

JANUSZ LIMON

Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Akademii Medycznej
Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

DLACZEGO CYTOGENETYCY ANALIZUJĄ ABERRACJE
CHROMOSOMOWE, KTÓRE POJAWIAJĄ SIĘ W KOMÓRKACH
NOWOTWOROWYCH CZŁOWIEKA?*

Każda prawidłowa komórka somatyczna człowieka podczas swojego podziału mitotycznego wykazuje obecność 46 chromosomów, pośród których wyróżniamy 44 chromosomy autosomalne oraz dwa chromosomy płciowe XX u kobiety i XY u mężczyzny. Reprezentatywny zestaw chromosomów danej komórki, ułożony według obowiązujących zasad, nazywamy kariogramem (ryc. 1). Komórki płciowe natomiast posiadają zredukowaną liczbę chromosomów do 23, tak że powstająca w procesie zapłodnienia zygota posiada 46 chromosomów dając początek organizmowi, którego wszystkie komórki somatyczne będą posiadały 46, czyli diploidalną liczbę chromosomów (nazewnictwo genetyczne jest wyjaśnione w słowniku terminów genetycznych znajdującym się na końcu artykułu).

Upłynęło wiele lat żmudnych doświadczeń, zanim cytogenetycy zdołali ustalić prawidłową liczbę chromosomów człowieka. Wynikało to przede wszystkim z trudności metodycznych w uzyskiwaniu czytelnych obrazów chromosomów. Jak wiadomo, chromosomy uwidaczniają się podczas podziału mitotycznego komórki, szczególnie wyraźnie w stadium metafazy. Dlatego też, aby uzyskać czytelne do analizy chromosomy, stosowano początkowo tak zwane metody bezpośrednie analizy tkanek, których komórki wykazują wysoką aktywność mitotyczną, na przykład szpik kostny. Najlepiej jednak do tego celu służą hodowle komórek *in vitro*, na przykład fibroblastów pobranych ze skóry czy też limfocytów T pobranych z krwi obwodowej pacjenta. Drugą ważną sprawą metodyczną było zatrzymanie podziału komórki właśnie w stadium metafazy, kiedy to chromosomy są najbardziej widoczne. W tym celu stosuje się obecnie kolchicynę (alkaloid roślinny wyizolowany z ziemowita jesiennego), która uszkadzając mikrotubule wrzeciona podziałowego komórki zatrzymuje mitozę w stadium metafazy. Wreszcie ostatnim ważnym czynnikiem okazało się wprowadzenie szoku hipotonicznego komórki będącej w stadium metafazy — komórka taka poddana działaniu, na przykład, wody pęcznieje, a po jej utrwaleniu w preparacie mikroskopowym obserwuje się duży rozrzut chromosomów w tak zwanej płytce metafazalnej, co umożliwia wykonanie analizy liczby lub struktury chromoso-

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Numer projektu badawczego 4 S405 018 06

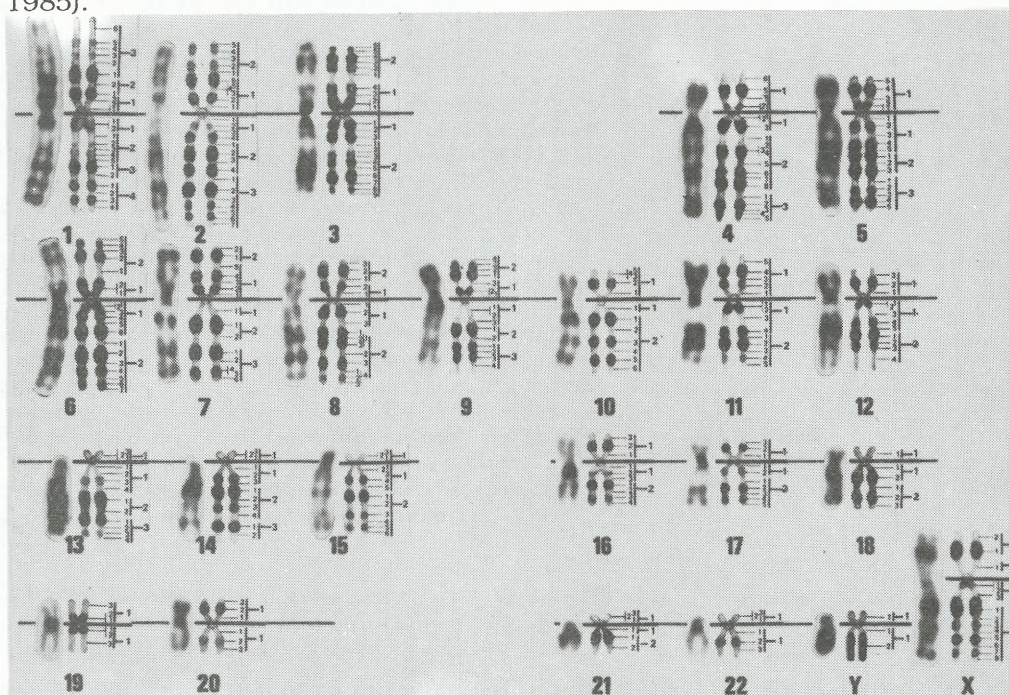


Ryc. 1. Górna część ryciny przedstawia chromosomy człowieka w stadium metafazy podziału komórki wybarwione techniką prążkową. W dolnej części znajduje się kariogram ułożony z tychże chromosomów według obowiązujących zasad. Prawidłowy zapis tego kariogramu: 46,XY (LIMON i MITELMAN 1994).

mów. Dopiero równoczesne zastosowanie wszystkich powyższych osiągnięć metodycznych doprowadziło do odkrycia prawidłowej liczby chromosomów człowieka przez szwedzkich badaczy TJO i LEVANA w 1956 roku.

Kolejnym postępem w badaniach cytogenetycznych było odkrycie przez CASPERSSONA i współpracowników (1970), także szwedzkich badaczy, zjawiska nierównomiernej, tak zwanej prążkowej fluorescencji ramion chromosomów w mikroskopie fluorescencyjnym po wybarwieniu ich pochodnymi akrydyny (BEIL i LIMON 1973). Okazało się mianowicie, że każdy chromosom człowieka wykazuje wzdłuż swoich ramion charakterystyczną budowę prążkową, która pozwala na jego precyzyjną identyfikację pośród pozostałych chromosomów i w konsekwencji umożliwia wykrycie ewentualnych jego mutacji wskutek zmiany liczby chromosomów w zaburzeniach podziału w komórce, bądź też uszkodzeń jego struktury. W chwili obecnej cytogenetycy stosują kilkadziesiąt różnych technik ujawniających prążkową strukturę chromosomów oraz opracowali mapy rozkładu powtarzalnych prążków w poszczególnych chromosomach człowieka (ryc. 2)

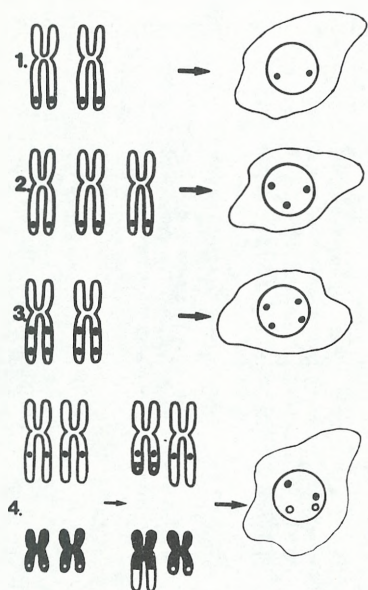
wraz z zasadami zapisu uszkodzeń (aberracji) tychże chromosomów (ISCN, 1985).



