

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXX
2010
SUPPLEMENT 3**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Mariola Iliszko

**Zastosowanie cytogenetyki klasycznej i molekularnej
w ocenie zaburzeń genomowych w wybranych mięsakach
tkanek miękkich człowieka**

*Application of the classical and molecular cytogenetic techniques
in analysis of the genomic imbalances in the selected soft tissue sarcomas*

Praca habilitacyjna

Katedra i Zakład Biologii i Genetyki
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Janusz Limon

Gdańsk 2010

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY

EDITOR-IN-CHIEF
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY

EDITORIAL BOARD

Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Zbigniew Machaliński,
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Zdzisław Bereznowski, prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI

ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG

są zamieszczane w bazie EMBASE

Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Składam serdeczne podziękowania:

Panu Profesorowi Januszowi Limonowi, mojemu Mistrzowi, dzięki któremu rozwija się moja fascynacja i pogłębia wiedza z genetyki człowieka, za opiekę naukową i życzliwość.

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki GUMed i Laboratorium Genetyki Klinicznej UCK, za pomoc oraz atmosferę pełną życzliwości, która ułatwiła mi realizację pracy.

Wszystkim Przyjaciółom za wiarę w moje możliwości.

Pracę dedykuję mojej Rodzinie

Spis publikacji zawierających wyniki badań dodatkowo analizowanych w pracy habilitacyjnej:

1. Schneider-Stock R., Ryś J., Walter H., Limon J., **Iliszko M.**, Niezabitowski A., Roessner A.: A rare chimeric TLS/FUS-CHOP transcript in a patient with multiple liposarcomas: a case report. *Cancer Genet. Cytogenet* 1999; 111: 130-133.
2. Panagopoulos I., Mertens F., Isaksson M., Limon J., Gustafson P., Skytting B., Akerman M., Sciot R., Cin P. D., Samson I., **Iliszko M.**, Ryoe J., Dębiec-Rychter M., Szadowska A., Brosjö O., Larsson O., Rydholm A., Mandahl N.: Clinical impact of molecular and cytogenetic findings in synovial sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 31: 362-372.
3. **Iliszko M.**, Ryś J., Woźniak A., Chosia M., Sciot R., Dębiec-Rychter M., Limon J.: Complex tumor-specific t(X;18) in seven synovial sarcoma tumors. *Cancer Genet. Cytogenet* 2009; 189: 118-121.

Praca została wykonana w ramach grantów KBN:

1. 4P05A07117
2. PBZ-KBN-091/P05/2003/10

Spis treści

Spis skrótów	8
1. Wstęp.....	11
1.1. Metody badań cytogenetycznych.....	11
1.2. Badania cytogenetyczne w nowotworach człowieka.....	12
1.2.1. Aberracje chromosomowe w mięsakach człowieka	13
1.3. Charakterystyka cytogenetyczna wybranych typów mięsaków	16
1.3.1. Tłuszczakomięśaki (Liposarcoma- LPS)	16
1.3.2. Mięśaki maziówkowe (Synovial sarcoma - SS)	18
2. Cele pracy	21
3. Materiał i metody	22
3.1. Materiał	22
3.1.1. Tłuszczakomięśaki (LPS)	22
3.1.2. Mięśaki maziówkowe (SS)	23
3.2. Metody	24
3.2.1. Hodowle komórkowe in vitro	24
3.2.2. Metody cytogenetyki klasycznej	25
3.2.3. Metody cytogenetyki molekularnej	25
3.2.4. Metody statystyczne	28
4. Wyniki.....	29
4.1. Charakterystyka cytogenetyczna tłuszczakomięśaków	29
4.1.1. Aberracje chromosomowe występujące w guzach tłuszczakomięśaków dobrze zróżnicowanych – WDLPS.....	29
4.1.2. Aberracje chromosomowe występujące w guzach tłuszczakomięśaków odróżnicowanych - DDLPS	33
4.1.3. Aberracje chromosomowe występujące w guzach tłuszczakomięśaków śluzowatych/okrągłokomórkowych (M/RLPS).....	35
4.2. Charakterystyka cytogenetyczna mięsaków maziówkowych - SS	41
4.2.1. Analiza chromosomów metodą GTW oraz M-FISH	41
4.2.2. Badania molekularne metodą FISH z zastosowaniem sond swoistych dla genów SS18 oraz SSX1-2.....	43
4.2.3. Zaburzenia równowagi genomu	44
4.3. Ewolucja zmian cytogenetycznych w guzach pierwotnych, nawrotowych i przerzutowych mięsaków pochodzących od jednego pacjenta	53
4.3.1. Tłuszczakomięśaki dobrze zróżnicowane	53
4.3.2. Tłuszczakomięśaki odróżnicowane	54
4.3.3. Tłuszczakomięśaki śluzowate/okrągłokomórkowe	56
4.3.4. Mięśaki maziówkowe	58
5. Dyskusja	61
6. Wnioski.....	76
7. Streszczenie	77
8. Summary.....	79
9. Piśmiennictwo.....	81
10. Aneks.....	90

Spis skrótów

Nazwy substancji chemicznych, roztworów, buforów oraz metod

arrayCGH	porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy / <i>comparative genomic hybridization microarray</i>
CGH	porównawcza hybrydyzacja genomowa / <i>comparative genomic hybridization</i>
CO ₂	dwutlenek węgla / <i>carbon dioxide</i>
Cy5	Cyanine 5 - barwnik fluorescencyjny / <i>fluorochrome</i>
DAPI	4',6-diaminoino-2-fenylindol - barwnik fluorescencyjny / <i>fluorochrome</i>
dd H ₂ O	woda dejonizowana / <i>without ion water</i>
DEAC	<i>diethyl aminomethyl coumarin</i> - barwnik fluorescencyjny / <i>fluorochrome</i>
DNA	kwas dezoksyrybonukleinowy / <i>deoxyribonucleic acid</i>
dUTP	trójfosforan urydyny lub deoksyurydyny / <i>deoxyuridine-triphosphatase</i>
EDTA	kwas etylenodwuaminoczteroctowy / <i>ethylenediaminetetraacetate</i>
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> / <i>fluorescence in situ hybridization</i>
FITC	izotiocyjanian fluoresceiny - barwnik fluorescencyjny / <i>fluorochrome</i>
GTW	prążki uzyskane przy użyciu barwnika Wrighta / <i>Wright stained bands</i>
M-FISH	wielobarwna fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> / <i>multicolor fluorescence in situ hybridization</i>
NaCl	chlorek sodu / <i>sodium chloride</i>
NaOH	wodorotlenek sodu / <i>sodium hydroxide</i>
NP-40	detergent niejonowy / <i>non-ionic detergent</i>
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy / <i>polymerase chain reaction</i>
Prążki C	centromery chromosomów wybarwione barwnikiem Giemzy po uprzedniej denaturacji wodorotlenkiem baru / <i>centromeres stained by Giemsa stain after barium hydroxide treatment</i>
SDS	dodecylosiarczan (VI) sodu - detergent o charakterze jonowym / <i>sodium dodecyl sulfate - ionic detergent</i>
SKY	analiza widmowa kariotypu / <i>spectral karyotyping</i>
SSC	bufor w skład, którego wchodzi chlorek sodu i cytrynian sodu / <i>buffer with sodium chloride and sodium citrate</i>
TRITC	izotiocyjanian tetrametylorodaminy - barwnik fluorescencyjny / <i>fluorochrome</i>

Geny (lokalizacja w chromosomie)

ABL	<i>c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase, (9q34)</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region, (22q11)</i>
CBFB	<i>core-binding factor, beta subunit, (16q22)</i>
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4, (12q13-14)</i>

<i>DDIT3</i>	<i>DNA-damage-inducible transcript 3, (12q13)</i>
<i>EWSR1</i>	<i>Ewing sarcoma breakpoint 1, (22q12).</i>
<i>FLI1</i>	<i>friend leukemia virus integration 1, (11q24)</i>
<i>FUS</i>	<i>fusion, involved in t(12;16) in malignant liposarcoma, (16p11)</i>
<i>GLI</i>	<i>glioma-associated oncogene (zinc finger protein), (12q13)</i>
<i>HMGA2</i>	<i>high mobility group AT-hook 2, (12q14)</i>
<i>MDM2</i>	<i>mouse double minute 2 homolog, (12q14)</i>
<i>MIC2</i>	<i>MIC2 MHC class I related antigen 2, (7p11)</i>
<i>MYH11</i>	<i>myosin, heavy chain 11, smooth muscle, (16p13)</i>
<i>SAS</i>	<i>sarcoma amplified sequence, (12q13-15)</i>
<i>SS18 (SYT)</i>	<i>synovial sarcoma chromosome 18 (synovial sarcoma translocation, chromosome 18), (18q11)</i>
<i>SSX1-4</i>	<i>synovial sarcoma, X breakpoint 1-4, (Xp11)</i>
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53, (17p13.1)</i>

Terminy cytogenetyczne

-	przed numerem chromosomu oznacza utratę kopii danego chromosomu w kariotypie / <i>before a chromosome designation to indicate the missing chromosome</i>
+	przed numerem chromosomu oznacza dodatkową kopię danego chromosomu w kariotypie / <i>before a chromosome designation to indicate the additional chromosome</i>
BAC	sztuczny chromosom bakteryjny / <i>bacterial artificial chromosome</i>
cen	centromer / <i>centromere</i>
del	delecja / <i>deletion</i>
der	chromosom pochodny / <i>derivative chromosome</i>
dic	chromosom dicentryczny / <i>dicentric chromosome</i>
dmin	acentryczne małe chromosomy powstałe w wyniku amplifikacji genów / <i>double minute chromosome</i>
i	izochromosom / <i>isochromosome</i>
inv	inwersja chromosomu / <i>chromosome inversion</i>
mar	chromosom markerowy / <i>marker chromosome</i>
p	ramiona krótkie chromosomu / <i>short arms of a chromosome</i>
q	ramiona długie chromosomu / <i>long arms of a chromosome</i>
r	chromosom pierścieniowy / <i>ring chromosome</i>
t	translokacja / <i>translocation</i>
tas	asocjacje telomeryczne / <i>telomeric association</i>

Skróty histopatologiczne i kliniczne

ALL	ostra białaczka limfatyczna / <i>acute lymphoblastic leukemia</i>
AML	ostra białaczka szpikowa / <i>acute myeloid leukemia</i>
BiSS	mięsak maziówkowy dwufazowy / <i>biphasic synovial sarcoma</i>
CLL	przewlekła białaczka limfocytowa / <i>chronic lymphocytic leukemia</i>
CML	przewlekła białaczka szpikowa / <i>chronic myeloid leukemia</i>
DDLPS	tuszczakomięsak odróżnicowany / <i>dedifferentiated liposarcoma</i>

DFSP	włókniakomięsak guzowaty / <i>dermatofibrosarcoma protuberans</i>
LGFMS	włókniakomięsak śluzowaty o niskim stopniu złośliwości / <i>low-grade fibromyxoid sarcoma</i>
LPS	łuszczakomięsak / <i>liposarcoma</i>
M	guz przerzutowy / <i>metastasis</i>
M/RLPS	łuszczakomięsak śluzowaty/okrągłokomórkowy / <i>myxoid/round cell liposarcoma</i>
MFH	złośliwy włókniak histiocytarny / <i>malignant fibrous histiocyoma</i>
MoSS	mięsak maziówkowy jednofazowy / <i>monophasic synovial sarcoma</i>
MPNST	złośliwy nowotwór osłonek nerwów obwodowych / <i>malignant peripheral nerve sheath tumors</i>
P	guz pierwotny / <i>primary tumor</i>
PDSS	mięsak maziówkowy niskozróżnicowany / <i>poorly differentiated synovial sarcoma</i>
PNET	obwodowy niedojrzały guz neuroektodermalny / <i>primitive neuroectodermal tumors</i>
R	wznowa miejscowa / <i>local recurrence</i>
SS	mięsak maziówkowy / <i>synovial sarcoma</i>
WDLPS	łuszczakomięsak dobrze zróżnicowany / <i>well-differentiated liposarcoma</i>

1. WSTĘP

W 1914 r. embriolog Teodor Boveri, zaobserwował w komórkach nowotworowych zaburzenia przebiegu mitozy i na tej podstawie sformułował teorię, wskazującą na mutacje chromosomowe w komórkach somatycznych jako przyczynę powstawania nowotworów. Boveri nie mógł doświadczalnie udowodnić swojej teorii, ponieważ w czasach jemu współczesnych nie znano jeszcze nie tylko morfologii prawidłowych chromosomów człowieka, ale nawet jej liczby. Dopiero w 1956 r. dwaj badacze: Tijo i Levan opublikowali pracę, w której ostatecznie określili, iż w prawidłowej komórce człowieka znajduje się 46 chromosomów [105].

Prowadzone od ponad 100 lat badania cytogenetyczne guzów nowotworowych jednoznacznie udowodniły, iż aberracje chromosomowe pełnią istotną rolę w transformacji nowotworowej i niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych [54, 64]. Nabyte liczbowe jak i strukturalne aberracje chromosomowe powstające w komórkach somatycznych, prowadzą do zaburzeń równowagi genomowej komórki i powodują transformację nowotworową. U podstaw tego zjawiska są trzy główne mechanizmy związane z różnymi rodzajami aberracji chromosomowych: (1) Zmiany strukturalne chromosomów prowadzące do utraty fragmentu (delecja) lub całego chromosomu (monosomia); (2) Aberracje liczbowe chromosomowe prowadzące do zwiększenia ilości materiału genetycznego komórki poprzez podwojenie (duplikacja) fragmentów chromosomów lub zwiększenie liczby ich kopii (trisomia, tetrasomia, itd.); (3) Przemieszczanie się materiału genetycznego pomiędzy chromosomami (translokacje, insercje) [45].

Już pierwsze wyniki badań cytogenetycznych wykazały obecność licznych aberracji chromosomowych w komórkach nowotworowych. Zauważono także różnice pomiędzy obrazem cytogenetycznym guzów nowotworowych pochodzenia mezenchymalnego i nabłonkowego. Te ostatnie charakteryzują najczęściej liczne i złożone aberracje chromosomowe, w wyniku których dochodzi głównie do utrat materiału genetycznego, podczas gdy w mięsakach stwierdza się często występowanie pojedynczych, zrównoważonych zmian chromosomowych w postaci translokacji wzajemnej (np. guz Ewinga, mięsak maziówkowy i in.) [45, 66].

1.1. Metody badań cytogenetycznych

Źródłem materiału do badań cytogenetycznych są krótkoterminowe hodowle komórkowe *in vitro*, z których uzyskuje się chromosomy metafazowe. Badania cytogenetyczne litych guzów człowieka zaczęły się intensywnie rozwijać w latach 80-tych ubiegłego wieku, kiedy udoskonalono metody uzyskiwania chromosomów metafazowych z hodowli pierwotnych tkanek guzów. Zastosowanie enzymatycznego rozdrabniania tkanek guza, opracowanie składu pożywek hodowlanych dla określonych nowotworów, użycie naczyń hodowlanych pokrytych kolagenem, szok hipotoniczny *in situ* zdecydowanie polepszyły wydajność i jakość uzyskiwanych chromosomów metafazowych [44]. Chromosomy wybarwiane są jedną z wybranych metod prążkowych, najczęściej metodą prążków G, w której stosuje się trypsynę i barwniki Giemsy (metoda GTG) lub Wrighta (GTW). Rzadziej stosuje się metodę fluorescencyjną prążków Q, w której wykorzystuje się pochodne akrydyny (QFQ) oraz prążków C, w której wybarwia się okofocentrome-

rową heterochromatynę (CBG) [5]. Powyższe procedury barwienia chromosomów i ich różne warianty określane są mianem **klasycznych metod cytogenetycznych**.

W ostatnich 20 latach dokonał się intensywny rozwój metod **cytogenetyki molekularnej**. W metodzie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) wykorzystuje się sondy molekularne znakowane różnymi fluorochromami, co umożliwia bardziej precyzyjną identyfikację aberracji chromosomowych. Ma to szczególne znaczenie w sytuacji, gdy klasyczne metody prążkowe uniemożliwiają identyfikację zmian takich jak: markery chromosomowe niewiadomego pochodzenia, złożone oraz ukryte lub widoczne pod mikroskopem świetlnym) mikrodelekcje, insercje, duplikacje lub translokacje. Z kolei zastosowanie sond molekularnych komplementarnych do genów fuzyjnych umożliwia identyfikację translokacji swoistej nie tylko w chromosomach, ale także w jądrach komórek interfazowych pochodzących zarówno z tkanki świeżej, mrożonej, jak i z materiału archiwalnego. Metoda ta jest obecnie szeroko stosowana w identyfikacji aberracji swoistych w hematologii i coraz częściej w identyfikacji aberracji swoistych w guzach litych, np. w mięsaku Ewinga, mięsaku maziówkowym oraz w tłuszczakomięsakach śluzowatym i okrągłokomórkowym [44, 46, 64]. Stosuje się także wielobarwną analizę kariotypu, która umożliwia różnokolorowe barwienie 22 par autosomów oraz chromosomów X i Y człowieka, zwana jako M-FISH (*multicolor FISH*), lub jej wariant - analiza widmowa kariotypu, określana jako SKY (*spectral karyotyping*), umożliwiające precyzyjną identyfikację aberracji chromosomowych w złożonych kariotypach [5, 24 44, 68].

Stosowana od kilku lat porównawcza hybrydyzacja genomowa - CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) pozwala z wysoką czułością (5 do 10 Mbp) określić nawet niewielkie aberracje chromosomowe, które prowadzą do niezrównoważenia kariotypu [5, 31]. Dostarcza ona informacji na temat utrat lub pojawiania się dodatkowych kopii materiału genetycznego fragmentów określonych chromosomów. Wyższość tej metody nad innymi metodami cytogenetycznymi polega na tym, że do jej zastosowania nie jest wymagane prowadzenie hodowli komórkowych, a potrzebny jest tylko DNA wyizolowany z badanej tkanki. Metodą tą nie można jednak identyfikować zmian zrównoważonych, a więc translokacji wzajemnych, co jest możliwe przy stosowaniu technik klasycznych. Ostatnio, coraz bardziej popularną stała się metoda CGH do mikromacierzy (*array CGH*), która stanowi bardziej czułą odmianą metody CGH i umożliwia identyfikację zaburzeń genomowych nawet wielkości od 10 do 100 kbp [5, 83].

1.2. Badania cytogenetyczne w nowotworach człowieka

Wyniki badań cytogenetycznych komórek nowotworowych wykazały, że większość nowotworów człowieka i to zarówno białaczek, chłoniaków złośliwych, jak i guzów litych charakteryzuje się występowaniem liczbowych i/lub strukturalnych aberracji chromosomowych. Niektóre z tych aberracji nie są przypadkowe i dla części nowotworów są one wysoce specyficzne. Aberracje te, najczęściej translokacje wzajemne, będące czasami jedyną zmianą cytogenetyczną w komórkach nowotworowych, a przyczynowo związane z transformacją nowotworową, nazwano aberracjami pierwotnymi (swoistymi). Określenie miejsc pęknięć w chromosomach uczestniczących w aberracjach swoistych, wyznaczyło drogę biologom molekularnym w poszukiwaniu i charakterystyce

molekularnej genów zlokalizowanych w tych miejscach, nazwanych genami fuzyjnymi [45], których produkty białkowe, poprzez wpływ na procesy transkrypcji DNA wywołują transformację nowotworową [44, 64].

Pierwszą translokację swoistą występującą w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej (CML) człowieka, wykryli w roku 1960 Nowell i Hungerford. Była to, jak się później okazało, translokacja $t(9;22)(q34;q11)$, w wyniku której powstaje chromosom Philadelfia (Ph). W 1980r. zidentyfikowano gen fuzyjny powstający w wyniku tej translokacji - *BCR/ABL*, który przyczynowo związany jest z transformacją nowotworową komórek pnia szpiku. W tym samym czasie odkryto translokację $t(8;14)(q24;q32)$ swoistą dla chłoniaka Burkita [17, 25, 46].

Wyniki badań cytogenetycznych wykazały obecność charakterystycznych zmian chromosomowych także w innych chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego (tab. 1) i stały się one rutynowym badaniem diagnostycznym i niezależnym czynnikiem rokowniczym w badaniach niektórych nowotworów [44, 64].

Tab. 1. Przykłady swoistych aberracji chromosomowych występujących w komórkach nowotworowych układu krwiotwórczego człowieka [9, 46]

Tab. 1. *Specific chromosomal aberrations in leukemic bone marrow cells [9, 46]*

Rodzaj nowotworu <i>Leukemia type</i>	Aberracje Chromosomowe <i>Chromosome aberrations</i>	Geny fuzyjne <i>Fusion genes</i>
Ostra białaczka limfoblastyczna <i>Acute lymphocytic leukemia</i> (ALL)	$t(1;19)(q23;p13)$ $t(4;11)(q21;q23)$	<i>PBX-E2A</i> <i>AF4-MLL</i>
Ostra białaczka szpikowa <i>Acute myeloid leukemia (AML)</i>		
M2	$t(8;21)(q22;q22)$	<i>ETO-AML1</i>
M3	$t(15;17)(q22;q11-21)$	<i>PML-RARA</i>
M4	$inv(16)(p13q22)$	<i>CBFB-MYH11</i>
M5	$t(9;11)(p21;q23)$	<i>AF9-MLL</i>
Zespoły mielodysplastyczne <i>Myelodysplastic syndromes</i> (MDS)	$del(5q)$, -7, +8, $del(20q)$, -Y	
Przewlekła białaczka szpikowa <i>Chronic myeloid leukemia</i> (CML)	$t(9;22)(q34;q11)$	<i>BCR-ABL</i>
Chłoniak nieziarniczy <i>Malignant lymphoma</i>	$t(14;18)(q23;q21)$	<i>IGH-BCL2</i>
Chłoniak Burkita <i>Burkitt's lymphoma</i>	$t(8;14)(q24;q32)$	<i>c-MYC-IGH</i>

1.2.1. Aberracje chromosomowe w mięsakach człowieka

W katalogu Mitelmana zgromadzono ponad 54 tysiące nieprawidłowych kariotypów nowotworów człowieka, z czego nowotwory hematologiczne stanowią ponad 38

tysiący (> 70%) a guzy lite ponad 14 tysięcy kariotypów (27%). Spośród guzów litych, mięsaki tkanek miękkich liczą około 1200 (>8%), a kości 570 (4%) guzów [64, 65].

Tab. 2. Aberracje chromosomowe typowe dla niektórych rodzajów niezłośliwych oraz złośliwych nowotworów tkanek miękkich człowieka [44, 64]

Tab. 2. *Specific chromosomal aberrations in some benign and malignant soft tissue sarcomas [44, 64]*

Rodzaj guza nowotworowego <i>Tumor type</i>	Aberracje chromosomowe <i>Chromosome aberrations</i>	Geny fuzyjne <i>Fusion genes</i>
<i>Guzy niezłośliwe / Benign tumors</i>		
Tłuszczak <i>Lipoma</i>	t(3;12)(q27-28;q13-15) translokacje z udziałem regionu / <i>translocations</i> 6p21-23; 13q12-22, 12q13-15	<i>HMGIC-LPP</i> , mutacje / <i>mutations HMGIC-LPP</i>
Tłuszczak zarodkowy <i>Lipoblastoma</i>	translokacje z udziałem regionu / <i>translocations</i> 8q11-13	
Zimowiak <i>Hibernoma</i>	translokacje z udziałem prążka / <i>translocations</i> 11q13, 12q13-15	
Mięśniak gładkokomórkowy macicy <i>Leiomyoma uteri</i>	aberracje chromosomu / <i>chromosomal aberrations</i> 6p, delecje / <i>deletions</i> 7q, 13q, +12	
<i>Guzy złośliwe / Malignant tumors</i>		
Tłuszczakomięsak śluzowaty/okrągłokomórkowy <i>Myxoid/round cell liposarcoma</i>	t(12;16)(q13.3;p11.2) t(12;22)(q13;q12)	<i>FUS-DDIT3(CHOP)</i> <i>EWSR1-DDIT3(CHOP)</i>
Tłuszczakomięsak odróżniony / <i>Dedifferentiated liposarcoma</i>	chromosomy pierścieniowe (r), olbrzymie chromosomy markerowe, tas <i>ring (r), large marker chromosomes, tas</i>	Amplifikacja / <i>amplification</i> 12q, często / <i>often</i> <i>MDM2</i> lub / <i>or</i> <i>CDK4</i>
Mięśniakomięsak prążkowano-komórkowy pęcherzykowy <i>Rhabdomyosarcoma alveolare</i>	t(2;13)(q35-7;q14); t(1;13)(p36;q14)	<i>PAX 3-FOXO1A</i> <i>PAX 7-FOXO1A</i>
Mięsak maziówkowy <i>Synovial sarcoma</i>	t(X;18)(p11.2;q11.2)	<i>SS18(SYT)-SSX1-4</i>
Mięsak Ewinga, PNET - obwodowy niedojrzały guz neuroektodermalny <i>Ewing's sarcoma, PNET- peripheral primitive neuroectodermal tumor</i>	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q21;q12) t(7;22)(p22;q12) t(17;22)(q12;q12) t(2;22)(q33;q12)	<i>EWSR1- FLI1</i> <i>EWSR1- ERG</i> <i>EWSR1- ETV1</i> <i>EWSR1- ETV4</i> <i>EWSR1- FEV</i>
Pozaszkieletowy chrząstniakomięsak śluzowaty <i>Extraskeletal myxoid chondrosarcoma</i>	t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11) t(9;15)(q22;q21)	<i>EWSR1-NR4A3</i> <i>RBP56-NR4A3</i> <i>TCF12- NR4A3</i>

Rodzaj guza nowotworowego <i>Tumor type</i>	Aberracje chromosomowe <i>Chromosome aberrations</i>	Geny fuzyjne <i>Fusion genes</i>
<i>Guzy złośliwe / Malignant tumors</i>		
Drobnokomórkowy desmoplastyczny guz dziecięcy jamy brzusznej <i>Desmoplastic small-round cell tumor</i>	t(11;22)(p.13;q12)	<i>EWSR1-WT1</i>
Mięsak jasnokomórkowy <i>Clear cell sarcoma</i>	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWSR1-ATF1</i>
Włókniakomięsak guzowaty skóry <i>Dermatofibrosarcoma protuberans</i>	r(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>

1.2.1.1. Aberracje pierwotne (swoiste)

Mięsak Ewinga jest pierwszym, litym guzem nowotworowym człowieka, w którym wykryto swoistą, wzajemną translokację chromosomową t(11;22)(q24;q12), obecną w ponad 90% guzów. W wyniku tej translokacji najczęściej następuje połączenie się genu *EWSR1* zlokalizowanego w chromosomie 22q12 z genem *FLII* znajdującym się w chromosomie 11q24, w wyniku czego powstaje gen fuzyjny *EWSR1-FLII*. Białkowy produkt tego genu ma zdolność wiązania się z DNA i aktywowania procesów transkrypcji. Translokację t(11;22) oraz jej warianty (tab. 1) wykryto również w obwodowych niedojrzałych guzach neuroektodermalnych (PNET), co w połączeniu z wynikami innych badań molekularnych (ekspresja białka p30/32 powstającego na matrycy genu *MIC2*) może świadczyć o wspólnym pochodzeniu tych nowotworów [37, 44, 64].

1.2.1.2. Aberracje wtórne

W komórkach nowotworowych, obok aberracji swoistych, mogą występować dodatkowe, czasami liczne zmiany chromosomowe, które określa się jako zmiany wtórne. Nie wykazują one takiej swoistości jak aberracje pierwotne i prawdopodobnie związane są z progresją nowotworu. Znaczenie tych aberracji najlepiej poznano w przypadku chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. W ostrej białaczce szpikowej (AML) występowanie wtórnych aberracji w postaci monosomii chromosomów 7 i Y czy trisomii chromosomu 8 ma znaczenie rokownicze [67].

Zmiany wtórne występują także w guzach tkanek miękkich człowieka i obserwuje się je zarówno w guzach pierwotnych, wznowach jak i guzach przerzutowych. Przykładem takiej zmiany liczbowej jest trisomia chromosomu 8, którą stwierdza się w: mięsaku jasnokomórkowym (70% guzów), mięsaku Ewinga (29%), tłuszczakomięsaku śluzowatym (26%) oraz w mięsaku maziówkowym (14%). Z kolei przykładem wtórnej, strukturalnej zmiany chromosomowej jest niezrównoważona translokacja der(16)t(1;16)(q11-21;q11-13), następstwem której jest częściowa monosomia chromosomu 16 i częściowa trisomia chromosomu 1. Występuje ona w wielu nowotworach, w tym w 11% mięsaków Ewinga [44, 66].

1.3. Charakterystyka cytogenetyczna wybranych typów mięsaków

Mięsaki, to pochodzenia mezenchymalnego, lite guzy nowotworowe człowieka lokalizujące się głównie w tkankach miękkich i kościach. Histologicznie jest to bardzo zróżnicowana grupa stanowiąca mniej niż 1% wszystkich nowotworów człowieka. Częstośći występowania niezłośliwych guzów tkanek miękkich określa się na 3000/milion a złośliwych guzów 30/milion [18].

Z punktu widzenia cytogenetyki, mięsaki możemy podzielić na dwie grupy: pierwsza, charakteryzuje się występowaniem aberracji swoistych np. mięsak Ewinga, tłuszczakomięsak śluzowaty/okrągłokomórkowy, mięsak maziówkowy (tab. 1) i druga ze złożonymi kariotypami, wykazującymi liczne strukturalne i/lub liczbowe aberracje chromosomowe, w których dotąd nie wykryto aberracji swoistych. Do tej ostatniej grupy należą mięsaki wrzecionowatokomórkowe i pleomorficzne wieku dorosłego: mięśniakomięsak gładkokomórkowy (*leiomyosarcoma*), złośliwy nowotwór osłonek nerwów obwodowych (*MPNST*), wielopostaciowy tłuszczakomięsak (*pleomorphic liposarcoma*) i in. [1, 44, 64].

