



Rola badania cytogenetycznego w szpiczaku mnogim

**Czy łatwo i gdzie wykonywać badanie cytogenetyczne
i molekularne w szpiczaku mnogim?**



dr Barbara Pieńkowska-Grela
Samodzielna Pracownia Cytogenetyki, Centrum Onkologii-Instytut
im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa

Kraków 19.04.2010

Nowotwory z dojrzałych komórek B

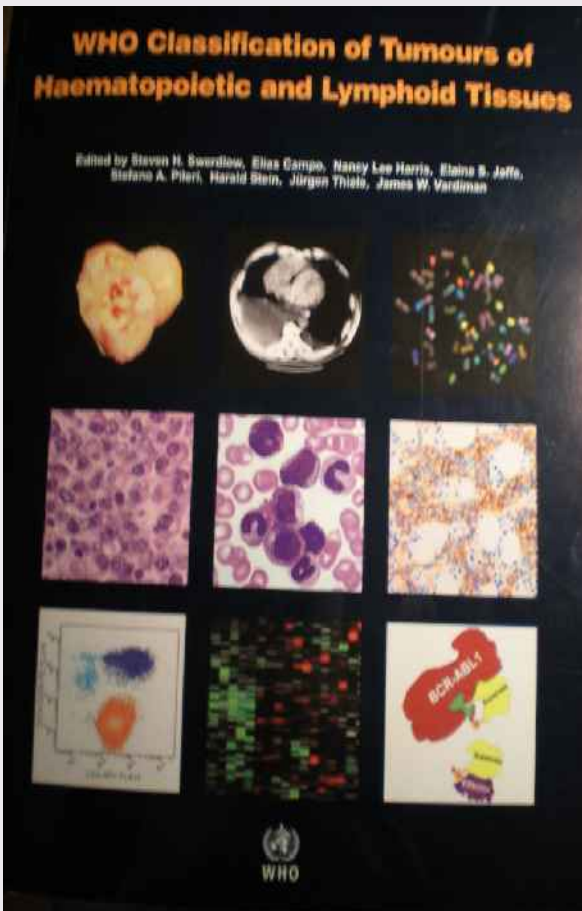
Nowotwory z komórek plazmatycznych

- Monoklonalne gammopatie (MGUS)
- Szpiczak plazmacytowy (*plasma cell myeloma*)

WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. S. H. Swerdlow et al, 2008, World Health Organization

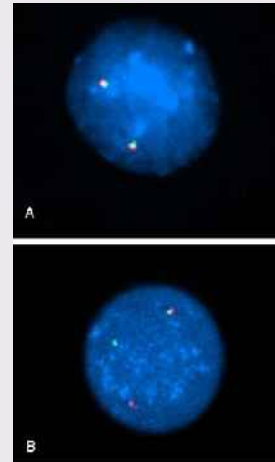
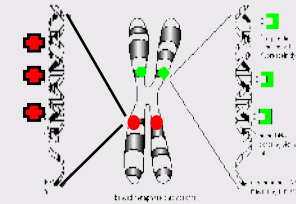
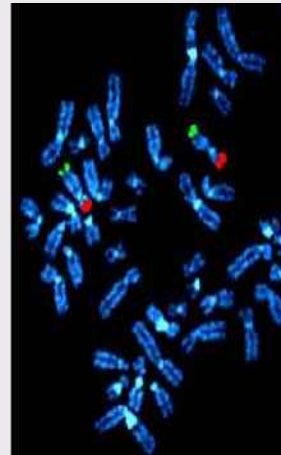
Cytogenetyczne aberracje w obu tych grupach są:

- jakościowo te same
- rzadsze w MGUS



Badanie kariotypu

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* FISH



MGUS



Zwykle prawidłowy kariotyp, trisomie - takie jak w szpiczaku

zmiany wykrywa FISH:

rearanż IGH t(11;14), t(4;14), t(14;16)
del(13q)

Plasma cell myeloma



Zmiany kariotypu w $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ przypadków. Zmiany ploidii (HYPO-, HYPER- diploidia): dodatkowe kopie chromosomów 3,5,7,9,11,15,19,21.

W FISH >90% ujawnia zmiany. Rearanżacje IGH z CCND1 (11q13), MAF (16q23), FGFR3(4p16), CCND3(6p21) MAFB(20q11), del(13q), del(17p)

Częstość aberracji w szpiczaku plazamacytowym

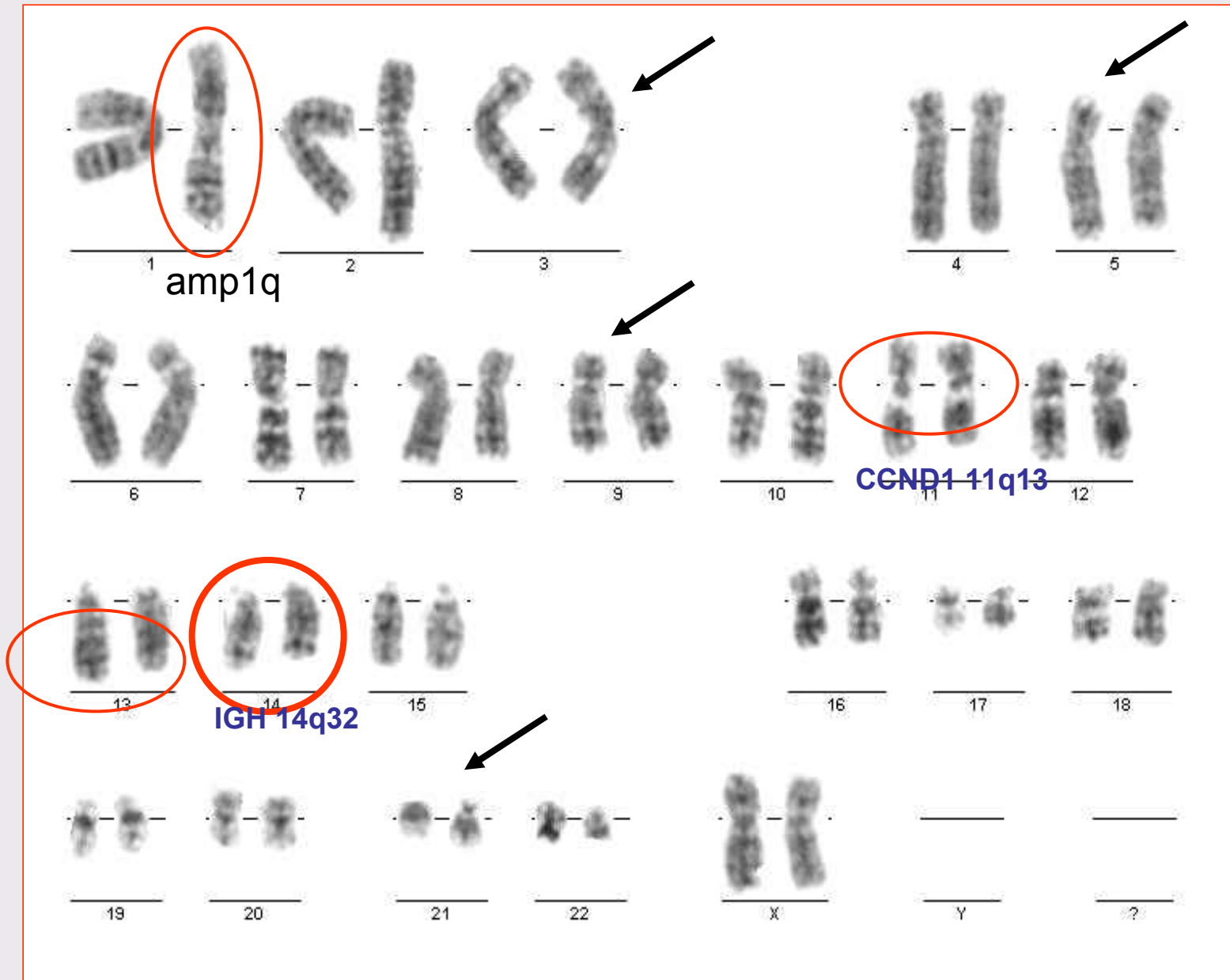
Aberracja	Częstość	Analizowana grupa pacjentów
• del(13)	48 %	(936)
• Hyperdiploidy	39 %	(657)
• t(11;14)(q13;q32)	21 %	(746)
• t(4;14)(p16;q32)	14 %	(716)
• <i>MYC</i> translocations	13 %	(571)
• del(17p)	11 %	(532)

