

Magdalena Koczkowska

**Analiza porównawcza profili genomowych podtypów
histologicznych tłuszczakomięsaków człowieka
z zastosowaniem techniki mikromacierzy-CGH**

(rozprawa doktorska)

Praca wykonana

w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik i promotor: Prof. dr hab. n. med. Janusz Limon

Gdańsk 2014

Praca wykonana ze środków finansowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na działalność statutową Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (02-0002/07) oraz na badania dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich (01-0005/08).

Praca powstała dzięki grantowi naukowemu Naukowej Fundacji Polpharmy.

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
1.1. Wielkości fizyczne i przedrostki	6
1.2. Substancje chemiczne i roztwory	6
1.3. Terminy cytogenetyczne	7
1.4. Geny i białka	7
1.5. Skróty histopatologiczne	9
1.6. Pozostałe skróty	9
2. STRESZCZENIE	11
2.1. Abstract	13
3. WSTĘP	15
3.1. Podłoże molekularne choroby nowotworowej	15
3.1.1. Geny zaangażowane w proces transformacji nowotworowej	16
3.1.1.1. Protoonkogeny i onkogeny	16
3.1.1.2. Geny supresorowe	18
3.1.1.3. Geny ochraniające integralność genomu	19
3.1.2. Teorie kancerogenezy	19
3.2. Tłuszczakomięsak	20
3.2.1. Klasyfikacja i epidemiologia	21
3.2.2. Obraz kliniczny, złośliwość i rokowanie	23
3.2.3. Morfologia	24
3.2.3.1. WDLPS	24
3.2.3.2. DDLPS	25
3.2.3.3. MLPS	25
3.2.3.4. PLPS	26
3.2.4. Leczenie	28
3.3. Metody badań cytogenetycznych	29

3.4. Znaczenie wyników badań cytogenetycznych w nowotworach	32
3.5. Badania cytogenetyczne i molekularne w tłuszczakomięsakach	34
3.5.1. WDLPS i DDLPS	34
3.5.2. MLPS	37
3.5.3. PLPS	39
3.6. Podsumowanie	40
4. CELE PRACY	42
5. MATERIAŁ I METODY	43
5.1. Materiał	43
5.1.1. Charakterystyka kliniczna pacjentów	43
5.2. Metody	46
5.2.1. Aparatura	46
5.2.2. Odczynniki	47
5.2.3. Roztwory	48
5.2.4. Izolacja DNA	48
5.2.4.1. Izolacja DNA z mrożonej tkanki nowotworowej	48
5.2.4.2. Izolacja DNA z limfocytów krwi obwodowej	49
5.2.5. Ocena ilościowa oraz jakościowa DNA	50
5.2.6. Mikromacierze-CGH	50
5.2.7. „Stripowanie” szkiełek mikromacierzowych	56
5.2.8. Analiza statystyczna	58
6. WYNIKI	59
6.1. Analiza profilu genomowego tłuszczakomięsaków	59
6.1.1. Analiza profilu genomowego guzów WDLPS i DDLPS	61
6.1.1.1. Guzy WDLPS	61
6.1.1.2. Guzy DDLPS	66
6.1.1.3. Aberracje chromosomu 12 w guzach WDLPS i DDLPS	71

6.1.2. Analiza profilu genomowego guzów MLPS	74
6.2. Ewolucja zmian cytogenetycznych w guzach pierwotnych, wznowach i przerzutach tłuszczakomięsaków, pochodzących od jednego pacjenta w trakcie trwania choroby	79
6.2.1. Guzy WDLPS	79
6.2.2. Guzy DDLPS	81
6.2.3. Guzy MLPS	87
6.3. Porównanie profili genomowych w trzech podtypach histologicznych tłuszczakomięsaków	88
7. DYSKUSJA	90
8. WNIOSKI	111
9. PIŚMIENNICTWO	112
10. ZAŁĄCZNIKI	129
10.1. Dane kliniczne pacjentów i histopatologiczne tłuszczakomięsaków ...	129
10.2. Wyniki badań cytogenetyki klasycznej oraz mikromacierzy-CGH	131
10.3. Spis rycin	145
10.4. Spis tabel	148

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1.1. Wielkości fizyczne i przedrostki

g	gram
l	litr, dm ³
m	mol
M	stężenie molowe, mol/dm ³
min.	minuta
sek.	sekunda
godz.	godzina
T	tera, 10 ¹²
G	giga, 10 ⁹
M	mega, 10 ⁶
k	kilo, 10 ³
d	decy, 10 ⁻¹
c	centy, 10 ⁻²
m	mili, 10 ⁻³
μ	mikro, 10 ⁻⁶
n	nano, 10 ⁻⁹
p	piko, 10 ⁻¹²

1.2. Substancje chemiczne i roztwory

Cy3	<i>Cyanine 3</i> - barwnik fluorescencyjny
Cy5	<i>Cyanine 5</i> - barwnik fluorescencyjny
ddH₂O	woda podwójnie destylowana
dNTPs	dezoksyrybonukleotydy
DTT	ditiotreitol
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowy

NaCl	chlorek sodu
NaOH	wodorotlenek sodu
SDS	dodecylosiarczan sodu
TRIS	2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol

1.3. Terminy cytogenetyczne

2n	diploidalna liczba chromosomów
3n	triploidalna liczba chromosomów
add	chromosom o nieustalonym pochodzeniu
del	delecja
der	chromosom pochodny
dic	chromosom dicentryczny
dmin	acentryczne małe chromosomy (<i>double minute chromosomes</i>)
i	izochromosom
inv	inwersja
mar	chromosom markerowy
p	ramiona krótkie chromosomu
q	ramiona długie chromosomu
r	chromosom pierścieniowy
t	translokacja
TA	fuzja telomeryczna (<i>telomer association</i>)

1.4. Geny i białka

ABL	<i>c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ASK1	<i>MAP3K5, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>

BRCA1	<i>breast cancer susceptibility gene 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer susceptibility gene 2</i>
CDK4	<i>cyclin-dependant kinase 4</i>
CPM	<i>carboxypeptidase precursor M</i>
DDIT3	<i>CHOP; DNA-damage-inducible transcript 3</i>
DNM3	<i>dynamamin 3 isoform</i>
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i>
EWSR1	<i>Ewing sarcoma breakpoint 1</i>
FLI1	<i>friend leukemia virus integration 1</i>
FRS2	<i>fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
FUS	<i>fusion, involved in t(12;16) in malignant liposarcoma</i>
GLI1	<i>glioma-associated oncogene homolog 1</i>
HER2	<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
HMGA2	<i>high mobility group AT-hook 2</i>
HOXC13	<i>homeobox C13</i>
JUN	<i>jun proto-oncogene</i>
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral</i>
MDM2	<i>MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i>
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MYCN	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma</i>
OS9	<i>osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum lectin</i>
RB1	<i>retinoblastoma 1</i>
SSX1-4	<i>synovial sarcoma, X breakpoint 1-4</i>
SYT	<i>SS18; synovial sarcoma translocation, chromosome 18</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>

1.5. Skróty histopatologiczne

ALT	atypowy guz tłuszczowy (<i>atypical lipomatous tumor</i>)
DDLPS	tłuszczakomięsak odróżnicowany (<i>dedifferentiated liposarcoma</i>)
GIST	nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego (<i>gastrointestinal stromal tumours</i>)
HNPCC	zespół niepolipowatości jelita grubego (<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>)
LPS	tłuszczakomięsak (<i>liposarcoma</i>)
MFH	mięsak włóknistohistiocytny (<i>fibrous histiocytoma</i>)
MLPS	tłuszczakomięsak śluzowaty/okrągłokomórkowy (<i>myxoid/round cell liposarcoma</i>)
PLPS	tłuszczakomięsak wielopostaciowy (<i>pleomorphic liposarcoma</i>)
SCL	tłuszczak z komórek wrzecionowatych (<i>spindle cell lipoma</i>)
SS	mięsak maziówkowy (<i>synovial sarcoma</i>)
STS	mięsak tkanek miękkich (<i>soft tissue sarcoma</i>)
WDLPS	tłuszczakomięsak dobrze zróżnicowany (<i>well-differentiated liposarcoma</i>)
UHGPS	niezróżnicowany mięsak pleomorficzny o wysokim stopniu złośliwości (<i>undifferentiated high-grade pleomorphic sarcoma</i>)

1.6. Pozostałe skróty

aCGH	porównawcza hybrydyzacja genomowa oparta na mikromacierzach (<i>array comparative genomic hybridization</i>)
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CGH	porównawcza hybrydyzacja genomowa (<i>comparative genomic hybridization</i>)
CNV	polimorfizm liczby kopii (<i>copy number variation</i>)

CSC	nowotworowa komórka macierzysta (<i>cancer stem cell</i>)
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
FFCC	<i>French Federation of Cancer Centers</i>
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (<i>fluorescence in situ hybridization</i>)
GTG	prążki uzyskane przy użyciu barwienia Giemsy
GTP	guanozynotrójfosforan (<i>guanosine triphosphate</i>)
ISCA	<i>International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium</i>
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
M	guz przerzutowy (<i>metastasis</i>)
M-FISH	wielobarwny FISH (<i>multicolour FISH</i>)
NK	komórki NK (<i>natural killer</i>)
nt	nukleotyd
P	guz pierwotny (<i>primary tumor</i>)
Ph'	chromosom Philadelphia
pz	par zasad
R	wznowa (<i>local recurrence</i>)
RT	temperatura pokojowa
r.ż.	rok życia
SKY FISH	analiza widmowa kariotypu (<i>spectral karyotyping</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (<i>World Health Organisation</i>)
UICC	<i>International Union against Cancer</i>
UPD	disomia jednorodzielska (<i>uniparental disomy</i>)

2. STRESZCZENIE

Tłuszczakomięśaki (LPS; *liposarcomas*) należą do grupy mięsaków tkanek miękkich, których częstość szacuje się poniżej 1% wszystkich nowotworów złośliwych u osób dorosłych. Wyróżnia się cztery podtypy histologiczne tłuszczakomięsaków: dobrze zróżnicowany (WDLPS; *well-differentiated liposarcoma*), odróżnicowany (DDLPS; *dedifferentiated liposarcoma*), śluzowaty/okrągłokomórkowy (MLPS; *myxoid/round cell liposarcoma*) oraz pleomorficzny (PLPS; *pleomorphic liposarcoma*). Guzy WDLPS i DDLPS cechują się występowaniem chromosomów pierścieniowych i markerowych, które powstają z amplifikowanego fragmentu chromosomu 12q13q15, z kolei w guzach MLPS obserwuje się obecność translokacji swoistej t(12;16).

Celem pracy była analiza porównawcza profili genomowych podtypów histologicznych tłuszczakomięsaków (WDLPS, DDLPS i MLPS) z zastosowaniem techniki mikromacierzy-CGH o wysokiej rozdzielczości. Ponadto podjęto próbę prześledzenia ewolucji zmian chromosomowych w guzach pierwotnych, wznowach oraz odległych przerzutach, pochodzących od jednego pacjenta na przestrzeni kilku lat trwania choroby.

Materiał badawczy stanowił DNA, wyizolowany z 70 mrożonych fragmentów tkanek z guzów tłuszczakomięśaka, pochodzących od 53 pacjentów (WDLPS n=24 od 19 pacjentów, DDLPS n=24 od 16 pacjentów oraz MLPS n=22 od 18 pacjentów). Analiza cytogenetyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem metody mikromacierzy-CGH o rozdzielczości 10 kbp (*NimbleGen array 2.1M*, Roche). Szkiełka mikromacierzowe skanowano w skanerze MS200 (Roche), a następnie analizowano z użyciem programów *DEVA* (Roche) oraz *Nexus Copy Number 7.5* (BioDiscovery).

Nie zrównoważone aberracje chromosomowe zidentyfikowano w 93% guzów tłuszczakomięsaków (n=65/70). Najbardziej złożony profil genomowy zaobserwowano w guzach DDLPS (p=0,016). Wspólną zmianę cytogenetyczną dla guzów WDLPS i DDLPS stanowiły rearanżacje chromosomu 12 (92%, n=44/48). W minimalnym wspólnym regionie (12q14.1q21.1) potwierdzono występowanie amplifikacji genów: *CDK4*, *HMGA2* i *MDM2*. Kolejnymi częstymi

niezrównoważonymi aberracjami w WDLPS były: częściowa trisomia ramion krótkich chromosomu 5 (42%) oraz 19 (25%). Duplikacja chromosomu 5 występowała częściej we wznowach niż w guzach pierwotnych ($p=0,002$ OR=30,3 95% CI [2,64-348,93]). Natomiast w przypadku trisomii fragmentu ramion krótkich chromosomu 19 stwierdzono istnienie zależności pomiędzy obecnością tej zmiany a lokalizacją guza ($p=0,008$). Aberracja ta nie była wykrywana w guzach, zlokalizowanych w tkankach głębokich kończyn. W przeciwieństwie do WDLPS, w guzachDDLPS zidentyfikowano m.in. utratę fragmentów chromosomów 13 i 15. Delecję ramion długich chromosomu 15 wykryto wyłącznie we wznowach, z kolei zmiany w chromosomie 13 były charakterystyczne dla guzów, zlokalizowanych w jamie brzusznej (odpowiednio $p=0,011$ oraz $p=0,016$). Do innych aberracji chromosomowych, które wykrywano częściej w guzachDDLPS niż w WDLPS zaliczono częściową delecję chromosomów 6 i 11, a także amplifikację fragmentu chromosomu 14 oraz rearanżacje chromosomu 8. Natomiast najczęstszymi niezrównoważonymi zmianami genomowymi, zidentyfikowanymi w guzachMLPS były: utrata fragmentu chromosomu 6 (32%, $n=7/22$) oraz częściowa trisomia chromosomu 1 (27%, $n=6/22$). Minimalne wspólne regiony obu zmian to 6q14.1q22.31 oraz 1q25.1q32.2. Delecja chromosomu 6q występowała zdecydowanie częściej w guzach przerzutowych niż w guzach pierwotnych i wznowach ($p=0,021$ OR=18,67 95% CI [1,5-232,3]). Ponadto na podstawie analizy ewolucji zmian cytogenetycznych w materiale, pochodzącym od tych samych pacjentów wykazano, iż wznowy oraz guzy przerzutowe tłuszczakomięsaków WDLPS i MLPS, pojawiające się w trakcie trwania choroby nowotworowej, cechuje większa stabilność chromosomowa w porównaniu do guzówDDLPS.

Zastosowanie metody mikromacierzy-CGH o wysokiej rozdzielczości w badaniach profili genomowych tłuszczakomięsaków pozwoliło na dokładną identyfikację różnic w niezrównoważeniach genomu pomiędzy ich podtypami histologicznymi, co może ułatwić diagnostykę tych rzadko występujących guzów. Zaobserwowane różnice w profilach genomowych w różnych typach histologicznych tłuszczakomięsaków potwierdzają odmienną biologię tych nowotworów.

2.1. Abstract

Liposarcomas (LPS) are the most common soft tissue sarcomas accounting for less than 1% of all human cancer cases. Morphologically, WHO classifies liposarcomas into four main subtypes: well-differentiated (WDLPS), dedifferentiated (DDLPS), myxoid/round cell (MLPS) and pleomorphic liposarcomas (PLPS). Cytogenetic features characterising WDLPS and DDLPS are supernumerary ring giant chromosomes and *dmin* (*double-minute chromosomes*), while MLPS are distinguished by the presence of a specific translocation t(12;16).

The objective of the study was to analyze genomic profiles of liposarcomas (WDLPS, DDLPS and MLPS) using microarray-CGH technique. Additionally, a comparison of chromosomal imbalances in subsequent samples of tumors resected from several individuals during disease progression have been evaluated.

The salting-out protocol was used to extract DNA from 70 frozen tissue samples of liposarcomas from 53 patients (WDLPS n=24 from 19 patients, DDLPS n=24 from 16 patients and MLPS n=22 from 18 patients). The analyses were carried out using microarray-CGH technique at unprecedented resolution of 10 kbp (*NimbleGen array 2.1M*, Roche). Arrays were scanned with MS200 Microarray Scanner (Roche) and analyzed using *DEVA* (Roche) and *Nexus Copy Number 7.5* software (BioDiscovery).

DNA copy number aberrations were found in 65/70 tumors (93%). The most complex genomic profiles were observed in DDLPS tumors ($p=0.016$). In WDLPS and DDLPS, the most frequently involved chromosome was 12q, gained in 44 of both liposarcomas subtypes (92%), with the minimal common region at 12q14.1q21.1. The three peaks of amplification in this region were localized in vicinity of *CDK4*, *HMGA2* and *MDM2 loci*. In WDLPS, the common aberrations were gains at chromosomes 5 (42%) and 19 (25%). Statistical analysis revealed that additional copies of chromosome 5 were more frequent in local recurrences than in primary tumors ($p=0.002$, OR=30.3, 95% CI [2.64-348.93]). Moreover, the presence of gains of chromosome 19 correlated with the location of the tumor ($p=0.008$). Contrary to WDLPS, in DDLPS losses at

chromosomes 13 and 15 were identified. The deletions of the long arms of chromosome 15 were found exclusively in the local recurrences, while aberrations of chromosome 13 were characteristic for tumors located in the abdomen ($p=0.011$ and $p=0.016$ respectively). The other unbalanced chromosomal aberrations, detected more frequently in DDLPS than in WDLPS, were losses at chromosome 6 and 11, amplifications of fragments of chromosome 14 and rearrangements at chromosome 8. In MLPS, the most frequently involved chromosomal regions were loss at chromosome 6 (32%) and gain at chromosome 1 (27%), with minimal overlapping regions at 6q14.1q22.31 and 1q25.1q32.2 respectively. Deletion of long arms of chromosome 6 was found more frequently in metastases than in primary tumors and local recurrences ($p=0.021$, OR=18.67, 95% CI [1.5-232.3]). Furthermore, based on the results of genomic imbalances in the subsequent samples resected from individual patients, it was established that during disease progression DDLPS tumors developed a much wider range of secondary chromosomal aberrations in comparison to WDLPS and MLPS.

The application of microarray-CGH technique at unprecedented resolution allowed to delineate the genomic profiles of the three subtypes of liposarcomas. The observed patterns of genomic aberrations reflect biological differences between these tumors and may be used in the diagnosis of liposarcomas.

3. WSTĘP

3.1. Podłoże molekularne choroby nowotworowej

Nowotwór jest chorobą komórki o podłożu genetycznym, spowodowaną nagromadzeniem się mutacji somatycznych, co skutkuje utratą kontroli nad procesami regulującymi wzrost, różnicowanie, proliferację i apoptozę. W konsekwencji dochodzi do szeregu zmian na poziomie genomowym, komórkowym, tkankowym i narządowym, co prowadzi do powstania pełnoobjawowego nowotworu złośliwego.

Rzeczony choroby nowotworowej, czyli kancerogeneza jest wieloletnim procesem, składającym się z trzech etapów: inicjacji, promocji i progresji. Proces powstawania nowotworu cechuje się długim okresem utajenia. Uważa się, iż średni czas od momentu zainicjowania transformacji nowotworowej do powstania guza o średnicy 1cm wynosi ok. 5 lat [Pasz-Walczak, 2007].

Inicjacja jest pierwszym etapem transformacji nowotworowej, czyli procesu przekształcenia komórki prawidłowej w komórkę nowotworową na skutek powstania mutacji. Zmiany w DNA mogą być spontaniczne lub wywołane przez działanie kancerogenów, do których zaliczamy czynniki fizyczne (promieniowanie jonizujące lub ultrafioletowe), chemiczne (m.in. nitrozaminy, związki interkalujące czy pierścieniowe węglowodory aromatyczne) i biologiczne (niektóre wirusy, bakterie i pasożyty). Ekspozycja na szkodliwe działanie kancerogenów może trwać całe życie i jest nazywana etapem preinicjacji [Siedlecki, 2011]. Drugim etapem transformacji nowotworowej jest promocja, gdzie dochodzi do nagromadzenia się dodatkowych mutacji, co w konsekwencji prowadzi do niestabilności genetycznej. Cechą tego etapu jest selekcja klonalna komórek nowotworowych. Etap promocji trwa zazwyczaj poniżej kilku lat i skutkuje powstaniem raka *in situ* [Biernat, 2007; Pasz-Walczak, 2007]. W ostatnim etapie rozwoju nowotworu (progresja) dochodzi do powstawania dalszych mutacji genowych i chromosomowych, a także do procesu neoangiogenezy, czyli unaczynienia guza. Zostają również wyodrębnione subklony komórek nowotworowych, które posiadają zdolność do swobodnej migracji i do przerzutowania do odległych narządów. Czas trwania

etapu progresji choroby nowotworowej jest zróżnicowany - od kilku miesięcy do kilku lat [Siedlecki, 2011].

3.1.1. Geny zaangażowane w proces transformacji nowotworowej

W proces transformacji nowotworowej zaangażowane są trzy grupy genów: onkogeny, geny supresorowe oraz geny ochraniające integralność genomu (stabilizujące). W większości przypadków mutacje, które powstają w powyższych genach są to zmiany somatyczne, aczkolwiek są również mutacje germinalne, które mogą predysponować do zwiększonego ryzyka zachorowania na określony rodzaj nowotworu.

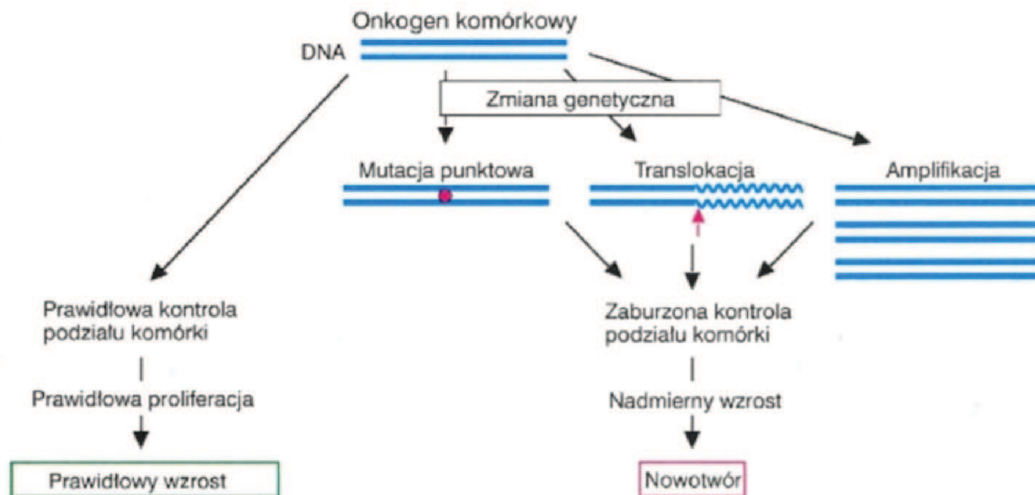
3.1.1.1. Protoonkogeny i onkogeny

W prawidłowej komórce produkty białkowe protoonkogenów pełnią ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego, w procesach wzrostu i różnicowania oraz w przekazywaniu sygnalizacji międzykomórkowej. Niektóre protoonkogeny wykazują homologię do onkogenów wirusowych. Dotychczas poznano ok. 500 protoonkogenów, które zostały zaklasyfikowane do trzech grup, w zależności od pełnionej funkcji jego produktu białkowego. Do pierwszej grupy zaliczamy geny, które produkują kinazy białkowe o aktywności tyrozynowej lub serynowo/treoninowej, czynniki wzrostu oraz odpowiadające im receptory, a także białka wiążące GTP i czynniki transkrypcyjne. Druga grupa składa się z protoonkogenów kodujących białka błony mitochondrialnej i jądrowej oraz białka błonowe zewnątrzkomórkowe i ich ligandy. Natomiast w trzeciej grupie dominują geny odpowiedzialne za powstawanie białek tworzących kanały jonowe [Siedlecki, 2011].

Proces przekształcenia protoonkogeny w onkogen jest wywołany przez pojedynczą mutację w genie. Mutacje te mają charakter dominujący, co oznacza, iż wystarczy jedna mutacja w jednym allelu genu przy drugim prawidłowym, aby ujawnić jego onkogenne działanie. Za aktywację

protoonkogenu w onkogen odpowiedzialne są najczęściej trzy mechanizmy: mutacja punktowa, translokacja chromosomowa oraz amplifikacja genu (ryc.1).

Rycina 1. Mechanizmy aktywacji onkogenów (schemat wg Passarge, 2004).



Przykładem protoonkogenu, który na skutek mutacji punktowej jest aktywowany do onkogenu jest gen *KIT*. Zmiany w sekwencji DNA w obrębie tego genu spotykane są m.in. w 80% guzów stromalnych przewodu pokarmowego (GIST). Gen *KIT* koduje receptor czynnika wzrostu komórek macierzystych. Na skutek mutacji dochodzi do nadmiernej ekspresji i do stałej, niezależnej od liganda autofosforylacji kinaz receptorowych *KIT*, która prowadzi do zmiany w konformacji receptora i w konsekwencji do aktywacji wielu wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału.

Translokacje chromosomowe są kolejnym mechanizmem, zaangażowanym w aktywację onkogenu. Przykładem może być $t(8;14)$ charakterystyczna dla 90% przypadków chłoniaka Burkitta. Na skutek translokacji dochodzi do aktywacji onkogenu *c-MYC* zlokalizowanego w prążku q24 chromosomu 8 poprzez przeniesienie go na chromosom 14q32 w pobliżu genu kodującego łańcuchy ciężkie immunoglobulin IgH.

Przykładem aktywacji onkogenu na drodze amplifikacji jest gen *HER2-NEU*. Badanie molekularne w kierunku amplifikacji tego genu wykonuje się rutynowo w guzach raka piersi techniką FISH (fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ*). Wynik badania ma istotną wartość prognostyczną, ponieważ status

receptora HER2 jest jednym z czynników decydujących o wyborze strategii terapeutycznej.

3.1.1.2. Geny supresorowe

W proces transformacji nowotworowej zaangażowane są również geny supresorowe, zwane także antyonkogenami, których zadaniem jest zapobieganie rozwojowi choroby nowotworowej. Obecnie znanych jest ok. 50 genów supresorowych, do których zaliczamy m.in. *RB1*, *APC*, *BRCA 1*, *BRCA 2* czy też *TP53*, którego mutacje spotyka się w komórkach ponad 50% wszystkich nowotworów.

W przeciwieństwie do protoonkogenów, geny supresorowe wykazują recesywny efekt działania, co oznacza, iż aby doszło do rozwoju nowotworu inaktywacji muszą ulec oba allele genu, co skutkuje całkowitą utratą funkcji genu. W 1971 roku Knudson zaproponował model tłumaczący mechanizm powstawania dziedzicznego i sporadycznego nowotworu na przykładzie siatkówczaka („teoria dwóch uderzeń”). Zakłada on, iż w przypadku guzów sporadycznych jedna kopia genu zostaje uszkodzona na skutek somatycznej mutacji punktowej, natomiast druga kopia może zostać utracona na drodze dużych rearanżacji, które prowadzą do delecji fragmentu chromosomu z *locus* genu supresorowego. Natomiast, gdy pierwsza mutacja („pierwsze uderzenie”) jest odziedziczoną zmianą germinalną, wówczas wystarczy już tylko jedna dodatkowa zmiana somatyczna, aby doszło do rozwoju nowotworu. Dlatego też siatkówczak rodzinny, podobnie jak i inne nowotwory dziedziczne jest rozpoznawany dużo wcześniej niż sporadyczna postać, ponieważ u osoby, która nie posiada mutacji dziedzicznej wymagane są dwie niezależne somatyczne mutacje genu, co wymaga dłuższego okresu czasu [Knudson, 1971].

3.1.1.3. Geny ochraniające integralność genomu

Do grupy genów ochraniających integralność genomu, zwanych również genami mutatorowymi lub stabilizującymi zalicza się ok. 130 genów. Geny te są zaangażowane w procesy naprawy uszkodzeń DNA, powstałych w czasie trwania replikacji lub na drodze działania czynników mutagennych. Mutacje w tej grupie genów będą skutkowały nieprawidłowo działającym systemem naprawy DNA, co w konsekwencji może doprowadzić do pojawienia się kolejnych mutacji, również w onkogenach i genach supresorowych, co sprzyja transformacji nowotworowej.

Mutacje germinalne w obrębie powyższych genów leżą u podłoża różnych zespołów genetycznych np. zespół niepolipowatości jelita grubego - HNPCC lub dziedziczonych się autosomalnie recesywnie chorób jednogennych: zespół Blooma, *Xeroderma pigmentosum*, anemia Fanconiego, które predysponują do zwiększonego ryzyka zachorowania na określone nowotwory [Siedlecki, 2011].

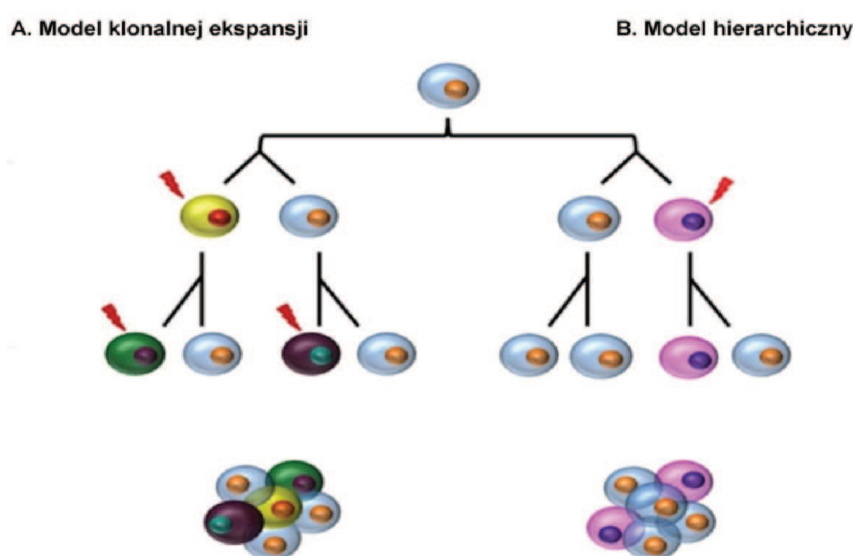
3.1.2. Teorie kancerogenezy

Wyróżnia się dwa modele opisujące przebieg procesu kancerogenezy: model ekspansji klonalnej (teoria stochastyczna) oraz model hierarchiczny (ryc. 2).

Model ekspansji klonalnej został zaproponowany przez Petera Nowella w 1976 roku. Teoria ta zakłada, że wszystkie komórki są równocenne i mają identyczny potencjał nowotworowy, czyli są zdolne do indukowania procesu kancerogenezy. W komórkach nowotworowych dochodzi do akumulacji wielu różnych zmian w materiale genetycznym, co w konsekwencji prowadzi do powstania odmiennych subpopulacji. Każda z tych subpopulacji posiada cechy charakterystyczne dla komórek nowotworowych, m.in. zdolność do podziałów i może aktywować progresję nowotworu [Nowell, 1976]. Selekcja klonalna skutkuje dużą heterogennością guza i u jednego pacjenta można wyróżnić komórki nowotworowe o znacznych różnicach w morfologii oraz w pełnionych funkcjach [Shackleton i wsp., 2009].

Natomiast model hierarchiczny opiera się na teorii, iż nowotwór wywodzi się z jednej konkretnej komórki tzw. komórki progenitorowej, która posiada zdolność do samoodnowy i proliferacji [Garcia i wsp., 2012]. Według powyższej teorii nie wszystkie komórki nowotworowe posiadają zdolność indukowania rozwoju i progresji nowotworu. Model zakłada istnienie nowotworowych komórek macierzystych (CSCs, *cancer stem cells*), które cechują się zwiększoną zdolnością do kancerogenezy i są zaangażowane w proces progresji guza i jego przerzutowania [Szaryńska i Kmiec, 2011].

Rycina 2. Teorie procesu kancerogenezy: model ekspansji klonalnej oraz hierarchiczny (schemat wg Garcia i wsp., 2012).



3.2. Tłuszczakomięsak

Tłuszczakomięsak (LPS, *liposarcoma*) należy do grupy mięsaków tkanek miękkich (STS, *soft tissue sarcoma*). Częstość występowania mięsaków tkanek miękkich szacuje się na ok. 0,7% wszystkich nowotworów złośliwych u osób dorosłych, z czego 20-25% stanowią tłuszczakomięsaki [Miettinen, 2010A]. W Polsce z roku na rok liczba zachorowań na nowotwory tkanek miękkich rośnie. W roku 2005 odnotowano 772 nowe rozpoznania tej grupy nowotworów, natomiast w roku 2010 zdiagnozowano już 921 zachorowań [Wojciechowska i wsp., 2010]. Pomimo stałego wzrostu wskaźnika 5-letniego przeżycia

całkowitego chorych z rozpoznaniem mięsakiem tkanek miękkich zlokalizowanym w kończynie aż do 55-78%, rokowania pacjentów, u których stwierdzono występowanie przerzutów są nadal niepomyślne (czas przeżycia poniżej jednego roku).

Niektóre zespoły uwarunkowane genetycznie (zespół Li-Fraumeni, zespół Wernera, zespół Gardnera, nerwiakowłóknikowatość), stany przebiegające z immunosupresją oraz wybrane czynniki środowiskowe (napromieniowanie i nadmierna ekspozycja na herbicydy, pestycydy, polichlorek winylu i dioksyny) mogą predysponować do zwiększonego ryzyka zachorowania na mięsaki tkanek miękkich [Ruka i wsp., 2009; Miettinen, 2010A].

3.2.1. Klasyfikacja i epidemiologia

Zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organisation*) wyróżnia się cztery podtypy histologiczne tłuszczakomięsaków: dobrze zróżnicowany (WDLPS, *well-differentiated liposarcoma*), odróżnicowany (DDLPS, *dedifferentiated liposarcoma*), śluzowaty/okrągłokomórkowy (MLPS, *myxoid/round cell liposarcoma*) oraz wielopostaciowy (PLPS, *pleomorphic liposarcoma*).

Guzy WDLPS są najliczniejszą grupą tłuszczakomięsaków i stanowią od 40 do 45% wszystkich rozpoznań LPS. Drugim pod względem częstości występowania tłuszczakomięsakiem jest MLPS, który stanowi 10% wszystkich mięsaków tkanek miękkich. Najrzadziej spotykanym podtypem histologicznym jest PLPS, którego częstość szacuje się poniżej 5% wszystkich tłuszczakomięsaków [Sandberg, 2004; Conyers i wsp., 2011].

Wzrost zachorowań na MLPS przypada między 40 a 50 r. ż., aczkolwiek w pojedynczych przypadkach obserwuje się również występowanie guzów MLPS u osób starszych powyżej 80 r.ż. [Sheffield i Nielsen, 2013]. Pozostałe podtypy histologiczne tłuszczakomięsaków są zazwyczaj rozpoznawane u osób powyżej 5-6 dekady życia [Sandberg, 2004; Coindre i wsp., 2010]. Chorobę tę rzadko diagnozuje się u dzieci i osób młodych - szacuje się, że

Łuszczakomięsaki stanowią ok. 2% wszystkich mięsaków tkanek miękkich spotykanych u dzieci i młodzieży. Najczęściej rozpoznawanym podtypem histologicznym w tej grupie chorych jest łuszczakomięsak śluzowaty a szczyt zachorowalności przypada na dwudziesty r.ż. [Huh i wsp., 2011]. Częstość występowania łuszczakomięsaków jest porównywalna u obu płci [Sandberg, 2004].

W celu oceny stopnia zaawansowania klinicznego stosuje się klasyfikację mięsaków tkanek miękkich, w tym łuszczakomięsaków opartą na wytycznych *American Joint Committee on Cancer* oraz *International Union against Cancer* (AJCC-UICC) [Edge i wsp., 2010; Miettinen, 2010A]. W klasyfikacji oceniane są następujące parametry: stopień złośliwości histologicznej (zgodnie z systemem FFCC na podstawie rozpoznania histopatologicznego, indeksu mitotycznego oraz stopnia martwicy), wielkość guza pierwotnego oraz obecność lub brak przerzutów odległych i/lub do węzłów chłonnych. Klasyfikacja ta została zaprezentowana w tab. 1.

Tabela 1. Klasyfikacja łuszczakomięsaków na podstawie AJCC-UICC [Edge i wsp., 2010; Miettinen, 2010A].

Stopień zaawansowania klinicznego	Lokalizacja i wielkość guza (T)	Przerzuty do węzłów chłonnych (N)	Przerzuty do narządów odległych (M)	Stopień złośliwości histologicznej guza (G)
IA	T1a,b	N0	M0	G1, GX
IB	T2a,b	N0	M0	G1, GX
IIA	T1a,b	N0	M0	G2, G3
IIB	T2a,b	N0	M0	G2
III	T2a,b	N0	M0	G3
	każdy T	N1	M0	każdy G
IV	każdy T	każdy N	M1	każdy G

T1 - guz o wielkości ≤ 5 cm, **T2** - guz o wielkości > 5 cm, **a** - guz umiejscowiony powierzchownie, **b** - guz zlokalizowany w tkankach głębokich; **N0** - brak przerzutów do węzłów chłonnych, **N1** - obecne przerzuty do węzłów chłonnych; **M0** - brak przerzutów do narządów odległych, **M1** - obecne przerzuty do narządów odległych; **G1** - niski, **G2** - średni, **G3** - wysoki, **GX** - brak oceny stopnia złośliwości histologicznej

3.2.2. Obraz kliniczny, złośliwość i rokowanie

Tłuszczakomięsak dobrze zróżnicowany (WDLPS) jest klasyfikowany jako nowotwór o pośredniej złośliwości, nie dający przerzutów, z niską częstością nawrotów choroby (ok. 10%). Guzy te są zlokalizowane przede wszystkim w tkankach głębokich kończyn (zwłaszcza uda), ale także w przestrzeni zaotrzewnowej i śródpiersiu. Bardzo rzadko obserwuje się występowanie WDLPS w tkance podskórnej bądź w skórze, w jamie ustnej oraz w gruczołach ślinowych [Sandberg, 2004; Conyers i wsp., 2011]. Wskaźnik śmiertelności jest uzależniony od lokalizacji guza: od braku w przypadku guzów umiejscowionych w kończynach aż do 80% z WDLPS zlokalizowanym w przestrzeni zaotrzewnowej [Coindre i wsp., 2010]. Mediana czasu od rozpoznania do zgonu dla pacjentów z niekorzystną lokalizacją anatomiczną guza wynosi od 6 do 11 lat [Dei Tos i Pedetour, 2013].

Tłuszczakomięsak odróżnicowany (DDLPS) jest nowotworem złośliwym, o agresywnym przebiegu klinicznym (śmiertelność wynosi od 30 do 40%). Do najczęstszych lokalizacji guzów należy przestrzeń zaotrzewnowa (ponad 80% wszystkich przypadków), kończyny oraz powrózek nasienny. Rzadko obserwuje się umiejscowienie nowotworu na głowie czy szyi [Dei Tos i wsp., 2013]. Częstość wznów szacuje się na 40-60%, natomiast u ok. 15-20% przypadków występują przerzuty, najczęściej do płuc. Długoletnie obserwacje kliniczne (ponad 10-20 lat) wskazują, iż u prawie wszystkich pacjentów z lokalizacją guza DDLPS w przestrzeni zaotrzewnowej, ma miejsce nawrót choroby. Zarówno w przypadku WDLPS, jak i DDLPS lokalizacja guza w przestrzeni zaotrzewnowej jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [Coindre i wsp., 2010].

W przeciwieństwie do WDLPS i DDLPS, guzy pierwotne tłuszczakomięsaka śluzowatego/okrągłokomórkowego bardzo rzadko są umiejscowione w przestrzeni zaotrzewnowej. Najczęstszą lokalizacją MLPS jest tkanka głęboka kończyn (w ponad 2/3 przypadków nowotwór zlokalizowany jest w tkankach uda). Cechą charakterystyczną guzów MLPS jest zdolność przerzutowania do odległych tkanek miękkich (najczęściej do przestrzeni

zaotrzewnowej albo do przeciwnej pachwiny) lub kości (przede wszystkim do kręgosłupa) [Antonescu i Ladanyi, 2013].

Najrzadszy podtyp histologiczny tłuszczakomięsaka – wariant wielopostaciowy jest bardzo agresywnym mięsakiem o lokalizacji w kończynach górnych i dolnych, rzadziej w przestrzeni zaotrzewnowej, śródpiersiu, miednicy i oczodole. U około 30-40% pacjentów z PLPS obserwuje się występowanie przerzutów, najczęściej do płuc. Ponadto wysoka śmiertelność (40-50%) oraz krótki czas przeżycia od momentu rozpoznania choroby są charakterystyczne dla tego rodzaju nowotworu [Sandberg, 2004; Coindre i Pedeutour, 2013].

Obraz kliniczny tłuszczakomięsaków jest bardzo podobny, niezależnie od podtypu histologicznego. Pacjenci zazwyczaj nie odczuwają żadnych dolegliwości bólowych, a jedynym objawem jest powiększający się guz, którego obecność często jest diagnozowana podczas rutynowych badań kontrolnych [Ruka i wsp., 2009].

3.2.3. Morfologia

Klasyfikacja histologiczna nowotworów tkanek miękkich oparta jest na ich podobieństwie do określonej tkanki dojrzałej. Grupa nowotworów wywodzących się z tkanki tłuszczowej jest najliczniejsza i należą do niej nie tylko tłuszczakomięsaki, czyli nowotwory o złośliwości pośredniej i złośliwe, ale również łagodne tłuszczaki (*lipomas*) [Niezabitowski i wsp., 2009; Miettinen, 2010A].

