

КЛИНИЧНИ СЛУЧАИ

CASE REPORTS

ПРЕИМУЩЕСТВАТА НА ГЕНОМНОТО СКЕНИРАНЕ ЗА ДИАГНОСТИКА ПРИ ПАЦИЕНТИ С МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ

T. Boneva¹ и E. Начева²

¹Цитогенетична лаборатория, Военномедицинска академия – София

²Molecular Cytogenetics Laboratory, UCL Medical School, Royal Free Campus – London

THE ADVANTAGE OF GENOME SCANNING FOR DIAGNOSIS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

T. Boneva¹ and E. Nacheva²

¹Cytogenetics Laboratory, Military Medical Academy – Sofia

²Molecular Cytogenetics Laboratory, UCL Medical School, Royal Free Campus – London

Резюме: През последните години се натрупаха достатъчно данни, които показват, че патогенезата и клиничното протичане на мултипления миелом (ММ) са свързани с отделни генетични нарушения. Заболяването се характеризира с комплексни генетични нарушения, които по същество отразяват не само патогенезата му, но и определят прогностичната хетерогенност на установените аберации. В това съобщение ние представяме 2-ма пациенти с ММ. Използвани са техниките: изолиране на CD138+ клетки, FISH и aCGH. Целта е да демонстрираме диагностичните възможности на aCGH, предимствата и недостатъците на всяка от тях при установяване на хромозомни аберации с клинично и терапевтично значение. Дискутираме необходимостта от прилагането му за получаване на максимална информация за хромозомните аберации с клинично и терапевтично значение.

Ключови думи: мултиплен миелом, хромозомни аберации, геномен профил

Адрес за кореспонденция: Д-р Теменужка Бонева, Цитогенетична лаборатория, Катедра по клинична лаборатория и имунология, ВМА, ул. "Св. Г. Софийски" № 3, 1606 София, e-mail: dr_t.boneva@abv.bg

Summary: Multiple myeloma (MM) is characterized by neoplastic transformation of mature B cells in the bone marrow. It is heterogeneous disease at both the clinical and genetic levels. Recent advances in molecular genetics and genomic studies have demonstrated that the disease evolution is associated with specific genetic aberrations, which not only shed light on the pathogenesis of MM but allows risk assessment and treatment monitoring. Here we present 2 patients investigated by FISH and whole genome screening aiming to devise a diagnostic algorithm to offer a comprehensive genomic profiling of MM.

Key words: multiple myeloma, chromosome aberrations, genome profiling

Address for correspondence: Temenuzhka Boneva, MD, Cytogenetics Laboratory, Department of Clinical Laboratory and Immunology, VMA, 3 G. Sofiyski St., Bg-1606 Sofia, e-mail: dr_t.boneva@abv.bg

Мултиплиеният миелом (ММ) спада към групата на зрелите В-клетъчни неоплазии. Той се характеризира с клонална пролиферация на терминално диференцирани плазмоцити в костния мозък (КМ), които секретират моноклонален протеин. ММ е инвалидизираща малигна хемопатия и е част от спектъра заболявания, вариращи от моноклонална гамопатия с неизвестен произход (MGUS) до плазмоклетъчна левкемия. Диагностичните критерии за доказването му са дефинирани в препоръките на СЗО: М-протеин в серум или урина, присъствие на плазмоклетъчна пролиферация в КМ над 10% и данни за органно или

тъканно засягане (хиперкалциемия, анемия, костни лезии, бъбречна недостатъчност) [2].

При това заболяване се наблюдават различни комплексни генетични нарушения, които по същество отразяват не само патогенезата на заболяването, но и прогностичната им хетерогенност. Установените цитогенетични и молекулярнобиологични промени потвърдиха, че заболяването включва различни клинични и прогностични субгрупи. Съобразно кариотипните промени ММ може да бъде разделен на две основни групи: пациенти с хипердиплоиден кариотип (хромозомен брой 48-75) и с нехипердиплоиден кариотип