1.3.1. Tłuszczakomięsaki (*Liposarcoma- LPS*)

Tłuszczakomięsaki stanowią około 20% wszystkich nowotworów tkanek miękkich u dorosłych. Jest to grupa zróżnicowana histologicznie i wyróżnia się w niej cztery podtypy: dobrze zróżnicowany (*well-differentiated liposarcoma* - WDLPS), odróżnicowany (*dedifferentiated liposarcoma* - DDLPS), śluzowaty i okrągłokomórkowy (*myxoid, round-cell liposarcoma* - M/RLPS) oraz wielopostaciowy (*pleomorphic liposarcoma* - PLPS) [62, 83, 109].

Tłuszczakomięsak dobrze zróżnicowany klasyfikowany jest jako nowotwór o miejscowej złośliwości i stanowi od 40 do 45% wszystkich LPS. Występuje głównie u osób w 6-7 dekadzie życia i lokalizuje się najczęściej w mięśniach uda, rzadziej zaotrzewnowo i śródpiersiu. Tłuszczakomięsak odróżnicowany to złośliwa postać nowotworu, która w 90% powstaje *de novo*, a w 10% w wyniku odróżnicowania WDLPS. Występuje głównie u osób w wieku średnim, najczęściej lokalizuje się zaotrzewnowo i w 10-15% daje przerzuty. Śluzowata postać tłuszczakomięsaka (MLPS) to ponad 1/3 wszystkich LPS, występuje w 4-5 dekadzie życia u pacjentów obojga płci i najczęściej (2/3 przypadków) lokalizuje się w mięśniach uda [83].

1.3.1.1. Cytogenetyka klasyczna

Guzy WDLPS charakteryzują się cytogenetycznie występowaniem chromosomów pierścieniowych (r) i/lub olbrzymich chromosomów markerowych (mar). Struktura centromerów w tych markerach nie jest widoczna, ponieważ jednak chromosomy te nie ulegają utracie w trakcie podziałów komórkowych, centromery zachowują swoją funkcję. Okazało się mianowicie, że w chromosomach tych brak jest sekwencji α satelitarnego DNA, ale zachowane są białka kinetochoru, których obecność wykryto badaniami immunologicznymi z zastosowaniem przeciwciał anty-CENCP [20, 89]. W WDLPS powyższe aberracje (czasami kilka ich kopii) występują najczęściej obok 46 prawidłowo-

wych chromosomów. Opisano również guzy, w których obok zmian charakterystycznych stwierdzano dodatkowe, liczbowe i/lub strukturalne wtórne zmiany chromosomowe. Komórki WDLPS najczęściej wykazują stopień ploidii 2n, tylko sporadycznie 3n. Oprócz wyżej wymienionych aberracji, w komórkach WDLPS, mogą występować, czasami liczne, kopie małych chromosomów nazywanych *dmin* [83].

W guzach DDLPS stwierdzono podobne zmiany chromosomowe jak WDLPS, w postaci chromosomów pierścieniowych (r) i/lub olbrzymich chromosomów markerowych (*giant chromosomes*) oraz małe chromosomy (*dmin*). Nowotwór ten czasami charakteryzuje występowanie wielu podklonów komórkowych z licznymi kopiami ww. markerów oraz obecność wtórnych aberracji chromosomowych [83].

Guzy śluzowate (MLPS) charakteryzuje występowanie wysoce swoistej (>95% guzów) translokacji t(12;16)(q13.3;p11.2), która została po raz pierwszy opisana w 1986r. [39]. W prawie połowie przypadków MLPS translokacja ta, lub jej wariant - w 5% jest to t(12;22)(q13;q12), występuje jako jedyna zmiana cytogenetyczna i nie stwierdza się jej w innych nowotworach, z wyjątkiem postaci okrągłokomórkowej - RLPS, co świadczy o jej znaczeniu w rozwoju w obu postaciach tłuszczakomięsaków. W wyniku tej translokacji dochodzi do fuzji genów *DDIT3* (*CHOP*) i *FUS* zlokalizowanych odpowiednio w chromosomach 12q13 i 16p11. Produkty genów fuzyjnych mają zdolności wiązania się z DNA i aktywowania procesów transkrypcji [44, 64].

Obecność t(12;16) w guzach MLPS ma szczególne znaczenie w diagnostyce różnicowej tego nowotworu ze śluzowatymi postaciami innych nowotworów takimi jak: śluzowata postać włókniaka histiocytarnego (*myxofibrosarcoma*), chrzęstniakomięsak śluzowaty (*myxoid chondrosarcoma*) oraz tłuszczak zarodkowy (*lipoblastoma*) [23, 45].

Wśród zmian wtórnych w guzach LPS najczęściej obserwuje się trisomie chromosomów: 8 (26% guzów), 7 (12%) i 5(8%); aberracje strukturalne chromosomów 7, w tym i(7)(q10) oraz 1p11 i 9q13 [51].

1.3.1.2. Cytogenetyka molekularna

Wyniki badań FISH wykazały, że chromosomy pierścieniowe i olbrzymie chromosomy markerowe występujące w guzach WDLPS, zbudowane są z DNA pochodzącego z chromosomu 12 [77]. Stosując sondy specyficzne dla genów zlokalizowanych w 12q13-15, wykazano obecność amplifikacji genu *MDM2* oraz zlokalizowanych w jego sąsiedztwie innych genów: *SAS*, *CDK4* oraz *HMG2A*. Nie obserwowano natomiast amplifikacji genów zlokalizowanych w pobliżu centromeru tego chromosomu, takich jak: *GLI* lub *DDIT3* (*CHOP*) [47, 83, 88]. Metodami cytogenetyki molekularnej, zarówno w guzach WDLPS jak i DDLPS, wykazano amplifikację fragmentu chromosomu 12q13-q15, w którym zlokalizowane są geny *MDM2*, *CDK4*, oraz *SAS* i *HMGIC*. W komórkach guzów WDLPS gen *MDM2* ulega nie tylko amplifikacji, ale obserwuje się także jego nadekspresję [83, 93].

Dzięki metodzie FISH wykazano, że mutacje genu *DDIT3* (*CHOP*) są charakterystyczne dla tłuszczakomięsaków śluzowatego i okrągłokomórkowego. Występują one także w wariacie t(12;22), ale nie stwierdza się ich w żadnym innym nowotworze z aberracjami regionu chromosomu 12q13-15 (tłuszczaku, zimowiaku, WDLPS, mięśniaku macicy, gruczolaku wielopostaciowym ślinianek i obłoniaku krwionośnym). Przypuszcza się, że produkt białkowy genu *DDIT3* zaangażowany jest w różnicowanie ko-

mórek tłuszczowych [44, 83]. Dostępność komercyjnych sond tego genu, umożliwiających identyfikację aberracji w jądrach interfazowych, ma obecnie zastosowanie w diagnozowaniu M/RLPS i różnicowaniu z innymi postaciami śluzowatymi nowotworów.

Badania CGH w różnych typach histologicznych LPS wykazały, że najczęściej dodatkowe kopie materiału genetycznego (w tym amplifikacja) są przyczyną zaburzeń równowagi genomowej. Tylko sporadycznie spotyka się utratę materiału genetycznego, a wyjątek stanowią guzy pleomorficzne, w których stwierdza się liczne aberracje chromosomowe prowadzące do utraty materiału genetycznego [54, 83].

Opublikowano wyniki badań CGH ponad 60 guzów WDLPS oraz 37 guzów DDLPS [26, 30, 47, 61, 76, 80, 85, 87, 100, 101]. W obydwu nowotworach wykazano amplifikacje chromosomu 12q13-q22 z tym, że częściej amplifikacji ulega region 12q14-q15 aniżeli 12q21-q22. Amplifikacji tej nie stwierdza się w innych podtypach LPS, ale wykryto ją także w komórkach złośliwego włókniaka histiocytarnego (MFH) [12]. W wielu guzach WDLPS wykazano także amplifikację chromosomu 1q21-23, podczas gdy w innych LPS występuje ona sporadycznie [100, 101]. Natomiast w wielu guzach DDLPS stwierdza się obecność dodatkowych kopii chromosomów 6q i 20q [54, 83, 85].

Wyniki badań CGH ponad 40 guzów M/RLPS w 57% przypadków wykazały kariotyp zrównoważony. W pozostałych guzach przyczyną niezrównoważenia kariotypu były przede wszystkim dodatkowe kopie materiału genetycznego, które najczęściej dotyczyły fragmentów lub całego chromosomu 8, rzadziej 13q, 5p i q czy 18q [71, 76, 83, 85, 100].

1.3.2. Mięsaki maziówkowe (*Synovial sarcoma* - SS)

Mięsak maziówkowy stanowi od 5 do 10% wszystkich guzów tkanek miękkich. Występuje przede wszystkim u ludzi młodych, częściej u mężczyzn. Lokalizuje się w różnych miejscach organizmu, najczęściej na głowie i karku, ścianie klatki piersiowej oraz śródpiersiu. Histologicznie wyróżnia się trzy podtypy SS: jednofazowy (*monophasic*), dwufazowy (*biphasic*) oraz niskozróżnicowany (*poorly differentiated*) [63, 82, 110].

1.3.2.1. Cytogenetyka klasyczna

W ponad 95% guzów, niezależnie od podtypu histologicznego, stwierdza się występowanie wysoce swoistej translokacji wzajemnej t(X;18)(p11.2;q11.2), która została opisana po raz pierwszy w 1986r [40]. Wykrycie tej translokacji miało doniosłe znaczenie w diagnostyce różnicowej guzów SS z innymi wrzecionowatokomórkowymi postaciami nowotworów tkanek miękkich, takich jak: włókniakomięsak, obłoniak krwionośny, mięsak jasnokomórkowy czy złośliwy nerwiak osłonowy [45].

Wykrycie aberracji swoistej nie umożliwia określenia podtypu histologicznego SS, jak to ma miejsce w LPS, gdzie wykrycie t(12;16) wyklucza rozpoznanie WDLPS czy DDLPS a potwierdza M/RLPS, ponieważ t(X;18) stwierdzana jest we wszystkich podtypach SS [82]. Mniej niż 10% SS charakteryzuje się obecnością wariantów translokacji swoistej, w które zaangażowane są, obok chromosomów X i 18, różne autosomy [74, 82]. Aberrację swoistą, lub jej warianty stwierdza się zarówno w guzach pierwotnych,

wznowach jak i w odległych przerzutach. Z tym, że w połowie guzów pierwotnych jest to jedyna obserwowana zmiana chromosomowa, natomiast w większości wznów i guzów przerzutowych towarzyszą jej liczne zmiany wtórne [44]. W wyniku translokacji dochodzi do fuzji genu *SS18 (SYT)* zlokalizowanego w prążku q11.2 chromosomu 18 z genem *SSX1* lub *SSX2* (bardzo rzadko *SSX4*) znajdującymi się w chromosomie X w prążkach p11.23 i p11.21 [44, 37, 54].

Wśród aberracji wtórnych i to zarówno w guzach pierwotnych, wznowach i guzach przerzutowych obserwowano najczęściej aberracje liczbowe chromosomów: 3, 14, 17, 11 i 22 (monosomie) oraz trisomie 7, 8, 12, 9, 21, 2, 4 i 15. Spośród aberracji strukturalnych najczęściej stwierdzano utraty chromosomu 3p21 oraz 17p13. Zauważono, że trisomia chromosomu 2 występuje wyłącznie w guzach przerzutowych i wznowach, a trisomia chromosomu 8 w guzach pierwotnych i wznowach [54, 82, 97].

1.3.2.2. Cytogenetyka molekularna

Zastosowanie sond molekularnych genów *SSX1* i *SSX2* umożliwia nie tylko stwierdzenie obecności aberracji swoistej, ale również określa, który z genów *SSX* jest zaangażowany w tę translokację. Wykazano, że translokacja swoista występuje w obydwu komponentach morfologicznych komórek w SS dwufazowym i w 85 - 95% przypadków zaangażowany jest gen *SSX1* [4]. Natomiast w guzach jednofazowych geny *SSX1* i *SSX2* zaangażowane są z jednakową częstością (po ok. 50%) [82, 69].

Wydawało się początkowo, że w danym guzie występuje jeden typ genu fuzyjnego [82]. Jednak w 2002 r. Yang i wsp. wykazali w 12/120 guzów współwystępowanie w jednym guzie dwóch postaci genów fuzyjnych - *SYT/SSX1* i *SYT/SSX2*. Zjawisko to, wg tych autorów, może być spowodowane poliklonalnym charakterem badanych guzów - powstanie dwóch niezależnych mutacji w czasie wzrostu guza pierwotnego lub, przy założeniu monoklonalnego pochodzenia nowotworu, pojawienie się drugiej mutacji, może być zmianą wtórną w czasie progresji guza [112].

Metodą CGH zbadano ok. 100 guzów SS [82, 69], z czego w 55% wykazano nierównowagę (częściej dodatkowe kopie aniżeli utraty chromosomów) kariotypu. W podtypie jednofazowym obserwowano 2x więcej aberracji na guz w porównaniu z dwufazowymi, ale nie wykryto zmian specyficznych dla danego podtypu histologicznego [69]. Najczęściej obserwowano dodatkowe kopie chromosomów: 8q, 12q, 7, 2, 17q, 1q, Xq, 18q i 16p oraz utraty chromosomów: 13q, 3p, 3q, 10q, Xq, 1q, 11q i 16p. Nie znaleziono specyficznych wtórnych zmian liczbowych, których obecność miałaby wpływ na długość całkowitego czasu przeżycia lub czasu wolnego od przerzutów pacjentów [82], ale stwierdzono gorsze rokowanie w przypadku wystąpienia trzech i więcej zmian liczbowych w guzie [54, 69]. Zaobserwowano także, że trisomia chromosomu 8 lub jego fragmentów w komórkach nowotworu ma wpływ na tempo wzrostu guza - najczęściej stwierdzana jest ona w guzach o średnicy ponad 5cm [82].

Wykrycie aberracji swoistych w wielu typach mięsaków oraz znajomość lokalizacji i struktury genów zlokalizowanych w miejscach pęknięć swoistych translokacji chromosomowych, wprowadziło metody cytogenetyki klasycznej i molekularnej do procedur diagnostycznych wielu nowotworów [45]. Znaczenie badań cytogenetycznych w diagnoście wielu mięsaków jest niezaprzeczalne, natomiast nieliczne są doniesienia dotyczące znaczenia tych badań w prognozowaniu klinicznym, co wynika głównie z faktu, iż

ośrodki zajmujące się tymi badaniami, nie dysponują odpowiednio liczną grupą pacjentów z danym typem mięsaka (niska częstość występowania), aby dobrze zbadać to zjawisko. Pojawiły się próby określenia związku pomiędzy molekularnie scharakteryzowanym guzem a przebiegiem klinicznym choroby, czego przykładem może być mięsak maziówkowy. Zaobserwowano mianowicie, że pacjenci, w guzach których występował gen fuzyjny *SYT/SSX2*, mieli dłuższe czasy przeżycia wolne od przerzutów aniżeli pacjenci z genem *SYT/SSX1*. Stwierdzono, iż lepsze rokowanie mają pacjenci, u których w guzach wykryto pojedyncze aberracje chromosomowe i gen *SYT/SSX2*, w porównaniu do pacjentów z licznymi aberracjami i genem *SYT/SSX1* [45].

Jak przedstawiono powyżej, w literaturze jest wiele doniesień opisujących wyniki badań cytogenetycznych w mięsakach człowieka, przeprowadzonych z wykorzystaniem zarówno metod cytogenetyki klasycznej jak i molekularnej. Jednak w większości przypadków przedstawiano wyniki badań cytogenetycznych uzyskanych tylko jedną z tych metod. Niewiele jest doniesień, w których przeprowadzono badania jednego guza nowotworowego i wykorzystano w tym celu kilka metod cytogenetycznych: klasyczną, FISH i CGH. Nieliczne są publikacje, w których prześlędzono ewolucję kariotypów uzyskiwanych z kilku następujących po sobie guzów w trakcie trwania choroby u jednego pacjenta. Nieliczne są także doniesienia dotyczące guzów, w których porównano stopień zaburzeń równowagi kariotypów uzyskanych metodami klasycznej cytogenetyki z wynikami analizowanymi metodą CGH.

2. CELE PRACY

Poprzez równoczesne zastosowanie metod cytogenetyki klasycznej i molekularnej w analizie aberracji chromosomowych występujących w guzach tłuszczakomięsaków i mięsaków maziówkowych człowieka postanowiono:

1. Scharakteryzować zaburzenia genomowe w komórkach tych mięsaków z uwzględnieniem podtypów histologicznych.
2. Określić częstości występowania swoistych aberracji chromosomowych i ich wariantów oraz aberracji wtórnych w powyższych mięsakach.
3. Porównać stopień zaburzeń genomowych w guzach pierwotnych, wznowach miejscowych i guzach przerzutowych oraz w obrębie podtypów obu rodzajów mięsaków.
4. Prześledzić ewolucję zmian cytogenetycznych w guzach mięsaków pojawiających się w trakcie trwania choroby u jednego pacjenta.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

Badaniom cytogenetycznym poddano metafazy uzyskane z komórek 70 guzów tłuszczakomięsaka pochodzących od 44 pacjentów oraz 23 guzów mięsaka maziówkowego od 17 pacjentów. Dane kliniczne i histologiczne podano w Aneksie w tab. 26, 27 i 28 dla guzów LPS oraz w tab. 29 dla SS. Materiał badawczy uzyskiwano z tkanek guzów pacjentów, którzy poddawani byli zabiegom operacyjnym w czterech polskich ośrodkach:

- Katedry i Kliniki Chirurgii Onkologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) (kierownik: prof. dr hab. n. med. A. Kopacz). Ocenę histopatologiczną preparatów z tkanek nowotworowych wykonano w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii GUMed (dr n. med. E. Iżycka-Świeszewska; kierownik: prof. dr hab. n. med. K. Jaśkiewicz)
- Zakładu Patologii Nowotworów, Centrum Onkologii, Oddział w Krakowie (kierownik: dr hab. n. med. J. Ryś)
- Zakładu Patologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (kierownik: prof. dr hab. n. med. R. Kordek)
- Zakładu Patomorfologii Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie (prof. dr hab. n. med. M. Chosia; kierownik: prof. dr hab. n. med. W. Domagała)

Weryfikację histologiczną wszystkich guzów przeprowadzili prof. M. Miettinen oraz dr n. med. J. Lasota z Department of Soft Tissue Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, USA.

W pracy dodatkowo wykorzystano kariotypy sześciu guzów LPS [23, 86] i 37 guzów SS [40, 42, 43, 50, 74, 96] opublikowanych przez pracowników Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki GUMed. Na podstawie tych kariotypów określono zaburzenia równowagi genomowej guzów. Ponadto, wykorzystując materiał archiwalny (skrawki mikroskopowe), wykonano badania FISH. Zarówno ocena zaburzeń genomu, jak również wyniki badań FISH tych guzów, nie były przedmiotem wcześniejszych publikacji.

Badania FISH wykonano we wszystkich guzach M/RLPS i SS, w których stwierdzono kariotyp prawidłowy lub, gdy w kariotypie z aberracjami chromosomowymi nie wykryto aberracji swoistej dla danego nowotworu. W przypadku, gdy kariotyp określono w kilku guzach pochodzących od jednego pacjenta i w każdym badaniu cytogenetycznym stwierdzano obecność translokacji swoistej, badanie FISH wykonywano na materiale pochodzącym tylko z jednego guza.

3.1.1. *Tłuszczakomięsaki (LPS)*

Wśród 70 badanych guzów (tab.3), 23 (pochodzące od 18 pacjentów: siedmiu kobiet i 11 mężczyzn, wiek 27-65 lat, średnio - 45 lat) stanowiły WDLPS (tłuszczakomięsaki dobrze zróżnicowane / *well-differentiated liposarcoma*), 19 (od dziewięciu pacjentów: pięciu kobiet i czterech mężczyzn, wiek 31-78 lat, średnio - 51 lat) DDLPS (tłuszczako-

mięsaki odróżnicowane / *dedifferentiated liposarcoma*) oraz 28 guzów (od 17 pacjentów: osiem kobiet i dziewięciu mężczyzn, wiek 25-60 lat, średnio - 49 lat) M/RLPS (tłuszczakomięsaki śluzowate/okrągłokomórkowe - *myxoid/round-cell liposarcoma*). Do tej ostatniej grupy dodano sześć guzów (od czterech pacjentów), których wyniki badań cytogenetycznych zostały opublikowane, lecz bez oceny zaburzeń genomu i badań FISH [23, 86]. Łącznie zbadano 34 guzy (20 pacjentów) M/RLPS. Dane kliniczne, histologiczne oraz cytogenetyczne opublikowanych wyników badań podano w Aneksie w tab. 30.

Metodą CGH poddano analizie: 21/23 guzów WDLPS, 15/19 guzówDDLPS oraz 16/34 guzów M/RLPS. W 21 guzach M/RLPS wykonano badania FISH stosując sondy swoiste dla genu *DDIT3* (*CHOP*).

Tab. 3. Podtypy histologiczne badanych cytogenetycznie 70 guzów tłuszczakomięsaków z podziałem na guzy pierwotne (P), wznowy (R) i guzy przerzutowe (M)

Tab. 3. *Histological subtypes of 70 cytogenetically examined tumors divided into primary (P), recurrent (R) and metastatic (M) liposarcoma*

Podtyp/ <i>Subtype</i>	P	R	M	Razem/ <i>Total</i>
WD	10	13	-	23
DD	3	10	6	19
M/R	5	13	10	28
Razem/ <i>Total</i>	18	36	16	70

WD- dobrze zróżnicowany, DD- odróżnicowany, M/R- śluzowaty/okrągłokomórkowy
WD- *well-differentiated*, DD- *dedifferentiated*, M/R- *myxoid/round-cell*

3.1.2. Mięsaki maziówkowe (SS)

Analizę cytogenetyczną przeprowadzono na chromosomach z 23 guzów (od 17 pacjentów: siedmiu kobiet i 10 mężczyzn, wiek 17-71 lat, średnio - 42 lata), trzech podtypów histologicznych: 17 guzów jednofazowych (MoSS), jeden dwufazowy (BiSS) oraz pięć guzów niskozróżnicowanych (PDSS). Wśród SS analizowanych cytogenetycznie, uwzględniono pięć guzów, których wyniki kariotypów opublikowano w 2009 roku [28]. Do tej grupy nowotworów dodano 37 guzów (od 25 pacjentów), których kariotypy były opublikowane (przed 2009r.) przez zespół Katedry Biologii i Genetyki GUMed, lecz bez oceny zaburzeń genomowych [40, 42, 43, 50, 74, 96]. Wśród guzów opublikowanych było: 19 guzów MoSS, 12 BiSS oraz sześć PDSS, w których w niniejszej pracy określono zaburzenia równowagi genomowej w oparciu o kariotypy oraz badania FISH z zastosowaniem sondy swoistej dla genu *SS18* (*SYT*). Łącznie zbadano 60 guzów SS (42 pacjentów) (tab. 4). Dane kliniczne, histologiczne oraz genetyczne opublikowanych (przed 2009r.) wyników podano w Aneksie w tab. 31.

Metodą CGH analizowano 15/60 guzów SS, 25 guzów metodą FISH z zastosowaniem sond swoistych dla genu *SS18* (*SYT*), a w 10 z zastosowaniem sond swoistych dla genów *SSX1* i *SSX2*.

Tab. 4. Podtypy histologiczne 60 guzów mięsaków maziówkowych z podziałem na guzy pierwotne (P), wznowy (R) i guzy przerzutowe (M)

Tab. 4. *Histological subtypes of 60 synovial sarcoma tumors divided into primary (P), recurrent (R) and metastatic (M) tumors*

Podtyp / Subtype	P	R	M	Razem / Total
Mo	13	19	4	36
Bi	3	10	-	13
PD	4	6	1	11
Razem / Total	20	35	5	60

Mo- jednofazowy, Bi- dwufazowy, PD- niskozróżnicowany
Mo- monophasic, Bi- biphasic, PD- poorly differentiated

3.2. Metody

3.2.1. Hodowle komórkowe *in vitro*

Fragmety tkanek guzów nowotworowych pobrane podczas operacji umieszczano w jałowym naczyniu z pożywką (płyn Hanksa; streptomycyna - 100 µg/ml i penicylina - 100 U/ml) i dostarczano do laboratorium. Z części materiału zakładano pierwotne hodowle komórkowe, a pozostały zamrażano w -80 °C.

Stosowano metodę krótkotrwałych hodowli komórkowych *in vitro*. Fragmenty tkanki nowotworowej rozdrabniano mechanicznie, a następnie enzymatycznie stosując kolagenazę (stężenie końcowe 150 U/ml hodowli). Tkankę inkubowano z enzymem przez 12 - 24 godz. w temp. 37 °C, przy 5% stężeniu CO₂ i 80% wilgotności powietrza. Uzyskaną zawiesinę komórek płukano płynem Hanksa (37 °C) i wirowano przy 100g przez 10 min. Z otrzymanego osadu komórek zakładano pierwotne hodowle, które prowadzono z użyciem pożywki hodowlanej: płyn Eagle'a z 10% ciejącą surowicą płodową (FBS), 100 µg/ml streptomycyny, 100 U/ml penicyliny i hodowano w warunkach jak podano powyżej. Zmiany pożywki dokonywano przeciętnie 2x w tygodniu. Przy pomocy mikroskopu odwróconego Axiovert 10 (*Opton*) prowadzono codzienną obserwację hodowli. Zwracano uwagę na aktywność mitotyczną komórek - zaobserwowanie dużej liczby mitoz było wskazówką do jej utrwalenia. Czas trwania hodowli wahał się od 7 do 20 dni.

Na ostatnie dwie godziny trwania hodowli dodawano *Colcemid* (*Gibco*) w stężeniu końcowym 0,05 µg/ml, zlewano pożywkę i wlewano płyn hipotoniczny *in situ* na okres 30 min. W kolejnej fazie utrwalania hodowli, mechanicznie oddzielano komórki od dna naczynia, otrzymaną zawiesinę przenoszono do probówek i wirowano przez 10 min przy 100g. Po usunięciu supernatantu, do osadu dodawano kroplami utrwalacz (metanol: kwas octowy lodowaty w stosunku objętościowym 3:1). Po upływie 20 min zawiesinę komórkową wirowano przez 10 min przy 100g. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w nowej porcji utrwalacza. Utrwalacz zmieniano dwukrotnie stosując ww. protokół [22, 41].

Utrwalone komórki zawieszano w niewielkiej objętości utrwalacza i rozlewano na zimne (4 °C), mokre szkiełka podstawowe. Preparaty przetrzymywano w temp. pok. i barwiono metodą GTW. Z każdej hodowli 1 - 2 preparaty zamrażano w temp. -20 °C.

3.2.2. Metody cytogenetyki klasycznej

3.2.2.1. Barwienie chromosomów metodą GTW

Preparaty z metafazami wybarwiano stosując metodę prążkową GTW [113] Najpierw trawiono je w 0,008% roztworze trypsyny stosując czasy od 15 do 60 s, a następnie barwiono 0,08% roztworem barwnika Wrighta. Czas barwienia wahał się od 35 do 45 s. Po zabarwieniu, preparaty płukano w wodzie bieżącej i suszono na powietrzu.

Analizę mikroskopową od 5 do 25 metafaz przeprowadzano pod mikroskopem Axioskop (*Zeiss*) przy pow. 1200×. Wybrane metafazy fotografowano kamerą automatyczną z zastosowaniem mikrofilmu negatywowego o czułości 25 ASA (*Kodak*). Analizę i zapisy aberracji liczbowych i/lub strukturalnych przeprowadzano na podstawie ułożonych kariogramów zgodnie z zasadami ISCN 2009. Za zmianę klonalną przyjmowano obecność aberracji strukturalnej lub występowanie dodatkowych chromosomów w dwóch metafazach a utratę chromosomu w co najmniej trzech metafazach [29].

3.2.3. Metody cytogenetyki molekularnej

3.2.3.1. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* - FISH

a. Barwienie chromosomów metodą M-FISH

Do badań wykorzystano komercyjny zestaw - 24XCyte Human M-FISH Painting Kit (*Metasystems*). Procedury badawcze przeprowadzono zgodnie z protokołem podanym przez producenta.

Preparaty chromosomowe trawiono pepsyną, utrwalano w zbuforowanym roztworze formaliny i denaturowano w 0.07 N NaOH. Po odwodnieniu, nakładano na szkiełko 24 zdenaturowane, różne sondy barwiące chromosomy (22 autosomy oraz chromosomy X i Y), wyznakowane pięcioma różnymi fluorochromami (DEAC, FITC, Spectrum Orange, Texas Red oraz Cy5). Preparaty hybrydyzowano 72 godz. w temp. 37 °C w komorze płyty grzewczej HYBRITE (*Vysis*), płukano i nanoszono roztwór do detekcji (zestaw przeciwciał sprzężonych z fluorochromami).

Obraz analizowano pod mikroskopem Olympus BX51 (pow. 1200×) z zestawem filtrów, sprzężonym z kamerą i połączonym z systemem komputerowej analizy obrazu - oprogramowanie ISIS (*Metasystem*). W każdym przypadku zapisywano obrazy 5-8 metafaz, z których układano kariogramy i analizowano aberracje chromosomowe.

b. Barwienie jąder interfazowych metodą FISH z zastosowaniem sond swoistych dla genów *SSX1* i *SSX2*

Do badań zastosowano wyizolowane ze sztucznych chromosomów bakteryjnych (BAC) następujące sondy: RP11-552E4 swoistą dla genu *SSX1*, RP11-552J9 dla *SSX2* oraz sondę RP11-344N17 zlokalizowaną pomiędzy ww. genami. Wszystkie chromosomy BAC z sondami pochodziły z RPC111 P. de Jong library (www.chori.org/bacpac/). Wyizolowane sondy wyznakowano techniką *nick translation* stosując komercyjne zestawy odczynników. Dwie pierwsze sondy wybarwiono biotyną stosując BIO-nick trans-

lation mix (*Roche*), a trzecią digoksygeniną przy użyciu DIG-nick translation mix (*Roche*). Procedury przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

Badania wykonano na preparatach z odciskami mrożonych fragmentów tkanek guzów SS. Pierwszym etapem było utrwalenie w mieszaninie metanol: kwas octowy lodowaty (w stosunku objętościowym 3:1). Po odwodnieniu w etanolu, preparaty trawiono pepsyną, utrwalano w zbuforowanym roztworze formaldehydu i denaturowano w 70% roztworze formamidu w temp. 75 °C. Po odwodnieniu w szeregu etanoli nakładano zdenaturowaną mieszaninę sond: RP11-552E4 zmieszana z sondą RP11-344N17 oraz RP11-552J9 także zmieszana z sondą RP11-344N17. Na szkiełko nanoszono, na dwa wybrane miejsca, sondy swoiste dla obydwu genów. Po całkowitej hybrydyzacji w temp. 37 °C w komorze płyty grzewczej HYBRITE (*Vysis*), niespecyficznie związaną sondę odplukiwano w 0,4×SSC/0,1% NP-40 (temp. 75 °C), a na preparat nanoszono roztwór do detekcji - zestaw przeciwciał sprzężonych z fluorochromami (FITC i Texas Red) oraz DAPI.