KARIOTYP



**Kariotypy w MM są zwykle złożone,
często z licznymi aberracjami
liczby i struktury chromosomów.**

Typowe zmiany kariotypowe w szpiczaku



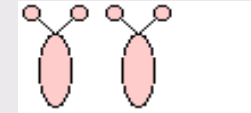
KARIOTYP

Aneuploidia: 67-90% przypadków ze zmianami

Hyperdiploid $>2n$ (lepsze rokowanie)

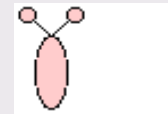
+3,+5,+7,+9,+11,+15,+19,+21

aberracje strukturalne - rzadkie



Hypodiploid $<2n$ (+hypotetraploid w wyniku powielenia komórek $<2n$)


kariotyp ze zmianami kompleksowymi i rearanżacjami 14q32, del13q14/-13 (przebieg agresywny).




Pacjenci bez zmian kariotypu wykazują istotnie dłuższą medianę przeżycia

W badaniu FISH >90% przypadków wykazuje obecność aberracji

Aberracje wykrywane w badaniu FISH

- rearanżacje IGH 14q32 u 55-70% pacjentów
 - CCND1 (11q13) 15-18%
 - FGFR3 (4p16) 15%
 - C-MAF (16q23) 5%
 - CCND3 (6p21) 3%
 - MAFB (20q11) 2%
- 

Te aberracje związane z brakiem **hyperdiploidii**

- del(13)(q14~34) ~50% przypadków
 - del(17p)
 - wtórne rearanżacje IGH lub IGL
 - rearanż. MYC, powielenie 1q, utraty 1p
- 

Te aberracje są cechami progresji nowotworu

Cytogenetyczne cechy rokownicze w szpiczaku

Czynniki złego rokowania:

- hypodiploidia i del(13q) w badaniu kariotypowym
- t(4;14)(p16;q32) (*FGFR3*)
- t(14;16)(q32;q23) (*C-MAF*)
- t(14;20)(q32;q11) (*MAF B*)
- del (17p) (*TP53*)

Czynniki dobrego rokowania:

- hyperdiploidia w badaniu kariotypowym
- t(11;14)(q13;q32) (*CCND1*)
- t(6;14)(p21;q32) (*CCND3*)

Przygotowanie materiału do analizy cytogenetycznej

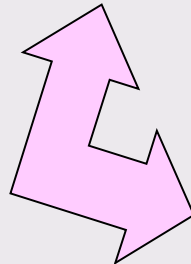
Materiał: SZPIK



Pobieranie materiału

**Jałowo!
Na heparynie!!**

H-P



Transport



Hodowla



in vitro



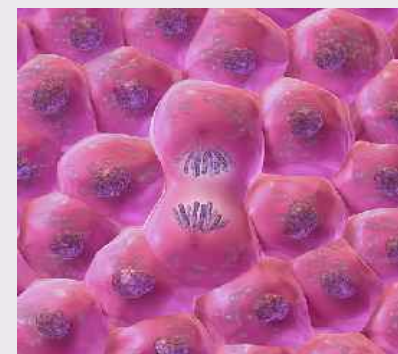
Analiza



Preparaty



Utrwalanie



PROBLEMY

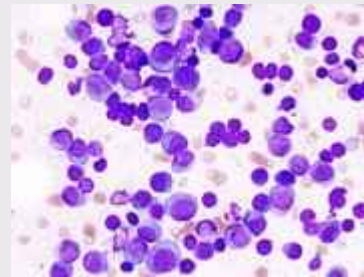
w karyotypowej analizie szpiczaka

1. Zawartość komórek plazmatycznych w szpiku

Komórki plazmatyczne w szpiczaku

Kryteria rozpoznania:

- obecność w biopsji tkankowej: **plazmocyty w szpiku > 30%**,
- białko monoklonalne:
3 500 mg% IgG (3,5 g/dl)
2 000 mg% IgA (2,0 g/dl)
1,0 g/24h łańcuchy lekkie w moczu.



Natomiast kryteria małe: **plazmocyty w szpiku 10 – 30 %**,

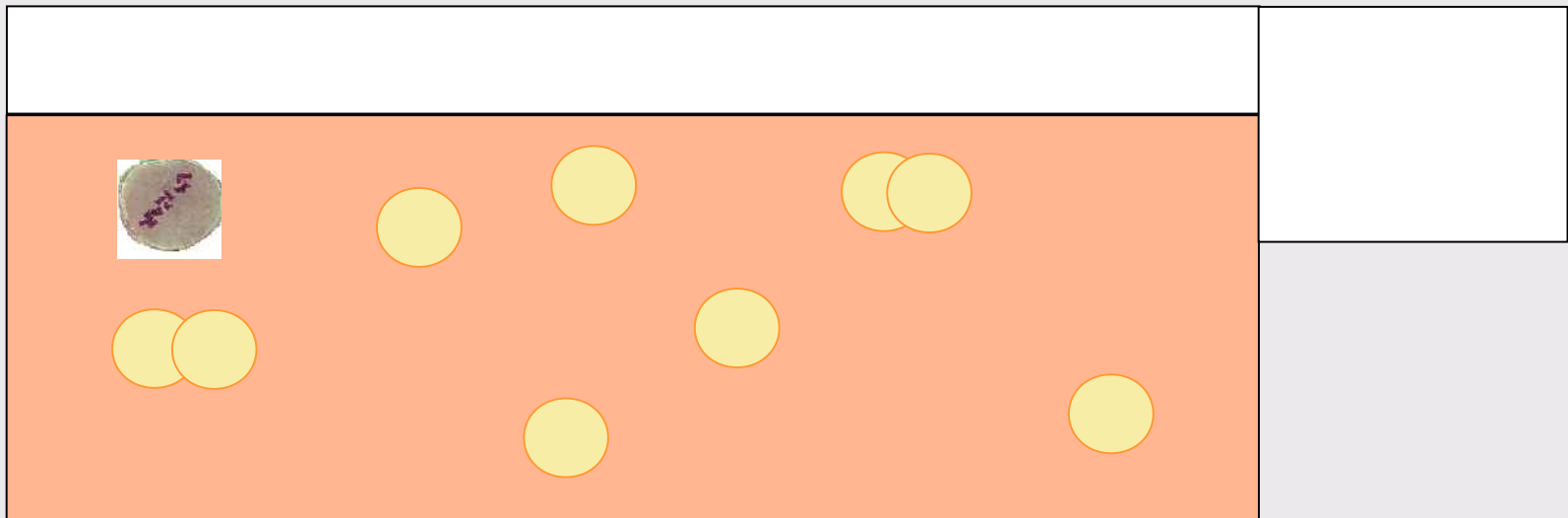
- białko monoklonalne w stężeniach mniejszych niż w kategorii kryteriów dużych,
- ogniska osteolityczne w kościach,
- stężenie prawidłowych immunoglobulin IgM < 50 mg%, IgA < 100 mg %, IgG < 600 mg%.