Ryc. 2. Prawidłowy kariotyp człowieka. Obok każdego chromosomu wybarwionego techniką prążkową znajduje się mapa występujących w nim regionów i prążków. Ramiona krótkie określamy literą „p” a długie literą „q”. Regiony i prążki zapisujemy cyframi arabskimi. Na przykład prążek 3 regionu 1 ramion długich chromosomu 2 zapisujemy: 2q31.

Najnowszym osiągnięciem technik cytogenetycznych jest połączenie analizy prążkowej chromosomów z hybrydyzacją *in situ*. Hybrydyzacja *in situ* umożliwia identyfikację całych chromosomów (tak zwane malowanie chromosomów), ewentualnie wybranych ich regionów lub prążków, a nawet niewielkich odcinków DNA (genów) w ramionach chromosomów lub w jądrach komórek będących w stanie spoczynku (interfazalne komórki). Należy w tym celu dysponować odpowiednią sondą (odcinkiem) DNA, którą po sprzężeniu na przykład z biotyną hybryduje się z komplementarnymi odcinkami DNA w chromosomach lub w jądrach interfazowych. Specyficzne miejsca hybrydyzacji wykrywa się przeciwciałami sprzężonymi ze związkiem fluorescencyjnym (technika FISH — fluorescence *in situ* hybridization) i w konsekwencji obserwuje się pod mikroskopem fluoryzujący odcinek chromosomu metafazowego, ewentualnie świecący punkt w jądrze interfazalnym komórki w miejscu odpowiadającym lokalizacji badanego chromosomu czy też genu (ryc. 3) (GRAY i PINKEL 1992). Szczegółowy opis tych molekularnych technik cytogenetycznych oraz ich zastosowanie w medycynie i biologii jest zawarty w kilku publikacjach polskich autorów (ZAWADA i LATOS-BIELEŃSKA 1993, BOCIAN 1993, GRONWALD i współaut. 1994).

W patologii człowieka jest znany cały szereg chorób czy też zespołów chorobowych wywołanych zaburzeniami liczby bądź też struktury chromosomów.



Ryc. 3. Schemat efektów barwień cytologicznych w przypadku zastosowania hybrydyzacji *in situ*.

Po lewej stronie znajdują się wybrane chromosomy w stadium metafazy, a po prawej jądra interfazalne komórek, w których znajdują się te chromosomy. Zastosowano znakowaną sondę fragmentu DNA znajdującego się w ramionach długich chromosomów. W przypadku gdy w metafazie znajdują się dwa takie chromosomy, to w jądrze interfazalnym tej komórki obserwujemy dwa świecące punkty (technika FISH)(A), a gdy występuje trisomia tychże chromosomów — trzy świecące punkty (B). Można również stosować znakowanie dwóch różnych fragmentów DNA znajdujących się w pobliżu siebie w ramionach długich chromosomów — w jądrze interfazalnym obserwujemy dwa znajdujące się blisko siebie świecące punkty (C). Gdy natomiast dojdzie to translokacji pomiędzy dwoma chromosomami i dla których wyznakowania zastosowano sondy DNA sprzężone ze fluorochromami o różnym kolorze świecenia — można wykryć tę translokację w jądrze interfazalnym w postaci dwóch znajdujących się obok siebie świecących różnymi kolorami punktów (D).

Zjawisko powstawania tych aberracji chromosomowych zachodzi najczęściej w komórkach rozrodczych rodziców i powstające mutacje chromosomowe są przekazywane potomstwu powodując ich poronienia samoistne lub w wielu przypadkach liczne wady rozwojowe i choroby. Okazuje się, że ponad 50% embrionów pochodzących ze spontanicznych poronień wykazuje obecność aberracji chromosomowych. Do najbardziej częstych zespołów chorobowych wywołanych aberracjami chromosomowymi (tak zwane chromosomopatie) należy tak zwany „mongolizm” — zespół Downa (trisomia chromosomu 21). Tak więc niektóre aberracje chromosomowe, występujące we wszystkich komórkach organizmu człowieka, są najczęściej letalne (wywołują poronienia embrionów obarczonych tą zmianą) lub wywołują choroby.

Do powstawania aberracji chromosomowych może dochodzić również w pojedynczych komórkach somatycznych różnych tkanek i narządów ciała ludzkiego podczas rozwoju osobniczego na skutek działania znanych lub najczęściej nie poznanych dotąd czynników mutagennych. Oczywiście nie każda aberracja chromosomowa prowadzi do transformacji nowotworowej komórki, w niektórych przypadkach prowadzi do jej śmierci, w innych do powstania klonu komórek (potomstwa jednej komórki) o „niegroźnej dla organizmu mutacji chromosomowej”. Jak się obecnie sądzi, tylko niektóre aberracje chromosomowe prowadzą do transformacji nowotworowej komórki i te właśnie aberracje będą omówione w dalszej części tego artykułu. Należy wyraźnie podkreślić, że w przypadku choroby nowotworowej, aberracje chromosomowe występują wyłącznie w komórkach nowotworowych przy równoczesnym prawidłowym składzie chromosomów w komórkach pozostałych tkanek i narządów organizmu. Dlatego też proces powstawania nowotworu jest nazywany przez wielu autorów chorobą genetyczną pojedynczej komórki somatycznej, w której dochodzi do powstania aberracji chromosomowej, aby następnie poprzez nie kontrolowany rozrost tej komórki doprowadzić do powstania guza nowotworowego (wyjątek

stanowią rzadkie zespoły dziedzicznej predyspozycji do nowotworów). Należy również pamiętać, że zjawisko to może powstać w dowolnej komórce organizmu, praktycznie każdego narządu i w dowolnym okresie czasu życia człowieka. Co więcej, proces ten trwa niekiedy wiele lat zanim zostanie rozpoznany przez lekarza lub bezpośrednio przez chorą osobę.