3.2.3.1. WDLPS

Tłuszczakomięsak dobrze zróżnicowany (WDLPS) jest zamiennie nazywany atypowym guzem tłuszczowym (ALT, *atypical lipomatous tumor*) [Dei Tos i Pedeutour, 2013]. Morfologicznie guzy WDLPS składają się z dojrzałych komórek tłuszczowych o różnej wielkości. W przeciwieństwie do tłuszczaków, WDLPS cechują się obecnością pojedynczych lub leżących w skupiskach niedojrzałych lipoblastów oraz komórek zrębu z nadbarwliwymi

(hiperchromatycznymi) jądrami [Niezabitowski i wsp., 2009; Dei Tos, 2014]. Guzy z grupy WDLPS można dodatkowo podzielić na cztery podtypy histologiczne: wariant z przewagą adipocytów (*lipoma-like*), włókniejący z obecnością komórek zrębu z nadbarwliwymi jądrami (*sclerosing*), z elementami przewlekłego nacieku zapalnego (*inflammatory*) oraz składający się z komórek wrzecionowatych (*spindle cell*) [Miettinen, 2010B; Dei Tos, 2014].

3.2.3.2. DDLPS

Okolo 90% przypadków DDLPS powstaje *de novo*. Natomiast 10% guzów DDLPS ewoluje z WDLPS na skutek procesu odróżnicowania, czyli utraty fenotypu tkanki tłuszczowej i na skutek wielokrotnych wznów progresji do guza o wysokim stopniu złośliwości [Dei Tos i wsp., 2013]. Zjawisko odróżnicowania oraz pojęcie tłuszczakomięsaka odróżnicowanego zostało po raz pierwszy opisane w 1979 roku przez Evansa [Evans, 1979]. W związku z powyższym w utkaniu guzów DDLPS obserwuje się obecność komponentu odróżnicowanego, najczęściej przybierającego fenotyp przypominający mięsaka włóknistohistiocytarnego (MFH, *fibrous histiocytoma*) bądź rzadziej włókniakomięsaka (*fibrosarcoma*), mięsakomięśniaka gładkokomórkowego (*leiomyosarcoma*) lub prążkowanokomórkowego (*rhabdomyosarcoma*) [Niezabitowski i wsp., 2009; Miettinen, 2010B].

3.2.3.3. MLPS

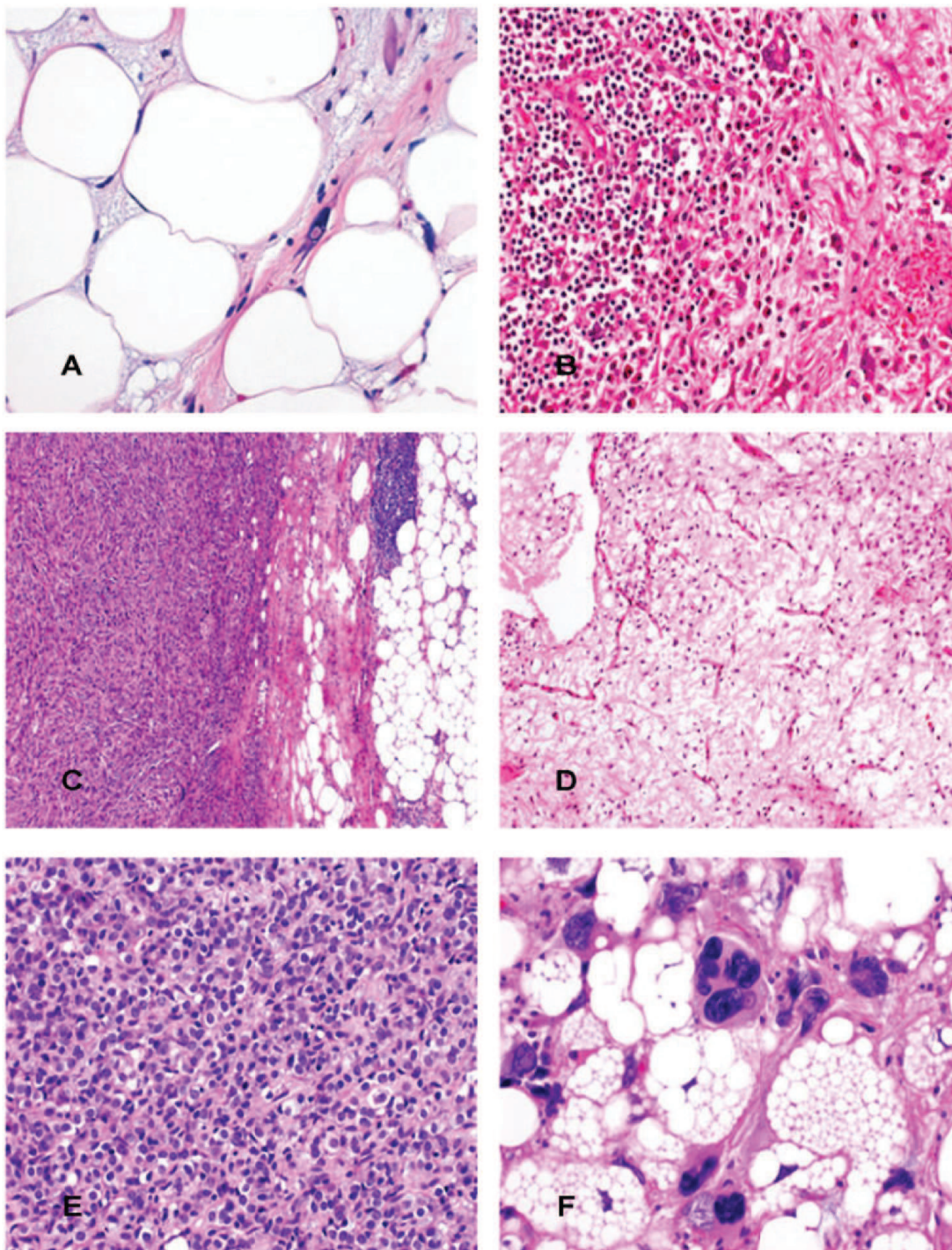
Guzy MLPS składają się z prymitywnych mezenchymalnych komórek wykazujących wczesne etapy lipogenezy, z niewielkiej ilości dojrzałych komórek tłuszczowych, ze śluzowatego podścieliska bogatego w glikozaminoglikany oraz z sieci cienkościennej krzywo pozaginanych naczyń krwionośnych [Niezabitowski i wsp., 2009]. Cechą charakterystyczną komórek utkania MLPS jest niska aktywność mitotyczna oraz brak cech polimorfizmu jądrowego. Natomiast tłuszczakomięsak okrągłokomórkowy jest bogatokomórkowym wariantem histologicznym powstałym na skutek progresji podtypu śluzowatego. W obrazie mikroskopowym obserwuje się liczne jednorodne komórki

o pęcherzykowatych jądrach zlokalizowane w nieregularnych skupiskach. Rozpoznanie wyłącznie utkania bogatokomórkowego w guzie MLPS spotykane jest niezmiernie rzadko i jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Najczęściej diagnozuje się guzy MLPS ze współistniejącym utkaniem śluzowatym i bogatokomórkowym [Antonescu i Ladanyi, 2013; Dei Tos, 2014].

3.2.3.4. PLPS

W utkaniu guzów PLPS obserwuje się olbrzymie lipoblasty o nieregularnych i nadbarwliwych (hiperchromatycznych) jądrach, z obecnością licznych wakuoli cytoplazmatycznych. Cechami charakterystycznymi komórek jest wielojądrowość, wysoka aktywność mitotyczna oraz rozległa martwica. Obraz mikroskopowy guzów PLPS może przypominać histologię mięsaka włóknistohistiocyta [Coindre i Pedeutour, 2013; Dei Tos, 2014].

Rycina 3. Obraz histologiczny czterech podtypów tłuszczakomięsaków: A) WDLPS z przewagą adipocytów, B) WDLPS z przewlekłym naciekiem zapalnym, C) progresja guza WDLPS do DDLPS, D) MLPS - wariant śluzowaty, E) MLPS - wariant bogatokomórkowy, F) PLPS (wg Dei Tos, 2014).



3.2.4. Leczenie

Najczęściej stosowaną metodą w terapii tłuszczakomięsaków jest radykalne leczenie operacyjne. Najlepsze efekty terapeutyczne, które zapewniają miejscową kontrolę choroby, obserwuje się u pacjentów z guzami umiejscowionymi powierzchownie, o niskim stopniu złośliwości oraz o wielkości maksymalnie do 5 cm [Crago i Singer, 2011]. W przypadku chorych z guzem o wielkości powyżej 5 cm i/lub zlokalizowanym zaotrzewnowo prowadzi się leczenie skojarzone: wycięcie guza oraz uzupełniającą radioterapię lub chemioterapię. Prawidłowe rozpoznanie histopatologiczne guza ma ogromne znaczenie kliniczne, ponieważ LPS różnią się wrażliwością na chemio- i radioterapię. Guzy MLPS są najbardziej wrażliwe na chemio- i radioterapię, natomiast pozostałe podtypy histologiczne wykazują niską (DDLPS i PLPS) bądź całkowity brak wrażliwości (WDLPS) na powyższe formy terapeutyczne [Jones i wsp., 2005]. Ponadto u pacjentów z zaawansowaną postacią MLPS z przerzutami stosuje się leczenie trabektedyną [Koseła i wsp., 2011]. Trabektedyna jest lekiem przeciwnowotworowym, którego mechanizm działania polega na wiązaniu się z małym rowkiem DNA, powodując zgięcie podwójnej helisy w kierunku głównego rowka, co skutkuje uruchomieniem kaskady zdarzeń wpływającej na szereg czynników transkrypcyjnych [Gounaris i wsp., 2014]. Badania kliniczne wykazują skuteczność leczenia trabektedyną nie tylko w grupie pacjentów z MLPS, ale także z rakiem piersi lub jajnika [Grosso i wsp., 2007; Gajdos i Elias, 2011].

Brak skutecznego postępowania terapeutycznego, zwłaszcza dla pacjentów z DDLPS, spowodował intensywny rozwój badań w kierunku poszukiwania terapii celowanej molekularnie. Jednym z badanych leków jest Nutlin-3A, który jest antagonistą MDM2 i blokuje interakcję między białkiem p53 a MDM2, co prowadzi do indukcji apoptozy komórek nowotworowych [Tseng i wsp., 2013]. Kolejnym przykładem terapii celowanej jest cząsteczka, będąca inhibitorem genu *CDK4*, którego amplifikację często obserwuje się w guzach WDLPS i DDLPS. Cząsteczka ta zapobiega niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych [Conyers i wsp., 2011]. Leki te są nadal w fazie badań klinicznych.

3.3. Metody badań cytogenetycznych

Wśród badań z zakresu cytogenetyki wyróżnia się techniki cytogenetyki klasycznej oraz molekularnej. Rozwój technik cytogenetyki klasycznej przypada na lata 50te i 60te XX-go wieku, kiedy dwóch naukowców: Tijo i Levan (1956) opublikowali pracę, w której ustalili, iż prawidłowa komórka człowieka składa się z 46 chromosomów. Źródłem materiału do badań cytogenetyki klasycznej są hodowle komórkowe *in vitro*, z których otrzymuje się chromosomy metafazalne. Chromosomy barwi się różnymi technikami i w zależności od rodzaju techniki uzyskiwania ich prążkowej struktury wyróżnia się barwienie G (odczynnik Giemsa), Q (pochodne akrydyny) oraz R (odwrotność barwienia G). Do analizy cytogenetycznej chromosomów najpowszechniej stosuje się barwienie GTG (barwienie odczynnikami Giemsa, po uprzednim trawieniu chromosomów trypsyną). Diagnostykę można rozszerzyć wykorzystując dodatkowo barwienie C w celu identyfikacji heterochromatyny okołocentromerowej lub barwienie Ag-NOR, które pozwala na wykrycie aktywnego organizatora jąderka w chromosomach akrocentrycznych [Bocian i Limon, 2011]. Liczne modyfikacje metod cytogenetyki klasycznej w badaniach guzów nowotworowych, m.in. wprowadzenie enzymatycznego rozdrabniania tkanek guza, zastosowanie nowego płynu hipotonicznego oraz odpowiedniego płynu hodowlanego, zawierającego antybiotyk i/lub związek mikostatyczny polepszyły jakość techniki oraz pozwoliły na jej wykorzystanie w analizie aberracji chromosomowych [Gibas i wsp., 1984; Limon i wsp., 1986A]. Rozdzielczość technik cytogenetyki klasycznej wynosi ok. 5 Mbp i jest niewystarczająca do identyfikacji mikrodelecji i mikroduplikacji, dlatego w ostatnich 30 latach nastąpił intensywny rozwój metod cytogenetyki molekularnej. Do technik cytogenetyki molekularnej zalicza się fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*), porównawczą hybrydyzację genomową (CGH, *comparative genomic hybridization*) oraz mikromacierze-CGH (array-CGH, *array-based comparative genomic hybridization*).

Technika FISH polega na hybrydyzacji wyznakowanych fluorescencyjnie (najczęściej fluoresceiną lub rodaminą) sond molekularnych z komplementarną sekwencją DNA, znajdującym się w badanym materiale. W rutynowej diagnostyce stosuje się kilka rodzajów sond w zależności od ich specyficzności:

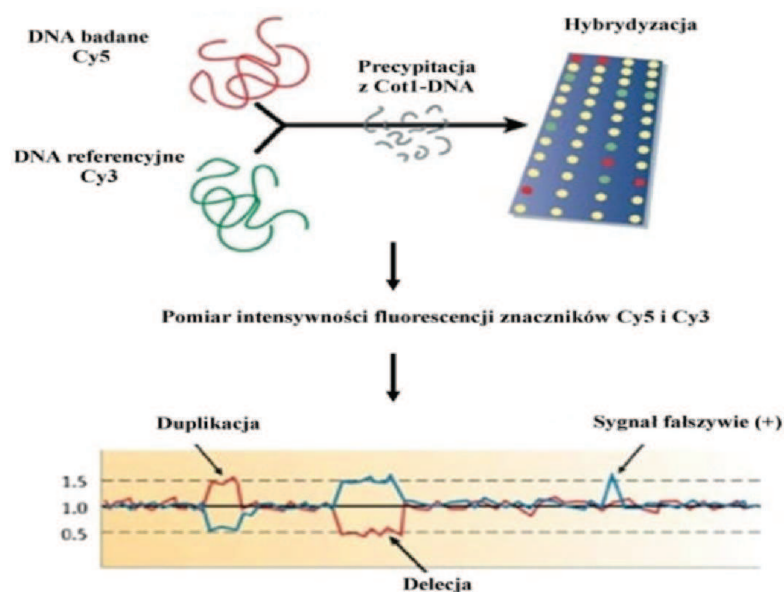
sondy centromerowe (komplementarne dla sekwencji centromerowych), telomerowe (wiążą się z sekwencją telomerową), malujące (umożliwiają wybarwienie całego chromosomu lub określonych ramion, co ma zastosowanie przede wszystkim w diagnostyce translokacji) oraz specyficzne (np. komplementarne dla wybranego genu) [Bocian i Limon, 2011]. Zastosowanie metody FISH w diagnostyce klinicznej jest szerokie i dotyczy m.in. identyfikacji aberracji chromosomowych, w tym mikrodelecji i/lub mikroduplikacji u pacjentów z chorobami konstytucyjnymi i hematoonkologicznymi lub badania amniocytów w diagnostyce prenatalnej. Ponadto technika FISH umożliwia wykonanie doświadczenia bez zakładania hodowli komórkowych, na jądrach interfazalnych, uzyskanych z materiału świeżego, mrożonego lub archiwalnego i zatopionego w parafinie. Dlatego też wynik badania FISH jest istotny w prognozowaniu przebiegu klinicznego choroby nowotworowej (np. amplifikacja *MYCN* jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w *neuroblastoma*) lub przewidywaniu odpowiedzi pacjenta na leczenie terapią celowaną (m.in. amplifikacja *HER2* w raku piersi lub *EGFR* w niedrobnokomórkowym raku płuc) [Varella-Garcia, 2003; Srebrniak i Tomaszewska, 2008]. Metoda FISH może być również stosowana do analizy całego profilu genomowego. W tym celu stosuje się modyfikację M-FISH (*multicolour FISH*), która polega na wybarwieniu każdego chromosomu innym znacznikiem fluorescencyjnym lub SKY FISH (*spectral karyotyping FISH*), oparta na pomiarze spektrofotometrycznym analiz widma emitowanego światła przez chromosomy [Bocian i Limon, 2011].

Klasyczna porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH) jest techniką z zakresu cytogenetyki molekularnej, umożliwiającą analizę całego profilu genomowego w pojedynczym eksperymencie. Zaletą metody jest możliwość przeprowadzenia doświadczenia bez zakładania hodowli komórkowej, ponieważ materiałem do badań jest wyizolowany DNA z limfocytów krwi obwodowej lub tkanki (np. nowotworowej). Klasyczna CGH polega na hybrydyzacji DNA badanego oraz referencyjnego, wyznakowanych dwoma różnymi znacznikami fluorescencyjnymi do prawidłowych chromosomów metafazalnych. Wynik końcowy analizy oparty jest na pomiarze intensywności świecenia poszczególnych barwników [Srebrniak i Tomaszewska, 2008]. Ze

względu na niską rozdzielczość (5-10 Mpz) technika ta została zastąpiona w wielu laboratoriach metodą mikromacierzy-CGH.

Metoda mikromacierzy-CGH, analogicznie jak klasyczna CGH, pozwala na identyfikację aberracji genomowych we wszystkich chromosomach z bardzo wysoką rozdzielczością w jednym doświadczeniu. W technice tej stosuje się szklane szkiełka mikromacierzowe, na których nadrukowane są sondy oligonukleotydowe, czyli krótkie sekwencje DNA (25-85 pz) obejmujące cały genom człowieka. Zasada działania oparta jest na hybrydyzacji mieszaniny w stosunku 1:1 DNA badanego i kontrolnego, wyznakowanego dwoma różnymi znacznikami fluorescencyjnymi (Cy5 i Cy3) do sond oligonukleotydowych, a następnie na porównaniu natężenia intensywności fluorescencji poszczególnych barwników (ryc. 4). Największą zaletą techniki jest rozdzielczość (nawet do kilku pz) - im więcej sond na szkiełku, tym większa rozdzielczość. Natomiast wadą metody jest ograniczenie do analizy translokacji niezrównoważonych: delecji – utrat materiału genetycznego i duplikacji/amplifikacji – dodatkowej ilości materiału genetycznego. Technika nie wykrywa aberracji zrównoważonych, disomii jednorodzicielskiej (UPD, *uniparental disomy*), mutacji punktowych ani mozaicyzmu niewielkiego stopnia. Mikromacierze-CGH mają zastosowanie nie tylko w badaniach profili genomowych guzów nowotworowych, ale również w diagnostyce klinicznej, głównie pacjentów z niepełnosprawnością intelektualną, dysmorfia i/lub zespołem wad wrodzonych [Behesti i wsp., 2002; Theisen, 2008]. Krótki czas wykonania badania (3-4 dni), możliwość analizy całego profilu genomowego w jednym eksperymencie oraz wysoka rozdzielczość spowodowały, iż technika mikromacierzy-CGH jest bardzo cenną i wiarygodną metodą, wykorzystywaną w diagnostyce oraz w badaniach naukowych.

Rycina 4. Schemat metody mikromacierzy-CGH (wg Feuk i wsp., 2006).



3.4. Znaczenie wyników badań cytogenetycznych w nowotworach

Wyniki badań cytogenetycznych wskazują, iż w wielu nowotworach, przede wszystkim w białaczkach, chłoniakach oraz guzach litych stwierdza się występowanie charakterystycznych lub wysoce swoistych aberracji chromosomowych w komórkach nowotworowych. W bazie *Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer* zgromadzono prawie 64 tysiące nieprawidłowych kariotypów nowotworów człowieka, z czego ponad 2 tysiące przypadków charakteryzuje się obecnością genu fuzyjnego. Zmiany genomowe, zarówno strukturalne, jak i liczbowe są najczęściej opisywane w nowotworach hematologicznych (ponad 44,000 przypadków) [*Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer*; <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>, stan na listopad 2014].

Aberracje chromosomowe występujące w guzach nowotworowych można podzielić na pierwotne i wtórne. Niektóre ze zmian są swoiste dla określonego podtypu histologicznego nowotworu oraz często występują jako jedyne aberracje w kariotypie, dlatego uważa się, że są one bezpośrednio zaangażowane w proces transformacji nowotworowej i dlatego nazywane są

aberracjami pierwotnymi. Natomiast zmiany wtórne są znacznie mniej specyficzne i mogą mieć związek z progresją guza nowotworowego.

Pierwsza aberracja pierwotna została scharakteryzowana w 1960 roku przez dwóch naukowców: Nowella i Hungerforda, którzy odkryli, że w komórkach szpiku pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową stwierdza się obecność małych chromosomów nazwanych chromosomami Philadelphia (Ph'). Dalsze badania cytogenetyczne wykazały, iż chromosom ten powstaje na skutek translokacji zrównoważonej między chromosomem 9 i 22 oraz prowadzi do powstania genu fuzyjnego *BCR/ABL*, na skutek przeniesienia onkogenu *ABL* o *locus* 9q34 w region *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*), znajdujący się w prążku q11 chromosomu 22 [Rowley, 1973]. W rezultacie koduje on białko p210 o podwyższonej aktywności kinazy tyrozynowej, które bierze udział w licznych szlakach przekąźnikowych, powodując zaburzenia regulacji cyklu komórkowego, różnicowania i dojrzewania komórki, a tym samym inicjuje proces kancerogenezy.

Aberracje pierwotne obecne są również w guzach litych, m.in. w mięsaku Ewinga, tłuszczakomięsaku śluzowatym, maziówczaku złośliwym i innych. W ponad 80% guzów Ewinga stwierdza się występowanie translokacji zrównoważonej $t(11;22)(q24;q12)$, która prowadzi do powstania genu fuzyjnego *EWS/FL1*. Białko fuzyjne ma aktywność czynnika transkrypcyjnego i zwiększa ekspresję onkogenu *c-MYC*. Mięsak Ewinga jest pierwszym guzem litym człowieka, w którym udało się zdiagnozować aberrację swoistą i poznać mechanizm jej powstawania [Turc-Carel i wsp., 1983]. Kolejnym przykładem jest maziówczak złośliwy (SS, *synovial sarcoma*), w którym Limon i wsp. (1986B) odkryli występowanie swoistej zmiany $t(X;18)(p11.2;q11.2)$, której konsekwencją są różne warianty genu fuzyjnego *SYT/SSX1* lub *SYT/SSX2*.

Zmiany wtórne, które są niespecyficzne, są spotykane w wielu różnych nowotworach i mogą pojawiać się nie tylko w przerzutach i wznowach, ale także w guzach pierwotnych. Jednym z najlepiej poznanych guzów litych pod względem występowania wtórnych zmian cytogenetycznych jest nerwiak zarodkowy (*neuroblastoma*), najczęstszy nowotwór złośliwy wieku dziecięcego. Około triploidalny karyotyp guza ($\sim 3n$) jest korzystnym czynnikiem

prognostycznym u niemowląt, natomiast utrata fragmentu chromosomu 1p i/lub 11q oraz częściowa trisomia chromosomu 17q wiążą się ze złym rokowaniem klinicznym [Limon, 2008]. Innym przykładem występowania aberracji wtórnych w nowotworach jest niezrównoważona translokacja der(16)t(1;16), która skutkuje częściową monosomią chromosomu 16 oraz częściową trisomią chromosomu 1. Zmiana ta jest wykrywana w wielu nowotworach, m.in. w mięsaku Ewinga, mięsaku prążkowanokomórkowym (*rhabdomyosarcoma*), raku piersi, zespołach mielodysplastycznych i innych [Mrózek i wsp., 1995].

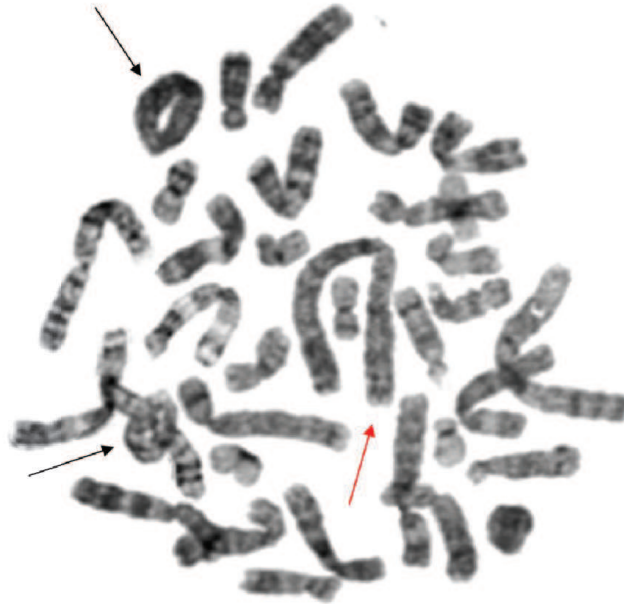
Badania cytogenetyczne pełnią istotną rolę w diagnostyce nowotworów hematologicznych oraz guzów litych. Potwierdzenie lub wykluczenie określonej aberracji ułatwia diagnostykę różnicową, zwłaszcza tych nowotworów, których rozpoznanie może sprawiać patologom problem. Ponadto wyniki tych badań pozwalają na dokładne poznanie biologii danego guza i mogą prowadzić do scharakteryzowania markerów genetycznych, związanych z ich progresją, co ma ogromną wartość praktyczną.

3.5. Badania cytogenetyczne i molekularne w tłuszczakomięsakach

3.5.1. WDLPS i DDLPS

W kariotypach ok. 80% guzów WDLPS i DDLPS obserwuje się liczne aberracje chromosomowe, w tym dodatkowe chromosomy markerowe, chromosomy pierścieniowe oraz małe chromosomy dmin (*double - minute chromosomes*) (ryc. 5). W WDLPS obecne mogą być również fuzje telomeryczne (TA, *telomer association*), które polegają na łączeniu się ze sobą telomerów różnych chromosomów a ich kariotypy są zazwyczaj 2n lub 3n [Sandberg, 2004].

Rycina 5. Kariotyp guza DDLPS, przedstawiający chromosom markerowy (czerwona strzałka) oraz dwa chromosomy pierścieniowe (czarne strzałki; dzięki uprzejmości dr hab. M. Iliszko).



Chromosomy markerowe, pierścieniowe oraz dmin zbudowane są najczęściej z amplifikowanego regionu 12q13-15, zawierającego liczne onkogeny: *MDM2*, *CDK4*, *HMGA2*, *TSPAN31*, *OS1*, *OS9*, *CHOP* i *GLI1*. Kluczowymi genami powyższego amplikonu są *MDM2* i *HMGA2*, których amplifikacje stwierdza się w prawie 100% guzów WDLPS i DDLPS, natomiast zwielokrotnienie genu *CDK4* obserwuje się w ok. 90% przypadków [Italiano i wsp., 2009; Conyers i wsp., 2011].

Gen *MDM2* (*murine double minute 2*) został odkryty u myszy jako jeden z trzech genów, których amplifikacje obserwuje się w spontanicznie transformowanej linii mysiej 3T3-DM [Cahilly-Snyder i wsp., 1987]. Obecnie wiadomo, iż gen ten należy do grupy protoonkogenów, które na skutek różnych mechanizmów aktywacji biorą udział w procesach kancerogenezy. Produkt białkowy genu *MDM2* jest odpowiedzialny za regulację aktywności białka p53. Białko MDM2 wiąże się z N-terminalną domeną białka p53, powodując zahamowanie jego aktywności transkrypcyjnej. Ponadto białko MDM2 posiada aktywność E3 ligazy ubikwityny, co pozwala na ubikwitynację

białka p53, a tym samym na jego degradację w proteosomach [Conyers i wsp., 2011].

Produkt białkowy genu *HMGA2* (*high mobility group AT - hook 2*) należy do rodziny niehistonowych białek jądrowych o zwiększonej ruchliwości elektroforetycznej. W prawidłowej komórce dorosłego człowieka nie obserwuje się ekspresji tego genu, a jego produkt białkowy zawiera strukturalne domeny DNA i może działać jako czynnik regulujący transkrypcję. Wysoka ekspresja białka *HMGA2* jest charakterystyczna dla wielu nowotworów, również dla mięsaków, w szczególności gdy obecne są aberracje chromosomu 12 [Lasota, 2010; Conyers i wsp., 2011]. Zaburzenia genu *HMGA2* obserwuje się również w łagodnych tłuszczakach, co może sugerować, iż guzy WDLPS wywodzą się z łagodnych tłuszczaków [Hameed, 2007].

Innym genem, którego produkt białkowy jest zaangażowany w regulację cyklu komórkowego (dokładnie w przejście z fazy G1 do S) jest *CDK4* (*cyclin – dependent kinase 4*). Gen ten koduje białko, które należy do rodziny kinaz serynowo – treoninowych. Mechanizm działania tego białka polega na tworzeniu kompleksu CDK4-CCND1 poprzez wiązanie się z cykliną D1 (CCND1), a w konsekwencji na fosforylacji białka Rb [Italiano i wsp., 2009].

Amplifikacja regionu 12q13-15 jest charakterystyczna dla guzów WDLPS oraz DDLPS, ale jest również spotykana w łagodnych tłuszczakach [Sandberg i wsp., 1986; Nielsen i Mandahl, 2013]. Italiano i wsp. (2009) udowodnili również, iż pacjenci z guzami WDLPS lub DDLPS, w których stwierdza się amplifikacje genu *MDM2* przy jednoczesnym braku zwielokrotnienia genu *CDK4*, mają lepsze rokowania, niższe ryzyko wznów a nowotwór cechuje się niższym stopniem złośliwości histopatologicznej. Ponadto w przeciwieństwie do WDLPS, w DDLPS stwierdza się występowanie mutacji punktowych w genie *TP53*, przede wszystkim w guzach zlokalizowanych zaotrzewnowo bez amplifikacji *MDM2*, co może sugerować, iż mutacje *TP53* leżą u podłoża procesu różnicowania guzów WDLPS w DDLPS [Conyers i wsp., 2011].

Wyniki najnowszych badań cytogenetycznych z wykorzystaniem metody mikromacierzy-CGH sugerują, iż w guzach WDLPS i DDLPS spotykane są dodatkowe aberracje wtórne, inne niż amplifikacja 12q. A mianowicie w guzach

DDLPS obserwuje się amplifikacje chromosomów 1p32 oraz 6q23, w których zlokalizowane są odpowiednio geny *JUN* i *ASK1* o podwyższonym poziomie ekspresji [Coindre i wsp., 2010]. Ponadto amplifikacja 1q24.3, w obrębie której zlokalizowane są geny *DNM3* oraz *miR-214/miR-199a2* jest charakterystyczna dla ok. 30% guzów WDLPS i DDLPS [Tap i wsp., 2011]. Natomiast Crago i wsp. (2012) stwierdzili, iż utrata fragmentu chromosomu 11q23q24 jest skorelowana z występowaniem złożonych kariotypów guzów DDLPS. Dodatkowo uważa się, że pacjenci, u których w guzach obecna jest delecja 19q13, bez jednoczesnej utraty 11q23q24, mają gorsze rokowania kliniczne [Crago i wsp., 2012].

3.5.2. MLPS

Guzy MLPS cechują się cytogenetycznie występowaniem wysoce specyficznej translokacji swoistej t(12;16)(q13;p11), opisanej po raz pierwszy w 1986 r. [Limon i wsp., 1986C]. Aberracja ta jest stwierdzana w ok. 95% guzów i skutkuje powstawaniem genu fuzyjnego *FUS/DDIT3*. Drugim, rzadko spotykanym wariantem genu fuzyjnego (5% guzów) jest *EWSR1/DDIT3*, który powstaje na skutek translokacji t(12;22)(q13;p11) [Dei Tos, 2014]. Produkty białkowe obu genów fuzyjnych wiążą się z DNA i aktywują procesy transkrypcyjne.

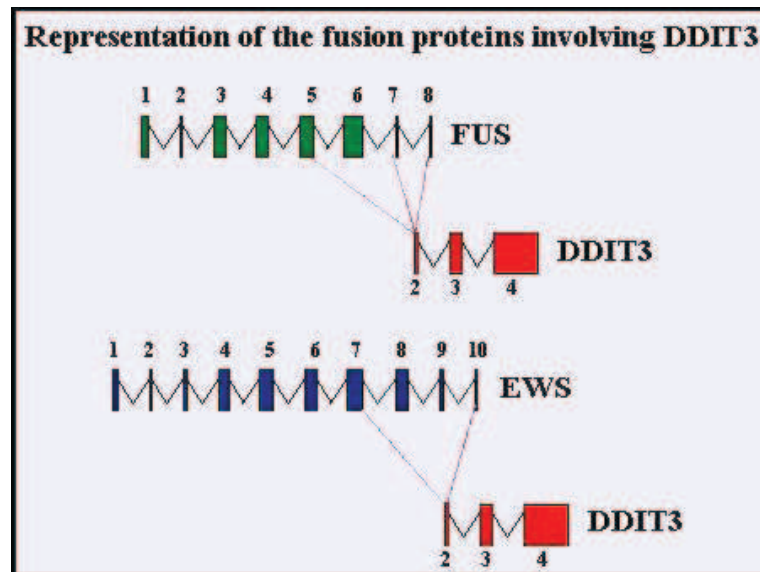
Gen *DDIT3* (*CHOP, DNA damage - inducible transcript 3*), który jest zaangażowany w powstawanie obu wariantów genu fuzyjnego, zlokalizowany jest w chromosomie 12q13.3, składa się z czterech eksonów i koduje białko C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein*), należące do rodziny czynników transkrypcyjnych. Produkt genu wiąże się z innymi białkami z rodziny C/EPB poprzez wysoce konserwatywny motyw zamka leucynowego, powodując zahamowanie ich funkcji. Ponadto białko CHOP jest zaangażowane w proces odkładania się tkanki tłuszczowej (adipogenezy), erytropoezę oraz promuje apoptozę. Gen *FUS* (*fused in sarcoma*), który u człowieka zbudowany jest z 15 eksonów i zlokalizowany w chromosomie 16p11.2 koduje białko, które wchodzi w skład heterogennego kompleksu rybonukleoprotein z rodziny hnRNP. Kompleks hnRNP reguluje proces alternatywnego składania i jest składową rodziny białek wiążących RNA (FET), zaangażowanych w regulację ekspresji

genów i utrzymanie stabilności genomowej [Conyers i wsp., 2011]. Natomiast gen *EWSR1* (*Ewing sarcoma breakpoint region 1*) składa się z 17 eksonów, zlokalizowany jest w chromosomie 22q12.2 i zaangażowany jest przede wszystkim w powstawanie genu fuzyjnego (*EWSR1/FLI1*) w guzie Ewinga.

W guzach MLPS znanych jest 11 wariantów genów fuzyjnych w zależności od punktów pęknięć: 9 wariantów genu *FUS/DDIT3* i 2 warianty *EWS/DDIT3* (ryc. 6). Najczęściej spotykanym wariantem (2/3 wszystkich przypadków) jest połączenie eksonu 2 genu *DDIT3* i eksonu 5 genu *FUS*. Inne warianty genów fuzyjnych, spotykane w guzach MLPS obejmują następujące kombinacje: ekson 2 genu *DDIT3* i odpowiednio ekson 7 lub 8 genu *FUS* oraz ekson 2 genu *DDIT3* i ekson 7 lub 10 genu *EWSR1* [Antonescu i Ladanyi, 2013]. Dotychczas nie udowodniono, aby warianty genu fuzyjnego miały znaczenie prognostyczne, jednakże uważa się, że typ fuzji może mieć wpływ na odpowiedź na leczenie trabektedyną [Dei Tos, 2014].

W prawie połowie przypadków MLPS powyższe warianty genów fuzyjnych występują jako pojedyncze aberracje, co pozwala przypuszczać, iż mogą one leżeć u podłoża patogenezы tego podtypu histologicznego tłuszczakomięsaka. Ponadto nie stwierdzono występowania tych zmian genomowych w innych nowotworach (z wyjątkiem wariantu okrągłokomórkowego MLPS). Udowodniono również, iż struktura genu *DDIT3* pozostaje nienaruszona w innych chorobach nowotworowych, w których stwierdza się występowanie aberracji regionu 12q13q15 [Kanoe i wsp., 1999]. Wyniki pojedynczych prac sugerują, iż w guzach MLPS najczęstszą aberracją wtórną jest częściowa trisomia chromosomu 8, aczkolwiek badania były przeprowadzone na niewielkiej liczbie guzów (n=10) [Ohguri i wsp., 2006].

Rycina 6. Warianty genów fuzyjnych *DDIT3/FUS* oraz *DDIT3/EWS* w guzach MLPS (wg Perez-Mancera i Sanchez-Garcia, 2004).



3.5.3. PLPS

Guzy PLPS mają bardzo złożone kariotypy, w których często stwierdza się poliploidie oraz liczne chromosomy markerowe. Ponadto w 30% przypadków można zaobserwować występowanie amplifikacji genu *MDM2*, która jest cechą charakterystyczną dla WDLPS i DDLPS [Sandberg, 2004]. Ze względu na bardzo niską częstość występowania tego nowotworu jest niewiele doniesień naukowych na temat jego cytogenetyki i biologii molekularnej. Uważa się, iż profil genomowy PLPS jest bardzo zbliżony do mięsaka włóknistohistiocytarnego, jednakże badania metodą klasycznego CGH zostały wykonane na niewielkiej liczbie guzów (n=9) [Idbaih i wsp., 2005]. W ok. 60% PLPS stwierdzono występowanie mutacji punktowych w genie supresorowym *TP53*, który koduje białko p53 o aktywności czynnika transkrypcyjnego [Ghadimi i wsp., 2011]. Jednakże mutacje somatyczne genu *TP53* obserwuje się aż w ponad połowie wszystkich nowotworów, dlatego zmiana ta nie jest swoista dla guzów PLPS.

3.6. Podsumowanie

Pomimo, iż od opublikowania pierwszych prac prezentujących wyniki badań cytogenetycznych tłuszczakomięsaków minęło już ponad 30 lat, wciąż nie została w pełni poznana biologia tych rzadkich nowotworów. Obecnie klinicyści przewidują przebieg kliniczny pacjenta z rozpoznaniem tłuszczakomięsakiem na podstawie wielkości guza, jego lokalizacji oraz stopnia złośliwości histologicznej. Pomimo intensywnego rozwoju technik cytogenetycznych oraz molekularnych nadal nieznanymi są markery genetyczne, które mogą być związane z progresją guza, a także ułatwić patomorfologom diagnostykę różnicową tych rzadko występujących nowotworów. Tab. 2 przedstawia podsumowanie wyników badań cytogenetycznych i molekularnych w tłuszczakomięsakach.

Tabela 2. Podsumowanie wyników badań cytogenetycznych i molekularnych w tłuszczakomięsakach (wg Dei Tos, 2014).

Podtyp histologiczny	Badania cytogenetyczne	Badania molekularne
WDLPS	Chromosomy pierścieniowe i markerowe (12q13-15)	Amplifikacja genów <i>MDM2</i> , <i>CDK4</i> i <i>HMGA2</i>
DDLPS	Chromosomy pierścieniowe i markerowe (12q13-15)	Amplifikacja genów <i>MDM2</i> , <i>CDK4</i> i <i>HMGA2</i>
MLPS	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q22)	Geny fuzyjne: <i>DDIT3/FUS</i> oraz <i>DDIT3/EWSR1</i>
PLPS	Złożone kariotypy	Mutacje genu <i>TP53</i> w 60% przypadków

Wprowadzenie nowej techniki mikromacierzy-CGH spowodowało intensywny rozwój badań nad identyfikacją profili genomowych różnych guzów nowotworowych. Ze względu na bardzo niską częstość tłuszczakomięsaków, w dostępnej literaturze niewiele jest doniesień prezentujących wyniki takich analiz w tej grupie nowotworów. Zaledwie dwie prace: Tap i wsp. (2011) oraz Crago i wsp. (2012) przedstawiają wyniki mikromacierzowe dla LPS. Wyniki tych badań oparte są na dużej liczbie guzów (odpowiednio n=38 oraz n=107 guzów), aczkolwiek analizy te ograniczają się tylko do dwóch podtypów

histologicznych: WDLPS i DDLPS. Natomiast Ohguri i wsp. (2006) analizował cytogenetycznie guzy MLPS, ale bardzo niewielką liczbę (n=10). Pozostałe prace są to opisy pojedynczych przypadków klinicznych, zbadanych cytogenetycznie z wykorzystaniem m.in. mikromacierzy-CGH.

Dlatego w niniejszej rozprawie przeprowadzono analizę profili genomowych guzów WDLPS, DDLPS i MLPS z zastosowaniem techniki mikromacierzy-CGH o bardzo wysokiej rozdzielczości (10 kpz). Ponadto powyższa analiza pozwoliła na dokładne prześledzenie ewolucji zmian cytogenetycznych we wznowach oraz guzach przerzutowych, pochodzących od jednego pacjenta na przestrzeni kilku lat trwania choroby. Warto podkreślić, iż w nowotworach rzadkich określenie pierwotnych i wtórnych aberracji chromosomowych jest nadal tematem otwartym, a analizy niezrównoważenia genomu już niejednokrotnie okazały się przełomowymi w badaniach nad funkcją genów i ich rolą w patogenezie wielu jednostek chorobowych.

4. CELE PRACY

1. Identyfikacja metodą mikromacierzy-CGH profili genomowych podtypów histologicznych tłuszczakomięsaków - WDLPS, DDLPS i MLPS.
2. Porównanie częstości występowania i stopnia zaburzeń genomowych w guzach pierwotnych, wznowach i guzach przerzutowych w obrębie powyższych podtypów histologicznych tłuszczakomięsaków.
3. Ocena różnic w ewolucji zmian genomowych w pojawiających się wznowach i przerzutach, pochodzących od tych samych pacjentów na przestrzeni kilku lat trwania choroby.

5. MATERIAŁ I METODY

Na przeprowadzenie badań zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej otrzymano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym – nr NKEBN/273/2011.

