Barbara **Pieńkowska-Grela**, Beata **Grygalewicz**

4. ZMIANY CYTOGENETYCZNE I MOLEKULARNE W SZPICZAKU PLAZMOCYTOWYM

W ostatnich latach odnotowano znaczący postęp w leczeniu pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym (PCM) [1, 2, 3]. Nadal jednak obserwuje się duże zróżnicowanie reakcji poszczególnych pacjentów na zastosowane leczenie. U niektórych chorych nie udaje się uzyskać remisji, podczas gdy inni mogą przeżyć kolejne 15 lat bez objawów choroby. Tę niejednorodność reakcji tłumaczy się znacznym zróżnicowaniem biologicznym choroby. Dalsze losy pacjenta można, przynajmniej częściowo, przewidzieć dzięki określeniu czynników prognostycznych. Obok oceny stadium klinicznego najbardziej znaczące informacje pozwalające na prognozowanie przebiegu choroby uzyskuje się w wyniku badania cytogenetycznego [4].

Komórki nowotworów wywodzących się z komórek plazmatycznych (*plasma cell neoplasms* – PCN) charakteryzują się występowaniem rozmaitych zaburzeń genetycznych, dostrzeganych jako aberracje struktury chromosomu, genu czy DNA. Obecność tych zmian ograniczona jest do populacji plazmocytów, które w prawidłowym szpiku stanowią stosunkowo niewielką część, co najwyżej 2% elementów komórkowych. W PCN odsetek ten zmienia się wraz ze stadium choroby (tab. 4.1). Dotychczasowe badania ujawniły rosnącą komplikację zmian genomowych w trakcie rozwoju choroby: od gammapatii monoklonalnej o nieustalonym znaczeniu (*monoclonal gammopathy of unknown significance* – MGUS), poprzez tlącą postać szpiczaka (*smoldering myeloma* – SMM), do pełnoobjawowego szpiczaka plazmocytowego (*plasma cell myeloma* – PCM; *multiple myeloma* – MM) czy białaczki plazmocytowej (*plasma cell leukemia* – PCL).

Jednak w materiale szpiku pobranego od pacjenta liczba komórek obciążonych zmianami może być niewielka, co w znaczący sposób utrudnia diagnostykę. W zależności od zastosowanej metody obecność aberracji wykrywa się z rozmaitą częstością: od 30% (w badaniu kariotypowym) do ponad 95% chorych w badaniach *SNP-array* (polimorfizm pojedynczego nukleotydu, *single nucleotide polymorphism* – SNP) [5].

Tabela 4.1. Odsetek plazmocytów w badanej tkance

Typ	Odsetek plazmocytów
Zdrowy szpik	0,2-2%
Gammapatia monoklonalna (MGUS)	≤ 10%
Postać tląca szpiczaka (SMM)	≥ 10%
Pełnoobjawowy szpiczak plazmocytowy (PCM)	≥ 30%
Białaczka plazmocytowa (PCL)	Plazmocyty we krwi ≥ 20%

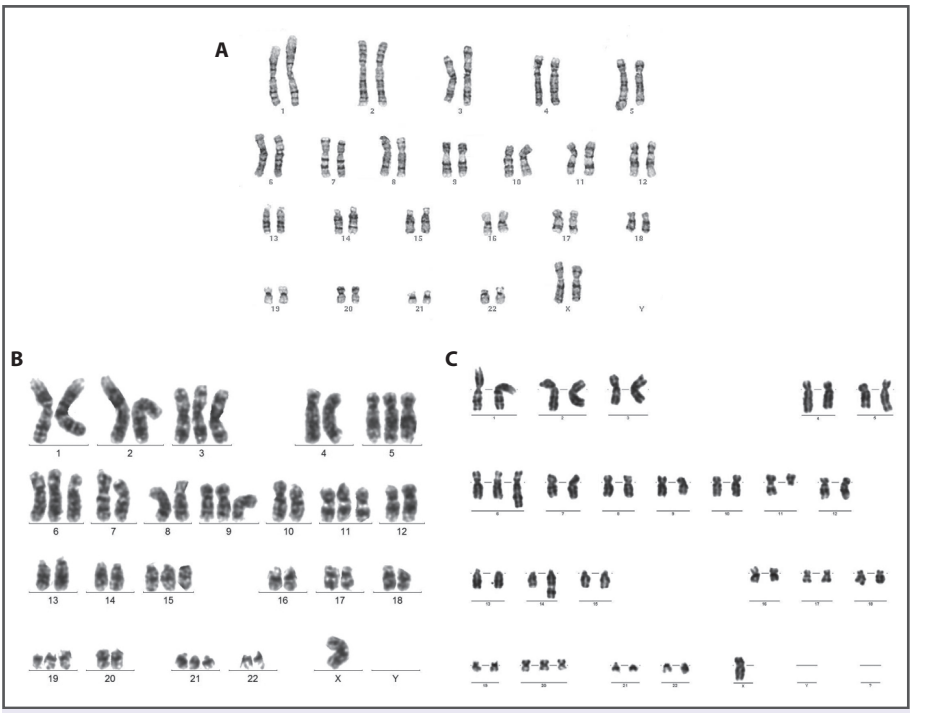
Metody detekcji zaburzeń genetycznych i ich ograniczenia