Analizę przeprowadzano pod mikroskopem fluorescencyjnym (pow. 1200×) Axioskop 20 (*Zeiss*), wyposażonym w filtry: DAPI, FITC, TRITC, kamerę o wysokiej czułości oraz system komputerowej analizy obrazu - CytoVision (*Applied Imaging*). W każdym przypadku analizowano sygnały, w co najmniej 100 nienakładających się jądrach komórkowych. Wynikiem pozytywnym (potwierdzającym pęknięcie chromosomu X w miejscu q11.2 - lokalizacja genu *SSX*) było uzyskanie (u mężczyzn) dwóch sygnałów: zielonego i czerwonego oddalonych od siebie i (u kobiet) dwóch sygnałów: zielonego i czerwonego oddalonych od siebie oraz sygnału żółtego lub leżących blisko siebie zielonego i czerwonego (z prawidłowego chromosomu X). Natomiast stwierdzenie w jądrach komórkowych tylko sygnałów żółtych i/lub leżących blisko siebie zielonego i czerwonego - oznaczało wynik ujemny, czyli brak translokacji [94].

c. Barwienie jąder interfazowych metodą FISH z zastosowaniem sond swoistych dla genów *SYT* oraz *CHOP*

Do badań wykorzystano bezpośrednio znakowane (dwukolorowe), komercyjne sondy: LSI *SYT* Dual Color Breakapart Probe (*Vysis*), w przypadku badania mięsaków maziówkowych (SS) i LSI *CHOP* Dual Color Breakapart Probe (*Vysis*), w tłuszczakomięsaku śluzowatym/okrągłokomórkowym (M/RLPS) oraz zestaw odczynników niezbędnych do wykonania oznaczenia w skrawkach parafinowych (*Paraffin Pretreatment Reagent KIT - Vysis*). Procedury przeprowadzono zgodnie z protokołem podanym przez producenta.

Tkanekę nowotworową zatopioną w parafinie, przy użyciu mikrotomu (HM340E STS, firmy *Mikrom*), cięto na skrawki o grubości 4 µm i nanoszono na szkiełka mikroskopowe (STAR FROST). Po osuszeniu, preparaty ogrzewano przez 12 godz. w temp. 56 °C, płukano je w ksylenie, odwadniano w szeregu etanoli i suszono na powietrzu.

Czas trawienia pepsyną, który wahał się od 15 do 70 min, dobierano indywidualnie dla każdego preparatu. Następnie preparaty utrwalano w zbuforowanym roztworze formaldehydu, płukano (2×SSC, pH 7,0) i suszono w temp. 45-50 °C. Na preparaty nanoszono sondy zawieszona w buforze i umieszczano w komorze płyty grzewczej HYBRITE (*Vysis*), w której odbywał się najpierw proces denaturacji DNA sondy i jąder interfazowych (5 min, temp. 72 °C), a następnie hybrydyzacji (19 godz., temp. 37 °C). Po zakoń-

czeniu tego procesu, niespecyficznie związaną sondę odplukiwano w $0,4 \times \text{SSC}/0,1\%$ NP-40 (temp. 72°C), preparaty suszono na powietrzu i barwiono DAPI.

Analizę przeprowadzono pod fluorescencyjnym mikroskopem Axioskop 20 (Zeiss, pow. $1200\times$), wyposażonym w filtry: DAPI, FITC, TRITC, kamerę o wysokiej czułości oraz systemem komputerowej analizy obrazu - CytoVision (Applied Imaging). W każdym preparacie analizowano sygnały w 100 nienakładających się jądrach komórkowych. Wynikiem pozytywnym (potwierdzającym udział chromosomu 18q11.2 w aberracji w przypadku guzów SS i 12q13 w przypadku M/RLPS) była obecność w jądrach komórkowych dwóch sygnałów: zielonego i czerwonego oddalonych od siebie oraz żółtego lub leżących blisko siebie zielonego i czerwonego pochodzącego z chromosomu prawidłowego. Jeżeli w jądrach komórkowych obserwowano tylko sygnały żółte, i/lub leżące blisko siebie zielone i czerwone - oznaczało to wynik ujemny, czyli brak translokacji [94].

3.2.3.2. Genomowa hybrydyzacja *in situ* – CGH

a. Izolacja DNA z tkanki nowotworowej

Fragmety tkanek guzów, po rozmrożeniu, rozdrabniano mechanicznie, a następnie zawieszano w roztworze $0,075\text{M NaCl}/0,001\text{M EDTA}$ z dodatkiem 10% SDS (stężenie końcowe 1%) i proteiny K (stężenie końcowe $0,1\text{ mg/ml}$). Mieszaninę inkubowano przez noc w temp. 46°C . Do strawionego materiału dodawano 6M NaCl oraz chloroform i dokładnie mieszano, a następnie wirowano przez 5 min przy 2000g . Fazę wodną przenoszono do czystej próbówki, w której DNA precypitowano poprzez zmieszanie z izopropanolem w stosunku objętościowym $1:1$. Następnie mieszaninę wirowano przez 10 min przy $16\ 000\text{g}$, a po usunięciu supernatantu, osad przemywano 70% etanolem, wirowano przez 1 min przy 900g . Uzyskany osad DNA suszono w temp. pok. i zawieszano w ddH_2O .

Stężenie DNA oznaczono przy pomocy NanoDrop ND1000 Spectrophotometer (Nano Drop Technologies). Uzyskany z komórek nowotworowych DNA rozcieńczano ddH_2O do stężenia końcowego od 150 do $500\text{ ng}/\mu\text{l}$ i przechowywano w temp. 4°C .

b. Procedura CGH

Do badań wykorzystano zestaw *Comparative Genomic Hybridization (CGH) reagent (Vysis)*. W skład zestawu wchodzi: odczynniki, w tym zestaw do znakowania sond techniką *nick translation*, DNA referencyjny (prawidłowy DNA człowieka) oraz preparaty cytogenetyczne z prawidłowymi chromosomami metafazowymi mężczyzny. Procedury badawcze przeprowadzono zgodnie z protokołem podanym przez producenta.

Pierwszym etapem było znakowanie DNA badanego oraz referencyjnego, które przeprowadzono techniką *nick translation*. DNA ($1\ \mu\text{g}$) z komórek nowotworowych znakowano fluorochromem SpectrumGreen dUTP, natomiast referencyjne ($1\ \mu\text{g}$) SpectrumRed dUTP. Następnie oba DNA zawieszano w buforze do hybrydyzacji, inkubowano przez 30 min w 37°C , a następnie poddawano denaturacji (73°C , 5 min). Preparaty cytogenetyczne denaturowano stosując 70% formamid/SSC (73°C , 5 min), a następnie odwadniano w szeregu etanoli o wzrastającym stężeniu, suszono w temp. pok. i nakła-

dano obydwie mieszaniny hybrydyzacyjne. Preparaty umieszczano w komorze płyty grzewczej *HYBRITE* (*Vysis*) i hybrydyzowano w temp. 37 °C, przez 72 godz. Po zakończeniu procesu hybrydyzacji, niespecyficznie związaną sondę odpłukiwano w 0,4xSSC/0,3%NP-40 (temp. 74 °C), preparaty suszono na powietrzu i barwiono DAPI.

Obraz analizowano przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu Axioskop 20 (*Zeiss*, 1200×) wyposażonego w filtry: DAPI, FITC, TRITC, kamerę o wysokiej czułości oraz komputera z oprogramowaniem do analizy CGH - CytoVision (*Applied Imaging*).

W pierwszym etapie układano 10-15 kariogramów z wybarwionych barwnikiem DAPI metafaz. Przy pomocy programu komputerowego analizowano stosunek intensywności sygnałów fluorescencyjnych z DNA badanego (zielony sygnał) do referencyjnego (czerwony) wzdłuż długości każdego chromosomu. Jeśli mieścił się on w przedziale 0,75-1,25 - uznawano jako wynik prawidłowy. Wartości poniżej 0,75 lub powyżej 1,25 w określonym regionie chromosomu, uznawano kolejno jako utratę lub zwiększenie liczby kopii danego regionu chromosomu w komórkach nowotworowych. Jeżeli natomiast stosunek intensywności sygnału zielonego do czerwonego był większy niż 1,5 - wskazywał na amplifikację materiału genetycznego w danym regionie chromosomu. W trakcie analizy nie uwzględniano telomerów i heterochromatyny okołocentromerowej chromosomów oraz ramion q chromosomu Y [31].

3.2.4. Metody statystyczne

Do porównania rozkładów uzyskanych wyników wykorzystano test χ^2 Pearsona, test χ^2 z poprawką Yatesa oraz dokładny test Fishera. W wynikach analiz statystycznych podano obliczony poziom istotności statystycznej (p) weryfikowanej hipotezy zerowej. Wartości $p < 0,05$ interpretowano jako znamienne statystycznie. Obliczeń dokonano przy zastosowaniu oprogramowania *STATISTICA 8* (*StatSoft Inc., USA*) dla systemu operacyjnego *Windows XP*.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka cytogenetyczna tłuszczakomięsaków

Przeprowadzono analizę cytogenetyczną chromosomów uzyskanych z 70 guzów czterech podtypów histologicznych tłuszczakomięsaków: dobrze zróżnicowanych (WDLPS) i odróżnicowanych (DDLPS) oraz śluzowatych/okrągłokomórkowych (M/RLPS).

Tab.5. Wyniki badań cytogenetycznych (metoda GTW) w guzach tłuszczakomięsaków
Tab. 5. Cytogenetic results (GTW technique) in liposarcoma tumors

Podtyp (liczba guzów) Subtype (Tumors No.)	Aberracje charakterystyczne lub swoiste <i>Characteristic or specific chromosome aberrations</i>			
	Obecne / Present		Brak / Absent	
	Wyłącznie <i>Exclusively</i>	Łącznie z wtórnymi <i>With secondary</i>	Wyłącznie wtórne <i>Secondary only</i>	Kariotyp prawidłowy <i>Normal karyotype</i>
	liczba guzów (%) / tumors No. (%)			
WD (23)	14 (60,9)	6 (26,1)	-	3 (13)
DD (19)	8 (42,1)	6 (31,6)	2 (10,5)	3 (15,8)
M/R (28)	2 (7,1)	20 (71,5)	2 (7,1)	4 (14,3)
Razem/ Total (70)	24 (34,3)	32 (45,7)	4 (5,7)	10 (14,3)

WD- dobrze zróżnicowanych, DD- odróżnicowany, M/R- śluzowaty/okrągłokomórkowy
WD- well-differentiated, DD- dedifferentiated, M/R- myxoid/round-cell

4.1.1. Aberracje chromosomowe występujące w guzach tłuszczakomięsaków dobrze zróżnicowanych – WDLPS

Spośród 23 (18 pacjentów) guzów, w 20 (87%) stwierdzono występowanie chromosomów pierścieniowych i/lub olbrzymich chromosomów markerowych. W sześciu guzach (26,1%) obserwowano towarzyszące im wtórne liczbowe i/lub strukturalne aberracje chromosomowe i stwierdzano je statystycznie znamienne rzadziej w porównaniu do guzów M/RLPS ($p=0,0013$), natomiast w porównaniu z guzami DDLPS nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ($p=0,69$). W trzech guzach (13%) kariotyp był prawidłowy (tab. 5). Zapisy kariotypów poszczególnych guzów podano w Aneksie w tab. 32.

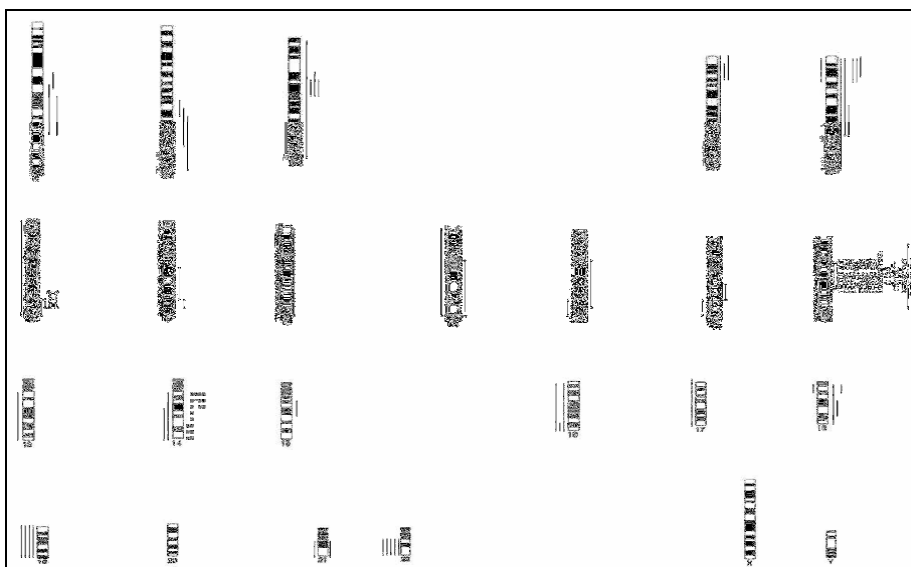
Badania CGH (ryc. 1) wykonano na DNA pochodzącym z 21 guzów. We wszystkich guzach stwierdzono zaburzenia równowagi genomowej, w postaci dodatkowych kopii materiału genetycznego. W trzech guzach występowały pojedyncze dodatkowe kopie chromosomu 12q11/13-q21/22, natomiast w 18 guzach (85,7%) amplifikacje tego chromosomu (ryc. 1). W 13 guzach (62%) wykryto wyłącznie dodatkowy materiał (tab. 6) i zmiany te znamienne statystycznie częściej występowały w guzach WDLPS w porównaniu do DDLPS ($p=0,01$) i M/RLPS ($p=0,025$). Natomiast w pozostałych ośmiu guzach (38%) stwierdzono zarówno utraty jak i dodatkowy materiał genetyczny (tab. 6) i zmiany te statystycznie znamienne częściej występowały w guzach DDLPS ($p=0,01$).

aniżeli w WDLPS, natomiast w porównaniu z guzami M/RLPS, nie stwierdzono istotnych różnic ($p=0,36$).

Tab. 6. Zaburzenia równowagi genomowej w 63 guzach tłuszczakomięsaków
Tab. 6. Genomic imbalances in 63 liposarcoma tumors

Podtyp histol. (liczba guzów) <i>Histological subtype (tumors No.)</i>	Wyłącznie dodatkowe kopie <i>Gains only</i>	Wyłącznie utruty <i>Losses only</i>	Utraty i dodatko- we kopie <i>Gains and losses</i>	Razem <i>Total</i>
	Liczba guzów / <i>Tumors No. (%)</i>			
WD (21)	13 (62)	-	8 (38)	21 (100)
DD (15)	3 (20)	-	12 (80)	15 (100)
M/R (27)	8 (27)	10 (37)	9 (33)	27 (100)

WD- dobrze zróżnicowany, DD- odróżnicowany, M/R- śluzowaty/okrągłokomórkowy
WD- well-differentiated, DD- dedifferentiated, M/R- myxoid/round-cell



Ryc. 1. Zaburzenia równowagi genomowej w 21 guzach tłuszczakomięsaków dobrze zróżnicowanych określone metodą CGH. Lewa strona diagramu chromosomów - utraty, prawa dodatkowe kopie chromosomów lub ich fragmentów, pogrubiona, przerywana linia - amplifikacja

Fig. 1. Summary of DNA copy number changes detected by the CGH method in 21 well-differentiated liposarcomas. Losses are shown on the left side of the chromosome diagram, gains on the right side. High-level amplifications are indicated by thick dotted lines

Wtórne aberracje nie zrównoważone występowały w 19 guzach (90,5%). W guzach tych stwierdzono łącznie 70 aberracji nie zrównoważonych, co daje 3,7 aberracji/guz, w tym 1,4 utrat i 2,3 dodatkowych kopii/guz. Liczbę aberracji w zależności od rodzaju guza przedstawiono w tab. 7.

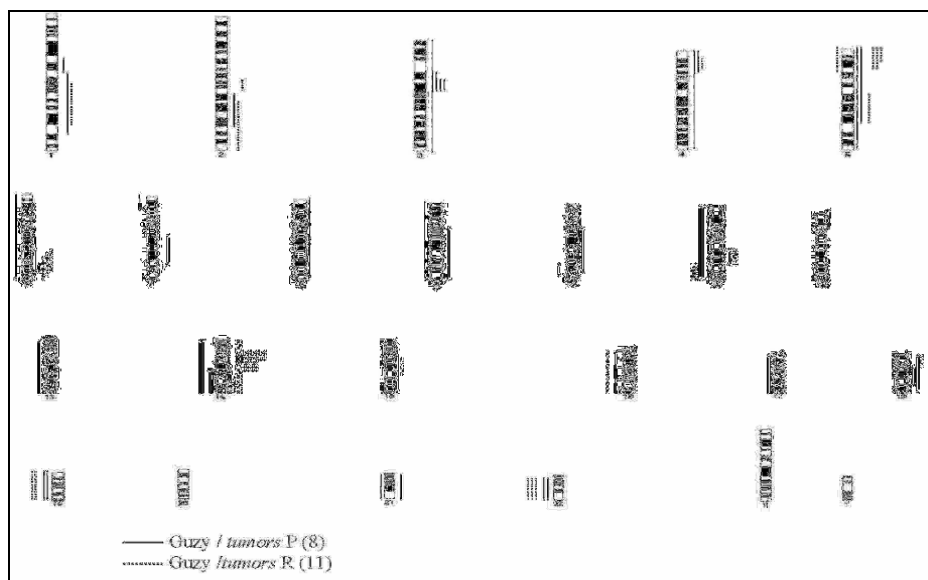
Tab. 7. Średnia liczba wtórnych aberracji niezrównoważonych w guzach pierwotnych (P), wznowach (R) i guzach przerzutowych (M) różnych podtypów tłuszczakomięśaków

Tab. 7. The average numbers of secondary unbalanced aberrations in different liposarcoma subtypes in primary (P), recurrent (R) and metastatic (M) tumors

	WD		DD			M/R		
	Rodzaj guzów (liczba) / Tumors type (No.)							
	P (8)	R (11)	P (3)	R (8)	M (3)	P (2)	R (14)	M (11)
Liczba aberracji/guz / Chromosome aberrations No./tumor								
Utraty / Losses	2,1	0,9	2,0	3,3	4,3	0,5	1,6	0,6
Dodatkowe kopie / Gains	2,6	2,1	3,3	2,3	2,3	1,0	2,3	1,3
Razem / Total	4,7	3,0	5,3	5,6	6,6	1,5	3,9	1,9

WD- dobrze zróżnicowany, DD- odróżnicowany, M/R- śluzowaty/okrągłokomórkowy
 WD- well-differentiated, DD- dedifferentiated, M/R- myxoid/round-cell

Wtórny zmianom niezrównoważonym najczęściej ulegały chromosomy: 14 (7 guzów - 36,8%), 6 (6 guzów - 31,6%), 22 (5 guzów - 26,3%) oraz 3, 11, 18 i 19 (po 4 guzy - 21,1%). Wyniki zbiorcze wszystkich aberracji niezrównoważonych w guzach WDLPS przedstawia ryc. 1. Wyniki badań poszczególnych guzów przedstawiono w tab.32 w Aneksie.



Ryc. 2. Wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe w guzach pierwotnych (P) i wznowach miejscowych (R) tłuszczakomięśaków dobrze zróżnicowanych określone metodą CGH. Lewa strona diagramu chromosomów - utraty, prawa dodatkowe kopie chromosomów lub ich fragmentów. Pogrubiona, przerywana linia - amplifikacja

Fig. 2. Secondary imbalanced chromosomal aberrations detected by the CGH method in primary (P) and local recurrent (R) tumors in well-differentiated liposarcomas. Losses are shown on the left side of the chromosome diagram, gains on the right side. High-level amplifications are indicated by thick dotted lines

Tab. 8. Najczęściej występujące wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe w guzach różnych podtypów tłuszczakomięśaków

Tab. 8. *The most frequently occurring secondary unbalanced chromosome aberrations in different subtypes of liposarcoma*

Tłuszczakomięśaki dobrze zróżnicowane (19 guzów) <i>Well-differentiated liposarcoma (19 tumors)</i>				
Rodzaj aberracji* <i>Aberration type*</i>	Rodzaj guzów/ <i>Tumors type</i>			
	P	R	M	Razem / <i>Total</i>
Liczba guzów/ <i>Tumors No. (%)</i>				
+3/+3p	4 (50)	-	-	4 (21)
+5p	2 (25)	3 (27)	-	5 (26)
+6q23/26-qter	2 (25)	3 (27)	-	5 (26)
+14q11/24-qter	-	5 (45)	-	5 (26)
-19	2 (25)	2 (18)	-	4 (21)
-22	2 (25)	3 (27)	-	5 (26)
Tłuszczakomięśaki odróżnicowane (14 guzów) <i>Dedifferentiated liposarcoma (14 tumors)</i>				
+4p/+4q	2 (66,7)	1 (12,5)	1 (33,3)	4 (28,6)
+5q14-23	1 (33,3)	2 (25)	1 (33,3)	4 (28,6)
+14q	1 (33,3)	1 (12,5)	1 (33,3)	3 (21,4)
-1p/-1q	1 (33,3)	3 (37,5)	2 (66,7)	6 (42,9)
-11p/-11q	1 (33,3)	2 (25)	2 (66,7)	5 (35,7)
-17/-17p	-	1 (12,5)	2 (66,7)	3 (21,4)
-19	-	3 (37,5)	3 (100)	6 (42,9)
-20q	-	3 (37,5)	1 (33,3)	4 (28,6)
-22	-	3 (37,5)	3 (100)	6 (42,9)
Tłuszczakomięśaki śluzowate/okrągłokomórkowe (27 guzów) <i>Myxoid/round-cell liposarcoma (27 tumors)</i>				
Rodzaj aberracji* <i>Aberration type*</i>	Rodzaj guzów/ <i>Tumors type</i>			
	P	R	M	Razem / <i>Total</i>
Liczba guzów/ <i>Tumors No. (%)</i>				
+1q	1 (50)	5 (35,7)	3 (27,3)	9 (33,3)
+8	-	5 (35,7)	1 (9,1)	6 (22,2)
-6q	-	3 (21,4)	2 (18,2)	5 (18,5)
-16p/-16q	1 (50)	2 (14,3)	1 (9,1)	4 (14,8)

+- dodatkowe kopie, - utraty, P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy,

*- wytłuszczonym drukiem zaznaczono chromosom ulegający amplifikacji

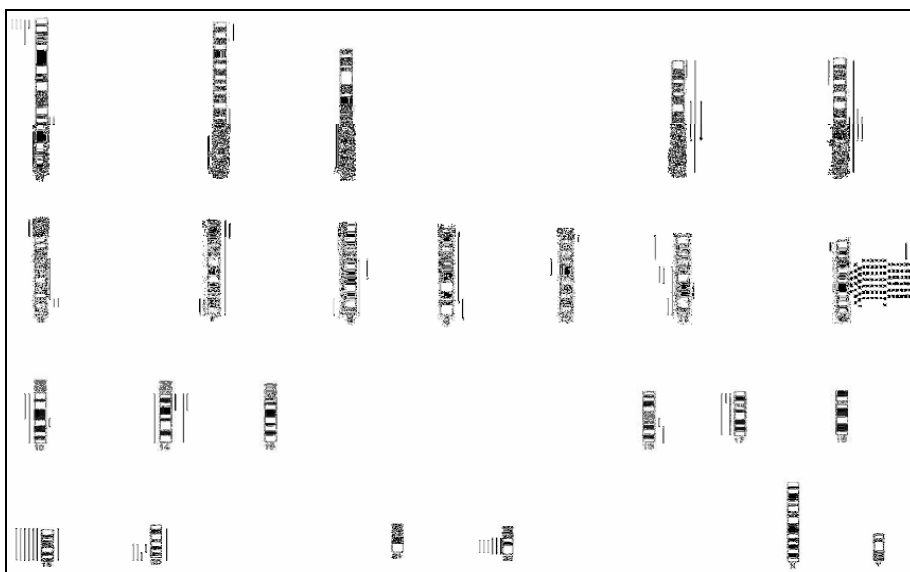
+- gains, - losses, P- primary, R- recurrent, M- metastatic, *- chromosome amplifications are in bold

Wszystkie wtórne aberracje niezrównoważone w guzach P i R tłuszczakomięśaka dobrze zróżnicowanego przedstawia ryc. 2, a chromosomy najczęściej zaangażowane w zaburzenia genomu w tych guzach przedstawiono w tab. 8. W przypadku chromosomów 19 i 22 były to wyłącznie utraty i stwierdzono je w dwóch guzach P (25%) oraz, kolejno w dwóch (18%) i trzech (27%) guzach R. Amplifikacja różnych fragmentów chromosomu 14q jest zmianą typową dla guzów R w porównaniu do P ($p=0,026$) - stwierdzono ją wyłącznie w guzach R - pięć (45%) guzów, natomiast dodatkowe kopie chromosomu 3 lub 3p były bardziej charakterystyczne dla guzów P aniżeli R ($p=0,0083$) i wykryto je wyłącznie w guzach P - cztery (50%) guzy. Dodatkowe kopie pozostałych chromoso-

mów występowały zarówno w guzach P jak i R (tab. 8). Chromosom 20 nie uczestniczył w niezrównoważonych aberracjach genomowych (ryc. 2).

4.1.2. Aberracje chromosomowe występujące w guzach tłuszczakomięsaków odróżnicowanych - DDLPS

Badaniom cytogenetycznym poddano 19 guzów. W kariotypach 14 (73,7%) guzów stwierdzono występowanie chromosomów pierścieniowych i/lub olbrzymich chromosomów markerowych (tab. 5), z czego, w ośmiu (57,1%) guzach były to jedyne zmiany cytogenetyczne, a w pozostałych sześciu (42,9%) ww. aberracjom towarzyszyły wtórne zmiany chromosomowe i występowały one statystycznie rzadziej w porównaniu do guzów M/RLPS ($p=0,04$). W porównaniu z guzami WDLPS, nie stwierdzono istotnych różnic ($p=0,69$). W pięciu (26,3%) guzach stwierdzono: wyłącznie wtórne aberracje chromosomowe w dwóch guzach oraz kariotyp prawidłowy w trzech guzach (tab. 5). Zapisy kariotypów poszczególnych guzów podano w Aneksie w tab 33.



Ryc. 3. Zaburzenia równowagi genomowej w 15 guzach tłuszczakomięsaków odróżnicowanych określone metodą CGH. Lewa strona diagramu chromosomów - utraty, prawa - dodatkowe kopie chromosomów lub ich fragmentów. Pogrubiona, przerywana linia - amplifikacja

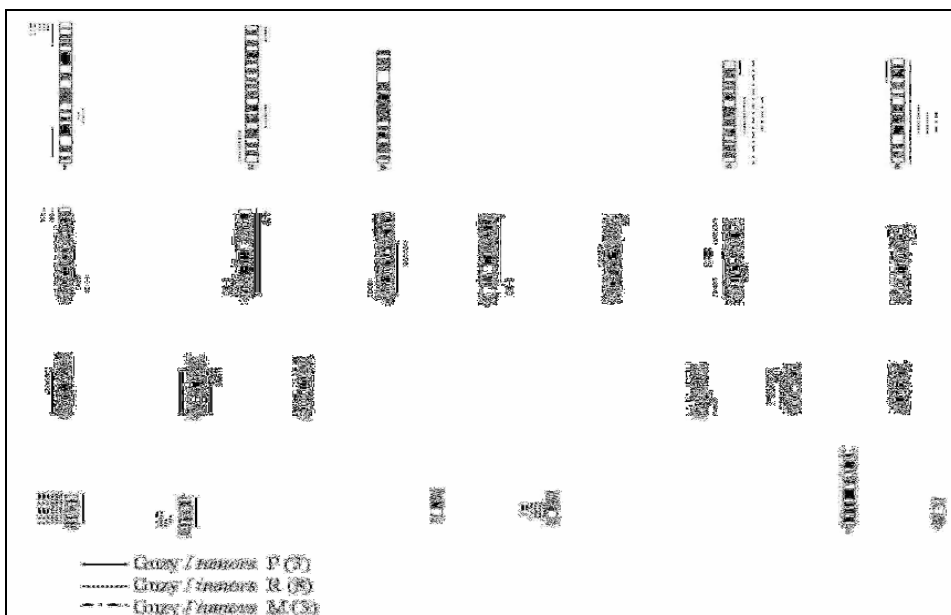
Fig. 3 Summary of DNA copy number changes detected by the CGH method in 15 dedifferentiated liposarcomas. Losses are shown on the left side of the chromosome diagram, gains on the right side. High-level amplifications are indicated by thick, dotted lines

Metodą CGH wykryto zaburzenia równowagi genomowej we wszystkich 15 guzach (ryc. 3). W 100% guzów stwierdzono amplifikacje chromosomu 12q11/13-q22/24 (ryc. 3), również w guzach, w których nie występowały chromosomy *r* lub *mar*. W 12 (80%) guzach były zarówno utraty jak i dodatkowy materiał i zmiany te były statystycznie

istotne w stosunku do guzów WDLPS ($p=0,01$), natomiast w porównaniu z guzami M/RLPS nie stwierdzono różnic ($p=0,1$). W trzech (20%) guzach DDLPS (tab. 6) występował jedynie dodatkowy materiał genetyczny.