5.1. Materiał

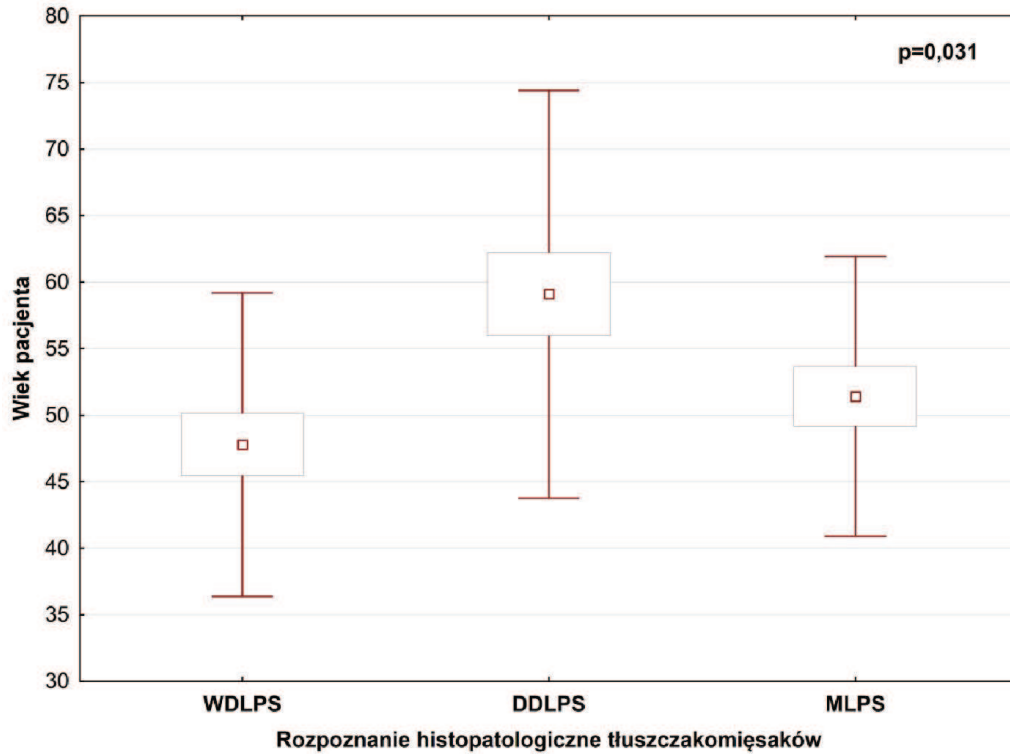
Materiałem wykorzystanym do badań było 70 mrożonych fragmentów tkanek z guzów tłuszczakomięśaka pochodzących od 53 pacjentów (WDLPS n=24 od 19 pacjentów, DDLPS n=24 od 16 pacjentów oraz MLPS n=22 od 18 pacjentów). Materiał badawczy uzyskano z trzech ośrodków: Katedry i Kliniki Chirurgii Onkologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Zakładu Patologii Nowotworów, Centrum Onkologii, Oddział w Krakowie oraz Zakładu Patologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Weryfikacja histopatologiczna badanych guzów została przeprowadzona przez prof. M. Miettinenę oraz dr J. Lasotę z Laboratory of Pathology, National Cancer Institute, Bethesda, USA. Dane kliniczne i histopatologiczne zostały przedstawione w tab. 17 (załącznik 10.1). Materiał badawczy został również zbadany cytogenetycznie techniką barwienia prążków G oraz FISH w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki w ramach wcześniejszych projektów badawczych (tab. 18-20, załącznik 10.2).

5.1.1. Charakterystyka kliniczna pacjentów

Średnia wieku pacjentów w momencie rozpoznania tłuszczakomięśaka wynosiła 52,8 lat (zakres od 36 do 82 lat), w tym dla chorych z rozpoznaniem histopatologicznym WDLPS to $47,8 \pm 11,4$ lat, a dla DDLPS $59,1 \pm 15,3$ lat i MLPS $51,4 \pm 10,5$ lat (ryc. 7). Stwierdzono występowanie statystycznie istotnej zależności między wiekiem chorych a rozpoznaniem histopatologicznym oraz rodzajem guza (odpowiednio $p=0,031$ i $p=0,015$; test ANOVA rang Kruskala-Wallis). Średnia wieku pacjentów, u których rozpoznano DDLPS była

wyższa niż chorych z WDLPS i MLPS. Liczba chorych kobiet była nieznacznie niższa niż mężczyzn (45% vs. 55%).

Rycina 7. Średnia wieku pacjentów w momencie rozpoznania choroby w zależności od podtypu histopatologicznego tłuszczakomięśaka.



Do analizy cytogenetycznej zakwalifikowano 32 guzy pierwotne (46%), 30 wznów (43%) oraz 8 przerzutowych (11%). Najczęstszymi lokalizacjami tłuszczakomięśaków, niezależnie od rodzaju guza, były tkanki uda oraz przestrzeń zaotrzewnowa (odpowiednio: 33% i 34%). Guzy pierwotne występowały przede wszystkim w tkankach głębokich kończyn dolnych z częstością 56%, natomiast wznowy i guzy przerzutowe pojawiały się głównie w przestrzeni zaotrzewnowej (odpowiednio 47% i 63%). Pojedyncze przerzuty były umiejscowione w nadgarstku (MLPS n=1) i jamie brzusznej (DDLPS n=2). Stwierdzono występowanie statystycznie istotnej zależności pomiędzy rodzajem guza a jego lokalizacją ($p < 0,001$; test Fishera).

Tabela 3. Zestawienie podstawowych parametrów klinicznych i histopatologicznych pacjentów z guzami tłuszczakomięsaków.

Parametr	WDLPS (n=24 guzy od 19 pacjentów)	DDLPS (n=24 guzy od 16 pacjentów)	MLPS (n=22 guzy od 18 pacjentów)	Razem (n=70 guzów od 53 pacjentów)
	Liczba chorych (%)			
<u>Płeć:</u>				
Kobieta	7 (37%)	10 (62,5%)	7 (39%)	24 (45%)
Mężczyzna	12 (63%)	6 (37,5%)	11 (61%)	29 (55%)
	Liczba guzów (%)			
<u>Rodzaj guza:</u>				
guz pierwotny (P)	16 (67%)	5 (21%)	11 (50%)	32 (46%)
wznowa (R)	8 (33%)	16 (67%)	6 (27%)	30 (43%)
przerzut (M)	0	3 (12%)	5 (23%)	8 (11%)
<u>Lokalizacja guza:</u>				
zaotrzewnowo	12 (50%)	8 (33%)	4 (18%)	24 (34%)
udo	7 (29%)	4 (17%)	12 (55%)	23 (33%)
jama brzuszna	1 (4%)	7 (29%)	0	8 (11%)
ściana brzucha	1 (4%)	0	1 (4%)	2 (3%)
inne	3 (13%)	5 (21%)	5 (23%)	13 (19%)

5.2. Metody

5.2.1. Aparatura

Tabela 4. Wykaz zastosowanej aparatury.

Sprzęt	Producent
Termocykler GeneAmp PCR System 2720	AB Applied Biosystems
Miniwirówka do szkiełek mikromacierzowych	Arrayit Corporation
Waga laboratoryjna	CAS
Pipety automatyczne	Eppendorf
Wirówka laboratoryjna 5415R i 5810R	
Termomikser	
Worteks	Ika
Pipeta automatyczna	Gilson
Łaźnia wodna	Julabo
Wirówka próżniowa CENTRIVAP	Labconco
Aparat do czyszczenia wody	Millipore
Miniwirówka	MPW-15
Płyta hybrydacyjna NimbleGen HS 4	Roche
Skaner NimbleGen MS 200	
Zestaw PMAT do nakładania miksera na szkiełko mikromacierzowe (<i>PMAT Precision Mixer Alignment Tool</i>)	
Zestaw akcesoriów do płukania szkiełek mikromacierzowych (<i>NimbleGen Array Processing Accessories</i>)	
Termoblok	Syngen Science
Cieplarka	Thermo Scientific
Spektrofotometr NanoDrop ND-100	TK Biotech

5.2.2. Odczynniki

Tabela 5. Wykaz zastosowanych odczynników.

Odczynnik	Producent
Dodecylosiarczan sodu	MB Biomedicals
EDTA	
Proteinaza K	
Chloroform	MERCK
Izopropanol	
Etanol	POCH
Szkiełka mikromacierzowe (<i>NimbleGen array 2.1M</i>)	Roche
Miksery do szkiełek mikromacierzowych (HX1)	
Kit do znakowania DNA (<i>NimbleGen Dual - Color DNA Labeling Kit</i>)	
Kit do hybrydyzacji (<i>NimbleGen Hybridization Kit</i>)	
Kit do płukania (<i>NimbleGen Wash Buffer Kit</i>)	
Chlorek sodu	SERVA
β -merkaptoetanol	Sigma Aldrich
Dimetylomocznik	

5.2.3. Roztwory

Tabela 6. Wykaz zastosowanych roztworów.

Bufor	Skład
75 mM NaCl / 1 mM EDTA	4,37 g NaCl 2 ml 0,5 M EDTA, pH=8,0 ddH ₂ O do 1 litra
10% SDS, pH=7,2	100 g dodecylosiarczanu sodu ddH ₂ O do 1 litra
9 M roztwór dimetylomocznika	793 g dimetylomocznika ddH ₂ O do 1 litra

5.2.4. Izolacja DNA

5.2.4.1. Izolacja DNA z mrożonej tkanki nowotworowej

DNA izolowano z mrożonej tkanki nowotworowej techniką wysalania [Miller S.A. i wsp., 1988] wg poniższej procedury:

1. Fragment mrożonej tkanki nowotworowej rozdrabniano mechanicznie przy użyciu skalpela, a następnie przenoszono do probówki 1,5 ml.
2. Do probówki dodawano 500 µl roztworu NaCl/EDTA, 50 µl 10% roztworu SDS oraz 2,5 µl proteiny K o stężeniu 20 mg/ml. Probówkę wortexowano.
3. Całość inkubowano w termobloku w temp. 56°C przez noc.
4. Drugiego dnia izolacji do probówki dodawano 200 µl 6M roztworu NaCl oraz 600 µl chloroformu. Całość wortexowano oraz mieszano przez 10 min., a następnie wirowano przez 5 min. (20800 x g, RT).
5. Supernatant przenoszono do nowej probówki 1,5 ml i dodawano jedną objętość zmrożonego izopropanolu w celu precypitacji DNA. Probówkę kilkakrotnie mieszano poprzez odwracanie oraz wirowano przez 10 min. (20800 x g, RT).

6. Po usunięciu supernatantu osad dwukrotnie przepłukiwano 100 µl roztworu 70% etanolu. Próbkę każdorazowo wirowano przez 1 min. (425 x g, RT).
7. Osad inkubowano w cieplarni w temp. 37°C przez około 30 min.
8. Osad zawieszano w 100 µl podwójnie destylowanej wody i przechowywano w temp. -20°C.

5.2.4.2. Izolacja DNA z limfocytów krwi obwodowej

DNA referencyjne w analizie mikromacierzy-CGH stanowiła mieszanina DNA, pochodząca od 9 zdrowych, anonimowych kobiet wyizolowany z limfocytów krwi obwodowej kitem *Qiagen DNA Blood Midi Kit* wg poniższej procedury:

1. Do probówki 15 ml dodawano 200 µl proteazy (*QIAGEN Protease*), a następnie 2 ml krwi żyłnej pobranej do probówki z antykoagulantem EDTA.
2. W celu lizy erytrocytów do probówki dodawano 2,4 ml buforu lizującego (*Buffer AL*), a następnie mieszano ją poprzez kilkakrotne odwracanie oraz intensywne wstrząsanie.
3. Probówkę inkubowano w łaźni wodnej w temp. 70°C przez 10 min.
4. Po inkubacji do probówki dodawano 2 ml 96% etanolu, a następnie mieszano poprzez kilkakrotne odwracanie oraz intensywne wytrząsanie probówki.
5. Połowę mieszaniny (3 ml) наносono na kolumnę (*QIAamp Midi column*) umieszczoną w nowej 15 ml probówce, a następnie wirowano przez 3 min. (1850 x g, RT).
6. Po odwirowaniu wyjmowano kolumnę z probówki, zlewano filtrat i наносono kolejne 3 ml mieszaniny na kolumnę. Wirowano przez 3 min. (1850 x g, RT).
7. Ponownie zlewano filtrat i dodawano na kolumnę 2 ml roztworu płuczącego *Wash Buffer 1*. Wirowano przez 1 min. (4500 x g, RT).

8. Po wirowaniu nie zlewano filtratu z próbki, lecz dodawano bezpośrednio 2 ml roztworu płuczającego *Wash Buffer 2*. Wirowano przez 15 min. (4500 x g, RT).
9. Kolumnę przenoszono do nowej próbki 15 ml. Następnie dodawano 200 μ l wody podwójnie destylowanej bezpośrednio na złożę.
10. Całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min., a następnie wirowano przez 2 min. (4500 x g, RT).
11. W celu zwiększenia stężenia DNA 200 μ l zwirowanego filtratu ponownie nanoszono na złożę i powtarzano punkt 10.
12. Kolumny usuwano, a oczyszczone DNA znajdujące się w próbce 15 ml przenoszono do próbek 1,5 ml i przechowywano w zamrażarce w -20°C do dalszych analiz.

5.2.5. Ocena ilościowa oraz jakościowa DNA

Stężenie oraz jakość wyizolowanego DNA sprawdzano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem NanoDrop ND-100. Do analizy mikromacierzowej wykorzystywano DNA o parametrach jakości: $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ oraz $A_{260}/A_{230} \geq 1,9$.

5.2.6. Mikromacierze-CGH

W celu identyfikacji profili genomowych wykorzystano technikę mikromacierzy-CGH (*NimbleGen array 2.1M, Roche*). Rozdzielczość szkiełek mikromacierzowych wynosiła 10 kbp (każde szkiełko mikromacierzowe posiadało 2,1 miliona sond oligonukleotydowych). Doświadczenia zostały wykonane zgodnie z poniższą procedurą:

Znakowanie DNA badanego i referencyjnego

- ✓ Podczas pracy ze znacznikami fluorescencyjnymi unikano światła dziennego.

- ✓ Przygotowanie znaczników fluorescencyjnych Cy5 i Cy3: do probówki 15 ml dodawano 2,200 μ l *Random Primer Buffer* oraz 4 μ l β -merkaptotetanolu. Całość mieszano i rozpipetowywano po 1,050 μ l odpowiednio do probówki z liofilizowanym znacznikiem Cy5 i Cy3. Następnie znaczniki rozpipetowywano do mniejszych objętości (po 40 μ l) i przechowywano w temp. -20°C maks. przez 4 miesiące.
1. DNA badany oraz referencyjny inkubowano w termobloku w temp. 56°C przez 90 min. w celu zwiększenia wydajności reakcji znakowania DNA.
 2. Przygotowywano rozcieńczenia DNA badanego oraz kontrolnego (500 ng DNA w 20 μ l *PCR Grade Water*) w probówkach 0,2 ml. Probówki wortexowano.
 3. Do roztworów DNA dodawano po 20 μ l znacznika Cy5 i Cy3, odpowiednio do DNA kontrolnego i badanego, a następnie wortexowano i wirowano probówki.
 4. Probówki inkubowano w termocyklerze w temp. 98°C przez 10 min. Po inkubacji probówki natychmiastowo umieszczano w lodzie na 2 min.
 5. Do probówek dodawano po 10 μ l mieszaniny reakcyjnej (5 μ l *dNTP mix*, 4 μ l *PCR Grade Water* i 1 μ l polimerazy *Klenow*). Etap ten wykonywano na lodzie. Probówki kilkakrotnie przepipetowywano.
 6. Probówki inkubowano w termocyklerze przez 4 godz. w temp. 37°C.
 7. W celu zatrzymania reakcji enzymatycznej do probówek dodawano 10,75 μ l roztworu *Stop Solution*. Probówki wortexowano, a zawartość przenoszono do probówek 1,5 ml.
 8. Następnie dodawano 55 μ l izopropanolu. Probówki wortexowano i inkubowano w warunkach braku dostępu światła słonecznego przez 10 min. Wirowano przez 10 min. (16000 x g, RT).
 9. Po usunięciu supernatantu peletki płukano w 500 μ l zmrożonego roztworu 80% etanolu. Wirowano przez 5 min. (16000 x g, RT).

10. Usuwano supernatant, a następnie peletki suszono w wirówce próżniowej przez 5 min. w temp. 35°C w warunkach chroniących przed dostępem światła.
11. Peletki rozpuszczano w 25 µl *PCR Grade Water*. Probówki worteksowano i następnie wirowano.
12. W celu zmierzenia inkorporacji znaczników fluorescencyjnych do DNA wykonywano pomiar stężenia z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop. Następnie obliczano właściwą objętość wyznakowanego DNA badanego i referencyjnego do przeprowadzenia reakcji hybrydyzacji wg poniższego wzoru (dla szkiełek mikromacierzowych *NimbleGen array 2.1M* stężenie DNA badanego i referencyjnego powinno wynosić po 34 µg) :

$$\text{Objętość DNA } [\mu\text{l}] = \frac{34}{\text{stężenie wyznakowanego DNA } [\text{ng}/\mu\text{l}]} \times 1000$$

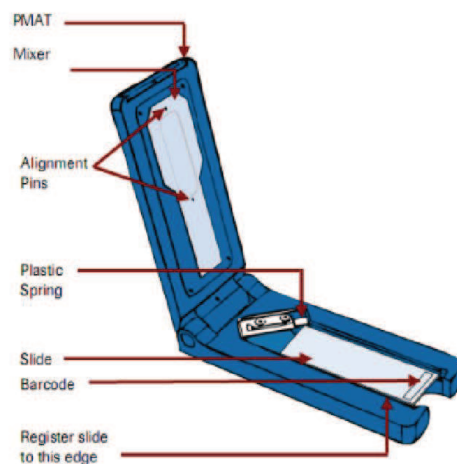
13. Mieszaninę wyznakowanego DNA badanego i referencyjnego suszono w wirówce próżniowej w temp. 35°C w warunkach chroniących przed dostępem światła przez około 45 min. (aż do otrzymania osadu w postaci fioletowej peletki). Unikano przesuszenia peletki. Peletki przechowywano w temp. -20°C do dalszych etapów doświadczenia (maks. 1 miesiąc).

Hybrydyzacja:

- ✓ Płytę hybrydyzacyjną uruchamiano minimum trzy godz. przed rozpoczęciem nastawiania reakcji hybrydyzacji w celu utrzymania równomiernej temp. 42°C na całej powierzchni płyty.
 - ✓ Wszystkie etapy pracy ze szkiełkami mikromacierzowymi przeprowadzano wyłącznie w warunkach braku dostępu światła dziennego używając rękawiczek nitrylowych.
 - ✓ Szkiełka mikromacierzowe przechowywano w eksykatorze w warunkach chroniących od światła.
1. Peletkę z pkt. 13 rozpuszczano w 12,3 µl *PCR Grade Water* oraz worteksowano.

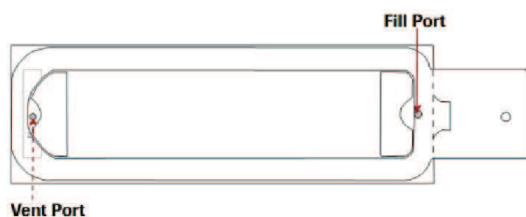
- Następnie przygotowano mieszaninę hybrydizacyjną w składzie (na jedno szkiełko mikromacierzowe): 29,5 μ l *2xHybridization Buffer*, 11,8 μ l *Hybridization Component A* oraz 1,4 μ l *Alignment Oligo*.
- Do każdej rozpuszczonej peletki dodawano po 31,7 μ l mieszaniny hybrydizacyjnej, a następnie probówkę wortexowano, wirowano oraz inkubowano w 95°C przez 5 min.
- Po inkubacji probówki przechowywano w temp. 42°C do momentu nałożenia mieszkany na szkiełko mikromacierzowe (maks. 15 min.).
- Mikser HX1 oraz szkiełko mikromacierzowe umieszczano wg schematu producenta w PMAT (ryc. 8), a następnie po oderwaniu folii zabezpieczającej przyklejano mikser do szkiełka.

Rycina 8. Schemat przyklejania miksera do szkiełka mikromacierzowego w PMAT [NimbleGen Arrays User's Guide, Roche].



- Szkiełko wraz z przyklejonym mikserem przekładano na płytę hybrydizacyjną i poprzez odpowiedni otwór w mikserze (ryc. 9) nakładano na szkiełko mieszaninę hybrydizacyjną. Nadmiar mieszaniny hybrydizacyjnej wycierano za pomocą bezwłóknowych chusteczek a otwory w mikserze zaklejano naklejkami.

Rycina 9. Szkiełko mikromacierzowe z naklejonym mikserem [NimbleGen Arrays User's Guide, Roche].



7. Hybrydyzację przeprowadzano przez 72 godz. w temp. 42°C.

Płukanie szkiełka mikromacierzowego:

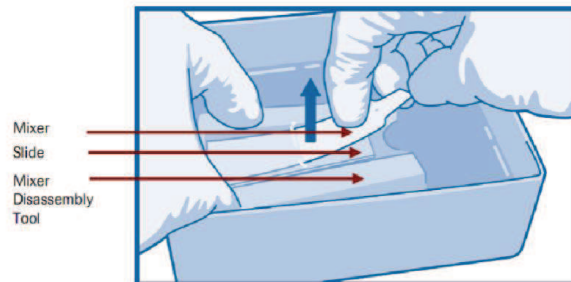
- ✓ Szkiełka mikromacierzowe odpłukiwano w warunkach braku dostępu światła.
 - ✓ Pojemniki stosowane do płukania szkiełek mikromacierzowych przez użyciem dokładnie płukano wodą podwójnie destylowaną oraz wodą MilliQ.
 - ✓ Przygotowanie 1M roztworu DTT: do próbki z liofilizowanym DTT dodawano 1,2 ml *PCR Grade Water*, całość mieszano, a następnie rozpipetowywano do mniejszych objętości (po 40 µl) i przechowywano w temp. -20°C
1. Do płukania szkiełka mikromacierzowego przygotowywano cztery bufor płuczące wg schematu przedstawionego w tab. 7. Bufor płuczący I* podgrzewano przed użyciem w łaźni wodnej do temp. 45°C. Bufory przygotowywano każdorazowo tuż przed użyciem.

Tabela 7. Skład buforów płuczących (objętości odczynników wymagane do płukania jednego szkiełka mikromacierzowego).

	Bufor płuczący I*	Bufor płuczący I, II lub III
Woda MilliQ	243 ml	24,3 ml
<i>10xWash Buffer I, II lub III</i>	27 ml	2,7 ml
Roztwór 1M DTT	27 µl	2,7 µl

- Mikser odklejano od szkiełka mikromacierzowego w pojemniku zawierającym uprzednio podgrzany bufor płuczący I* wg schematu przedstawionego na ryc. 10.

Rycina 10. Schemat odklejania miksera od szkiełka mikromacierzowego [NimbleGen Arrays User's Guide, Roche].



- Po odklejeniu miksera, szkiełko mikromacierzowe przenoszono do pojemnika z przygotowanym buforem płuczącym I. Szkiełko mikromacierzowe płukano przez 2 min. kilkakrotnie obracając pojemnik.
- Szkiełko przekładano do pojemnika z buforem płuczącym II na 1 min., a następnie do pojemnika z buforem płuczącym III na 15 - 30 sek.
- W celu wysuszenia szkiełka mikromacierzowego umieszczano je w miniwirówce (Arrayit) powierzchnią z sondami oligonukleotydowymi do góry na 60 sek.
- Szkiełko mikromacierzowe skanowano w skanerze MS 200 w ciągu 60 min. od zakończenia etapu płukania.

Skanowanie szkiełka mikromacierzowego i analiza wyniku mikromacierzowego:

- Szkiełka mikromacierzowe umieszczano w skanerze przy braku dostępu światła.
- Szkiełka skanowano w skanerze MS 200 przy standardowych ustawieniach (rozdzielczość 2 μm , najwyższa czułość aparatu z automatyczną regulacją wzmacnienia sygnału – *autogain settings*).
- Wyniki doświadczeń analizowano z wykorzystaniem programów *DEVA v.1.0.2* (Roche) oraz *Nexus Copy Number 7.5* (BioDiscovery).

4. Do analizy danych mikromacierzowych kwalifikowano próbki, które spełniły następujące kryterium: $\text{mad1.dr} < 0,3$ (dla przeprowadzonych doświadczeń $\bar{x}=0,15$). Parametr ten świadczy o jakości eksperymentu mikromacierzowego.
5. Analiza oraz normalizacja danych mikromacierzowych została przeprowadzona z wykorzystaniem algorytmu typu segMNT (*DEVA v.1.0.2*). W celu kwalifikacji zmiany jako aberracji chromosomowej co najmniej pięć sond oligonukleotydowych musiało być zlokalizowanych obok siebie.
6. Wyniki mikromacierzowe przedstawiano w postaci wykresów logarymicznych, w których na osi X prezentowano stosunek intensywności fluorescencji DNA badanego względem DNA kontrolnego (*log2 ratio*), a na osi Y pozycję w chromosomie. Rodzaj zmiany genomowej identyfikowano na podstawie progów odcięcia dla wartości *log2 ratio* : delecja heterozygotyczna *log2 ratio* $< -0,8$, delecja homozygotyczna *log2 ratio* $< -1,8$, duplikacja *log2 ratio* > 1 oraz amplifikacja *log2 ratio* > 2 .
7. Wyniki mikromacierzowe interpretowano w oparciu o koordynaty bazy danych Uniwersytetu Kalifornijskiego w Santa Cruz (NCBI36/hg18), a zapisywano je zgodnie z wytycznymi ISCN 2013 (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) [Shaffer i wsp., 2013].
8. W celu weryfikacji pochodzenia zmiany genomowej (somatyczna aberracja chromosomowa vs. polimorfizm liczby kopii) stosowano internetową bazę *Database of Genomic Variants* (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), bazy programu *Nexus Copy Number 7.5* oraz własną wewnętrzną bazę CNVs („in-house”).

5.2.7. „Stripowanie” szkiełek mikromacierzowych

W celu powtórnego użycia szkiełka mikromacierzowego do analizy odzyskiwano je z wykorzystaniem 9 M roztworu dimetylomocznika wg poniższej procedury [Ronowicz i wsp., 2012]:

- ✓ Szkiełko mikromacierzowe stripowano w ciągu 24 godz. od skanowania szkiełka po poprzedniej hybrydyzacji w warunkach braku dostępu światła.
 - ✓ Pojemniki stosowane do stripowania szkiełek mikromacierzowych przed użyciem dokładnie płukano wodą podwójnie destylowaną oraz wodą MilliQ.
1. W celu przygotowania 9 M roztworu dimetyloczownika 79,3 g dimetyloczownika w postaci stałej rozpuszczano w 100 ml wody MilliQ, a następnie intensywnie mieszano do całkowitego nasycenia roztworu. Roztwór 9 M dimetyloczownika przechowywano w temp. + 4°C przez okres do 1 miesiąca.
 2. Bufor do stripowania podgrzewano w łaźni wodnej w temp. 45°C przez 30 min.
 3. Szkiełko mikromacierzowe umieszczano w pojemniku z wodą MilliQ, a następnie inkubowano przez 5 min. w temp. pokojowej.
 4. Natychmiastowo szkiełko umieszczano w pojemniku z podgrzany do 45°C buforem do stripowania. Przez pierwszą minutę inkubacji szkiełko wytrząsano poprzez kilkakrotne wyciąganie i wkładanie do pojemnika. Następnie inkubowano w buforze w łaźni wodnej w temp. 45°C przez 4 godz.
 5. Po inkubacji w buforze do stripowania szkiełko mikromacierzowe płukano dwukrotnie w dwóch pojemnikach z wodą MilliQ po 5 min.
 6. Szkiełko mikromacierzowe suszono w miniwirówce Arrayit przez 60 sek. umieszczając je powierzchnią z sondami oligonukleotydowymi do góry.
 7. Szkiełko powtórnie skanowano w skanerze MS 200 w ciągu 60 min. od stripowania, przy standardowych parametrach (rozdzielczość 2 μm , najwyższa czułość aparatu z automatyczną regulacją wzmocnienia sygnału – *autogain settings*). Maksymalne wartości obu laserów (1000%) świadczyły o prawidłowym zestripowaniu szkiełka mikromacierzowego.
 8. Po stripowaniu szkiełko mikromacierzowe przechowywano w eksykatorze w warunkach braku dostępu światła słonecznego. Szkiełko wykorzystywano do ponownej analizy w ciągu 24 godz. od zakończenia etapu stripowania.

5.2.8. Analiza statystyczna

Analizę opisową przeprowadzono przedstawiając proporcje odsetkowe dla zmiennych kategoryzowanych oraz medianę i zakres dla zmiennych ciągłych. Do porównania rozkładów uzyskanych wyników wykorzystano dokładny test Fishera. Zmienne ciągłe porównywano nieparametrycznym testem U Manna Whitney'a oraz Kruskala – Wallisa w zależności od liczebności grup. We wszystkich obliczeniach za statystycznie znamienne przyjęto wartość $p < 0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy zastosowaniu oprogramowania *STATISTICA 10* (StatSoft Inc., USA).

6. WYNIKI

6.1. Analiza profilu genomowego tłuszczakomięsaków

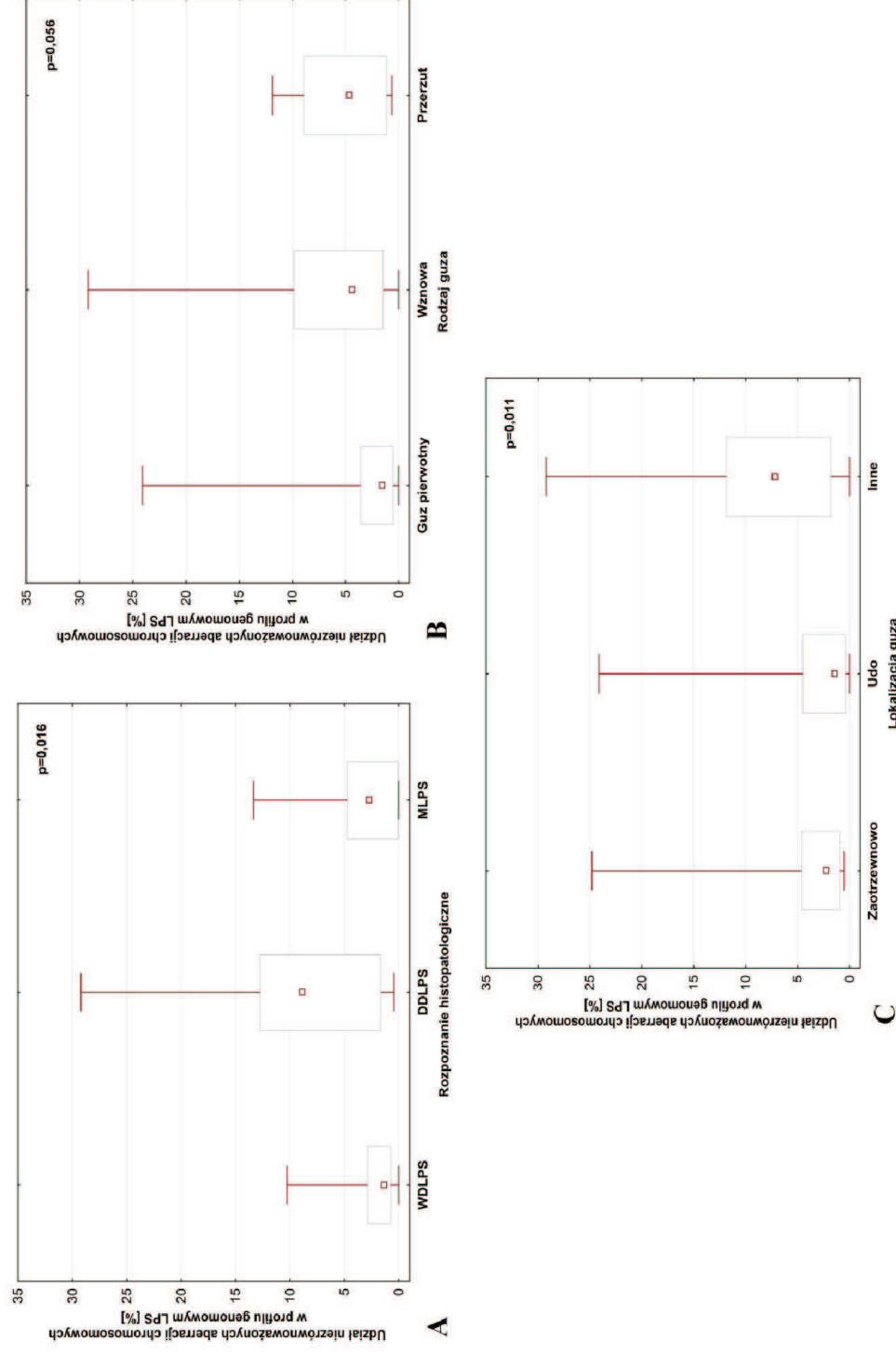
Analiza cytogenetyczna z wykorzystaniem techniki mikromacierzy-CGH została przeprowadzona w grupie 70 guzów tłuszczakomięsaków, pochodzących od 53 pacjentów. Częstości wykrytych niezrównoważonych aberracji oraz procentowy udział zmian chromosomowych w profilu genomowym guzów w zależności od ich podtypu histologicznego prezentuje tab. 8.

Tabela 8. Częstość niezrównoważonych aberracji chromosomowych, zidentyfikowanych w 70 guzach tłuszczakomięsaków.

Rodzaj aberracji chromosomowych	WDLPS	DDLPS	MLPS
	Liczba guzów (%)		
Wyłącznie duplikacje/ amplifikacje	17 (71)	5 (21)	4 (18)
Wyłącznie delecje	0	1 (4)	6 (27)
Jednoczesne występowanie duplikacji i delecji różnych chromosomów	6 (25)	18 (75)	8 (36)
Razem	23 (96)	24 (100)	18 (82)

Różnice w średnim procentowym udziale aberracji chromosomowych w profilu genomowym tłuszczakomięsaków są istotne statystycznie pomiędzy podtypami histopatologicznymi oraz lokalizacją guzów (odpowiednio: $p=0,016$ i $p=0,011$; test ANOVA rang Kruskala-Wallis). Ponadto stwierdzono występowanie zależności na granicy istotności statystycznej ($0,1 > p > 0,05$) między liczbą zmian genomowych w guzie a jego rodzajem. Wyniki zostały przedstawione na ryc. 11.

Rycina 11. Wykresy przedstawiające udział niezrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów tęczakomięsaków w zależności od A) podtypu histopatologicznego, B) rodzaju guza, C) lokalizacji guza.

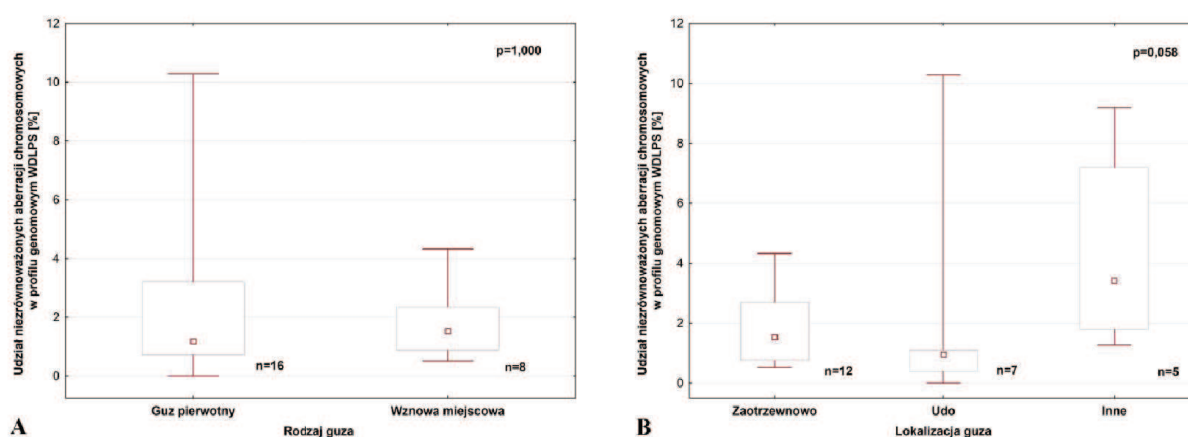


6.1.1. Analiza profilu genomowego guzów WDLPS i DDLPS

6.1.1.1. Guzy WDLPS

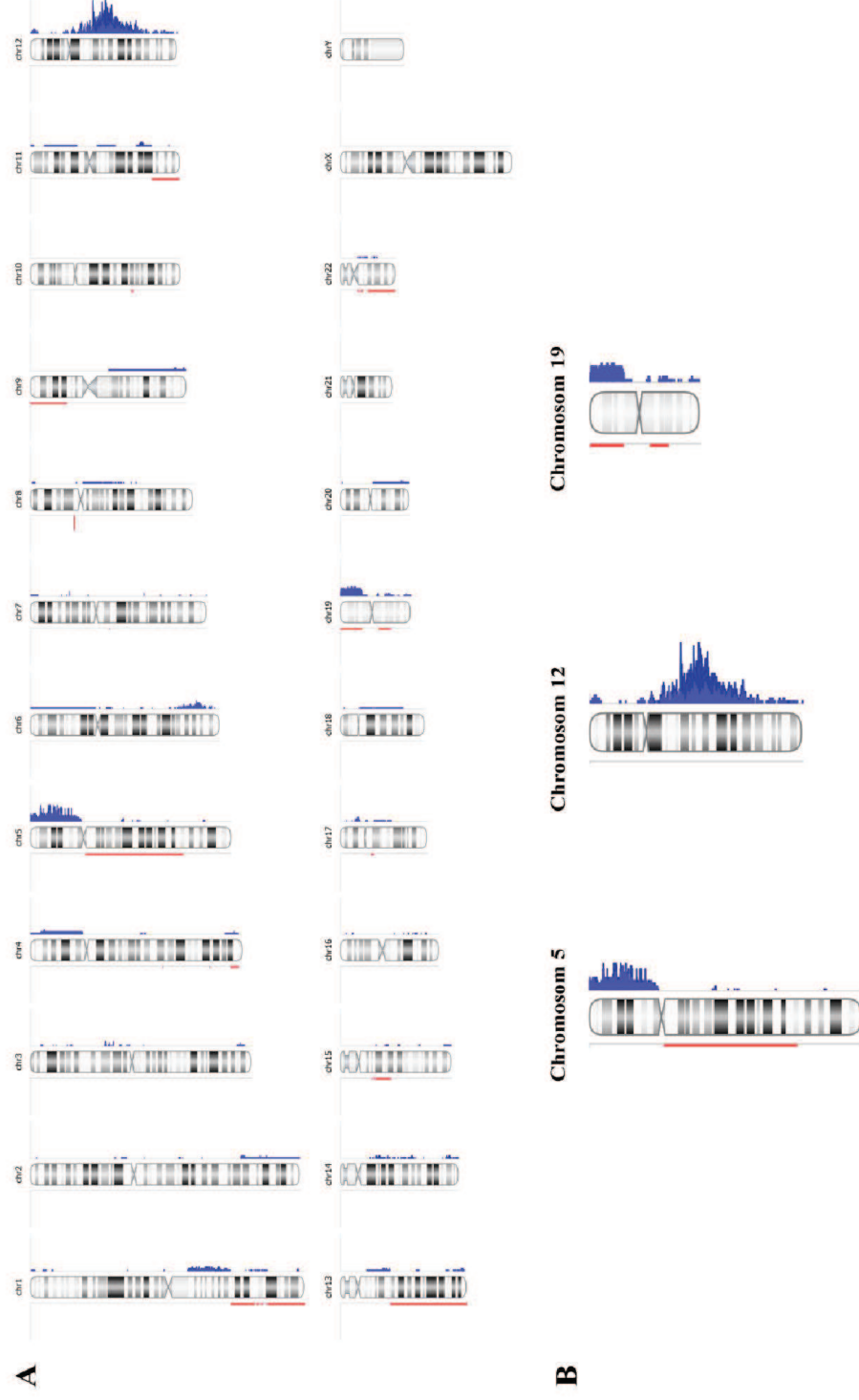
Zastosowanie techniki aCGH umożliwiło identyfikację nie zrównoważonych aberracji chromosomowych w 23 guzach WDLPS (95,8%). Prawidłowy profil genomowy z jednoczesnym prawidłowym kariotypem został stwierdzony w jednym guzie pierwotnym. Utraty materiału genetycznego wykryto w sześciu guzach (25%), natomiast dodatkowe kopie w 23 przypadkach. Średni procentowy udział nie zrównoważonych zmian chromosomowych w profilu genomowym guzów WDLPS wynosił 2,5% (zakres: 0 - 10,3%). Analiza związku pomiędzy liczbą aberracji genomowych w guzach WDLPS a jego rodzajem nie wykazała różnic istotnych statystycznie. Jednocześnie na granicy istotności statystycznej ($0,1 > p > 0,05$) znalazły się obserwacje występowania bardziej złożonego profilu genomowego w guzach, zlokalizowanych poza przestrzenią zaotrzewnową oraz tkankami głębokimi kończyn dolnych (ryc. 12).

Rycina 12. Wykres przedstawiający udział nie zrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów WDLPS w zależności od A) rodzaju guza, B) lokalizacji guza.



Zbiorcze wyniki wszystkich nie zrównoważonych zmian chromosomowych, zidentyfikowanych w guzach WDLPS przedstawia ryc. 13.

Rycina 13. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte w grupie 24 guzów WDLPS z zastosowaniem techniki aCGH (A) oraz powiększone chromosomy o najwyższej częstotliwości rearanżacji (B). Po lewej stronie diagramu chromosomu - delekcje (kolor czerwony), po prawej stronie - duplikacje (kolor niebieski).