OBSERWACJE CHROMOSOMÓW W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH CZŁOWIEKA

Analiza chromosomów komórek nowotworowych ma swoją długą tradycję. Już pod koniec ubiegłego stulecia patolog niemiecki, D. von Hansemann zauważył w preparatach mikroskopowych tkanek nowotworowych człowieka nieprawidłowe podziały mitotyczne komórek, co skłoniło go do wysnucia hipotezy, że u podłoża powstawania nowotworów są zaburzenia podziałów komórkowych prowadzące do nierównego podziału jądra komórki. Jak to czasami bywa w nauce, na skutek silnej krytyki jego poglądów przez innych badaczy, w latach późniejszych wycofał się ze swojej koncepcji (według SANDBERGA 1990). Dopiero kolejny badacz niemiecki, THEODOR BOVERI, sformułował mutacyjną teorię powstawania nowotworów w swojej pracy pt. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*, którą opublikował w 1914 roku. Ujmując problem w dużym uproszczeniu: Boveri uważał, że nieprawidłowe podziały mitotyczne zachodzące w komórkach nowotworowych prowadzą do różnej liczby chromosomów, co z kolei prowadzi do transformacji nowotworowej komórki. Koncepcja ta, nazywana teorią mutacji somatycznej, jest uznawana obecnie za jeden z podstawowych mechanizmów powstawania nowotworów i coraz więcej dowodów na istnienie tego mechanizmu dostarczają współczesne wyniki badań cytogenetycznych oraz molekularnych.

Proces powstawania nowotworów jest wieloetapowy i został przedstawiony w artykule CHORAŻEGO i DUXA (1995) w tym zeszycie *Kosmosu*. Obserwacje chromosomów w komórkach nowotworowych, aczkolwiek dotyczą tylko jednego elementu tego złożonego procesu, wydają się tworzyć istotny czynnik w badaniach mechanizmów karcynogenezy. Wynika to z faktu, że rozrastające się w organizmie człowieka komórki nowotworowe wykazują obecność licznych aberracji (mutacji) chromosomowych i to zarówno liczbowych (genomowych), jak i strukturalnych. Dotychczasowe obserwacje wykazują, że liczba chromosomów w komórce nowotworowej wykazuje duże wahania i może zmniejszyć się z prawidłowej do niekiedy liczby około haploidalnej, to znaczy około 23, albo, i tak jest najczęściej, zwiększa się, osiągając niekiedy liczbę dochodzącą do kilkuset chromosomów w jednej komórce. Co więcej, chromosomy komórek nowotworowych ulegają niekiedy bardzo licznym aberracjom strukturalnym — praktycznie obserwuje się w nich wszystkie rodzaje aberracji występujących w komórkach ssaków — delecje, duplikacje, różnego rodzaju translokacje i inwersje. O ile początkowo cytogenetycy nie byli w stanie dokonać szczegółowej charakterystyki tych niekiedy bardzo złożonych aberracji chromosomowych, to od kilku lat, dzięki istotnemu rozwojowi technik hodowli komórek i barwień prążkowych chromosomów, zaczęli dostrzegać pewne korelacje pomiędzy okre-

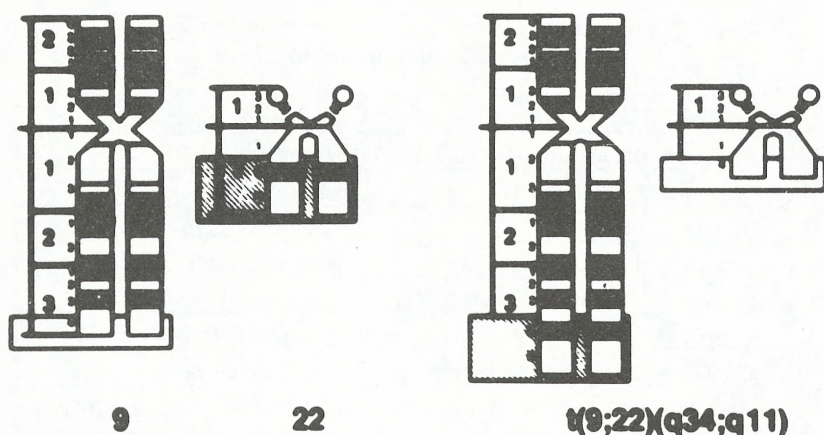
ślonymi aberracjami chromosomowymi, nazywanymi aberracjami pierwotnymi, a rodzajem histologicznym nowotworu, z komórek którego uzyskano te chromosomy (HEIM i MITELMAN 1987, SANDBERG 1990, LIMON i MITELMAN 1994). Ponadto zauważono, że wyniki analizy cytogenetycznej mogą mieć implikacje praktyczne w prognozowaniu klinicznym pacjentów.

ABERRACJE CHROMOSOMOWE W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO (BIAŁACZKI)

Pierwszą swoistą aberrację chromosomową wykryto w komórkach nowotworowych pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową (CML). NOWELL i HUNDERFORD (1960) zauważyli, że w metafazach tychże komórkach występuje mały chromosom, który powstał według nich jako wynik delecji jednego z chromosomów grupy G, jak ustalono potem, chromosomu 22. Należy zaznaczyć, że komórki innych tkanek badanych pacjentów wykazywały obecność prawidłowego zestawu chromosomów. Tak więc tylko komórki szpiku zmienione nowotworowo posiadały nieprawidłowy chromosom, który nazwano, ze względu na miasto, w którym dokonano tej obserwacji — chromosomem filadelfijskim (w skrócie Ph). Wkrótce inni autorzy potwierdzili fakt występowania chromosomu Ph w komórkach nowotworowych pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową oraz w części przypadków ostrej białaczki szpikowej. Co więcej, zaobserwowano, że podczas przełomu blastycznego choroby pojawiają się dodatkowe aberracje chromosomowe, które niekiedy pojawiają się na kilka miesięcy przed wystąpieniem objawów chorobowych (HAUS 1992). Jakże miało to ówczesnie implikacje praktyczne w medycynie? Otóż analiza cytogenetyczna stała się postępowaniem diagnostycznym i prognostycznym w białaczkach oraz zachęciła cytogenetyków i hematologów do dalszych poszukiwań swoistych aberracji chromosomowych w różnych nowotworach układu krwiotwórczego.

