

Artykuły przeglądowe • Review articles**Aplikacje kliniczne badań cytogenetycznych
w złośliwych chłoniakach nieziarniczych**

Barbara Pieńkowska-Grela

Chłoniaki nieziarnicze (NHL) są heterogenną grupą nowotworów układu chłonnego. Ostatnie lata przyniosły intensywny rozwój metod badawczych, pozwalających na udoskonalenie systemu klasyfikacji NHL, a także poznanie nowych czynników prognostycznych. Identyfikacja specyficznych dla określonych subtypów NHL aberracji kariotypowych, pozwoliła na poznanie mechanizmów patogenezy wielu z tych nowotworów. Aberracje strukturalne, występujące w komórkach chłoniaków, to przede wszystkim translokacje. Ich efektem jest na ogół deregulacja ekspresji określonych białek. W chłoniakach wywodzących się z limfocytów B, najczęściej opisywanym mechanizmem jest nadekspresja onkogenów, spowodowana przez ich przeniesienie w rejon aktywnego promotora immunoglobulin. Konkretnie zmiany kariotypowe skorelowane są z charakterystyczną morfologią, specyficznym immunofenotypem i określonymi cechami klinicznymi nowotworu. Możliwość detekcji zmian genetycznych, na poziomie analizy kariotypu, czyni z badania cytogenetycznego użyteczne narzędzie diagnostyczne. Analiza aberracji wtórnych pozwala, w wielu przypadkach, na określenie rokowania.

Clinical applications of cytogenetic analysis in Non Hodgkin's lymphoma

Non-Hodgkin's lymphomas (NHL) represent a heterogeneous group of diseases. Recent years have brought an explosion of new diagnostic tools to the pathology of lymphomas, thus permitting more precise disease definition and prognosis prediction. Detection of recurrent chromosomal abnormalities by cytogenetic analysis has led to the identification of most genetic alterations of NHL. Many translocations lead, in consequence, to the overexpression of a protein not ordinarily found in that cell type. The common consequence of the translocation in B-NHL is the deregulated expression of an oncogene by juxtaposition to the immunoglobulin locus, characterised by recurrence within a specific clino-pathologic category of malignant lymphomas. Detection of the alteration can be useful for the diagnosis of particular patients – both for distinguishing lymphomas from a benign lymphoid process and for making a specific diagnosis of lymphoma. Analysis of genetic abnormalities can also be used for the detection of minimal residual disease, and may also affect prognosis.

Słowa kluczowe: chłoniak, aberracja kariotypowa, translokacja, diagnoza

Key words: lymphoma, karyotypic aberration, translocation, diagnosis

Wstęp

Wraz z postępowaniem wiedzy na temat biologii chłoniaków nieziarniczych ich, początkowo prosta, klasyfikacja uległa rozbudowaniu i skomplikowaniu. Od czasów gdy różniano jedynie lepiej rokujące „chłoniaki grudkowe” od gorzej rokujących „chłoniaków rozlanych”, pojawiły się szczegółowe kategorie NHL, ujęte w obowiązującej dziś klasyfikacji REAL/WHO [1, 2].

Niejednorodność kliniczna, współwystępująca z różnorodnością obrazu histologicznego, jest przyczyną trudności klasyfikacji wielu chłoniaków nieziarniczych. Większość pacjentów trafia do lekarza z objawami uogólnionego powiększenia węzłów chłonnych, jednak zmiany mogą

lokalizować się także w miejscach nietypowych: w skórze, tarczycy, sutku, przewodzie pokarmowym, mózgu, jajnikach lub jądrach. Rozpoznanie NHL bazuje na badaniu węzłów chłonnych lub innych narządów zajętych przez proces nowotworowy. Proces diagnostyczny obejmuje obecnie, obok klasycznego badania histopatologicznego, również genetyczne i molekularne badania nowotworów. Obok danych morfologicznych bierze się pod uwagę immunofenotyp komórek, określany metodami barwienia immunohistochemicznego i cytometrii przepływowej, a także obecność zmian genetycznych, oznaczanych technikami biologii molekularnej i cytogenetyki, w kontekście obrazu klinicznego (Tab.1). Nowe narzędzia badawcze: technologie porównawczej hybrydyzacji genomowej (*comparative genomic hybridization* CGH), mikromacierze DNA (*microarrays*), zaawansowane techniki FISH (*multi-color-FISH, unique sequence probes, SKY*) czy zaawansowane techniki PCR, pozwalają na badanie genomu komór-

Tabela I. Klasyfikacja chłoniaków B-komórkowych, (wg A. Cuneo, 2000)

Histologia	Immunofenotyp	Cytogenetyka	Dane kliniczne
Chłoniak limfocytarny <i>Small lymphocytic lymphoma</i> (SLL)	Pan-B+; CD5+; CD23+; CD10-; sIgM+ faint	del(6)(q21-23)(ok. 30% przypadków) del(13q14) tris 12, del(11q), del(17p)	Przebieg powolny; w 10-20% obraz białaczkowy – gorsze rokowanie
Chłoniak limfoplazmacytoidalny <i>Lymphoplasmacytic lymphoma</i> (LP)	Pan-B+; CD5-; CD10-; cyIgM+	t(9;14)(p13;q32) PAX5/IgH (50% przypadków)	Przebieg powolny; możliwa progresja
Chłoniak z komórek płaszczka <i>Mantle cell lymphoma</i>	Pan-B +; CD5+; CD23-; CD10-/+; sIgM+ bright	t(11;14)(q13;q32) / BCL1 zmiany wtórne: 3q, 7p, 12q, 17p tetraploid, 2x t(11;14)	Agresywny przebieg – faza blastyczna, gorsze rokowanie
Chłoniak z ośrodków rozmnażania <i>Follicle centre cell lymphoma</i> (FL)	Pan-B+; CD10+/-; CD5-; sIg+	t(14;18)(q32;q21) / rearanżacje BCL2 (70-80% przypadków) delecje: 3q, 10q, 13q, 17p, 17q, 2p, 10p	Przebieg dość powolny, w 50% postęp choroby – zwiększone ryzyko progresji
Chłoniak rozlany z dużych komórek B. <i>Diffuse large cell lymphoma</i>	CD10-/+; D19+; CD22+; SIg+	t(14;18) (ok. 20% przyp.) t(3;V)(q27;V) / BCL6 rear (ok. 30%) t(8;14)(q24;q32) lub wariantowe rearanżacje c-MYC (7-10%)	Przebieg zazwyczaj agresywny. Nie znane szczególne markery prognostyczne. Kariotyp z licznymi zmianami (<i>complex karyotype</i>) związany z krótszym okresem przeżycia
Chłoniak Burkitta <i>Burkitt's lymphoma</i>	Pan-B+; TdT-, CD10+; CD5-; sIgM+/-;	t(8;14)(q24;q32) 85% przyp. translokacje wariantowe: t(2;8) 5% oraz t(8;22) 10%	Bardzo agresywny
Chłoniak typu Burkitta <i>Burkitt-like lymphoma</i> (też ALL L3)	Pan-B+; TdT-; CD10-/+ CD5-; sIg+	t(8;14) lub wariantowo (25% przyp.) t(8;14) + t(14;18) (30% przypadków)	Bardzo agresywny Przypadki z równoczesnym t(8;14) + t(14;18) mają gorszy przebieg
Chłoniak z komórek strefy brzeżnej <i>Marginal zone B-cell lymphoma</i> (MZBCL)	pan-B+; CD5-/+; CD10-; CD23-; CD11c+/-; cyIg+ (40%), sIgM+ bright; sIgD-	t(11;18)(q21;q21) / PI2 / MLT fuzja (30-50% low-grade MALT) t(1;14)(p21;q32) del(7)(q22-31) (40% przypadków) +3/+3q (30-70% przypadków)	Powolny przebieg, lokalizacja pozawęzłowa MALT postać śledzionowa MZBCL węzłowe, pozawęzłowe i śledzionowe MZBCL

rek z niezwykłą do tej pory precyzją. Poznanie molekularnych mechanizmów patogenezы chłoniaków uściśliło kryteria diagnostyczne, wobec czego podział tych nowotworów oparty jest w znacznej mierze na obecności markerów immunologicznych i genetycznych, występujących w komórce nowotworu.