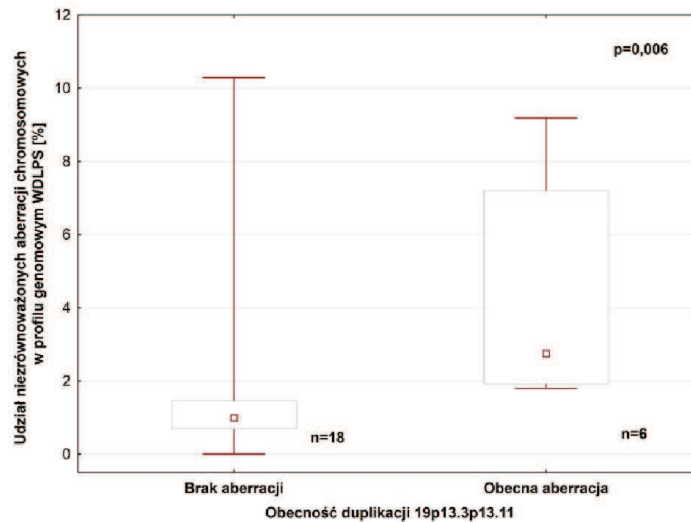


Najczęstszymi aberracjami, wykrywanymi w guzach WDLPS były rearanżacje chromosomu 12 (91,7%, n=22). Zmiany genomowe w obrębie chromosomu 12 zostały omówione w oddzielnym rozdziale 6.1.1.3. Kolejnymi aberracjami, pod względem częstości występowania były dodatkowe kopie krótkich ramion chromosomu 5 (42%, n=10) oraz chromosomu 19 (25%, n=6). Ponadto w kilku guzach zaobserwowano duplikacje 1q21.2q25.2 (12,5%, n=3) oraz 4p16.1p12 (8%, n=2).

Analiza związku pomiędzy występowaniem częściowej trisomii fragmentu chromosomu 5 a typem zmiany WDLPS wykazała różnice istotne statystycznie ($p=0,002$ OR=30,3 95%CI [2,64-348,93]). Powyższa zmiana genomowa była obecna w 87,5% wznów (n=7/8) i tylko w 19% guzów pierwotnych (n=3/16). Duplikację ramion krótkich chromosomu 5 stwierdzono również w jednym guzie DDLPS. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy występowaniem powyższej aberracji w guzach WDLPS i DDLPS (test Fishera).

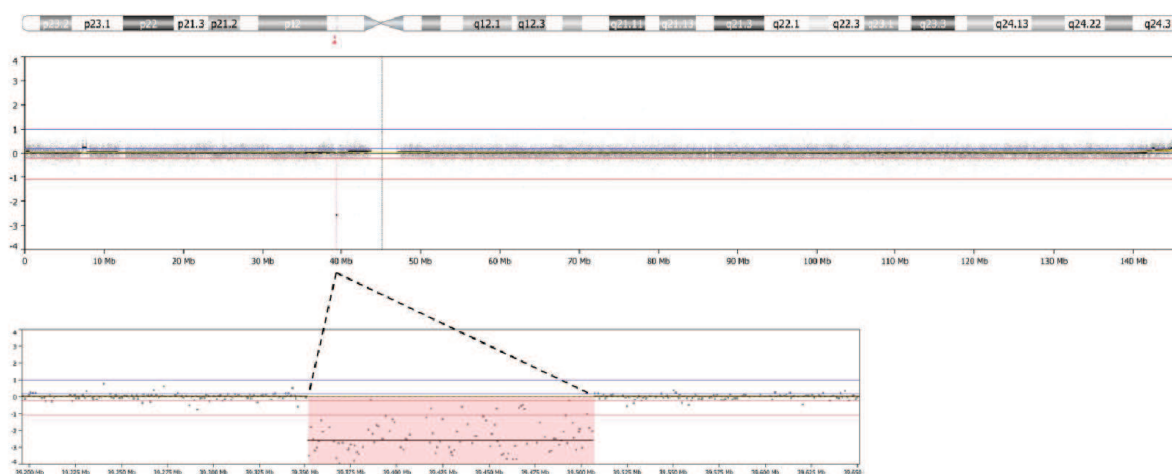
Minimalny wspólny region duplikacji fragmentu chromosomu 19 określono na 19p13.3p13.11, o wielkości ok. 18 Mbp (0-18,201,879 nt). Region ten obejmuje 586 genów, w tym 11 genów z bazy *Cancer Gene Census* (*FSTL3*, *STK11*, *TCF3*, *GNA11*, *SH3GL1*, *MLLT1*, *SMARCA4*, *LYL1*, *BRD4*, *TPM4*, *JAK3*). Stwierdzono występowanie znamiennej statystycznie zależności pomiędzy występowaniem powyższej aberracji a lokalizacją guza ($p=0,008$; test Fishera). Zmiana ta nie była wykrywana w guzach, zlokalizowanych w tkankach głębokich kończyn. Ponadto zaobserwowano, iż aberracja ta pojawiała się częściej w guzach, które cechują się złożonym profilem genomowym ($p=0,006$; test u Manna-Whitney'a) – ryc. 14.

Rycina 14. Wykres przedstawiający zależność między występowaniem częściowej trisomii chromosomu 19 a stopniem niestabilności chromosomowej guzów WDLPS.

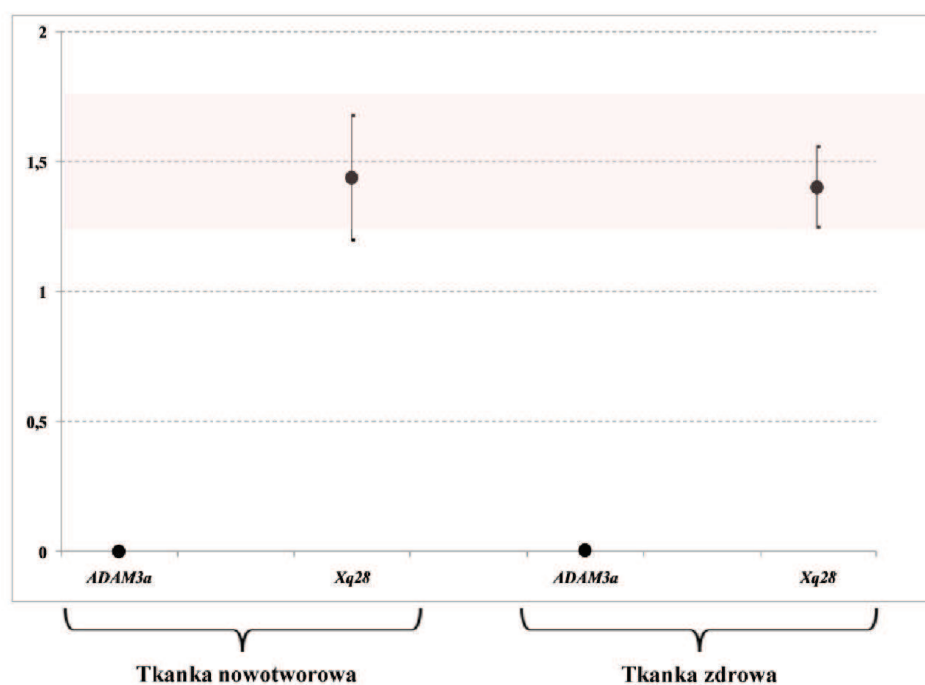


Podczas analizy wyników mikromacierzowych guzów WDLPS zaobserwowano występowanie homozygotycznej delecji fragmentu chromosomu 8p11.23p11.22 o wielkości ok. 155 kpz (punkty pęknięć: 39,351,919-39,507,290 nt). Region ten obejmował dwa geny: *ADAM3a* i *ADAM5* (częściowo). Częstość występowania aberracji wynosiła 42% (n=10/24). W celu weryfikacji, czy powyższa zmiana jest aberracją somatyczną wykonano doświadczenie z wykorzystaniem ilościowego PCR w czasie rzeczywistym dla DNA genomowego (qPCR). Liczba kopii genu *ADAM3a* zbadano w tkance nowotworowej oraz w tkance prawidłowej, pobranej od tego samego pacjenta. Kalibratorem w doświadczeniu było DNA referencyjne, używane do eksperymentów aCGH. Do względnej analizy porównawczej zastosowano dwa geny referencyjne: *GPR15* (3q11.2) oraz *ERMP1* (9p24.1). Dodatkowo oceniono liczbę kopii sekwencji z chromosomu Xq28, której wartość pozwalała określić płeć pacjenta, a tym samym stanowiła kontrolę wewnętrzną jakości przebiegu eksperymentu. Analiza qPCR wykazała, iż homozygotyczna delecja 8p11.23p11.22 jest polimorfizmem liczby kopii genów (CNVs, ang. *Copy Number Variation*), a nie aberracją somatyczną. Całkowita utrata genu *ADAM3a* obecna była zarówno w guzie, jak i w tkance prawidłowej (ryc. 15 i 16).

Rycina 15. Schemat homozygotycznej mikrodelecji 8p11.23p11.22, wykrytej techniką aCGH w guzach WDLPS.



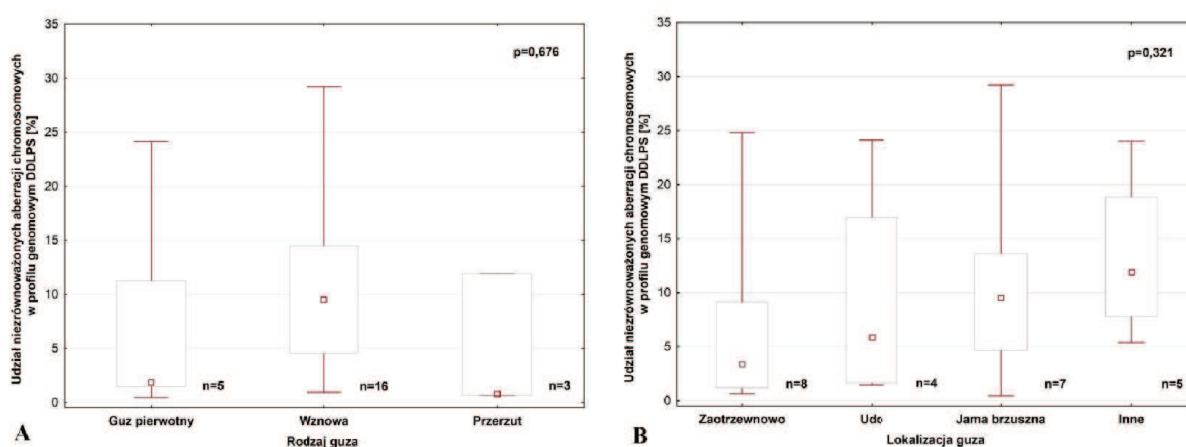
Rycina 16. Wykres przedstawiający wyniki qPCR w materiale, pobranym z guza oraz z tkanki prawidłowej pacjentki, u której wykryto homozygotyczną mikrodelecję 8p11.23p11.22.



6.1.1.2. Guzy DDLPS

We wszystkich guzach DDLPS (n=24) zidentyfikowano nie zrównoważone aberracje chromosomowe. W pięciu guzach (21%) zaobserwowano wyłącznie dodatkowe kopie materiału genetycznego, natomiast pojedynczą delecję wykryto w jednym guzie (4%). Jednoczesne występowanie duplikacji i/lub amplifikacji oraz delecji fragmentów chromosomów stwierdzono w 18 guzach DDLPS (75%). Utraty materiału genetycznego występują statystycznie częściej w guzach DDLPS w porównaniu z guzami WDLPS ($p < 0,001$ OR=11,4 95% CI [2,95 - 44]). Średni procentowy udział nie zrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów DDLPS wynosił 9,5% (zakres 0,4 - 29,2%). Analiza związku pomiędzy powyższym parametrem w grupie guzów WDLPS i DDLPS wykazała różnicę istotną statystycznie ($p = 0,001$; test U Manna Whitney'ego). Jednocześnie nie stwierdzono zależności między stopniem nie zrównoważenia genomu a rodzajem guza DDLPS i jego lokalizacją (test ANOVA rang Kruskala-Wallisa).

Rycina 17. Wykres przedstawiający średni procentowy udział nie zrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów DDLPS w zależności od A) rodzaju guza oraz B) lokalizacji guza.

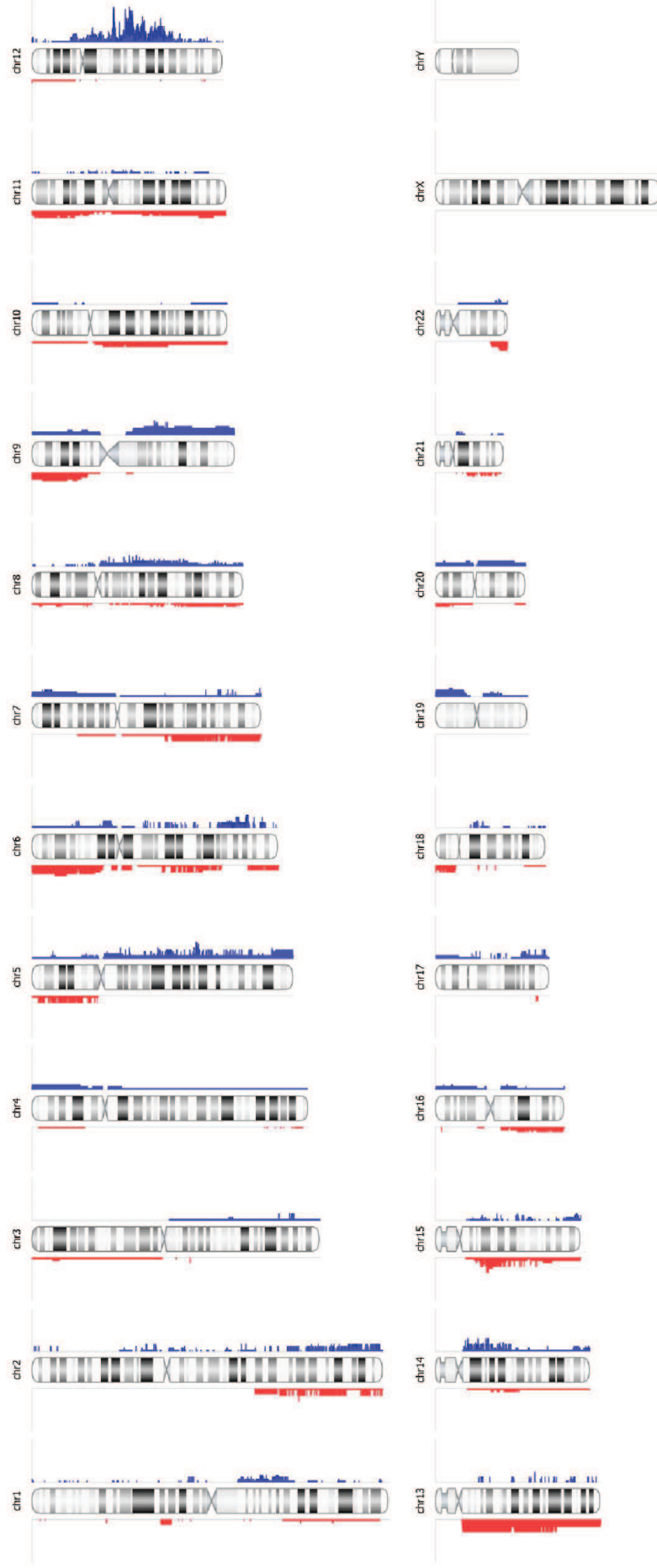


W 22 guzach DDLPS (91,7%) stwierdzono występowanie aberracji chromosomu 12. Zmiany te zostały szczegółowo opisane w rozdziale 6.1.1.3. Kolejnymi rearanżacjami genomowymi, wykrywanymi z największą częstością były: aberracje chromosomów 5 (n=16), 13 (n=14), 2 (n=12), 6 (n=13), 14 (n=10) oraz 15 (n=10). Ryc. 18 przedstawia zbiorcze wyniki wszystkich

niezrównoważonych aberracji chromosomowych, zidentyfikowanych w guzach DDLPS.

Za pomocą dokładnego testu Fishera z rozszerzeniem Freeman-Haltona dla tablic 3x2 lub 4x2 przeprowadzono jednoczynnikową analizę związku pomiędzy występowaniem określonej aberracji chromosomowej a rodzajem guza oraz jego lokalizacją. Stwierdzono, iż istnieje statystycznie istotna zależność między obecnością delekcji fragmentu chromosomu 15 a rodzajem guza ($p=0,011$). Utratę materiału chromosomu 15 zaobserwowano wyłącznie we wznowach, natomiast nie była ona wykrywana w guzach pierwotnych oraz przerzutowych. Minimalny wspólny region powyższej zmiany obejmował 1,4 Mpz w prążku 15q14. Ponadto analiza statystyczna wykazała znamienne różnice w częstości występowania utrat materiału genetycznego w chromosomie 13 w guzach o różnych lokalizacjach ($p=0,016$). Aberrację tę wykryto w 7 guzach DDLPS, z czego aż w 5 guzach umiejscowionych w jamie brzusznej (ryc. 19). Minimalny wspólny region delekcji stanowił 13q11q31.1 o wielkości ok. 65 Mpz (punkty pęknięć: 18,664,422-83,656,346 bp). Region ten obejmował aż 382 geny, w tym 9 genów z bazy *Cancer Gene Census* (*ZMYM2*, *CDX2*, *FLT3*, *BRCA2*, *LHFP*, *TTL*, *FOXO1*, *LCP1*, *RB1*). Ponadto powyższa aberracja statystycznie częściej występuje w guzach, które cechują się złożonym profilem genomowym ($p=0,016$; test U Manna-Whitney'a). Do innych zmian genomowych, które wykrywano w guzach o wysokim stopniu niestabilności chromosomowej zaliczono: rearanżacje chromosomu 8 i 9 oraz delekcje fragmentu chromosomu 11 (tab. 9).

Rycina 18. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte w grupie 24 guzów DDLPS z zastosowaniem techniki aCGH. Po lewej stronie diagramu chromosomu - delecje (kolor czerwony), po prawej stronie - duplikacje (kolor niebieski).



Rycina 19. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy występowaniem delekcji fragmentu ramion długich chromosomu 13 oraz A) lokalizacją guza B) stopniem złożoności profilu genomowego wszystkich guzów DDLPS.

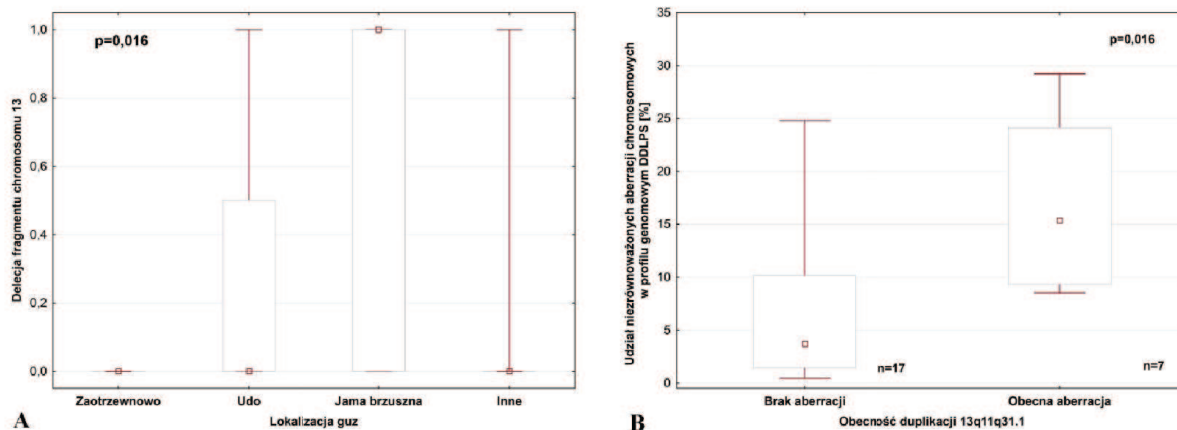


Tabela 9. Analiza związku pomiędzy obecnością określonej aberracji chromosomowej a stopniem złożoności profilu genomowego guzów DDLPS (test U Manna-Whitney'a).

Aberracja chromosomowa	Poziom istotności p
Nieźrównoważenie chromosomu 8	0,011
Nieźrównoważenie chromosomu 9	< 0,001
Delekcja fragmentu chromosomu 11	0,010
Delekcja fragmentu chromosomu 13	0,016

W 16 guzach (67%) stwierdzono występowanie aberracji chromosomu 5, w tym duplikacji i/lub amplifikacji w 13 guzach, zaś delekcji w trzech guzach. W porównaniu do guzów WDLPS, dodatkowe kopie materiału genetycznego obejmowały przede wszystkim ramiona długie chromosomu 5 (8% vs. 50%). Nie stwierdzono występowania zależności statystycznie istotnej pomiędzy obecnością niezrównoważenia chromosomu 5 a rodzajem guza i jego lokalizacją. Jednakże różnica w częstości powyższej aberracji między grupą guzów WDLPS i DDLPS była na granicy istotności statystycznej ($0,1 > p > 0,05$).

Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu Fishera pozwoliła na ocenę różnic częstości występowania określonych aberracji chromosomowych pomiędzy grupą guzów WDLPS i DDLPS. W przeciwieństwie do guzów WDLPS, w DDLPS stwierdza się występowanie statystycznie częściej następujących zmian genomowych: częściowej utraty materiału genetycznego chromosomu 6, 11, 13 i 15, trisomii fragmentu chromosomu 14 oraz rearanżacji chromosomu 8 (tab. 10).

Tabela 10. Analiza związku między częstością występowania określonych aberracji chromosomowych w guzach WDLPS i DDLPS.

Aberracja chromosomowa	Częstość w guzach WDLPS	Częstość w guzach DDLPS	Poziom istotności p
Delecja fragmentu chromosomu 6	0	42% (n=10)	< 0,001
Nie zrównoważenie chromosomu 8	4% (n=1)	33% (n=8)	0,011 OR=11,5 95% CI [1,31-101,19]
Delecja fragmentu chromosomu 11	4% (n=1)	25% (n=6)	0,049 OR=7,67 95% CI [0,85-69,54]
Delecja fragmentu chromosomu 13	4% (n=1)	29% (n=7)	0,024 OR=9,47 95% CI [1,06-84,38]
Duplikacja fragmentu chromosomu 14	12,5% (n=3)	42% (n=10)	0,025 OR=5 95% CI [11,7-21,46]
Delecja fragmentu chromosomu 15	4% (n=1)	25% (n=6)	0,049 OR=7,67 95% CI [0,85-69,54]

6.1.1.3. Aberracje chromosomu 12 w guzach WDLPS i DDLPS

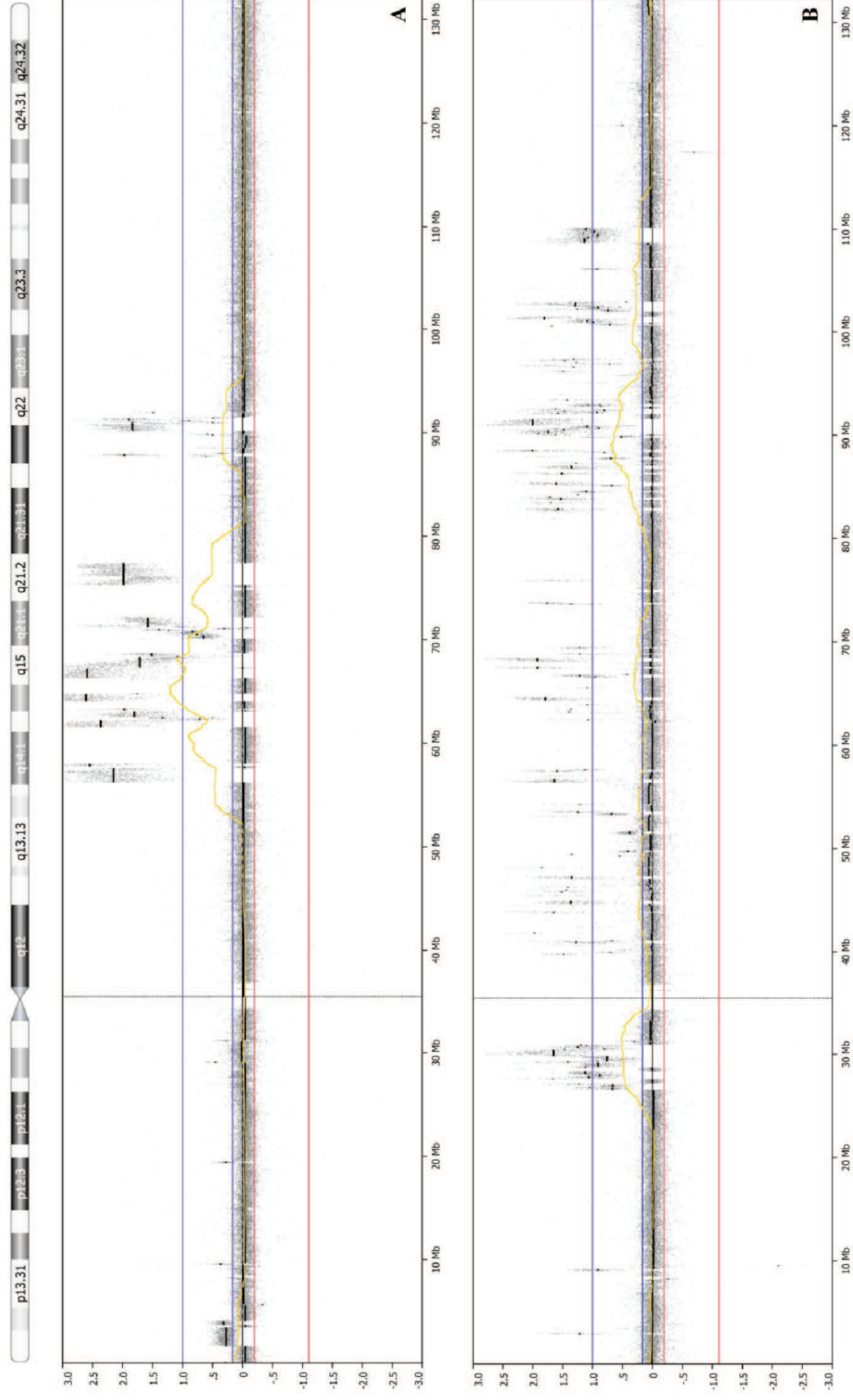
Spośród 48 guzów WDLPS i DDLPS, w 44 (91,7%) stwierdzono występowanie niezrównoważonych aberracji chromosomu 12 (WDLPS n=22/24; DDLPS n=22/24). W dwóch guzach pierwotnych WDLPS oraz w jednym guzie pierwotnym i w jednej wznowie DDLPS nie wykryto zaburzeń genomowych tego chromosomu. Aberracje chromosomu 12 obejmowały przede wszystkim amplifikację fragmentu ramion długich (100%), ale także częściową trisomię fragmentu ramion krótkich (33%). Dodatkowo w jednym guzie DDLPS stwierdzono występowanie delecji o wielkości ok. 30 Mpz w regionie 12p13.33p11.22 (punkty pęknięć: 0-29,970,824 nt). Przykładowe wyniki rearanżacji chromosomu 12 przedstawia ryc. 20.

Minimalny wspólny region amplifikacji chromosomu 12 w guzach WDLPS i DDLPS obejmuje 12q14.1q21.1. W regionie tym wyróżnić można trzy piki o najwyższej częstości występowania: 12q14.1 (*locus* genu *CDK4*), 12q14.3 (*locus* genu *HMGA2*) oraz 12q15 (*locus* genu *MDM2*) – ryc. 21. Amplifikację genów *CDK4* i *MDM2* stwierdzono we wszystkich guzach WDLPS i w 21 guzach DDLPS, w których wykryto aberracje chromosomu 12. Częstość amplifikacji genu *HMGA2* jest również porównywalna w obu podtypach histologicznych tłuszczakomięsaków (tab. 11).

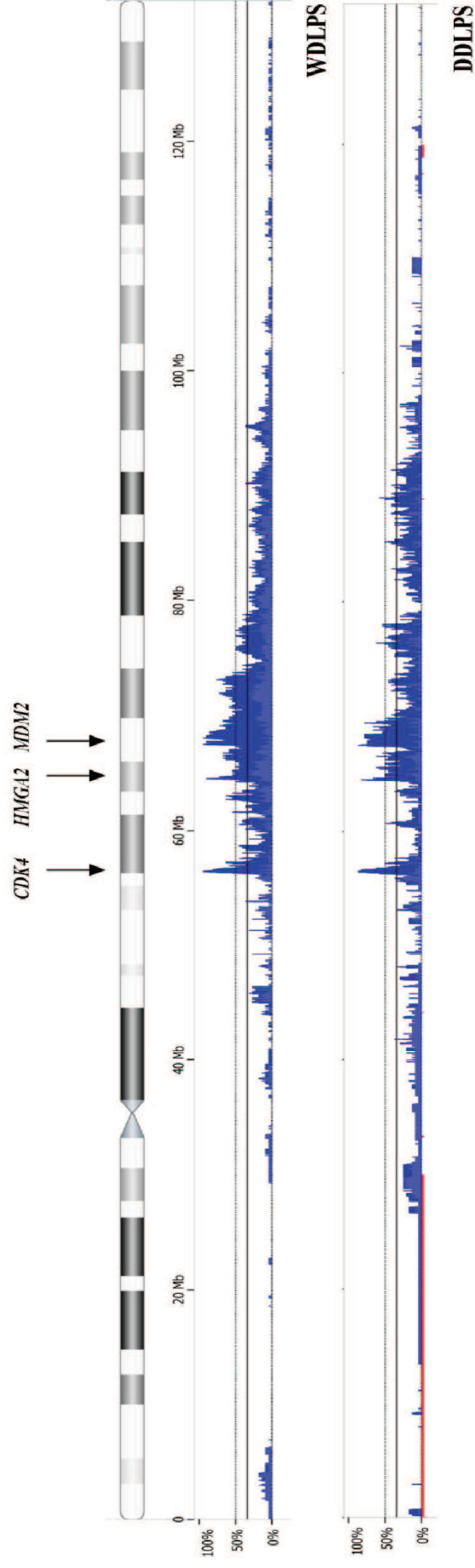
Tabela 11. Porównanie częstości amplifikacji genów *CDK4*, *HMGA2* i *MDM2* w guzach WDLPS i DDLPS.

	Amplifikacja genu <i>CDK4</i> (12q14.1) n (%)	Amplifikacja genu <i>HMGA2</i> (12q14.3) n (%)	Amplifikacja genu <i>MDM2</i> (12q15) n (%)
WDLPS	22 (91,7)	21 (87,5)	22 (91,7)
DDLPS	21 (87,5)	20 (83,3)	21 (87,5)

Rycina 20. Przykładowe wyniki aCGH niezrównoważonych aberracji chromosomu 12 w guzach A) WDLPS i B) DDLPS.



Rycina 21. Porównanie częstości występowania aberracji chromosomu 12 w guzach WDLPS i DDLPS.

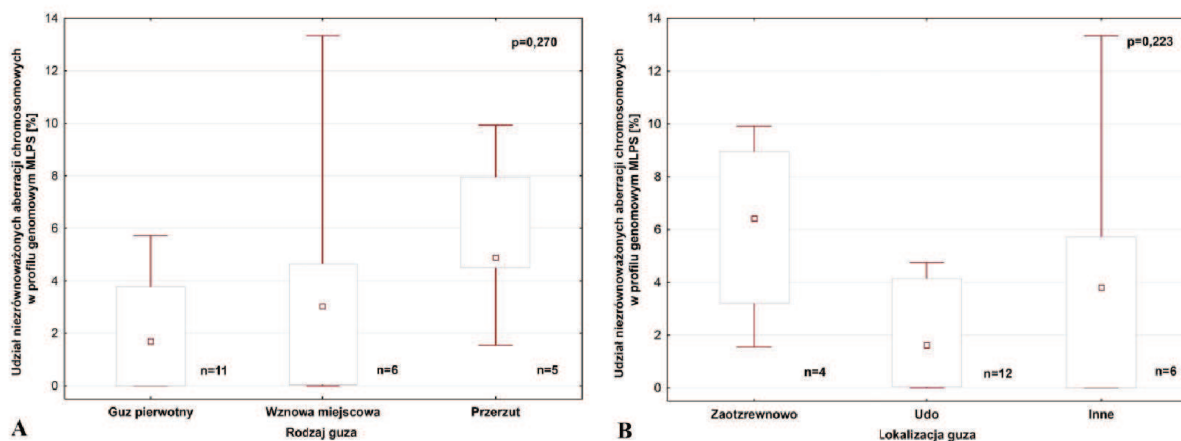


6.1.2. Analiza profilu genomowego guzów MLPS

Obecność translokacji swoistej t(12;16)(q13;p11) została zbadana technikami klasycznej cytogenetyki i/lub FISH, z zastosowaniem sondy specyficznej dla genu *DDIT3*. Występowanie powyższej aberracji pierwotnej stwierdzono w 20 guzach (91%), natomiast w dwóch pozostałych (z prawidłowym kariotypem i negatywnym wynikiem FISH) wykryto techniką aCGH wtórne aberracje chromosomowe. W badanej grupie w trzech guzach ze zdiagnozowaną translokacją swoistą nie stwierdzono występowania dodatkowych zmian cytogenetycznych. Zapisy kariotypów zostały przedstawione w załączniku 10.2 (dzięki uprzejmości dr hab. M. Iliszko).

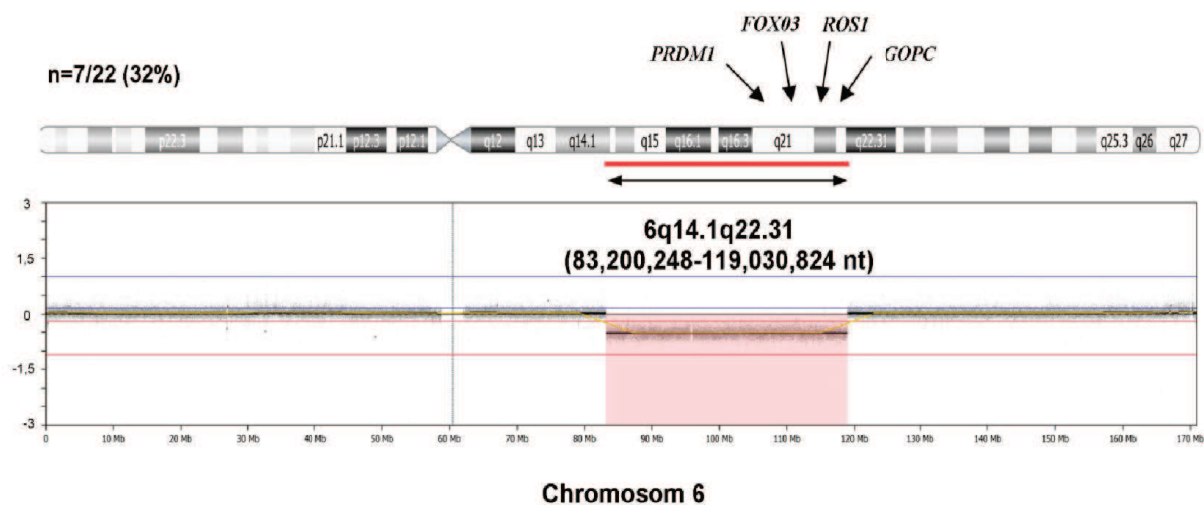
Technika aCGH umożliwiła identyfikację wtórnych aberracji chromosomowych w 18 guzach MLPS (82%). Pozostałe cztery guzy (18%) charakteryzowały się prawidłowym profilem genomowym. Dodatkową ilość materiału genetycznego stwierdzono w 12 guzach (5%), podczas gdy utraty w 14 przypadkach (64%). W ośmiu guzach (36%) wykryto jednocześnie duplikacje i delecje różnych chromosomów. W badanym materiale nie zaobserwowano amplifikacji. Aberracje obejmują średnio 3,4% (zakres 0 - 13,3%) profilu genomowego guzów MLPS (ryc. 22). Analiza związku przeprowadzona dla średniego procentowego udziału niezrównoważonych zmian chromosomowych w profilu genomowym guzów MLPS nie wykazała istotnego statystycznie związku z rodzajem oraz lokalizacją guza (test ANOVA rang Kruskala-Wallis).

Rycina 22. Wykres przedstawiający średni procentowy udział nie zrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów MLPS w zależności od A) rodzaju guza oraz B) lokalizacji guza.



Wyniki zbiorcze wszystkich nie zrównoważonych aberracji chromosomowych wykrytych techniką aCGH w grupie 22 guzów MLPS przedstawia ryc. 26 oraz tab. 20 w załączniku 10.2. Najczęstszą stwierdzaną zmianą genomową w grupie wszystkich guzów była delecja fragmentu chromosomu 6 (n=7/22; 32%) oraz częściowa trisomia chromosomu 1 (n=6/22; 27%). Dodatkowo w kilku guzach MLPS wykryto trisomię chromosomu 8 (n=3/22; 14%) i 13 (n=2/22; 9%) oraz utratę fragmentu ramion długich chromosomu 16 (n=2/22; 9%).

Minimalny wspólny region chromosomu 6 obejmował 6q14.1q22.31, wielkości ok. 36 Mpz (83,200,248-119,030,824 nt) - ryc. 23. Region powyższej utraty obejmuje 175 genów, w tym cztery geny z bazy *Cancer Gene Census* (*PRDM1*, *FOXO3*, *ROS1*, *GOPC*). Stwierdzono występowanie statystycznie istotnej zależności między występowaniem utraty chromosomu 6q14.1q22.31 a rodzajem guza (p=0,018; test Fishera). Zmiana ta występowała zdecydowanie częściej w guzach przerzutowych niż w guzach pierwotnych i wznowach (p=0,021 OR=18,67 95% CI [1,5-232,3]). Jednocześnie analiza związku przeprowadzona dla powyższej aberracji nie wykazała istotnego statystycznie związku pomiędzy jej występowaniem a lokalizacją guza (tab. 12).

Rycina 23. Minimalny wspólny region delecji chromosomu 6 w guzach MLPS.**Tabela 12.** Analiza związku pomiędzy występowaniem delecji fragmentu chromosomu 6q14.1q22.31 a rodzajem guza MLPS i jego lokalizacją (test Fishera).

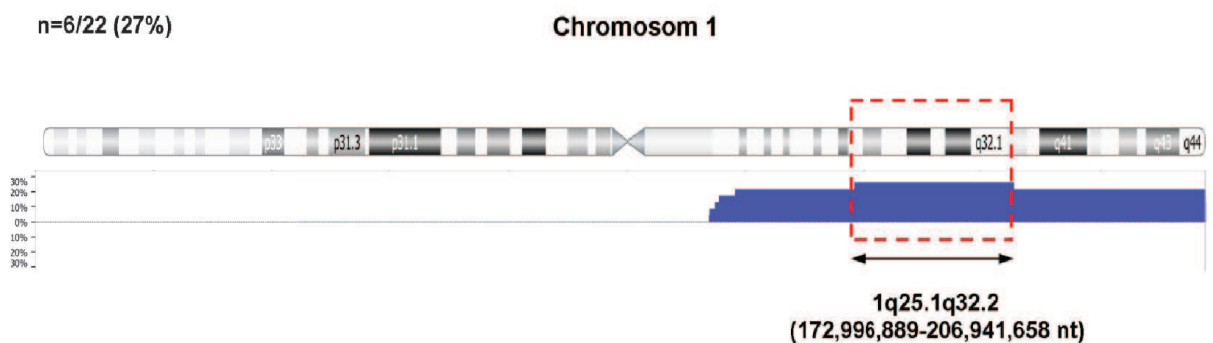
	Obecna aberracja	Brak aberracji	Poziom istotności p
	n (%)	n (%)	p
Rodzaj guza:			0,018
• P	1 (14)	10 (67)	
• R	2 (29)	4 (27)	
• M	4 (57)	1 (6)	
Lokalizacja guza:			0,125
• zaotrzewnowo	3 (43)	1 (6)	
• udo	2 (28,5)	10 (67)	
• inne	2 (28,5)	4 (27)	

* oznaczenia skrótów: P - guz pierwotny, R - wznowa, M - guz przerzutowy

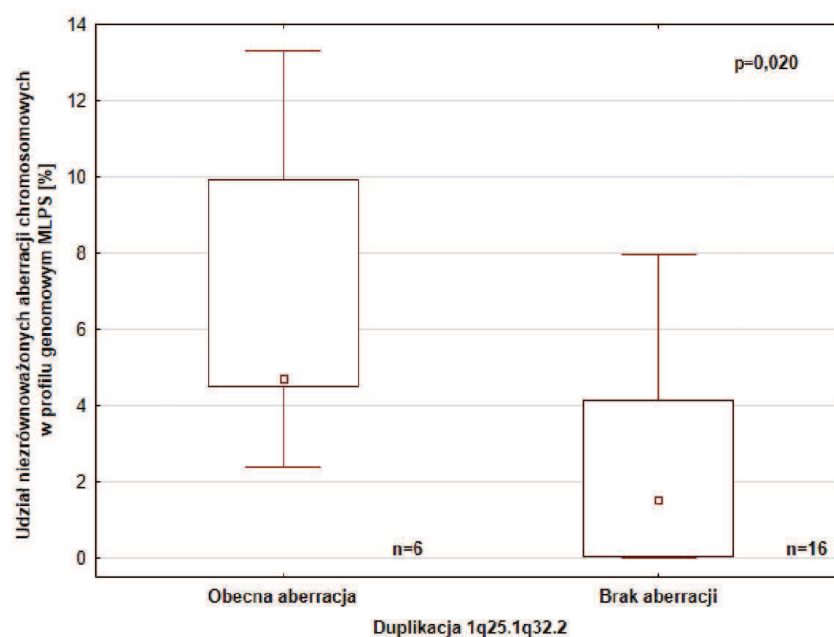
Minimalny wspólny region duplikacji chromosomu 1, zidentyfikowany w sześciu guzach MLPS obejmował fragment wielkości ok. 34 Mbp ramion

długich 1q25.1q32.2 (dokładne punkty pęknięć: 172,996,889-206,941,658 nt) - ryc. 24. W regionie tym zlokalizowanych jest 269 genów, w tym sześć genów z bazy *Cancer Gene Census* (*ABL2*, *TPR*, *CDC73*, *MDM4*, *ELK4*, *SLC45A3*). Analiza związku przeprowadzona dla częściowej trisomii fragmentu chromosomu 1q25.1q32.2 nie wykazała istotnego statystycznie związku pomiędzy jej występowaniem a rodzajem guzów MLPS i ich lokalizacją. Jednakże wykazano, iż aberracja ta występuje statystycznie częściej w guzach, które cechują się złożonym profilem genomowym ($p=0,020$; test U Manna - Whitney'a) – ryc. 25.