PROBLEMY

w kariotypowej analizie szpiczaka

1. Zawartość komórek plazmatycznych w szpiku
2. Wzrost komórek w hodowli *in vitro*

Hodowla *in vitro*



Uzyskany kariotyp prawidłowy

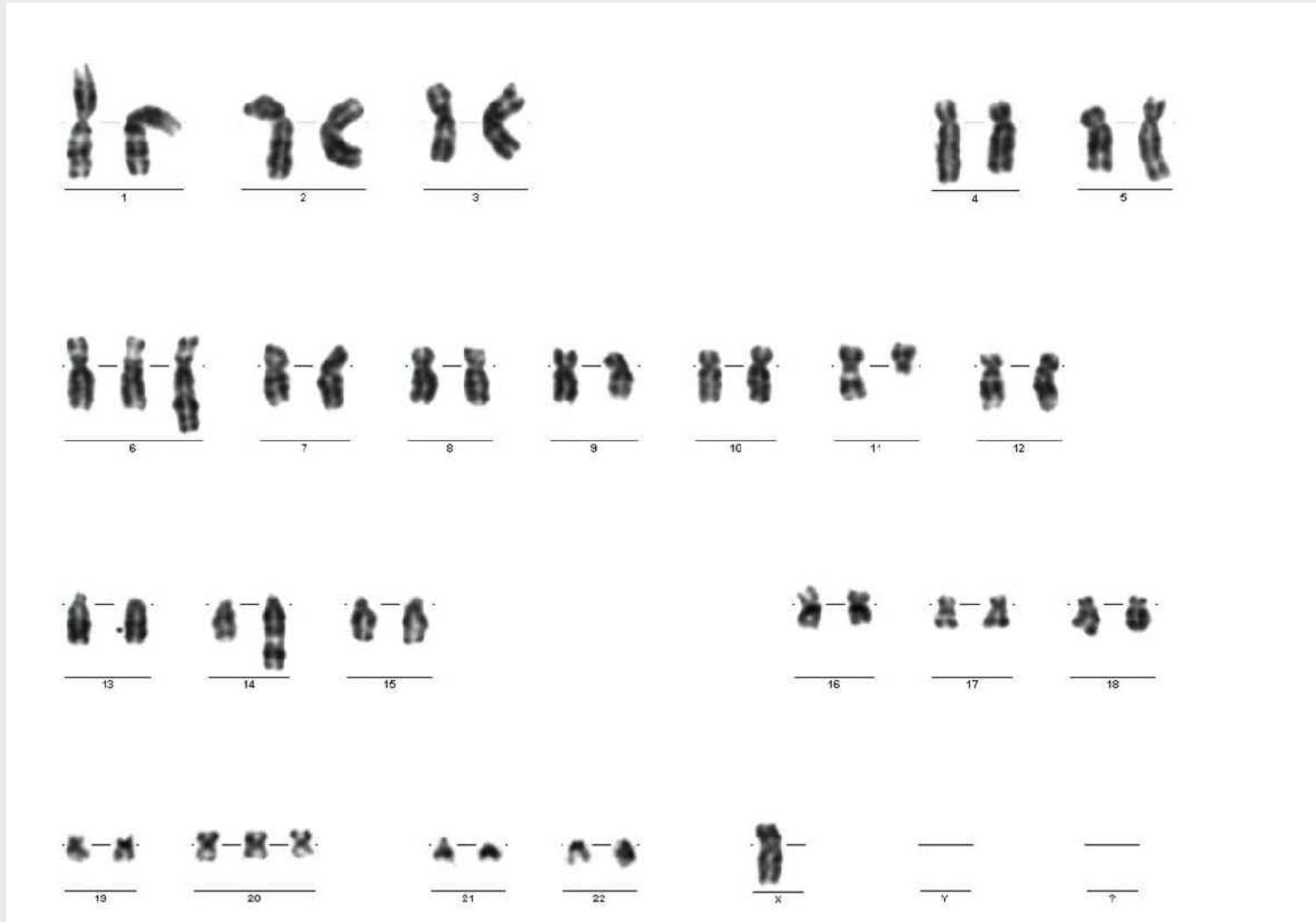
WĄTPLIWOŚĆ !!

PROBLEMY

w kariotypowej analizie szpiczaka

1. Zawartość komórek plazmatycznych w szpiku
2. Słaby wzrost komórek w hodowli *in vitro*
3. Kariotyp prawidłowy ► czy to komórka szpiczaka?

47,X,-Y,der(6)t(1;6)(q21;q16),t(11;14)(q13;q32),+20



PROBLEMY

w kariotypowej analizie szpiczaka

1. Zawartość komórek plazmatycznych w szpiku
2. Słaby wzrost komórek w hodowli *in vitro*
3. Kariotyp prawidłowy (plazmocyt) – aberracje ukryte