Nowotwór można zdefiniować jako wynik akumulacji nie naprawionych uszkodzeń DNA, powstających w komórce. Większość komórek dorosłego organizmu wielokomórkowego ulega regularnym podziałom. Powtarzające się cykle komórkowe są szczegółowo kontrolowane przez wiele białek, w tym produkty protoonkogenów i genów supresorowych. Od ich właściwego działania zależy prawidłowy przebieg proliferacji oraz homeostaza organizmu. Uszkodzenie aparatu genetycznego, przyczyniające się do obniżenia lub podwyższenia poziomu określonych czynników regulujących cykl komórkowy, powoduje rozstrojenie funkcjonowania punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Komórki uwolnione od kontroli proliferacji ulegają szybkim podziałom, w efekcie narasta klon z uszkodzonym aparatem genetycznym, a szybko prze-

biegający cykl komórkowy sprzyja powstawaniu nowych aberracji. Te zaś są przyczyną m.in. transformacji nowotworowej.

Rola badań cytogenetycznych

W procesie transformacji nowotworowej dochodzi do modyfikacji aktywności określonych genów w wyniku np. aktywacji onkogenów, inaktywacji genów supresorowych czy fuzji genów bądź zmian ilościowych, obejmujących zwielokrotnienie lub utratę kopii określonych genów. Zmiany molekularne objawiają się najczęściej w widocznych anomaliiach chromosomowych, będących swoistymi markerami nowotworu. W komórkach nowotworów widoczne są odstępstwa od obrazu prawidłowego, cytogenetycznie wyrażające się jako nieprawidłowości (aberracje) kariotypu (Ryc. 1). Wzór anomalii cytogenetycznych jest odmienny w różnych typach nowotworów. Wykazuje on szerokie spektrum od pojedynczych zmian strukturalnych bądź liczbowych do głębokich zmian (*complex karyotype*), obejmujących liczne aberracje strukturalne czy zmianę plo-



Ryc. 1. Prawidłowy kariotyp człowieka.

Zaznaczono obszary szczególnie często zaangażowane w translokacje w przypadku chłoniaków nieziarniczych B-komórkowych

idii. Znaczna część poznanych, nielosowych aberracji chromosomowych jest specyficznym związana z określonym typem nowotworu i ma znaczenie rokownicze. Istnieją bazy danych, gromadzące informacje o aberracjach kariotypowych, występujących w ludzkich nowotworach, np. *Mitelman Database of Chromosome Aberration in Cancer* 2001 [3]. Określenie tych zmian i ich związku z transformacją/progresją nowotworu jest przedmiotem badań cytogenetyki onkologicznej.

Obok klasycznych metod prążkowych, pozwalających na uchwycenie zmian morfologicznych w chromosomach metafazowych, stosowane są techniki FISH (*fluorescent in situ hybridization*), umożliwiające, przy użyciu specyficznych sond DNA, precyzyjne określenie zmian obejmujących poszczególne chromosomy, ich części, bądź określone geny, tak w metafazach, jak i w jądrach interfazowych.

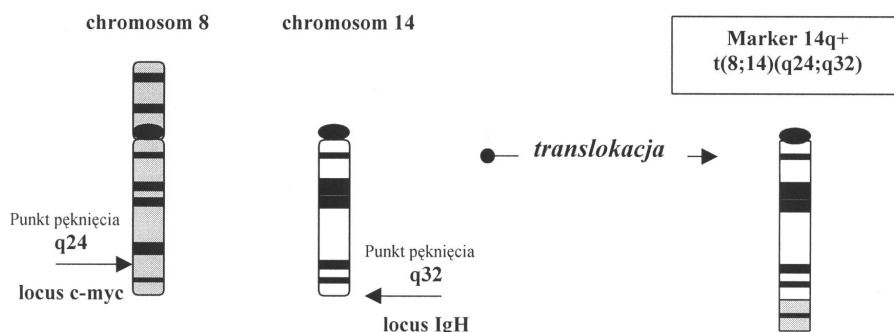
Znajomość aberracji kariotypowych, specyficznych dla określonych typów nowotworów, dała podstawy do rozwinięcia badań nad molekularnymi mechanizmami patogenezy. Badania te, w wielu przypadkach, pozwoliły na określenie genów kluczowych dla powstania nowotworu i poznanie szczegółowych mechanizmów tego procesu.

W obszarze użyteczności klinicznej cytogenetyka, będąc badaniem uzupełniającym wobec diagnostyki histopatologicznej, może być pomocna w zdefiniowaniu określonego subtypu NHL. Precyzyjna diagnoza zaś, ma istotny wpływ na ustalenie strategii leczenia pacjenta. W naszej pracowni od kilku lat prowadzimy analizę cytogenetyczną NHL, dla potwierdzenia/uściślenia diagnozy histopatologicznej bądź – w rzadkich przypadkach wątpliwych – określenia rozpoznania. Poszukujemy również cytogenetycznych czynników rokowniczych.

Molekularne efekty aberracji kariotypowych w chłoniakach nieziarniczych

Aberracje strukturalne, występujące w komórkach chłoniaków B, to przede wszystkim translokacje [4]. Schemat translokacji wzajemnej pokazano na Ryc. 2. W wyniku pęknięcia chromosomu i przeniesienia jego fragmentu w region pęknięcia na innym chromosomie, następuje zaburzenie funkcjonowania genu (genów) zlokalizowanego w tym obszarze.

W większości chłoniaków molekularnym efektem translokacji jest deregulacja transkrypcji kluczowego genu