Na przykładzie chromosomu filadelfijskiego można prześledzić dalszy rozwój badań genetycznych, w tym molekularnych, w hematologii. Otóż w roku 1973 ROWLEY dzięki zastosowaniu techniki prążkowej identyfikacji chromosomów wykryła, że chromosom Ph nie powstaje, jak początkowo przypuszczano, w wyniku delecji, lecz translokacji wzajemnej pomiędzy chromosomami 9 i 22 i dokładnie sprecyzowała miejsca pęknięć obu chromosomów $t(9;22)(q34;q13)$ (ryc. 4). Obserwacja ta zainteresowała genetyków molekularnych, którzy podjęli się analizy molekularnej genów znajdujących się w miejscu pęknięć tych chromosomów lub w ich pobliżu wychodząc z założenia, że tam właśnie powinny znajdować się geny odpowiedzialne za transformację nowotworową. Już wkrótce wykryto, że w wyniku translokacji pomiędzy chromosomami 9 i 22 dochodzi do przeniesienia protoonkogenu *c-abl* (homologa retrowirusowego onkogenu) znajdującego się w chromosomie 9q34 na chromosom 22q13 w pobliże nie poznanego dotychczas genu *bcr*. Pomimo, iż wkrótce poznano produkt białkowy nowo powstałego genu *bcr/abl*, nie wyjaśniono do końca roli tego białka w procesie transformacji nowotworowej komórek szpiku (NOWELL 1994, RABBITT 1994). Dalsze badania molekularne chromosomu Ph doprowadziły do sklonowania i pełnej charakterystyki genu *bcr/abl* wskazujące, między innymi, na różnice

w miejscu pęknięcia genu *bcr* w procesie formowania chromosomu Ph pomiędzy komórkami przewlekłej białaczki szpikowej oraz ostrej białaczki szpikowej. Efektem tego jest mniejszy produkt białkowy genu *bcr/abl* w ostrej białaczce szpikowej, co wydaje się determinować odmienny przebieg kliniczny obu chorób (NOWELL 1994). Z chwilą gdy sonda genu *bcr/abl* stała się osiągalna dla badaczy i to nawet w formie gotowych do użycia zestawów odczynników, nastąpił zasadniczy przełom w diagnostyce i monitorowaniu leczenia przewlekłej białaczki szpikowej oraz niektórych innych postaci białaczek — w tym ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) występującej zarówno u dzieci, jak i dorosłych (KOWALCZYK 1994) oraz ostrej białaczki szpikowej (AML) u dorosłych. Wykrycie chromosomu Ph w komórkach tych ostatnich białaczek ma znaczenie dla pacjentów, gdyż znacznie pogarsza rokowanie kliniczne (KOWALCZYK 1994, SKOTNICKI 1993).



Ryc. 4. Schemat translokacji $t(9;22)(q34;q13)$ powstającej w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej. Powstały w wyniku tej translokacji chromosom będący pochodnym chromosomu 22 (z prawej strony) nazywamy chromosomem Ph.

Aczkolwiek badania cytogenetyczne chromosomów powinny być nadal wykonywane w diagnostyce tych chorób, to dysponując sondą genu *bcr/abl* możemy wykryć obecność komórek z tą specyficzną translokacją dzięki metodzie PCR. Jest to wysoce czuła technika biologii molekularnej, która pozwala na wykrycie, na przykład, jednej komórki z tą translokacją na milion prawidłowych komórek szpiku (NOWAK i JANUSZKIEWICZ 1994). Co więcej, dysponując znakowaną sondą tego genu można wykonać opisane powyżej molekularne badanie cytogenetyczne, tak zwaną hybrydyzację *in situ* polegającą na łączeniu się (hybrydyzacji) tej sondy z genem translokacyjnym, znajdującym się w jądrze interfazowym komórki i wykrywaniu miejsca hybrydyzacji metodami immunohistochemicznymi pod postacią barwnych reakcji lub fluorescencji. Tak więc aby wykryć chromosom Ph u pacjenta z podejrzeniem określonej białaczki, nie musimy w niektórych przypadkach hodować komórek szpiku w celu uzyskania chromosomów, lecz możemy identyfikować tę translokację w jądrze interfazalnym komórki szpiku na zwykłym rozmazie cytologicznym tychże komórek, a jeżeli komórki nowotwo-

rowe przedostaną się ze szpiku do krwi obwodowej to znajdujemy je w rozmazie tej krwi na szkiełku mikroskopowym.

Przedstawiony powyżej przykład chromosomu Ph ilustruje postęp metodyczny genetyków w badaniach chorób nowotworowych układu krwiotwórczego. Jakie zasadnicze implikacje poznawcze i praktyczne wynikają z osiągniętego postępu tych badań?

Po pierwsze, okazało się, że większość chorób nowotworowych układu krwiotwórczego wykazuje obecność swoistych aberracji chromosomowych dla określonego rodzaju białaczki. Stąd też analiza aberracji chromosomowych stała się niezależnym czynnikiem wspomagającym diagnostykę różnicową tych chorób. Tabela 1 przedstawia wybrane (najbardziej częste) choroby nowotworowe szpiku, w których wykryto swoiste aberracje chromosomowe.

Tabela 1

Przykłady swoistych aberracji chromosomowych występujących w nowotworach układu krwiotwórczego

Choroba	Anomalie chromosomowe
Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)	t(1;19)(q23;p13)
Mielodysplazje (MDS)	del(5q)
Chłoniak Burkitt'a	t(8;14)(q24;q32)
Ostra białaczka szpikowa (AML)	t(8;21)(q22;q22)
Przewlekła białaczka szpikowa (CML)	t(9;22)(q34;q11)
Chłoniak złośliwy	t(14;18)(q32;q21)
Ostra białaczka promielocytowa (APL)	t(15;17)(q22;q11)
Ostra białaczka mielomonocytowa (AMMol)	inv(16)(p13q22) lub del(16)(q22)

Po drugie, kompleksowa analiza korelacji pomiędzy aberracjami chromosomowymi a przebiegiem klinicznym choroby wykazały, że obserwacje cytogenetyczne komórek nowotworowych mają znaczenie prognostyczne w klinice. Tabela 2 przedstawia znaczenie prognostyczne aberracji chromosomowych występujących w komórkach nowotworowych chorych z ostrą białaczką szpikową i ostrą białaczką limfoblastyczną (SKOTNICKI 1993). Należy podkreślić, że właściwe rozpoznanie choroby oraz znajomość czynnika ryzyka decydują o wyborze przez lekarzy określonej strategii leczenia to znaczy wyboru odpowiednich leków cytostatycznych i, niekiedy, wielkości dawek i czasu podawania tych leków (SKOTNICKI 1993, KOWALCZYK 1994).

Po trzecie, ponieważ analiza molekularna PCR lub hybrydyzacja *in situ* pozwalają na wykrycie niewielkiej liczby komórek nowotworowych (GRAY i PINKEL 1992), to wyniki tych badań mogą pomóc lekarzowi w szczególnych przypadkach postępowania klinicznego, kiedy lekarzowi niezbędna jest informacja — czy w organizmie pacjenta, pomimo intensywnego leczenia, pozostały komórki białaczkowe (tak zwana choroba resztkowa)? Podobnie w przypadku przeszczepu prawidłowych komórek szpiku pacjentowi, u którego w postępowaniu transplantacyjnym zniszczono promieniowaniem komórki nowotworowe szpiku, pojawia się pytanie — czy przeszczepione normalne komórki szpiku przyjęły się i tworzą

zdrową tkankę szpikową, a może nie zniszczone do końca komórki nowotworowe zaczynają się rozmnażać i „wypierać” prawidłowe komórki szpikowe uzyskane od zdrowego dawcy?