Wtórne aberracje niezrównoważone występowały w 14 (93,3%) guzach. W guzach tych stwierdzono łącznie 81 aberracji niezrównoważonych, co daje 5,8 aberracji/guz, w tym 3,3 utraty i 2,5 dodatkowych kopii/guz. Liczbę i rodzaj aberracji w zależności od rodzaju guza przedstawiono w tab. 7.

Wtórny aberracjom niezrównoważonym ulegały przede wszystkim chromosomy: 1 (6 guzów - 42,9%), 5, 6, 11 i 14 (każdy w 5 guzach - 35,7%) oraz 4, 8 i 19 (każdy w 4 guzach - 28,6%). We wszystkich ww. chromosomach stwierdzono zarówno utraty jak i dodatkowe kopie ich materiału genetycznego. Natomiast chromosomy 17 i 22 ulegały wyłącznie utratom (odp. 3 guzy - 21,4% i 6 - 42,9% guzów.). Wyniki zbiorcze wszystkich aberracji niezrównoważonych w guzach DDLPS przedstawia ryc. 3. Wyniki badań CGH poszczególnych guzów podano w Aneksie w tab. 33.



Ryc. 4. Wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe określone metodą CGH w guzach pierwotnych (P), wznowach miejscowych (R) i guzach przerzutowych (M) tłuszczakomięsaków odróżnicowanych. Lewa strona diagramu chromosomów - utraty, prawa - dodatkowe kopie chromosomów lub ich fragmentów

Fig. 4. Secondary imbalances chromosomal aberrations detected by CGH in primary (P), local recurrence (R) and metastasis (M) tumors in dedifferentiated liposarcoma. Losses are shown on the left side of the chromosome diagram, gains on the right

Wtórne aberracje niezrównoważone w guzach P, R i M tłuszczakomięsaków odróżnicowanych przedstawia ryc. 4, a chromosomy najczęściej zaangażowane w zaburzenia genomu w tych guzach, tab. 8. Dodatkowe kopie chromosomu 5q14-23, różnych fragmentów chromosomu 4 oraz utraty różnych fragmentów chromosomów 1 i 11 (głównie

ramion q) obserwowano w guzach P, R i M. Z kolei utraty różnych fragmentów chromosomów 20q, 19 oraz 22 stwierdzono wyłącznie w guzach R i M (tab. 8).

Przeprowadzone w niniejszej pracy wyniki badań cytogenetycznych wykazały zarówno podobieństwa, jak i różnice w obrazie cytogenetycznym guzów WDLPS i DDLPS.

Podobieństwa:

- Zarówno w guzach WDLPS jak i DDLPS stwierdza się charakterystyczne aberracje chromosomowe pod postacią chromosomów pierścieniowych i/lub olbrzymich chromosomów markerowych.
- We wszystkich guzach występują dodatkowe kopie lub amplifikacje chromosomu 12q11-22.
- Występują utraty chromosomów 19 i 22, odp. w 4 (21%) i 5 (26%) guzach WDLPS, natomiast w DDLPS w 6 guzach (43%) oba chromosomy traczone są równocześnie.

Różnice:

- W guzach DDLPS stwierdzono 2x (2,9/guz) więcej utrat/guz w porównaniu do WDLPS (1,3/guz).
- Fragment chromosomu 12q23-24 ulegał amplifikacji wyłącznie w guzach DDLPS.
- W guzach WDLPS dodatkowe kopie chromosomów 3/3p charakterystyczne są dla guzów P ($p=0,0083$), chromosomu 5p występują w guzach P i R, a amplifikacje różnych fragmentów chromosomu 14q są najbardziej typowe dla guzów R ($p=0,0008$). Natomiast w guzach DDLPS charakterystyczne są utraty chromosomu 20q (guzy R i M) i dodatkowe kopie 5q (guzy P, R i M).

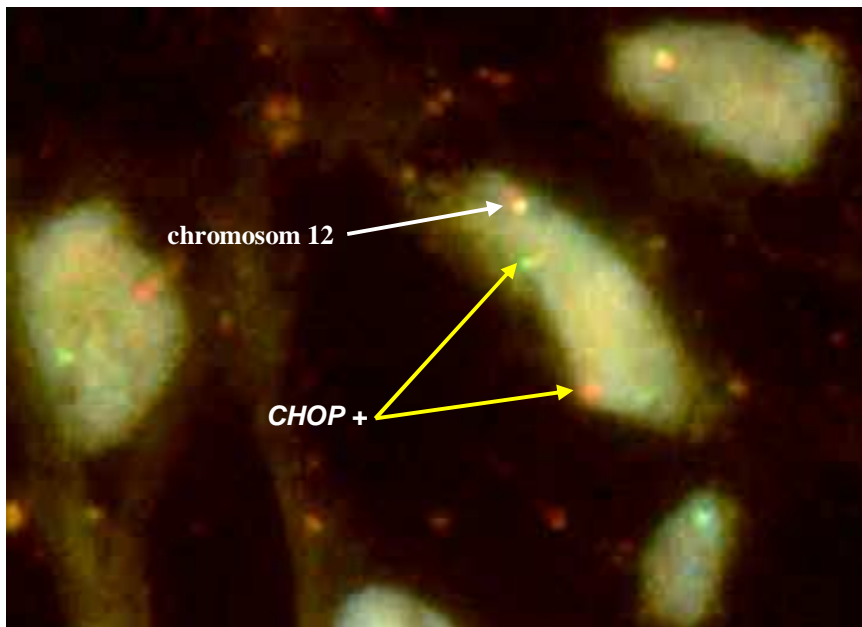
4.1.3. Aberracje chromosomowe występujące w guzach tłuszczakomięsaków śluzowatych/okrągłokomórkowych (M/RLPS)

4.1.3.1. Analiza chromosomów metodą GTW oraz jąder interfazowych metodą FISH z użyciem sondy genu *CHOP* (*DDIT3*)

Badaniom cytogenetycznym poddano 28 guzów tłuszczakomięsaków M/RLPS (22 guzy podtypu MLPS oraz sześć RLPS). Obecność swoistej translokacji t(12;16)(q13;p11) stwierdzono w 22 guzach (78,6%), a w pozostałych sześciu (21,4%) obecne były: albo jedynie wtórne aberracje chromosomowe (2 guzy - 7,1%), albo kariotypy prawidłowe (4 guzy - 14,3%) (tab. 5). Zapisy kariotypów poszczególnych guzów podano w tab. 34 w Aneksie. W 20 guzach (90,9%), translokacji swoistej towarzyszyły wtórne strukturalne i/lub liczbowe aberracje różnych chromosomów i zmiany te występowały częściej aniżeli w guzach WDLPS ($p=0,0013$) i DDLPS ($p=0,04$). W pozostałych 2 (9,1%) guzach kariotyp był prosty, w którym translokacja swoista była jedyną zmianą cytogenetyczną.

Badania FISH, z zastosowaniem sondy molekularnej swoistej dla genu *CHOP*, wykonano w 22 guzach. Badaniami tymi objęto 19 guzów, których wyniki cytogenetyczne

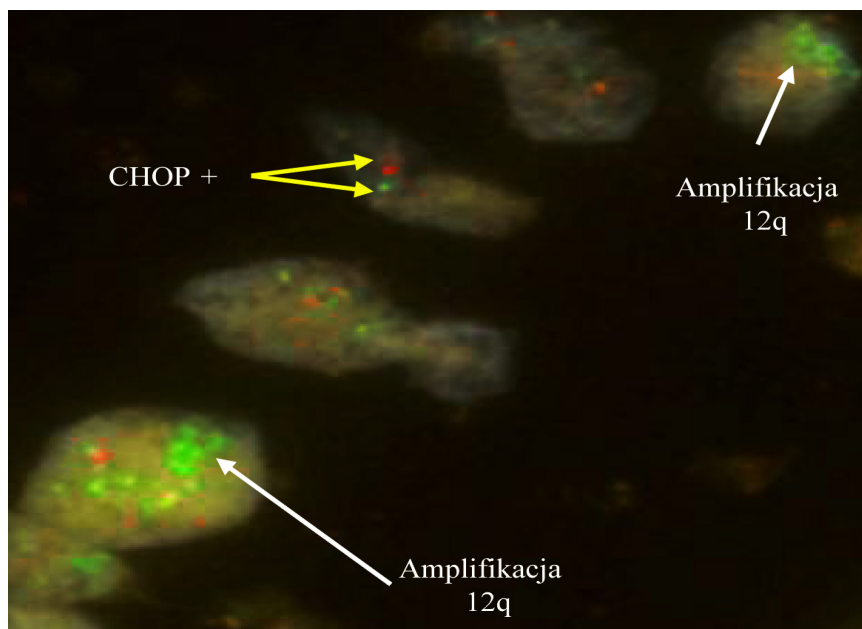
przedstawiono powyżej oraz trzech guzów, których kariotypy zostały opublikowane [23, 86]. Wyniki uzyskano w 21 guzach (95,5%), w których potwierdzono mutacje genu *CHOP* (ryc. 5). Wyniki badań FISH poszczególnych guzów podano w Aneksie w tab. 34. Uwzględniając obie metody badawcze (cytogenetyka klasyczna i FISH), występowanie translokacji swoistej stwierdzono w 100% guzów.



Ryc. 5. Jądra interfazowe komórek tłuszczakomięsaka śluzowatego wybarwione techniką FISH z zastosowaniem dwukolorowej sondy genu *DDIT3* (*CHOP*). Strzałki żółte wskazują rozdzielone sygnały (*DDIT3*+) - obecność swoistej translokacji *t*(12;16), biała - sygnał z prawidłowego chromosomu 12. Kariotyp guza 46,XX. Badanie wykonane na materiale archiwalnym (skrawki mikroskopowe), pow. 1200x

Fig. 5. Interphase FISH with break apart probe showing rearrangement of the DDIT3 (CHOP) gene in myxoid liposarcoma. One separate red and green signal (yellow arrows) and one fused signal (white arrows) per nucleus indicates a t(12;16) translocation. Tumor karyotype is 46,XX. Nuclei from paraffin blocks were used, magnification 1200x

W złożonym kariotypie guza MLPS pochodzącego od pacjenta nr 11 (zapis kariotypu podano w Aneksie w tab. 34) stwierdzono występowanie *t*(12;16), chromosomów pierścieniowych i olbrzymich chromosomów markerowych oraz dodatkowych aberracji strukturalnych, w które zaangażowane były chromosomy 16 i 19. Badaniem FISH tego guza wykazano, oprócz *t*(12;16), amplifikację chromosomu 12q13 (ryc. 6).



Ryc.6. Jądra interfazowe komórek mieszanego tłuszczakomięsaka śluzowatego/dobrze zróżnicowanego (M/WDLPS) wybarwione techniką FISH z zastosowaniem dwukolorowej sondy genu *DDIT3* (*CHOP*). Strzałki żółte wskazują rozdzielone sygnały (CHOP+) - obecność swoistej translokacji t(12;16), biała - amplifikacje fragmentu genu *CHOP* zlokalizowanego w chromosomie 12q13. Zapis kariotypu podano w Aneksie w tab. 34, pacjent 11). Badanie wykonane na materiale archiwalnym (skrawki mikroskopowe), pow. 1200x

Fig. 6. Interphase FISH with break apart probe showing rearrangement of the *DDIT3* (*CHOP*) gene in mixed myxoid/well differentiated liposarcomas (M/WLPS). One separate red and green signal (yellow arrows) and many green signals (white arrows) per nucleus indicate a t(12;16) translocation and amplifications of 12q13 chromosome, respectively. Karyotype is listed in Annex in Tab. 34, patient 11. Nuclei from paraffin blocks were used, magnification 1200x

4.1.3.2. Zaburzenia równowagi genomu

Zaburzenia równowagi genomowej w komórkach guzów określano porównawczą hybrydyzacją genomową (CGH) i analizą kariotypów w 16 guzach, a w 18 guzach jedynie w oparciu o kariotypy. W sumie badaniami objęto 34 guzy (27 MLPS i 7 RLPS) pochodzące od 20 pacjentów. Wyniki badań cytogenetycznych 28 guzów przedstawiono w podrozdziale 4.1.3.1, natomiast sześciu były wcześniej opublikowane, ale bez oceny zaburzenia genomu [23, 86].

W 27 (79,4%) guzach stwierdzono wtórne, niezrównoważone aberracje genomowe i zmiany te obserwowano w dwóch (33,3%) guzach P, w 14 (87,5%) guzach R oraz w 11 (91,7%) guzach M (tab. 9). Powyższe zmiany częściej stwierdzano w guzach R ($p=0,025$) i M ($p=0,0217$) w porównaniu do guzów P, natomiast pomiędzy guzami R i M nie stwierdzono różnic statystycznych ($p=0,7$). W pozostałych siedmiu (20,6%) guzach genotyp był zrównoważony i były to głównie guzy P (tab. 9), w tym: sześć guzów z

translokacją swoistą t(12;16) jako jedyną zmianą cytogenetyczną i jeden guz z kariotypem prawidłowym.

Tab. 9. Częstości występowania zaburzeń równowagi genomowej w 34 guzach tłuszczakomięsaków śluzowatych/okrągłokomórkowych (M/RLPS) w zależności od rodzaju guza
 Tab. 9. Frequency of genomic imbalance occurrences in 34 tumors of myxoid/round cell liposarcoma (M/RLPS) in dependence to tumor type

	Rodzaj guzów (liczba) / Tumors type (No.)			Razem Total
	P (6)	R (16)	M (12)	
Liczba guzów / Tumors No. (%)				
Z zaburzeniami With imbalances	2 (33,3)	14 (87,5)	11 (91,7)	27 (79,4)
Bez zaburzeń Without imbalances	4 (66,7)	2 (12,5)	1 (8,3)	7 (20,6)
Razem / Total	6 (100)	16 (100)	12 (100)	34 (100)

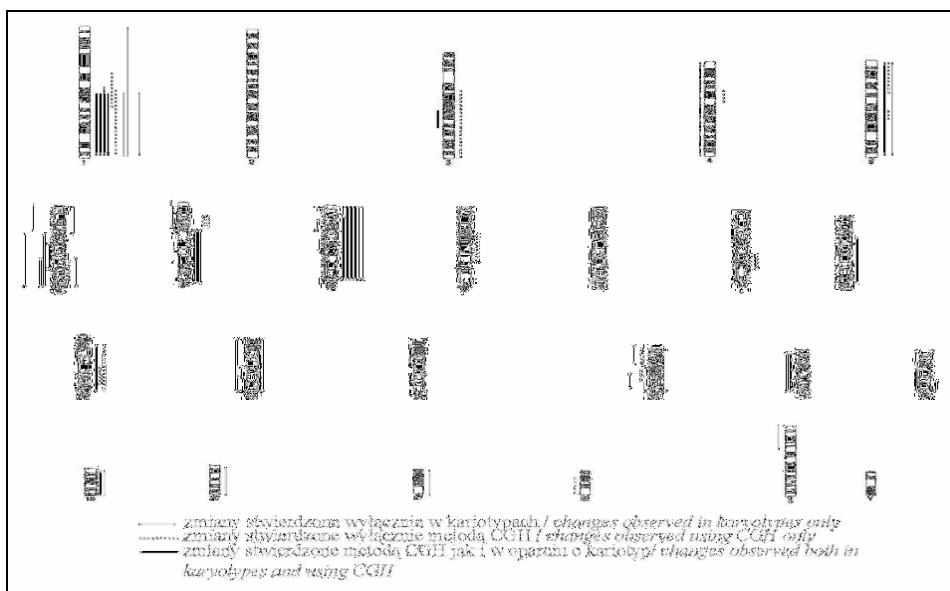
P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy / P- primary, R- recurrent, M- metastatic

Współwystępujące utraty i dodatkowe kopie wykryto w dziewięciu (33,3%) guzach - głównie guzy R (7 guzów - 50%) i zmiany te częściej stwierdzano w guzach R aniżeli M ($p=0,029$). Wyłącznie utraty wykryto w 10 (37,1%) nowotworach - guzy R i M (kolejno po 5 guzów - 35,7% i 45,5%) (tab. 10) i były to chromosomy: 3q, 4, 6q, 14, 16p i 19p (ryc. 7). Natomiast wyłącznie dodatkowe kopie stwierdzono w pozostałych ośmiu guzach (29,6%), głównie w guzach M (5 guzów - 45,5%) (tab. 10), a zmiany te dotyczyły chromosomów: 1q, 5, 7, 8, 12q, 13, 14, 18q, 19 i 20 (ryc.7). Nie stwierdzono statystycznych różnic pomiędzy guzami R i M w częstości występowania wyłącznie utrat ($p=0,6$), czy wyłącznie dodatkowych kopii w guzie ($p=0,08$).

Tab.10. Rodzaje zaburzeń równowagi genomowej w 27 guzach tłuszczakomięsaków śluzowatych/okrągłokomórkowych (M/RLPS) w zależności od rodzaju guza
 Tab. 10. Genomic imbalances in 27 tumors of myxoid/round cell liposarcoma (M/RLPS) in dependence to tumor type

Rodzaj zaburzenia Imbalances	Rodzaj guzów (liczba) / Tumors type (No.)			Razem Total
	P (2)	R (14)	M (11)	
Liczba guzów / Tumors No. (%)				
Wyłącznie utraty Losses only	-	5 (35,7)	5 (45,5)	10 (37,1)
Wyłącznie dodatkowe kopie Gains only	1 (50,0)	2 (14,3)	5 (45,5)	8 (29,6)
Utraty i dodatkowe kopie Losses and gains	1 (50,0)	7 (50,0)	1 (9,0)	9 (33,3)
Razem / Total	2 (100)	14 (100)	11 (100)	27 (100)

P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy / P- primary, R- recurrent, M- metastatic



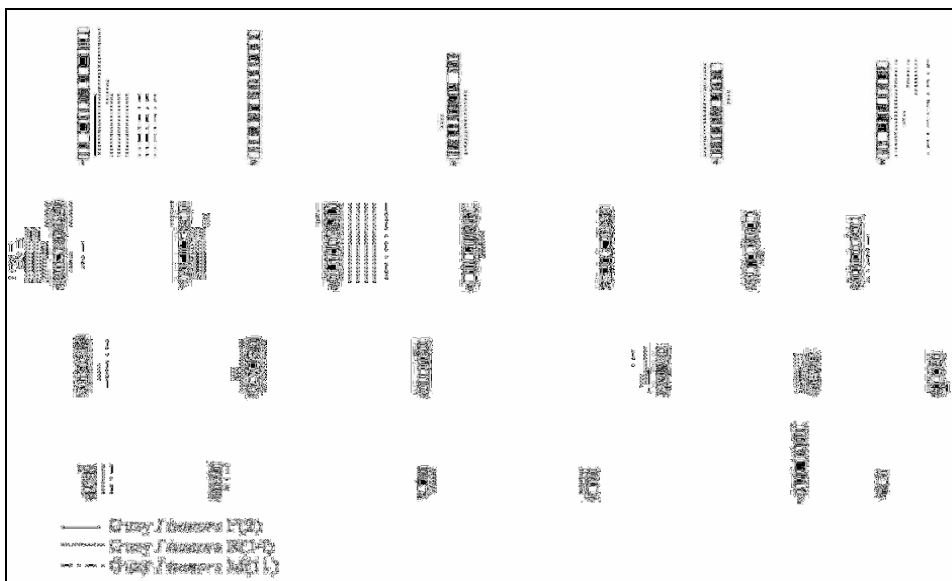
Ryc. 7. Wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe w 27 guzach tłuszczakomięsaków śluzowatych/okrągłokomórkowych określone metodą CGH i/lub analizy kariotypów. Lewa strona diagramu chromosomów - utraty, prawa - dodatkowe kopie chromosomów lub ich fragmentów

Fig. 7. Secondary imbalanced chromosomal aberrations detected by the CGH method and/or karyotype analysis on 27 myxoid/round-cell liposarcomas. Losses are shown on the left side of the diagram, gains on the right side

W 27 guzach z zaburzeniami równowagi genomowej stwierdzono łącznie 78 niezrównoważonych aberracji chromosomowych, co daje 2,8 aberracji/guz, w tym 1,1 utrat i 1,7 dodatkowych kopii chromosomów na guz. Liczbę aberracji niezrównoważonych w zależności od rodzaju guza przedstawiono w tab. 7.

Niezrównoważonym aberracjom najczęściej ulegały chromosomy: 1 i 6 po dziewięć (33,3%) guzów, 8 - osiem guzów (29,6%) oraz 16 - pięć guzów (18,5%). Wyniki zbiorcze przedstawiające wszystkie wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe w guzach M/RLPS przedstawia ryc. 7. Aberracje występujące w poszczególnych guzach podano w tab. 35 i 36 w Aneksie.

Wszystkie wtórne aberracje niezrównoważone w guzach P, R i M przedstawia ryc. 8, natomiast chromosomy najczęściej zaangażowane w utraty i dodatkowe kopie w guzach tłuszczakomięsaków MLPS/RLPS, tab. 8. Dodatkowe kopie chromosomu 1q (wyłącznie w MLPS) oraz utraty różnych fragmentów chromosomu 16 obserwowano w guzach P, R i M. Natomiast utraty chromosomu 6q i dodatkowe kopie 8 wyłącznie w guzach R i M, z tym, że +8 występowały głównie w guzach R (5 guzów - 35,7%). Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania aberracji ww. chromosomów w guzach R i M. Chromosomy 2, 10 i 15 nie uczestniczyły w niezrównoważonych aberracjach (ryc. 7 i 8).



Ryc. 8. Wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe w guzach pierwotnych (P), wznowach miejscowych (R) i guzach przerzutowych (M) tłuszczakomięsaków śluzowatych/okrągłokomórkowych określone metodą CGH i/lub analizy kariotypów. Lewa strona diagramu chromosomów - utraty, prawa - dodatkowe kopie chromosomów

Fig. 8. Secondary imbalanced chromosomal aberrations detected by the CGH method and/ or karyotype analyses in primary (P), local recurrent (R) and metastatic (M) tumors in myxoid/round-cell liposarcomas. Losses are shown on the left side of the chromosome diagram, gains on the right side

Zaburzenia równowagi genomowej metodą CGH określono w 16 guzach różnych podtypów histologicznych LPS (13 MLPS i 3 RLPS), a otrzymane wyniki porównano z danymi uzyskanymi z analizy kariotypów tych samych guzów. We wszystkich guzach stwierdzono zaburzenia genomu, z tym, że w 10 (62,5%) guzach wykazano je zarówno metodą CGH jak i w oparciu o kariotyp danego guza, a w pozostałych sześciu (37,5%), zmiany te stwierdzono w oparciu tylko o jedną ze stosowanych metod. W pięciu (50%) guzach uzyskano identyczne wyniki stosując obydwie metody badawcze, a w pozostałych pięciu (50%) guzach, obok zmian wspólnych stwierdzanych z zastosowaniem obydwu metod, były pojedyncze aberracje chromosomowe, które wykryto albo tylko badaniem CGH, albo tylko w oparciu o kariotyp (ryc. 7). Wykazano obecność 59 niezrównoważonych aberracji chromosomowych, z czego 23 (39%) stwierdzono stosując obydwie metody, 14 (23,7%) wyłącznie w metodzie CGH i 22 (37,3%) aberracje tylko w oparciu o kariotypy.

Podsumowanie:

- Translokację swoistą $t(12;16)(q13;p11)$ dla guzów MPLS/RLPS stwierdzono w 100% guzów, w tym w 79% metodą prążków G, a w pozostałych 21% metodą FISH z zastosowaniem sondy swoistej dla genu *DDIT3* zlokalizowanego w chromosomie 12q13 (translokacja ukryta).
- Opisano drugi przypadek guza nowotworowego, którego wyniki badań cytogenetycznych potwierdzają możliwość istnienia postaci mieszanej tłuszczakomię-

saka śluzowatego - współwystępowanie aberracji chromosomach typowych dla tych dwóch podtypów guza.

- Po raz pierwszy porównano zaburzenia równowagi genomowej pomiędzy guzami R i M i wykazano, iż średnia liczba aberracji niezrównoważonych przypadająca na guz, była 2x większa w guzach R (3,9/guz) w porównaniu do guzów M (1,9/guz). Przyczyną zaburzeń były zarówno utraty materiału genetycznego, które występowały prawie 3x częściej (1,6/guz), jak i dodatkowe kopie, około 2x częściej (2,3/guz) stwierdzane w guzach R aniżeli w M (0,6/guz i 1,3/guz, kolejno).
- Zaburzenia równowagi genomowej stwierdzono w 80% guzów MLPS/RLPS. Zaburzenia te polegały głównie na występowaniu dodatkowych kopii materiału genetycznego pochodzącego z chromosomów: 1q (33% guzów) i 8 (22% guzów), stwierdzone wyłącznie w guzach R i M. Po raz pierwszy opisano utraty chromosomów: 6q (18% guzów) stwierdzane w guzach R i M i różnych fragmentów chromosomu 16 (15%), a występujące zarówno w guzach P jak i R oraz M.
- Współwystępujące utraty i dodatkowe kopie częściej stwierdzano w guzach R aniżeli M ($p=0,029$). Nie stwierdzono statystycznych różnic pomiędzy guzami R i M w częstości występowania wyłącznie utrat ($p=0,6$), czy wyłącznie dodatkowych kopii na guz ($p=0,08$).
- Stosując jednocześnie badania metodą CGH oraz analizę zaburzeń z kariotypu, zaburzenia równowagi genomowej stwierdzono w 62% guzów, w tym w 50% guzów uzyskano identyczne wyniki w obu metodach; 39% aberracji niezrównoważonych stwierdzono obiema metodami, natomiast pozostałe 61% tylko jedną z powyższych metod.

4.2. Charakterystyka cytogenetyczna mięsaków maziówkowych - SS

Analizie cytogenetycznej poddano 23 guzy trzech podtypów histologicznych: 17 guzów jednofazowych - MoSS, jeden dwufazowy - BiSS oraz pięć niskozróżnicowanych - PDSS. Dane kliniczne pacjentów i histologiczne guzów nowotworowych przedstawiono w tab. 29 w Aneksie.

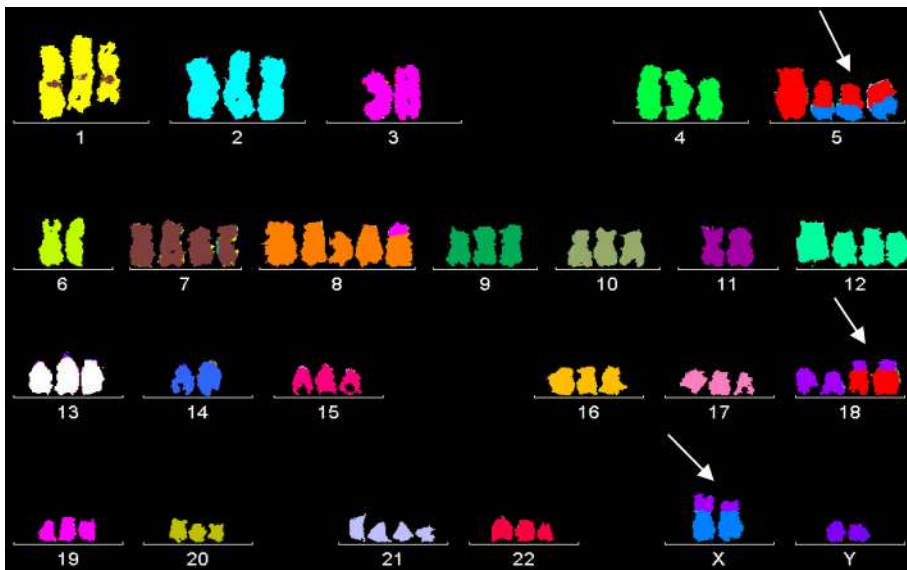
4.2.1. Analiza chromosomów metodą GTW oraz M-FISH

Spośród 23 analizowanych guzów SS, translokację swoistą $t(X;18)(p11;q11)$ lub jej wariant, stwierdzono w 17 (73,9%) guzach: w 12 guzach MoSS i pięciu PDSS (tab. 11). Kariotyp prosty z translokacją $t(X;18)$, jako jedyną zmianą cytogenetyczną, wykazano w dwóch (11,8%) guzach i były to guzy MoSS (tab. 11). Natomiast w pozostałych 15 (88,2%) guzach towarzyszyły jej liczne, wtórne, strukturalne i/lub liczbowe aberracje chromosomowe. Translokacji swoistej nie wykryto w sześciu (26,1%) guzach i wykazano jedynie obecność aberracji wtórnych - cztery guzy, albo kariotyp prawidłowy - dwa guzy (tab. 11). Zapisy kariotypów poszczególnych guzów podano w tab. 37 w Aneksie.