Ryc. 2. Schemat translokacji t(8;14) w chłoniaku Burkitt'a

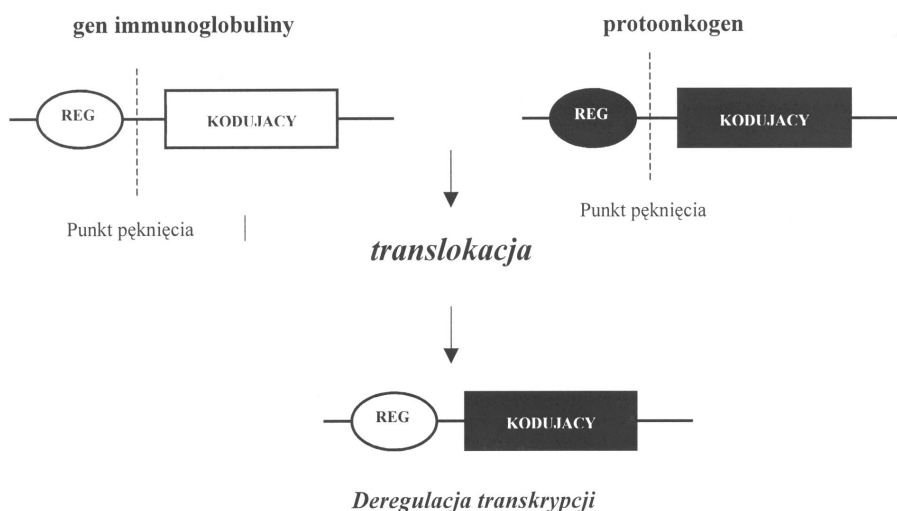
(protoonkogenu), zachodząca poprzez jego aktywację obcymi sekwencjami regulatorowymi (Ryc. 3). Punkt pęknięcia w onkogenie przebiega pomiędzy jego częścią regulatorową (R), a kodującą (K). W wyniku rearanżacji część kodująca zostaje przeniesiona w rejon wysoce aktywnego promotora immunoglobulin. Rezultatem jest zwiększony poziom produktu białkowego, występującego w stanie fizjologicznym w komórkach (np. nadekspresja MYC w chłoniaku Burkitt'a) bądź obecność białka, nie wykazującego ekspresji w komórkach prawidłowych (np. BCL-2 w chłoniaku grudkowym). Równocześnie, w badaniu kariotypu ujawnia się obecność specyficznych markerów chromosomowych, tj. chromosomów o nieprawidłowej morfologii.

Efektem pracy wielu zespołów badawczych było ustalenie korelacji pomiędzy specyficznymi nieprawidłowościami cytogenetycznymi, występującymi w komórce nowotworowej, a typem histologicznym chłoniaka [5]. Na podstawie analizy punktów pęknięcia chromosomów w powtarzających się aberracjach, możliwe było w wielu wypadkach określenie genów, których nieprawidłowa ekspresja odpowiedzialna jest za powstanie fenotypu nowotworowego limfocytów B w różnym stadium różnicowania [6-8]. I tak np. kluczowym zdarzeniem w onkogenezie chłoniaków Burkitt'a jest aktywacja onkogenu c-MYC przez promotor immunoglobulin [9, 10]. Zmiana ta widoczna jest w badaniu kariotypu jako translokacja obejmująca chromosomy 8 i 14, w postaci markera t(8;14) określanego również jako 14q+ (Ryc. 2). Podobne anomalie, specyficzne dla określonych typów B-NHL, prowadzą do zaburzonej ekspresji takich onkogenów jak: BCL-2 w translokacji t(14;18), BCL-1 w translokacji t(11;14) czy BCL-6 w translokacji t(3;14).

Obecnie znane są konkretne zmiany kariotypowe skorelowane z charakterystyczną morfologią, specyficznym immunofenotypem i określonymi cechami klinicznymi nowotworu. Aberracje angażujące onkogeny są na ogół w B-komórkowych chłoniakach niezziarniczych zmianami pierwotnymi i jako takie, mają głównie znaczenie diagnostyczne. Aberracje wtórne, świadczące zwykle o progresji choroby, dotyczą najczęściej genów supresorowych. Inaktywacja genów supresorowych w NHL następuje, podobnie jak w innych nowotworach, poprzez delecję jednego allelu z równoczesną mutacją allelu homologicznego. Najczęściej zaangażowane są tu geny: *p53*, *p16* i *ATM*. Dodatkowo, kariotypy chłoniaków niezziarniczych często wykazują obecność ubytków, widocznych w postaci delecji chromosomów 6 (6q) i 13 (13q), co sugeruje lokalizację dalszych, niezidentyfikowanych jeszcze, genów supresorowych.

Metodyka badań cytogenetycznych

Istotą badania cytogenetycznego jest określenie odstępstw od prawidłowego kariotypu w komórkach nowotworu. Materiał do analizy stanowią żywe komórki, pobrane ze zmienionych nowotworowo narządów, węzłów chłonnych lub szpiku kostnego ewentualnie krwi obwodowej (głównie w przypadku białaczek). W przypadku chłoniaków winny być to fragmenty bądź aspiraty węzłów chłonnych, pobrane w trakcie biopsji diagnostycznych. Komórki nowotworu poddawane są krótkotrwałej hodowli *in vitro* w standardowych warunkach (5% CO₂, 37°C) w medium hodowlanym z dodatkiem 15% surowicy cielęcej, L- glutaminy i antybiotyków. Zawiesina komórek utrwalana jest po 24, 48 lub 72 godzinach hodowli, nie stymulowanej lub prowadzonej z dodatkiem mitogenu. Sukces klasycz-



W rezultacie pęknięcia chromosomów i ich błędnego połączenia, protoonkogen, który w warunkach fizjologicznych ulega ekspresji na niskim poziomie (bądź wcale), ulega aktywacji, kiedy znajdzie się pod kontrolą silnego elementu regulatorowego, należącego do aktywnego genu immunoglobuliny. Na schemacie genu: obszar REGulatorowy, obszar KODUJĄCY.

Ryc. 3. Mechanizm deregulacji genów, powszechny w chłoniakach niezziarniczych

nej analizy cytogenetycznej zależy od uzyskania wzrostu hodowli komórek nowotworu. Utrwalony materiał, nadający się do analizy kariotypu, musi zawierać figury podziałowe, bowiem morfologiczne różnice między chromosomami ujawniają się w stadium metafazy. W nie stymulowanej hodowli *in vitro* indeks mitotyczny jest często bardzo niski, stosuje się więc mitogeny, tj. substancje podwyższające aktywność podziałową hodowanych komórek. W hodowli chłoniaków B-komórkowych powszechnie stosuje się TPA (*Phorbol 12-myristate-13-acetate*), stymulujący podziały komórek linii B. W przypadku chłoniaków T-komórkowych dobre efekty przynosi zastosowanie LF 7 (ekstrakt fasoli *Phaseolus vulgaris*), będący mitogenem komórek T. Preparaty cytogenetyczne, zawierające metafazy, barwione są różnicowo dla uzyskania prążków G (*G-banding*, GTG) [11], bądź poddawane fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) [12].

Badanie kariotypu prążkowego (GTG) pozwala na ocenę ploidi komórek, zakresu i rodzaju zmian liczby chromosomów oraz występowania zaburzeń morfologii chromosomów, spowodowanych aberracjami takimi jak translokacje, delecje czy duplikacje określonych obszarów chromosomów. Opis aberracji kariotypowych wykonywany jest zgodnie z obowiązującą klasyfikacją *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) 1995 [13]. Podstawowe skróty używane w opisie badań kariotypowych zestawiono w Tabeli II.

Klasyczne badanie kariotypu, choć szczegółowo określa liczbę i rodzaj cytogenetycznie uchwytnych aberracji, obejmuje jedynie populacje komórek dzielących się. Jednak w utrwalonym preparacie jedynie kilka procent komórek badanej populacji znajduje się w mitozie, tak więc komórki słabo proliferujące mogą zostać pominięte. Ponadto, anomalie dotyczące małych obszarów pozostają nieuchwytnie w badaniu prążkowym, ponieważ przy użyciu tej techniki widoczne są zmiany strukturalne, obejmujące obszar co najmniej 10^6 - 10^7 par zasad (dla porównania: wielkość genu waha się w granicach od 2 do 200 x 10^3 par zasad).