W wielu nowotworach podstawowym badaniem wykonywanym w celu oceny zmian genetycznych pozostaje badanie kariotypowe. Analiza kariotypu polega na ocenie morfologii chromosomów **metafazowych**, barwionych różnicowo **metodą GTG (*G-bands by trypsin using Giemsa*),** i wychwyceniu odstępstw od prawidłowego wzorca (ryc. 4.1).

Nowsze techniki badawcze, w tym fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (*fluorescent in situ hybridization* – FISH), porównawcza hybrydyzacja genomowa (*comparative genomic hybridization* – CGH, *array*-CGH) czy zaawansowane techniki molekularne, takie jak badanie profilu ekspresji genów (*gene expression profiling* – GEP), znacznie rozszerzyły granice poznania, pozwalając na lepszy wgląd w genetykę szpiczaka. Prawidłowo przeprowadzona diagnostyka genetyczna, mająca na celu oszacowanie ryzyka, jest narzędziem użytecznym w optymalizacji leczenia pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym [6, 7].

Analiza kariotypowa

Analiza kariotypowa umożliwia ocenę zmian morfologii chromosomów metafazowych zarówno ilościowych, jak i jakościowych, a ich lokalizacja pozwala wiązać określone aberracje z zaburzeniami określonych genów. Jest to więc metoda analizy całościowej, obciążona jednak pewnymi niedogodnościami. Ograniczeniem metody jest stosunkowo niski poziom detekcji zaburzeń. W przypadku szpiczaka wymienia się dwie główne przyczyny uzyskiwania fałszywie ujemnych wyników badania kariotypowego. Po pierwsze: rutynowa analiza kariotypu pozwala wykryć klony komórek stanowiące około 20% badanej populacji. Plazmocyty natomiast opornie dzielą się w warunkach *ex vivo*, zatem u znacznej części pacjentów prawidłowe kariotypy uzyskiwane z oceny hodowanych komórek szpiku obrazują populacje dzielących się, prawidłowych komórek mieloidalnych [12]. Po drugie: analizę kariotypową cechuje stosunkowo niska rozdzielczość: wykrywane są aberracje angażujące fragmenty większe niż (średnio) 800 x 10^3 par zasad. Znaczna część aberracji typowych dla szpiczaka plasuje się poniżej tej granicy rozdzielczości. Można natomiast jednoznacz-