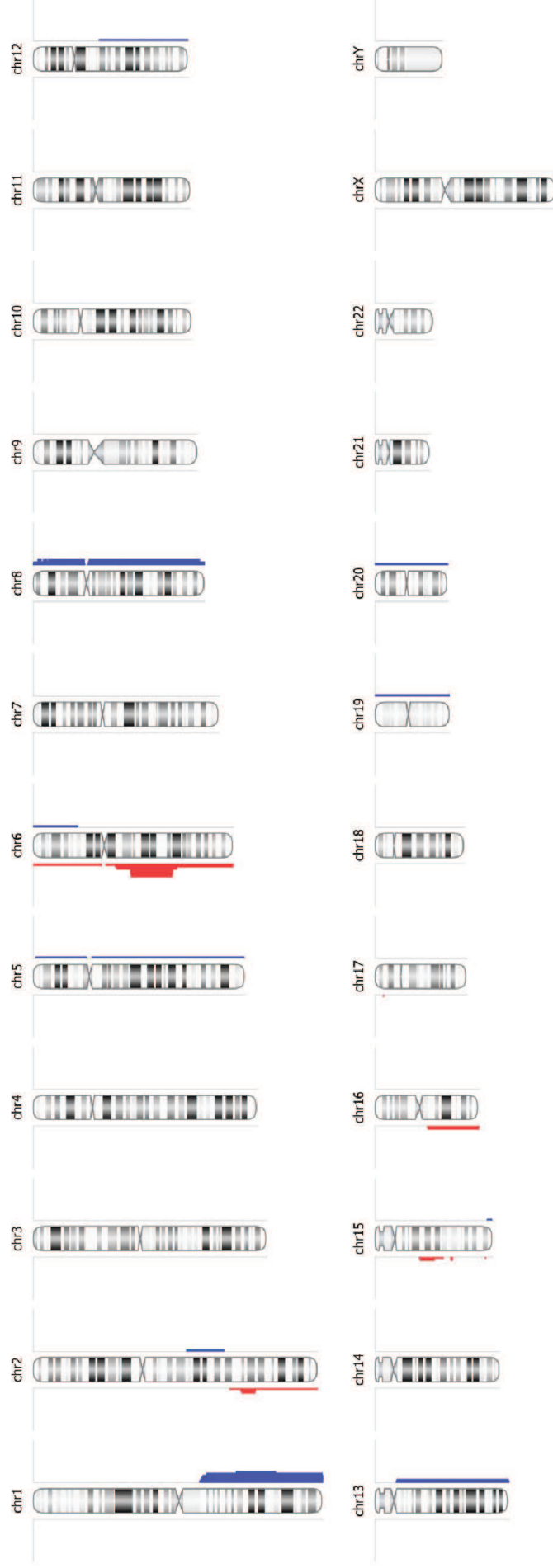
Rycina 24. Minimalny wspólny region duplikacji chromosomu 1 w MLPS.



Rycina 25. Wykres przedstawiający zależność między występowaniem częściowej trisomii chromosomu 1 a stopniem niestabilności chromosomowej guza MLPS.



Rycina 26. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte w grupie 22 guzów MLPS z zastosowaniem techniki aCGH. Po lewej stronie diagramu chromosomu - delecje (kolor czerwony), po prawej stronie - duplikacje (kolor niebieski).



6.2. Ewolucja zmian cytogenetycznych w guzach pierwotnych, wznowach i przerzutach tłuszczakomięsaków, pochodzących od jednego pacjenta w trakcie trwania choroby.

Analiza cytogenetyczna z wykorzystaniem techniki aCGH, mająca na celu prześledzenie ewolucji zmian chromosomowych w guzach pierwotnych, wznowach oraz przerzutach została wykonana w 25 guzach, pochodzących od ośmiu pacjentów. Liczba guzów pochodząca od jednego pacjenta wahała się w granicach od dwóch do pięciu.

6.2.1. Guzy WDLPS

W grupie tłuszczakomięsaków dobrze zróżnicowanych analizowano ewolucję profili genomowych w materiale nowotworowym, pochodzącym od dwóch pacjentów (tab. 13). Od pacjenta nr 15 pobrano na przestrzeni czterech lat tkankę nowotworową z pięciu wznów, zlokalizowanych zaotrzewnowo. Natomiast w przypadku pacjenta nr 16 uzyskano dwa guzy pierwotne również z przestrzeni zaotrzewnowej.

Wspólnymi aberracjami chromosomowymi dla wszystkich guzów, pochodzących od pacjenta nr 15 były: amplifikacja fragmentu ramion krótkich chromosomu 5p15.2p13.2 oraz ramion długich chromosomu 12q13.11q21.1. Dodatkowo w pierwszej, drugiej oraz czwartej wznowie pojawiła się częściowa trisomia chromosomu 6q25.1q25.2. Natomiast wtórna aberracja w postaci duplikacji ramion krótkich chromosomu 19p13.3p13.11 była zmianą charakterystyczną dla guza nr 4 i 5.

Pomimo identycznej lokalizacji guzów pierwotnych, pochodzących od pacjenta nr 16, ich profil genomowy różnił się. Analiza cytogenetyczna, wykonana w odstępie kilku miesięcy między jednym a drugim pobraniem materiału wskazuje, iż wspólnymi wtórnymi zmianami chromosomowymi są: aberracje chromosomu 12 oraz amplifikacje małych fragmentów chromosomu 3 i 17. W drugim guzie pojawiają się dodatkowe zaburzenia genomowe w postaci duplikacji fragmentu chromosomu 8, 13 oraz 19.

Tabela 13. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte techniką aCGH w guzach WDLPS pochodzących od 2 pacjentów.

Numer guza	Rodzaj guza *	Wiek pacjenta **	Delekcje	Duplikacje chromosomu 12 ***	Duplikacje pozostałych chromosomów
15 - 1	R	36	brak	12q13.11, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2	5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 6q25.1q25.2
15 - 2	R	38	brak	12q13.11, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.32, 12q24.32	5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 6q25.1q25.2
15 - 3	R	39	brak	12q13.11, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2	5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 5q14.2, 5q14.3
15 - 4	R	39	brak	12q13.11, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.31, 12q24.32	4p15.33, 5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 6q16.2q16.3, 6q21, 6q22.31q22.32, 6q22.33, 6q23.1, 6q23.2q23.3, 6q23.3q24.2, 6q24.3q25.3, 6q26, 19p13.3p13.1, 19q12
15 - 5	R	40	brak	12q13.11, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2	4p16.3p12, 5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 19p13.3p13.11
16 - 1	P	37	brak	12p13.33p13.31, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.33, 12q21.33q22, 12q22	3p14.1, 3p12.3, 17p13.1, 17p12p11.2
16 - 2	P	37	brak	12p13.33p13.32, 12p3.32, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.33, 12q21.33q22, 12q22	3p14.1, 3p12.3, 8p23.3p23.2, 8p11.21, 8q11.1q12.3, 8q12.3q13.3, 8q13.3, 8q21.11, 8q21.11q21.12, 8q21.12, 8q21.12q21.13, 8q21.13, 8q21.13, 8q21.3, 8q22.1, 13q13.3q14.11, 13q21.33, 13q33.1q33.2, 13q33.3q34, 17p12, 17p12p11, 19q12, 19q13.12q13.2, 19q13.32, 19q13.33q13.43

* oznaczenia skrótów: P - guz pierwotny, R - wznowa, M - guz przerzutowy, ** wiek pacjenta w momencie pobrania materiału , przeznaczony do analizy cytogenetycznej,

*** pogrubioną czcionką zaznaczono amplifikację wybranych fragmentów chromosomów

6.2.2. Guzy DDLPS

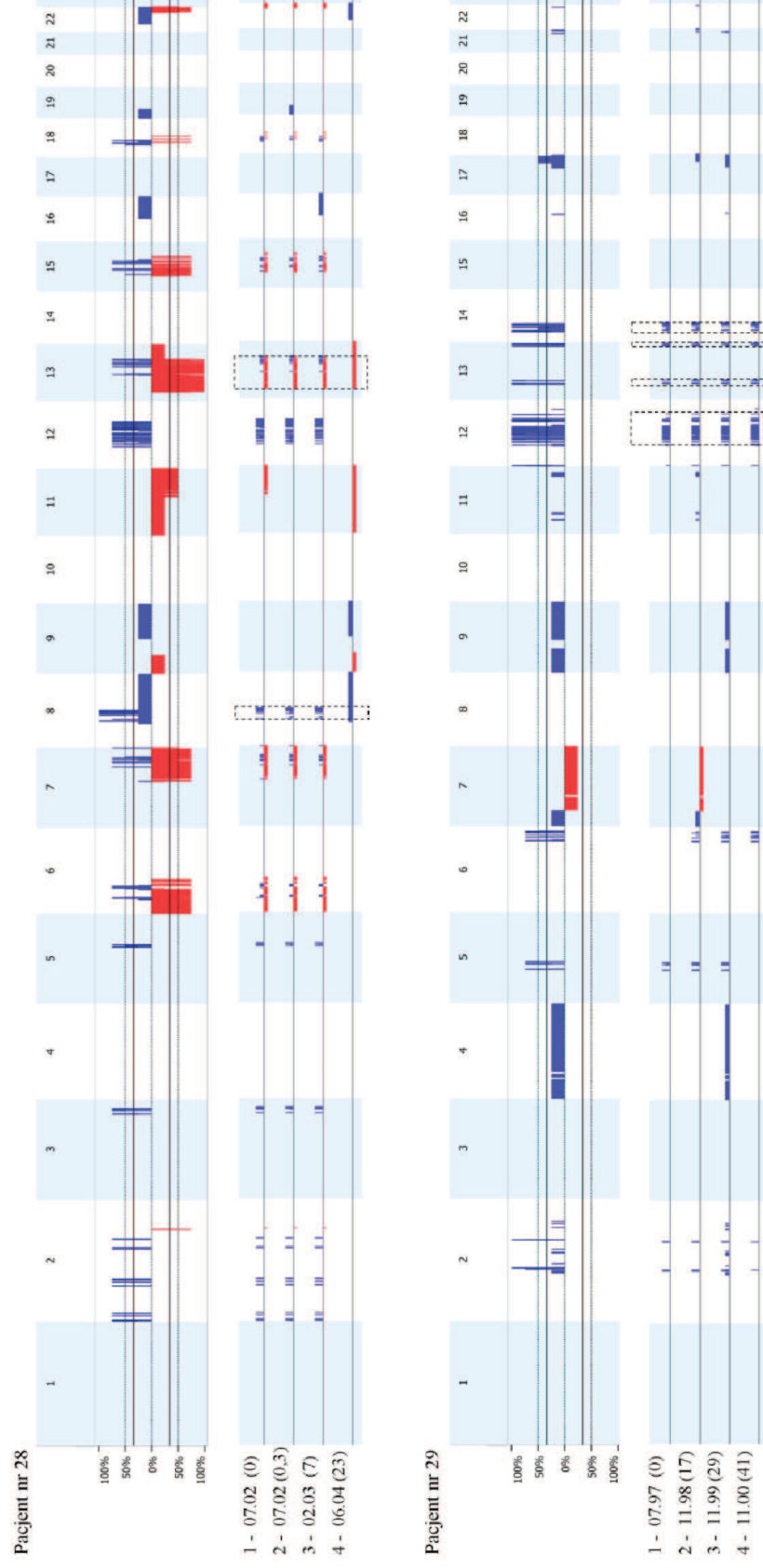
Analiza cytogenetyczna z wykorzystaniem techniki aCGH została przeprowadzona w grupie 12 guzów DDLPS, pochodzących od czterech pacjentów. Od pacjenta nr 28 pobrano cztery wznowy z jamy brzusznej, zaś od pacjenta nr 29 trzy guzy przerzutowe i jedną wznowę, zlokalizowane odpowiednio w jamie brzusznej (dwa przerzuty) oraz w przestrzeni zaotrzewnowej (jeden przerzut i jedna wznowa). U obu pacjentów materiał był pobierany w odstępie dwóch lat od momentu rozpoznania choroby. Ponadto od pacjenta nr 30 uzyskano materiał z dwóch wznów o nietypowych dla guzów DDLPS lokalizacjach: z krezki jelita biodrowego oraz z guza naciekającego na powłoki ciała. W przypadku pacjenta nr 34 analiza cytogenetyczna objęła dwie wznowy, umiejscowione w przestrzeni zaotrzewnowej, które zostały pobrane w odstępie 12 miesięcy.

U pacjenta nr 28 trzy wznowy, które zostały pobrane w pierwszej kolejności na przestrzeni siedmiu miesięcy wykazywały bardzo podobny profil genomowy. Do wspólnych niezrównoważonych aberracji chromosomowych zalicza się: amplifikację fragmentu ramienia długiego chromosomu 12 oraz liczne rearanżacje (duplikacje i/lub delecje) chromosomów 2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 13 i 18 (tab. 14). Natomiast w czwartej wznowie, analizowanej w 23 miesiącu od momentu rozpoznania choroby, stwierdzono występowanie tylko kilku zmian genomowych: częściowej trisomii fragmentu ramienia długiego chromosomu 8, delecji oraz duplikacji chromosomu 9, monosomii chromosomów 11 i 13 oraz trisomii chromosomu 22 (ryc. 27).

Wspólnymi niezrównoważonymi aberracjami chromosomowymi, zidentyfikowanymi we wszystkich guzach, pochodzących od pacjenta nr 29 były: amplifikacje wybranych fragmentów chromosomów 12, 13 i 14. W jednym z guzów przerzutowych (29-3) wykryto trisomię chromosomów 4 oraz 9. Występowanie utrat materiału genetycznego w postaci delecji fragmentu ramion krótkich i długich chromosomu 7 stwierdzono wyłącznie we wznowie (29-2). Wszystkie zmiany genomowe, zidentyfikowane u powyższego pacjenta zostały zaprezentowane w tab. 14 i na ryc. 27.

Rycina 27. Ewolucja nie zrównoważonych aberracji chromosomowych w guzach DDLPS, pochodzących od dwóch pacjentów (nr 28 i 29).

(przy numerze guza podano miesiąc i rok oraz w nawiasie odległość w miesiącach od pobrania pierwszego guza; delekcje zaznaczono na kolor czerwony, duplikacje – na kolor niebieski; linią przerywaną zaznaczono aberracje chromosomowe wspólne dla wszystkich guzów)



29 - 2	R	37	7p15.1p11.1, 7q11.21q36.3	<p>12p13.33, 12q12, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q13.3, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.22, 12q22, 12q23.1, 12q23.3</p>	<p>2q12.1q12.2, 2q24.25q13.1, 5q14.1, 5q14.2q14.3, 6q24.1q24.2, 6q24.3q25.1, 6q25.2, 6q25.3q26, 7p22.3p15.1, 11p14.2p14.1, 11p12, 11q23.2q24.1, 13q12.3, 13q13.1, 13q13.3, 13q33.2, 13q33.3, 13q34, 14q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2, 14q13.3q21.1, 17q24.2q25.3, 21q22.3, 22q13.31</p>
29 - 3	M	37	brak	<p>12p13.33, 12q12, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q13.3, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.22, 12q22, 12q23.1, 12q23.3</p>	<p>2q11.1q11.2, 2q12.1q12.2, 2q13q14.1, 2q21.2q21.3, 2q22.1, 2q22.2, 2q24.2, 2q32.1, 2q32.3, 2q33.1, trisomia 4, 5q13.1, 5q14.1, 5q14.2q14.3, 6q24.1q24.2, 6q24.3q25.1, 6q25.2, 6q25.3q26, trisomia 9, 13q12.3, 13q13.1, 13q13.3, 13q33.2, 13q33.3, 13q3414q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2, 14q13.3q21.1, 16q12.1, 17q24.2q25.3</p>
29 - 4	M	39	brak	<p>12p13.33, 12q12, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q13.3, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.22, 12q22, 12q23.1, 12q23.3</p>	<p>2q12.1q12.2, 2q24.2, 6q24.1q24.2, 6q24.3q25.1, 6q25.2, 6q25.3q26, 13q12.3, 13q13.1, 13q13.3, 13q33.2, 13q33.3, 13q3414q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2, 14q13.3q21.1</p>

30 - 1	R	67	<p>1p32.3, 1p22.2p21.3, 2q23.3q31.1, 2q31.1, 2q31.11q31.2, 2q31.2, 2q31.3, 2q32.1, 2q32.1q32.2, 2q32.2, 2q32.3, 2q33.1, 2q33.2, 2q33.3, 2q33.3q34, 2q34, 2q35, 2q36.3, 2q37.1, 2q37.2, 2q37.3, 3q13.12q13.13, 5p15.33p15.32, 5p15.32, 5p15.31, 5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 5p13.1, 5p12, 6q15q16.1, 6q16.1, 6q16.1q16.2, 6q16.3, 6q16.3q21, 6q21, 6q21q22.1, 6q22.1, 6q22.1q22.31, 6q22.31q22.33, 6q23.1, 6q25.1, 11p15.5p13, 15q13.1q13.3, 15q14q22.31, 15q23q26.3, 16p13.3, 17q25.1, 18p11.32p11.21, 20p13p11.21</p>	<p>12p13.33m 12p13.31, 12p11.23, 12p11.22, 12p11.22p11.21, 12p11.21, 12q12, 12q13.11, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.31q21.32, 12q21.32, 12q21.33, 12q21.33q22, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q23.2q23.3, 12q23.3, 12q24.11</p>	<p>1p13.3, 1p13.3p13.2, 2q31.1, 2q31.2, 2q31.2q31.3, 2q31.3, 2q31.3q32.1, 2q32.1, 2q32.2, 2q32.2q32.3, 2q32.3, 2q32.3q33.1, 2q33.1, 2q33.2, 2q33.3, 2q34, 2q34q35, 2q35, 2q35q36.3, 2q36.3, 2q37.1, 2q37.2, 2q37.3, 5q12.3, 5q14.3, 5q15, 5q15q21.1, 5q21.1, 5q21.2, 5q21.3, 5q22.1, 5q22.2, 5q22.3, 5q22.3q23.1, 5q23.1, 5q23.2, 5q31.1, 5q31.2, 5q31.3, 5q32, 5q33.1q33.2, 5q34q35.3, 6q14.1, 6q15, 6q16.1, 6q16.2, 6q16.2q16.3, 6q16.3, 6q21, 6q22.1, 6q22.31, 6q22.33, 6q23.1q25.1, 9q21.32, 9q21.33, 9q22.2, 9q22.31, 11p13, 11p12, 11p11.2, 13q21.32, 13q21.33, 13q31.3q32.1, 13q32.1, 14q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2q13.3, 14q21.1, 14q21.2, 14q21.3, 14q22.1, 15q11.2, 15q12, 15q14, 15q22.31q23, 17q21.31, 17q23.3q24.2</p>
30 - 2	R	67	<p>2q32.1, 2q32.1q32.2, 2q32.2, 2q32.3, 2q33.1, 2q33.2, 2q33.3, 2q33.3q34, 2q34, 2q35, 2q36.3, 2q37.1, 2q37.2, 2q37.3, 3q13.12q13.13, 5p15.33p15.32, 5p15.32, 5p15.31, 5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 5p13.1, 5p12, 6q15q16.1, 6q16.1, 6q16.1q16.2, 6q16.3, 6q16.3q21, 6q21, 6q21q22.1, 6q22.1, 6q22.1q22.31, 6q22.31q22.33, 6q23.1, 6q25.1, 15q14, 16p13.3, 16q11.2q24.3, 17q25.1, 18p11.32p11.21</p>	<p>12p13.33m 12p13.31, 12p11.23, 12p11.22, 12p11.22p11.21, 12q12, 12q13.11, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.31q21.32, 12q21.32, 12q21.33, 12q21.33q22, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q23.2q23.3, 12q23.3, 12q24.11</p>	<p>2q32.2q32.3, 2q32.3, 2q32.3q33.1, 2q33.1, 2q33.2, 2q33.3, 2q34, 2q34q35, 2q35, 2q35q36.3, 2q36.3, 2q37.1, 2q37.2, 2q37.3, 5q12.3, 5q14.3, 5q15, 5q15q21.1, 5q21.1, 5q21.2, 5q21.3, 5q22.1, 5q22.2, 5q22.3, 5q22.3q23.1, 5q23.1, 5q23.2, 5q31.1, 5q31.2, 5q31.3, 5q32, 5q33.1q33.2, 5q34q35.3, 6q14.1, 6q15, 6q16.1, 6q16.2, 6q16.2q16.3, 6q16.3, 6q21, 6q22.1, 6q22.31, 6q22.33, 6q23.1q25.1, 9q21.32, 9q21.33, 9q22.2, 9q22.31, 13q21.32, 13q21.33, 13q31.3q32.1, 13q32.1, 14q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2q13.3, 14q21.1, 14q21.2, 14q21.3, 14q22.1, 17q21.31, 17q23.3q24.2</p>

34 - 1	R	63	19q12q13.2	12q12, 12q13.11, 12q13.13, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.2q21.32, 12q21.31, 12q21.31q21.32, 12q21.32, 12q21.33, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q23.3	1p36.13, 1p36.12, 1p35.3, 1p34.3, 1p32.3p32.2, 1p32.1, 1p31.3, 3q22.2, 3q22.2q22.3, 3q22.3, 15q26.3, 19p13.2, 20p12.3, 22q13.2
34 - 2	R	64	15q13.1q13.2, 15q13.3q14, 15q14q15.1, 15q24.2q25.2, 16q11.2q24.3, 21q21.2q22.3	12q12, 12q13.11, 12q13.13, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.2q21.32, 12q21.31, 12q21.31q21.32, 12q21.32, 12q21.33, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q23.3	13q31.3, 15q25.3, 17p13.3p11.2, 21q11.2q21.1

* oznaczenia skrótów: P - guz pierwotny, R - wznowa, M - guz przerzutowy, ** wiek pacjenta w momencie pobrania materiału , przeznaczonego do analizy cytogenetycznej, *** pogrubioną czcionką zaznaczono amplifikację wybranych fragmentów chromosomów

Analiza metodami cytogenetyki klasycznej przeprowadzona w dwóch guzach, pobranych od pacjenta nr 30 wykazała, iż ich kariotypy cechowały się obecnością chromosomów pierścieniowych i markerowych (tab. 19 w załączniku 10.2). Badanie profilu genomowego z wykorzystaniem techniki aCGH potwierdziło złożony kariotyp i jednocześnie umożliwiło określenie dokładnych punktów pęknięć zidentyfikowanych zmian chromosomowych (tab. 14). W guzach stwierdzono występowanie licznych aberracji w postaci duplikacji i/lub amplifikacji oraz delecji następujących chromosomów: 1, 2, 3, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18 i 20.

W przypadku pacjenta nr 34, w obu guzach wykazano obecność aberracji chromosomu 12 i 15. Dodatkowo w pierwszej pobranej wznowie pojawia się utrata fragmentu ramion długich chromosomu 19 i dodatkowy materiał z chromosomów 1, 3, 19, 20 i 22. Natomiast w kolejnej wznowie powyższe aberracje zaniknęły, ale pojawiły się delecje fragmentów chromosomu 15, 16 i 17 oraz częściowe trisomie chromosomów 13, 17 i 21.

6.2.3. Guzy MLPS

W grupie tłuszczakomięsaków śluzowatych/ okrągłokomórkowych prześledzono ewolucję profili genomowych guzów od dwóch pacjentów. Analiza obejmowała dwa guzy pierwotne (pacjent nr 39), zlokalizowane odpowiednio w podudzie i ścianie brzucha oraz cztery guzy, pochodzące od pacjenta nr 41 (trzy przerzuty oraz jedna wznowa). U obu pacjentów materiał był pobierany w odstępie dwóch lat od momentu rozpoznania choroby.

W profilu genomowym guzów pierwotnych (pacjent nr 39) stwierdzono występowanie wspólnej aberracji: delecji fragmentu ramion długich chromosomu 15. W drugim guzie dodatkowo wykryto trisomię chromosomu 5.

We wszystkich guzach, pochodzących od pacjenta nr 41 zaobserwowano utratę 6q14.1q22.31. W trzech guzach (dwóch przerzutach i wznowie) pojawiła się dodatkowa zmiana - delecja fragmentu chromosomu 2, natomiast duplikacja chromosomu 1q została wykryta tylko w jednym guzie. W ostatnim guzie przerzutowym, obok aberracji chromosomów 2 i 6

stwierdzono jednoczesne występowanie delecji i duplikacji na chromosomie 15. Zbiorcze wyniki ewolucji nie zrównoważonych zmian cytogenetycznych w guzach MLPS zostały przedstawione w tab. 15.

Tabela 15. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte techniką aCGH w guzach MLPS pochodzących od dwóch pacjentów.

Numer guza	Rodzaj guza *	Wiek pacjenta **	Delecje	Duplikacje
39 - 1	P	60	15q22.31q23	brak
39 - 2	P	62	15q22.31q23	trisomia chr.5
41 - 1	M	44	2q31.1q32.2, 6q14.1q22.31	brak
41 - 2	M	44	6q14.1q22.31	1q21.1q44
41 - 3	R	46	2q31.1q32.2, 6q14.1q22.31	brak
41 - 4	M	46	2q24.3q37.3, 6q14.1q22.31, 15q26.2	2q21.1q24.2, 15q26.2q26.3

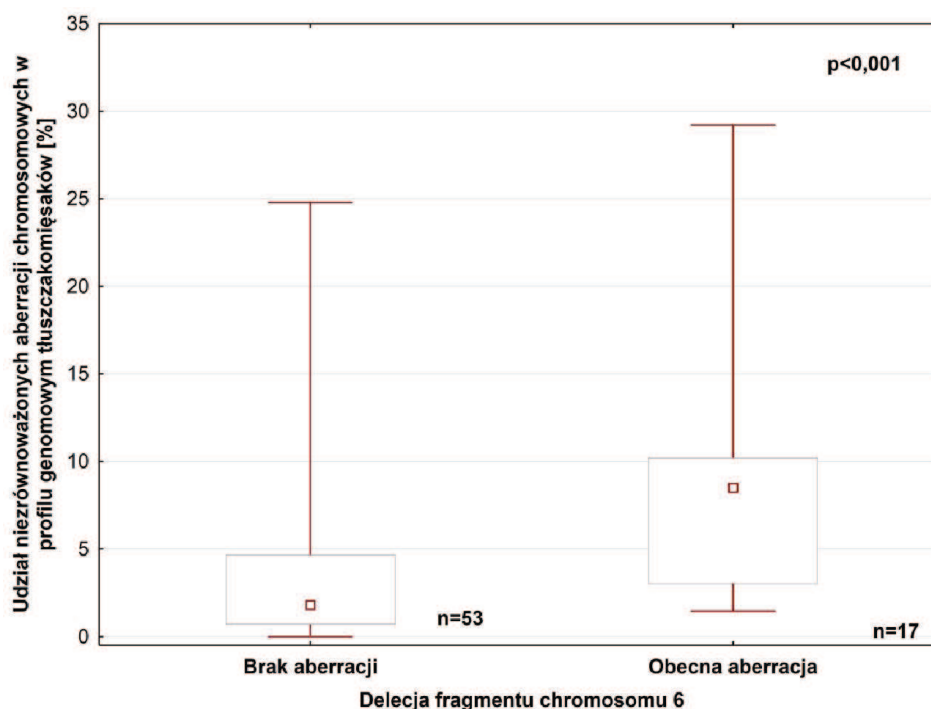
* oznaczenia skrótów: P - guz pierwotny, R - wznowa, M - guz przerzutowy, ** wiek pacjenta w momencie pobrania materiału, przeznaczonego do analizy cytogenetycznej

6.3. Porównanie profili genomowych w trzech podtypach histologicznych tłuszczakomięsaków

Analiza związku pomiędzy występowaniem określonej aberracji chromosomowej we wszystkich tłuszczakomięsakach, niezależnie od podtypu histologicznego a lokalizacją guza nie wykazała zależności istotnej statystycznej. Jednakże istnieje związek znamieny statystycznie między obecnością delecji fragmentu chromosomu 6 oraz duplikacji i/lub amplifikacji chromosomu 5 a rodzajem guza (odpowiednio $p=0,002$ i $p<0,001$; test Fishera). Utrata materiału genetycznego chromosomu 6 jest zmianą charakterystyczną dla wznów oraz guzów przerzutowych ($p=0,001$ OR=9,78 95% CI [2,03-47,13]), natomiast dodatkowe kopie chromosomu 5 występują przede wszystkim we wznowach ($p<0,001$ OR=6,89 95% CI [2,38-19,92]).

Za pomocą testu U Manna-Whitney'a udowodniono także, iż powyższa utrata fragmentu materiału genetycznego z chromosomu 6 jest zmianą genomową, która statystycznie częściej była obserwowana w guzach, cechujących się wysokim stopniem niestabilności chromosomowej ($p < 0,001$). Częstość występowania tej aberracji wynosiła 24% ($n = 17/70$).

Rycina 28. Wykres przedstawiający zależność między występowaniem częściowej utraty fragmentu chromosomu 6 a stopniem niestabilności chromosomowej guzów tłuszczakomięsaków.



7. DYSKUSJA

Tłuszczakomięśaki są niezwykle rzadkimi nowotworami – częstość ich występowania szacuje się na 20% wszystkich mięsaków tkanek miękkich, które stanowią poniżej 1% nowotworów złośliwych człowieka [Coindre i wsp., 2010; Conyers i wsp., 2011]. Dlatego też większość opublikowanych prac stanowią opisy pojedynczych przypadków LPS o nietypowym przebiegu klinicznym lub rzadko spotykanej lokalizacji guza. W literaturze znajdują się nieliczne doniesienia na temat analiz cytogenetycznych guzów LPS z wykorzystaniem techniki mikromacierzy-CGH o dużej rozdzielczości. Dotychczas opublikowano tylko dwie prace, których celem była analiza porównawcza profili genomowych guzów WDLPS i DDLPS w oparciu o metodę aCGH [Tap i wsp., 2011; Crago i wsp., 2012]. W pierwszej z nich Tap i wsp. (2011) zbadali 38 tłuszczakomięsaków (21 guzów WDLPS i 17 DDLPS), używając szkiełek mikromacierzowych o rozdzielczości rzędu 150 kpz (Agilent 105K). Natomiast Crago i wsp. (2012) przedstawili wyniki badań mikromacierzowych (Agilent 244K lub 1M), przeprowadzonych w grupie 107 guzów LPS (WDLPS n=55 oraz DDLPS n=52). Analiza cytogenetyczna z użyciem aCGH w guzach MLPS była przedmiotem badań tylko jednego zespołu, w dodatku obejmowała ona niewielką liczbę guzów (n=10) [Ohguri i wsp., 2006].

Z uwagi na niewielką liczbę danych, dotyczących analiz cytogenetycznych w LPS z wykorzystaniem techniki mikromacierzy-CGH, postanowiono w niniejszej pracy porównać profile genomowe różnych podtypów histologicznych tłuszczakomięsaków z użyciem szkiełek mikromacierzowych o wysokiej rozdzielczości rzędu 10 kpz - *NimbleGen Array 2.1M* (Roche). Dodatkowo, zgodnie z aktualną wiedzą, po raz pierwszy prześledzono ewolucję niechrómalności genomu w guzach pierwotnych i przerzutowych oraz wznowach, pochodzących od tego samego pacjenta na przestrzeni kilku lat trwania choroby. Dotychczas żadna z opublikowanych prac nie prezentowała wyników badań mikromacierzowych o tak dużej rozdzielczości, przeprowadzonych jednocześnie w trzech podtypach histologicznych tłuszczakomięsaków. Identyfikacja aberracji chromosomowych, niewidocznych pod mikroskopem świetlnym pozwoliła na dokładne przeanalizowanie profilu

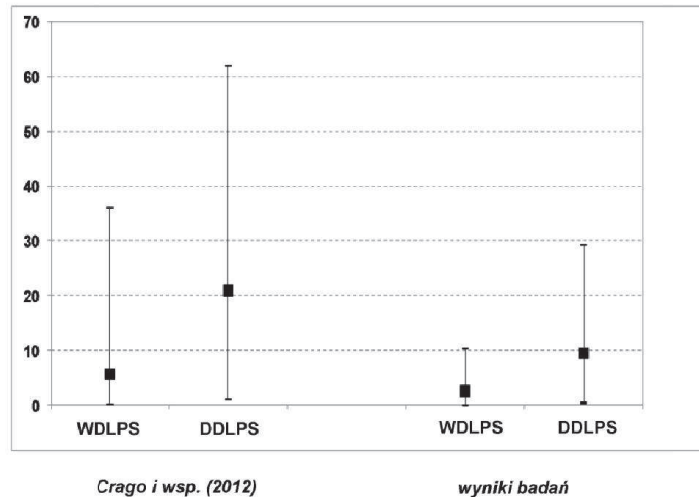
genomowego LPS, a tym samym na bardziej szczegółową charakterystykę biologii tych rzadko występujących guzów.

Porównanie profili genomowych guzów WDLPS i DDLPS

Uważa się, że w 90% przypadków guzy DDLPS powstaje *de novo*. Natomiast 10% guzów DDLPS ewoluuje z WDLPS w trakcie procesu odróżnicowania, czyli utraty fenotypu tkanki tłuszczowej i po wielokrotnych wznowach ulega progresji do guza o wysokim stopniu złośliwości [Dei Tos i wsp., 2013]. Pomimo zaangażowania wielu grup badawczych nie udało się dotychczas ustalić mechanizmu, który mógłby być odpowiedzialny za powyższy proces.

Dotychczas opublikowane prace sugerują, iż stopień niezrównoważenia genomu guzów DDLPS jest zdecydowanie bardziej złożony niż guzów WDLPS [Tap i wsp., 2011; Crago i wsp., 2012]. Crago i wsp. (2012) wykazali, iż średni udział niezrównoważonych aberracji chromosomowych w profil genomowy guzów WDLPS wynosi 5,7% (zakres 0,1 - 36%), zaś guzów DDLPS aż 21% (zakres 1 - 62%). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają powyższe doniesienia literaturowe, iż podtypy histologiczne WDLPS i DDLPS różnią się istotnie statystycznie pod względem liczby niezrównoważonych zmian genomowych w komórkach nowotworowych ($p=0,001$; test U Manna Whitney'a, → *Wyniki str. 66*). Jednakże średni udział niezrównoważonych aberracji w genomie guzów WDLPS i DDLPS, zbadanych w pracy był niższy niż sugeruje Crago i wsp. (ryc. 29), odpowiednio 2,5% (zakres 0 - 10,3%) oraz 9,5% (0,4 - 29,2%).

Rycina 29. Wykres przedstawiający średni procentowy udział nie zrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów WDLPS i DDLPS na podstawie danych literaturowych [Crago i wsp., 2012] oraz wyników badań własnych.



Przyczyną zaobserwowanej różnicy może być lokalizacja guza, która jest istotnym czynnikiem, wpływającym na stopień złożoności genomu. Większość przypadków LPS, zakwalifikowanych do analizy przez Crago i wsp. (2012) umiejscowionych było w przestrzeni zaotrzewnowej i jamie brzusznej (89%), co uważa się za niekorzystny czynnik rokowniczy, gdyż guzy te dużo szybciej ulegają progresji [Coindre i wsp., 2010]. Natomiast w niniejszej pracy tylko 58% guzów WDLPS i 62% DDLPS pochodziło z przestrzeni zaotrzewnowej i jamy brzusznej, zaś pozostałe lokalizacje obejmowały udo oraz inne nietypowe dla guzów LPS umiejscowienie (np. nadgarstek, nerka, guz palca II ręki i inne). Wykazano również, iż utraty materiału genetycznego obserwowane są statystycznie częściej w guzach DDLPS niż WDLPS ($p < 0,001$ OR=11,4 95%CI [2,95 - 44] → *Wyniki str. 66*), co potwierdza doniesienia literaturowe [Tap i wsp., 2011].

Charakterystyczną cechą cytogenetyczną guzów WDLPS i DDLPS jest obecność chromosomów pierścieniowych, markerowych i/lub malutkich chromosomów dmin (*double minute chromosomes*). Wyniki badań molekularnych wskazują, iż chromosomy te składają się z amplifikowanego regionu chromosomu 12q13-15. Region ten zawiera *loci* kilkunastu

protoonkogenów (m.in. *MDM2*, *CDK4*, *HMGA2*, *TSPAN31*, *OS9*, *GLI1*), które na skutek amplifikacji ulegają aktywacji do onkogenów [Pedeutour i wsp., 1999]. W niniejszej pracy aberracje chromosomu 12 zidentyfikowano w 91,7% guzów WDLPS i DDLPS (n=44/48), co stanowi najczęstszą zmianę genomową, zidentyfikowaną w powyższych podtypach histologicznych LPS, a minimalny wspólny region obejmował 12q14.1q21.1. W uzyskanych wynikach badań zaobserwowano amplifikację genów *MDM2* oraz *CDK4* z częstością występowania porównywalną do danych literaturowych (89,6% vs. 85-100%) [Coindre i wsp., 2010; Conyers i wsp., 2011; Tap i wsp., 2011; Crago i wsp., 2012]. Uważa się, że pacjenci z guzami WDLPS lub DDLPS, w których stwierdza się amplifikację genu *MDM2* oraz prawidłową liczbę kopii genu *CDK4* mają lepsze rokowania i niższe ryzyko nawrotu choroby. Guzy te najczęściej umiejscawiają się w tkankach miękkich kończyn, co zdecydowanie ułatwia przeprowadzenie radykalnego leczenia operacyjnego [Italiano i wsp., 2009]. Lee i wsp. (2014) również wykazali, iż brak zwielokrotnienia genu *CDK4* w guzach WDLPS, zlokalizowanych w obrębie jamy brzusznej jest korzystnym czynnikiem rokowniczym. Ponadto udowodniono, iż liczba kopii genu *CDK4* ma znaczenie kliniczne: wysoki poziom amplifikacji tego genu jest skorelowany z krótkim czasem przeżycia [Lee i wsp., 2014]. Wyniki badań niniejszej pracy nie wykazały różnic w częstości występowania amplifikacji genów *MDM2* oraz *CDK4* w guzach WDLPS i DDLPS. We wszystkich przypadkach, w których obecna była amplifikacja genu *MDM2*, zidentyfikowano jednocześnie zwiększoną liczbę kopii genu *CDK4*. Trzecim genem z amplikonu 12q13q15, którego amplifikację rozpoznaje się w tłuszczakomięsakach jest gen *HMGA2*. W analizowanej grupie guzów WDLPS i DDLPS wykazano, iż częstość zwielokrotnienia tego genu szacuje się na 85%, co pokrywa się z danymi literaturowymi [Wang X. i wsp., 2011; Tap i wsp., 2011]. Rearanżacje genu *HMGA2* są spotykane również w tłuszczakach, m.in. pod postacią genu fuzyjnego z różnymi partnerami genowymi (najczęściej z genem *LPP*, zlokalizowanym w 3q27q28) [Fedele i wsp., 2001]. Dotychczas rola genu *HMGA2* w patogenezie tłuszczakomięsaków nie została w pełni poznana [Persson i wsp., 2008]. Częstości amplifikacji genów *CDK4*, *MDM2* oraz *HMGA2* w guzach WDLPS i DDLPS zostały zaprezentowane w tab. 16 na podstawie cytowanych publikacji oraz wyników niniejszej rozprawy.

Tabela 16. Częstość amplifikacji genów *CDK4*, *MDM2* oraz *HMGA2* w guzach WDLPS i DDLPS na podstawie danych literaturowych oraz wyników badań własnych.

	Amplifikacja genów (%) w guzach WDLPS i DDLPS		
	<i>MDM2</i>	<i>CDK4</i>	<i>HMGA2</i>
<i>Crago i wsp. (2012)</i>	87	95	76
<i>Tap i wsp. (2011)</i>	97	93	94
<i>Wang X. i wsp. (2011)</i>	> 90	69	88
<i>Conyers i wsp. (2011)</i>	100	90	Bd
<i>Coindre i wsp. (2010)</i>	100	90	90
<i>Wyniki badań własnych</i>	90	90	85

Wyniki najnowszych badań cytogenetycznych sugerują, iż w proces transformacji nowotworowej tłuszczakomięsaków dobrze zróżnicowanych oraz odróżnicowanych mogą być zaangażowane inne geny amplikonu 12q13-15 niż opisane powyżej. Wang X. i wsp. (2011) stwierdzili, iż w guzach WDLPS i DDLPS, oprócz znanych dotychczas genów (*MDM2*, *CDK4* i *HMGA2*) obecna jest również amplifikacja genu *FRS2* (*fibroblast growth factor receptor substrate 2*), zlokalizowanego w chromosomie 12q15. Uważa się, że nadmierna ekspresja tego białka, która jest obecna w wielu nowotworach, m.in. w raku piersi, żołądka, prostaty, pęcherza moczowego lub jelita grubego może być związana z procesami angiogenezy oraz przerzutowania [Zhang i wsp., 2013]. Badania, przeprowadzone z wykorzystaniem techniki mikromacierzy typu SNP o rozdzielczości 5 kbp oraz FISH wykazały, iż częstość zwielokrotnienia genu *FRS2* w guzach WDLPS i DDLPS wynosi 100% (n=57) [Wang X. i wsp., 2011]. Natomiast autorzy innej publikacji sugerują, iż amplifikacja tego genu jest obecna w 93% guzów DDLPS (n=14/15) oraz w 100% przypadków nieodróżnicowanego mięsaka pleomorficznego o wysokim stopniu złośliwości (UHGPS, *undifferentiated high-grade pleomorphic sarcoma*) [Zhang i wsp., 2013]. W niniejszej pracy amplifikację genu *FRS2* zaobserwowano w 87,5% guzów WDLPS (n=21/24) oraz w 79% przypadków DDLPS (n=19/24). Nie stwierdzono różnic znamiennych statystycznie pomiędzy częstością występowania amplifikacji genu a rodzajem guza i jego lokalizacją.