Tab. 11. Wyniki badań cytogenetycznych (metoda GTW) 23 guzów mięsaków maziówkowych
 Tab. 11. Cytogenetic data (GTW technique) in 23 synovial sarcoma tumors

Podtyp / Subtype (liczba guzów) tumors No.)	Aberracje swoiste / Specific aberrations					
	Obecne / Present			Brak / Absent		
	Wyłącznie Only	Łącznie z wtórnymi With secondary	Razem Total	Wyłącznie wtórne Secondary only	Karyotyp prawidłowy Normal karyotype	Razem Total
Mo (17)	2 (11,8)	10 (58,8)	12 (70/6)	4 (23,5)	1 (5,9)	5 (29,4)
Bi (1)	-	-	-	-	1 (100)	1 (100)
PD (5)	-	5 (100)	5 (100)	-	-	-
Razem Total (23)	2 (8,7)	15 (65,2)	17 (73,9)	4 (17,4)	2 (8,7)	6 (26,1)

Mo- jednofazowy, Bi- dwufazowy, PD- niskozróżnicowany
 Mo- monophasic, Bi- biphasic, PD- poorly differentiated



Ryc. 9. Karyogram mięsaka maziówkowego jednofazowego z wariantem translokacji swoistej, w którym, obok chromosomów X i 18, zaangażowany jest chromosom 5 (strzałki). Karyotyp guza okotriploidalny, złożony, z t(X;5;18) i licznymi zmianami wtórnymi (Zapis karyotypu podano w Aneksie w tab. 37, pacjent 15). Badanie wykonano metodą M-FISH, pow. 1200x

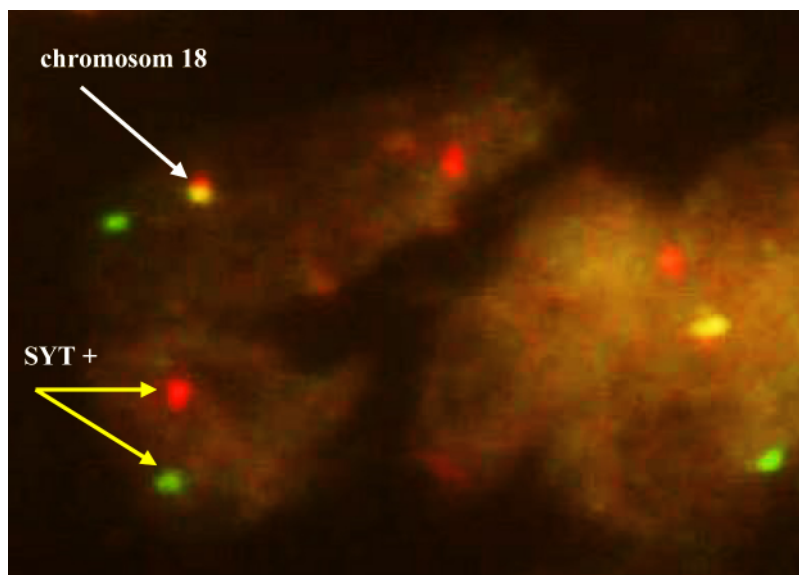
Fig. 9. Karyogram prezentujący złożony swoisty translokacji z X, 18 i 5 chromosomami zaangażowanymi (strzałki) w monophasic synovial sarcoma. The complex karyotype was near-triploid with t(X;5;18) and many secondary chromosomal aberrations. Karyotype is listed in Annex in Tab. 37, patient 17. The karyotype was identified using the multicolor FISH method, magnification 1200x

W siedmiu (41,2%) guzach (5 MoSS od 4 pacjentów i 2 PDSS od 1 pacjenta) wykazano obecność wariantów aberracji swoistej, gdzie obok chromosomów X i 18, w translokację zaangażowane były autosomy: 15 w trzech guzach, 5 w dwóch oraz 1 i 17 po

jednym guzie. Wszystkie ww. guzy charakteryzowały się złożonymi kariotypami z licznymi wtórnymi aberracjami chromosomowymi. W trzech guzach (pacjenci: 3, 10 i 26) wyniki badań metodą GTW potwierdzono techniką M-FISH (ryc. 9). Zapisy kariotypów poszczególnych guzów podano w tab. 37 w Aneksie.

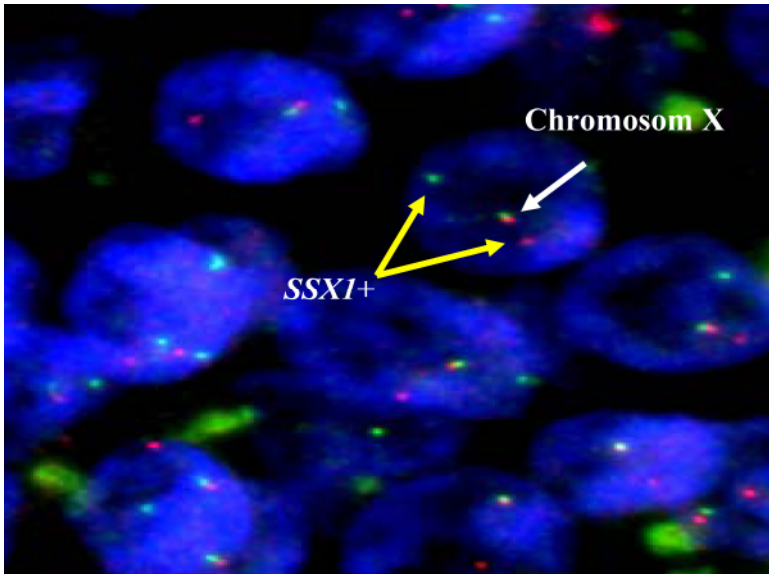
4.2.2. *Badania molekularne metodą FISH z zastosowaniem sond swoistych dla genów SS18 oraz SSX1-2*

Badania FISH przy użyciu sondy molekularnej swoistej dla genu *SS18* (*SYT*) (chromosom 18q11) wykonano w 25 guzach. Badaniami objęto 20 guzów pochodzących od 17 pacjentów, których wyniki opisano w podrozdziale 4.2.1 oraz pięć guzów, których kariotypy były wcześniej opublikowane [50, 40, 42, 43]. W sumie zbadano 18 guzów jednofazowych (MoSS), dwa dwufazowe (BiSS) i pięć niskozróżnicowanych (PDSS). W 100% guzów uzyskano wynik pozytywny (ryc.10). W 10 guzach dodatkowo przeprowadzono badania FISH z zastosowaniem sond swoistych dla genów *SSX1* i *SSX2* zlokalizowanych w chromosomie Xp11. Zaangażowanie genu *SSX1* stwierdzono w sześciu guzach, w tym w czterech MoSS i dwóch PDSS (1 pacjent), natomiast genu *SSX2* w trzech guzach MoSS (1 pacjent) i w jednym BiSS. Wyniki FISH poszczególnych guzów podano w Aneksie w tab. 37.



Ryc. 10. Jądra interfazowe komórek mięsaka maziówkowego jednofazowego wybarwione techniką FISH z zastosowaniem dwukolorowej sondy genu *SYT*. Strzałki żółte wskazują rozdzielone sygnały (SYT+) - obecna swoista translokacja t(X;18), biała - sygnał z prawidłowego chromosomu 18. Kariotyp guza 46,XY. Badanie wykonane na materiale archiwalnym (skrawki mikroskopowe), pow. 1200x

Fig. 10. Interphase FISH with break apart probe showing rearrangement of the *SYT* gene in monophasic synovial sarcoma. One separate red and green signal (yellow arrows) and one fused signal (white arrows) per nucleus indicates a t(X;18) translocation. Tumor karyotype is 46,XY. Nuclei from paraffin blocks were used, magnification 1200



Ryc. 11. Jądra interfazowe komórek guza mięsaka maziówkowego jednofazowego wybarwione dwukolorową techniką FISH z zastosowaniem sondy genu *SSX1*. Strzałki żółte wskazują rozdzielone sygnały (*SSX1+*) - potwierdza zaangażowanie genu *SSX1* w translokację swoistą - $t(X;18)$, biała - sygnał z prawidłowego chromosomu X. Karyotyp guza: $46,X,t(X;18)(p11;q11)$. Badanie wykonano na odciskowych preparatach mrożonej tkanki, pow. 1200x

Fig. 11. Interphase FISH with break apart probe showing rearrangement of the *SSX1* gene in monophasic synovial sarcom. One separate red and green signal (yellow arrows) and one fused signal (white arrows) per nucleus indicates a $t(X;18)$ translocation. Tumor karyotype is $46,X,t(X;18)(p11;q11)$. Touch slides were used, magnification 1200x

4.2.3. Zaburzenia równowagi genomu

Zaburzenia równowagi genomowej prześledzono w 60 guzach mięsaków maziówkowych różnych podtypów histologicznych (36 guzów MoSS, 13 BiSS i 11 PDSS) pochodzących od 42 pacjentów z tym, że w 15 guzach określano ww. zjawisko wykorzystując dwie metody: CGH i analizę karyotypów, natomiast w pozostałych 45 wyłącznie w oparciu o karyotypy. Wyniki zbiorcze przedstawiające wszystkie zmiany niezrównoważone przedstawia ryc. 12. Aberracje występujące w poszczególnych guzach podano w Aneksie w tab. 38 i 39. Wyniki badań cytogenetycznych 23 guzów opisano w podrozdziale 4.2.1, natomiast pozostałych 37 były opublikowane wcześniej [40, 42, 43, 50, 74, 96].

Niezrównoważenie genomowe stwierdzono w 48 (80%) guzach. W pozostałych 12 (20%) karyotyp był zrównoważony: w siedmiu (11,7%) guzach stwierdzono swoistą translokację $t(X;18)$ jako jedyną zmianę, a w pięciu (8,3%) guzach karyotyp prawidłowy (tab. 12). Częstości występowania guzów z zaburzeniami genomu pomiędzy trzema podtypami histologicznymi SS, były statystycznie nieistotne.

Tab. 12. Częstość występowania zaburzeń genomu w 60 guzach trzech podtypów histologicznych mięsaków maziówkowych

Tab. 12. Frequency of genomic imbalances in 60 synovial sarcoma of three subtypes

Podtyp Subtype (liczba guzów) (tumors No.)	Z zaburzeniami łącznie With imbalances	Bez zaburzeń / Without imbalances		Razem Total
		Tylko translokacja swoista / specific translocation only	Kariotyp prawidłowy Normal karyo- type	
Liczba guzów / Tumors No. (%)				
Mo (36)	29 (80,6)	5 (13,9)	2 (5,6)	36 (100)
Bi (13)	9 (69,2)	2 (15,4)	2 (15,4)	13 (100)
PD (11)	10 (90,9)	-	1 (9,1)	11 (100)
Razem / Total (60)	48 (80,0)	7 (11,7)	5 (8,3)	60 (100)

Mo- jednofazowy, Bi- dwufazowy, PD- niskodróżnicowany

Mo- monophasic, Bi- biphasic, PD- poorly differentiated

Spośród nowotworów z zaburzeniami równowagi genomowej, w 33 (68,7%) guzach wykazano zarówno utraty jak i dodatkowe kopie, natomiast w pozostałych 15 (31,3%) guzach stwierdzono albo wyłącznie utraty (9 guzów - 18,8%), albo wyłącznie dodatkowe kopie chromosomów lub ich fragmentów (6 guzów - 12,5%) (tab. 13).

Uwzględniając rodzaj guza, wyłącznie utraty wykryto w trzech (20%) guzach P i pięciu (17,2%) R, natomiast wyłącznie dodatkowe kopie, odpowiednio w czterech (26,7%) i dwóch (6,9%) guzach. Natomiast utraty i dodatkowe kopie chromosomów lub ich fragmentów stwierdzono w ośmiu (53,3%) guzach P i 22 (75,9%) guzach R oraz w trzech (75%) guzach M (tab. 13). Różnice w częstości występowania ww. rodzajów zaburzeń równowagi genomowej pomiędzy guzami P i R są statystycznie nieistotne.

Tab. 13. Rodzaje zaburzeń genomu w 48 guzach mięsaków maziówkowych w zależności od rodzaju guza

Tab. 13. Genomic imbalances in 48 synovial sarcoma tumors in dependence to tumor type

Rodzaj zaburzenia Imbalances	Rodzaj guzów (liczba) / Tumors type (No.)			Razem Total
	P (15)	R (29)	M (4)	
Liczba guzów / Tumors No. (%)				
Wyłącznie utraty Losses only	3 (20,0)	5 (17,2)	1 (25,0)	9 (18,8)
Wyłącznie dodatkowe kopie Gains only	4 (26,7)	2 (6,9)	-	6 (12,5)
Utraty i dodatkowe kopie Losses and gains	8 (53,3)	22 (75,9)	3 (75,0)	33 (68,7)
Razem / Total	15 (100)	29 (100)	4 (100)	48 (100)

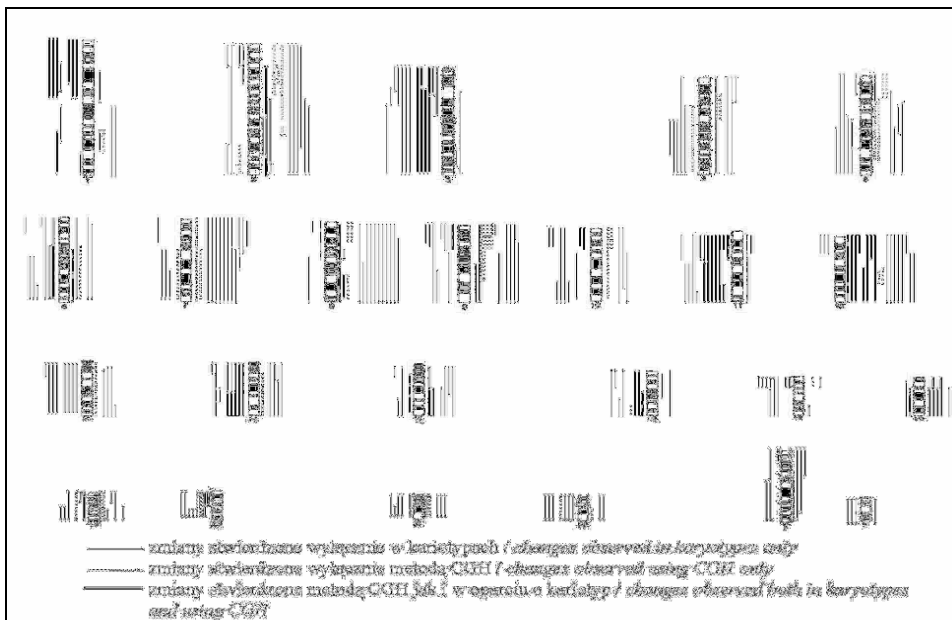
P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy / P- primary, R- recurrent, M- metastatic

Łącznie stwierdzono występowanie 399 aberracji niezrównoważonych, co daje 8,3 aberracji na guz, w tym 4,5 utrat i 3,8 dodatkowych kopii chromosomów lub ich fragmentów na guz. Liczby aberracji niezrównoważonych w guzach P, R i M przedstawiono w tab. 14.

Tab. 14. Średnia liczba aberracji niezrównoważonych w guzach pierwotnych (P), wznowach (R) i guzach przerzutowych (M) mięsaków maziówkowych

Tab. 14. The average number of unbalanced aberrations in primary (P), recurrent (R) and metastatic (M) synovial sarcoma tumors

Rodzaj aberracji Type of aberration	Rodzaj guzów (liczba) / Tumors type (No.)		
	P (15)	R (29)	M (4)
Utraty / Losses	4,5	4,6	3,8
Dodatkowe kopie / Gains	4,2	3,9	3,0
Razem / Total	8,7	8,5	6,8



Ryc. 12. Wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe w 48 guzach mięsaków maziówkowych określone metodą CGH i/lub analizy kariotypów. Lewa strona diagramu chromosomów - utraty, prawa - dodatkowe kopie materiału genetycznego

Fig. 12. Secondary imbalanced chromosomal aberrations detected by the CGH method and/ or karyotype analyses on 48 synovial sarcomas. Losses are shown on the left side of the chromosome diagram, gains on the right side

Wyniki zbiorcze zaangażowania chromosomów we wtórne aberracje niezrównoważone w guzach SS przedstawia ryc. 12. Aberracje występujące w poszczególnych guzach podano w Aneksie w tab. 38 i 39. W aberracje te, (zarówno utraty jak i dodatkowe kopie) zaangażowane były wszystkie chromosomy. Wyjątek stanowi chromosom 20, który ulegał jedynie utratom (ryc. 12).

Aberracjom niezrównoważonym najczęściej ulegały chromosomy: 8 - 22 guzy (45,8%), 12 - 21 (43,8%), 2 i 9 - po 19 guzów (39,6%), 7 - 18 (37,5%), 11 - 17 (35,4%)

oraz 1, 3 i 5 po 15 guzów (31,3%) i występowały one w guzach P, R i M (tab. 15). Wyjątek stanowią chromosomy 1 i 2, których aberracji nie stwierdzano w guzach M. Aberracje chromosomów: 3, 7 i 12 z podobną częstością stwierdzano w guzach P i R, podczas gdy chromosomów: 1, 2 i 8 występowały ok. 2x częściej w guzach R aniżeli P (tab. 15). Z kolei aberracje chromosomów 5 i 9, 2x częściej stwierdzano w guzach P aniżeli R (tab. 15), jednak różnice te są statystycznie nieistotne.

Tab. 15. Najczęściej występujące wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe w guzach pierwotnych (P), wznowach (R) i guzach przerzutowych (M) mięsaków maziówkowych

Tab. 15. *The most frequently occurring secondary unbalanced chromosome aberrations in primary (P), recurrent (R) and metastatic (M) synovial sarcoma tumors*

Nr chromosomu* Chromosome No.	Rodzaj guzów (liczba) / Tumors type / (No.)			Razem 48 guzów Total 48 tumors
	P (15)	R (29)	M (4)	
Liczba guzów (%) / Tumors No. (%)				
1	2 (13,3)	13 (44,8)	-	15 (31,3)
2	4 (26,7)	15 (51,7)	-	19 (39,6)
3	5 (33,3)	9 (31,0)	1 (25,0)	15 (31,3)
5	7 (46,7)	6 (20,7)	2 (50,0)	15 (31,3)
7	5 (33,3)	11(37,9)	2 (50,0)	18 (37,5)
8	4 (26,7)	17 (58,6)	1 (25,0)	22 (45,8)
9	9 (60,0)	8 (27,6)	2 (50,0)	19 (39,6)
11	7 (46,7)	8 (27,6)	2 (50,0)	17 (35,4)
12	7 (46,7)	12 (41,4)	2 (50,0)	21 (43,8)

*- Wytłuszczono chromosomy zaangażowane przynajmniej 2x częściej w aberracje w guzach R aniżeli P, pismem pochyłym chromosomy zaangażowane ok. 2x częściej w aberracje w guzach P aniżeli R

*- *Chromosomes in which aberrations in R than P tumors are twice more frequent are in bold, while chromosomes in which aberrations in P than R tumors are twice more frequent are in italics*

Występowanie dodatkowych kopii dotyczyło głównie chromosomów: 8 w 19 guzach (39,6%), 12 - w 18 (37,5%) oraz 2 i 7 - po 13 guzów (27,1%) i były to najczęściej zmiany liczby kopii chromosomów, rzadziej ich fragmentów (tab. 16, ryc.12). Aberracje ww. chromosomów stwierdzano głównie w guzach P i R, z tym, że w przypadku chromosomu 8 zmiany te 2x, a chromosomu 2 około 1,7x częściej występowały w guzach R aniżeli P (tab. 16), jednak różnice te nie są statystycznie istotne. Wszystkie wtórne aberracje niezrównoważone w guzach P, R i M mięsaków maziówkowych przedstawia ryc. 13.

Utraty najczęściej dotyczyły następujących chromosomów lub ich fragmentów: 11 w 15 guzach (31,3%), 3 w 13 (27,1%) oraz 1 w 10 (20,8%) guzach, z tym, że aberracje chromosomu 1 występowały wyłącznie w guzach P i R, a pozostałych chromosomów zarówno w guzach P, R i M (tab. 16). Utraty chromosomu 1 - 4,6x częściej stwierdzono w guzach R aniżeli P, jednak zmiany te nie są statystycznie istotne ($p=0,067$), podczas gdy chromosomu 11 ok. 1,3x częściej w guzach P aniżeli R (tab. 16), również nieistotne statystycznie ($p=0,69$). W przypadku chromosomu 1 utratom najczęściej ulegały ramiona p, natomiast w pozostałych chromosomach aberracje dotyczyły całych chromosomów i/lub różnych fragmentów obu ramion (ryc. 12 i 13).

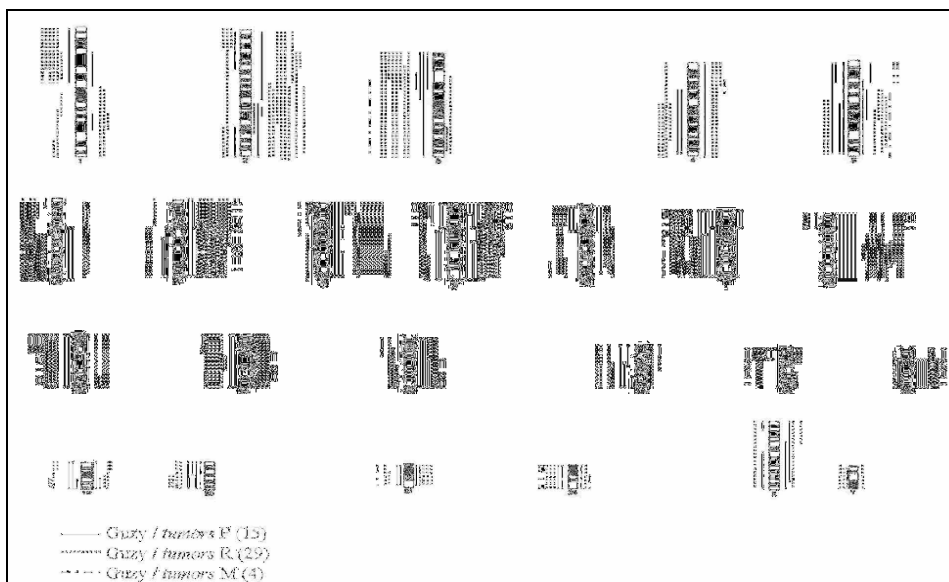
Tab. 16. Najczęściej występujące wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe w 48 guzach mięsaków maziówkowych w zależności od rodzaju guza

Tab. 16. The most frequent occurring secondary unbalanced chromosome aberrations in 48 synovial sarcomas in dependence to tumor type

Rodzaj aberracji Aberration type	Rodzaj guzów (liczba) / Tumors type (No.)			Razem guzów Total tumors
	P (15)	R (29)	M (4)	
Liczba guzów / Tumors No. (%)				
+8	4 (26,7)	15 (51,7)	-	19 (39,6)
+12	5 (33,3)	11 (37,9)	2 (50)	18 (37,5)
+2	3 (20,0)	10 (34,5)	-	13 (27,1)
+7	3 (20,0)	8 (27,6)	2 (50)	13 (27,1)
-11	5 (33,3)	8 (27,6)	2 (50)	15 (31,3)
-3	4 (26,7)	8 (27,6)	1 (25)	13 (27,1)
-1	1 (6,7)	9 (31,0)	-	10 (20,8)

+ - dodatkowe kopie chromosomu lub jego fragmentu, - utraty chromosomu lub jego fragmentu, P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy

+ - chromosome or part of chromosome gains, - chromosome or part of chromosome losses, P - primary, R - recurrent, M - metastatic



Ryc. 13. Wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe określone metodą CGH i/ lub analizy kariotypów w guzach pierwotnych (P), wznowach miejscowych (R) i guzach przerzutowych (M) mięsaków maziówkowych. Lewa strona diagramu chromosomów - utraty, prawa - dodatkowe kopie materiału genetycznego

Fig. 13. Secondary unbalanced chromosomal aberrations detected by the CGH method and/ or karyotype analyses in primary (P), local recurrent (R) and metastatic (M) tumors in synovial sarcomas. Losses are shown on the left side of the chromosome diagram, gains on the right side

Zaburzenia równowagi genomowej metodą CGH określono w 15 guzach SS (11 MoSS, 1 BiSS i 3 PDSS), a otrzymane wyniki porównano z wynikami uzyskanymi z

analizy kariotypów tych samych guzów. W 14 (93,3%) guzach stwierdzono niezrównoważenie genomu, z tym, że w 10 (71,4%) guzach wykazano je zarówno metodą CGH jak i w oparciu o kariotyp tego samego guza, a w pozostałych czterech (28,5%) guzach zmiany te stwierdzono w oparciu tylko o jedną ze stosowanych metod. W jednym guzie BiSS o kariotypie prawidłowym nie wykazano zmian w genomie. W sumie stwierdzono występowanie 158 niezrównoważonych aberracji chromosomowych, w tym 76 (48,1%) wspólnych (wykrytych obiema metodami), 42 (26,6%) wyłącznie metodą CGH i 40 (25,3%) tylko w oparciu kariotypy. We wszystkich tych guzach były zarówno zmiany wspólne - stwierdzone dwiema metodami, jak również aberracje chromosomowe, których obecność wykazano wyłącznie badaniem CGH, albo tylko w kariotypie (ryc. 12).

4.2.3.1. Porównanie zaburzeń genomu w trzech podtypach histologicznych

Zaburzenia równowagi genomowej stwierdzono we wszystkich podtypach histologicznych SS: w 29 (81%) guzach MoSS, w dziewięciu (70%) guzach BiSS i w 10 (91%) guzach PDSS. We wszystkich podtypach główną przyczyną zaburzeń genomu były współwystępujące utraty i dodatkowe kopie materiału genetycznego i stwierdzono je w 22 (75,9%) guzach MoSS oraz w ośmiu (80%) PDSS, a zmiany te były statystycznie ($p=0,02$) w stosunku do guzów BiSS. Wyłącznie utraty lub wyłącznie dodatkowe kopie chromosomów lub ich fragmentów stwierdzono odpowiednio w pięciu (17,2%) i w dwóch (6,9%) guzach MoSS i po jednym (10%) guzie PDSS. W przypadku guzów BiSS z jednakową częstością - po trzy guzy (33,3%) - stwierdzano wyłącznie utraty, wyłącznie dodatkowe kopie oraz guzy, w których jednocześnie występowały utraty i dodatkowe kopie (tab. 17). Wtórne aberracje niezrównoważone w trzech podtypach histologicznych SS przedstawia ryc. 14.

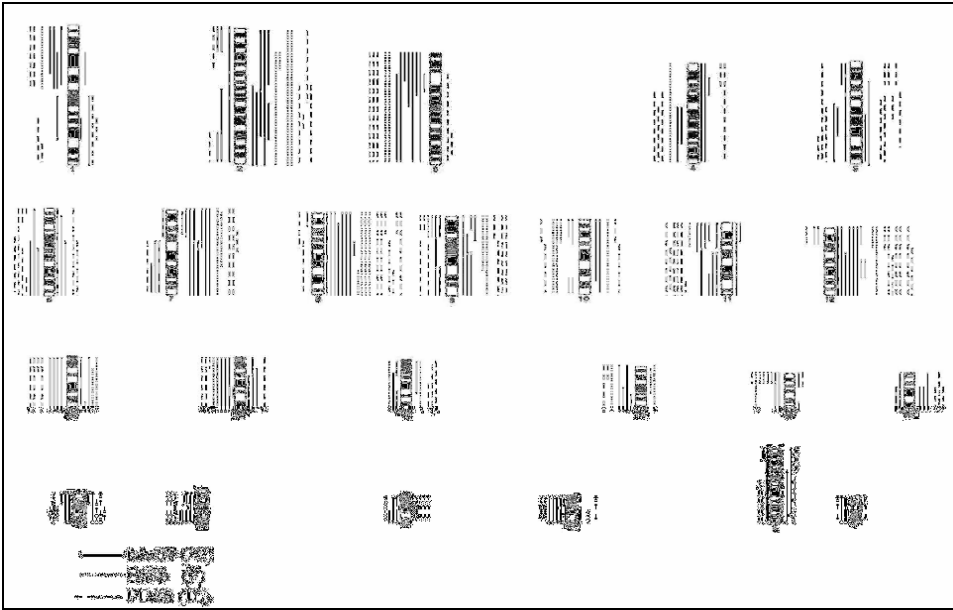
Tab. 17. Rodzaje zaburzeń genomu w 48 guzach trzech podtypów histologicznych mięsaków maziówkowych

Tab. 17. Genomic imbalances in 48 synovial sarcoma of three subtypes

Podtyp (liczba guzów) Subtype (tumors No.)	Rodzaj zaburzenia / Imbalances			
	Wyłącznie utraty <i>Losses only</i>	Wyłącznie dodatkowe kopie <i>Gains only</i>	Utraty i dodatkowe kopie <i>Losses and gains</i>	Razem <i>Total</i>
Liczba guzów (%) / Tumors No. (%)				
Mo (29)	5 (17,2)	2 (6,9)	22 (75,9)	29 (100)
Bi (9)	3 (33,3)	3 (33,3)	3 (33,3)	9 (100)
PD (10)	1 (10,0)	1 (10,0)	8 (80,0)	10 (100)
Łącznie Total (%)	9 (18,8)	6 (12,5)	33 (68,8)	48 (100)

Mo- jednofazowy, Bi- dwufazowy, PD- niskozróżnicowany

Mo- monophasic, Bi- biphasic, PD- poorly differentiated



Ryc. 14. Wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe określone metodą CGH i/lub analizy kariotypów w guzach trzech podtypów histologicznych mięsaków maziówkowych. Lewa strona diagramu chromosomów - utraty, prawa - dodatkowe kopie materiału genetycznego

Fig. 14. Secondary imbalanced chromosomal aberrations detected by the CGH method and/or karyotype analyses in three synovial sarcoma subtypes. Losses are shown on the left side of the chromosome diagram, gains on the right side

Zbadano zaangażowanie chromosomów w niezrównoważone aberracje chromosomowe w trzech podtypach histologicznych guzów SS. W 29 guzach MoSS łącznie stwierdzono 159 aberracji niezrównoważonych, co daje 5,5 aberracji/guz w tym: 3,2 utrat/guz i 2,3 dodatkowych kopii/guz. W aberracje zaangażowane były wszystkie chromosomy, z tym, że najczęściej dotyczyły chromosomów: 7 - 12 guzów (41,4%), 12 - 11 guzów (37,9%), 2 - 10 (34,5%) - utraty, prawa - dodatkowe kopie materiału genetycznego. Natomiast chromosomy: 3 (8 guzów - 27,6%), 20 (5 guzów - 17,2%), 16 (4 guzy - 13,8%) i 21 (3 guzy - 10,3%) ulegały jedynie utratom. Najczęściej obserwowano dodatkowe kopie chromosomów: 12 (9 guzów - 31%), 7 (8 guzów - 27,6%), 8 (7 guzów - 24,1%) i 2 (6 guzów - 20,7%) (tab. 18).