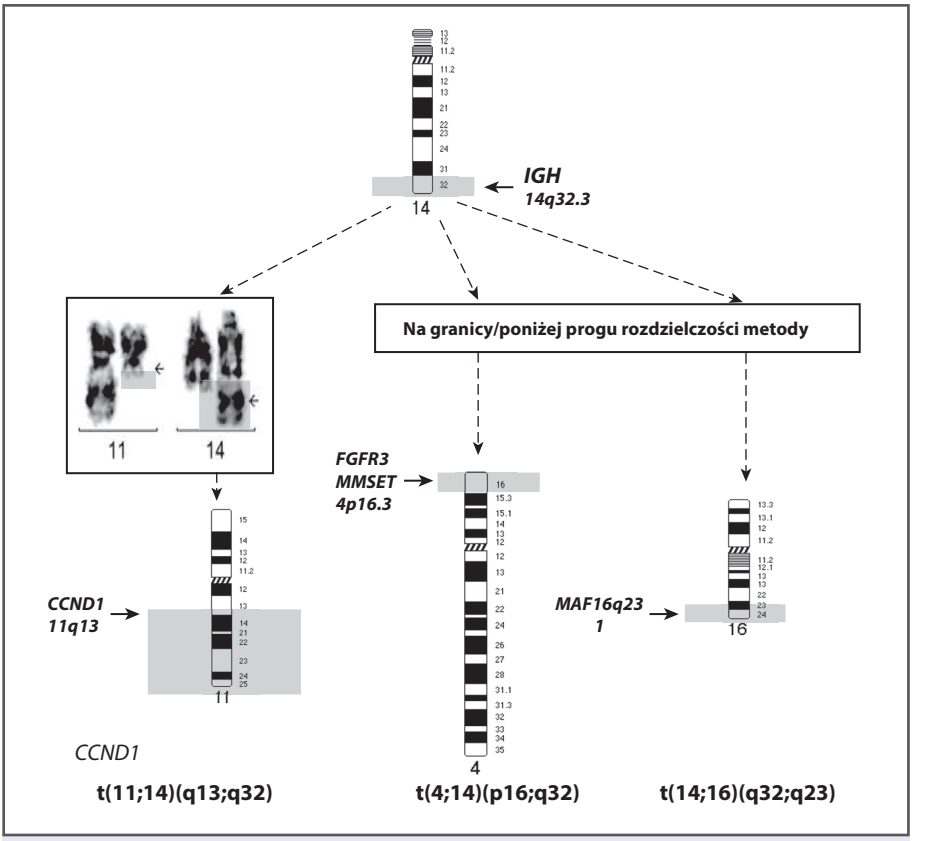
Ryc. 4.1. Kariotyp komórek szpiczaka: diploidalny, bez widocznych aberracji (A), kariotyp hiperdiploidalny z powieleniem kopii chromosomów (B), kariotyp pseudodiploidalny ze zmianami strukturalnymi (C).

nie wykazać zmiany liczby kopii poszczególnych chromosomów i ploidii (ryc. 4.1 B). Ocena zmian struktury chromosomów bywa trudniejsza (ryc. 4.2). Niektóre z aberracji są wyraźnie widoczne nawet w metafazach o słabszej rozdzielczości prążkowej, inne ujawniają się jedynie w przypadku metafaz szczególnie dobrej jakości, jeszcze inne – pozostają poniżej progu detekcji metody.

Zważywszy na te ograniczenia w genetycznej diagnostyce szpiczaka, zaleca się rutynowe stosowanie metody FISH uzupełnionej, w miarę możliwości, badaniem kariotypowym.

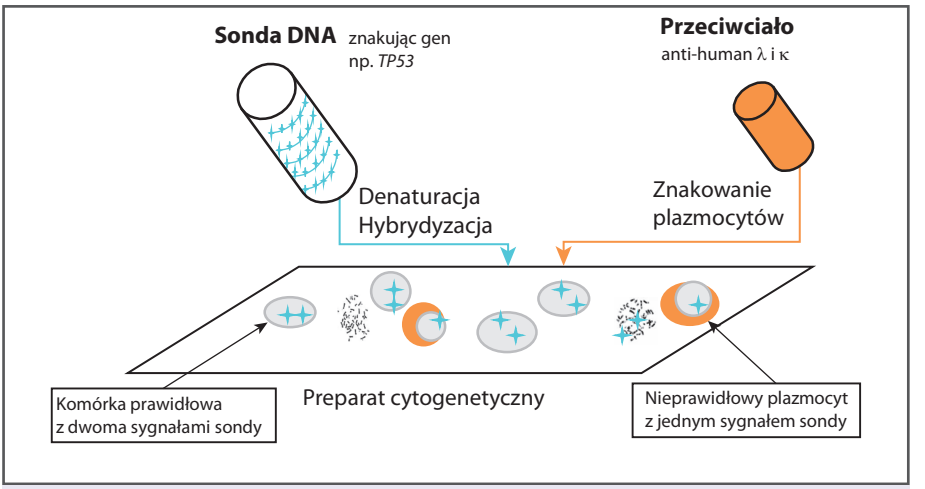
Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH)