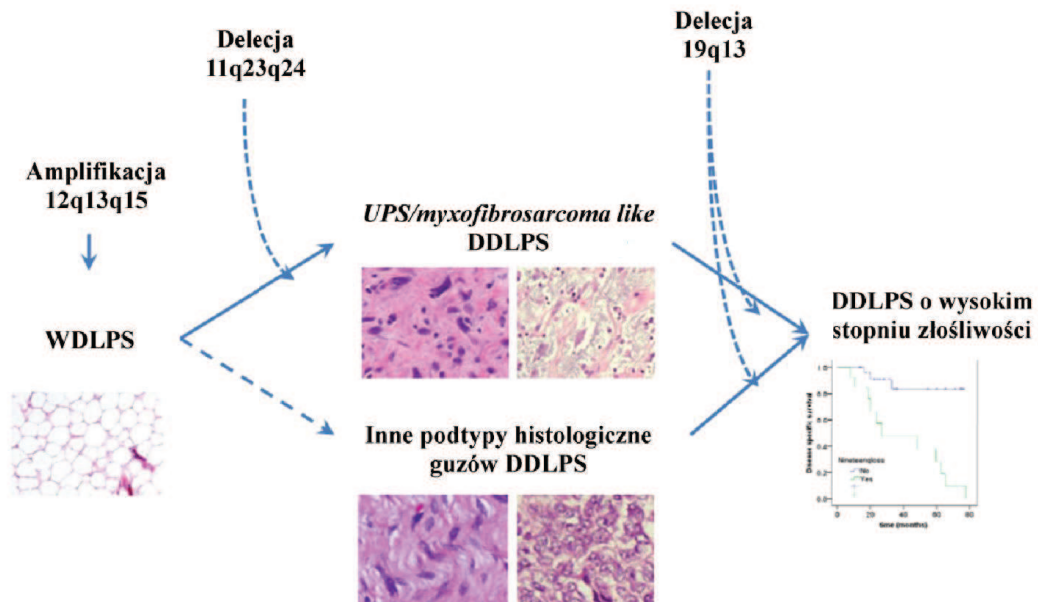
Kolejnym genem z regionu 12q13-15, którego amplifikację obserwuje się w tłuszczakomięsakach jest gen *CPM* (12q15). Gen *CPM* (*carboxypeptidase precursor M*), który zlokalizowany jest bardzo blisko genu *MDM2* i koduje proteazę cynkozależną, która bierze udział w wielu fizjologicznych procesach, np. w różnicowaniu tkanki tłuszczowej. Nadmierną ekspresję tego białka obserwuje się m.in. w jasnokomórkowym raku jajnika, gruczołowym raku płuca, a także w mięsakach tkanek miękkich [Denis i wsp., 2013]. Erickson-Johnson i wsp. (2009) wykazali, iż gen *CPM* jest amplifikowany w guzach WDLPS z częstością 100%, natomiast w tłuszczakach oraz tłuszczakomięsakach MLPS i PLPS obecna jest prawidłowa liczba kopii genu. Powyższe badania zostały przeprowadzone tylko w grupie pacjentów z rozpoznaniem WDLPS (n=17). Na podstawie wyników badań uzyskanych w niniejszej pracy szacuje się, iż częstość amplifikacji genu *CPM* jest niższa niż sugerują autorzy powyższej publikacji. W grupie 48 guzów WDLPS i DDLPS koamplifikację genów *CPM* i *MDM2* zaobserwowano jedynie w 41 przypadkach (85%). Innym genem, którego nadmierną ekspresję wykazano w guzach WDLPS i DDLPS jest gen *HOXC13*. Uważa się, że wzrost ekspresji białka związany jest z amplifikacją tego genu, której częstość szacuje się na 73% w guzach WDLPS i 50% w DDLPS [Cantile i wsp., 2013]. W niniejszej pracy nie zidentyfikowano żadnych zmian liczby kopii genu *HOXC13* w guzach WDLPS i DDLPS.

Dotychczas opublikowano tylko dwie prace, przedstawiające wyniki badań cytogenetycznych guzów WDLPS i DDLPS z wykorzystaniem mikromacierzy-CGH o wysokiej rozdzielczości [Tap i wsp., 2011; Crago i wsp., 2012]. Tap i wsp. (2011) wykazali, iż do najczęstszych niezrównoważonych aberracji chromosomowych w guzach WDLPS i DDLPS, oprócz rearanżacji chromosomu 12q należą: amplifikacje chromosomu 1q21q24, 1p32.2 oraz 6q23q24. Dodatkowy materiał genetyczny chromosomu 1q21q24 stwierdzono w 43% przypadków WDLPS (n=9/21) oraz w 47% DDLPS (n=8/17), zaś chromosomu 6q23q24 w 24% guzach LPS. Analogicznie, w niniejszej pracy również wykazano obecność powyższych zmian genomowych, aczkolwiek ich częstości były dużo niższe. Amplifikacja chromosomu 1q21q24 występowała w 12,5% guzów WDLPS (n=3/24) oraz w 17% przypadków DDLPS (n=4/24). Natomiast aberracje chromosomu 6q23q24 zidentyfikowano tylko w jednym

guzie WDLPS i w trzech guzach DDLPS. Ponadto Tap i wsp. (2011) sugerują, iż zmianą genomową, która nie jest obecna w genomie WDLPS, ale występuje w guzach DDLPS z częstością 24% (n=4/17) jest amplifikacja 1p32.2. W obrębie tej aberracji zlokalizowany jest protoonkogen *JUN*, który na skutek amplifikacji ulega aktywacji do onkogenu i może mieć znaczenie w procesie progresji WDLPS do DDLPS. Crago i wsp. (2012) potwierdzili, iż częstość amplifikacji 1p32.2 szacuje się na 28% w guzach DDLPS (n=15/52), aczkolwiek jest ona również obecna w 9% przypadków WDLPS (n=5/55). W niniejszej pracy stwierdzono występowanie amplifikacji genu *JUN* tylko w jednym guzie DDLPS, zaś w guzach WDLPS powyższa aberracja nie została wykryta.

Na podstawie analizy liczby kopii chromosomów Crago i wsp. (2012) zaproponowali model transformacji nowotworowej tłuszczakomięsaków WDLPS oraz ich progresji do guzów DDLPS (ryc. 30). Autorzy pracy sugerują, że amplifikacja chromosomu 12q13q15 inicjuje proces kancerogenezy WDLPS, a delecja 11q23q24 jest skorelowana z określoną histologią guza, a mianowicie występuje w DDLPS o morfologii przypominającej włókniakomięsaka śluzowatego (*myxofibrosarcoma-like DDLPS*). Szacuje się, iż częstość delecji chromosomu 11q23q24 wynosi 42% w DDLPS i 4% w WDLPS. Ponadto stwierdzili, iż aberracja ta pojawia się w materiale nowotworowym, który cechuje się dużą niestabilnością genomową. Wyniki uzyskane w rozprawie potwierdzają powyższe doniesienia. Częściowa utrata chromosomu 11 została wykryta w 17% guzów DDLPS (n=4/24) oraz w 4% przypadków WDLPS (n=1/24). Wykazano także występowanie zależności pomiędzy obecnością powyższej aberracji w guzie a stopniem złożoności jego profilu genomowego ($p=0,01$; test U Manna Whitney'a → *Wyniki str. 69*). Crago i wsp. (2012) zaobserwowali również, iż utrata fragmentu chromosomu 19q13 jest niezależnym niekorzystnym markerem prognostycznym, którego obecność jest identyfikowana w guzach o agresywnym przebiegu klinicznym. Uważa się, że utrata chromosomu 19q13 jest obecna wyłącznie w guzach DDLPS (32% przypadków). W niniejszej pracy nie wykryto delecji 19q13 w guzach DDLPS, natomiast zidentyfikowano powyższą aberrację w jednym guzie pierwotnym WDLPS.

Rycina 30. Model transformacji nowotworowej guzów WDLPS oraz ich progresji do DDLPS na podstawie analizy liczby kopii chromosomów (schemat wg Crago i wsp., 2012).



W niniejszej pracy wykazano, że najczęstszymi niezrównoważonymi aberracjami chromosomowymi wykrywanymi w guzach WDLPS, oprócz rearanżacji chromosomu 12q były częściowa trisomia ramion krótkich chromosomu 5 (42%) oraz chromosomu 19 (25%). Duplikacja 5p obserwowana jest w wielu nowotworach, m.in. w tłuszczakomięśaku pleomorficznym, mięsaku kościopochodnym, MFH, złośliwym nowotworze osłonek nerwów obwodowych, mięśniakomięśaku gładkokomórkowym, raku płuc oraz płaskonabłonkowym raku głowy i szyi [Knuutila i wsp., 1998; Rieker i wsp., 2002]. Uważa się także, że aberracja ta jest związana z progresją guzów stromalnych przewodu pokarmowego, gdyż jej obecność stwierdzono wyłącznie w guzach przerzutowych [El-rifai i wsp., 2000]. Rieker i wsp. (2002) potwierdzili korelację pomiędzy występowaniem częściowej trisomii chromosomu 5p a zwiększonym stopniem złośliwości guza. W niniejszej pracy wykazano, iż zmiana ta jest charakterystyczna dla wznów WDLPS ($p=0,002$ OR=30,3 95% CI [2,64 - 348,93] → *Wyniki str.* 63). Częstość tej aberracji we wznowach była prawie 5-krotnie wyższa niż w guzach pierwotnych (87,5% vs. 19%). Kolejną niezrównoważoną zmianą genomową, obserwowaną w co czwartym WDLPS była duplikacja ramion krótkich chromosomu 19. Powyższa aberracja

występowała statystycznie częściej w guzach, które cechowały się dużą niestabilnością genomową ($p=0,006$; test u Manna-Whitney'a → *Wyniki str. 63*). Ozaki i wsp. (2002) stwierdzili, iż obecność częściowej trisomii 19p w komórkach nowotworowych mięsaka kościopochodnego związana jest z gorszą odpowiedzią pacjenta na leczenie chemioterapią ($p<0,001$). Ze względu na brak dostępności odpowiednich danych klinicznych, analiza statystyczna powyższej korelacji w guzach WDLPS nie została przeprowadzona.

W przeciwieństwie do WDLPS, w guzach DDLPS statystycznie częściej występują m.in. delecje fragmentów chromosomów 13 i 15 (odpowiednio $p=0,024$ i $p=0,049$ → *Wyniki str. 70*). Utrata materiału genetycznego chromosomu 13q jest często obserwowana w nowotworach tj. w nowotworach hematologicznych (w przewlekłej białaczce limfocytowej, szpiczaku mnogim, ostrej białaczce limfoblastycznej), w raku prostaty, jajnika, piersi oraz w niedrobnokomórkowym raku płuc [Nupponen i Visakorpi, 2000; Zojer i wsp., 2000; Zhang i wsp., 2006; Bandi i wsp., 2009; Moorman i wsp., 2010; Palamarchuk i wsp., 2010]. W chromosomie 13 zlokalizowanych jest m.in. kilka ważnych genów supresorowych, które pełnią istotną rolę w procesach transformacji nowotworowej. Bonci i wsp. (2008) wykazali, iż wraz z delecją chromosomu 13q14 w guzie prostaty dochodzi do utraty funkcji genów *mir-15a* oraz *miR-16-1*, których obniżony poziom ekspresji skorelowany jest z progresją choroby. Ponadto udowodniono, iż obecność powyższej zmiany genomowej w komórkach szpiczaka mnogiego jest związana z gorszą odpowiedzią pacjenta na leczenie talidomidem [Biran i wsp., 2013]. Występowanie aberracji chromosomu 13 również zostało zaobserwowane w nowotworach, wywodzących się z tkanki tłuszczowej. Dane literaturowe wskazują, że utrata chromosomu 13 jest obecna w ok. 16% tłuszczaków (*lipomas*), z kolei w tłuszczakach z komórek wrzecionowatych (SCL; *spindle cell lipomas*) częstość tej zmiany szacuje się na ~100% [Dahlen i wsp., 2003; Bartuma i wsp., 2011]. Dahlen i wsp. (2003) stwierdzili, że minimalny wspólny region utraty chromosomu 13 w tłuszczakach był region 13q12q22, zaś analiza parametrów klinicznych wraz z wynikami FISH wykazała, iż delecja prążka 13q14 może być związana z patogenezą tej grupy nowotworów. Bartuma i wsp.

(2011) określili precyzyjnie punkty pęknięć powyższej aberracji: 13q14.2(47,883,000-48,187,000) oraz 13q14.2q14.3(48,430,000-52,065,000). Wyznaczony w niniejszej pracy minimalny wspólny region utraty chromosomu 13q pokrywa się z danymi literaturowymi - 13q11q31.1(18,664,422-83,656,346). Częstość tej aberracji jest zdecydowanie wyższa w guzach DDLPS niż w WDLPS ($p=0,024$ OR=9,47 95% CI [1,06-84,38] → *Wyniki str. 70*). Najważniejszym genem supresorowym, zlokalizowanym w obrębie delecji chromosomu 13q jest gen *RB1* (*retinoblastoma 1*). Pomimo, iż w literaturze można znaleźć opisy pacjentów z rozpoznaniem siatkówczakiem złośliwym, u których rozpoznano nowotwory, wywodzące się z tkanki tłuszczowej, dotychczas nie udało się ustalić roli genu *RB1* w procesie ich powstawania i różnicowania [Li i wsp., 1997; Genuardi i wsp., 2001]. Bartuma i wsp. (2011) wykazali, że poziom ekspresji genu *RB1* w komórkach SCL jest znacznie obniżony w porównaniu do grupy kontrolnej oraz do tłuszczaków bez delecji 13q w guzie. Natomiast analiza statystyczna wyników badań FISH wraz z wybranymi parametrami klinicznymi sugeruje, iż w patogenezę nowotworów, wywodzących się z tkanki tłuszczowej mogą być zaangażowane inne geny, zlokalizowane w pobliżu genu *RB1*, np. *RFP2*, *BCMS* lub *BCMSUN*, których rola została potwierdzona w rozwoju przewlekłej białaczki limfatycznej z limfocytów B [Mertens i wsp., 2002; Dahlen i wsp., 2003].

Kolejną niezrównoważoną aberracją chromosomową, charakterystyczną dla DDLPS jest delecja fragmentu chromosomu 15. Zmiana ta została zidentyfikowana ponad 6-krotnie częściej w guzach DDLPS, w porównaniu do WDLPS ($p=0,049$ OR=7,67 95% CI [0,85-69,54] → *Wyniki str. 70*). Wykazano występowanie związku między obecnością aberracji w guzie a typem zmiany ($p=0,011$; test Fishera → *Wyniki str. 67*). Wyniki badań wskazują, iż utrata fragmentu chromosomu 15 pojawia się wyłącznie we wznowach. Nie wykryto jej w żadnym guzie pierwotnym, dlatego też wydaje się, iż delecja chromosomu 15q w komórkach DDLPS może być związana z progresją choroby. W literaturze można znaleźć wiele publikacji na temat utraty chromosomu 15 w nowotworach hematologicznych, m.in. w ostrej białaczce szpikowej oraz limfoblastycznej. Aberracja ta współwystępuje z innymi wtórnymi zmianami genomowymi, pojawiającymi się w kariotypie wraz

z progresją choroby. Bardzo rzadko stwierdza się obecność delecji chromosomu 15q jako pojedynczego niezrównoważenia genomu [Lu i wsp., 2009]. Aberracja ta jest także wykrywana w raku płuc, jelita grubego, pęcherza moczowego oraz w niektórych mięśniakach (m.in. w guzach podścieliska przewodu pokarmowego) [Kee i wsp., 2003; Natrajan i wsp., 2003; Sheffer i wsp., 2009; Ul-Hassan i wsp., 2009]. Udowodniono, iż występowanie delecji chromosomu 15q jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym i może być związane zarówno z większą złośliwością guza [Chen i wsp., 2008], jak i z krótszym czasem przeżycia pacjenta [Scheffer i wsp., 2009]. Oprócz delecji fragmentów chromosomów 13q i 15q, do niezrównoważonych aberracji chromosomowych, statystycznie częściej występujących w guzach DDLPS, w porównaniu do WDLPS zaliczono: utratę fragmentów chromosomów 6 oraz 11, a także częściową duplikację i/lub amplifikację chromosomu 14 oraz rearanżację chromosomu 8. Ponadto wykazano, iż niektóre zmiany genomowe (aberracje chromosomów 8 i 9, delecja chromosomu 11q oraz 13q) są charakterystyczne dla guzów, cechujących się dużą niestabilnością chromosomową, która pojawia się wraz z progresją choroby.

Analiza profili genomowych guzów MLPS

W literaturze znajdują się nieliczne prace, oceniające stopień niezrównoważenia genomu komórek nowotworowych MLPS. Ohguri i wsp. (2006) przebadali cytogenetycznie, z wykorzystaniem techniki mikromacierzy typu BAC 10 guzów tłuszczakomięśniaków śluzowato/okrągłokomórkowych oraz osiem przypadków *myxofibrosarcomas*. W mikromacierzach typu BAC, w porównaniu do klasycznej metody CGH stosuje się klony bakteryjne zamiast chromosomów metafazalnych, co pozwala na zwiększenie rozdzielczości analizy. Szacuje się, że rozdzielczość mikromacierzy typu BAC wynosi < 1Mpz, aczkolwiek jest ona uzależniona od liczby klonów oraz od odległości między nimi w genomie [Szczaluba i wsp., 2010]. W powyższej pracy zastosowano szkiełka z 1440 nadrukowanymi sondami typu BAC, które obejmowały sekwencje 356 genów, potencjalnie zaangażowanych w procesy transformacji nowotworowej. Ohguri i wsp. (2006) stwierdzili występowanie

niezrównoważonych aberracji chromosomowych tylko w trzech guzach MLPS (30%). W dwóch przypadkach (w guzie pierwotnym oraz we wznowie) zaobserwowali częściową trisomię chromosomu 8 (8p21.2p23.3, 8q11.22q12.2 oraz 8q23.1q24.3). Natomiast w jednym guzie wykazano obecność dodatkowego materiału genetycznego, pochodzącego z ramion krótkich i długich chromosomu 5 (5p13.2p14.3 oraz 5q11.2q35.2) oraz delecję fragmentu chromosomu 21q22.2qter. Nie stwierdzono występowania amplifikacji w badanych guzach MLPS. Pozostałe prace, analizujące profil genomowy guzów MLPS, przedstawiają wyniki badań cytogenetycznych z użyciem techniki klasycznego CGH. Zarówno Schmidt i wsp. (2005), jak i Parente i wsp. (1999) uzyskali zbliżoną częstość występowania niezrównoważonych aberracji chromosomowych w MLPS, odpowiednio 47% (n=8/17) oraz 36% (n=4/11). W niniejszych badaniach obecność wtórnych niezrównoważonych zmian genomowych stwierdza się aż w 82% przypadków MLPS (n=18/22). Przyczyną uzyskanych różnic w częstości może być niska rozdzielczość techniki klasycznego CGH (> 5 Mbp) oraz mikromacierzy typu BAC w porównaniu do zastosowanej w pracy metody mikromacierzy-CGH (~10 kbp). Uważa się, iż najczęściej wykrywaną aberracją w guzach MLPS jest trisomia fragmentu lub całego chromosomu 8 [Szymanska i wsp., 1996; Parente i wsp., 1999]. Ponadto Schmidt i wsp. (2005) wykazali, iż obecność dodatkowych kopii ramion długich chromosomu 13 (13q21q31 oraz 13q32) w komórkach nowotworowych MLPS jest złym czynnikiem prognostycznym, związanym z wyższym stopniem zaawansowania choroby. Wyniki badań, uzyskanych w niniejszej pracy nie potwierdzają powyższych doniesień. W analizowanej grupie guzów MLPS, najczęstszą stwierdzaną zmianą genomową była delecja fragmentu chromosomu 6 (n=7/22; 32%) oraz częściowa trisomia chromosomu 1 (n=6/22; 27%). Natomiast aberracje w obrębie chromosomów 8 i 13 zostały wykryte jedynie w kilku guzach, odpowiednio w 14% (n=3/22) oraz w 9% (n=2/22) przypadków. Ponadto podobnie jak w opublikowanych dotychczas pracach, w badanej grupie nie zidentyfikowano występowania amplifikacji.

Utrata chromosomu 6 jest spotykana w wielu nowotworach, przede wszystkim w nowotworach hematologicznych (np. w białaczce

limfoblastycznej z komórek T), ale także w guzach prostaty, raku jajnika czy też w jasnokomórkowym nerki [Morita i wsp., 1991; Dafou i wsp., 2009; Lopez-Nieva i wsp., 2012; Kluth i wsp., 2013]. Występowanie delecji powyższego chromosomu zostało również opisane w mięsakach tkanek miękkich i kości, a mianowicie we włókniaku typu *chondromyxoid* oraz w tłuszczakomięsaku śluzowato-okrągłokomórkowym [Altungoz i wsp., 1995; Romeo i wsp., 2010]. Altungoz i wsp. stwierdzili, iż w trzech guzach MLPS, oprócz pierwotnej translokacji t(12;16) obecna była utrata chromosomu 6q12q22, która może być związana z progresją choroby, a także ze zwiększoną zdolnością guza do przerzutowania. Podobne obserwacje opublikował Frigere i wsp. (1991) sugerując jednocześnie, iż w obrębie aberracji mogą być zlokalizowane geny supresorowe, których utrata funkcji prowadzi do dalszego wzrostu komórek nowotworowych. W niniejszej pracy potwierdzono, iż minimalny wspólny region delecji, wykryty w guzach MLPS (6q14.1q22.31) jest bardzo podobny do opisywanego w literaturze i obejmuje aż 175 genów (→ *Wyniki ryc. 23 na str. 76*). Dodatkowo wykazano, iż istnieje zależność pomiędzy występowaniem tej aberracji a rodzajem guza ($p=0,018$, test Fishera → *Wyniki str. 75*). Zmiana ta występowała zdecydowanie częściej w guzach przerzutowych niż w guzach pierwotnych i wznowach ($p=0,021$ OR=18,67 95% CI [1,5-232,3] → *Wyniki str. 75*), co może potwierdzać wcześniejsze hipotezy badawcze. W grupie genów, których funkcja zostaje utracona na skutek delecji znajdują się cztery geny z bazy *Cancer Gene Census* (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/census/>) - *PRDM1*, *FOXO3*, *ROS1*, *GOPC*. Najnowsze publikacje dowodzą, iż geny *PRDM1* (6q21) i *FOXO3* (6q21) należą do genów supresorowych, które są zaangażowane w patogenezę nowotworów z komórek NK (*natural killer - cells neoplasms*) [Karube i wsp., 2011; Kucuk i wsp., 2011]. Zgodnie z założeniem hipotezy Knudsona, aby doszło do utraty funkcji genu supresorowego musi dojść do uszkodzenia dwóch kopii genu na obu allelach. Kucuk i wsp. (2011) wykazali, iż jedna kopia genu *PRDM1* zostaje utracona na skutek delecji fragmentu chromosomu 6, zaś mechanizmem odpowiedzialnym za wyciszenie drugiej kopii genu jest metylacja promotora.

W niniejszych badaniach kolejną najczęstszą wykrywaną nie zrównoważoną aberracją chromosomową w guzach MLPS była częściowa trisomia fragmentu chromosomu 1q, z minimalnym wspólnym regionem 1q25.1q32.2. Trisomia długich ramion chromosomu 1 jest zmianą genomową, identyfikowaną w wielu nowotworach, m.in. w raku szyjki macicy, jajnika, guzie Wilmsa lub mięsaku Ewinga [Mackintosh i wsp., 2012; Segers i wsp., 2013; Kuglik i wsp., 2014; Micci i wsp., 2014]. Udowodniono, iż aberracja ta jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w guzach Wilmsa, niezależnie od jego stopnia zaawansowania oraz histologii, a także wiąże się ze zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby [Hing i wsp., 2001; Segers i wsp., 2013]. Natomiast Jansen i wsp. (2012) wykazali, że obecność częściowej trisomii chromosomu 1q w komórkach nowotworowych oponiaka jest skorelowana z krótszym czasem przeżycia bez progresji choroby. Region powyższej duplikacji (1q25.1 oraz 1q25.3q32.1) pokrywał się z minimalnym wspólnym regionem, zidentyfikowanym w niniejszej pracy w guzach MLPS (1q25.1q32.2), aczkolwiek częstość występowania tej zmiany w oponiakach była 2-krotnie wyższa niż w guzach MLPS (60% vs. 27%).

Charakterystyczną cechą cytogenetyczną w guzach MLPS jest występowanie swoistej translokacji zrównoważonej t(12;16), która skutkuje powstaniem genu fuzyjnego *FUS/DDIT3*. Szacuje się, że częstość tej aberracji wynosi ok. 95%, zaś w pozostałych przypadkach można zaobserwować obecność genu fuzyjnego *EWSR1/DDIT3*, powstałego na skutek t(12;22) [Bode-Leśniewska i wsp., 2007]. W niniejszej pracy, pierwotną aberracją chromosomową rozpoznano w 91% guzów (n=20/22), dzięki wykorzystaniu techniki klasycznej cytogenetyki (barwienie prążków G) i/lub FISH, z sondą specyficzną dla genu *DDIT3*.

Ewolucja zmian cytogenetycznych w guzach WDLPS, DDLPS i MLPS pochodzących od jednego pacjenta

Jednym z celów niniejszej pracy była ocena różnic w ewolucji nie zrównoważonych aberracji chromosomowych w guzach pierwotnych, wznowach i przerzutach, pochodzących od tych samych pacjentów na

przestrzeni kilku lat trwania choroby. W analizowanej grupie tłuszczakomięsaków prześlędzono ewolucję profili genomowych w materiale nowotworowym, pobranym od ośmiu pacjentów (WDLPS n=7 guzów od dwóch pacjentów,DDLPS n=12 guzów od czterech pacjentów oraz MLPS n=6 guzów od dwóch pacjentów). Analiza cytogenetyczna wykazała, iż materiał nowotworowy, uzyskany od pacjentów z rozpoznaniem WDLPS i MLPS cechował się dużą stabilnością genomową. We wszystkich guzach występowały charakterystyczne dla danego podtypu histologicznego aberracje tj. translokacja t(12;16) w MLPS oraz amplifikacja chromosomu 12q w WDLPS. Wraz z upływem czasu w kolejnych wznowach lub przerzutach pojawiały się dodatkowe nieliczne wtórne zmiany genomowe.

Z kolei w guzach DDLPS zaobserwowano niestabilność chromosomową. W przypadku materiału, pobranego od pacjenta nr 29 na przestrzeni 41 miesięcy od momentu rozpoznania choroby jedynymi wspólnymi aberracjami dla wszystkich guzów były amplifikacje chromosomów 12, 13 i 14. Pozostałe liczne wtórne zmiany genomowe (trisomia chromosomu 4 i 9, rearanżacje chromosomów 5, 6, 7, 11, 21, 22) pojawiały się wraz z progresją choroby.

Wzrost liczby zmian w genomie guza w czasie progresji jest cechą charakterystyczną dla większości nowotworów [Tarkannen i wsp., 1999]. Na podstawie uzyskanych wyników mikromacierzowych w LPS oraz danych literaturowych [Örndal i wsp., 1993; Gustafson i wsp., 1991] można wnioskować, iż model ekspansji klonalnej leży u podłoża transformacji nowotworowej mięsaków tkanek miękkich. Örndal i wsp. (1993) badali cytogenetycznie z wykorzystaniem techniki barwienia prążków G materiał nowotworowy, pochodzący od dwóch pacjentów: od jednego chorego z rozpoznaniem mięsaka maziówkowego (SS, *synovial sarcoma*) oraz od drugiego z włókniakiem histiocytarnym (MFH, *malignant fibrous histiocytoma*). Ewolucję zmian genomowych prześlędzono w jednym guzie pierwotnym i w czterech przerzutach, zlokalizowanych w płucach w przypadku pacjenta z SS oraz w jednym guzie pierwotnym, dwóch wznowach i sześciu przerzutach od chorego z MFH. Autorzy pracy sugerują, iż na skutek niestabilności chromosomowej w kolejnych etapach progresji choroby pojawiają się nowe subklony komórek nowotworowych, które świadczą o heterogenności guza, co

potwierdzają uzyskane wyniki badań. Uważa się również, że istnieje związek pomiędzy liczbą wznów a występowaniem odległych przerzutów u tego samego pacjenta [Gustafson i wsp., 1991]. Analiza statystyczna przeprowadzona w grupie 128 osób wykazała, iż u 50% pacjentów z mięsakami tkanek miękkich przerzuty były diagnozowane równocześnie lub niewiele wcześniej niż wznowy. Ze względu na niewielką liczbę pacjentów, analiza statystyczna powyższej korelacji w guzach LPS nie została przeprowadzona.

Problemy metodyczne związane z techniką mikromacierzy-CGH

Technika mikromacierzy-CGH jest metodą z zakresu cytogenetyki molekularnej, która umożliwia analizę całego profilu genomowego w jednym eksperymencie. Jest to technika porównawcza, w której oprócz DNA badanego stosuje się także DNA referencyjne, uzyskany od zdrowych osób. Porównanie intensywności fluorescencji barwników, stosowanych do znakowania DNA badanego i kontrolnego umożliwia ocenę liczby kopii wybranego fragmentu genomu pacjenta. W literaturze brak jest jednoznacznych wytycznych, dotyczących kryteriów doboru DNA referencyjnego. W zależności od wewnątrzlaboratoryjnych ustaleń kontrolą może być DNA, wyizolowany z limfocytów krwi obwodowej od pojedynczej osoby albo mieszanina takiego DNA, pochodząca od co najmniej kilku osób tej samej płci. W przypadku analizy mikromacierzowej materiału nowotworowego rekomenduje się zastosowanie jako kontroli DNA konstytucyjnego z limfocytów krwi obwodowej lub fibroblastów, uzyskanego od tego samego pacjenta. Powyższy algorytm postępowania zdecydowanie ułatwia analizę danych mikromacierzowych, gdyż wszystkie wykryte zmiany chromosomowe są aberracjami somatycznymi, charakterystycznymi dla tkanki nowotworowej. W wielu przypadkach schemat ten nie może zostać wykorzystany, ponieważ doświadczenia mikromacierzowe często są wykonywane na unikatowym materiale archiwalnym, pochodzącym od pacjentów, którzy już nie żyją albo u których na skutek leczenia onkologicznego przeprowadzono transfuzję krwi. Wówczas stosuje się mieszaninę DNA, pochodzącą od zdrowych osób. W takim przypadku istotnym jest, aby w trakcie analizy danych mikromacierzowych zweryfikować, czy dana

aberracja (zwłaszcza zmiana poniżej 500 kpz) jest zmianą somatyczną czy polimorfizmem liczby kopii.

Polimorfizmy liczby kopii (CNVs, *copy number variations*) są to małe delecje i/lub duplikacje w genomie człowieka, które podobnie jak polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) warunkują zmienność wewnątrzsobniczą. Wielkość tych zmian waha się w granicach od 1 pz do 500 kpz, a nawet w bardzo nielicznych przypadkach do 1 Mpz [Chen i wsp., 2011]. Obecnie znanych jest ok. 250 tysięcy CNVs, które pokrywają aż 19% ludzkiego genomu, aczkolwiek liczba ta stale rośnie [*Database of Genomic Variants*; <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>, stan na listopad 2014]. Według Chen i wsp. (2011) 70% populacji europejskiej posiada minimum jeden polimorfizm zmiany liczby kopii. Średnia liczba CNVs przypadająca na jednego Europejczyka wynosi ~2 zmiany. W populacji tej większość rozpoznawanych CNVs (94,1%) są to małe aberracje poniżej 300 kpz. Polimorfizmy te zlokalizowane są przede wszystkim subcentromerowo oraz w regionie telomerów i są zazwyczaj przekazywane z pokolenia na pokolenie [Chen i wsp., 2011]. Uważa się, że większość CNVs nie ma wpływu na fenotyp, natomiast ze względu na swoją powszechność odpowiadają one za zmienność wewnątrz- i zewnątrzsobniczą. Jednakże niektóre zmiany są określane jako patogenne i ich występowanie może być skorelowane z występowaniem niektórych chorób genetycznych (np. w łuszczycy lub chorobie Leśniewskiego-Crohna) albo nowotworowych [Eichler, 2008]. Według obowiązujących wytycznych ISCA (*The International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium*) oprócz CNVs, zakwalifikowanych jako patogenne lub prawdopodobnie patogenne, łagodne oraz prawdopodobnie łagodne (odpowiednio: *pathogenic*, *likely pathogenic*, *benign*, *likely benign*) istnieje jeszcze jedna grupa polimorfizmów o nieznanym znaczeniu klinicznym (*uncertain*). Zmiany te stwarzają najwięcej trudności interpretacyjnych, dlatego też w trakcie analizy warto korzystać z dostępnych baz internetowych, m.in. *Database of Genomic Variants* (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), w której można znaleźć wszystkie dotychczas opisane w literaturze CNVs lub *Decipher* (<https://decipher.sanger.ac.uk/>), gdzie znajdziemy informację, czy dana aberracja występowała u pacjenta z określonym fenotypem. Ponadto wskazane

jest, aby wyniki mikromacierzowe odnosić do odpowiedniej grupy etnicznej, dlatego też oprócz dostępnych baz internetowych warto utworzyć własną wewnętrzną bazę CNVs („*in-house*”), odzwierciedlającą lokalną populację. Katedra i Zakład Biologii i Genetyki dysponuje tego typu bazą, która została wykorzystana do interpretacji danych mikromacierzowych.

Badania mikromacierzowe, wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone na 70 mrożonych skrawkach guzów tłuszczakomięsaków. W trakcie analizy wyników mikromacierzowych w 10 guzach WDLPS (42%) zaobserwowano występowanie homozygotycznej delecji chromosomu 8p11.23p11.22 o wielkości ok. 155 kpb. Region ten obejmował dwa geny: *ADAM3a* i *ADAM5* (częściowo). W celu weryfikacji, czy powyższa zmiana jest aberracją somatyczną oceniono ilość kopii genu *ADAM3a* w tkance nowotworowej i zdrowej techniką ilościowego PCR w czasie rzeczywistym dla DNA genomowego (qPCR). Analiza qPCR wykazała, iż powyższa zmiana jest polimorfizmem liczby kopii (CNVs, *Copy Number Variation*), a nie aberracją somatyczną. Całkowita utrata genu *ADAM3a* obecna była zarówno w guzie, jak i w tkance prawidłowej. Powyższa aberracja genomowa została dwukrotnie błędnie opisana w literaturze. Barrow i wsp. (2011) stwierdzili występowanie homozygotycznej delecji genu *ADAM3a* z częstością 16% (n=6/38) w dziecięcej postaci glejaka o wysokim stopniu zaawansowania klinicznego. Autorzy sugerują, iż delecja ta jest aberracją somatyczną, charakterystyczną dla komórek glejaka. Innym przykładem niepoprawnej kwalifikacji zmiany genomowej jako somatycznej, jest praca zespołu Wang Y. i wsp. (2011). Analogicznie, zidentyfikowali homozygotyczną delecję *ADAM3a* jako aberrację charakterystyczną dla komórek niedrobnokomórkowego raka płuca. Oszacowali, iż delecja jednej kopii genu występuje w 52,1% przypadków, natomiast całkowita jego utrata dotyczy 6,8% analizowanych guzów. Ponadto autorzy sugerują, iż zmiana ta jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [Wang Y. i wsp., 2011]. Dopiero Li i wsp. (2014) udowodnili, iż opisywana zmiana 8p11.23p11.22 jest polimorfizmem liczby kopii. Wyniki badań wykazały, iż homozygotyczna delecja genu *ADAM3a* obecna jest zarówno w tkance nowotworowej raka piersi, jak i w prawidłowym marginesie wycięcia guza. Powyższy problem błędnej interpretacji pochodzenia bardzo małych zmian

genomowych, zwłaszcza poniżej 300 kpz podkreśla znaczenie poprawności wykonania badania oraz jego analizy. Ponadto wskazuje, iż dobór odpowiedniego DNA referencyjnego jest jednym z kluczowych etapów procedury, który może znacznie ułatwić interpretację uzyskanych wyników. W przeciwnym wypadku należy pamiętać, aby w trakcie analizy danych uwzględniać obecność polimorfizmów liczby kopii, gdyż pominięcie tego etapu może mieć wpływ na wiarygodność uzyskanych wyników.

Poważnym ograniczeniem metody mikromacierzy-CGH jest brak jej zastosowania w diagnostyce zrównoważonych aberracji chromosomowych. Technika ta, ze względu na bardzo wysoką rozdzielczość zyskała ogromną popularność w identyfikacji niewielkich zaburzeń genomowych, o wielkości nawet do kilku kpz, ale cechujących się zmianą ilości materiału genetycznego. Wynik badania mikromacierzowego nie dostarcza również informacji na temat niewielkiego stopnia mozaicyzmu [Albertson i Pinkel, 2003]. Jednakże niewątpliwą przewagą aCGH nad technikami cytogenetyki klasycznej jest brak konieczności prowadzenia hodowli komórkowych (materiałem do badań jest DNA, wyizolowany z tkanki), a także krótszy czas wykonania procedury (ok. 3 dni). Dlatego też metoda mikromacierzy-CGH zyskała ogromną popularność w diagnostyce prenatalnej, postnatalnej (zwłaszcza pacjentów z dysmorfia, zespołem wad wrodzonych i/lub niepełnosprawnością intelektualną) oraz chorób nowotworowych [Shaffer i Bejjani, 2004; Reddy i wsp., 2012; Wapner i wsp., 2012; Ahn i wsp., 2013]. Ponadto kolejną zaletą metody aCGH jest możliwość określenia dokładnych punktów pęknięć delecji i/lub amplifikacji, co zdecydowanie ułatwia identyfikację genów supresorowych i/lub protoonkogenów, które potencjalnie mogą być zaangażowane w patogenezę lub progresję choroby nowotworowej [Kallioniemi, 2008]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają słuszność wyboru techniki aCGH do analizy profili genomowych guzów LPS. Zastosowanie metody mikromacierzy-CGH pozwoliło na wykrycie wtórnych niezrównoważonych aberracji chromosomowych w przypadku sześciu guzów z prawidłowym wynikiem kariotypu oraz umożliwiło identyfikację prawdopodobnego pochodzenia chromosomów pierścieniowych i markerowych (załącznik 10.2). Przyczyną zaobserwowanych różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi technikami

cytogenetyki klasycznej oraz aCGH może być fakt, iż w przypadku niektórych guzów hodowano metafazy komórek prawidłowych zamiast komórek nowotworowych. Istotnym parametrem, mającym wpływ na jakość wyniku mikromacierzowego jest stężenie oraz jakość DNA. Rekomenduje się, aby do doświadczeń mikromacierzowych używać DNA, wyizolowanego z tkanki nowotworowej mrożonej, aczkolwiek doniesienia literaturowe sugerują, iż możliwe jest uzyskanie wiarygodnego wyniku również dla DNA, otrzymanego z materiału utrwalonego w parafinie [Koczkowska i wsp., 2013]. Niewątpliwie aCGH jest techniką o wysokiej rozdzielczości oraz o szerokim spektrum zastosowania, jednakże wyłącznie kombinacja wielu metod cytogenetycznych pozwala uzyskać wiarygodny wynik końcowy.

Podsumowanie

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy umożliwiły dokładniejsze poznanie profili genomowych tłuszczakomięsaków. Jest to pierwsza praca, w której przebadano cytogenetycznie z zastosowaniem metody mikromacierzy-CGH o wysokiej rozdzielczości (~10 kpz) 70 guzów WDLPS, DDLPS i MLPS. Stwierdzono występowanie różnic w niezrównoważeniu genomów pomiędzy podtypami histologicznymi LPS, co może być wykorzystane jako marker diagnostyczny, ułatwiający rozpoznanie tych rzadko występujących nowotworów. Analiza statystyczna nie wykazała związku między występowaniem określonej aberracji chromosomowej a lokalizacją guza. Aczkolwiek udowodniono, iż w LPS pojawiają się zmiany genomowe, które są charakterystyczne dla określonego typu zmiany nowotworowej. Mianowicie utrata fragmentu chromosomu 6 występuje częściej we wznowach i w przerzutach, w porównaniu do guzów pierwotnych ($p=0,001$ OR=9,78 95% CI [2,03-47,13] → *Wyniki str. 88*), a dodatkowy materiał genetyczny chromosomu 5 jest aberracją charakterystyczną dla guzów nawrotowych ($p<0,001$ OR=6,89 95% CI [2,38-19,92] → *Wyniki str. 88*). Prześledzenie ewolucji zmian genomowych w materiale, pochodzącym od jednego pacjenta na przestrzeni kilku lat trwania choroby było dodatkowym celem pracy. Jednak

uzyskane wyniki nie pozwoliły zidentyfikować charakterystycznej zmiany genetycznej, odpowiedzialnej za progresję guza.

Wykazane różnice w profilach genomowych podtypów histologicznych tłuszczakomięsaków świadczą o odmiennej biologii tych rzadko rozpoznawanych nowotworów. Pomimo, iż nie udało się ustalić konkretnego onkogenu bądź genu supresorowego, odpowiedzialnego za progresję choroby to wiedza na temat zaburzeń genomowych, dotyczących określonych chromosomów daje możliwość dalszych badań molekularnych nad patogenezą i progresją tłuszczakomięsaków.