Tabela 2

Znaczenie prognostyczne aberracji chromosomowych u chorych z ostrą białaczką szpikową (AML) oraz z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL). (Według: SKOTNICKI 1993, zmodyfikowany)

Rokowanie kliniczne	Rodzaje aberracji chromosomowych	
	AML	ALL
Dobre	inv (16) del (16) t(8;21) t(15;17)	hiperdiploidia
Pośrednie	t(9;22) t(v;11) del(9q) +8	zbliżony do haploidi diploidia
Złe	t(6;9), del(5q), del(7q) t(1;7), inv(3) t(3;3)	t(1;19), t(4;11) t(9;22), t(8;14) t(11;14), t(v;12) del(6q)

Po czwarte, uzyskane informacje o genach zlokalizowanych w miejscach lub w pobliżu miejsc pęknięć chromosomów zaangażowanych w swoje translokacje oraz znajomość produktów białkowych tych nowo powstających genów pogłębiają naszą wiedzę o mechanizmie powstawania nowotworów. Stwarza to także nadzieję na swoistą terapię przyczynową chorób nowotworowych. Niezwykle interesująca jest ostatnio dokonana obserwacja, że w wyniku translokacji pomiędzy chromosomami 15 i 17 w komórkach ostrej białaczki promielocytowej (APL) dochodzi do uszkodzenia genu (w chromosomie 17) odpowiedzialnego za budowę podjednostki receptora kwasu retinowego. Dlatego też w leczeniu powyższej białaczki stosuje się, z pozytywnym rezultatem, wysokie dawki kwasu retinowego (NOWELL 1994).

ABERRACJE CHROMOSOMOWE W KOMÓRKACH LITYCH GUZÓW NOWOTWOROWYCH

Dlaczego lite guzy nowotworowe człowieka stały się tak intensywnie badanym polem działania cytogenetyków? Na pewno sprawiły to odkrycia cytogenetyczne dokonane w komórkach nowotworowych układu krwiotwórczego, które zostały opisane w poprzednim podrozdziale. Albowiem, jeżeli wyjdziemy z założenia, że proces powstawania nowotworu jest związany z mutacją somatycznej komórki, należy oczekiwać, że podobnie jak w komórkach szpiku, w komórkach innych tkanek człowieka dochodzi do powstawania swoistych aberracji chromosomowych, które mają związek z transformacją nowotworową tychże komórek. Wyniki badań cytogenetycznych licznych guzów nowotworowych człowieka ostatnich lat wykazały, że oczekiwania genetyków były słuszne. Tabela 3 przedstawia najczę-

stsze swoiste aberracje chromosomowe występujące w niektórych litych guzach człowieka.

Tabela 3

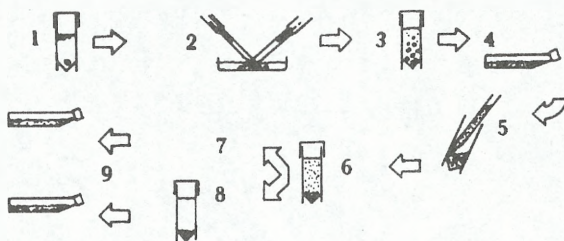
Przykłady swoistych aberracji chromosomowych występujących w litych guzach nowotworowych człowieka

Choroba	Anomalie chromosomowe
Guzy mezenchymalne: Łagodne: Tłuszczak	translokacje chromosomu 12q13-15 chromosomy pierścieniowe t(12;14)(q14-15;q23-24)
Mięśniak macicy Złośliwe: Tłuszczakomięsak śluzowaty Maziówczak złośliwy Mięśniako-mięsak prążkowanokomórkowy	t(12;16)(q13.3;p11.2) t(X;18)(p11;q11) t(2;13)(q35-37;q14)
Guzy nabłonkowe: Rak oskrzela Rak nerek Guz Wilms'a (nerki)	del(3)(p14-23) del(3)(p11-14) oraz t(3;5)(p13;q22) del(11)(p13)
Guzy neurogenne, neuroektodermalne: Oponiak Siatkówczak Zwojak zarodkowy Guz Ewing'a	del(22)(q12-13) oraz -22 del(13)(q14) del(1)(p31-pter) oraz HSR/DMS t(11;22)(q24;q12) oraz +8

Wyniki te uzyskano po wielu latach przełamywania trudności metodycznych, albowiem o ile uzyskanie chromosomów ze szpiku kostnego człowieka nie przedstawia obecnie problemu metodycznego dla doświadczonego zespołu cytogenetyków, to analiza chromosomów komórek litych guzów nowotworowych stanowi nadal dość duży problem metodyczny. Wydaje się paradoksem, że komórki złośliwie rosnącego guza nowotworowego w zasadzie powinny „dostarczać” dużo komórek w stadium metafazy. Tymczasem praktyka wykazuje, że wyprowadzanie hodowli pierwotnych *in vitro* tychże komórek, które, jak wspomniano powyżej, stanowią główne źródło chromosomów, nie jest proste. Te niekiedy szybko dzielące się komórki w tkance guza nowotworowego, z chwilą „wyrwania” poprzez działanie chirurga z naturalnego środowiska jakim jest guz, tracą aktywność mitotyczną w hodowli *in vitro* i dość często hodowle te przerażają prawidłowymi komórkami znajdującymi się w obrębie guza, na przykład fibroblastami. Zainteresowanych tym problemem Czytelników odsyłam do prac przeglądowych z tego zakresu (LIMON i MITELMAN 1994, LIMON 1994a).

W drugiej połowie lat osiemdziesiątych dokonano przełomu metodycznego w analizie chromosomów komórek litych guzów człowieka i obecnie najczęściej stosuje się następującą procedurę (ryc. 5): podczas operacji chirurg wycina w jałowych warunkach fragment tkanki guza nowotworowego i w sterylnym naczyniu przesyła do laboratorium cytogenetycznego. Tam również w warunkach jałowych rozdrabnia się nożyczkami tkankę guza i poddaje działaniu enzymu zwanego kolagenazą przez okres od kilku do kilkunastu godzin. Enzym ten powoduje uwolnienie komórek z tkanki guza i tym samym uzyskuje się zawiesinę pojedynczych komórek nowotworowych, z których po eliminacji mar-