Badanie przy użyciu techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), przy zastosowaniu zróżnicowanych sond DNA, rozszerza możliwość detekcji zmian na komórki interfazowe, jednocześnie podwyższając znacznie poziom rozdzielczości w stosunku do cytogenetyki klasycznej. Jednak badanie takie ukierunkowuje analizę na określony, wybrany wcześniej, obszar chromosomu. Zastosowanie techniki FISH pozwala m.in. na ocenę liczby kopii poszczególnych chromosomów, określenie partnerów translokacji, czy stwierdzenie obecności zaburzeń, dotyczących określonych genów.

Zastosowanie sondy DNA, hybrydującej do określonego centromeru (sonda centromerowo specyficzna, *alphasatellite probe*), pozwala na określenie liczby kopii wybranego chromosomu, zarówno w metafazach, jak i komórkach nie dzielących się, jednak nie dostarczy informacji dotyczących pozostałych chromosomów (Ryc. 4a). Sonda malująca (*total chromosome probe*) hybryduje do wybranego chromosomu, pozwalając na stwierdzenie obecności jego materiału np. w badanym markerze

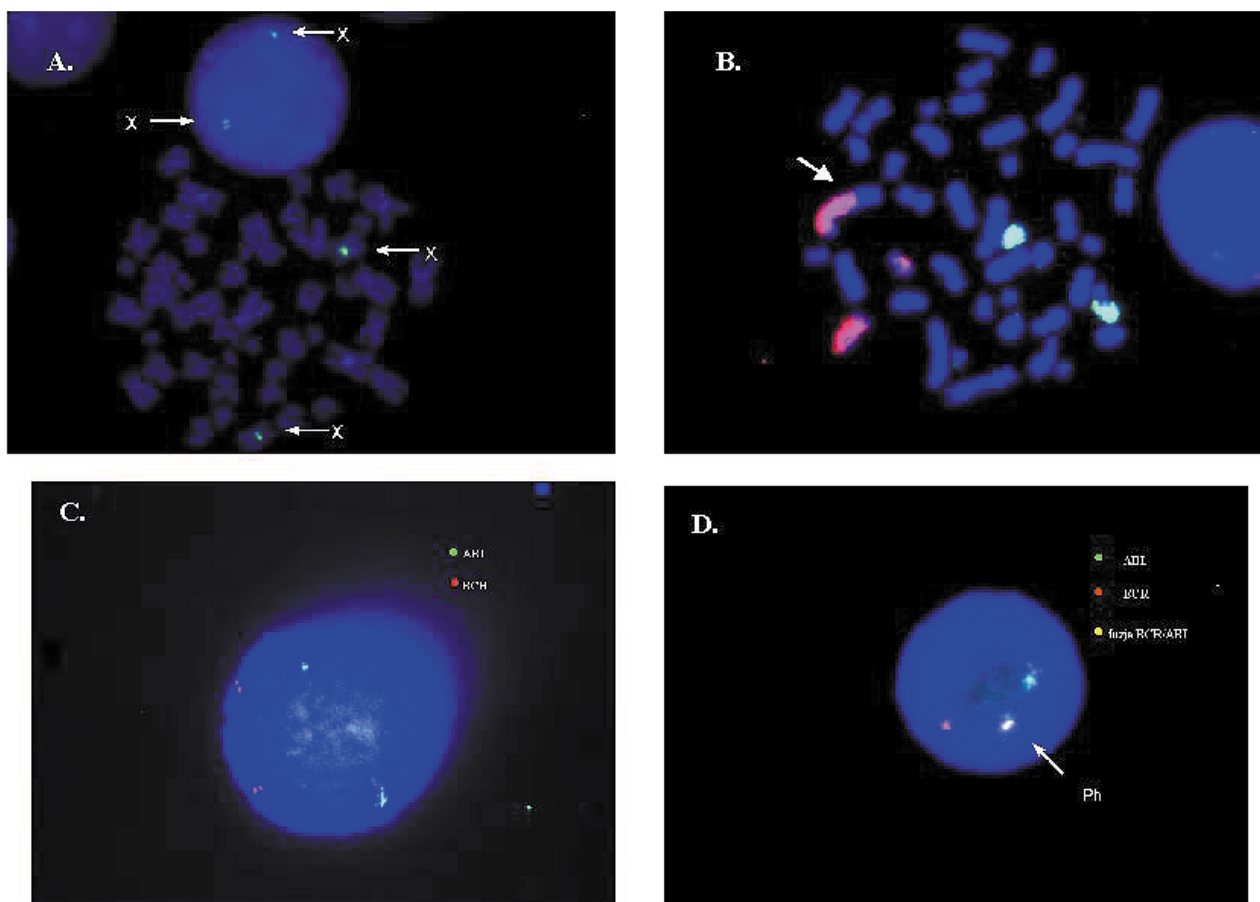
Tabela II. Podstawowa nomenklatura cytogenetyczna (wg ISCN 1995)

Skrót	Objaśnienie
p	krótkie ramię chromosomu
q	długie ramię chromosomu
t	translokacja
()	w nawiasie umieszcza się chromosomy biorące udział w translokacji lub punkty pęknięć np. t(8;14)(q24;q32)
;	oddziela zaangażowane chromosomy lub punkty pęknięcia
-	utrata kopii chromosomu (monosomia) np. -1
+	dodatkowa kopia chromosomu (trisomia) np. +8
del	delecja, utrata fragmentu chromosomu np. del(6)
der	pochodna chromosomu (<i>derivative chromosome</i>) np. der(9)
dic	chromosom dicentryczny np. dic(5;16)
dup	duplikacja fragmentu chromosomu np. dup(1q)
i	isochromosom np. i(12p)
ins	insercja np. ins(13)
inv	inwersja np. inv(16)
mar	niezidentyfikowany chromosom markerowy (marker)

translokacyjnym, jednak inne chromosomy pozostają wówczas niezróżnicowane (Ryc. 4b). Specyficzne sondy translokacyjne (*translocation probes*) umożliwiają detekcję kolokalizacji czy fuzji genów w określonej, znanej translokacji (np. fuzja BCR/ABL w translokacji t(9;22)(q34;q11)) (Ryc. 4c,d). Wykorzystuje się także szeroki panel sond hybrydujących, np. do telomerów, ramion poszczególnych chromosomów, czy ich wybranych obszarów (prążków). Użycie sond specyficznych (*unique sequence probes*), znakujących obszar określonego genu, pozwala na stwierdzenie obecności poszukiwanej zmiany (delecji, amplifikacji czy zmiany pozycji genu) (Ryc. 4a). W szczegółowych analizach można zastosować sondy DNA, umożliwiające nawet detekcję zmian w obrębie pojedynczego genu (np. *break apart probe* dla badania obecności rearanżacji) (Ryc. 5). Obecnie możliwe jest stosowanie zaawansowanych (i drogich) technik równoczesnej detekcji wszystkich chromosomów i ich określonych obszarów (np. technika M-FISH), jednak metody te są rzadko stosowane w rutynowej diagnostyce.

Badanie cytogenetyczne jest obecnie zalecaną metodą uzupełniającą w diagnostyce chłoniaków. Właściwie zastosowane – pozwala na uzyskanie informatywnych wyników. Sukces analizy uzależniony jest z jednej strony od jakości materiału dostarczonego do badania (właściwe pobranie i warunki transportu), z drugiej zaś – od właściwego doboru technik. Należy przy tym pamiętać, że kariotyp konstytutywny pacjenta (komórki „nie-nowotworowe”) jest na ogół prawidłowy, tak więc np. analiza krwi obwodowej pacjenta ze zmianami węzłowymi nie wykaże najprawdopodobniej obecności żadnych aberracji.