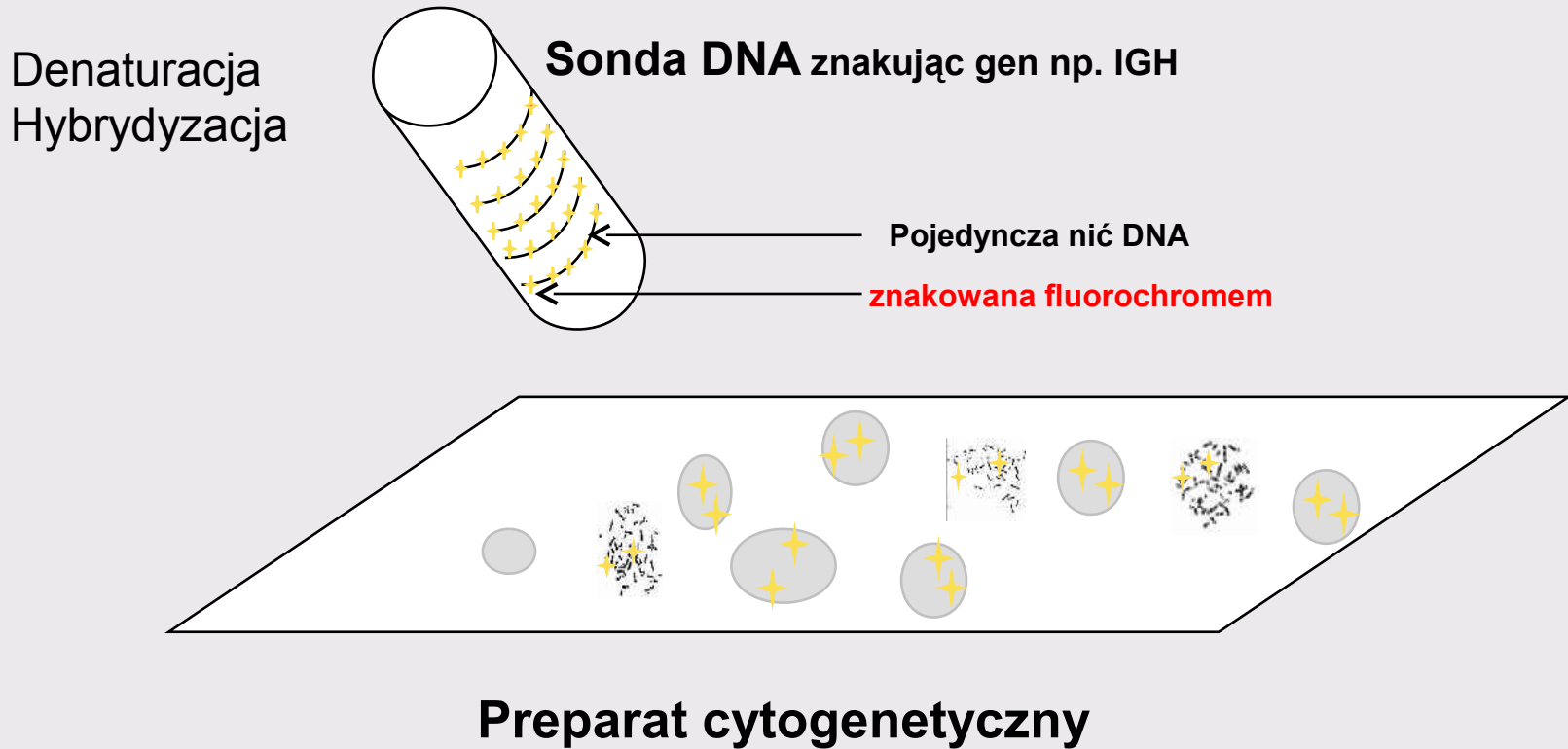
NIE ZOBACZYMY

- **t(4;14)(p16;q32) (*FGFR3*)**
- **t(14;16)(q32;q23) (*C-MAF*)**
- **t(14;20)(q32;q11) (*MAF B*)**
- **del (17p) (*TP53*)**

Wykrywanie zmian statusu genu (-ów)



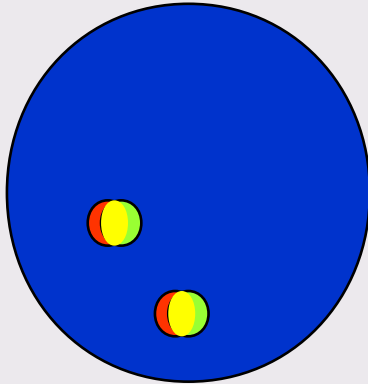
Procedura fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* FISH



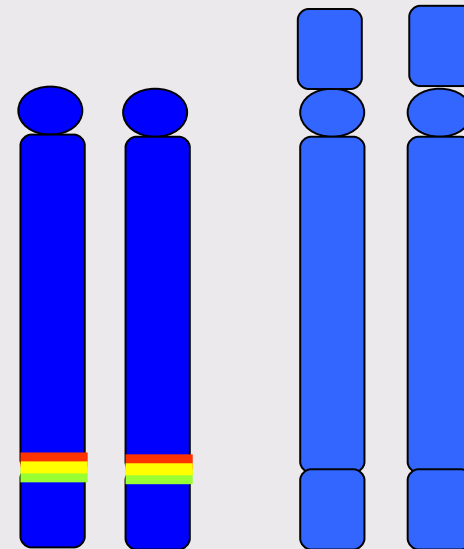
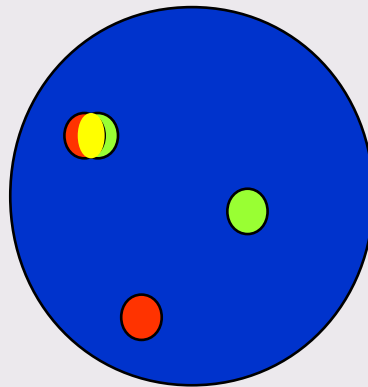
Ocena statusu IGH w badaniu FISH

NORMA

2 kopie kompletnego genu IGH – sygnał 2Y



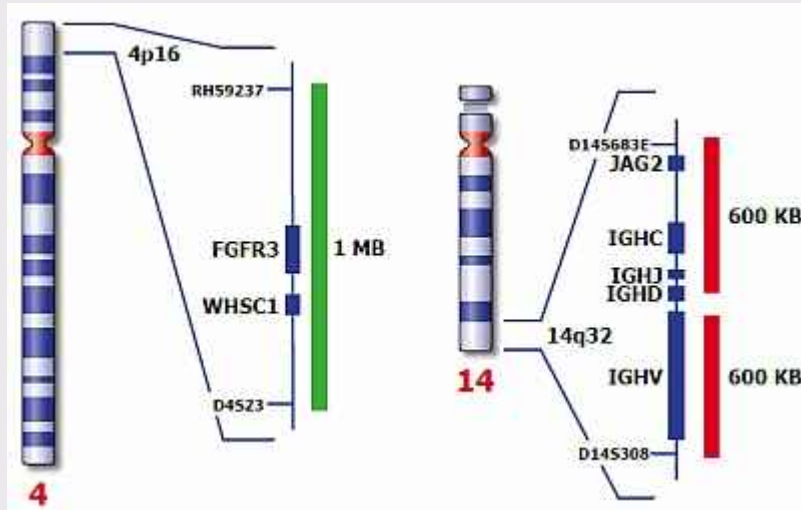
REARANŻACJA



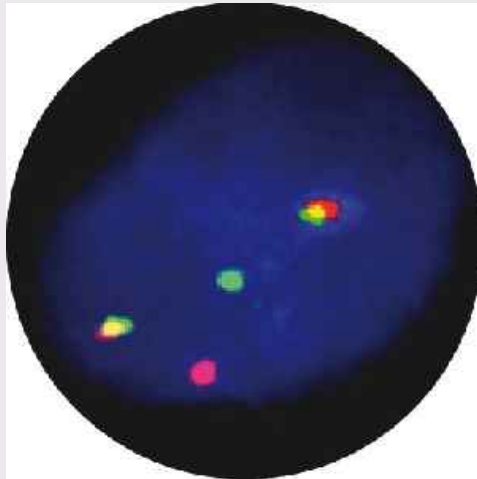
1 kopia kompletnego genu IGH – 1Y
Rozdzielenie sygnału 1R i 1G