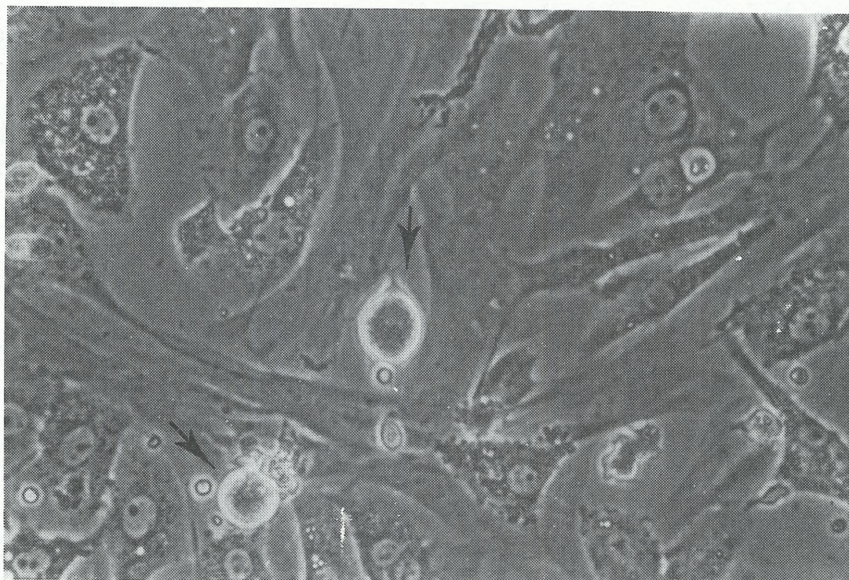
twych komórek zakłada się w naczyniach hodowlanych (najczęściej plastikowych) pierwotną hodowlę komórkową stosując różnego rodzaju wzbogacone pożywki (LIMON i MITELMAN 1994, LIMON 1994a). W ten sposób komórki nowotworowe, wprowadzone do pierwotnej hodowli *in vitro* po kilkunastu godzinach, a najczęściej po kilku dobach zaczynają się rozmnażać (ryc. 6) i stają się źródłem chromosomów dla cytogenetyka poszukującego swoistych aberracji chromosomowych w różnych rodzajach guzów nowotworowych.



Ryc. 5. Proces zakładania pierwotnej hodowli *in vitro* z litego guza nowotworowego (LIMON i MITELMAN 1994). Kolejne etapy tej procedury są opisane w tekście.

Fakt występowania swoistych aberracji chromosomowych w niektórych rodzajach guzów nowotworowych człowieka, podobnie jak w chorobach nowotworowych hematologicznych, nadał nową rolę cytogenetyce w diagnostyce różnicowej tych guzów. Oczywiście, podstawowe rozpoznanie tych nowotworów opiera się na rutynowych badaniach histopatologicznych prowadzonych przez patologów, czy też immunohistochemicznych czy też w mikroskopie elektronowym. Cytogenetyk może jednak wypowiedzieć się co do rozpoznania histopatologicznego w przypadku tak zwanych anaplastycznych, niskozróżnicowanych złośliwych guzów, kiedy to wyniki wyżej wspomnianych metod stosowanych przez patologów nie dają jednoznacznej odpowiedzi (LIMON i MITELMAN 1994).

Podobnie jak w przypadku chorób nowotworowych szpiku genetycy molekularni zainteresowali się odkryciami cytogenetyków dokonanymi na materiale pochodzącym z litych guzów nowotworowych. Na przykładzie nowotworu dziecięcego, nazywanego mięsakiem Ewing'a, opiszę dokonany w ostatnich latach postęp metodyczny w rozpoznawaniu tego guza, które dość często przysparza kłopotów diagnostycznych patologom, a wczesna diagnoza tego złośliwego nowotworu ma istotne znaczenie w wyborze terapii. W roku 1984 TURC-CAREL i współpracownicy odkryli, że komórki tego nowotworu posiadają translokację pomiędzy chromosomami 11 i 22 — $t(11;22)(q24;q12)$. Już wkrótce okazało się, że ponad 90% tych nowotworów wykazuje obecność tej translokacji i w ten sposób analiza cytogenetyczna stała się ważnym czynnikiem diagnostycznym tego nowotworu. Fakt ten ma również implikacje dotyczące pochodzenia tkankowego tego nowotworu. Otóż przez wiele lat sądzono, że nowotwór ten wywodzi się z tkanki mezenchymalnej i dlatego nazywano ten guz mięsakiem. Tymczasem identyczną translokację pomiędzy chromosomami 11 i 22 wykryto także w guzach nowotworowych o jednoznacznym pochodzeniu z komórek zarodkowego grzebienia nerwowego. Podobieństwo tej translokacji sugeruje zatem, że guz Ewing'a wywodzi się z tkanki neuroektodermalnej i nie jest mięsakiem — tak więc wyniki badań cytogenetycznych mogą niekiedy dostarczać informacji



Ryc. 6. Fotografia hodowli pierwotnej nadnerczaka. Widoczne są rosnące *in vitro* komórki pośród których dwie komórki, znajdują się w stadium metafazy (strzałki) — jest to właściwy moment do dodania do hodowli kolchicyny zatrzymującej podziały komórkowe w stadium metafazy.

o etiologii niektórych nowotworów. W roku 1993 wyizolowano i sklonowano gen obejmujący tę translokację i scharakteryzowano produkt białkowy tego genu (SANDBERG i BRIDGE 1994)). Osiągnięcie to zostało natychmiast wykorzystane w praktyce klinicznej. Podobnie jak w przypadku genu *bcr/abl* w hematologii onkologicznej można obecnie rozpoznawać guz Ewing'a technikami molekularnymi badając bezpośrednio gen translokacyjny w izolowanym DNA komórek nowotworowych techniką PCR lub, bez hodowli komórkowej, identyfikować obecność tego genu w jądrach interfazalnych komórek tego nowotworu z użyciem opisanej uprzednio techniki hybrydyzacji *in situ* (FISH) (GIOVANNINI i współaut. 1992). Obie techniki są szybkie i cechują się wysokim stopniem swoistości, ale niestety i wysokimi kosztami.

ZNACZENIE ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH W PROGNOZOWANIU KLINICZNYM

Na obecnym etapie rozwoju cytogenetyki litych guzów człowieka stosunkowo niewiele można powiedzieć o roli tych badań w prognozowaniu klinicznym. Najlepiej udokumentowaną zależność pomiędzy obrazem cytogenetycznym guza a przebiegiem klinicznym choroby znajdujemy w przypadku zwojaka zarodkowego (neuroblastoma) — guza nowotworowego występującego w wieku dziecięcym. Okazuje się, że o pacjentach w wieku poniżej pierwszego roku życia, w guzach których występuje hiperdiploidalna lub okołotriploidalna liczba chromosomów z brakiem lub niewielką liczbą aberracji strukturalnych, można rokować dobrze. Natomiast pacjenci powyżej 5 roku życia z zaawansowanymi

guzami o okołodiploidalnej lub okołotetraploidalnej liczbie chromosomów z równoczesną delecją ramion krótkich chromosomu 1 nie rokują wyzdrowienia (SANDBERG i BRIDGE 1994). Dokonano szeregu obserwacji podobnych korelacji w innych guzach nowotworowych człowieka, a szczególnie w rakach pęcherza moczowego, stercza, jajników i okrężnicy oraz gwiaździaków mózgu. Jednak większość tych obserwacji jest jeszcze na wstępnym etapie i wymaga dalszych badań na większej liczbie pacjentów (LIMON i MITELMAN 1994, LIMON 1994b).