Ze względu na specyficzne właściwości podstawowych technik cytogenetycznych, przyjmuje się, że pierwotna analiza przypadku powinna obejmować ustalenie pełnego kariotypu (badanie prążkowe), w uzasadnionych przypadkach uzupełnione badaniem metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, przy użyciu odpowiednio dobranych sond DNA. Natomiast w trakcie monitorowania przebiegu choroby wystarczy na ogół określenie obecności bądź braku specyficznego markera, a więc pozwala ograniczyć się do dającego szybką odpowiedź badania



Ryc. 4. Przykłady analizy cytogenetycznej techniką FISH, przy użyciu różnych sond DNA.

A. Zastosowano sondę α -satelitarną, hybrydującą do centromeru chromosomu X. Sygnały są widoczne tak w metafazie, jak i w komórce interfazowej.

B. Sonda malująca chromosom 7 (sygnał czerwony) i chromosom 14 (sygnał zielony). Widoczne dwie prawidłowe kopie chromosomu 14, jedna prawidłowa kopia chromosomu 7 oraz marker translokacyjny, zawierający materiał chromosomu 7.

C. Zastosowano sondę hybrydującą do genów ABL na chromosomie 9 (sygnał zielony) i BCR na chromosomie 22 (sygnał czerwony).

Komórka prawidłowa – widoczne po dwie prawidłowe kopie genów.

D. Zastosowano sondę hybrydującą do genów ABL i BCR.

W komórce białaczki widoczna fuzja genów BCR/ABL (sygnał żółty, powstały w wyniku kolohybrydyzacji sond). Obraz taki świadczy o obecności translokacji t(9;22) – marker Philadelphia (Ph).

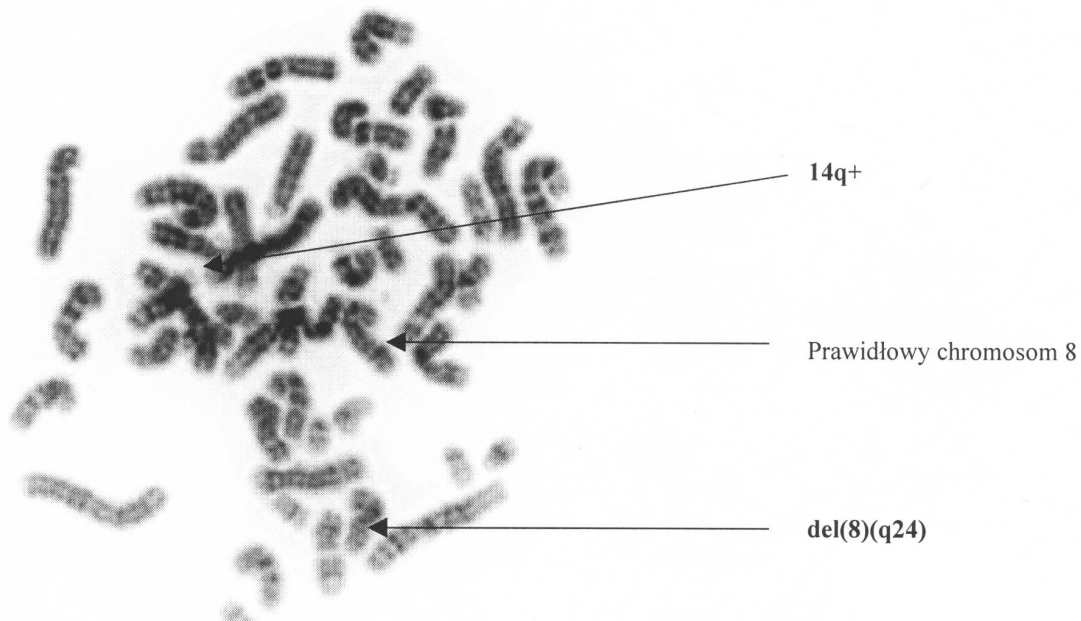
FISH. W niektórych przypadkach można stosować tu zamiennie techniki cytogenetyczne i badania molekularne bądź immunologiczne. W przypadku badania wznowy zalecane jest jednak zastosowanie obu tych technik (GTG + FISH) dla stwierdzenia pojawienia się ewentualnych zmian wtórnych.

Aberracje kariotypowe w B-NHL

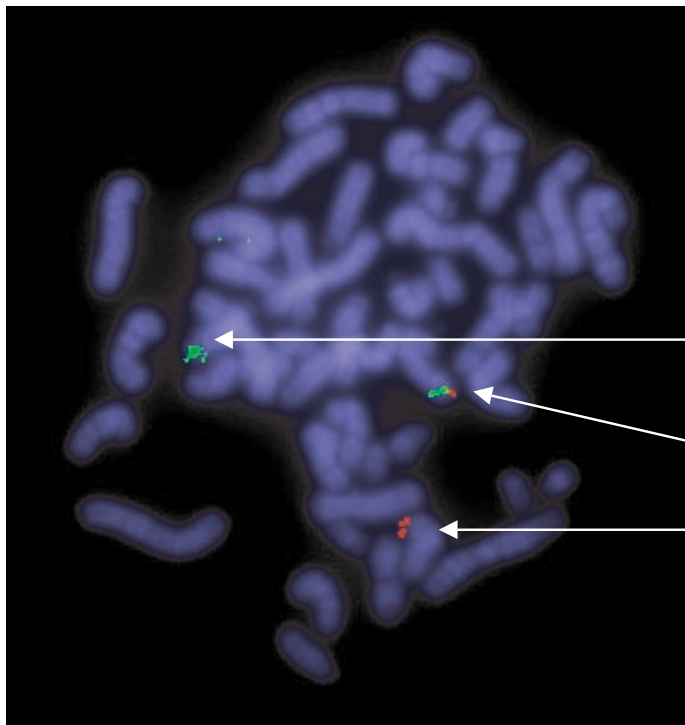
Ponad 80% pacjentów z niezłośliwymi chłoniakami B-komórkowymi wykazuje obecność klonalnych, nie-losowych aberracji kariotypowych w komórkach nowotworu [14]. Część tych zmian występuje niespecyficycznie, w różnych typach nowotworów, inne aberracje są specyficzne lub typowe dla określonych subtypów histologicznych NHL (Ryc. 6). Wyróżniamy wśród nich zmiany pierwotne, mające bezpośredni związek z patogenezą nowotworu oraz zmiany wtórne, świadczące niekiedy o trwającej progresji. Uważa się, że liczne zmiany kariotypowe (>3), widoczne w komórkach nowotworu, świadczą o istnieniu formy bardziej agresywnej. Tak więc, jeśli określenie zmiany pier-

wotnej ma istotne znaczenie diagnostyczne, to analiza zmian wtórnych ma doprowadzić do ustalenia zależności między aberracjami kariotypu, a progresją choroby (znaczenie prognostyczne).