MM

sonda **FGFR3/IGH**



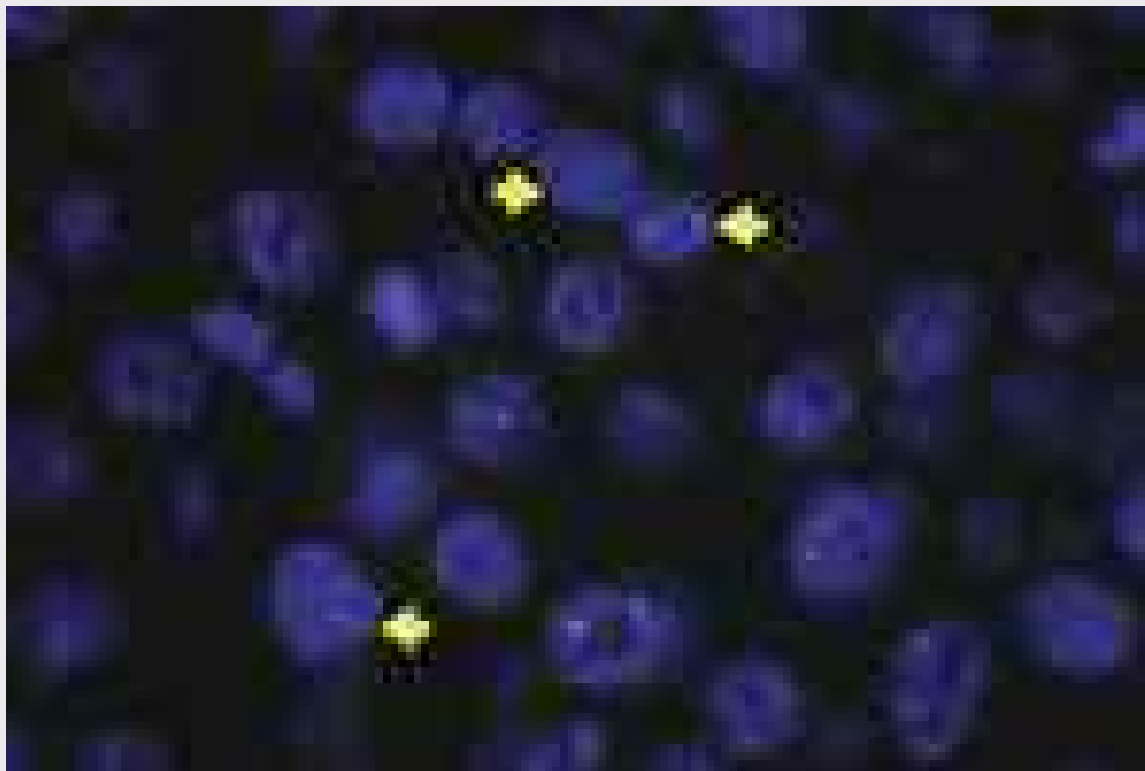
Fuzja **FGFR3/IGH**



PROBLEMY W BADANIU FISH

- Znakowanie FISH zachodzi w morfologicznie podobnych komórkach plazmatycznych i nie-plazmatycznych

3/45 <10% komórek ze zmianą

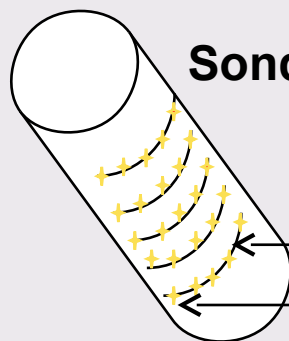


Poniżej granicy błędu

Znakowanie komórek plazmatycznych przeciwciałami Anty-Human Lambda i Kappa równocześnie z procedurą FISH

Anty-Human Lambda i Kappa

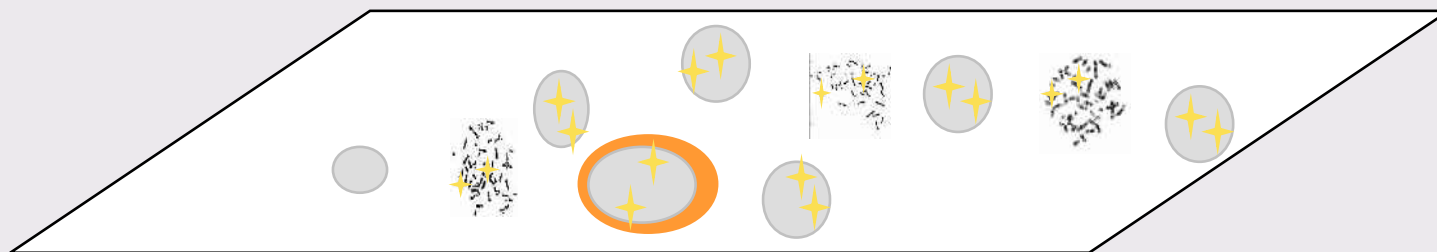
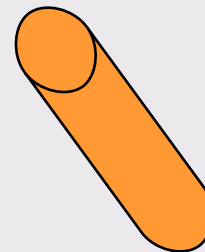
Denaturacja
Hybrydyzacja