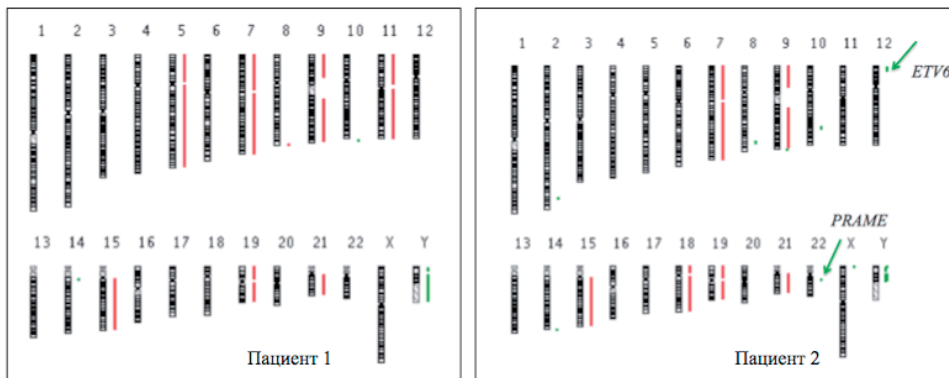
(хромозомен брой под 48 и/или над 75). Първата група обединява случаи, при които има допълнителни хромозоми, най-често +3, +5, +7, +9, +11, +15, +19 и +21, и по-рядко се срещат структурни аномалии (при около 10% от случаите). За втората група са характерни комплексни структурни аномалии, често асоциирани с 14q32 преобразувания (50-70%) и -13/13q-. Пациентите с хипердиплоиден кариотип са с по-дълга преживяемост, докато при хиподиплоидния кариотип се установява по-агресивна еволюция.

Генетичните методи, използвани рутинно в практиката за установяване на описаните хромозомни аберации, са конвенционален цитогенетичен анализ (G-banding) и флуоресцентна in situ хибридизация (FISH). С въвеждането през последното десетилетие на по-съвременни техники, като сравнителна геномна хибридизация (aCGH) върху олиго-ДНК микрочипове, диагностичните възможности се увеличиха значително. Това подобри възможността за индивидуализиране на терапевтичния подход при всеки пациент с ММ.

Ние представяме два случая с ММ, които демонстрират възможностите на aCGH като съвременен диагностичен метод в практиката. CD138(+) плазмоцити са изолирани чрез магнитно белязване с помощта на MACs клетъчен сепаратор (Miltenyl Biotec). FISH анализ е извършен върху фиксирани препарати от изолираните плазмоцити. Използвани са локус-специфични ДНК сонди за следните райони: 13q14/13qter, 14q32 break apart, p53/CEP17

(Cytocell). Геномната ДНК, необходима за aCGH анализа, е получена от CD 138(+) плазмоцити. Използвани са олигонуклеотидни микрочипове, формат 60K (Agilent, USA). Микрочиповете са скенирани на двуканален лазерен скенер, а данните са обработени с програмата Agilent's Genomic Workbench Lite Edition 6.0. Получените резултати са графично представени с геномни адреси съобразно HG 19.

И при двата случая FISH анализът беше негативен за тестваните локуси, но aCGH показва данни за хипердиплоиден кариотип. При пациент 1 (Case 938 – новооткрит миелом) общият брой на геномните аберации е 19, от които: тризомии на хромозоми № 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21 и загуба на Y. Заключение – хипердиплоиден кариотип с добра прогноза. При пациент 2 (Case 902 – рецидив) общият брой на геномните аберации е 36. Допълнително копие на хромозоми № 7, 9, 15, 18, 19 и 21 показва хипердиплоиден кариотип, но установените загуби в райони 12p13, 14q32 и 22q11.22 променят съществено прогнозата на този пациент (фиг. 1). В 12p13 локуса са локализирани редица онкогени, включително и ETV6. Наличието на делеция на ETV6 самостоятелно или в комбинация с други геномни промени е важен прогностичен маркер при пациенти с миелом, асоцииран с лоша прогноза [1]. В район 22q11.22 се намира друг онкоген PRAME. Генната му експресия при пациенти с ММ позволява да се използва като маркер за хода на заболяването, за оценка на ремисията и маркер за минимална резидуална болест [3].



Фиг. 1. Молекулярен кариотип на CD138(+) плазмоцити от костен мозък на пациенти 1 и 2 с диагноза мултиплен миелом. Геномните промени са представени чрез диаграми, като линиите от дясната страна на всяка хромозома отразяват размера на аберациите. В червено са представени районите с амплификация в генома, а в зелено – загубите. Стрелките в молекулярния кариотип при пациент 2 посочват загубата на зони, които съдържат онкогените ETV6 и PRAME с доказана прогностична значимост

Тези два случая са показателен пример за възможностите на сравнителната геномна хибридизация. Скринингът на целият геном чрез aCGH предоставя максимална информация на високо-резолюционно ниво за клинично значимите геномни промени. В рамките на един тест може да бъде подпомогнат клиницистът за вземане на решение за оптимален терапевтичен подход при всеки пациент.

Ние препоръчваме прилагането на този метод рутинно в практиката, като първа линия за диагностика и проследяване на пациенти с миелом.

Библиография

1. Avet-Loiseau, H. et al. Prognostic significance of copy-number alteration in multiple myeloma. – J. Clin. Oncol., **27**, 2009, 4585-4590.
2. Swerdlow, S. H. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon, 2008.
3. Abramenko, I. V. et al. Expression of PRAME gene in multiple myeloma. – Ter. Erkh., **76**, 2004, № 7, 77-81.