W przeciwieństwie do analizy kariotypowej badanie FISH jest ściśle ukierunkowane. Stosuje się tu wybrane przed rozpoczęciem badania sondy DNA hybrydyzujące do



Ryc. 4.2. Translokacje z zaangażowaniem genu *IGH*. Obszar zacieniony wskazuje fragment chromosomu ulegający przeniesieniu.

komplementarnych obszarów DNA pacjenta. Sekwencje takie, zwykle ograniczone do genu lub kilku genów, znakowane są różnymi kolorami, co pozwala na ocenę statusu badanych genów w komórkach pozyskanych od pacjenta. Można określić liczbę kopii badanego genu/genów, obecność/brak rearanżacji czy wzajemne położenie wyznakowanych sekwencji, zarówno w metafazach, jak i w jądrach interfazowych. Granicę rozdzielczości metody FISH określa wielkość wyznakowanej fluorescencyjnie sondy. Zwykle jej wielkość odpowiada wielkości genu, średnio od 1 do 200 x 10^3 par zasad. Błąd metody FISH zawiera się w granicach od 1 do 10%, w zależności od typu zastosowanej sondy. Wartość ta jest porównywalna z możliwym, niskim odsetkiem plazmocytów, co może spowodować uzyskanie wyników fałszywie ujemnych. Z tego powodu w przypadku podjęcia analizy FISH na materiale szpiku pobranego od pa-



Ryc. 4.3. Schemat barwienia FISH z równoczesną detekcją plazmocytów (c-Ig-FISH).

cjenta z podejrzeniem/rozpoznaniem szpiczaka plazmocytowego niezbędne jest jednoznaczne wyodrębnienie plazmocytów z badanej populacji komórek. W analizowanym preparacie plazmocyty powinny zostać oznakowane za pomocą przeciwciał specyficznych dla łańcuchów lekkich immunoglobulin (c-Ig-FISH) w celu ich identyfikacji w mikroskopie fluorescencyjnym (ryc. 4.3) lub wyizolowane uprzednio za pomocą technik immunomagnetycznych.

Zestaw sond DNA zalecanych do detekcji zaburzeń istotnych w szpiczaku plazmocytowym (tzw. panel szpiczakowy) został wybrany na podstawie wieloletnich, wieloośrodkowych badań, które zdefiniowały aberracje najczęściej występujące i znaczące klinicznie (tab. 4.2). Rekomendacje dotyczące wykonywania badań genetycznych zaproponowane przez różne grupy badawcze, m.in. *Intergroupe Francophone du Myélome* – IFM (Francja) i Klinikę Mayo (USA), doprowadziły do sprecyzowania klasyfikacji IMWG (*International Myeloma Working Group* – Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Szpiczaka) zaburzeń genetycznych i molekularnych w szpiczaku plazmocytowym w powiązaniu z kliniczną oceną ich znaczenia prognostycznego [8].

Badanie profilu ekspresji genów

Nowoczesnym podejściem mającym na celu przyporządkowanie pacjentów do określonych grup ryzyka jest klasyfikacja molekularna oparta na badaniu profilu ekspresji genów. Jest to metoda całościowej analizy charakteryzująca się wysoką roz-

Tabela 4.2. Podstawowy zestaw sond DNA do oceny czynników prognostycznych, tzw. panel szpiczakowy stosowany z równoczesnym znakowaniem komórek plazmatycznych przeciwciałami *anti-human λ/κ*

Sonda DNA	Znakowany region	Spodziewane zaburzenie
TP53/CEP-17 DC*	17p13, CEP-17**	Delecja 17p (utrata genu *TP53*)
D13S319/13q34 DC	13q14, 13q34	Delecja 13q (utrata 13q14 – mała delecja, utrata 13q14 i 13q34 – masywna delecja lub monosomia 13)
IGH/CCND1 DC/DF#	14q32, 11q13	Rearanżacja *CCND*1, fuzja z *IGH*
IGH/FGFR3 DC/DF	14q32, 4p16	Rearanżacja *FGFR3*, fuzja z *IGH*
IGH/CMAF DC/DF	14q32, 16q23	Rearanżacja *MAFC*, fuzja z *IGH*