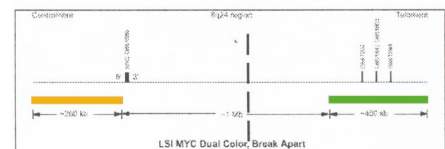
Mechanizm molekularnej patogenezы w chłoniaku limfocytarnym B-komórkowym (*Small lymphocytic lymphoma* – SLL) nie jest do tej pory poznany. Wiadomo, że istnieją dwie formy kliniczne, różniące się pod względem genetycznym. Przypadki o łagodniejszym przebiegu charakteryzują się wystąpieniem mutacji w rejonie genów immunoglobulin, czemu towarzyszy brak widocznych aberracji cytogenetycznych. Progresywna forma choroby (bez mutacji regionu Ig) wykazuje obecność zaburzeń kariotypu: najczęściej trisomie 12q lub 8q, delecje 13q14, 11q, 17p czy 6q bądź translokacje obejmujące region 14q32 [15]. Delecja obecna w rejonie krótkiego ramienia chromosomu 17 wskazuje na gorszą prognozę, podobnie jak delecja w rejonie 11q, a także trisomia chromosomu 12, szczególnie przy atypowej morfologii [16, 17]. Delecja 13q, występująca jako jedyna zmiana kariotypowa, jest natomiast czynnikiem korzystnym rokowniczo.



Ryc. 5A



Schemat sondy:



Pęknięcie w obrębie c-myc

Dystalny fragment c-MYC
przeniesiony na chr. 14,
tworzy marker **14q+**

Kompletny gen c-MYC

Proksymalny fragment
c-MYC pozostały na **del(8)**

Ryc. 5B

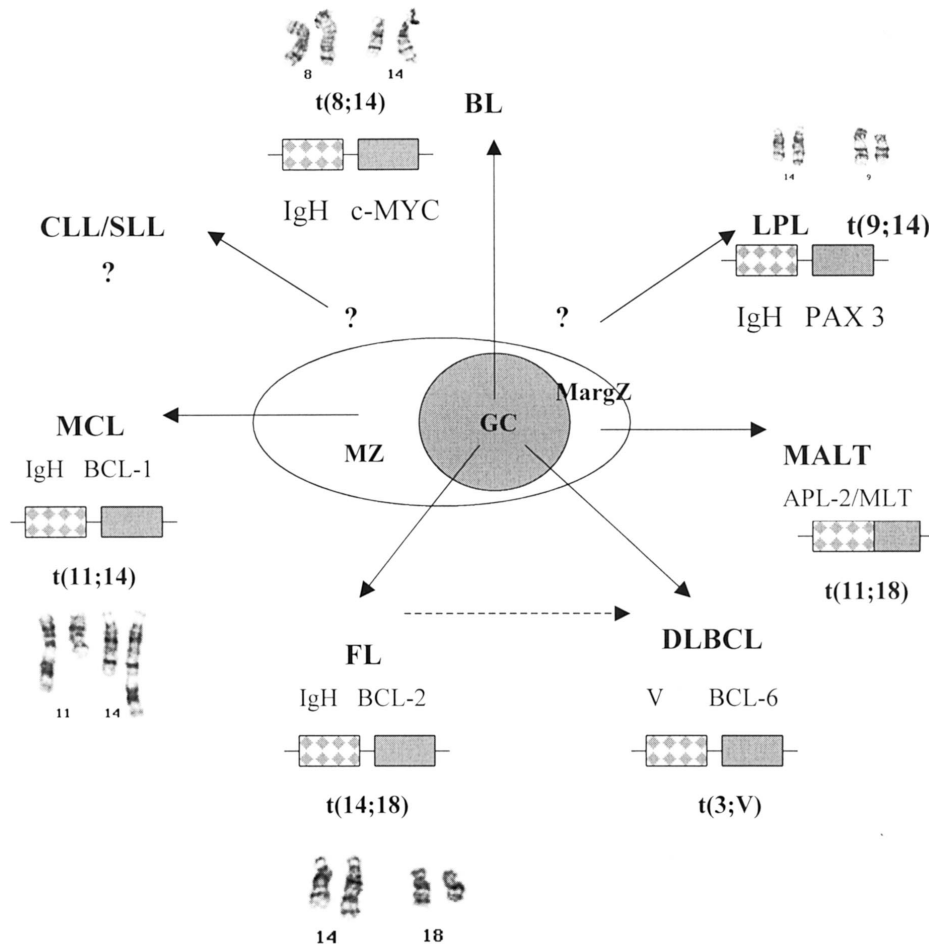
Ryc. 5. Cytogenetyczne potwierdzenie diagnozy chłoniaka Burkitt'a.

A. Analiza prążkowa (GTG). Widoczny obraz świadczy o obecności translokacji t(8;14)(q24;q32), której produktem są: skrócony chromosom 8 – del(8)(q24) oraz marker 14q+ (chromosom 14 przedłużony o fragment pochodzący z chromosomu 8)

B. Analiza FISH, przy użyciu dwukolorowej sondy DNA, hybrydującej do genu c-MYC (*LSI MYC break apart*). Uzyskany obraz odpowiada reorganizacji genu c-MYC.

Chłoniak limfoplazmacytoidalny (makroglobulinemia Waldenströma, *lymphoplasmacytic lymphoma – LPL*) jest chłoniakiem o przebiegu powolnym, występującym głównie u ludzi starszych. Początkowo klasyfikowany był wspólnie z chłoniakiem limfocytarnym. Cytogenetycznie, z chłoniakiem tym związana jest charakterystyczna trans-

lokacja t(9;14)(p13;q32) (w ponad 50% opisanych przypadków LPL) (Ryc. 5). Aberracja ta prowadzi do deregulacji ekspresji genu *BASP* (*B-cell specific activator protein*) zwanego też *PAX5*, poprzez kolokalizację z locus IgH [18]. Gen *BASP* koduje czynnik transkrypcyjny, zaangażowany w kontrolę proliferacji i różnicowania limfocytów



GC - *germinal center* - ośrodek rozmnażania

MZ - *mantle zone* - strefa komórek płaszczu

MargZ - *marginal zone* - strefa brzeżna

Ryc. 6. Translokacje specyficzne dla poszczególnych subtypów chłoniaków nieziarniczych

B [19]. Zmiana taka, występująca głównie w LPL, stwierdzana jest sporadycznie w przypadkach chłoniaka strefy brzeżnej oraz chłoniaka z dużych rozlanych komórek B.

Chłoniak z komórek płaszczu (*mantle cell lymphoma* – *MCL*) występujący na ogół u ludzi starszych, charakteryzuje się agresywnym przebiegiem i gorszym rokowaniem. Podwyższony poziom cykliny D1 (*BCL-1*, białko regulatorowe cyklu komórkowego) związany jest z obecnością translokacji t(11;14)(q13;q32), opisywanej w ok. 80% przypadków *MCL* [20]. Punkt pęknięcia w chromosomie 11 obejmuje region genu *BCL-1* (zwanego także *CCND1*), który koduje cyklinę D1. Cyklina D1 nie przejawia ekspresji w prawidłowych limfocytach B. Stymulacja ekspresji genu *BCL-1*, poprzez jego przeniesienie w region IgH na chromosomie 14 (locus 14q32), powoduje deregulację cyklu komórkowego i jest krytycznym zdarzeniem w patogenezie *MCL* [21].

Cytogenetycznym efektem tej aberracji jest obecność długiego markera (14q+), powstałego z przeniesienia długiego ramienia chromosomu 11 na chromosom 14, oraz silnie skróconego chromosomu 11

(11q-) (Ryc. 6). Pojawiające się aberracje wtórne, szczególnie obejmujące regiony 3q, 7p, 12q czy delecje w obszarze 17p mogą świadczyć o niebezpieczeństwie progresji do fazy blastycznej [22]. Faza blastyczna charakteryzuje się obecnością komórek tetraploidalnych z podwojonym markerem t(11;14) i towarzyszącymi licznymi aberracjami strukturalnymi.