W dziewięciu guzach BiSS łącznie wykryto 44 aberracje niezrównoważone, co daje 4,9 aberracji/guz, w tym: 2,3 utrat/guz i 2,6 dodatkowych kopii/guz. Najczęściej tym aberracjom ulegały chromosomy 2, 8 i 10 - po cztery guzy (44%) i w przypadku pierwszych dwóch chromosomów były to wyłącznie dodatkowe kopie chromosomów lub ich fragmentów. Utratam najczęściej ulegał chromosom 10 - trzy guzy (33%). Chromosomy 5, 6, 18, X i Y nie uczestniczyły w niezrównoważonych aberracjach (tab. 18).

Tab. 18. Częstość aberracji niezrównoważonych określona metodą CGH i / lub w oparciu o analizę kariotypów w 48 guzach trzech podtypów mięsaków maziówkowych

Tab. 18. Unbalanced aberrations frequency in 48 tumors of three synovial sarcoma subtypes determined by CGH and / or karyotype analyses

Nr chromosomu* Chromosome No.	Podtyp (liczba guzów) / Subtype (tumors No.)					
	Mo (29)		Bi (9)		PD (10)	
	Rodzaj zaburzenia / Imbalances					
	Utraty** Losses	Dodatkowe kopie** Gains	Utraty** Losses	Dodatkowe kopie** Gains	Utraty** Losses	Dodatkowe kopie** Gains
Liczba (%) / No. (%)						
1	5 (17,2)	3 (10,3)	1 (11,1)	-	4 (40)	2 (20)
2	4 (13,8)	6 (20,7)	-	4 (44,4)	2 (20)	4 (40)
3	8 (27,6)	-	2 (22,2)	-	3 (30)	2 (20)
4	2 (6,9)	3 (10,3)	1 (11,1)	-	3 (30)	2 (20)
5	4 (13,8)	2 (6,9)	-	-	3 (30)	6 (60)
6	3 (10,3)	3 (10,3)	-	-	5 (50)	2 (20)
7	4 (13,8)	8 (27,6)	-	2 (22,2)	1 (10)	3 (30)
8	1 (3,4)	7 (24,1)	-	4 (44,4)	2 (20)	8 (80)
9	4 (13,8)	5 (17,2)	1 (11,1)	2 (22,2)	3 (30)	4 (40)
10	4 (13,8)	2 (6,9)	3 (33,3)	1 (11,1)	2 (20)	2 (20)
11	7 (24,1)	2 (6,9)	1 (11,1)	-	7 (70)	-
12	2 (6,9)	9 (31,0)	1 (11,1)	2 (22,2)	-	7 (70)
13	4 (13,8)	3 (10,3)	-	2 (22,2)	4 (40)	-
14	6 (20,7)	3 (10,3)	1 (11,1)	-	3 (30)	1 (10)
15	3 (10,3)	1 (3,4)	1 (11,1)	1 (11,1)	-	3 (30)
16	4 (13,8)	-	1 (11,1)	2 (22,2)	2 (20)	-
17	5 (17,2)	2 (6,9)	2 (22,2)	-	1 (10)	1 (10)
18	2 (6,9)	3 (10,3)	-	-	-	3 (30)
19	3 (10,3)	2 (6,9)	2 (22,2)	-	1 (10)	3 (30)
20	5 (17,2)	-	1 (11,1)	-	2 (20)	-
21	3 (10,3)	-	1 (11,1)	2 (22,2)	-	3 (30)
22	5 (17,2)	1 (3,4)	2 (22,2)	1 (11,1)	-	1 (10)
X	2 (6,9)	2 (6,9)	-	-	1 (10)	2 (20)
Y	2 (6,9)	-	-	-	1 (10)	1 (10)

Mo- jednofazowy, Bi- dwufazowy, PD- niskodróżnicowany, *- liczono aberracje obejmujące całe chromosomy oraz ich fragmenty, **- wytłuszczonym drukiem zaznaczono niezrównoważenie w co najmniej 20% guzów w każdym podtypie histologicznym

Mo- monophasic, Bi- biphasic, PD- poorly differentiated, * the aberrations of whole chromosomes or their parts were counted, ** imbalances in at least 20% of tumors in each histological subtypes are in bold

Zaburzenia równowagi genomowej stwierdzono w 10 guzach PDSS. Obserwowano łącznie 109 aberracji - 10,9 aberracji/guz. Częstość utrat wynosiła 5,0/guz, a dodatkowych kopii 5,9/guz. W 100% guzów stwierdzono aberracje chromosomu 8 i były to dodatkowe kopie (8 guzów - 80%) jak i utraty (2 guzy - 20%). Dodatkowo w aberracji niezrównoważone zaangażowane były chromosomy: 5 - dziewięć guzów (90%); 6, 9, 11 i 12 po siedem guzów (70%); 1 i 2 po sześć (60%) oraz 3 i 4 po pięć guzów (50%). Utratom najczęściej ulegał chromosom 11 - siedem guzów (70%) oraz 13 - cztery guzy (40%) i były to jedyne zmiany niezrównoważone ww. chromosomów stwierdzane w guzach PDSS. Dodatkowe kopie najczęściej dotyczyły, oprócz chromosomu 8, chromo-

somów: 12 (jedynie dodatkowe kopie) - siedem (70%) guzów, 5 - sześć (60%) oraz 2 i 9 po cztery (40%) guzy (tab. 18).

Podsumowanie:

- Translokację swoistą t(X;18)(p11;q11) wykryto metodą cytogenetyki klasycznej w 74% guzów. Badania FISH z zastosowaniem sondy swoistej dla genu *SS18* zlokalizowanego w chromosomie 18q11, umożliwiły zidentyfikowanie tej translokacji w pozostałych 26% guzów.
- Warianty t(X;18)(p11;q11) stwierdzono w 41% guzów. W aberracji te, obok chromosomów X i 18, zaangażowane były kolejno, co do częstości, chromosomy 15, 5, 1 i 17.
- Zaburzenia równowagi genomowej wykazało 80% guzów wszystkich podtypów histologicznych SS: 69% guzów - zarówno utraty jak i dodatkowe kopie, w pozostałych 31%, albo wyłącznie utraty (19%), albo wyłącznie dodatkowe kopie chromosomów lub ich fragmentów (12%).
- Aberracjom niezrównoważonym najczęściej ulegały chromosomy: 8 (46% guzów), 12 (43,8%), 2 i 9 (po 39,6%), 7 (37,5%), 11 (35,4%) oraz 1, 3 i 5 po (31,3%) guzów. Aberracje chromosomów 1 i 8 częściej stwierdzano w guzach R aniżeli P, natomiast 5 i 9 w guzach P w porównaniu do R (różnice statystycznie nieistotne).
- W dodatkowe kopie zaangażowane były, przede wszystkim, chromosomy: 8 (40% guzów), 12 (38%), 2 i 7 (po 27% guzów), a w utraty chromosomy: 11 (31% guzów), 3 (27%) oraz 1p (21% guzów).
- Dodatkowe kopie chromosomów 8, 2 i 7 częściej stwierdzano w guzach R aniżeli P (statystycznie nieistotne). W guzach przerzutowych nie stwierdzono dodatkowych kopii chromosomów 2 i 8.
- Utraty chromosomów 1p są bardziej charakterystyczne dla guzów R aniżeli P, chromosomu 11 dla guzów P w porównaniu do R (statystycznie nieistotne), natomiast chromosomu 3 z podobną częstością występują w tych guzach.
- Stosując jednocześnie badania metodą CGH i analizę zaburzeń z kariotypu, zaburzenia równowagi genomowej stwierdzono w 71% guzów. Około 50% aberracji niezrównoważonych wykazane było obiema metodami, natomiast pozostałe 50% stwierdzono tylko w oparciu o jedną z nich. We wszystkich guzach były zarówno zmiany wspólne stwierdzone dwiema metodami, jak i zmiany, których obecność wykryto tylko jedną z tych metod (CGH, lub w oparciu o kariotyp).
- Analiza porównawcza zaburzeń równowagi genomowej w trzech podtypach histologicznych SS wykazała najwyższy odsetek guzów (91%) z aberracjami niezrównoważonymi w PDSS, a najniższy (70%) w BiSS. W guzach PDSS i BiSS częstości występowania dodatkowych kopii chromosomów były nieznacznie wyższe w porównaniu do utrat, natomiast w guzach MoSS utraty były ok. 1,4x częściej przyczyną zaburzeń w genomie aniżeli dodatkowe kopie. Niezrównoważone aberracje chromosomów 8 i 11 częściej stwierdzano w guzach MoSS aniżeli PDSS (odp. $p=0,001$ i $p=0,03$) i w PDSS w porównaniu do BiSS (odp. $p=0,017$ i $p=0,019$). Wykazano, iż chromosomy: 3, 16 i 21 w guzach MoSS; 3, 4, 11 i 19 w BiSS oraz 11 i 13 w PDSS zaangażowane były wyłącznie w utraty, natomiast chromosomy 2, 7, 8 i 13 w guzach BiSS oraz 12, 15, 18 i 21 w PDSS zaangażowane były wyłącznie w tworzenie dodatkowych kopii.

4.3. Ewolucja zmian cytogenetycznych w guzach pierwotnych, nawrotowych i przerzutowych mięsaków pochodzących od jednego pacjenta

Łącznie prześlędzono ewolucje kariotypów guzów (11 pacjentów), pojawiających się w trakcie trwania choroby nowotworowej. Liczba guzów pochodząca od jednego pacjenta wahała się od dwóch do ośmiu: pięć guzów WDLPS od jednego pacjenta, cztery i osiem guzów od dwóch pacjentów z DDLPS. Prześlędzono ewolucję kariotypów guzów M/RLPS pochodzących od czterech pacjentów kolejno: siedem guzów, trzy guzy i po dwa guzy od dwóch pacjentów. W przypadku guzów SS zbadano po dwa guzy od czterech pacjentów.

4.3.1. Tłuszczakomięsaki dobrze zróżnicowane

Analizę kariotypów przeprowadzono metodami GTW oraz CGH w pięciu guzach będących wznowami miejscowymi zlokalizowanymi w przestrzeni zaotrzewnowej pojawiającymi się w ciągu 46 mies. trwania choroby pacjenta nr 15. We wszystkich guzach stwierdzono aberracje charakterystyczne w postaci chromosomów pierścieniowych, a w ostatnim guzie dodatkowo wystąpił olbrzymi chromosom markerowy. We wszystkich guzach wykazano amplifikację chromosomu 12q11-21 oraz dodatkowe kopie chromosomu 5p13-15. W guzie trzecim dodatkowo wystąpiły utraty chromosomów 19 i 22, a w czwartym dodatkowe kopie 6q15-pter. W ostatnim guzie zaniknęły dodatkowe kopie chromosomu 6q, ale pojawiły się chromosomu 4p13-15 oraz dodatkowo amplifikacja 14q11-12, a obok utrat chromosomów 19 i 22, stwierdzono utraty 16 (tab. 19). Najwięcej niezrównoważeń genomowych, w tym amplifikację 14q, stwierdzono w ostatniej badanej wznowie (tab. 19, guz 15-5).

Tab. 19. Aberracje niezrównoważone określone metodą CGH w pięciu guzach (wznowy miejscowe – R) tłuszczakomięsaków dobrze zróżnicowany pacjenta nr 15

Tab. 19. Unbalanced aberrations in five tumors (recurrence - R) of well-differentiated liposarcoma patient no 15 determined using the CGH method

Nr guza <i>Tumor No.</i>	Data badania (mies.)* <i>Analysis date (month)</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosomes losses</i>	Dodatkowe kopie / <i>Gains</i>	
			Chromosom <i>Chromosome 12</i>	Inne chromosomy ** <i>Other chromosomes</i>
15-1	04.96 (0)	brak / <i>absent</i>	12q11-21 (a)	5p13-15,
15-2	09.97 (17)	brak / <i>absent</i>	12q11-21 (a)	5p13-15,
15-3	10.98 (30)	19, 22	12q11-21 (a)	5p13-15,
15-4	10.98 (30)	brak / <i>absent</i>	12q11-21 (a)	5p14-15, 6q15-pter
15-5	02.00 (46)	16, 19, 22	12q11-21 (a)	4p13-15, 5p14-15, 14q11-12 (a)

*- podano miesiąc i rok oraz, w nawiasie - odległość w miesiącach od badania cytogenetycznego pierwszego guza, **- wytłuszczono zmiany wspólne dla wszystkich guzów, a- amplifikacja

*- month and year and a time period - in the bracket, since the first tumor cytogenetic examination are given, **- the changes dual for all tumors are in bold, a- amplification

Podsumowanie

- We wszystkich guzach WDLPS danego pacjenta amplifikacji ulega ten sam fragment chromosomu 12q.
- Wspólną dla wszystkich guzów wtórną aberracją chromosomową były dodatkowe kopie chromosomu 5p13-15.
- Najliczniejsze zmiany wtórne obserwowano w ostatniej wznowie, która pojawiła się po 46 mies. od pierwszego guza.

4.3.2. *Tłuszczakomięsaki odróżnicowane*

Przeprowadzono analizę kariotypu metodami GTW i CGH czterech guzów będących wznowami miejscowymi pojawiającymi się w przeciągu 23 miesięcy trwania choroby pacjenta nr 4. We wszystkich guzach stwierdzono obecność chromosomów pierścieniowych i/lub olbrzymich chromosomów markerowych. Metodą CGH wykazano, wspólną dla wszystkich badanych guzów, amplifikację chromosomu 12q11-23 oraz utratę chromosomu 6p21-pter. Oprócz powyższych zmian, we wszystkich guzach stwierdzano różne, dodatkowe aberracje wtórne. Najliczniejsze aberracje wtórne stwierdzono w pierwszej badanej wznowie, a najmniej liczne w trzeciej, która pojawiła się po siedmiu mies. od pierwszego badanego guza (tab. 20).

Tab. 20. Aberracje niezrównoważone określone metodą CGH i/lub w oparciu o kariotypy w guzach tłuszczakomięsaków odróżnicowanych (DDLPS) pochodzących od dwóch pacjentów

Tab. 20. *Unbalanced aberrations in tumors of dedifferentiated liposarcoma (DDLPS) from two patients determined using the CGH and/or karyotype analyses*

Nr guza* <i>Tumor No.</i>	Data badania (mies.)** <i>Analysis date (month)</i>	Rodzaj guza <i>Tumor type</i>	Utraty chromosomów*** <i>Chromosomes losses</i>	Dodatkowe kopie / <i>Gains</i>	
				Chromosom 12*** <i>Chromosome 12***</i>	Inne chromosomy <i>Other chromosomes</i>
4-1	07.02 (0)	R	1p36 -pter, 6p21-pter , 7q32-qter, 11q23-qter, 19, 20q12-qter, 22	12q11-23 (a)	2p22-pter, 5q21-23,
4-2	07.02 (0,3)	R	1p36 -pter, 6p21-pter , 19, 20q12-qter, 22	12q11-23 (a)	5q21-23,
4-3	02.03 (7)	R	6p21-pter	12q11-23 (a)	16q12-22
4-4	06.04 (23)	R	6p21-pter , 7q32-qter, 13q10-21	12q11-23 (a)	2p22-pter, 16q12-22
9-1	08.94 (0)	M	5p13-pter, 9q34-qter, 11p15-pter, 12p11-pter	nb	2p21-qter, 3q12-qter, 4q12-qter
9-2	10.96 (26)	R	brak / <i>absent</i>	nb	brak <i>absent</i>
9-3	07.97 (33)	M	brak / <i>absent</i>	12q12-22 (a)	brak

Nr guza* <i>Tumor No.</i>	Data badania (mies.)** <i>Analysis date (month)</i>	Rodzaj guza <i>Tumor type</i>	Utraty chromosomów*** <i>Chromosomes losses</i>	Dodatkowe kopie / <i>Gains</i>	
				Chromosom 12*** <i>Chromosome 12***</i>	Inne chromosomy <i>Other chromosomes</i>
					<i>absent</i>
9-4	11.98 (49)	R	7q32-qter	12q12-22 (a)	6q23-26
9-5	07.99 (58)	M	19p13-pter	nb	brak <i>absent</i>
9-6	11.99 (63)	M	17p, 19, 20q, 22	12q12-22 (a)	4, 5q13-q31, 6q22-q26, 9q32-pter, 14q10-q21,
9-7	11.00 (75)	M	1p36-pter, 11q12-q13, 19, 22	12q12-22 (a)	brak <i>absent</i>
9-8	11.00 (75)	M	1p36-pter, 11q12-q13, 17, 19, 22	12q12-22 (a)	5q15-q23, 6q22-q26,

R- wznowa, M- guz przerzutowy, nb- nie badano,*- wytluszczone nr guzów badanych metodą CGH, pozostałe guzy analizowane wyłącznie w oparciu o karyotyp, **- podano miesiąc i rok oraz - w nawiasie, odległość w miesiącach od badania cytogenetycznego pierwszego guza ***- wytluszczone zmianę wspólną dla wszystkich guzów pochodzących od jednego pacjenta, a- amplifikacja

R- recurrent, M- metastatic, nb- not research, *- tumor no which were analyzed by CGH method are in bold, the rest of the tumors were analyzed by karyotyping, **- month and year and a time period - in the bracket, since the first tumor cytogenetic examination are given, ***- the changes dual for all tumors isolated from a one patient are in bold, a- amplification

U pacjenta nr 9 badania cytogenetyczne wykonano w ośmiu guzach (2 guzy R i 6 M). Poszczególne guzy poddawano badaniom cytogenetycznym na przestrzeni 75 mies. trwania choroby. Chromosom pierścieniowy (*r*), jako jedyną zmianę cytogenetyczną, stwierdzono w jednym guzie R i w jednym guzie M. W pozostałych guzach M wykryto albo wyłącznie zmiany wtórne, albo chromosomy *r* i/lub *mar*, którym towarzyszyły liczne wtórne aberracje chromosomowe. W dwóch guzach (R i M) karyotyp był prawidłowy. Amplifikację chromosomu 12q12-q22 obserwowano we wszystkich pięciu guzach (jeden R i cztery M) badanych metodą CGH, a w guzie nr 9-3 (M) była to jedyna niezrównoważona aberracja chromosomowa. Pozostałe guzy charakteryzowały zarówno utraty jak i dodatkowe kopie różnych chromosomów lub ich fragmentów (tab. 20).

Podsumowanie

- We wszystkich guzach DDLPS pochodzących od danego pacjenta amplifikacji ulega zawsze ten sam fragment chromosomu 12: 12q11-23 (pacjent 4) i 12q12-q22 (pacjent 9).
- Guzy DDLPS charakteryzowała niestabilność karyotypowa. Tylko jedna wtórna aberracja chromosomowa była wspólna, dla wszystkich guzów pacjenta nr 4 (utrata chromosomu 6p21-pter), natomiast u pacjenta nr 9, w ośmiu kolejno analizowanych guzach, nie stwierdzono wspólnej, wtórnej aberracji chromosomowej.
- Utratę chromosomu 7q32-qter stwierdzono w dwóch guzach R pacjenta nr 4 i jednym guzie R od pacjenta nr 9.

- Pojawiające się w trakcie choroby (pacjent 9) guzy M charakteryzowały różne, wtórne aberracje chromosomowe. Nie stwierdzono wtórnej zmiany chromosomowej charakterystycznej dla wszystkich guzów M tego pacjenta.

4.3.3. *Tłuszczakomięsaki śluzowate/okrągłokomórkowe*

Przeprowadzono analizę cytogenetyczną siedmiu guzów (5 M i 2 R) MLPS pojawiających się w ciągu 64 mies. trwania choroby pacjenta nr 14. Kariotypy sześciu guzów były identyczne - t(12;16) wraz z aberracją wtórną w postaci delecji interstycjalnej chromosomu 6 - del(6)(q15q23). Badaniem FISH z zastosowaniem sondy genu *CHOP*, uzyskano wynik pozytywny. Jedynie w przerzutowym guzie 14-4 oprócz ww. zmian, dodatkowo stwierdzono utratę chromosomu 8p11-pter oraz dodatkową kopię chromosomu 1q (tab. 21).

Tab. 21. Aberracje niezrównoważone określone metodą CGH i/lub w oparciu o kariotypy w guzach tłuszczakomięsaków śluzowatych/ okrągłokomórkowych pochodzących od czterech pacjentów

Tab. 21. *Unbalanced aberrations in tumors of myxoid/round cell liposarcoma from four patients determined using the CGH and/or karyotype analyses*

Nr guza* <i>Tumor No.</i>	Podtyp/ <i>Subtype</i>	Data badania (mies.)** <i>Analysis date (month)</i>	Rodzaj guza <i>Tumor type</i>	Utraty*** <i>Losses</i>	Dodatkowe kopie <i>Gains</i>	t(12;16) FISH
14-1	MLPS	01.95 (0)	M	6q15-23	brak <i>absent</i>	obecna <i>present</i> nb
14-2	MLPS	05.98 (41)	M	6q15-23	brak <i>absent</i>	obecna <i>present</i> nb
14-3	MLPS	06.98 (42)	M	6q15-23	brak <i>absent</i>	obecna <i>present</i> nb
14-4	MLPS	02.00 (62)	M	6q15-23, 8p11-pter	1q	obecna <i>present</i> <i>CHOP+</i>
14-5	MLPS	02.00 (62)	M	6q15-23	brak <i>absent</i>	obecna <i>present</i> nb
14-6	MLPS	02.00 (62)	R	6q15-23	brak <i>absent</i>	obecna <i>present</i> nb
14-7	MLPS	03.00 (64)	R	6q15-23	1q	obecna <i>present</i> nb
4-1	MLPS	07.98 (0)	P	brak <i>absent</i>	brak <i>absent</i>	brak <i>absent</i> <i>CHOP+</i>

Nr guza* Tumor No.	Podtyp/ Subtype	Data badania (mies.)** Analysis date (month)	Rodzaj guza Tumor type	Utraty*** Losses	Dodatkowe kopie Gains	t(12;16) FISH
4-2	MLPS	04.00 (21)	R	16p11-pter	brak <i>absent</i>	brak <i>absent</i> CHOP+
4-3	MLPS	06.00 (23)	M	16p11-pter	brak <i>absent</i>	brak <i>absent</i> CHOP+
5-1	MLPS	10.02 (0)	P	16q	1q	obecna <i>present</i> CHOP+
5-2	RLPS	06.04 (20)	R	brak <i>absent</i>	5, 7q, 8, 13, 14	obecna <i>present</i> nb
17-1	RLPS	07.00 (0)	R	brak <i>absent</i>	brak <i>absent</i>	obecna <i>present</i> CHOP+
17-2	RLPS	04.02 (21)	M	brak <i>absent</i>	5	obecna <i>present</i> nb

MLPS- tłuszczakomięsak śluzowaty, RLPS- tłuszczakomięsak okrągłokomórkowy, P- guz pierwotny, R- wznowa miejscowa, M- guz przerzutowy, *- wytuszczono nr guzów badanych metodami CGH i w oparciu o kariotypy, pozostałe guzy analizowano wyłącznie w oparciu o kariotypy, ** - podano miesiąc i rok oraz - w nawiasie, odległość w miesiącach od badania cytogenetycznego pierwszego guza ***- wytuszczono zmianę wspólną dla wszystkich guzów pochodzących od jednego pacjenta, nb- nie badano

MLPS- myxoid liposarcoma, RLPS- round cell liposarcoma, P- primary, R- recurrent, M- metastatic,

- tumor no which were analyzed by CGH method and karyotyping are in bold, the rest of the tumors were analyzed by karyotyping only, **- month and year and a time period - in the bracket, since the first tumor cytogenetic examination are given, *- the changes dual for all tumors isolated from a one patient are in bold, nb- not research*

Przeprowadzono analizę trzech guzów (P, R i M) MLPS pacjenta nr 4 (24 mies. trwania choroby) i po dwa guzy (MLPS i RLPS) od pacjentów: nr 5 (P i po 11 mies. R), nr 13 (R i po 4 mies. M) oraz dwa guzy RLPS od pacjenta nr 17 (R i po 21 mies. M.). Tylko u pacjenta nr 4 w żadnym z trzech badań nie stwierdzono obecności t(12;16) - w pierwszym badaniu (guz P) uzyskano kariotyp prawidłowy, a w dwóch pozostałych (R i M) identyczną wtórną zmianę chromosomową prowadzącą do zaburzenia równowagi genomowej w postaci utrat chromosomu 16p11-pter (metoda CGH). We wszystkich trzech guzach tego pacjenta, przy użyciu sondy swoistej dla genu *CHOP*, techniką FISH uzyskano wyniki pozytywne (tab. 21).

Prześledzono ewolucję kariotypów guzów P i R (po 20 mies.) u pacjenta nr 5, u którego obserwowano progresję histologiczną tłuszczakomięsaka śluzowatego do okrągłokomórkowego. Aberracje wtórne w postaci utrat chromosomu 16q i dodatkowych kopii 1q stwierdzone w guzie MLPS, zaniknęły w guzie RLPS, w którym pojawiły się nowe zmiany chromosomowe - dodatkowe kopie chromosomów: 5, 7q, 8, 13 i 14 (tab. 21).

Spośród dwóch badanych guzów RLPS pacjenta nr 17 (R i M) tylko w guzie przerzutowym stwierdzono niezrównoważoną aberrację wtórną w postaci dodatkowych kopii chromosomu 5 (tab. 21).

Podsumowanie:

- Kariotypy guzów MLPS czy RLPS pochodzących od jednego pacjenta charakteryzowały się dużą stabilnością. Identyczne wtórne zmiany chromosomowe stwierdzano w guzach pojawiających się nawet po 64 mies. od badania pierwszego guza. W pojedynczych guzach obserwowano nieliczne, dodatkowe wtórne aberracje chromosomowe.
- Guz MLPS ulegający progresji histologicznej do RLPS, obok translokacji swoistej, charakteryzowały różne aberracje wtórne. Dodatkowe kopie chromosomu 1q stwierdzane w guzie MLPS, nie występowały w guzie RLPS tego pacjenta.
- Wtórna aberracja w postaci utraty 6q15-23 była zmianą charakterystyczną dla wszystkich guzów R i M pacjenta nr 14, a utrata 16p11-pter u pacjenta nr 4.

4.3.4. Mięśaki maziówkowe

Przeprowadzono analizę cytogenetyczną dwóch guzów MoSS pochodzących od pacjenta nr 6 (guz P i po 11 miesiącach M) (tab. 22). W obydwu guzach potwierdzono, stosując metodę FISH, obecność, nie wykrytej metodą prążkową, swoistej translokacji - t(X;18)(p11;q11). Dodatkowo, w guzach tych, badaniem techniką FISH z zastosowaniem sondy swoistej dla genu *SSX2*, uzyskano wynik pozytywny. W kariotypach obydwu guzów wykazano obecność licznych, wspólnych, wtórnych, niezrównoważonych aberracji chromosomowych, w które zaangażowane były chromosomy: 5, 11, 12, 13, 16, 18, 21 i 22. Cytogenetycznie guzy te różniły się utratą chromosomu 17p11-pter, obecną tylko w guzie P i utratą chromosomu 10p stwierdzoną w guzie R (tab. 22).

Tab. 22. Aberracje niezrównoważone w określone metodą CGH i/lub w oparciu o kariotypy w guzach mięsaków maziówkowych pochodzących od czterech pacjentów

Tab. 22. *Unbalanced aberrations in tumors of synovial sarcoma from four patients determined using the CGH method and/ or karyotype analyses*

Nr guza* <i>Tumor No.</i>	Podtyp/ <i>Sub-type</i>	Data badania (mies.)** <i>Analysis date (month)</i>	Rodzaj guza <i>Tumor type</i>	Utraty*** <i>Losses</i>	Dodatkowe kopie*** <i>Gains</i>	t(X;18)/ FISH
6-2	Mo	11.98 (0)	P	5q13-qter, 11p11-pter, 13p-cen-q11, 17p11-pter, 18, 21, 22	12p11-pter, 16p-q12	brak <i>absent</i> SS18+ SSX2+
6-3	Mo	09.99 (11)	R	5q13-qter, 10p, 11p11-pter, 13, 18, 21, 22	12p11-pter, 16p-q12	brak <i>absent</i> SS18+ SSX2+
9-1	Mo	12.04 (0)	R	X, 1p13-32, 1q10-25, 3, 4q21-31, 5, 6q13-qter, 7p11-pter, 15q22-qter	7q11-qter, 8p21-qter, 9p13-qter, 14q13-qter, 15p-q22	obecna <i>present</i> SS18+

Nr guza* <i>Tumor No.</i>	Pod- typ/ <i>Sub- type</i>	Data badania (mies.)** <i>Analysis date (month)</i>	Rodzaj guza <i>Tumor type</i>	Utraty*** <i>Losses</i>	Dodatkowe kopie*** <i>Gains</i>	t(X;18)/ FISH
9-2	Mo	12.04 (0)	R	2, 6q11-qter, 7p11-pter, 22	12q13-qter, 14q11-qter , 17p-q11	brak/ absent SS18+
15-1	PD	04.02 (0)	R	1q32-qter, 8p, 13q22-qter	3p21-pter, 4p12-pter	wariant <i>variant</i> t(X;5;18) SS18+ SSX1+
15-2	PD	11.02 (7)	R	1q32-qter, 3, 6, 11, 14	Y, 7, 8, 12, 18, 19q13-qter, 21	wariant <i>variant</i> t(X;5;18) SS18+ SSX1+
17-1	PD	06.04 (0)	R	6p23-pter, 8p-q13, 9p, 11, 13,	5p11-qter, 8q13-qter, 9q, 19p13-pter	obecna <i>present</i> SS18+
17-2	PD	02.05 (8)	M	6p23-pter, 8p-q13, 9p13-pter, 11, 13p-q11	5p13-pter, 19q13-qter	obecna <i>present</i> nb

Mo- jednofazowy, PD- niskoróżnicowany, P- guz pierwotny, R- wznowa miejscowa, M- guz przerzutowy, *- wyłuszczone nr guzów badanych metodą CGH i w oparciu o analizę kariotypu, pozostałe guzy analizowano wyłącznie w oparciu o kariotypy, ** - podano miesiąc i rok oraz - w nawiasie, odległość w miesiącach od badania cytogenetycznego pierwszego guza ***- wyłuszczone zmianę wspólną dla wszystkich guzów pochodzących od jednego pacjenta, nb- nie badano

Mo- *monophasic*, PD- *poorly differentiated*, P- *primary*, R- *recurrent*, M- *metastatic*, *- *tumor no which were analyzed by CGH method and karyotyping are in bold, the rest of the tumors were analyzed by karyotyping only*, **- *month and year and a time period - in the bracket, since the first tumor cytogenetic examination are given*, ***- *the changes dual for all tumors isolated from a one patient are in bold, nb- not research*

U pacjenta nr 9 zbadano dwa guzy MoSS - R uzyskane w trakcie jednego zabiegu chirurgicznego. Wyniki badań cytogenetycznych guza pierwszego (translokacja swoista i liczne zmiany wtórne) całkowicie różnią się od wyników uzyskanych w badaniu drugiego guza, w którym występowały wyłącznie aberracje wtórne inne aniżeli uzyskane w guzie pierwszym. Badaniem FISH z zastosowaniem sondy genu *SS18*, w obydwu guzach uzyskano wynik pozytywny. Analizując zaburzenia równowagi genomowej wykazano, że wśród licznych aberracji niezrównoważonych, zmianami wspólnymi dla obydwu guzów, są jedynie utraty chromosomu 7p11-pter oraz dodatkowe kopie 14q (tab. 22).