* DC – sonda dwukolorowa.
** CEP-17 – centromer chromosomu 17.
# DC/DF – sonda dwukolorowa ujawniająca dwa sygnały fuzyjne.

dzielczością. Poszczególne sygnatury ekspresji genów pokrywają się w dużej części ze zmianami obserwowanymi na poziomie cytogenetycznym.

Zaburzenia cytogenetyczne

Aberracje liczbowe i strukturalne w komórkach nowotworów prowadzą do zmiany aktywności określonych genów, głównie w wyniku translokacji lub delecji fragmentów chromosomów. Częstość występowania najpowszechniejszych aberracji w szpiczaku plazmocytowym zestawiono w tabeli 4.3.

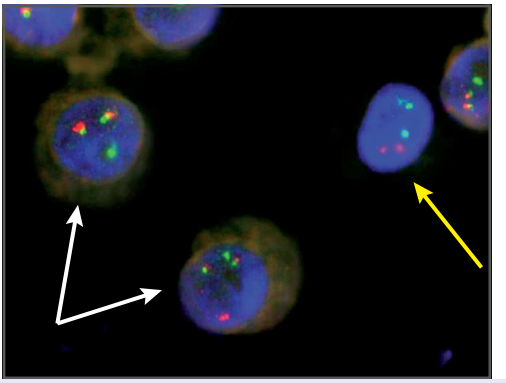
Obok tych typowych zaburzeń poznano niezrównoważenia silnie związane z określonym etapem choroby. I tak powielenia materiału fragmentów chromosomów 1q, 3p, 6p, 9p, 11q, 19p, 19q i 21q czy utraty fragmentów 1p, 16q i 22q są znacznie

Tabela 4.3. Częstość występowania i znaczenie kliniczne aberracji z udziałem *IGH* (14q32)

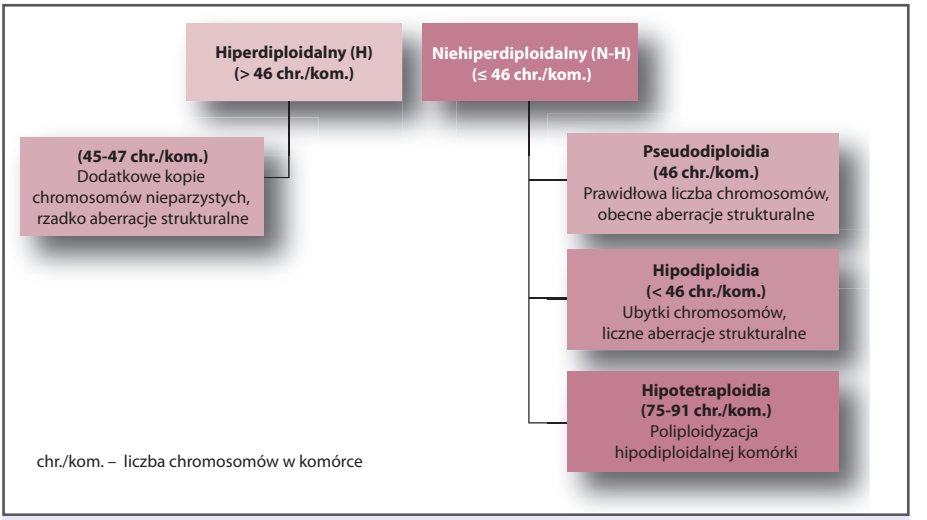
Aberracja	Gen partnerski	MGUS SMM	PCM	Rokowanie
Rearanżacje *IGH*		35-50%	50-70%	
t(11;14)(q13;q32)	*CCND1*	15-30%	16%	Korzystne
t(4;14)(p16.3;q32)	*FGFR3/MMSET*	2-10%	15%	Niekorzystne
t(14;16)(q32;q23)	*MAFC (WWOX?)*	2-5%	5%	Niekorzystne
t(6;14)(p21;q32)	*CCND3*	?	5%	?
t(14;20)(q32;q11)	*MAFB*	< 1?	1,5-5%	Zmienne
t(8;14)(q24;q32)	*MYC*	?	< 10%	Niekorzystne

rzadsze w MGUS niż w szpiczaku pełnoobjawowym. Powielenia obszarów 11q i 21q, podobnie jak utraty 6q i 22q, wskazują niemal jednoznacznie na stadium pełnoobjawowe, chociaż pojawiają się w nielicznych klonach komórkowych w MGUS [9, 10].