Badanie efektywności leczenia czy obecności choroby resztkowej w przypadkach chłoniaka z komórek płaszczu (*MCL*) można przeprowadzić zarówno przez stwierdzenie ekspresji cykliny D1 techniką cytometrii przepływową, jak i techniką FISH przez detekcję rearanżacji w regionie genu *BCL-1*. Obok typowych form *MCL* obecność markera t(11;14) notuje się w rzadkich przypadkach *CLL*, *PLL* czy śledzionowej postaci chłoniaka ze strefy brzeżnej. Istnieją sugestie, że mogą to być atypowe przypadki *MCL*.

Chłoniak z ośrodków rozmnażania (*follicle centre cell lymphoma* – *FL*) jest jednym z częściej występujących chłoniaków nieziarniczych u dorosłych. Zwiększona ekspresja białka *BCL-2* związana jest na ogół z typową dla

FL translokacją t(14;18)(q32;q21) (Ryc. 6), występującą aż w 70-80% przypadków [4]. W wyniku tej translokacji dochodzi do deregulacji inhibitora apoptozy – genu *BCL-2* (18q21) przez przeniesienie go w region promotora genu dla IgH (14q32) bądź (rzadko) IgL (locus 2p11 lub 22q11). Zmiana promotora stymuluje nadmierną ekspresję *BCL-2*, opóźniając w rezultacie programowaną śmierć komórek. Translokacja t(14;18) uważana jest za zmianę pierwotną w FL. Towarzyszą jej często pojedyncze bądź liczne zmiany wtórne, takie jak: +7, del(6q), +12, +X, +18, +5, +8, der(18), +21 (w 10-25% przypadków) [23]. Na ogół przebieg choroby jest powolny, jednak w ok. 50% przypadków notuje się przejście w chłoniaka rozlanego z dużych komórek B. Zmiany wtórne, występujące w bardziej zaawansowanych stadiach FL ze zwiększonym ryzykiem progresji do DLBCL, to głównie delecje: ubytki fragmentów chromosomów 10q, 13q, 3q, 17p, 17q, 2p, 10p.

Chłoniak rozlany z dużych komórek B (*DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma*) jest bardziej agresywny niż chłoniak grudkowy, z którego często się wywodzi. Nowotwory tej grupy charakteryzuje duża heterogenność kliniczna i genetyczna. Obok typowej dla FL aberracji t(14;18) charakteryzuje się on zmianami pierwotnymi, obejmującymi najczęściej region *BCL6* na chromosomie 3 (3q27). W ok. 20% zmianie pierwotnej towarzyszą mutacje p53, wskazujące na gorsze rokowanie [24]. Rearanżacja w regionie *c-MYC*, w obrazie cytogenetycznym widoczna jako translokacja t(8;14)(q24;q32), występuje w 7-10% przypadków. Obecnie w 6-30% przypadków wykrywa się aberracje obejmujące region *BCL6*, widoczne w postaci translokacji wariantowych z udziałem chromosomu 3: t(3;V)(q27;V) [25, 26]. Partnerem tej translokacji bywa najczęściej chromosom 14 z punktem pęknięcia w prążku q32 oraz chromosomy 2p11, 22q11, 6p21 lub 11q23. Przypadki takie wydają się wiązać z lokalizacją pozawęzłową i lepszym rokowaniem.

Zmiany wtórne obejmują na ogół chromosomy 3, 5, 7, 11, 12, 18 i X. Kariotyp z licznymi zmianami wtórnymi (*complex karyotype*) związany jest z krótszym okresem przeżycia.

Chłoniak Burkitta (*Burkitt's lymphoma – BL*) w fazie białaczkowej określanej jest jako ostra białaczka limfoblastyczna L3 z komórek B (FAB) (*lymphoblastic leukemia ALL L3*). Kryteria diagnostyczne różnicowania chłoniaków BL, BL-L (*Burkitt like lymphoma*) i DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*) nie zawsze są w pełni rozstrzygające [27]. Rozpoznanie powinno być więc oparte na połączonej ocenie obrazu morfologicznego, fenotypu komórek i kariotypu [28].

Zasadniczym czynnikiem patogenezy chłoniaków Burkitt'a jest deregulacja ekspresji genu *c-MYC* (locus 8q24). Przyczyną nieprawidłowej ekspresji tego genu jest jego przeniesienie w rejon aktywnego promotora jednej z trzech immunoglobulin, stwierdzone we wszystkich przypadkach BL. Pierwotną, najczęściej występującą, zmianą kariotypową jest translokacja t(8;14)(q24;q32) (Ryc. 5), opisana w 70-80% przypadków [29]. Biorący udział w tej translokacji chromosom 14 zawiera w prążku q32 gen dla

ciężkiego łańcucha IgH, którego promotor aktywuje gen *c-MYC*. Zmiany wariantowe, obejmujące typowy punkt pęknięcia 8q24, występują w postaci translokacji t(2;8)(p11;q24) oraz t(8;22)(q24;q11). W pierwszej z nich zaangażowany jest gen łańcucha lekkiego κ (chromosom 2, punkt pęknięcia p11) – 12% przypadków, w drugiej zaś – gen łańcucha lekkiego λ (chromosom 22, q11) – 8% przypadków [30]. W sporadycznych przypadkach diagnozowanych jako BL z nietypowymi translokacjami, obejmującymi region lokalizacji genu *c-MYC* [28], zaleca się potwierdzić obecność rearanżacji w obrębie tego genu, szczególnie przy atypowym przebiegu bądź gorszej odpowiedzi na leczenie. Brak rearanżacji genu *c-MYC* poddaje w wątpliwość pierwotną diagnozę, natomiast analiza innych nieprawidłowości kariotypu może wskazać kierunek weryfikacji diagnozy. I tak np.: obecność translokacji t(14;18), obejmującej region 18q21 (gen *BCL-2*), występującej obok typowych dla BL aberracji angażujących rejon *c-MYC* (8q21), wskazuje na atypowego chłoniaka Burkitt'a (*Burkitt-like lymphoma, BL-L*).

Inne aberracje wtórne, stwierdzone najczęściej w komórkach BL, to: delecja 6q11-14, delecja w obszarze 17p oraz trisomie 12, 7, 8 i 18. Duplikacja fragmentu długiego ramienia chromosomu 1 (1q23-24) związana jest prawdopodobnie z powieleniem genu odpowiedzialnego za inwazyjność komórek nowotworowych [31].

Chłoniaki z komórek strefy brzeżnej (*marginal zone B-cell lymphoma – MZBCL*) to zróżnicowana grupa nowotworów o powolnym przebiegu. Wywodzą się one z komórek tkanki limfatycznej błon śluzowych (*mucosa-associated lymphoid tissue, MALT*), komórek strefy brzeżnej śledziony (*splenic form*) oraz węzłów chłonnych. Te trzy formy wykazują podobne cechy histologiczne i immunologiczne [32]. Ich patogeneza nie jest do końca poznana, przy czym znaczna część przypadków związana jest z infekcją *Helicobacter pylori*. Najczęściej (u 40-50% pacjentów z lokalizacją pozawęzłową) występuje translokacja t(11;18)(q21;q21), prowadząca do fuzji genu *API2* (inhibitor apoptozy) oraz genu *MLT*. Mechanizm patogenezy jest tu odmienny niż w większości chłoniaków. W wyniku pęknięcia genów w obszarze kodującym i ich translokacji, powstaje nowe białko fuzyjne o właściwościach anty-apoptotycznych. Inny regulator apoptozy, gen *BCL10*, jest zaangażowany w rzadką translokację t(1;14)(p21;q32) [33]. Obecność tej zmiany skorelowana jest z gorszą prognozą. W przypadkach MALT pozawęzłowych (*gastric*) z translokacją t(11;18) istnieje niewielkie prawdopodobieństwo dobrej odpowiedzi na terapię antybiotykową. Równocześnie przypadki takie charakteryzuje niskie ryzyko transformacji do chłoniaka z dużych komórek (*large-cell*).