U pacjenta (nr 15) z rozpoznaniem PDSS zbadano dwa guzy R, które pojawiły się w przebiegu 7 mies. trwania choroby. W guzach tych stwierdzono złożone kariotypy z licznymi aberracjami chromosomowymi, wśród których wykryto wariant translokacji swoistej - t(X;5;18). Zaangażowanie genu *SSX1* oraz *SS18* stwierdzono metodą FISH. Wśród licznych wtórnych aberracji chromosomowych, utrata chromosomu 1q32-qter była jedyną wspólną, dla obydwu guzów, zmianą (tab. 22).

U pacjenta nr 17 zbadano dwa guzy PDSS (R i po 8 miesiącach M). W obu guzach wykazano obecność t(X;18) i licznych, wspólnych, wtórnych zmian chromosomowych,

a różniły się obecnością dodatkowych kopii chromosomów 8q i 9q, których obecność stwierdzono wyłącznie w guzie R (tab. 22).

Podsumowanie:

- We wszystkich guzach SS stwierdzono obecność translokacji swoistej-t(X;18)(p11;q11) lub wariantu tej translokacji.
- Wszystkie guzy charakteryzowały się złożonymi kariotypami z licznymi, wtórnymi, nie zrównoważonymi, w większości powtarzalnymi aberracjami chromosomowymi.
- Guzy P i R (pacjent 6) oraz R i M (pacjent 17) charakteryzowała duża zgodność kariotypów i różniły się między sobą pojedynczymi aberracjami chromosomowymi. Natomiast w dwóch guzach R od jednego pacjenta (pacjenci 9 i 15) stwierdzano tylko pojedyncze wspólne, wtórne aberracje chromosomowe.

5. DYSKUSJA

Zasadniczym celem niniejszej pracy było określenie zaburzeń równowagi genomowej w guzach dwóch typów histologicznych mięsaków człowieka: tłuszczakomięsaków (LPS) i mięsaków maziówkowych (SS). Zjawisko to badano w podtypach histologicznych obu mięsaków stosując metodę CGH i/lub analizę kariotypów tego samego guza. Zaburzenia genomowe porównywano w guzach pierwotnych, wznowach miejscowych i guzach przerzutowych. Ponadto, stosując dodatkowo technikę FISH, określono częstości występowania swoistych aberracji chromosomowych w obu typach mięsaków oraz prześledzono ewolucję zmian cytogenetycznych w guzach pochodzących od jednego pacjenta, pojawiających się w trakcie trwania choroby nowotworowej.

Tłuszczakomięsaki (LPS)

Chromosomowymi aberracjami charakterystycznymi dla tłuszczakomięsaków dobrze zróżnicowanych (WDLPS) są chromosomy pierścieniowe (*r*) i/lub olbrzymie chromosomy markerowe (*mar*) zbudowane przede wszystkim z chromosomu 12 [78, 89], aczkolwiek czasami stwierdza się w nich dodatkowo obecność fragmentów innych chromosomów: 1, 4, 6, 10, 13 lub 16 [61, 78, 98]. Zmiany te występują w około 80% guzów, a towarzyszące im wtórne aberracje chromosomowe pojawiają się w ok. 29% guzów [83]. Podobne wyniki uzyskano w niniejszej pracy, gdzie powyższe aberracje stwierdzono odp. w 87% i 26% guzów.

Porównawczą hybrydyzację genomową (CGH) zastosowano w 21 guzach WDLPS i we wszystkich stwierdzono zaburzenia równowagi genomowej. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy badając w sumie około 60 guzów WDLPS (metoda CGH) [26, 61, 76, 85, 100, 101]. W niniejszej pracy przyczyną zaburzeń genomowych w tych guzach był przede wszystkim dodatkowy materiał genetyczny - w 62% guzów stwierdzono wyłącznie dodatkowy materiał (w tym amplifikacje chromosomu 12q) i zmiany te zamiennie częściej obserwowano w porównaniu do guzów DDLPS i M/RLPS, rzadziej (38% guzów) występowały równocześnie utraty materiału genetycznego, co jest zgodne z danymi opublikowanymi przez innych autorów [61, 85, 100].

Podobnie jak w opublikowanych pracach [47, 83, 88], we wszystkich guzach WDLPS stwierdzono występowanie dodatkowych kopii chromosomu 12q11/13- q21/22, w tym w 86% guzów, amplifikacji tego regionu. Tę amplifikację wykryto również w dwóch guzach, w których kariotyp był prawidłowy. Cytowani powyżej autorzy badali guzy stosując jedynie metodę CGH, natomiast Micci i wsp. we wszystkich guzach, podobnie jak w niniejszej pracy, analizowali jednocześnie kariotyp metodą prążków G i zaburzenia równowagi genomowej metodą CGH i w 100% guzów potwierdzili obecność charakterystycznych dla WDLPS zmian genetycznych [61]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki dowodzą, że metoda CGH uzupełnia metody cytogenetyki klasycznej w wykrywaniu zmian charakterystycznych dla tych guzów.

W chromosomie 12q zlokalizowany jest, ulegający amplifikacji, gen *MDM2* oraz geny *SAS*, *CDK4* i *HMG2* [83, 85, 88]. Białko MDM2 inaktywując produkt genu supresorowego *TP53* może wywoływać transformację nowotworową [19, 83, 87]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają teorię, iż amplifikacja genu *MDM2* może być przyczyną transformacji w WDLPS.

Wtórne aberracje nie zrównoważone występowały w ponad 90% guzów i stwierdzono w nich średnio 3,7 aberracji/guz, w tym 1,4 utrat i 2,3 dodatkowych kopii. Autorzy

cytowanych powyżej prac nie określali szczegółowo liczby i rodzajów aberracji chromosomowych przypadających na jeden guz. W większości przypadków autorzy wykonywali badania na niewielkiej liczbie guzów: od czterech [100] do 11 [85]. Jedynie Micci i wsp. wykonali badania na podobnej liczbowo do badanych w niniejszej pracy guzów (22) [61]. Jednakże, wszyscy powyżsi autorzy, nie przeprowadzili porównawczej analizy w zależności od rodzaju guza (pierwotny, wznowa), czego dokonano w niniejszej pracy, w której obliczono, że średnia częstość występowania wtórnych aberracji niezrównoważonych w guzach P (4,7/guz), jest wyższa aniżeli w guzach R (3,0). Utraty materiału genetycznego 2x częściej są przyczyną zaburzeń genomowych w guzach P (2,1/guz) aniżeli w guzach R (0,9/guz). Natomiast dodatkowe kopie nieznacznie częściej stwierdzano w guzach P (2,6/guz) aniżeli w R (2,1 /guz). Uzyskane wyniki mogą świadczyć o większym znaczeniu w rozwoju guzów P utrat genów supresorowych zlokalizowanych w traconych chromosomach aniżeli aktywacji protoonkogenów zlokalizowanych w dodatkowych kopiach chromosomów.

W niniejszej pracy wykazano, że we wtórne aberracje niezrównoważone zaangażowane były głównie chromosomy: 3, 5, 6 i 14 (dodatkowe kopie różnych fragmentów) oraz 19 i 22 (utruty). Najistotniejszą zmianą jest, opisana po raz pierwszy, występująca wyłącznie w guzach R (45% guzów), amplifikacja różnych fragmentów chromosomu 14q, co pozwala przypuszczać, że geny zlokalizowane w tym chromosomie mogą być związane z rozwojem guzów R. Natomiast dodatkowe kopie chromosomu 3/3p z rozwojem guzów P, ponieważ występowanie tej aberracji stwierdzono wyłącznie w guzach P (50% guzów). Dodatkowe kopie chromosomów 5p i 6q23/26-qter oraz utraty chromosomu 22 występują z podobną częstością w guzach P (25%) jak i R (27% guzów). Jedynie utrata chromosomu 19 częściej stwierdzana była w guzach P (25% guzów) aniżeli w R (18% guzów). Dodatkowe kopie wszystkich ww. chromosomów sporadycznie były stwierdzane w guzach WDLPS [61, 85, 100], natomiast nie opisano utrat chromosomów 19 i 22.

Wszystkie wymienione powyżej niezrównoważone aberracje chromosomowe były opisywane w wielu różnych typach nowotworów człowieka [32]. Dodatkowe kopie chromosomu 5p obserwowano w komórkach tłuszczakomięsaka pleomorficznego (*pleomorphic liposarcoma*), jak również w mięsaku kościopochodnym, MFH, złośliwym nowotworze osłonek nerwów obwodowych i mięśniakomięsaku gładkokomórkowym [80]. W chromosomie tym zlokalizowano gen *SKP2*, którego produkt białkowy pełni istotną rolę w regulacji procesów proliferacji, a szczególnie przy przejściu komórki z fazy G1 do fazy S [32]. Rieker i wsp. wykazali związek aberracji +5p z progresją guza [80]. Z kolei +6q23-24 opisano w guzach: DDLPS, mięśniakomięsaku gładkokomórkowym oraz MPNST [32, 80]. W regionie 6q23-24 zlokalizowano protoonkogen z rodziny czynników transkrypcyjnych *MYB* (*c-MYB*), którego produkt uczestniczy w aktywacji genów regulujących wzrost i różnicowanie komórek. Aktywacja tego genu odbywa się na drodze amplifikacji i stwierdzono jej występowanie m.in. w białaczkach, raku jelita grubego i czerniaku złośliwym skóry [32, 81]. Zarówno w chromosomach 19 jak i 22 zmapowano różne geny supresorowe, których utraty mogą mieć wpływ na procesy transformacji nowotworowej [32]. Guzy WDLPS należą do guzów o granicznej złośliwości. Stwierdzenie w ich kariotypach opisanych powyżej niezrównoważonych aberracji chromosomowych, które wcześniej opisano w wielu złośliwych nowotworach człowieka, może świadczyć o progresji zachodzącej w tych guzach lub o zachodzącym procesie odróżnicowania w postaci DDLPS.

W nielicznych doniesieniach w literaturze opisano zmiany kariotypowe w guzach litych pochodzących od jednego pacjenta i dotyczyły one porównywania aberracji chromosomowych pomiędzy guzami pierwotnymi (P) i wznowami miejscowymi (R) [79] lub między guzami P a przerzutowymi (M) [104]. W niniejszej pracy przeprowadzono badania cytogenetyczne kariotypów i analizę zaburzeń równowagi genomu stosując metodę CGH w pięciu guzach R, z rozpoznaniem WDLPS, pojawiających się u pacjenta nr 15, w ciągu 46 mies. trwania choroby. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że guzy WDLPS pochodzące od jednego pacjenta charakteryzuje duża stabilność genomu, niemniej jednak w trakcie trwania choroby, w komórkach nowotworów gromadzą się dodatkowe zmiany genetyczne świadczące o progresji choroby.

W tłuszczakomięsakach odróżnicowanych (DDLPS) występują podobne charakterystyczne zmiany chromosomowe, jakie obserwowano w guzach WDLPS, czyli chromosomy pierścieniowe (*r*) i/lub olbrzymie chromosomy markerowe (*mar*), w których stwierdza się amplifikacje chromosomu 12q13-21 [83, 88, 98]. Wyniki badań cytogenetycznych przeprowadzonych w niniejszej pracy potwierdziły obecność tych aberracji charakterystycznych w ponad 73% guzów DDLPS, z czego w ok. 42% były to jedyne zmiany, a w pozostałych 31% towarzyszyły im, czasami liczne, wtórne strukturalne i/lub liczbowe aberracje chromosomowe. Wykrycie w kariotypie guzów litych obecności chromosomów pierścieniowych nie potwierdza rozpoznania WD/DDLPS, ponieważ obecność chromosomów o takiej strukturze stwierdzano również w innych guzach nowotworowych: w śluzowatej postaci złośliwego włókniaka histiocytarnego [72], włókniakomięsaku guzowatym [51], we włókniakomięsaku śluzowatym o niskim stopniu złośliwości [59], DFSP [51] czy LGFMS [59]. Dopiero wyniki badań FISH wykazały, iż w tworzenie markerów pierścieniowych (*r*) w guzach WD/DDLPS zaangażowany jest przed wszystkim chromosom 12 [78, 83, 88, 89, 98], natomiast w MFH 12, 16 i 20 [58, 78, 99], w DFSP chromosomy 17 i 22 [51], a w LGFMS 7 i 16 [59].

Do tej pory opublikowano wyniki zaburzeń równowagi genomowej badanych metodą CGH w 37 guzach tłuszczakomięsaków odróżnicowanych (DDLPS) [26, 80, 85, 100]. Guzy DDLPS (wyłącznie P i R) w powyższych pracach stanowiły jedynie część (od dwóch do dziewięciu guzów) materiału badawczego, w skład którego wchodziły również inne podtypy tłuszczakomięsaków. W niniejszej pracy badania CGH przeprowadzono w 15 guzach DDLPS i były to zarówno guzy P, R jak i M. W 100% guzów stwierdzono zaburzenia równowagi genomowej, co jest zgodne z doniesieniami wyżej cytowanych autorów. W 80% guzów stwierdzono zarówno utraty jak i dodatkowe kopie materiału genetycznego (w tym amplifikacje chromosomu 12q) i zmiany te obserwowano znamiennej częściej aniżeli w guzach WDLPS, a w pozostałych 20% wyłącznie dodatkowe kopie.

W 100% guzów stwierdzono występowanie amplifikacji chromosomu 12q11/14-q21/24, co jest zgodne z wynikami innych autorów [26, 80, 85, 100]. W guzach DDLPS, podobnie jak w WDLPS występuje amplifikacja genów *MDM2*, *CDK4* oraz *SAS* [47, 80, 88]. Amplifikacje chromosomu 12, stwierdzono również w pięciu guzach, w których nie wykryto obecności, charakterystycznych dla DDLPS, chromosomów pierścieniowych, ani olbrzymich chromosomów markerowych, co potwierdza, podobnie jak w guzach WDLPS, że metoda CGH uzupełnia metody cytogenetyki klasycznej w wykrywaniu zmian charakterystycznych dla tych guzów.

W ponad 93% guzów DDLPS, stwierdzono wtórne, niezrównoważone zmiany chromosomowe. Średnia liczba aberracji wynosiła 5,8/guz, w tym 3,3 utraty i 2,5 dodat-

kowych kopii. Jedynie Rieker i wsp. [80] obliczyli liczby aberracji przypadające na guz DDLPS: 2,0 utrat i 6,7 dodatkowych kopii/guz. Pozostali autorzy wykonali takie obliczenia dla wszystkich guzów, bez uwzględniania ich podtypów histologicznych [26, 85, 100]. Uzyskane wyniki własne różnią się od publikowanych, w których badano 2 guzy P i 7 R [80]. Różnice te mogą być spowodowane faktem, że 50% guzów opisanych w ww. pracy była, przed badaniem cytogenetycznym, poddana radioterapii, podczas gdy spośród 15 analizowanych przez nas guzów naświetlany był tylko jeden i charakteryzował się licznymi aberracjami chromosomowymi. W guzie tym stwierdzono największą liczbę aberracji nie zrównoważonych (10/guz).

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza porównawcza średniej liczby wtórnych aberracji niezrównoważonych na guz, w zależności od rodzaju guza (P, R, M), czego nie wykonali inni autorzy badający zaburzenia genomu w guzach DDLPS [26, 80, 85, 100], wykazała obecność najliczniejszych aberracji w guzach M (6,6/guz), natomiast w P i R na podobnym poziomie (odpowiednio 5,3 i 5,6). Najniższą częstość utrat obserwowano w guzach P (2,0/guz), a najwyższą w guzach M (4,3/guz). Z kolei dodatkowe kopie częściej stwierdzano w guzach P (3,3/guz) aniżeli w guzach R i M (po 2,3/guz). Uzyskane wyniki mogą sugerować, że w miarę rozwoju choroby, w guzach DDLPS zmienia się profil zmian cytogenetycznych - pojawia się więcej utrat materiału genetycznego, kosztem dodatkowych kopii, co z kolei może oznaczać, iż w miarę rozwoju choroby większego znaczenia nabierają utraty genów zlokalizowanych w traconych chromosomach, w porównaniu do genów zlokalizowanych w dodatkowych kopiach materiału genetycznego w komórce nowotworowej.

Ponieważ w niniejszej pracy dysponowano tylko trzema guzami P, ośmioma R i trzema M, nie można było przeprowadzić porównawczej analizy wtórnych aberracji niezrównoważonych w zależności od rodzaju guza. Zauważono jednak, że dodatkowe kopie chromosomów 4p/q i 5q14-23 oraz utraty chromosomów 1p/q, 11p/q występują w guzach P, R i M, a utraty chromosomów: 19, 20q i 22, wyłącznie w guzach R i M. Aberracje chromosomów 4p/q, 5q14-23 i 1p/q były obserwowane przez innych autorów tylko w pojedynczych guzach DDLPS [26, 80, 100]. Wyjątek stanowią utraty różnych fragmentów chromosomu 11, które były obserwowane przez Riekera i wsp. w guzach P i R [80] i występowały rzadziej (22%) aniżeli w naszych badaniach (36%). Zaistniała różnica prawdopodobnie wynika z obecności guzów M, które w niniejszej pracy badano obok guzów P i R. Natomiast utraty chromosomów 19, 20q i 22, nie były obserwowane przez innych autorów [26, 80, 100].

Aberracje ww. chromosomów stwierdzane były w wielu złośliwych nowotworach człowieka: +4p/q i +5q w mięsaku kościopochodnym [15, 36] czy MFH [32]. Utraty chromosomu 11 (głównie ramion q) stwierdzano w mięśniakomięsaku gładkokomórkowym macicy [11], mięsaku kościopochodnym i MFH [33]. W chromosomie 11q zmapowano kilka genów supresorowych, np. gen *MEN1*, którego mutacje stwierdzono w nowotworach przytarczyc i trzustki [33]. Z kolei w chromosomie 1p zlokalizowanych jest wiele genów, których mutacje związane są z rozwojem różnych nowotworów, np. mutacje genu *NBS* stwierdzone w nerwiaku zarodkowym współczulnym, *BRCD2* w raku piersi czy *P73*, który jest homologiem genu *TP53* i tracony jest w neuroblastoma i wielu innych nowotworach [33]. Również w chromosomach 19, 20 i 22 zmapowano liczne geny, których mutacje opisywano w wielu nowotworach [33]. Wtórne dla guzów DDLPS aberracje chromosomowe nie są zmianami charakterystycznymi dla tego podtypu LPS i stwierdza się je w różnych, złośliwych nowotworach człowieka.

Znane są doniesienia dotyczące wyników badań cytogenetycznych i zaburzeń genomowych guzów DDLPS, ale wykonane one były w guzach P i R pochodzących od różnych pacjentów [26, 47, 80, 85, 100]. W niniejszej pracy prześledzono ewolucję kariotypów u dwóch pacjentów z rozpoznaniem DDLPS: cztery guzy R pacjenta nr 4 oraz osiem guzów (dwa guzy R i sześć M) pacjenta nr 9 (tab. 20). W guzach obu pacjentów stwierdzono charakterystyczne zmiany cytogenetyczne oraz amplifikacje fragmentu chromosomu 12q, a także (często liczne) różne, wtórne aberracje chromosomowe prowadzące zarówno do utrat jak i dodatkowych kopii materiału genetycznego. Zaobserwowano, iż guzy DDLPS pochodzące od jednego pacjenta cechuje niestabilność kariotypowa - u pierwszego pacjenta tylko jedna wtórna aberracja była zmianą wspólną dla wszystkich guzów, które pojawiły się w trakcie trwania choroby nowotworowej, a u drugiego nie stwierdzono takiej zmiany. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy czasem trwania choroby, a liczbą aberracji pojawiających się w kolejnych guzach wznowy u pacjenta nr 4. Natomiast u pacjenta 9, guzy M, w porównaniu do guzów R charakteryzowały liczniejsze zmiany cytogenetyczne świadczące o progresji choroby nowotworowej. Wzrost liczby zmian w genomie w czasie progresji, jest cechą charakterystyczną większości nowotworów [104]. Örndal i wsp. opisali w 1993r. wyniki badań cytogenetycznych dwóch guzów R i sześciu M z rozpoznaniem MFH, pochodzących od jednego pacjenta. Nowotwory te charakteryzowały się złożonymi, poliploidalnymi kariotypami z licznymi aberracjami chromosomowymi. Podobnie jak w guzach DDLPS analizowanych w niniejszej pracy, obok zmian wspólnych dla kilku guzów, obserwowano aberracje chromosomowe występujące w dwóch, trzech lub pojedynczych guzach tego pacjenta [73].

W niniejszej pracy potwierdzono, iż guzy tłuszczakomięsaków dobrze zróżnicowanych (WDLPS) i odróżnicowanych (DDLPS) cechują takie same charakterystyczne aberracje chromosomowe (*r* i *mar*). Zastosowanie metody CGH umożliwiło bardziej precyzyjną charakterystykę genomu obu podtypów LPS. Wykryto, że fragment chromosomu 12q11-22 ulega amplifikacji zarówno w guzach WD jak i DDLPS, a 12q23-24 wyłącznie w guzach DDLPS. Poza tym, amplifikacja różnych fragmentów chromosomu 14q charakterystyczna jest dla guzów R, dodatkowe kopie chromosomu 3/3p dla guzów P, a chromosomu 5p występują w guzach P i R, wyłącznie w podtypie WDLPS. Natomiast dodatkowe kopie chromosomu 5q charakterystyczne są dla guzów P, R i M, a utraty chromosomu 20q dla guzów R i M podtypu DDLPS. Z kolei utraty chromosomów 19 i 22 występują w guzach P i R podtypu WDLPS oraz w R i M podtypu DDLPS.

Spośród przeanalizowanych 28 guzów tłuszczakomięsaków śluzowatych/ okrągłokomórkowych (M/RLPS), w 79% guzów stwierdzono obecność translokacji swoistej t(12;16)(q13;p11). W pozostałych guzach występowały wyłącznie aberracje wtórne, albo kariotyp był prawidłowy. Aberracje wtórne towarzyszyły translokacji swoistej w 91% guzów i stwierdzano je znacznie częściej aniżeli w guzach WDLPS i DDLPS, podczas gdy w literaturze częstość tę określono na 50% [23, 83]. Zaistniałe różnice mogą wynikać z faktu, iż w niniejszej pracy badaniom poddano tylko sześć guzów pierwotnych, a pozostałe to były wznowy i guzy przerzutowe, w których częściej występują aberracje wtórne [83].

Dodatkowo, w 22 guzach, wykonano badania FISH stosując dwukolorowe sondy komplementarne do genu *DDIT3* (*CHOP*). Wynik pozytywny uzyskano w 95,5% guzów, co jest zgodne z doniesieniami innych autorów [6]. Łącząc wyniki badań wykona-

nych metodami cytogenetyki klasycznej i FISH, uzyskano, wyższą od publikowanej (93%) [83], częstość translokacji swoistej - 100% guzów.

W literaturze opisano wiele przypadków nowotworów, w których nie wykazano badaniami cytogenetycznymi translokacji swoistej, natomiast metodami FISH i/lub PCR potwierdzano w nich obecność genu fuzyjnego charakterystycznego dla danej translokacji. Zjawisko to nazwano translokacją ukrytą (*cryptic translocation*) [21, 56, 106, 107]. Najwięcej doniesień na ten temat dotyczy białaczek. Opisano przewlekłe białaczki szpikowe, w których metodą cytogenetyki klasycznej nie stwierdzano obecności, przyczynowo związanego z rozwojem tej choroby, chromosomu Philadelphia (Ph), który powstaje w wyniku translokacji wzajemnej t(9;22)(q34;q11), a obserwowano +9 i +21 [21], lub t(6;9) [106]. Natomiast w obydwu przypadkach, techniką PCR, stwierdzono obecność, charakterystycznego dla chromosomu Ph, genu fuzyjnego *BCR/ABL*. Z kolei w 2004 r. Merchant i wsp. opisali ostrą białaczkę szpikową (AML-M4), w której kariotypie nie stwierdzono obecności ani inwersji chromosomu 16 - inv(16)(p13q22), ani t(16;16)(p13;q22), charakterystycznych dla tej białaczki, a jedynie del(16q22). Badaniami FISH i PCR potwierdzono obecność, charakterystycznego dla AML-M4, genu fuzyjnego *CBFβ/MYH11*, który zlokalizowany był w opisanym powyżej chromosomie 16 z delecją [56].

Spośród guzów litych, opisano mięsaka maziówkowego dwufazowego z prawidłowym kariotypem, w którym metodą FISH wykazano obecność, swoistego dla tego mięsaka, genu fuzyjnego *SS18/SSX1*. Według autorów pracy pierwszym etapem było powstanie swoistej translokacji t(X;18)(p11;q11), która następnie została „naprawiona” przez systemy naprawcze komórki, ale geny fuzyjne pozostały „nienaprawione” [107].

W badaniu cytogenetycznym guza wstępnie rozpoznanego jako MLPS, w złożonym tetraploidalnym kariotypie, obok t(12;16), wykryto chromosomy pierścieniowe i olbrzymie chromosomy markerowe. Te dwa ostatnie rodzaje markerów chromosomowych charakterystyczne są dla postaci WD i DDLPS. Badaniem FISH dwukolorową sondą swoistą dla genu *DDIT3*, potwierdzono obecność translokacji swoistej i dodatkowo stwierdzono amplifikację fragmentu tego genu. Do dzisiaj opublikowano tylko jeden guz tłuszczakomięsaka z taką kompozycją aberracji chromosomowych. Ten typ nowotworu nazwano tłuszczakomięsakiem śluzowatym z komponentą dobrze zróżnicowaną (*mixed well differentiated and myxoid liposarcoma*) [55]. Opisany w niniejszej pracy guz potwierdza możliwość istnienia tego typu mięsaka.

Zaburzenia równowagi genomowej 34 guzów M/RLPS określano dwiema metodami: w 16 guzach w oparciu o równoczesne badania CGH i kariotypu, a w 18 wyłącznie w oparciu o analizę kariotypów. Opublikowane dotychczas wyniki badań zaburzeń genomowych obejmują łącznie ok. 40 guzów [71, 76, 85, 100]. W niniejszej pracy zaburzenia genomowe stwierdzono w 80% guzów M/RLPS, co stanowi wyższą częstość aniżeli obserwowali inni autorzy: 30% [71], 36% [76] i 47% [85]. Różnice powyższych danych mogą wynikać z faktu, że w niniejszej pracy badaniom poddano przede wszystkim guzy R i M, w których częściej stwierdza się aberracje wtórne prowadzące do zaburzeń genomowych [83] i tylko sześć guzów P, podczas gdy autorzy cytowanych powyżej prac badali przede wszystkim guzy P, a ponadto stosowali tylko technikę CGH. Dodatkowo stwierdzono, że wtórne, niezrównoważone aberracje chromosomowe znamienne częściej występują w guzach R i M w porównaniu do guzów P, czym potwierdzono teorię, że w miarę rozwoju choroby nowotworowej wzrasta w guzach liczba wtórnych zmian chromosomowych [83].

Utraty materiału genetycznego rzadko są przyczyną zaburzeń genomowych w LPS. Wyjątek stanowią guzy pleomorficzne, które często charakteryzują się złożonymi kariotypami z licznymi aberracjami chromosomowymi [83]. Podczas gdy w niniejszej pracy, spośród 27 guzów M/RLPS, w których wykazano zaburzenia genomowe, w ponad 1/3 guzów (R i M) stwierdzono wyłącznie utraty materiału genetycznego, w następnej 1/3 guzów (znamiennie częściej w guzach R aniżeli M), obok utrat, stwierdzono dodatkowy materiał genetyczny, natomiast w pozostałej 1/3 guzów (głównie M) wyłącznie dodatkowe kopie chromosomów i/lub ich fragmentów. Zauważono, iż w guzach, w których stwierdzono wyłącznie utraty materiału genetycznego, zaangażowane były inne chromosomy (3q, 4, 6q, 14, 16p i 19p), aniżeli w guzach wyłącznie z dodatkowym materiałem genetycznym (1q, 5, 7, 8, 12q, 13, 14, 18q, 19 i 20). Uzyskane wyniki świadczą o tym, że w proces progresji guzów M/RLPS zaangażowane są zarówno geny supresorowe i systemu naprawczego DNA zlokalizowane w traconych chromosomach, jak i onkogeny zlokalizowane w chromosomach, których dodatkowe kopie obserwowano w ww. guzach.