8. WNIOSKI

1. Guzy tłuszczakomięsaków dobrze zróżnicowanych (WDLPS), odróżnicowanych (DDLPS) oraz śluzowato/okrągłokomórkowych (MLPS) różnią się profilem genomowym określanym aCGH, co świadczy o odmiennej biologii tych nowotworów.
2. Tłuszczakomięsaki odróżnicowane (DDLPS) cechują się występowaniem najwyższej liczby niezrównoważonych aberracji chromosomowych w genomie w porównaniu do pozostałych podtypów histologicznych tłuszczakomięsaków.
3. Wspólną niezrównoważoną zmianą genomową, występującą w guzach WDLPS i DDLPS jest rearanżacja chromosomu 12, w obrębie której stwierdza się amplifikację genów: *CDK4*, *MDM2* i *HMGA2*, co potwierdza doniesienia literaturowe. Minimalny wspólny region aberracji to 12q14.1q21.1.
4. W przeciwieństwie do WDLPS, w guzach DDLPS wykryto utratę fragmentów chromosomów 13 i 15. Delecja chromosomu 15q jest aberracją genomową, występującą wyłącznie we wznowach.
5. Najczęstszymi niezrównoważonymi zmianami genomowymi w guzach WDLPS są częściowa trisomia ramion krótkich chromosomów 5 oraz 19.
6. Najczęstszymi niezrównoważonymi aberracjami chromosomowymi, zidentyfikowanymi w guzach MLPS jest utrata fragmentu ramion długich chromosomu 6 oraz częściowa trisomia ramion długich chromosomu 1 (minimalne wspólne regiony obu zmian to 6q14.1q22.31 oraz 1q25.1q32.2).
7. Wtórnymi aberracjami chromosomowymi, charakterystycznymi dla wznów i guzów przerzutowych tłuszczakomięsaków, niezależnie od ich podtypu histologicznego są delecja fragmentu chromosomu 6 i dodatkowy materiał genetyczny chromosomu 5.
8. Wznowy oraz guzy przerzutowe tłuszczakomięsaków WDLPS i MLPS, pojawiające się w trakcie trwania choroby nowotworowej, cechuje większa stabilność chromosomowa w porównaniu do DDLPS.

9. PIŚMIENICTWO

1. Ahn J.W., Bint S., Begbaum A., Mann K., Hall R.P., Ogilvie C.M.: Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals – results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Mol Cytogenet.* 2013, 6: 16.
2. Albertson D.G., Pinkel D.: Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet.* 2003, 2: 145-152.
3. Altungoz O., Meloni A.M., Peier A., Zalupski M., Spanier S., Brooks J.S., Sandberg A.A.: Deletion 6q in three cases of mixed-type liposarcoma in addition to t(12;16)(q13;p11). *Cancer Genet Cytogenet.* 1995; 79: 104-110.
4. Antonescu C., Ladanyi M.: Myxoid liposarcoma, w: WHO classification of tumours of soft tissue and bone (red. C.D.M. Fletcher, J.A. Bridge, P.C.W. Hogendoorn, F. Mertens). Wyd. IARC Press, Lyon 2013; 39-41.
5. Bandi N., Zbinden S., Gugger M., Arnold M., Kocher V., Hasan L., Kappeler A., Brunner T., Vassella E.: miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb - dependent manner and are frequently deleted or down - regulated in non - small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2009; 69: 5553-5559.
6. Barrow J., Adamowicz-Brice M., Cartmill M., MacArthur D., Lowe J., Robson K., Brundler M.A., Walker D.A., Coyle B., Grundy R.: Homozygous loss of ADAM3A revealed by genome - wide analysis of pediatric high - grade glioma and diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol.* 2011; 13: 212-222.
7. Bartuma H., Nord K.H., Macchia G., Isaksson M., Nilsson J., Domanski H.A., Mandahl N., Mertens F.: Gene expression and single nucleotide polymorphism array analyses of spindle cell lipomas and conventional lipomas with 13q14 deletion. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50: 619-632.

8. Behesti B., Park P.C., Braude I., Squire J.A.: Microarray CGH. *Methods Mol Biol.* 2002; 204: 191-207.
9. Biernat W.: Podstawy genetyki molekularnej nowotworów, w: *Onkologia* (red. R. Kordek). Wyd. Via Medica, Gdańsk 2007, 7-10.
10. Biran N., Jagannath S., Chari A.: Risk stratification in multiple myeloma, part 2: the significance of genetic risk factors in the era of currently available therapies. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2013; 11: 578-583.
11. Bocian E., Limon J.: Metody analizy cytogenetycznej i cytogenetyki molekularnej, w: *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej* (red. J. Bal). Wyd. PWN, Warszawa 2011; 105-123.
12. Bode-Lesniewska B., Frigerio S., Exner U., Abdou M.T., Moch H., Zimmermann D.R.: Relevance of translocation type in myxoid liposarcoma and identification of a novel EWSR1-DDIT3 fusion. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46: 961-971.
13. Bonci D., Coppola V., Musumeci M., Addario A., Giuffrida R., Memeo L., D'Urso L., Pagliuca A., Biffoni M., Labbaaye C., Bartucci M., Muto G., Peschle C., De Maria R.: The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med.* 2008; 14: 1271-1277.
14. Cahilly-Snyder L., Yang-Feng T., Francke U., George D.L.: Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet.* 1987; 13: 235-244.
15. *Cancer Gene Census*; <http://cancer.sanger.ac.uk>
16. Cantile M., Galletta F., Franco R., Aquino G., Scognamiglio G., Marra L., Cerrone M., Malzone G., Manna A., Apice G., Fazioli F., Botti G., De Chiara A.: Hyperexpression of HOXC13, located in the 12q13 chromosomal region, in well-differentiated and dedifferentiated human liposarcomas. *Oncol Rep.* 2013; 30: 2579-2586.

17. Charest A., Lane K., McMahon K., Park J., Preisinger E., Conroy H., Housman D.: Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37: 58-71.
18. Chen W., Hayward C., Wright A.F., Hicks A.A., Vitart V., Knott S., Wild S.H., Pramstaller P.P., Wilson J.F., Rudan I., Porteous D.J.: Copy number variation across european populations. *Plos One* 2011; 6: e23087.
19. Chen Y., Liou C.P., Tseng H.H., Jan Y.J., Li C.F., Tzeng C.C.: Deletions of chromosome 1p and 15q are associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumors. *J Formos Med Assoc.* 2009; 108: 28-37.
20. Coindre J.M., Pedeutour F., Aurias A.: Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Virchows Arch.* 2010; 456: 167-179.
21. Coindre J.M., Pedeutour F.: Pleomorphic liposarcoma, w: WHO classification of tumours of soft tissue and bone (red. C.D.M. Fletcher, J.A. Bridge, P.C.W. Hogendoorn, F. Mertens). Wyd. IARC Press, Lyon 2013; 42-43.
22. Conyers R., Young S., Thomas D.M.: Liposarcoma: molecular diagnostics and therapeutics. *Sarcoma* 2011; 2011: 483154.
23. Crago A.M., Singer S.: Clinical and molecular approaches to well differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Curr Opin Oncol.* 2011; 23: 373-378.
24. Crago A.M., Socci N.D., DeCarolis P., O'Connor R., Taylor B.S., Qin L.X., Antonescu C.R., Singer S.: Copy number losses define subgroups of dedifferentiated liposarcomas with poor prognosis and genomic instability. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 1334-1340.
25. Dafou D., Ramus S.J., Choi K., Grun B., Trott D.A., Newbold R.F., Jacobs I.J., Jones C., Gayther S.A.: Chromosomes 6 and 18 induces neoplastic suppression in epithelial ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 2009; 124: 1037-1044.

26. Dahlen A., Debiec-Rychter M., Pedeutour F., Domanski H.A., Hoglund M., Bauer H.C., Rydholm A., Sciot R., Mandahl N., Mertens F.: Clustering of deletions on chromosome 13 in benign and low-malignant lipomatous tumors. *Int J Cancer* 2003; 103: 616-623.
27. *Database of Genomic Variants*; <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>
28. *Decipher*; <https://decipher.sanger.ac.uk/>
29. Dei Tos A.P., Marino-Enriquez A., Pedeutour F., Rossi S.: Dedifferentiated liposarcoma, w: WHO classification of tumours of soft tissue and bone (red. C.D.M. Fletcher, J.A. Bridge, P.C.W. Hogendoorn, F. Mertens). Wyd. IARC Press, Lyon 2013; 37-38.
30. Dei Tos A.P., Pedeutour F.: Atypical lipomatous tumour/ well differentiated liposarcoma, w: WHO classification of tumours of soft tissue and bone (red. C.D.M. Fletcher, J.A. Bridge, P.C.W. Hogendoorn, F. Mertens). Wyd. IARC Press, Lyon 2013; 33-36.
31. Dei Tos A.P.: Liposarcomas: diagnostic pitfalls and new insights. *Histopathology* 2014; 64: 38-52.
32. Denis C.J., Deiteren K., Hendriks D., Proost P., Lambeir A.M.: Carboxypeptidase M in apoptosis, adipogenesis and cancer. *Clin Chim Acta.* 2013; 415: 306-316.
33. Edge S., Byrd D.R., Compton C.C., Fritz A.G., Greene F.L., Trotti A. (eds): *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th edition. Wyd. Springer, Nowy Jork 2010.
34. Eichler E.E.: Copy Number Variation and Human Disease. *Nature Education* 2008; 1: 1.
35. El-Rifai W., Sarlomo-Rikala M., Andersson L.C., Knuutila S., Miettinen M.: DNA sequence copy number changes in gastrointestinal stromal tumors: tumor progression and prognostic significance. *Cancer Res.* 2000; 60: 3899-3903.

36. Erickson-Johnson M.R., Seys A.R., Roth C.W., King A.A., Hulshizer R.L., Wang X., Asmann Y.W., Lloyd R.V., Jacob E.K., Oliveira A.M.: Carboxypeptidase M: a biomarker for the discrimination of well-differentiated liposarcoma from lipoma. *Mod Pathol.* 2009; 22: 1541-1547.
37. Evans H.L.: Liposarcoma: a study of 55 cases with a reassessment of its classification. *Am J Surg Pathol.* 1979; 3; 507-523.
38. Fedele M., Battista S., Manfioletti G., Croce C.M., Giancotti V., Fusco A.: Role of the high mobility group A proteins in human lipomas. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1583-1591.
39. Feuk L., Carson A.R., Scherer S.W.: Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006; 7; 85-97.
40. Frigere M., Markvendel E., Haus O., Coindre J., Terrier P., Collin F., Mugneret F., Turccarel C.: Chromosomal studies in a series of 13 liposarcomas. Del(6)(q14q24) as non random secondary change associated with myxoid subtype. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1991; 52: 268.
41. Gajdos C., Elias A.: Trabectedin: safety and efficacy in the treatment of advanced sarcoma. *Clin Med Insights Oncol.* 2011; 5: 35-43.
42. Garcia M.A., Carrasco E., Ramirez A., Jimenez G., Lopez-Ruiz E., Peran M., Picon M., Campos J., Boulaiz H., Marchal J.A.: Apoptosis as a therapeutic target in cancer and cancer stem cells novel strategies and futures perspectives, w: *Apoptosis and medicine* (red. T.M. Ntuli), 2012, 111-153.
43. Genuardi M., Klutz M., Devriendt K., Caruso D., Stirpe M., Lohmann D.R.: Multiple lipomas linked to an RB1 gene mutation in a large pedigree with low penetrance retinoblastoma. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9: 690-694.
44. Ghadimi M.P., Liu P., Peng T., Bolshakov S., Young E.D., Torres K.E., Colombo C., Hoffman A., Broccoli D., Hornick J.L., Lazar A.J., Pisters P., Pollock R.E., Lev D.: Pleomorphic liposarcoma: clinical observations and molecular variables. *Cancer* 2011; 117; 5359-5369.

45. Gibas L.M., Gibas Z., Sandberg A.A.: Technical aspects of cytogenetic analysis of human tumors. *Karyogram* 1984; 10; 25-27.
46. Gounaris I., Hatcher H.M., Davidson D., Sherbourne K., Alam S., Zaki K.A., Horan G., Earl H.M.: Trabectedin for advanced soft tissue sarcoma: a single institution experience. *Futute Oncol.* 2014; 10: 1843-1851.
47. Grosso F., Jones R.L., Demetri G.D., Judso I.R., Blay J.Y., Le Cesne A., Sanfilippo R., Casieri P., Collini P., Dileo P., Spreafico C., Stacchiotti S., Tamborini E., Tercero J.C., Jimeno J., D'Incalci M., Gronchi A., Fletcher J.A., Pilotti S., Casali P.G.: Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 2007; 8; 595-602.
48. Gustafson P., Rööser B., Rydholm A.: Is local recurrence of minor importance for metastases in soft tissue sarcoma? *Cancer* 1991; 67: 2083-2086.
49. Hameed M.: Pathology and genetics of adipocytic tumors. *Cytogenet Genom Res.* 2007; 118; 138-147.
50. Hing S., Lu Y.J., Summersqill B., King-Underwood L., Nicholson J., Grundy P., Grundy R., Gessler M., Shipley J., Pritchard-Jones K.: Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors. *Am J Pathol.* 2001; 158: 393-398.
51. Huh W.W., Yuen C., Munsell M., Hayers-Jordan A., Lazar A.J., Patel S., Wang W.L., Barahmani N., Okcu M.F., Hicks J., Debelenko L., Spunt S.L.: Liposarcoma in children and young adults: a multi-institutional experience. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57: 1142-1146.
52. Idbaih A., Coindre J.M., Derrre J., Mariani O., Terrier P., Ranchere D., Mairal A., Aurias A.: Myxoid malignant fibrous histiocytoma and pleomorphic liposarcoma share very similar genomic imbalances. *Lab Invest.* 2005; 85; 176-181.
53. Italiano A., Bianchini L., Gjernes E., Keslair F., Ranchere-Vince D., Dumollard J.M., Haudebourg J., Leroux A., Mainguene C., Terrier P.,

- Chibon F., Coindre J.M., Pedeutour F.: Clinical and biological significance of CDK4 amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5696-5703.
54. Jansen M., Mohapatra G., Betensky R.A., Keohane C., Louis D.N.: Gain of chromosome arm 1q in atypical meningioma correlates with shorter progression - free survival. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012; 38: 213-219.
55. Jones R.L., Fisher C., Al-Muderis O., Judson I.R.: Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy. *Eur J Cancer* 2005; 41; 2853-2860.
56. Kallioniemi A.: CGH microarrays and cancer. *Curr Opin Biotechnol.* 2008; 19: 36-40.
57. Kanoe H., Nakayama T., Hosaka T., Murakami H., Yamamoto H., Nakashima Y., Tsuboyama T., Nakamura T., Ron D., Sasaki M.S., Toguchida J.: Characteristics of genomic breakpoints in TLS-CHOP translocations in liposarcomas suggest the involvement of Translin and topoisomerase II in the process of translocation. *Oncogene* 1999; 18: 721-729.
58. Karube K., Nakagawa M., Tsuzuki S., Takeuchi I., Honma K., Nakashima Y., Shimizu N., Ko Y.H., Morishima Y., Ohshima K., Nakamura S., Seto M.: Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by genomic and functional analyses. *Blood* 2011; 118: 3195-3204.
59. Kee H.J., Shin J.H., Chang J., Chung K.Y., Shin D.H., Kim Y.S., Kim S.K., Kim S.K.: Identification of tumor suppressor loci on the long arm of chromosome 15 in primary small cell lung cancer. *Yonsei Med J.* 2003; 44: 65-74.
60. Kluth M., Hesse J., Heintz A., Krohn A., Steurer S., Sirma H., Simon R., Mayer P.S., Schumacher U., Grupp K., Izbicki J.R., Pantel K., Dikomey E., Korbel J.O., Plass C., Sauter G., Schlom T., Minner S.: Genomic

- deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2: ERG fusions. *Mod Pathol.* 2013; 26: 975-983.
61. Knudson A.G.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68: 820-823.
 62. Knuutila S., Bjorkqvist A.M., Autio K., Tarkkanen M., Wolf M., Monni O., Szymanska J., Larramendy M.L., Tapper J., Pere H., El-Rifai W., Hemmer S., Wasenius V.M., Vidgren V., Zhu Y.: DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol.* 1998; 152: 1107-1123.
 63. Koczkowska M., Lipska B.S., Grzeszewska J., Limon J., Biernat W., Jassem J.: Primary leiomyosarcoma of the mesentery in two sisters: clinical and molecular characteristics. *Pol J Pathol.* 2013; 64: 59-63.
 64. Korpanty G.J., Graham D.M., Vincent M.D., Leighl N.B.: Biomarkers that currently affect clinical practice in lung cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1 and KRAS. *Front Oncol.* 2014; 4: 204.
 65. Kosęła H., Wiater K., Świtaj T., Klimczak A., Kamycka A., Falkowski S., Ługowska I., Rutkowski P.: Trabectedin in patients with pre-treated advanced soft tissue sarcoma: a retrospective single center analysis. *Wspolczesna Onkol.* 2011; 15: 367-371.
 66. Kucuk C., Iqbal J., Hu X., Gaulard P., De Leval L., Srivastaya G., Au W.Y., McKeithan T.W., Chan W.C.: PRDM1 is a tumor suppressor gene in natural killer cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 20119-20124.
 67. Kuglik P., Smetana J., Vallova V., Moukova L., Kasikova K., Cvanova M., Brozova L.: Genome - wide screening of DNA copy number alterations in cervical carcinoma patients with CGH+SNP microarrays and HPV-FISH. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7: 5071-5082.

68. Lasota J.: Molecular Genetics of soft tissue tumors, w: Modern soft tissue pathology (red. M. Miettinen). Wyd. Cambridge University Press, New York, 2010; 127-180.
69. Lee S., Park H., Ha S.Y., Paik K.Y., Lee S.E., Kim J.M., Park J.B., Kwon C.H., Joh J.W., Choi Y.L., Kim S.J.: CDK4 amplification predicts recurrence of well-differentiated liposarcoma of the abdomen. Plos One 2014; 9: e99452.
70. Li A., Liu Y., Zhao Q., Feng H., Harris L, Wang M.: Genome-wide identification of somatic aberrations from paired normal-tumor samples. Plos One 2014.
71. Li F.P., Abramson D.H., Tarone R.E., Kleinerman R.A., Fraumeni J.F. Jr, Boice J.D. Jr: Hereditary retinoblastoma, lipoma nad second primary cancers. J Natl Cancer Inst. 1997; 89: 83-84.
72. Limon J., Dal-Cin P., Sandberg A.A.: Application of long-term collagenase desegregation for the cytogenetics analysis of human solid tumors. Cancer Genet. Cytogenet. 1986A; 23: 305-313.
73. Limon J., Dal Cin P., Sandberg A.A.: Translocations involving the X chromosome in solid tumors: Presentation of two sarcomas with t(X;18)(q13;p11). Cancer Genet Cytogenet. 1986B; 23: 87-91.
74. Limon J., Turc-Carel C., Dal Cin P., Sandberg A.A.: Recurrent chromosome translocations in liposarcoma. Cancer Genet Cytogenet. 1986C; 22: 93-94.
75. Limon J.: Genetyczne podłoże chorób nowotworowych, w: Genetyka molekularna (red. P. Węgleński). Wyd. PWN, Warszawa 2006, 400-430.
76. Limon J.: Swoiste aberracje chromosomowe, w: Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. klinicznej (red. J. Bal). Wyd. PWN, Warszawa 2008; 397-407.
77. Lopez-Nieva P., Vaquero C., Fernandez-Navarro P., Gonzales-Sanchez L., Villa-Morales M., Santos J., Esteller M., Fernandez-Pigueras J.:

- EPHA7, a new target gene for 6q deletion in T-cell lymphoblastic lymphomas. *Carcinogenesis* 2012; 33: 452-458.
78. Lu G., Yin C.C., Medeiros L.J., Abruzzo L.V.: Deletion 15q as the sole abnormality in acute myeloid leukemia: report of three cases and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009; 188: 118-123.
79. Mackintosh C., Ordonez J.L., Garcia-Dominquez D.J., Sevillano V., Llombart-Bosch A., Szuhai K., Scotlandi K., Alberghini M., Sciort R., Sinnaeve F., Hogendoorn P.C., Picci P., Knuutila S., Dirksen U., Debicq-Rychter M., Schaefer K.L., de Alava E.: 1q gain and CDT2 overexpression underlie and aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. *Oncogene* 2012; 31: 1287-1298.
80. Mertens D., Wolf S., Schroeter P., Schaffner C., Dohner H., Stilgenbauer S., Lichter P.: Down - regulation of candidate tumor suppressor genes within chromosomes band 13q14.3 is independent of the DNA methylation pattern in B - cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 4116-4121.
81. Micci F., Haugom L., Abeler V.M., Davidson B., Trope C.G., Heim S.: Genomic profile of ovarian carcinomas. *BMC Cancer* 2014; 14: 1315.
82. Miettinen M.: Overview of soft tissue tumors, w: Modern soft tissue pathology (red. M. Miettinen). Wyd. Cambridge University Press, New York, 2010A; 1-10.
83. Miettinen M.: Atypical lipomatous tumor and liposarcomas, w: Modern soft tissue pathology (red. M. Miettinen). Wyd. Cambridge University Press, New York, 2010B; 432-459.
84. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215.
85. *Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer*; <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

86. Moorman A.V., Ensor H.M., Richards S.M., Chilton L., Schwab C., Kinsey S.E., Vora A., Mitchell C.D., Harrison C.J.: Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B - cell precursor acute lymphoblastic leukaemia results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 429-438.
87. Morita R., Susumu S., Jiri I., Osamu O., Osamu Y., Kazuhiro Y., Yusuke N.: Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Research* 1991; 51: 5817-5820.
88. Mrózek K., Arthur D., Karakousis C., Koduru P., Lebeau M., Pettenati M., Tanravahi R., Mrózek E., Perezmesa C., Rao U., Frankel S., Davey F., Bloomfield C.: Der(16)t(1;16) is a nonrandom secondary chromosome aberration in many types of human neoplasia, including myxoid liposarcoma, rhabdomyosarcoma and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol.* 1995; 6: 531-538.
89. Natrajan R., Louhelainen J., Williams S., Lave J., Knowles M.A.: High-resolution deletion mapping of 15q13.2-q21.1 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 2003; 63: 7657-7662.
90. Nielsen G.P., Mandahl N.: Lipoma, w: WHO classification of tumours of soft tissue and bone (red. C.D.M. Fletcher, J.A. Bridge, P.C.W. Hogendoorn, F. Mertens). Wyd. IARC Press, Lyon 2013; 20-21.
91. Niezabitowski A., Szczepański W., Stachura J.: Choroby kości, stawów, nowotwory tkanek miękkich, w: Patologia- znaczy słowo o chorobie (red. J. Stachura, W. Domagała). Wyd. Antykwa, Kraków 2009; 1191-1193.
92. *NimbleGen Arrays User's Guide*, Roche
93. Nowell P.C., Hungerford D.A.: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 142: 1497.
94. Nowell P.C.: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 1976; 194: 23-28.
95. Nupponen N.N., Visakorpi T.: Molecular cytogenetics of prostate cancer. *Microsc Res Tech.* 2000; 51: 456-463.

96. Ohguri T., Hisaoka M., Kawauchi S., Sasaki K., Aoki T., Kanemitsu S., Matsuyama A., Korogi Y., Hashimoto H.: Cytogenetic analysis of myxoid liposarcoma and myxofibrosarcoma by array-based comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol.* 2006; 59: 978-983.
97. Örndal C., Mandahl N., Willen H., Rydholm A., Mitelman F.: Cytogenetic evolution in primary tumors, local recurrences and pulmonary metastases of two soft tissue sarcomas. *Clin Exp Metastasis* 1993; 11: 401-408.
98. Ozaki T., Schaefer K.L., Wai D., Buerger H., Flege S., Lindner N., Kevric M., Diallo R., Bankfalvi A., Brinkschmidt C., Juergens H., Winkelmann W., Dockhorn-Dworniczak B., Bielack S.S., Poremba C.: Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in osteosarcomas. *Int J Cancer* 2002; 102: 355-365.
99. Palamarchuk A., Efanov A., Nazaryan N., Santanam U., Alder H., Rassenti L., Kipps T., Croce C.M., Pekarsky Y.: 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood* 2010; 115: 3916-3922.
100. Parente F., Grosgeorge J., Coindre J.M., Terrier P., Vilain O., Turc-Carel C.: Comparative genomic hybridization reveals novel chromosome deletions in 90 primary soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999; 115: 89-95.
101. Passarge E.: Powstawanie (pochodzenie) nowotworów, w: *Genetyka. Ilustrowany przewodnik.* Wyd. PZWL, Warszawa 2004, 316-321.
102. Pasz-Walczak G.: Czynniki rakotwórcze, w: *Onkologia* (red. R. Kordek). Wyd. Via Medica, Gdańsk 2007, 1-6.
103. Pedeutour F., Forus A., Coindre J.M., Berner J.M., Nicolo G., Michiels J.F., Terrier P., Ranchere-Vince D., Collin F., Myklebost O., Turc-Carel C.: Structure of the supernumerary ring and giant rod chromosomes in adipose tissue tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 24: 30-41.
104. Pérez-Mancera P.A., Sánchez-García I.: DDIT3 (DNA damage inducible transcript 3). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2004., <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/DDIT3ID80.html>.

105. Persson F., Olofsson A., Sjogren H., Chebbo N., Nilsson B., Stenman G., Aman P.: Characterization of the 12q amplicons by high - resolution, oligonucleotide array CGH and expression analyses of a novel liposarcoma cell line. *Cancer Lett.* 2008; 260: 37-47.
106. Reddy U.M., Page G.P., Saade G.R., Silver R.M., Thorsten V.R., Parker C.B., Pinar H., Willinger M., Stoll B.J., Hein-Hall J., Varner M.W., Goldenberg R.L., Bukowski R., Wapner R.J., Drews-Botsch C.D., O'Brien B.M., Dudley D.J., Levy B., NICHD Stillbirth Collaborative Research Network: Karyotype versus microarray testing for genetic abnormalities after stillbirth. *N Engl J Med.* 2012; 367: 2185-2193.
107. Rieker R.J., Joos S., Bartsch C., Willeke F., Schwarzbach M., Otano-Joos M., Ohl S., Hogel J., Lehnert T., Lichter P., Otto H.F., Mechttersheimer G.: Distinc chromosomal imbalances in pleomorphic and in high-grade dedifferentiated liposarcomas. *Int J Cancer* 2002; 99: 68-73.
108. Romeo S., Duim R.A., Bridge J.A., Mertens F., de Jong D., Dal Cin P., Wijers-Koster P.M., Dębiec-Rychter M., Sciot R., Rosenberg A.E., Szuhai K., Hogendoorn P.C.: Heterogeneous and complex rearrangements of chromosome arm 6q in chondromyxoid fibroma: delineation of breakpoints and analysis of candidate target genes. *Am J Pathol.* 2010; 177: 1365-1376.
109. Ronowicz A., Brzeskwiniewicz M., Madanecki P., Buckley P.G., Orłowska E., Ochocka R., Limon J., Piotrowski A.: Regeneration of comparative genomic hybridization oligonucleotide microarrays with dimethylurea. *Anal Biochem.* 2012; 426: 91-93.
110. Rowley J.D.: Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973, 243: 290-293.
111. Ruka W., Rutkowski P., Krzakowski M., Grzesiakowska U., Ptaszyński K., Jeziorski A., Polkowski W., Ryś J., Słuszniak J., Dziewirski W., Morysiński T., Świtaj T., Bębenek M., Siedlecki J.A., Limon J., Nowecki Z.I.: Mięsaki

- tkanek miękkich u dorosłych - zasady postępowania diagnostyczno-terapeutycznego. *Onkol. Prakt. Klin.* 2009; 5: 198-210.
112. Sandberg A.A., Gibas Z., Saren E., Li F.P., Limon J., Tebbi C.K.: Chromosome abnormalities in two benign adipose tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986; 22: 55-61.
113. Sandberg A.A.: Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: liposarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2004; 155: 1-24.
114. Schaffer L.G., Bejjani B.A.: A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 221-226.
115. Schimdt H., Bartel F., Kappler M., Wurl P., Lange H., Bache M., Holzhausen H.J., Taubert H.: Gains of 13q are correlated with a poor prognosis in liposarcoma. *Mod Pathol.* 2005; 18: 638-644.
116. Segers H., van den Heuvel-Eibrink M.M., Williams R.D., van Tinteren H., Vujanic G., Pieters R., Pritchard-Jones K., Bown N., Children's Cancer and Leukaemia Group and the UK Cancer Cytogenetics Group. Gain of 1q is a marker of poor prognosis in Wilms' tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; 52: 1065-1074.
117. Shackleton M., Quintana E., Fearon E.R., Morrison S.J.: Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 2009, 138: 822-829.
118. Shaffer L.G., McGowan -Jordan J., Schmid M.: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Karger 2013.
119. Sheffer M., Bacolod M.D., Zuk O., Giardina S.F., Pincas H., Barany F., Paty P.B., Gerald W.L., Notterman D.A., Domany E.: Association of survival and disease progression with chromosomal instability: A genomic exploration of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 7131-7136.

120. Sheffield B.S., Nielsen T.O.: Myxoid liposarcoma in a 91- year- old patient. *Mol. Cytogenet.* 2013; 6: 50.
121. Siedlecki J.A.: Choroby nowotworowe, w: *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej* (red. J. Bal). Wyd. PWN, Warszawa 2011, 226-257.
122. Srebrniak M., Tomaszewska A.: Techniki cytogenetyczne oraz jakość badania cytogenetycznego, w: *Badania cytogenetyczne w praktyce klinicznej*. Wyd. PZWL 2008; 94-116.
123. Szaryńska M., Kmieć Z.: Rola nowotworowych komórek macierzystych w patogenezie i terapii chorób nowotworowych. *Forum Medycyny Rodzinnej*, 2011, 5: 47-56.
124. Szczaluba K., Obersztyn E., Mazurczak T.: Zastosowanie nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej w diagnostyce wrodzonych wad rozwojowych. *Perinatalogia, Neonatologia i Ginekologia* 2010; 3: 108-116.
125. Szymanska J., Tarkkanen M., Wiklund T., Blomqvist C., Asko-Seljavaara S., Tukiainen E., Elomaa I., Knuutila S.: Gains and losses of DNA sequences in liposarcomas evaluated by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 15: 89-94.
126. Tap W.D., Eilber F.C., Ginther C., Dry S.M., Reese N., Barzan-Smith K., Chen H.W., Wu H., Eilber F.R., Slamon D.J., Anderson L.: Evaluation of well-differentiated/de-differentiated liposarcomas by high-resolution oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50: 95-112.
127. Tarkkanen M., Huuhtanen R., Virolainen M., Wiklund T., Asko-Seljavaara S., Tukiainen E., Lepantalo M., Elomaa I., Knuutila S.: Comparison of genetic changes in primary sarcomas and their pulmonary metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25: 323-331.
128. Theisen A.: Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education* 2008; 1: 45.

129. Tijo J.L., Levan A.: The chromosomes number of man. *Hereditas* 1956; 42: 1-6.
130. Tseng W.W., Somaiah N., Lazar A.J., Lev D.C., Pollock R.E.: Novel systematic therapies in advanced liposarcoma: a review of recent clinical trial results. *Cancers (Basel)* 2013; 5: 529-549.
131. Turc-Carel C., Philip I., Berger M.P., Philip T., Lenoir G.: Chromosomal translocation (11;22) in cell lines of Ewing's sarcoma. *C R Seances Acad Sci III* 1983; 296: 1101-1103.
132. Ul-Hassan A., Sisley K., Hughes D., Hammond D.W., Robinson M.H., Reed M.W.: Common genetic changes in leiomyosarcoma and gastrointestinal stromal tumour: implication for ataxia telangiectasia mutated involvement. *Int J Exp Pathol.* 2009; 90: 549-557.
133. Varella-Garcia M.: Molecular cytogenetics in solid tumors: laboratorial tool for diagnosis, prognosis and therapy. *Oncologist* 2003; 8: 45-58.
134. Wang X., Asmann Y.W., Erickson-Johnson M.R., Oliveira J.L., Zhang H., Moura R.D., Lazar A.J., Lev D., Bill K., Lloyd R.V., Yaszemski M.J., Maran A., Oliveira A.M.: High-resolution genomic mapping reveals consistent amplification of the fibroblast growth factor receptor substrate 2 gene in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50: 849-858.
135. Wang Y., Zhang Y., Wu L.: Homozygous deletion of ADAM3A revealed by genome - wide analysis early - stage NSCLS in China showed to be correlated with poor prognosis. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl: abstr e21177).
136. Wapner R.J., Martin C.L., Levy B., Ballif B.C., Eng C.M., Zachary J.M., Savage M., Platt L.D., Saltzman D., Grobman W.A., Klugman S., Scholl T., Simpson J.L., McCall K., Aggarwal V.S., Bunke B., Nahum O., Patel A., Lamb A.N., Thom E.A., Beaudet A.L., Ledbetter D.H., Shaffer L.G., Jackson L.: Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Eng J Med.* 2012; 367: 2175-2184.

-
137. Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2010 roku. Rejestracja Nowotworów Złośliwych, Narodowy Program Zwalczania Nowotworów 2012.
138. Zhang K., Chu K., Wu X., Gao H., Wang J., Yuan Y.C., Loera S., Ho K., Wang Y., Chow W., Un F., Chu P., Yen Y.: Amplification of FRS2 and activation of FGFR/FRS2 signaling pathway in high-grade liposarcoma. *Cancer Res.* 2013; 73: 1298-1307.
139. Zhang L., Huang J., Yang N., Greshock J., Megraw M.S., Giannakakis A., Liang S., Naylor T.L., Barchetti A., Ward M.R., Yao G., Medina A., O'Brien-Jenkins A., Katsaros D., Hatzigeorgiou A., Gimotty P.A., Weber B.L., Coukos G.: microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 9136-9141.
140. Zojer N., Konigsberg R., Ackermann J., Fritz E., Dallinger S., Kromer E., Kaufmann H., Riedl L., Gisslinger H., Schreiber S., Heinz R., Ludwig H., Huber H., Drach J.: Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2000; 95: 1925-1930.

10. Załączniki

10.1. Dane kliniczne pacjentów i histopatologiczne tłuszczakomięsaków

Tabela 17. Dane kliniczne i histopatologiczne 70 guzów tłuszczakomięsaka (53 pacjentów).

Numer pacjenta - numer guza	Rozpoznanie histologiczne	Płeć (K - kobieta; M - mężczyzna)	Wiek	Rodzaj guza	Lokalizacja
1	WDLPS	K	53	pierwotny	zaotrzewnowo
2	WDLPS	M	38	pierwotny	klatka piersiowa
3	WDLPS	M	46	pierwotny	udo
4	WDLPS	M	50	pierwotny	jama brzucha
5	WDLPS	M	51	pierwotny	udo
6	WDLPS	M	51	pierwotny	nadnercze
7	WDLPS	K	49	pierwotny	ściana brzucha
8	WDLPS	M	65	pierwotny	udo
9	WDLPS	M	38	pierwotny	udo
10	WDLPS	K	64	pierwotny	udo
11	WDLPS	M	41	pierwotny	udo
12	WDLPS	K	32	wznowa	zaotrzewnowo
13	WDLPS	K	51	wznowa	zaotrzewnowo
14	WDLPS	K	64	wznowa	zaotrzewnowo
15 - 1	WDLPS	M	36	wznowa	zaotrzewnowo
15 - 2	WDLPS	M	38	wznowa	zaotrzewnowo
15 - 3	WDLPS	M	39	wznowa	zaotrzewnowo
15 - 4	WDLPS	M	39	wznowa	zaotrzewnowo
15 - 5	WDLPS	M	40	wznowa	zaotrzewnowo
16 - 1	WDLPS	K	37	pierwotny	zaotrzewnowo
16 - 2	WDLPS	K	37	pierwotny	zaotrzewnowo
17	WDLPS	M	63	pierwotny	udo
18	WDLPS	M	74	pierwotny	miednica mniejsza
19	WDLPS	M	51	pierwotny	zaotrzewnowo
20	DDLPS	M	48	pierwotny	zaotrzewnowo
21	DDLPS	M	50	pierwotny	udo
22	DDLPS	K	52	wznowa	zaotrzewnowo
23	DDLPS	K	39	wznowa	zaotrzewnowo
24	DDLPS	M	78	wznowa	okolice łędźwiowe
25	DDLPS	M	71	pierwotny	udo
26	DDLPS	K	38	wznowa	udo
27	DDLPS	K	68	wznowa	jama brzucha

28 - 1	DDLPS	K	77	wznowa	jama brzucha
28 - 2	DDLPS	K	77	wznowa	jama brzucha
28 - 3	DDLPS	K	78	wznowa	jama brzucha
28 - 4	DDLPS	K	78	wznowa	jama brzucha
29 - 1	DDLPS	K	37	przerzut	zaotrzewnowo
29 - 2	DDLPS	K	37	wznowa	zaotrzewnowo
29 - 3	DDLPS	K	38	przerzut	jama brzucha
29 - 4	DDLPS	K	39	przerzut	jama brzucha
30 - 1	DDLPS	K	67	wznowa	kreзка jelita biodrowego
30 - 2	DDLPS	K	67	wznowa	naciekający na powłoki ciała
31	DDLPS	K	59	wznowa	zaotrzewnowo
32	DDLPS	M	68	pierwotny	nerka i okolice
33	DDLPS	K	51	pierwotny	udo
34 - 1	DDLPS	K	63	wznowa	zaotrzewnowo
34 - 2	DDLPS	K	64	wznowa	zaotrzewnowo
35	DDLPS	M	74	wznowa	staw kolanowy
36	MLPS	K	41	przerzut	zaotrzewnowo
37	MLPS	M	51	przerzut	zaotrzewnowo
38	MLPS	M	61	wznowa	udo
39 - 1	MLPS	K	60	pierwotny	podudzie
39 - 2	MLPS	K	62	pierwotny	ściana brzucha
40	MLPS	M	54	wznowa	ramię
41 - 1	MLPS	K	44	przerzut	zaotrzewnowo
41 - 2	MLPS	K	44	przerzut	nadgarstek
41 - 3	MLPS	K	46	wznowa	udo
41 - 4	MLPS	K	46	przerzut	zaotrzewnowo
42	MLPS	M	46	pierwotny	śródpierście
43	MLPS	K	47	wznowa	udo
44	MLPS	M	44	wznowa	dół podkolanowy
45	MLPS	K	64	pierwotny	udo
46	MLPS	M	57	pierwotny	udo
47	MLPS	M	45	pierwotny	udo
48	MLPS	M	55	pierwotny	udo
49	MLPS	M	40	pierwotny	guz palca II ręki
50	MLPS	K	82	wznowa	udo
51	MLPS	M	37	pierwotny	podudzie
52	MLPS	K	44	pierwotny	udo
53	MLPS	M	61	pierwotny	udo

10.2. Wyniki badań cytogenetyki klasycznej oraz mikromacierzy-CGH

Tabela 18. Wyniki badań kariotypów oraz niezrównoważenia genomowego metodą aCGH w grupie 24 guzów WDLPS, pochodzących od 19 pacjentów.