Delecja del(7)(q22-31) jest typowa dla postaci śledzionowej. Najczęściej spotykane, inne aberracje kariotypowe, takie jak częściowa trisomia chromosomów 3, 18 i X, zmiany strukturalne obejmujące obszary chromosomów 1q21 i 1q32 oraz częściowe lub całkowite delecje krótkich ramion chromosomów 17 i 9, są na ogół wspólne dla chłoniaków strefy brzeżnej, niezależnie od ich pierwotnej lokalizacji [34].

Podsumowanie

Poznanie molekularnych mechanizmów patogenezы i rozwoju chłoniaków niezziarnicznych przyniosło intensywny postęp w metodach diagnozowania B-NHL, umożliwiając bardziej precyzyjne określenie typu nowotworu, a także poznanie nowych czynników prognostycznych. Obecnie stosowana klasyfikacja chorób rozrostowych układu chłonnego REAL/WHO oparta jest na analizie danych morfologicznych, immunofenotypowania (barwienia immunohistochemiczne, cytometria przepływowa) oraz badań cytogenetycznych i molekularnych, pozwalających na określenie genetycznych nieprawidłowości występujących w komórkach nowotworu. W wielu ośrodkach badania genetyczne i molekularne stanowią nieodłączny element procesu diagnostycznego, mającego na celu precyzyjne rozpoznanie i różnicowanie subtypów chłoniaków niezziarnicznych.

Wraz z rozwojem technik badawczych, szczególnie cytogenetyki molekularnej, wzrasta rola badania cytogenetycznego. Poznanie cytogenetycznych czynników prognostycznych zwiększa przydatność informacji uzyskiwanych w wyniku analizy aberracji kariotypowych, w praktyce klinicznej. W świetle dotychczasowej wiedzy należy przyjąć, że badanie cytogenetyczne powinno stanowić integralną część nowoczesnej diagnostyki w tej grupie nowotworów, pozwalającej na optymalny wybór postępowania terapeutycznego.

Dr n. med. Barbara Pięnkowska-Grela
Samodzielna Pracownia Cytogenetyki
Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie,
ul. K.W. Roentgena 5
02-781 Warszawa
e-mail: barpien@coi.waw.pl

Piśmiennictwo

- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J i wsp. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-49.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H i wsp. A revised European – American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994; 84: 1361-92.
- <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitel-Search>
- Heim S, Mitelman F. Malignant lymphomas. *Cancer Cytogenetic*, Wiley-Liss, Inc. 1995; 267-92.
- World Health Organization Classification of Tumors – Pathology & Genetics, Tumours of Haemopoietic and Lymphoid Tissues: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Lyon, France: IARC Press; 2001.
- Mitelman F. *Catalogue of Chromosome Aberrations in Cancer* (Ed 5). New York, NY: Wiley-Liss, 1994.
- Harris NL, Stein H, Coupland SF i wsp. New Approaches to Lymphoma Diagnosis, <http://www.asheducationbook.org/cgi/content/full/2001/1/194>.
- Dalla-Favera R, Gaidano G. Molecular Biology of Lymphomas. W: De Vita VTJ, Hellman S, Rosenberg S.A. (wyd.). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 2215-35.
- Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3707-3721.
- Klein G. Multiple phenotypic consequences of IG/myc translocation in B-cell-derived tumors *Genes Chrom Cancer* 1989; 1: -8.
- Wang HC, Fedoroff S. Banding in humane chromosomes treated with trypsin. *Nature, New Biol* 1972; 235: 52-3.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2934-8.
- ISCN *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Mitelman F. Basel: S Karger; 1995.
- Fifth International Workshop on Chromosomes in Leukemia-Lymphoma. *Blood* 1987; 70: 1554-64.
- Doehne H, Stilgenbauer S, Benner A i wsp. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-6.
- Doehner H, Fischer K, Bentz M. P-53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic lymphocytic leukemias. 1995; *Blood*, 85: 1580-9.
- Popławska-Szczygłowska L, Walewski J, Pienkowska-Grela B i wsp. Chronic lymphocytic leukaemia presenting with central nervous system involvement. *Medical Oncology* 1999; 16: 65-68.
- Iida S, Rao PH, Ueda R i wsp. Chromosomal rearrangement of the PAX-5 locus in lymphoplasmacytic lymphoma with t(9;14)(p13;q32). *Leuk Lymphoma* 1999; 34: 25-33.
- Morrison AM, Nutt SL, Thevenin C i wsp. Loss- and gain- of-function mutations reveal an important role of BASP (Pax-5) at the start and end of B-cell differentiation. *Semin Immunol* 1998; 10: 133-42.
- Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ i wsp. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 1997; 89: 2067-78.
- Raffled M, Jaffe ES. Bcl-1, t(11;14), and mantle cell lymphoma. *Blood* 1991; 78: 259-63.
- Bea S, Ribas M, Hernandez JM i wsp. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999; 93: 4365-74.
- Horsman DE, Connors JM, Pantzar T i wsp. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 30: 375-82.
- Offitt K, Wong G, Philippa DA i wsp. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood* 1991; 77: 1508-15.
- Offitt K, Lo Coco F, Louie DC i wsp. Rearrangement of BCL-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *New Engl J Med* 1994; 331: 74-80.
- Chaganti SR, Chen W, Parsa NZ i wsp. Involvement of BCL6 in chromosomal aberrations affecting band 3q27 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 23: 323-7.
- Mioduszewska O. Patologia chłoniaków i ziarnicy złośliwej. Chłoniak Burkitta. *Polish J Pathol* 1998; 49: 59-60.
- Walewski J, Pienkowska-Grela B, Rymkiewicz G i wsp. Combined pathologic, immunophenotypic, and cytogenetic analysis of Burkitt's and Burliitt-like lymphoma. *Hematol J, suppl* 2001; 1: 142.
- Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17: 47-56.
- Kornblau SM, Goodacre A, Cabanillas F. Chromosomal abnormalities in adult non-endemic Burkitt's lymphoma and leukemia: 22 new reports and a review of 148 cases from the literature. *Hematol Oncol* 1991; 9: 63-78.
- Zijmonic DB, Keck-Waggenger C, Popescu NC. Novel genomic imbalances and chromosome translocations involving *c-myc* gene in Burkitt's lymphoma. *Leukemia* 2001; 15: 1582-8.
- Zucca E, Roggero E, Pileri A. B-cell lymphoma of MALT type: a review with special focuses on diagnostic and management problems of low-grade gastric tumors. *Br J Haematol* 1998; 100: 3-14.
- Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L i wsp. Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2000; 18: 1-13.
- Cunéo A, Bigoni R, Roberti MG i wsp. Molecular cytogenetic characterization of marginal zone B-cell lymphoma: correlation with clinicopathologic findings in 14 cases. *Haematologica* 2001; 86: 64-70.

Otrzymano: 25 lipca 2002 r.
Przyjęto do druku: 27 września 2002 r.