Sonda DNA znakując gen np. IGH

Pojedyncza nić DNA

znakowana fluorochromem

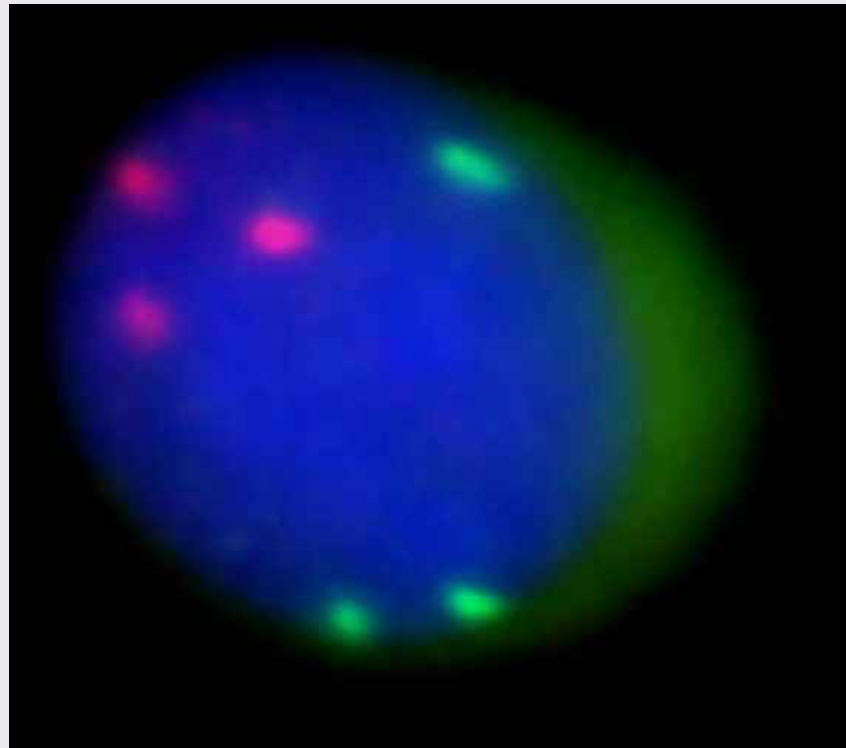


Preparat cytogenetyczny

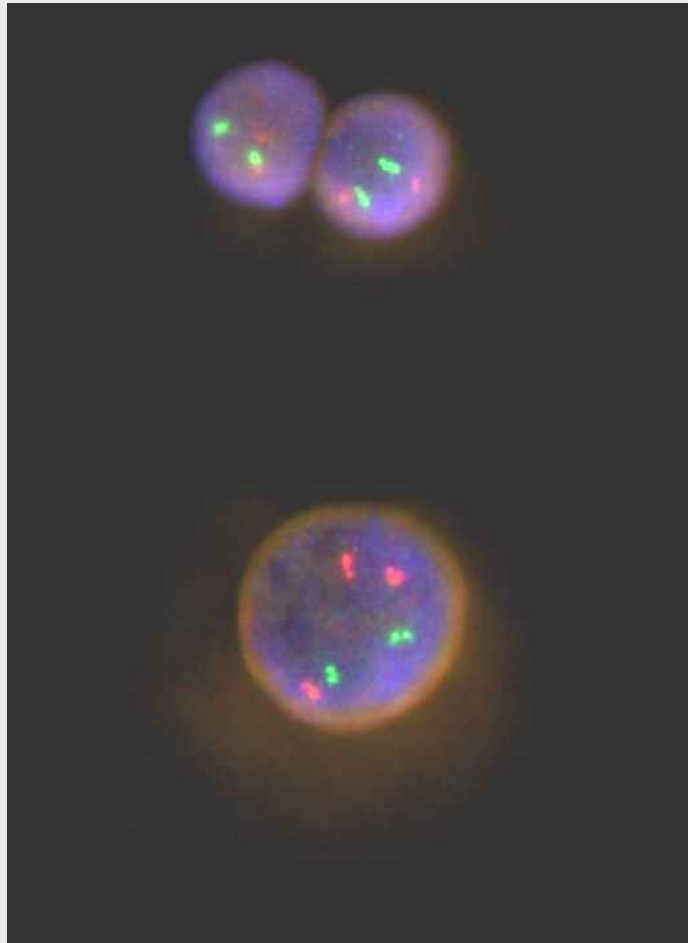
Znakowanie komórek plazmatycznych równoległe z badaniem FISH

Komórka plazmatyczna wyznakowana przeciwciałami Anty-Human Lambda i Kappa (Vector)

Widoczne trzy sygnały zielone pochodzące z centromeru 11 i trzy czerwone sygnały pochodzące z centromeru 3



1. powielenie liczby kopii genu *CCND1* (trzy sygnały czerwone) i dwie kopie genu *IGH* (dwa sygnały zielone) - w komórce plazmatycznej
2. prawidłowe znakowanie 2 kopie *CCND1* (dwa sygnały czerwone) i *IGH* (dwa sygnały zielone) – w komórce nie-plazmatycznej



BADANIE FISH

ISTOTNE KLINICZNIE

są zmiany niekosowe

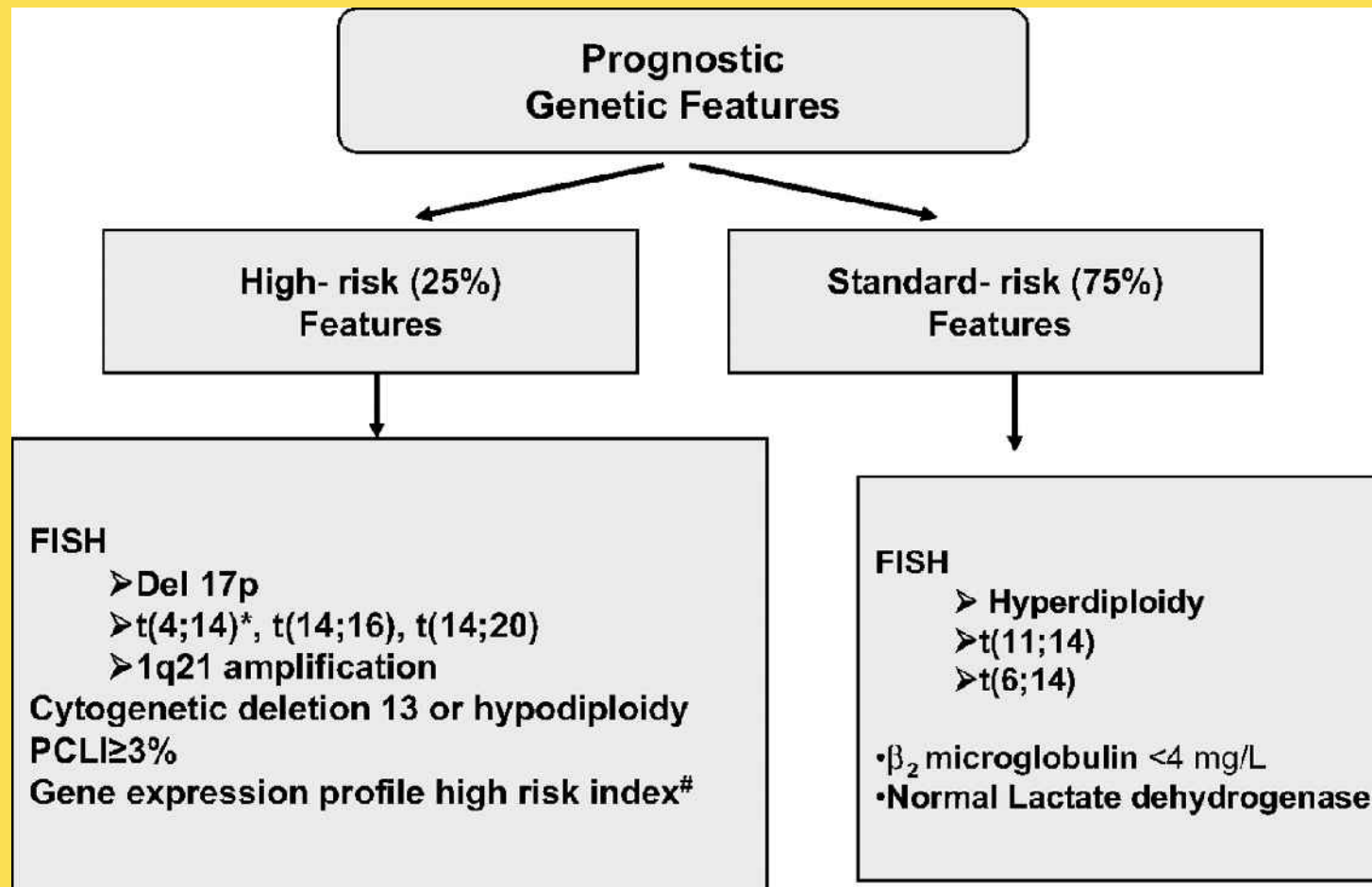
wykrywane w komórkach plazmatycznych

Granica błędu:

10% dla fuzji

20% dla delecji

Cytogenetyczne czynniki ryzyka



* Patients with t(4;14), β₂ microglobulin < 4 mg/L and hemoglobin 10 g/dL may have intermediate risk disease.
Dispenzieri et al. Mayo Clin Proc 2007;82:323-341, revised and update: June 2008

Zalecane badania FISH

1. Rearanżacja IGH

- Fuzja **IGH/MAF** złe rokowanie
- Fuzja **IGH/FGFR3** złe rokowanie
- Fuzja **IGH/CCND1** dobre rokowanie

1. Del **TP53** złe rokowanie

2. Del 13q14-q34 – złe rokowanie – **masywna delecja**

Implikacje terapeutyczne: (ciągle kontrowersyjne)

Pacjenci z grupy wysokiego ryzyka cytogenetycznego:

- Standardowa chemioterapia
- Wysokodawkowa chth
- Wysokodawkowa chth + autologiczny przeszczep szpiku (ASCT)

Niska skuteczność leczenia

- Podwójny ASCT

Wydłużenie czasu do progresji choroby (PFS) i całkowitego czasu przeżycia (OS)

NOWE LEKI

TALIDOMID skuteczny w grupie **wysokiego ryzyka cytogenetycznego**

Poprawa efektów leczenia z wyłączeniem pacjentów z del(17p) oraz del(13)+t(4;14)

LENALIDOMID nie zmienia efektów leczenia (?), z del(17) krótszy OS

BORTEZOMIB skuteczny w grupie **wysokiego ryzyka cytogenetycznego** (brak różnic u pacjentów z del(13q)?)

Gdzie wykonać badanie FISH w szpiczaku?



**Samodzielna Pracownia Cytogenetyki
Centrum Onkologii-Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie
02-781 Warszawa
Ul. Roentgena 5**

Pracownia Cytogenetyczna, Klinika Hematologii, UM, Łódź
Dr Ewa Wawrzyniak

Warunki wykonania badania:

**PO WCZEŚNIEJSZYM ZAPISIE TELEFONICZNYM:
tel (22) 546 26 49**

Terminy przyjmowania materiału:

Poniedziałek, wtorek środa, w godz. 8:30 – 14:00

Materiał:

szpik kostny (2 ml) pobrany jałowo do probówek z heparyną litową (np. Sarstedt, Nr kat.01.1604.001)

Metody:

KARIOTYPOWANIE, FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja in situ) – zestaw sond DNA

Warunki wykonania badania (cd.):

Transport:

Transport materiału - jak najszybsze dostarczenie go do Pracowni Cytogenetyki, z zabezpieczeniem sterylności i szczelności próbek, w stałych warunkach termicznych.

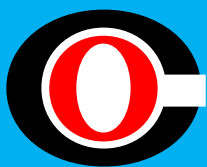
Przesyłka kurierska do pracowni cytogenetycznej w stałych warunkach temperatury (+4°C +8°C) **NIE ZAMRAŻAĆ!**

Czas dostarczenia do pracowni nie dłużej niż 24 godz. od pobrania materiału

Ze skierowaniem od lekarza prowadzącego i akceptacją dyrekcji

Warunki wykonania badania (cd.):

Skierowanie:



<http://www.coi.pl/>

Menu Główne

Strona główna

Aktualności

O nas

Dyrekcja

Rada Naukowa

Historia

Działalność

Struktura

Dla Pacjentów

Zamówienia Publiczne

Polityka ZSZ

Zjazdy, Sympozja, Konferencje

Serwer Pocztowy

Kontakt

Linki

Oferty pracy, konkursy

Czasopismo Nowotwory

Działalność usługowa



Dostępne badania FISH:

- **IGH BAR** **14q32 rearanżacja**
- **CCND1/IGH** **t(11;14) fuzja**
- **IGH/FGFR3** **t(4;14) fuzja**
- **IGH/MAF** **t(14;16) fuzja**

13q14 region

delecja 13q14

13q34 region

masywna delecja

17p13 TP53

delecja

Dziękuję za uwagę ..

CENNIK

L. p.	Rodzaj badania	Cena 2010
	FISH – czynniki prognostyczne w SLL/CLL (TP53/ATM /+12/13q14)	1200,00
	FISH - PLAZMOCYTY panel podstawowy (IGH/TP53/13q)	2100,00
	FISH - PLAZMOCYTY panel dodatkowy (fuzje CCND1/MAF/FGFR3)	1900,00
	FISH na materiale archiwalnym (skrawki parafinowe)	900,00

Genetic subtype (prevalence)	Ploidy	Prognosis	HC	LC	CD20	Mutation ras	$\Delta 13$	Bone disease	CCND
t(14;16) and other MAF (5-8% cases)	NH	Poor	IgA	λ	+/+	-	+++	+/-	CCND2
t(4;14) (15% cases)	NH/n	Poor	IgA	λ	-	-	+++	+/-	CCND2
t(11;14) and CCND2/3 (16-20% cases)	NH	Neutral/Good	IgG	κ/λ	+++	++	+/+	++	CCND1 CCND3
Hyperdiploid (45% cases)	H	Neutral/Good	IgG	κ	-	++	+/-	++	CCND1 >CCND2

R. Fonseca. Multiple myeloma and FISH (but no CHIPS)

Blood, 2007, 109, 3132-3133.

Prognostic value of chromosomal abnormalities (univariate analysis)

Genomic aberration	Impact on EFS, mo* (<i>P</i>)	Impact on OS
del(13)	29 vs 41 (< .001)	68% vs 83% (< .001)
t(11;14)(q13;q32)	35 vs 34 (.2)	80% vs 74% (.28)
t(4;14)(p16;q32)	20.6 vs 36.5 (< .001)	41.3 months vs 79% (< .001)
Hyperdiploidy	37 vs 33 (.02)	82% vs 70% (.006)
MYC translocations	35 vs 37 (.94)	72% vs 78% (.50)
del(17p)	15 vs 35 (< .001)	22 months vs 75% (< .001)

- * Median EFS for patients presenting the chromosomal abnormality versus that of those who did not present the genomic aberration.
- Median OS for patients presenting the chromosomal abnormality versus that of those who did not present the genomic aberration. When the median was not attained, we did calculate the percentage of patients alive at the time of median follow-up (ie, 41 months).