Klasyczne badanie cytogenetyczne pozwala ocenić zmiany liczby chromosomów w metafazach dzielących się komórek. Badanie FISH umożliwia wykrycie obecności



Ryc. 4.4. Znakowanie metodą c-Ig-FISH z użyciem sondy FGFR3/IGH DCDF (Vysis, Abbott). W opłaszczonych plazmocytach widoczne po 2 sygnały kolokalizacyjne wskazujące fuzję *IGH/FGFR3* (białe strzałki). Komórka nieplazmatyczna (żółta strzałka) zawiera po dwa osobne sygnały genów *FGFR3* i *IGH*.



Ryc. 4.5. Typy szpiczaka w zależności od ploidii komórek.

charakterystycznych translokacji bądź delecji/powieleń angażujących wybrane geny/obszary chromosomów w plazmocytach (ryc. 4.4). Zasadniczy podział dokonany na podstawie tak określonych cech cytogenetycznych wyróżnia dwie główne postacie szpiczaka plazmocytowego: hiperdiploidalną i niehiperdiploidalną (ryc. 4.5). Postacie te różnią się przebiegiem klinicznym.

Hiperdiploidia

Szpiczak hiperdiploidalny (H) cechuje się obecnością dodatkowych kopii chromosomów o nieparzystych numerach (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 i 21) (ryc. 4.1 B). Zwykle w komórce występuje kilka trisomii, z wyłączeniem chromosomu 13. Postać hiperdiploidalna częściej występuje u starszych chorych i na ogół wskazuje indolentny przebieg, zwykle bez niewydolności nerek, natomiast częściej występują tu zmiany kostne. Pacjenci z trisomią 5, 9 i/lub 17 lepiej reagują na leczenie i mają dłuższy całkowity czas przeżycia niż osoby z kariotypem niehiperdiploidalnym [4].

Brak hiperdiploidii

Postać niehiperdiploidalna (N-H) charakteryzuje się bardziej agresywnym przebiegiem i dużą różnorodnością zmian kariotypowych. Niektóre z przypadków wykazują pseudodiploidalny skład chromosomów: przy prawidłowej liczbie (46 chr./kom.) widoczne są zmiany strukturalne (ryc. 4.1 C). W tej postaci szpiczaka wyróżnia się źle rokujące przypadki hipodiploidalne, to jest takie, których komórki wykazują ubytki pojedynczych kopii chromosomów (często 13, rzadziej 14 czy 22) oraz utraty fragmentów chromosomów (delecje 1p, 12p, 16q i 17p), wszystkie związane z niekorzystnym przebiegiem lub progresją [11]. Szczególną klasą tej grupy są agresywne formy okołotetraploidalne, gdzie poliploidyzacja komórek hipodiploidalnych (rzadziej pseudodiploidalnych) prowadzi do powstania komórek o dużym potencjale proliferacyjnym [12]. Przypadki grupy N-H znacznie częściej niż hiperdiploidalne obciążone są występowaniem translokacji angażujących geny immunoglobulin [13].

Translokacje

W większości translokacji opisanych w komórkach szpiczaków zaangażowany jest gen ciężkiego łańcucha immunoglobulin *IGH* (tab. 4.3). W wyniku rearanżacji genu *IG* jego wysoce aktywny region regulatorowy modyfikuje aktywność genu partnerskiego przeniesionego z drugiego chromosomu zaangażowanego w translokację wzajemną (ryc. 4.2). Znaczenie prognostyczne aberracji z udziałem genu *IGH* jest zmienne w zależności od genu partnerskiego aktywowanego w wyniku rearanżacji.