Na obecnym stopniu rozwoju naszej wiedzy można wymienić następujące praktyczne i poznawcze znaczenia badań cytogenetycznych w patologii i klinice litych guzów nowotworowych człowieka.

Po pierwsze, już sam fakt wykrycia w jakichkolwiek komórkach powtarzalnych licznych aberracji chromosomowych wskazuje na nowotworowy charakter badanych komórek.

Po drugie, wykrycie swoistej aberracji chromosomowej w komórkach nowotworowych umożliwia, w niektórych przypadkach, przeprowadzenie diagnostyki różnicowej tych guzów. Uściślenie tej diagnozy z kolei decyduje niekiedy o wyborze sposobu leczenia pacjenta z danym guzem nowotworowym. Należy jednak zaznaczyć, że zbyt mała liczba danych powoduje, że analiza aberracji chromosomowych w guzach litych nie jest niezależnym czynnikiem diagnostycznym, tak jak ma to miejsce w nowotworach układu krwiotwórczego.

Po trzecie, niektóre obserwacje cytogenetyczne komórek litych guzów mają zastosowanie w prognozowaniu klinicznym. Uzyskane do tej pory dane upoważniają do przypuszczenia, że zgromadzenie większej liczby danych pozwoli, w najbliższej przyszłości, na ściśle określenie zależności pomiędzy rodzajami i złożonością aberracji chromosomowych występujących w komórkach guza nowotworowego a przebiegiem klinicznym choroby.

Po czwarte, obserwowane częste utraty materiału genetycznego w litych guzach, szczególnie pochodzenia nabłonkowego, pod postacią delecji fragmentu lub braku całego chromosomu doprowadziły do odkrycia tak zwanych genów supresorowych pełniących istotną rolę w regulacji funkcji onkogenów. A zatem wyniki połączonych badań cytogenetycznych i molekularnych dostarczają wiele istotnych informacji o mechanizmie powstawania i progresji nowotworów.

Do przedstawionych w tabelach 1 i 3 wykazów chorób nowotworowych człowieka, w komórkach których znaleziono swoiste aberracje chromosomowe, stale przybywają nowe i należy oczekiwać, że do końca XX wieku większość swoistych aberracji chromosomowych oraz powstające w ich wyniku specyficzne białka w nowotworach człowieka zostaną zdefiniowane. Dynamiczny postęp metodyczny badań cytogenetycznych oraz molekularnych sprawia, że cytogenetyk oraz biolog molekularny stają się pomocnikami patologa w diagnostyce chorób nowotworowych. Już obecnie wyniki badań genetycznych znalazły zastosowanie w klinicznej diagnozie, w prognozowaniu i monitorowaniu leczenia niektórych chorób nowotworowych człowieka. Najistotniejszym wydaje się jednak postęp badań genetycznych nad mechanizmem procesu powstawania nowotworów, albowiem poznawanie tego złożonego procesu działa stymulująco na poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych i stwarza nadzieję na swoiste leczenie jednej z najczęstszych poważnych chorób trapiących współczesnego człowieka — choroby nowotworowej.

SŁOWNIK TERMINÓW GENETYCZNYCH

Aberracje chromosomowe liczbowe (genomowe):

Diploidia — prawidłowa liczba chromosomów w komórce (u człowieka $46 = 2n$).

Aneuploidia — zwiększenie lub zmniejszenie się liczby chromosomów w komórce o liczbę 22 lub mniejszą, to znaczy $46 + 22$. Zwiększenie się liczby chromosomów nazywamy hiperdiploidią, a zmniejszenie hipodiploidią. Zwiększenie liczby chromosomów o jeden nazywamy trisomią i na przykład dla chromosomu 7 zapisujemy +7, a utratę jednego chromosomu nazywamy monosomią i zapisujemy -7.

Poliploidia — zwiększenie liczby chromosomów w komórkach, na przykład u człowieka o liczbę $23 = n$. Komórka triploidalna posiada $46 + 23 = 69$ chromosomów, tetraploidalna 92 itd.

Aberracje chromosomowe strukturalne:

Delecja — utrata fragmentu dystalnego chromosomu (jedno pęknięcie) lub śródchromatydowego (dwa pęknięcia). Jeżeli dystalne delecje dotyczą na przykład prążka 12 ramion krótkich chromosomu 7 to zapisujemy: $\text{del}(7)(p12)$, a prążka 21 ramion długich tego chromosomu: $\text{del}(7)(q21)$.

Translokacja — przemieszczanie się fragmentów ramion chromosomów pomiędzy nimi. Może być wymiana wzajemna lub niewzajemna. Dotyczyć może więcej niż dwóch chromosomów. Jeżeli doszło do wzajemnej translokacji pomiędzy chromosomami 9 i 22 z miejscami pęknięć $9q34$ i $22q11$, to zapisujemy: $t(9;22)(q34;q11)$.

Duplikacja — podwojenie się fragmentów chromosomów. Stosujemy zapis: $\text{dup}(2)(p23-p14)$.

Inwersja — na skutek dwóch pęknięć w obrębie chromatyd jednego chromosomu dochodzi do odwrócenia się tego odcinka o 180° i następnie do ponownego połączenia się obu końców. Inwersja może być pericentryczna obejmująca centromer, lub paracentryczna zachodząca w obrębie jednego z ramion chromosomu. Najprostszy zapis inwersji: $\text{inv}(2)(p21q31)$.

Izochromosomy — chromosomy zbudowane wyłącznie z ramion długich lub krótkich chromosomu. Jeżeli izochromosom jest zbudowany z ramion długich chromosomu 7 to zapis wygląda następująco: $i(7)(q10)$.

Centromer — przewężenie pierwotne chromosomu, miejsce połączenia obu chromatyd. W zależności od jego umiejscowienia wyróżniamy chromosomy: metacentryczne (u człowieka nr 1, 3, 16, 19, 20), akrocentryczne (odp. 13, 14, 15, 21, 22 i Y), submetacentryczne (wszystkie pozostałe chromosomy). Patrz rycina. 1.

Chromosomy „double minutes” (DMS): malutkie chromosomy pojawiające się w metafazach w liczbie od kilku do kilkuset. Występują głównie w komórkach nowotworowych niektórych guzów — uważa się, że są cytologicznym efektem amplifikacji (powielenia się wielu kopii) genów.

HSR — Homogenously Staining Regions: jednolicie wybarwiające się regiony ramion chromosomów komórek nowotworowych. Uważa się, że podobnie jak DMS są efektem cytologicznym amplifikacji genów.

Kariotyp — reprezentatywny zestaw chromosomów danego osobnika (lub guza nowotworowego) ułożony według obowiązujących zasad). Kariogram: zestaw chromosomów jednej komórki — nie zawsze stanowi kariotyp danej osoby, gdyż czasami organizm jest tworzony przez komórki o różnych kariogramach (tak zwane organizmy mozaikowe).