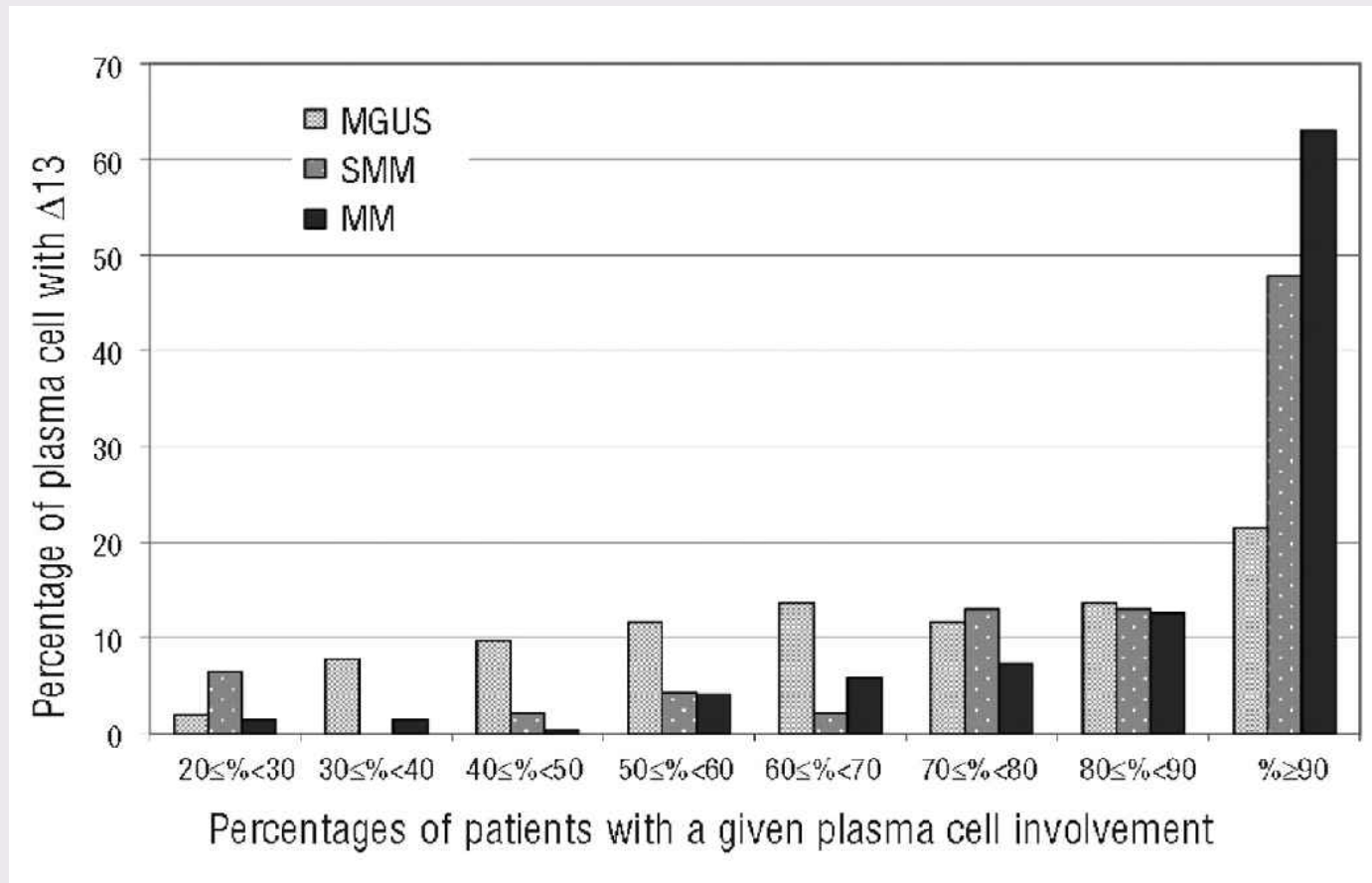
Poor cytogenetyczne:

- Chromosome 1q amplification (one of the most common genetic abnormalities in my-eloma), deletions of chromosomes 1p and 13
- Risk of conversion to overt disease related to these two genetic abnormalities
- Pts with both elevated expression of genes on chromosome 1q and reduced expression of genes on 1p (13%) have a very short survival
- Absence of chromosome 1 abnormalities but with deletions of chromosomes 8 and 13

Good risk genetics

- Hyperdiploidy (~40-60%) (trisomies of chromosomes 3, 5, 9, 11, 15, 19, 21)
 - 2 groups: trisomies listed above and additionally gains of chromosomes 1q and 7, deletion of chromosome 13, absence of trisomy 11
- Cyclin D translocations (t[11;14] (15-20%) and t[6;14] (18%))
- (~75% and if eligible do well with high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation)

Figure 1. Distribution of the percentages of abnormal plasma cells with del 13 in patients found positive for the abnormality, among the three groups of patients



Chiecchio, L. et al. *Haematologica* 2009;94:1708-1713

Table 3. Association between Del(13) and the different chromosomal abnormalities

	$\Delta 13$			<i>p</i> value
	MGUS	SMM	MM	
<i>IgH</i> rearrangement	26/76 (34%)	22/43 (51%)	110/182 (60%)	MGUS <i>vs.</i> MM <i>p</i> <0.001
t(4;14)	6/7 (86%)	13/16 (81%)	45/48 (94%)	
t(6;14)	0/2	0/1	4/6 (67%)	
t(11;14)	1/28 (3.6%)	2/13 (15%)	21/53 (40%)	MGUS <i>vs.</i> MM <i>p</i> <0.001
t(14;16)	4/6 (67%)	3/4 (75%)	11/15 (73%)	
t(14;20)	5/9 (56%)	0	7/9 (78%)	
Hyperdiploid	11/71 (15%)	14/68 (21%)	74/219 (34%)	MGUS <i>vs.</i> MM <i>p</i> =0.003
Non-hyperdiploid	32/101 (32%)	22/42 (52%)	109/164 (66%)	MGUS <i>vs.</i> MM <i>p</i> <0.001 MGUS <i>vs.</i> SMM <i>p</i> =0.02

Chiecchio, L. et al. *Haematologica* 2009;94:1708-1713

PROCEDURA

Materiał z hodowli 24-godzinnej zawiesić w **etanolu 96%**;

Przygotować 4 preparaty kapiąc po dwa pola (pod dwie sondy).

Wysuszyć przez noc na powietrzu lub cieplarnie.

Inkubacja preparatów w 10mM buforze cytrynianowym o pH=6.0, temp. 95st.C , 10 minut.

Studzenie preparatów w tym samym kominku na powietrzu przez 30 minut

Płukanie w PBS (bez jonów Mg i Ca) 2 x 2 min., RT.

Nałożenie przeciwciał Anti-Human Kappa + Anti-Human Lambda wg. przepisu producenta
inkubacja w 37 st. C 30 minut.

Płukanie w PBS (bez jonów MG i Ca) 2 x 2 min., RT

Odwodnienie w szeregu alkoholi (70%, 80%, 96%) po 2 min.

Nałożenie sond (wg. przepisu producenta)

. Kodenaturacja 72 st.C 5 minut.

Dalej standardowa procedura FISH.

MUTACJE

A number of onco/tumor suppressor genes such as *ras* 7-11 *FGFR3*, 12 *c-maf*, 13 *MUM1*, 14 *cyclin D1*, 15 *p53*, and *pRb* 16 have been implicated in the pathogenesis of multiple myeloma (reviewed in Hallek et al and Berenson et al). **Blood. 2001;98:1555-1560**)