Numer pacjenta	Rodzaj guza *	Kariotyp	Deleccje	Duplikacje **		% profilu genomowego
				Chromosom 12	Inne chromosomy	
1	P	47,XX,+r[8]/46,XX[5]	brak	12q13.12, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2q21.31, 12q21.32, 12q22, 12q23.1	1q21.1, 15q26.2q26.3	0,69
2	P	48,XY,+r1,+r2,inc[4]	10q23.31	12q14.1, 12q14.3q15, 12q15q21.1, 12q21.2q21.31, 12q21.31, 12q21.33, 12q22, 12q23.1, 12q23.3, 12q24.31	2q32.2q32.3, 2q34, 3p14.1, 3p13, 3p12.3, 3p11.2p12.2, 3p12.1, 3p12.1p11.2, 3q27.3q28, 5p13.1, 6q23.3, 6q24.1, 6q24.2, 6q24.3q25.1, 6q25.1, 6q25.2, 6q25.3, 13q32.1q32.2, 13q33.2, 13q33.2q33.3	1,27
3	P	46,XY,-6,+r[7]/64,idem[4]/46,XY[3] ish r(12)(wcp12+)[4]	brak	12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q21.1, 12q21.1q21.2, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.33, 12q22q23.1, 12q23.1, 12q23.2	11q22.1	0,60
4	P	46,mar1,inc[8]	brak	12p13.32, 12p13.31, 12p11.22p11.1, 12q12, 12q13.13, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.32, 12q21.33, 12q22, 12q23.1	1p36.33p36.32 1p36.22p36.21 1p36.13p36.12, 2p12p11.2, 3p25.3, 3p24.3, 3p22.2, 3p14.1, 3p12.3, 3p11.2p11.1, 3q12.2, 7p22.3p22.1, 7p15.1, 7p14.3, 7p12.1, 9q33.3q24.11, 19p13.3p13.2, 19p13.2, 19p13.2p13.13, 19p13.13p13.12, 19q13.11, 19q13.11q13.12, 19q13.12, 19q13.13, 19q13.2, 19q13.31, 19q13.32, 19q13.41q42, 20p13, 20q13.31, 20q13.32	1,80
5	P	46,XY,r1,r2[cp7]	brak	12q12, 12q13.3q14.1, 12q14.2, 12q14.3q21.31	brak	0,40

6	P	63-64,mar1,mar2,inc[cp6]	9p24.3p13.3	12q12, 12q13.11, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.31q21.32, 12q21.32, 12q21.33, 12q22	5p15.33p11, 9q13q34.3, 15q21.3, 15q24.1, 19p13.3p13.11, 20q11.21q13.33	7,20
7	P	46,XX,r1,r2,mar[8]	brak	12q12, 12q13.11, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.3, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.32, 12q21.33, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q23.3, 12q24.21, 12q24.23, 12q24.31, 12q24.32	2q12.1, 3q27.1q28, 18q11.1, 18q11.2q12.1, 18q12.1, 18q12.2q21.2, 18q21.2q21.32, 18q21.32, 19p13.3p12, 19q13.12	3,42
8	P	46,XY[4]	1q25.3q31.3, 1q31.1q32.1, 1q32.1, 1q32.2, 1q32.2q32.3, 1q41q44, 4q26, 4q32.1q32.2, 4q34.3q35.2, 5q11.1q31.2, 15q13.2, 15q13.3 15q14q21.1, 22q12.1q13.33	12q12, 12q14.1, 12q14.3, 12q15, 12q21.1q21.33, 12q22q23.1, 12q23.1, 12q23.1q23.2, 12q23.3, 12q24.11, 12q24.13, 12q24.21, 12q24.32q24.33	1q12q24.1, 1q24.1q25.1, 1q25.11q31.3, 1q32.1, 1q32.1q32.2, 1q32.2, 1q32.3, 1q32.3q41, 4q23, 4q24, 5p15.33p13.1, 22q11.21, 22q11.21q12.1	10,29
9	P	46,XY	brak	brak	brak	0
10	P	46,XX[25]	brak	12p13.33, 12p12.3, 12p12.1, 12p11.21, 12q12, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2q14.3, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1q21.2, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.32, 12q21.33, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q23.3, 12q24.31	1q21.2q21.3, 1q21.3, 1q23.2, 1q23.3, 1q23.3q24.2, 1q24.2, 1q24.2q24.3, 1q24.3, 1q25.2, 1q31.3, 5p15.33	1,09
11	P	42-50,XY,r1,r2,inc[cp3]/92-97,r1,r2,mar1,inc[cp3]	brak	12q13.13, 12q13.2, 12q13.3, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q23.3	5p15.33, 5p15.33p15.32, 5p15.32, 5p15.2, 5p15.1p14.3, 5p14.3, 5p14.2 5p14.2p14.1, 5p14.1, 5p14.1p13.3, 5p13.3, 5p13.2, 5p13.1, 5p13.1p12, 5p12, 14q13.1q21.1, 14q21.2q21.3, 14q22.1	1,08

12	R	25- 98.X,(2;?3;?)(p26;?:q29;?) [cp3]/25- 85.add(18)(q13)[2].add(19)(q13) [2].r1[3].r2[4]inc[cp8]	brak	12q13.2, 12q13.3q14.2, 12q14.3q21.1, 12q21.1q21.2, 12q21.31	1p22.3, 1p12, 1q12q21.1, 1q21.2, 1q21.2q21.3, 1q21.3q23.1, 1q23.1, 1q23.2, 1q23.2q23.3, 1q23.3, 1q23.3q24.1, 1q24.3, 1q32.1, 1q43 2p15.2, 2p12, 2q21.2, 2q21.2q21.3, 2q21.3, 2q22.1, 2q24.1, 2q33.3, 5q33.3, 11q21, 11q22.1, 11q22.1q22.2, 11q22.2, 14q23.3, 14q32.13q32.2, 14q32.31q32.32, 14q32.32, 14q32.33, 15q14, 15q15.1, 15q15.2q15.3, 15q15.3q21.1, 15q21.1, 16p13.3, 16p13.13, 16q22.1q22.2	1,60
13	R	46- 48,XX,+der(19)(5;19)(q13;q13).+r1,+ r2[cp10]/90-92.idem[2]	brak	12q12, 12q13.13, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.2q21.31, 12q21.31, 12q21.32, 12q21.33, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q24.13	5p15.33 5p15.33p15.32, 5p15.31p15.2, 5p15.2p14.3, 5p14.3p14.2, 5p14.2, 5p14.2p14.1, 5q14.2, 5q14.2q14.2, 5q15, 5q21.1, 5q23.2, 22q11.21, 22q12.2q12.3, 22q12.3	1,46
14	R	45-50,XX,r.mar1.mar2.mar3.inc[cp7]	brak	12q12, 12q13.12, 12q13.13, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.32, 12q21.33	6p25.3p11.1, 6q11.1, 6q12q13, 6q13, 6q25.3q26, 6q27, 14q12, 14q13.1, 14q13.2, 14q13.3, 14q21.2, 14q21.3, 14q21.3q22.1, 14q22.1, 14q22.2, 14q22.3, 14q23.1, 14q23.2q23.3, 14q24.1, 14q24.3, 14q32.12, 14q32.2, 14q32.31, 16q12.1, 16q21, 16q22.1, 16q22.3, 16q23.1	4,32
15 - 1	R	47,XY,+[cp3]/75-90.idem x2[cp3]	brak	12q13.11, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2	5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 6q25.1q25.2	0,76
15 - 2	R	47,XY,+r[8]/88-96.idemx2[46,XY[7]	brak	12q13.11, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.32, 12q24.32	5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 6q25.1q25.2	1,00
15 - 3	R	44-45,r1,r2.inc[cp3]/92,r1,r2,r3.mar, inc[2].ish dic(12;12)(wcp12+)[2]/r(12)(wcp12+)[4]/ r(12)(wcp12+)x2[8]	brak	12q13.11, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2	5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 5q14.2, 5q14.3	0,52

15 - 4	R	42-48,XY,r1,r2[cp6]/71-82,r1,r2,inc[cp2]/46,XY[2]	brak	12q13.11, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.31, 12q24.32	4p15.33, 5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 6q14.2, 6q16.2q16.3, 6q21, 6q22.31q22.32, 6q22.33, 6q23.1, 6q23.2q23.3, 6q23.3q24.2, 6q24.3q25.3, 6q26, 19p13.3p13.1, 19q12	1,93
15 - 5	R	31-46,r.mar,inc[cp10]	brak	12q13.11, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2	4p16.3p12, 5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 19p13.3p13.1	2,75
16 - 1	P	36-47,r1,r2,2-5dmin,inc[cp7]/36-46,mar,inc[3]	brak	12p13.33p13.31, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.33, 12q21.33q22, 12q22	3p14.1, 3p12.3, 17p13.1, 17p12p11.2	0,76
16 - 2	P	44-47,r1,r2,2-3dmin,inc[cp3]/42-46,mar,inc[3]	brak	12p13.33p13.32, 12p3.32, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.33, 12q21.33q22, 12q22	3p14.1, 3p12.3, 8p23.3p23.2, 8p11.21, 8q11.1q12.3, 8q12.3q13.3, 8q13.3, 8q21.11, 8q21.11q21.12, 8q21.12, 8q21.12q21.13, 8q21.13, 8q21.3, 8q22.1, 13q13.3q14.11, 13q21.33, 13q33.1q33.2, 13q33.3q34, 17p12, 17p12p11, 19q12, 19q13.12q13.2, 19q13.32, 19q13.33q13.43	2,63
17	P	47+50,XY,+r1,+r2,+r3,inc[cp7]	19q12q13.2	12q13.2, 12q13.3, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15q21.31, 12q21.32, 12q21.33, 12q24.21	9q34.3, 11q24.2, 13q14.11q14.12, 18p11.31	0,96
18	P	90-120,r1x2,r2,inc[cp4]/46,XY[3]	11q22.3q25, 13q14.12q34, 17q11.2q12	brak	2q32.2q37.3, 4q34.1q35.2, 11p15.5p15.4, 11p15.3p12, 11q12.2q14.1, 11q22.1q22.3, 13q12.12q14.12, 17p12p11.2, 17q11.1q11.2, 17q12q21.31, 17q21.32q21.33, 19p13.3p13.11	9,18
19	P	42-52,mar1,mar2,inc[5]	19p13.3p13.11	12p13.32, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.33, 12q23.1	4p16.1p12, 6q23.3 6q24.1q25.2, 13q33.3q34	3,00

* oznaczenia skrótów: P - guz pierwotny, R - wznowa; ** pogrubioną czcionką zaznaczono amplifikację wybranych fragmentów chromosomów

Tabela 19. Wyniki badań kariotypów oraz niezrównoważenia genomowego metodą aCGH w grupie 24 guzów DDLPS, pochodzących od 16 pacjentów.

Numer pacjenta	Rodzaj guza *	Kariotyp	Delekcje	Duplikacje **		% profilu genomowego
				Chromosom 12	Inne chromosomy	
20	P	63-71,mar1,mar2,mar3,mar4,inc[cp5]	5p15.33p11, 9p24.3p11.1, 9q12q13, 11q11q25, 12p13.33p11.22, 22q13.31q13.33	12q12, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.33, 12q22, 12q23.1, 12q24.22q24.31	4p16.3p15.1, 8p23.3p23.2, 8q13.2q23.3, 8q24.13, 8q24.21, 8q24.3, 9q21.13q22.2, 9q22.33q31.3	11,26
21	P	46,XY	1q25.1q43, 3p25.1p24.3, 4q32.2, 4q32.3, 4q33q34.1, 4q34.3q35.2, 8p23.2p11.21, monosomia 13	12q14.1, 12q15	trisomia 5, 7p22.1p11.1, 7q11.1q36.3, trisomia 14, trisomia 19, trisomia 20	24,12
22	R	32- 46,XX,del(6)(q13),add(6)(p25),add(11)(q21),der(14;18)(q10;q10),der(17)t(6;17)(q13;q25),mar1,mar2 [cp11]	6p23p22.2, 14q21.1, 14q21.2q21.3, 14q21.3q22.3, 14q22.3, 14q23.1, 15q12q14, 15q26.1q26.3	12q12, 12q13.2q13.3, 12q14.1, 12q14.3, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.32q22, 12q22, 12q23.1	5q14.3, 5q22.2q23.1, 5q23.2, 7p22.3p21.3, 7p21.3p21.2, 14q11.2, 14q21.1q21.2, 14q21.3, 14q22.3, 14q22.3q23.1, 14q23.1, 14q32.13q32.2, 14q32.33, 19q13.11, 19q13.13, 19q13.2	3,03

23	R	38-45,r,mar1,mar2,inc[cp2]/71-84,r1,r2,mar1,inc[cp2]	21q21.2q21.3	12q13.2, 12q13.3q14.1, 12q14.1q14.2, 12q14.3q21.1, 12q21.1q21.2, 12q21.31	1q21.1, 1q21.2q21.3, 1q21.3, 1q23.1, 1q23.2, 1q23.2q24.1, 1q24.2q24.3, 1q24.3, 1q42.12, 1q43, 1q43q44, 2p15p14, 2p12, 2q21.2q21.3, 2q21.3, 2q22.1, 2q24.1, 2q33.3, 5q33.3, 11q21, 11q22.1q22.2, 14q23.3, 14q32.2, 14q32.31q32.32, 14q32.33, 15q14, 15q15.1, 15q15.2q15.3, 15q15.3, 15q15.3q21.1, 16p13.3, 16p13.13	1,43
24	R	68-74,XY,del(1)(q11),dic(1;9)(p22;p13),der(2)t(2;4)(p13;q12) del(3)(p21)x2,del(4)(p11), der(6)t(2;6)(p11;p11),del(7)(q31),del(7)(p15),der(7)t(7;8)(p11;p11),del(8)(p11), del(9)(p13),del(9)(p13)add(9)(q34), add(11)(q13),add(11)(p13),add(11)(p15), del(12)(p11),der(16)t(9;16)(q11;p11), der(16)t(15;16)(q11;q11)x2,der(17)t(3;17)(q21;p13),i(18)(q10),add(19)(q13),der(19)t(17;19)(q21;q13),der(?)t(10;?)(q11;?),inc[cp7]	2q21.1q37.3, 4p16.2p14, 6p25.3p12.3, 8q23.1q24.3, 9p24.3p21.3, 9p21.2p13.3, 10q11.22q23.33, 11p15.5p12, 11q23.2q24.2, monosomia 13, 18p11.31p11.21, 18q22.1q23, 20p13p12.1, 21q21.2q21.2	12p11.22p11.1, 12q12q13.13, 12q14.1, 12q14.3, 12q14.3q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.32, 12q21.33q22, 12q23.1	1q21.1q25.3, 1q31.2q32.1, 1q32.3q41, 5p15.2p15.1, 5p12p11, 5q11.1q12.2, 8q11.21q22.3, 9p21.3p21.2, 9p13.3p13.1, 9q33.3q34.3, 10p15.3p21.33, 10q25.1q26.3, 11q11q13.5, 11q14.1, 19p13.3p12, 19q12q13.13, 20p11.23p11.21	24,04
25	P	42-52,mar1,mar2,inc[5]	9p24.3p13.3	12q13.3q14.1, 12q14.1q14.2, 12q14.3q15, 12q15q21.1, 12q21.1q21.2, 12q21.31q21.32, 12q21.32q21.33	1q21.1, 1q21.2, 1q21.2q21.3, 1q21.3q22, 1q23.2q23.3, 1q23.3, 1q24.1q25.1, 1q25.2, 7q36.3, 19p13.3p12	1,86

26	R	41-46,X,-X,dic(1;7)(p36;p11),-2,- 4,+der(5)(1;5)(p22;p15).del(9)(p13),+dic (p:?) (p24:?),+12,+16,-19,mar1,mar2[cp7]	2q23.3q31.1, 2q31.1, 2q31.2, 2q32.1, 2q32.3, 2q33.1, 2q33.2, 2q33.3, 2q34, 2q35, 3q13.12q13.13, 5p15.31, 5p15.31, 5p15.2p13.2, 5p13.1 5p12, 6q15, 6q16.1, 6q16.2, 6q16.3, 6q21, 6q22.1q22.31, 6q25.1q27, 9p24.1p21.1, 15q14, 16p13.3, 18p11.32p11.21	12p13.33, 12p13.31, 12p11.23, 12p11.23p11.21, 12q12, 12q13.11, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.32, 12q21.33, 12q21.33q22, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q23.3, 12q24.11	1p22.2, 1p22.2p21.3, 1p21.3, 1p13.3p13.2, 2q31.1, 2q31.2, 2q32.1, 2q32.3, 2q33.1, 2q33.2, 2q33.3, 2q34, 2q35, 5q14.3, 5q15, 5q22.1, 5q21.3, 5q22.1, 5q22, 5q22.3q23.1, 5q23.2, 5q31.1, 5q31.2, 5q31.3, 5q32, 5q33.1q33.2, 5q34q35.3, 6q14.1, 6q14.3q15, 6q16.1, 6q16.2, 6q16.3, 6q21, 6q22.1, 6q22.31, 6q22.33, 6q23.2q25.1, 14q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2, 14q13.3, 14q21.1, 14q21.2, 14q21.3, 14q22.1, 17q23.3q24.1, 17q24.1q24.2	9,86
27	R	3p26.3p11.1, 6p25.3p21.1, 9p24.3p21.3, monosomia 10, monosomia 13, monosomia 15, 16p11.2 16q13q24.3, 20q13.31q13.33	12p11.22p11.21, 12q12q13.11	3q11.2q29, 7p22.3p11.1, 9q12q34.3, 16p13.3p11.2, 16q11.2q13, 17p13.3q12, 20p13q13.31	29,22	
28 - 1	R	40-46,r1,r2,inc[cp3]	6p25.3p12.3, 6p12.1, 6q11.1q12, 7q21.3q36.3, 11q13.5q25, 13q11q31.1, 15q13.3q21.3, 22q13.1q13.33	12q12, 12q13.11q13.12, 12q13.12, 12q13.13q13.2, 12q13.2, 12q13.3, 12q13.3, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.31q21.32, 12q21.32, 12q21.33, 12q22	2p25.3, 2p25.2, 2p24.3, 2p24.2, 2p13.3, 2p12, 2p11.2, 2q22.3, 2q24.3, 2q32.1, 3q26.2, 3q26.32, 3q26.33, 5q22.3, 5q23.1, 6p12.3p12.1, 8q11.23, 8q12.3, 8q13.1, 8q13.2, 8q13.3, 8q21.11, 13q21.1, 18q12.1	9,69

28 - 2	R	36-47,XX,r,mar,inc[cp6]	6p25.3p12.3, 6p12.1, 6q11.1q12, 7q21.3q36.3, 13q11q31.1, 15q13.3q21.3, 22q13.1q13.33	12q12, 12q13.11q13.12, 12q13.12, 12q13.13q13.2, 12q13.2, 12q13.3, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.31q21.32, 12q21.32, 12q21.33, 12q22	2p25.3, 2p25.2, 2p24.3, 2p24.2, 2p13.3, 2p12, 2p11.2, 2q22.3, 2q24.3, 2q32.1, 3q26.2, 3q26.32, 3q26.33, 5q22.3, 5q23.1, 6p12.3p12.1, 8q11.23, 8q12.3, 8q13.1, 8q13.2, 8q13.3, 8q21.11, 13q21.1, 18q12.1, 19p13.3p13.11	8,51
28 - 3	R	41- 55.add(4)(q31),add(7)(q11),add(9)(q11), add(22)(q13),der(?),t(1:?) (p13:?),r1,r2, mar,inc[cp7]	6p25.3p12.3, 6p12.1, 6q11.1q12, 7q21.3q36.3, 13q11q31.1, 15q13.3q21.3, 22q13.1q13.33	12q12, 12q13.11q13.12, 12q13.13q13.2, 12q13.2, 12q14.1, 12q15, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.31q21.32, 12q21.32, 12q21.33, 12q22	2p25.3, 2p25.2, 2p24.3, 2p24.2, 2p13.3, 2p12, 2p11.2, 2q22.3, 2q24.3, 2q32.1, 3q26.2, 3q26.32, 3q26.33, 5q22.3, 5q23.1, 6p12.3p12.1, 8q11.23, 8q12.3, 8q13.1, 8q13.2, 8q13.3, 8q21.11, 13q21.1, 16q11.2q24.3, 18q12.1, 19p13.3p13.11	9,34
28 - 4	R	43-45,t(X;18)(p11;q11),Y,+del(5)(p11.2), der(6)t(6;13)(p21;q12),+(9)(q10),-11,- 13.13.der(19),t(8;19)(q13;q13),mar[cp12]	9p24.3p13.1, monosomia 11, monosomia 13	brak	8q11.1q24.3, 9q12q34.3, trisomia 22	15,35
29 - 1	M	43-46,XX,add(4)(p14),r[5]/78- 82, idemx2[2]	brak	12p13.33, 12q12, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q13.3, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.22, 12q22, 12q23.1	2q12.1q12.2, 2q24.25q13.1, 5q14.1, 5q14.2q14.3, 13q12.3, 13q13.1, 13q13.3, 13q33.2, 13q33.3, 13q3414q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2, 14q13.3q21.1	0,65

29 - 2	R	46,XY[10]	7p15.1p11.1, 7q11.21q36.3	12p13.33, 12q12, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q13.3, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.22, 12q22, 12q23.1, 12q23.3	2q12.1q12.2, 2q24.25q13.1, 5q14.1, 5q14.2q14.3, 6q24.1q24.2, 6q24.3q25.1, 6q25.2, 6q25.3q26, 7p22.3p15.1, 11p14.2p14.1, 11p12, 11q23.2q24.1, 13q12.3, 13q13.1, 13q13.3, 13q33.2, 13q33.3, 13q34, 14q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2, 14q13.3q21.1, 17q24.2q25.3, 21q22.3, 22q13.31	7,01
29 - 3	M	45- 47,X,der(X)(X:4)(q22;q12)[2],del92)(p21)[2],add(14)(q22)[2],r[2],mar1[2],mar2[3][cp6]/46,XX[30]	brak	12p13.33, 12q12, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q13.3, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.22, 12q22, 12q23.1, 12q23.3	2q11.1q11.2, 2q12.1q12.2, 2q13q14.1, 2q21.2q21.3, 2q22.1, 2q22.2, 2q24.2, 2q32.1, 2q32.3, 2q33.1, trisomia 4, 5q13.1, 5q14.1, 5q14.2q14.3, 6q24.1q24.2, 6q24.3q25.1, 6q25.2, 6q25.3q26, trisomia 9, 13q12.3, 13q13.1, 13q13.3, 13q33.2, 13q33.3, 13q3414q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2, 14q13.3q21.1, 16q12.1, 17q24.2q25.3	11,89
29 - 4	M	30-46,der(7)add(7)(p1)add(7)(q220[2],mar[4],inc[cp8]	brak	12p13.33, 12q12, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q13.3, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q14.3, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.22, 12q22, 12q23.1, 12q23.3	2q12.1q12.2, 2q24.2, 6q24.1q24.2, 6q24.3q25.1, 6q25.2, 6q25.3q26, 13q12.3, 13q13.1, 13q13.3, 13q33.2, 13q33.3, 13q3414q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2, 14q13.3q21.1	0,78

30 - 1	R	44-48,r1,r2,mar1,mar2,mar3[3][cp8]	<p>1p32.3, 1p22.2p21.3, 2q23.3q31.1, 2q31.1, 2q31.11q31.2, 2q31.2, 2q31.3, 2q32.1, 2q32.1q32.2, 2q32.2, 2q32.3, 2q33.1, 2q33.2, 2q33.3, 2q33.3q34, 2q34, 2q35, 2q36.3, 2q37.1, 2q37.2, 2q37.3, 3q13.12q13.13, 5p15.33p15.32, 5p15.32, 5p15.31, 5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 5p13.1, 5p12, 6q15q16.1, 6q16.1, 6q16.1q16.2, 6q16.3, 6q16.3q21, 6q21, 6q21q22.1, 6q22.1, 6q22.1q22.31, 6q22.31q22.33, 6q23.1, 6q25.1, 11p15.5p13, 15q13.1q13.3, 15q14q22.31, 15q23q26.3, 16p13.3, 17q25.1, 18p11.32p11.21, 20p13p11.21</p>	<p>12p13.33m 12p13.31, 12p11.23, 12p11.22, 12p11.22p11.21, 12p11.21, 12q12, 12q13.11, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.31q21.32, 12q21.32, 12q21.33, 12q21.33q22, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q23.2q23.3, 12q23.3, 12q24.11</p>	<p>1p13.3, 1p13.3p13.2, 2q31.1, 2q31.2, 2q31.2q31.3, 2q31.3, 2q31.3q32.1, 2q32.1, 2q32.2, 2q32.2q32.3, 2q32.3, 2q32.3q33.1, 2q33.1, 2q33.1, 2q33.2, 2q33.3, 2q34, 2q34q35, 2q35, 2q35q36.3, 2q36.3, 2q37.1, 2q37.2, 2q37.3, 5q12.3, 5q14.3, 5q15, 5q15q21.1, 5q21.1, 5q21.2, 5q21.3, 5q22.1, 5q22.2, 5q22.3, 5q22.3q23.1, 5q23.1, 5q23.2, 5q31.1, 5q31.2, 5q31.3, 5q32, 5q33.1q33.2, 5q34q35.3, 6q14.1, 6q15, 6q16.1, 6q16.2, 6q16.2q16.3, 6q16.3, 6q21, 6q22.1, 6q22.31, 6q22.33, 6q23.1q25.1, 9q21.32, 9q21.33, 9q22.2, 9q22.31, 11p13, 11p12, 11p11.2, 13q21.32, 13q21.33, 13q31.3q32.1, 13q32.1, 14q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2q13.3, 14q21.1, 14q21.2, 14q21.3, 14q22.1, 15q11.2, 15q12, 15q14, 15q22.31q23, 17q21.31, 17q23.3q24.2</p>	13,6
--------	---	------------------------------------	--	--	--	------

30 - 2	R	40-46,r1,r2,mar1,mar2,inc[cp4]	<p>2q32.1, 2q32.1q32.2, 2q32.2, 2q32.3, 2q33.1, 2q33.2, 2q33.3, 2q33.3q34, 2q34, 2q35, 2q36.3, 2q37.1, 2q37.2, 2q37.3, 3q13.12q13.13, 5p15.33p15.32, 5p15.32, 5p15.31, 5p15.2, 5p15.1, 5p14.3, 5p14.2, 5p14.1, 5p13.3, 5p13.2, 5p13.1, 5p12, 6q15q16.1, 6q16.1, 6q16.1q16.2, 6q16.3, 6q16.3q21, 6q21, 6q21q22.1, 6q22.1, 6q22.1q22.31, 6q22.31q22.33, 6q23.1, 6q25.1, 15q14, 16p13.3, 16q11.2q24.3, 17q25.1, 18p11.32p11.21</p>	<p>12p13.33m 12p13.31, 12p11.23, 12p11.22, 12p11.22p11.21, 12q12, 12q13.11, 12q13.12, 12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31, 12q21.31q21.32, 12q21.32, 12q21.33, 12q21.33q22, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q23.2q23.3, 12q23.3, 12q24.11</p>	<p>2q32.2q32.3, 2q32.3, 2q32.3q33.1, 2q33.1, 2q33.2, 2q33.3, 2q34, 2q34q35, 2q35, 2q35q36.3, 2q36.3, 2q37.1, 2q37.2, 2q37.3, 5q12.3, 5q14.3, 5q15, 5q15q21.1, 5q21.1, 5q21.2, 5q21.3, 5q22.1, 5q22.2, 5q22.3, 5q22.3q23.1, 5q23.1, 5q23.2, 5q31.1, 5q31.2, 5q31.3, 5q32, 5q33.1q33.2, 5q34q35.3, 6q14.1, 6q15, 6q16.1, 6q16.2, 6q16.2q16.3, 6q16.3, 6q21, 6q22.1, 6q22.31, 6q22.33, 6q23.1q25.1, 9q21.32, 9q21.33, 9q22.2, 9q22.31, 13q21.32, 13q21.33, 13q31.3q32.1, 13q32.1, 14q11.2, 14q12, 14q13.1, 14q13.2q13.3, 14q21.1, 14q21.2, 14q21.3, 14q22.1, 17q21.31, 17q23.3q24.2</p>	10,2
31	R	60-68<3n>,XXX,+1,der(3)(1;3)(p13;q29),der(3)(3;8)(p11;p11),-4,-6,-8,+9,-10,add(11)(p11),-11,-12,-14,add(15)(p11),del(17)(p11),-20,-20,der(21)(12;21)(q13;q22)add(12)(q24),-21,-22,-22,r1,r2,inc[cp8]	<p>8q11.23q13.1, 8q31.1q21.2, 8q22.1q24.22, 8q24.22q24.3, 10q11.21q26.3, 11p15.5p14.3, 11p14.2p14.3, 11p14.2p14.1, 11p13p12 11p11.2, 14q11.2q32.33, 16p13.3p11.2, 21q11.2, 21q21.1, 21q21.1q21.3, 21q22.11q22.12, 21q22.12q22.22, 21q22.2q22.3, 22q13.31q13.33</p>	<p>12p13.1p11.21, 12q12, 12q13.2, 12q13.3q14.1, 12q14.1, 12q14.2, 12q14.2q14.3, 12q15, 12q15q21.1, 12q21.1, 12q21.2, 12q23.3, 12q24.11, 12q24.13, 12q24.31</p>	<p>2p16.1p14, 2p12p11.2, 2p11.2, 2q11.1q11.2, 2q11.2q12.1, 2q13, 2q14.1, 2q14.2q14.3, 2q22.2q24.1, 2q33.3q34, 2q35q37.3, 4p16.3p11, 4q12q13.1, 5p13.3p12, 5q31.3, 5q33.3q34, 6p25.3p11.1, 6q11.1q13, 6q14.1, 6q23.3, 6q24.3q25.1, 8p11.23p11.21, 8q13.1, 8q21.2, 8q24.22, trisomia 9, 10p11.21, 11q21.1, 14q11.2, 15q22.1, 15q22.31q23, 15q25.1, 15q25.3, 15q26.1q26.3, 18q22.1, 18q22.3, 18q22.3q23, 18q23, 20q11.21q13.33</p>	24,8

32	P	47,XY,+r[8]	brak	12q13.13, 12q13.2, 12q14.1, 12q14.3, 12q15 , 12q24.23	18q12.1, 18q12.2, 18q21	0,44
33	P	46,XX,t(12;16)(q13;p11)[3]/46,idem,+add(6)(q16)[3]/46,XX[3]	6q13q22.2	brak	brak	1,46
34 - 1	R	84-92,r1,r2,inc[cp5]	19q12q13.2	12q12 , 12q13.11 , 12q13.13 , 12q13.3q14.1 , 12q14.1 , 12q14.2 , 12q14.2q14.3 , 12q14.3q15 , 12q15 , 12q15q21.1 , 12q21.1 , 12q21.2 , 12q21.2q21.32 , 12q21.31 , 12q21.31q21.32 , 12q21.32 , 12q21.33 , 12q22 , 12q23.1 , 12q23.2 , 12q23.3	1p36.13 , 1p36.12 , 1p35.3 , 1p34.3 , 1p32.3p32.2 , 1p32.1 , 1p31.3 , 3q22.2 , 3q22.2q22.3 , 3q22.3 , 15q26.3 , 19p13.2 , 20p12.3 , 22q13.2	0,92
34 - 2	R	44-47,X,-X,der(2)(2;13)(p15;q12),der(5)(5;?18)(p15;q12),-13,-13,add(15)(p11):-21,-22,+r1,+r2,+r3,inc cp[10]/84-89,idemx2[cp4]	15q13.1q13.2, 15q13.3q14, 15q14q15.1, 15q24.2q25.2, 16q11.2q24.3, 21q21.2q22.3	12q12 , 12q13.11 , 12q13.13 , 12q13.3q14.1 , 12q14.1 , 12q14.2 , 12q14.2q14.3 , 12q14.3q15 , 12q15 , 12q15q21.1 , 12q21.1 , 12q21.2 , 12q21.2q21.32 , 12q21.31 , 12q21.31q21.32 , 12q21.32 , 12q21.33 , 12q22 , 12q23.1 , 12q23.2 , 12q23.3	13q31.3 , 15q25.3 , 17p13.3p11.2 , 21q11.2q21.1	3,72
35	R	46-48,XY,+add(15)(q11)x2,inc[cp15]	brak	12q13.3q14.1 , 12q14.1q14.2 , 12q14.3q15 , 12q15 , 12q21.1 , 12q21.2 , 12q21.31q21.32 , 12q21.32q21.33	1q21.1 , 1q21.2 , 1q21.3 , 1q23.2q23.3 , 1q24.2q25.2 , 5q11.1q35.3	5,38

* oznaczenia skrótów: P - guz pierwotny, R - wznowa; ** pogrubioną czcionką zaznaczono amplifikację wybranych fragmentów chromosomów

Tabela 20. Wyniki badań kariotypów oraz niezrównoważenia genomowego metodą aCGH w grupie 22 guzów MLPS, pochodzących od 18 pacjentów.

Numer pacjenta	Rodzaj guza *	Kariotyp **	Delekcje	Duplikacje	% profilu genomowego
36	M	45-48,XX,+der(1;16)(q10;p10), t(12;16)(q13;p11) ,der(16)t(12;16)(q13;p11),+19, +20[cp4]	brak	1q21.1q44, 12q13.3q24.33, trisomia chr. 19, trisomia chr.20	9,93
37	M	47,XY,del(6)(q11),+8, t(12;16)(q13;p11)	6q12q27	trisomia chr. 8	7,95
38	R	46,XY[3]	16q11.2q24.3	1q21.1q44	4,65
39 - 1	P	39-44,XX, t(12;16)(q13;p11) [3]	15q22.31q23	brak	0,04
39 - 2	P	47,XX,+5, t(12;16)(q13;p11) [10]	15q22.31q23	trisomia chr.5	5,73
40	R	51,XY,+5,+i(7)(q10),+8, t(12;16)(q13;p11) ,+13, +14[10]	brak	brak	0
41 - 1	M	46,XX,del(6)(q21), t(12;16)(q13;p11) [5]	2q31.1q32.2, 6q14.1q22.31	brak	1,55
41 - 2	M	46-47,XX,+add(1)(p13),del(6)(q21), add(8)(p11), t(12;16)(q13;p11) [cp8]	6q14.1q22.31	1q21.1q44	4,5
41 - 3	R	45-46,XX,del(6)(q21), t(12;16)(q13;p11) [10]	2q31.1q32.2, 6q14.1q22.31	brak	1,55
41 - 4	M	46,XX,del(6)(q21), t(12;16)(q13;p11) [10]	2q24.3q37.3, 6q14.1q22.31, 15q26.2	2q21.1q24.2, 15q26.2q26.3	4,88
42	P	46,XY[3]	brak	brak	0
43	R	47,XX,+8, t(12;16)(q13;p11) [7]	brak	trisomia chr.8	4,51

44	R	$t(1;8)(p13;q12)x2,+8,t(12;16)(q13;p11)x2,-7[cp9]$ 85-92,XXYY,der(8)	monosomia chr.6	1q12q44, trisomia chr.8	13,34
45	P	$46,XX,t(12;16)(q13;p11)[2]/47,XX,i(7)(q10),+8,t(12;16)[5]/72-73,XXX,+1,-8,+8,+8,+8,t(12;16)-14?,-17,-18,+19,+21,+22[cp4]$	brak	brak	0
46	P	$46,XY[7]$	$15q15.1q22.2$	trisomia chr.13	3,77
47	P	$83<4n>,del(1)(p13)der(1)t(1;6)(q32;p21)x2,del(16)(q13q22)x2,der(16)t(12;16)(q13;p11),del(17)(p11)x3,i(17)(q10),inc[cp2]/46,XY[4]$ 81-	$16q11.2q24.3$	$1q21.1q32.2, 6p25.3p21.2$	4,76
48	P	$46,XY,t(12;16)(q13;p11)[3]$	brak	$1q25.1q44$	2,41
49	P	$47,XY,t(4;22)(q31;q11),t(12;19)(q13;p13),+13[15]/46,XY[6]$	brak	trisomia chr.13	3,12
50	R	$46,XX,t(12;16)(q13;p11)[2]/86-92,idermx2[cp8]$	$17p13.2p13.1$	brak	0,04
51	P	$44-46,XY,add(2)(q37?),-4,t(12;16)(q13;p11)[cp7]$	brak	brak	0
52	P	$46,XX,add(1)(p22),der(6)t(6;12)(p23;q15),t(12;16)(q13;p11)[17]/46,XX[3]$	$15q14q21.2$	brak	0,44
53	P	$46,XY,add(6)(q13),t(12;16)(q13;p11)$	$6q13q22.31$	brak	1,69

* oznaczenia skrótów: P - guz pierwotny, R - wznowa, M - guz przerzutowy, ** wytluszczone kariotypy, na podstawie których rozpoznano translokację swoistą guzów MLPS

10.3. Spis rycin

Rycina 1. Mechanizmy aktywacji onkogenów (schemat wg Passarge, 2004).

Rycina 2. Teorie procesu kancerogenezy: model ekspansji klonalnej oraz hierarchiczny (schemat wg Garcia i wsp., 2012).

Rycina 3. Obraz histologiczny czterech podtypów tłuszczakomięsaków: A) WDLPS z przewagą adipocytów, B) WDLPS z przewlekłym naciekiem zapalnym, C) progresja guza WDLPS doDDLPS, D) MLPS - wariant śluzowaty, E) MLPS - wariant bogatokomórkowy, F) PLPS (wg Dei Tos, 2014).

Rycina 4. Schemat metody mikromacierzy-CGH (wg Fenk i wsp., 2006).

Rycina 5. Kariotyp guzaDDLPS, przedstawiający chromosom markerowy (czerwona strzałka) oraz dwa chromosomy pierścieniowe (czarne strzałki; dzięki uprzejmości dr hab. M. Iliszko).

Rycina 6. Warianty genów fuzyjnych *DDIT3/FUS* oraz *DDIT3/EWS* w guzach MLPS (wg Perez-Mancera i Sanchez-Garcia, 2004).

Rycina 7. Średnia wieku pacjentów w momencie rozpoznania choroby w zależności od podtypu histologicznego tłuszczakomięsaka.

Rycina 8. Schemat przyklejania miksera do szkiełka mikromacierzowego w PMAT [NimbleGen Arrays User's Guide, Roche].

Rycina 9. Szkiełko mikromacierzowe z naklejonym mikserem [NimbleGen Arrays User's Guide, Roche].

Rycina 10. Schemat odklejania miksera od szkiełka mikromacierzowego [NimbleGen Arrays User's Guide, Roche].

Rycina 11. Wykresy przedstawiające udział nie zrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów tłuszczakomięsaków w zależności od A) podtypu histologicznego, B) rodzaju guza, C) lokalizacji guza.

Rycina 12. Wykres przedstawiający udział niezrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów WDLPS w zależności od A) rodzaju guza, B) lokalizacji guza.

Rycina 13. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte w grupie 24 guzów WDLPS z zastosowaniem techniki aCGH (A) oraz powiększenie chromosomów o najwyższej częstości rearanżacji (B). Po lewej stronie diagramu chromosomu - delecje (kolor czerwony), po prawej stronie - duplikacje (kolor niebieski).

Rycina 14. Wykres przedstawiający zależność między występowaniem częściowej trisomii chromosomu 19 a stopniem niestabilności chromosomowej guzów WDLPS.

Rycina 15. Schemat homozygotycznej mikrodelecji 8p11.23p11.22, wykrytej techniką aCGH w guzach WDLPS.

Rycina 16. Wykres przedstawiający wyniki qPCR w materiale, pobranym z guza oraz z tkanki prawidłowej pacjentki, u której wykryto homozygotyczną mikrodelecję 8p11.23p11.22.

Rycina 17. Wykres przedstawiający średni procentowy udział niezrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów DDLPS w zależności od A) rodzaju guza oraz B) lokalizacji guza.

Rycina 18. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte w grupie 24 guzów DDLPS z zastosowaniem techniki aCGH. Po lewej stronie diagramu chromosomu - delecje (kolor czerwony), po prawej stronie - duplikacje (kolor niebieski).

Rycina 19. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy występowaniem delecji fragmentu ramion długich chromosomu 13 oraz A) lokalizacją guza B) stopniem złożoności profilu genomowego wszystkich guzów DDLPS.

Rycina 20. Przykładowe wyniki aCGH niezrównoważonych aberracji chromosomu 12 w guzach A) WDLPS i B) DDLPS.

Rycina 21. Porównanie częstości występowania aberracji chromosomu 12 w guzach WDLPS i DDLPS.

Rycina 22. Wykres przedstawiający średni procentowy udział niezrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów MLPS w zależności od A) rodzaju guza oraz B) lokalizacji guza.

Rycina 23. Minimalny wspólny region delecji chromosomu 6 w guzach MLPS.

Rycina 24. Minimalny wspólny region duplikacji chromosomu 1 w MLPS.

Rycina 25. Wykres przedstawiający zależność między występowaniem częściowej trisomii chromosomu 1 a stopniem niestabilności chromosomowej guza MLPS.

Rycina 26. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte w grupie 22 guzów MLPS z zastosowaniem techniki aCGH. Po lewej stronie diagramu chromosomu - delecje (kolor czerwony), po prawej stronie - duplikacje (kolor niebieski).

Rycina 27. Ewolucja niezrównoważonych aberracji chromosomowych w guzach DDLPS, pochodzących od pacjentów nr 28 i 29.

Rycina 28. Wykres przedstawiający zależność między występowaniem częściowej utraty fragmentu chromosomu 6 a stopniem niestabilności chromosomowej guzów tłuszczakomięsaków.

Rycina 29. Wykres przedstawiający średni procentowy udział niezrównoważonych aberracji chromosomowych w profilu genomowym guzów WDLPS i DDLPS na podstawie danych literaturowych [Crago i wsp., 2012] oraz wyników badań własnych.

Rycina 30. Model transformacji nowotworowej guzów WDLPS oraz ich progresji do DDLPS na podstawie analizy liczby kopii chromosomów (schemat wg Crago i wsp., 2012).

10.4. Spis tabel

Tabela 1. Klasyfikacja tłuszczakomięsaków na podstawie AJCC-UICC [Edge i wsp., 2010; Miettinen, 2010A].

Tabela 2. Podsumowanie wyników badań cytogenetycznych i molekularnych w tłuszczakomięsakach (wg Dei Tos, 2014).

Tabela 3. Zestawienie podstawowych parametrów klinicznych i histopatologicznych pacjentów z guzami tłuszczakomięsaków.

Tabela 4. Wykaz zastosowanej aparatury.

Tabela 5. Wykaz zastosowanych odczynników.

Tabela 6. Wykaz zastosowanych roztworów.

Tabela 7. Skład buforów płuczających (objętości odczynników wymagane do płukania jednego szkiełka mikromacierzowego).

Tabela 8. Częstość niezrównoważonych aberracji chromosomowych, zidentyfikowanych w 70 guzach tłuszczakomięsaków.

Tabela 9. Analiza związku pomiędzy obecnością określonej aberracji chromosomowej a stopniem złożoności profilu genomowego guzów DDLPS (test U Manna-Whitney'a).

Tabela 10. Analiza związku między częstością występowania określonych aberracji chromosomowych w guzach WDLPS i DDLPS.

Tabela 11. Porównanie częstości amplifikacji genów *CDK4*, *HMGA2* i *MDM2* w guzach WDLPS i DDLPS.

Tabela 12. Analiza związku pomiędzy występowaniem delekcji fragmentu chromosomu 6q14.1q22.31 a rodzajem guza MLPS i jego lokalizacją (test Fishera).

Tabela 13. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte techniką aCGH w guzach WDLPS, pochodzących od 2 pacjentów.

Tabela 14. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte techniką aCGH w guzach DDLPS, pochodzących od 4 pacjentów.

Tabela 15. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte techniką aCGH w guzach MLPS pochodzących od 2 pacjentów.

Tabela 16. Częstość amplifikacji genów *CDK4*, *MDM2* oraz *HMGA2* w guzach WDLPS i DDLPS na podstawie danych literaturowych oraz wyników badań własnych.

Tabela 17. Dane kliniczne i histopatologiczne 70 guzów tłuszczakomięsa (53 pacjentów).

Tabela 18. Wyniki badań kariotypów oraz niezrównoważenia genomowego metodą aCGH w grupie 24 guzów WDLPS, pochodzących od 19 pacjentów.

Tabela 19. Wyniki badań kariotypów oraz niezrównoważenia genomowego metodą aCGH w grupie 24 guzów DDLPS, pochodzących od 16 pacjentów.

Tabela 20. Wyniki badań kariotypów oraz niezrównoważenia genomowego metodą aCGH w grupie 22 guzów MLPS, pochodzących od 18 pacjentów.