Klonowanie — wyizolowanie określonego fragmentu DNA (na przykład znanego genu) i jego namnożenie w koloniach bakteryjnych.

Geny supresorowe (antyonkogeny) — geny działające supresyjnie na aktywność onkogenów. Dziedziczą się autosomalnie recesywnie. Do tej pory zlokalizowano w chromosomach człowieka około 10 takich genów, między innymi gen *p53* w chromosomie 17p13. Uważa się, że utrata tych genów prowadzi do wzrostu ekspresji protoonkogenów.

Hybrydyzacja — łączenie się dwóch pojedynczych i komplementarnych nici DNA w cząsteczkę dwuniciową.

Protoonkogeny — zlokalizowane w jądrze komórkowym geny homologiczne do retrowirusowych onkogenów. Scharakteryzowano ponad 20 takich genów, które między innymi kontrolują różnicowanie się i proliferację komórek. W przypadku mutacji tych genów może dochodzić do powstawania nieprawidłowych produktów białkowych uczestniczących w procesie transformacji nowotworowej.

PCR — technika molekularna polegająca na wielokrotnym powtórzeniu reakcji replikacji określonego fragmentu DNA w wyniku czego otrzymuje się setki lub tysiące kopii takiego samego odcinka DNA (może to być określony gen).

Sonda — sklonowany fragment DNA lub RNA, oznakowany radioaktywnie (lub innym znacznikiem na przykład fluorochromem) służący do wykrycia sekwencji komplementarnych nukleotydów poprzez hybrydyzację, na przykład, z chromosomami lub jądrami interfazowymi komórek.

WHY SHOULD CHROMOSOME ABERRATIONS IN HUMAN NEOPLASTIC CELLS BE ANALYZED BY CYTOGENETISTS?

Cancer and leukemia are genetic diseases not at the organism level, although occasionally this is the case, but at the level of individual cells. The main difference between a neoplastic cell and a normal one is that the former has undergone DNA change(s) — mutation(s) that enable it to escape the organism's normal proliferation control mechanisms. On the cytological level, during mitosis the genome (DNA) of the cell takes the form of chromosomes. Many hematologic malignancies and solid tumors in man are characterized by acquired genetic rearrangements that can be detected by cytogenetic methods as clonal chromosomal abnormalities mostly as deletions or translocations, or by molecular studies as a gene mutations. A combination of cytogenetic and molecular genetic techniques has been used to provide considerable information on the development of leukemias and solid tumors. Chromosome aberrations may be primary, i.e. occurring at the beginning of a tumor's life and presumably playing an important role in the pathogenesis of neoplastic cells, or secondary, i.e. occurring during later tumor evolution-progression. In general, chromosome studies of human cancer and leukemias have provided important clues to the location of relevant genes and their products (tumor-specific proteins) and to the mechanisms by which their growth regulatory functions have been altered. The specific chromosome aberrations in a particular tumor type or leukemia also serve as disease markers that help in reaching a more precise diagnosis, including a better assessment of the prognosis in individual cases. Thus, the distinct chromosomal aberrations and molecular genetic findings have already found clinical application in differential diagnosis, prognosis, and monitoring of the treated patients, and will be helpful in designing a therapy based on molecular understanding and methodology.

LITERATURA

- BEIL B., LIMON J., 1973. *Teoretyczne aspekty współczesnych metod cytogenetycznych*. Przegl Zool. XVII: 411-420.
- BOCIAN E., 1993. *Zastosowanie nowoczesnych technik analizy chromosomowej w diagnostyce klinicznej chorób genetycznych — hybrydyzacja „in situ”*. Klinika 2, 42-46.
- CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., 1970. *Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes*. Exp Cell Res, 60, 315-319.
- GIOVANNINI M., SELLERI L., BIEGEL J. A., SCOTLANDI K., EMANUEL B. S., EVANS G., 1992. *Interphase cytogenetics for the detection of the t(11;22)(q24;q12) in small round cell tumors*. J Clin Invest 90, 1911-1918.
- GRAY J. W., PINKEL D., 1992. *Molecular cytogenetics in human cancer diagnosis*. Cancer 69, 1536-1542.
- GRONWALD J., LUBIŃSKI J., ZAJĄCZEK St., 1994. *Cytogenetyka interfazalna w diagnostyce aberracji chromosomowych w nowotworach*. Nowotwory. Supl. 1, 44, 34-39.
- HAUS O., 1992. *Aberracje chromosomów w przewlekłej białaczce szpikowej*. Acta Haematol Pol., 23, supl. 1, 5-11.
- HEIM S., MITELMAN F., 1987. *Cancer Cytogenetics*. Alan R.Liss, New York;
- ISCN, 1985. *An International System for Human Cytogenetics Nomenclature*. Birth Defects: Original Article Series, 21, National Foundation — March of Dimes, New York.
- KOWALCZYK J. R., 1994. *Cytogenetyka ostrych białaczek*. Nowotwory. Supl. 1, 44, 5-10.
- LIMON J., 1994a. *Rak sutka u kobiet — postępy metodyczne w badaniach cytogenetycznych*. Nowotwory. Supl. 1, 44, 27-33.
- LIMON J., 1994b. *Cytogenetics of astrocytoma*. Folia Neuropathol. 32, 205-207.
- LIMON J., MITELMAN F., 1994. *Znaczenie aberracji chromosomowych w litych guzach nowotworowych człowieka*. Pat Pol, 45, 1-15.
- NOWAK J., JANUSZKIEWICZ D., 1994. *Monitorowanie chemioterapii białaczki limfoblastycznej metodą PCR*. Nowotwory. Supl. 1, 44, 90-101.
- NOWELL P. C., HUNDERFORD D. A., 1960. *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia*. Science 132, 1487.
- NOWELL P. C., 1994. *Cytogenetic approaches to human cancer genes*. FASEB J 8, 408-413.
- RABBITT T. H., 1994. *Chromosomal translocations in human cancer*. Nature 372, 143-149.
- ROWLEY J. D., 1973. *A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining*. Nature 54, 39-45.
- SANDBERG A. A., 1990. *Chromosomes in Human Cancer and Leukemia*. Elsevier. New York.
- SANDBERG A. A., BRIDGE J., 1994. *The Cytogenetics of Bone and Soft Tissue Tumors*. Medical Intelligence Unit. Wyd. R.G.Landes Company, Austin.
- SKOTNICKI A. A., 1993. *Białaczki. Diagnostyka i chemioterapia ostrych białaczek i zespołów mielo-dysplastycznych*. Kraków. Wyd. Upjohn Poland.
- TURC-CAREL C., PHILIP I., BERGER M. P., PHILIP T., LENOIR G. M., 1984. *Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12)*. Cancer Genet Cytogenet., 12, 1-19.
- ZAWADA M., LATOS-BIELEŃSKA A., 1993. *Hybrydyzacja in situ (ISH) w cytogenetyce*. Post Biol Kom, 20, 363-371.