W guzach M/RLPS, średnia liczba aberracji niezrównoważonych była identyczna jak w danych z literatury [85] i wynosiła 2,8 na guz. Ponieważ spośród 27 guzów M/RLPS, w których stwierdzono zaburzenia równowagi genomowej, tylko dwa to były guzy P, dokonano porównania zaburzeń pomiędzy guzami R (14 guzów) i M (11 guzów), czego nie dokonali autorzy innych prac [71, 76, 85, 100]. Okazało się, że średnia liczba wszystkich aberracji niezrównoważonych (3,9/guz) oraz utrat materiału genetycznego (1,6/guz) w guzach R, była odpowiednio: 2x i ok. 3x większa w porównaniu do guzów M (1,9 i 0,6/guz, kolejno). Dodatkowe kopie materiału genetycznego również częściej (2,3/guz) stwierdzano w guzach R aniżeli w M (1,3/guz). Niższa częstość aberracji wtórnych w guzach M w porównaniu do R może być spowodowana faktem, iż niektóre guzy zakwalifikowane jako przerzutowe, mogły tak naprawdę być nowym ogniskiem choroby - tak naprawdę drugim guzem pierwotnym, a nie przerzutowym. Dotyczyć to może guzów M, które zlokalizowane były na udzie, szyi czy ścianie klatki piersiowej (była to inna lokalizacja aniżeli guza pierwotnego), a nie w płucach czy wątrobie, a te dwie ostatnie lokalizacje są najbardziej typowe dla guzów przerzutowych [62, 91]. Ponadto, guzy przerzutowe są tworzone jedynie przez wyselekcjonowane kłony komórkowe istniejące w guzie P lub R. Częstości chromosomowych aberracji niezrównoważonych w guzach pierwotnych są niższe aniżeli w guzach wznowy [83].

Porównując częstości występowania niezrównoważonych aberracji chromosomowych w guzach R i M stwierdzono, iż w guzach tych w dodatkowe kopie najczęściej zaangażowane były chromosomy 1q i 8, natomiast w utraty 6q i 16p/16q, a zmiany te częściej obserwowano w guzach R (odp. 1,3; 4; 1,2 i 1,6x) aniżeli w M, jednakże zmiany te są statystycznie nieistotne. Aberracje chromosomów 6q i 8 były opisywane przez innych autorów, ale nie podawali oni częstości występowania tych aberracji w guzach MLPS. Nie zauważyli również, stosując wyłącznie metodę CGH, występowania aberracji niezrównoważonych chromosomów 1q i 16 [71, 76, 85, 100]. Natomiast inni autorzy, wykorzystując metodę GTW, stwierdzili zaangażowanie ww. chromosomów we wtórne aberracje, następstwem których była trisomia 1q i utrata 16q [66, 92, 108]. Wtórna aberracja w postaci trisomii chromosomu 8, opisywana była przede wszystkim w guzach R i M [52]. W niniejszej pracy stwierdzono, iż aberracja ta 4x częściej występuje w guzach R aniżeli M, w związku z tym, wydaje się być zmianą bardziej typową dla guzów R aniżeli M.

Wszystkie opisane powyżej aberracje chromosomowe wykryto w wielu różnych nowotworach człowieka. Dodatkowe kopie chromosomu 8 opisywano w: mięsaku Ewinga (29% guzów), mięsaku jasnokomórkowym (70% guzów) i mięsaku maziówkowym (14% guzów) [45], MFH [111], włókniakomięsaku [84], MPNST [8], *myeloid sarcoma* [14] i chrzęstniakomięsaku [35], jak również w ostrych i przewlekłych białaczkach szpikowych [16, 67]. Okazuje się, że trisomia chromosomu 8, w niektórych nowotworach, może mieć znaczenie kliniczne: w CML trisomia 8, obok dodatkowego chromosomu Ph i izochromosomu 17p, zwiastuje kryzę blastyczną [9], natomiast w mięsaku maziówkowym związana jest z progresją guza - najczęściej stwierdzana jest w guzach o średnicy ponad 5cm [44, 82, 90].

Dodatkowe kopie chromosomu 1q, w tym amplifikacje, obserwowano w wielu różnych guzach nowotworowych, również pochodzenia tłuszczowego: WDLPS, DDLPS, tłuszczakomięsaku pleomorficznym, MFH [61, 70, 85] oraz mięsaku kościopochodnym, mięśniakomięsaku gładkokomórkowym i rakach: wątroby i jelita grubego (najczęściej w guzach M ww. raków). Występowanie tej mutacji w tak różnorodnych histologicznie nowotworach, sugeruje, iż w chromosomie 1q zlokalizowane są geny związane z rozwojem i proliferacją guzów [34].

Z kolei utraty chromosomu 6q opisywano w: mięsaku kościopochodnym [33], chrzęstniakomięsaku [53], MFH [33], mięsach macicy [27], raku piersi i jajnika [33], a utraty różnych fragmentów chromosomu 16 w rakach wątroby, płuc i piersi [33], mięsaku Ewinga [3] czy MPNST [8]. Występowanie ww. aberracji w tak wielu różnych, złośliwych nowotworach może sugerować, iż w chromosomach tych zlokalizowane są geny supresorowe [32].

W niniejszej pracy po raz pierwszy porównano zaburzenia równowagi genomowej w guzach M/RLPS określone jednocześnie metodą CGH i analizy kariotypów. W 62% guzów obie metody potwierdziły nie zrównoważenie genomu, z tym, że niespełna 39% zmian była stwierdzona obiema metodami, a pozostałe, albo tylko metodą CGH (24%), albo tylko w oparciu o kariotypy (37%). Zgodność wyników uzyskanych z zastosowaniem obu metod stwierdzono w 50% guzów. Dlatego też, w celu precyzyjnego określenia zaburzeń równowagi genomowej w guzach nowotworowych, najlepiej stosować obydwie metody badawcze.

Prześledzono ewolucję kariotypów guzów czterech pacjentów z rozpoznaniem M/RLPS analizując od dwóch do siedmiu guzów od jednego pacjenta. We wszystkich guzach stwierdzono (metodą prążków G i/lub FISH) obecność translokacji swoistej t(12;16). Wykazano, iż jeżeli zmiana swoista występowała w postaci aberracji ukrytej, w takiej postaci utrzymywała się we wszystkich guzach pochodzących od tego pacjenta. Wykazano również, że guzy M/RLPS danego pacjenta pojawiające się w trakcie trwania choroby, charakteryzuje duża stabilność genomu - aberracje wtórne utrzymują się w większości guzów R i M danego pacjenta i tylko sporadycznie pojawiają się dodatkowe zmiany chromosomowe.

Mandahl i wsp. opisali wyniki badań cytogenetycznych dwóch guzów MLPS (P i M) pochodzących od jednego pacjenta, które miały identyczne kariotypy z t(12;16) jako jedyną zmianą cytogenetyczną [49]. Z kolei Gibas i wsp. opisali kariotypy dwóch guzów M od jednego pacjenta rozpoznanych jako MLPS. Wspólną zmianą chromosomową dla obydwu guzów była t(12;16) i różniły się one aberracjami wtórnymi [23].

Po raz pierwszy prześledzono zmiany cytogenetyczne w guzach pacjenta, u którego stwierdzono histologiczną progresję MLPS do RLPS. Jedyną wspólną zmianą cytogene-

tyczną, występującą w obydwu guzach, była aberracja swoista. W guzie MLPS stwierdzono pojedyncze zmiany wtórne (-16q i +1q), które zaniknęły w guzie RLPS, ale pojawiły się inne wtórne aberracje i były to wyłącznie dodatkowe kopie chromosomów: 5, 7q, 8, 13 i 14. W trakcie histologicznej progresji tłuszczakomięsaka śluzowatego w okrągłokomórkowy występują istotne różnice chromosomowe. Guzy te charakteryzują zupełnie odmienne wtórne aberracje chromosomowe, przy zachowaniu wspólnej aberracji swoistej.

Poszczególne podtypy histologiczne tłuszczakomięsaków różnią się cytogenetycznie, ale nie zaobserwowano, aby lokalizacja nowotworu wpływała na obecność aberracji swoistych, czy stopień złożoności kariotypu stwierdzanego w danym guzie.

Mięsaki maziówkowe (SS)

Przeprowadzono analizę cytogenetyczną 23 guzów trzech podtypów histologicznych SS i były to zarówno guzy pierwotne, wznowy miejscowe jak i guzy przerzutowe. Translokację swoistą t(X;18)(p11;q11) lub jej wariant stwierdzono w 74% guzów, a w pozostałych kariotyp był prawidłowy lub występowały wyłącznie aberracje wtórne. We wszystkich guzach, w których nie wykazano metodą cytogenetyki klasycznej obecności t(X;18), potwierdzono jej obecność wykonując badanie FISH z zastosowaniem sondy swoistej dla genu *SS18*. W związku z tym, częstość występowania aberracji swoistej w badanych 23 guzach wzrosła z 74% do 100%. Wyniki te są zbliżone do danych z literatury, gdzie swoistą translokację wykrywano w ponad 95% guzów [45, 82]. Zjawisko translokacji ukrytej było stwierdzane zarówno w guzach SS o kariotypie prawidłowym [107] jak i w guzach charakteryzujących się występowaniem wyłącznie aberracji wtórnych [2, 38], w których metodą FISH z zastosowaniem sond swoistych dla genów *SS18* lub *SSX*, albo metodą PCR potwierdzono obecność translokacji swoistej [2, 38, 107]. W niniejszej pracy potwierdzono dane publikowane stwierdzające, iż w guzach MoSS z jednakową częstością występują mutacje genów *SSX1* i *SSX2* [69, 74, 82], 5-10% guzów BiSS charakteryzują mutacje *SSX2* [82], a w guzach PDSS głównie mutacje genu *SSX1* [74]. Dopiero wprowadzenie kilku metod badawczych - GTW i FISH, z zastosowaniem sond swoistych dla genów zlokalizowanych w miejscach pęknięć chromosomów zaangażowanych w aberracje, umożliwia pełną diagnostykę i wykrycie aberracji pierwotnej w 100% guzów.

Prosty kariotyp z t(X;18) jako jedyną zmianą cytogenetyczną, stwierdzono tylko w dwóch guzach (12%), w pozostałych zaś towarzyszyły jej liczne wtórne, strukturalne i/lub liczbowe aberracje chromosomowe, podczas gdy wg Sandberga, średnio 30% guzów (głównie pierwotnych) charakteryzuje prosty kariotyp [82]. Zaistniała różnica pomiędzy badaniami własnymi i opublikowanymi może świadczyć o wyższym zaawansowaniu klinicznym choroby u pacjentów, których nowotwory były przedmiotem badań w niniejszej pracy.

W mniej niż 10% guzów stwierdza się występowanie wariantów translokacji swoistej, w którą, obok chromosomów X i 18, zaangażowane są inne chromosomy [82]. W niniejszej pracy aberracje takie stwierdzono w 41% guzów (MoSS i PDSS), w których obok chromosomów X i 18 zaangażowane były chromosomy: 1, 5, 15 i 17. Natomiast uwzględniając kariotypy wszystkich SS badanych w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki GUMed, częstość występowania wariantów wynosi 11,7% [28]. Warianty translokacji z ww. chromosomami opisano w literaturze, ale stwierdzono inne miejsca pęknięć tych chromosomów [74, 82] aniżeli w guzach przez nas analizowanych. Łącząc

dane publikowane [42, 43, 50, 74] i wyniki własne, warianty translokacji stwierdzono w 27 guzach SS. Najczęściej w aberrację tę zaangażowany był chromosom 15 (6 guzów) oraz chromosomy 1, 5 i 12 (po 3 guzów). Wszystkie guzy analizowane w niniejszej pracy, charakteryzują złożone kariotypy z licznymi wtórnymi aberracjami chromosomowymi, które nie zawsze można było określić tylko w oparciu o badanie metodą GTW. W celu precyzyjnego określenia zmian chromosomowych, w trzech guzach pochodzących od trzech pacjentów, dodatkowo wykonano badania metodą M-FISH. Nie zaobserwowano różnic cytogenetycznych ani histologicznych pomiędzy mięsakami maziówkowymi z „klasyczną” postacią translokacji swoistej t(X;18), a guzami z wariantami tej translokacji zawierającymi, obok chromosomów X i 18, czasami kilka dodatkowych chromosomów [28].

Zaburzenia równowagi genomowej analizowano w 60 guzach SS w tym: 36 guzów MoSS, 13 BiSS i 11 PDSS. W 15 guzach zjawisko to określono w oparciu o jednoczesne badania metodą CGH i analizy kariotypów, a w pozostałych 45 guzach wyłącznie w oparciu o kariotypy. Do tej pory w literaturze zaburzenia genomu, badane wyłącznie metodą CGH, opisano w ok. 100 guzach SS [69, 79, 102, 104], a w 21 wyłącznie w oparciu o analizę kariotypów [50]. Wyniki badań liczyń grup guzów przedstawili Szymańska i wsp.- 67 guzów [102] oraz Nakagawa i wsp.- 22 guzy [69], natomiast pozostali autorzy przedstawiali po kilka guzów SS, łączące je z badaniami innych rodzajów nowotworów litych [79, 104].

W niniejszej pracy zaburzenia równowagi genomowej stwierdzono w 80% guzów SS, co stanowi wyższą częstość aniżeli obserwowali inni autorzy: 55% [102] i 68% [69]. W 69% guzów były to zarówno utraty jak i dodatkowe kopie, w 19% wyłącznie utraty, a w pozostałych 12% wyłącznie dodatkowe kopie. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, iż w większości mięsaków maziówkowych (guzy P, R i M), zaburzenie równowagi genomowej wynika zarówno z utrat, jak i dodatkowych kopii materiału genetycznego, natomiast wyłącznie utraty lub wyłącznie dodatkowe kopie stwierdzano głównie w guzach P i R (tylko w jednym guzie M), czego nie opisywali autorzy cytowanych powyżej prac.

Tab. 23. Średnia liczba aberracji niezrównoważonych przypadająca na guz mięsaka maziówkowego - porównanie z literaturą

Tab. 23. *The average number of unbalanced aberrations per synovial sarcoma tumor -review of the literature*

Liczba guzów/ <i>Tumors No.</i>	Liczba na guz/ <i>No. per tumor</i>			Źródło/ <i>Reference</i>
	Aberracji/ <i>Aberrations</i>	Utrat/ <i>Losses</i>	Dodatkowych kopii/ <i>Gains</i>	
48	8,3	4,5	3,8	bad. własne/ <i>present series</i>
22	4,0	1,0	3,0	Nakagawa 2006 [69]
67	4,7	b.d.	b.d.	Szymańska 1998 [102]

b.d.- brak danych / *no data*

Średnia liczba aberracji niezrównoważonych przypadająca na jeden guz w badaniach własnych była 2x wyższa aniżeli u innych autorów (tab. 23). Zastąpienie różnic mogą wynikać z faktu, iż w badanym przez nas materiale przeważały liczbowo guzy R i

M (łącznie 33 guzy) w stosunku do guzów P (15 guzów), podczas gdy cytowani badacze analizowali zaburzenia genomu w 60 guzach P i tylko 7 R i M [102], natomiast Nakagawa i wsp. wyłącznie w guzach P (22) [69]. Okazuje się jednak, że w naszych badaniach, liczba aberracji niezrównoważonych przypadająca na jeden guz P (8,7/guz), również jest 2x wyższa aniżeli u innych autorów. Ponieważ żaden z badanych pacjentów nie był, przed badaniem cytogenetycznym guza, poddawany leczeniu, można przypuszczać, iż przyczyną tak licznych wtórnych aberracji chromosomowych w guzach tych pacjentów był wyższy stopień zaawansowania klinicznego choroby, aniżeli u pacjentów badanych przez innych autorów [69, 102]. Wysoka liczba aberracji niezrównoważonych stwierdzona w guzach R i M (8,5 i 6,8 aberracji/guz kolejno), potwierdza teorię, iż w trakcie progresji guza, wzrasta w nim liczba wtórnych niezrównoważonych aberracji chromosomowych [82].

Tab. 24. Porównanie częstości występowania utrat i dodatkowych kopii wybranych chromosomów w mięśniakach maziówkowych - badania własne i dane z literatury

Tab. 24. Comparison of the losses and gains frequencies in selected chromosomes in synovial sarcomas - present series and review of the literature

Rodzaj aberracji* Type of aberration*	Badania własne Present series P(15), R(29), M(4)	Mandahl, 1995 [50] P(13), R(8), M(6)	Szymańska, 1998, [102] P(58), R(2), M(1)	Nakagawa,2006 [69] P(22)
% guzów/ % tumors				
+8	40	17	30	27
+12	38	14	30	33
+2	27	10	16-22**	27
+7	27	13	b.d.	27
-11	31	10	14	b.d.
-3	31	17	22-24**	27
-1	21	b.d.	14	13

P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy, *- różne fragmenty chromosomów, ** - odp. ramiona p i q danego chromosomu, b.d.- brak danych

P- primary, R- recurrent, M- metastatic, * - different fragments of the chromosome, ** - the p and the q arms of each chromosome, respectively, b.d.- no data

Porównanie wyników własnych i danych literaturowych odnośnie chromosomów najczęściej zaangażowanych w aberracje wtórne w guzach SS przedstawiono w tab. 24. W dodatkowe kopie zaangażowane były kolejno, w zależności od częstości występowania, chromosomy: 8, 12, 2 i 7, natomiast w utraty chromosomy: 11, 3 i 1. Zaangażowanie wszystkich ww. chromosomów w zaburzenia równowagi genomowej były obserwowane przez innych autorów, z tym, że częstości zmian w badaniach własnych (w większości chromosomów) były wyższe aniżeli w danych opublikowanych (tab. 24), co może być związane z faktem, że cytowani badacze analizowali przede wszystkim guzy pierwotne [69, 102]. Ponieważ w niniejszej pracy dysponowano tylko czterema guzami M, porównano zaangażowanie ww. chromosomów we wtórne aberracje niezrównoważone wyłącznie w guzach P (15 guzów) i R (29 guzów). Nie znaleziono wtórnej aberracji chromosomowej charakterystycznej dla guzów P lub R, ale zauważono, że ww. chromosomy (z wyjątkiem 11, którego utraty nieznacznie częściej obserwowano w guzach P), częściej zaangażowane były w aberracje w guzach R w porównaniu do P. Stwierdzono,

że dodatkowe kopie chromosomu 8, ok. 2x częściej, a utraty chromosomu 1 ponad 4x częściej obserwowano w guzach R aniżeli w P (statystycznie nieistotne), co może sugerować, iż geny obecne w tych chromosomach mają szczególne znaczenie w rozwoju guzów R. Nakagawa i wsp. oraz Szymańska i wsp., z podobną częstością (w guzach P) obserwowali trisomię chromosomu 8, natomiast utraty chromosomu 1 - 2x częściej aniżeli w niniejszych badaniach [69, 102]. Potwierdziliśmy opublikowane [82] dane wskazujące, iż trisomia chromosomu 2 nie występuje w guzach pierwotnych, a chromosomu 8 w przerzutowych. Stwierdzone w guzach P dodatkowe kopie chromosomu 2 dotyczyły ramion p lub q tego chromosomu (ryc. 13) i były obserwowane również przez innych autorów [50, 68, 102]. W guzach SS, w których występują dodatkowe kopie chromosomu 2p, wykazano mutacje zlokalizowanych tam onkogenów *MSH2* i *KCNK12*, które mogą mieć znaczenie kliniczne [68]. Z kolei występująca w guzach SS trisomia chromosomu 12, a szczególnie ramion q tego chromosomu, w którym zlokalizowane są liczne onkogeny (*CDK2*, *SAS*, *CDK4*, *MDM2* i in.) ma złe rokowanie kliniczne [68].

Aberracje niezrównoważone wszystkich ww. chromosomów, obserwowano nie tylko w guzach mięsaków maziówkowych, ale w wielu różnych typach nowotworów człowieka. Zmiany wtórne w postaci dodatkowych kopii chromosomu 12 stwierdzono w chrzęstniakomięsaku [35, 53], włókniakomięsaku [84], mięsaku kościopochodnym [103] i MFH [111], a 7 w chrzęstniakomięsaku [35, 53], włókniakomięsaku [84], mięśniakomięsaku prążkowanokomórkowym [10] i MPNST [8]. Utraty chromosomów: 1p i 11 obserwowano w guzach MPNST [8] i chrzęstniakomięsaku [53], a 3 w MPNST [8] i mięsaku Ewinga [3]. Z utratami chromosomów wiążą się utraty zlokalizowanych w nich genów. W mięsaku maziówkowym opisano, np. utraty genów supresorowych - *RASSF1* (3p21.3) i protoonkogenów - *HRAS* (11p15.5) oraz *CCND1* (11q13) [68]. Znane są mutacje tych genów w wielu innych nowotworach [32, 33]. Występowanie ww. aberracji w różnych złośliwych nowotworach człowieka świadczy o obecności w nich genów, których mutacje związane są z proliferacją różnych typów nowotworów.

Po raz pierwszy określono zaburzenia równowagi genomowej w tym samym guzie wykorzystując dwie metody badawcze: CGH i analizę kariotypu. Badaniami tymi objęto 15 guzów mięsaków maziówkowych. Wszystkie badane nowotwory charakteryzowały się złożonymi kariotypami z licznymi aberracjami chromosomowymi. W 71% guzów obie metody potwierdziły niezrównoważenie genomu, 48% aberracji stwierdzone było obiema metodami, 27% wyłącznie metodą CGH i 25% tylko w oparciu o analizowanie kariotypów. Przedstawione powyżej wyniki wskazują, że pełną ocenę zrównoważenia genomu komórek nowotworowych można uzyskać poprzez równoczesne zastosowanie klasycznej techniki prążkowej G i techniki molekularnej CGH.

Przeprowadzona analiza porównawcza zaburzeń równowagi genomowej w trzech podtypach histologicznych SS wykazała najwyższy odsetek (91%) guzów z zaburzeniami w podtypie niskozróżnicowanym (PDSS), a najniższy (70%) w guzach dwufazowych (BiSS), natomiast w postaci jednofazowej (MoSS) zmiany takie występowały w 81% guzów, co jest zgodne z literaturą w przypadku dwóch ostatnich podtypów, natomiast inni autorzy nie analizowali wystarczającej liczby guzów PDSS, aby wykonać takie obliczenia [69, 90, 102]. Współwystępowanie utrat i dodatkowych kopii było główną przyczyną zaburzeń równowagi genomowej w guzach Mo i PDSS (odp. 76% i 80% guzów) i zmiany te były statystycznie istotne w stosunku do guzów BiSS (33% guzów). Autorzy cytowanych powyżej prac, nie analizowali szczegółowo rodzajów aberracji w poszczególnych guzach, a tylko obliczali liczby utrat i dodatkowych kopii [69, 90, 102].

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki dowodzą, że w trakcie rozwoju każdego z podtypów SS mają znaczenie zarówno utraty jak i dodatkowe kopie genów zlokalizowanych w chromosomach ulegających aberracjom.

Tab. 25. Średnia liczba niezrównoważonych aberracji przypadająca na guz w różnych podtypach mięsaków maziówkowych - badania własne i dane z literatury

Tab. 25. *The average number of unbalanced aberrations per tumors in different synovial sarcoma subtypes - present series and review of the literature*

Podtyp Subtype	Liczba aberracji/ guz (liczba guzów) <i>Aberrations No. per tumor (tumors No.)</i>		
	Badania własne <i>Present series</i>	Szymańska 1998 [102]	Nakagawa 2006 [69]
MoSS	5,5 (29)	5,3 (29)	4,2 (13)
BiSS	4,9 (9)	2,5 (6)	2,1 (9)
PDSS	10,9 (10)	b.d. (2)	b.d. (-)

MoSS – mięsak maziówkowy jednofazowy, BiSS - mięsak maziówkowy dwufazowy, PDSS - mięsak maziówkowy nisko zróżnicowany, b.d.- brak danych

MoSS- monophasic synovial sarcoma, BiSS- biphasic synovial sarcoma, PDSS- poorly differentiated synovial sarcoma, b.d.- no research

Najniższą średnią liczbę aberracji przypadającą na jeden guz stwierdzono w guzach BiSS (4,9/guz), a najwyższą w guzach PDSS (10,9/guz). Uzyskane wyniki porównano z danymi innych autorów (tab. 25) i stwierdzono, że podobnie jak w niniejszej pracy, guzy jednofazowe charakteryzuje większa częstość aberracji na guz w porównaniu do dwufazowych [69, 102]. Jednak w badaniach własnych, w guzach BiSS, częstość aberracji była 2x większa aniżeli wykazali inni autorzy (tab. 25). W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy we wszystkich podtypach histologicznych SS przeważały liczbowo guzy R i M, które charakteryzują się większą liczbą niezrównoważonych aberracji chromosomowych w porównaniu do guzów P [82], które były głównym lub jedynym materiałem badawczym u cytowanych powyżej autorów [69, 102].

W niniejszej pracy po raz pierwszy porównano, średnią liczbę utrat i dodatkowych kopii chromosomów przypadających na jeden guz w każdym z trzech podtypów mięsaków maziówkowych. Stwierdzono, iż zaburzenia równowagi genomowej we wszystkich podtypach mięsaków maziówkowych wywołują zarówno utraty jak i dodatkowe kopie materiału genetycznego różnych chromosomów. Jedynie w podtypie MoSS utraty (3,2/guz) przeważają nad dodatkowymi kopiami (2,3/guz). W pozostałych podtypach histologicznych częstości utrat i dodatkowych kopii są na podobnym poziomie.

Chociaż nie znaleziono aberracji wtórnej, która byłaby charakterystyczna dla określonego podtypu histologicznego SS zauważono, iż dodatkowe kopie chromosomu 8 lub jego fragmentu występują we wszystkich trzech podtypach tego mięsaka (24% guzów MoSS, 44% BiSS i 80% PDSS). Utraty różnych fragmentów chromosomu 11 i dodatkowe kopie 12 stwierdzono w znacznym odsetku guzów MoSS (odp. 24% i 31% guzów) i PDSS (po 70% guzów), natomiast utraty chromosomu 10 i dodatkowe kopie 2 w guzach BiSS (odp. 33% i 44% guzów). Zauważono również, iż w guzach MoSS i PDSS w aberracje niezrównoważone zaangażowane były wszystkie chromosomy, podczas gdy w guzach BiSS chromosomy 5, 6 i 18, nie uczestniczyły w aberracjach.

Wykorzystując metodę prążków GTW, CGH oraz FISH przesledzono ewolucję cytogenetyczną guzów SS pochodzących od czterech pacjentów i były to kolejno: guzy P i

R, R i M oraz od dwóch pacjentów po dwa guzy R. Translokację swoistą - t(X;18)(p11;q11) stwierdzono w guzach wszystkich pacjentów, z tym, że u dwóch z nich była ona w postaci translokacji ukrytej, u jednego w postaci wariantu z chromosomem 5 - t(X;5;18), a u ostatniego w formie „klasycznej”. Aberracjom tym zawsze towarzyszyły liczne, wtórne aberracje chromosomowe prowadzące do zaburzeń równowagi genomowej (tab. 22).

Wykazano, iż guzy P i R oraz R i M pochodzące od jednego pacjenta charakteryzowała duża zgodność kariotypowa - guzy te różniły się między sobą tylko pojedynczymi wtórnymi aberracjami chromosomowymi. W opisanych dotychczas badaniach guzów P i R od pacjenta z mięsakiem maziówkowym stwierdzano, albo identyczne kariotypy w obu guzach [50, 79], albo w guzie R pojawiały się dodatkowe, w stosunku do P, zmiany chromosomowe [50]. Nie stwierdzono doniesień innych autorów, którzy porównali wyniki badań cytogenetycznych guzów R i M mięsaka maziówkowego pochodzących od jednego pacjenta. Obserwacje takie przeprowadzono w przypadku włóknakiomięsaka [48] oraz MFH [73] i wykazano wzrost liczby aberracji w guzach M w stosunku do guzów R. Natomiast w kilku doniesieniach opisano wyniki badań cytogenetycznych guzów P i M pochodzących od jednego chorego z SS. U pacjentów tych, w guzach M obserwowano dodatkowe, w stosunku do guzów P, aberracje chromosomowe [73, 104]. Podobne wyniki obserwowano w badaniach guzów P i M innych nowotworów litych: MFH [7, 104], raku prostaty [95], mięśniakiomięsaka gładkokomórkowym prostaty [13] i włóknakiomięsaka [104]. Wzrost liczby aberracji chromosomowych w guzach R w stosunku do P, czy w R do M wskazuje, że progresja z guza P do R i R do M związana jest z gromadzeniem się w komórkach guza zmian genetycznych [50, 79].

Przeprowadzone porównanie wyników badań cytogenetycznych dwóch guzów R od jednego pacjenta z mięsakiem maziówkowym wykazały w każdym guzie odmienne wtórne aberracje chromosomowe - stwierdzano tylko pojedyncze, wspólne dla obydwu guzów danego pacjenta, wtórne zmiany chromosomowe. Mandahl i wsp. opisali wyniki badań cytogenetycznych pięciu guzów R (MoSS) pochodzących od jednego pacjenta i podobnie jak powyżej opisano, we wszystkich guzach stwierdzono aberrację swoistą oraz liczne wtórne zmiany chromosomowe, wśród których były aberracje wspólne dla wszystkich guzów, jak i zmiany występujące tylko w pojedynczych guzach [50].

Przeprowadzona analiza porównawcza wyników cytogenetycznych guzów mięsaków maziówkowych pochodzących od jednego pacjenta wykazała, iż guzy te charakteryzują liczne zmiany w genomie, a w trakcie trwania choroby nowotworowej pojawiają się dodatkowe aberracje chromosomowe. Zauważono, że kolejne guzy wznowy miejscowej charakteryzują się odmiennymi aberracjami wtórnymi - tylko pojedyncze zmiany są wspólne dla wszystkich guzów R danego pacjenta, natomiast guzy pierwotne i wznowy oraz wznowy i guzy przerzutowe pochodzące od jednego pacjenta charakteryzuje większa zgodność kariotypów i różnią się między sobą pojedynczymi aberracjami wtórnymi. Nie znaleziono wtórnej aberracji chromosomowej charakterystycznej wyłącznie dla guzów P, R czy M mięsaka maziówkowego.

Przedstawione powyżej wyniki dowodzą, iż badania cytogenetyczne odgrywają istotną rolę w diagnostyce różnicowej nowotworów tkanek miękkich. Tłuszczakomięsaka śluzowatego z t(12;16) można różnicować ze śluzowatymi postaciami innych guzów, a mięsaka maziówkowego z t(X;18) z innymi guzami wrzecionowatokomórkowymi [44]. Z kolei badania molekularne miejsc pęknięć chromosomów zaangażowanych w

translokacje swoiste, umożliwiły wykrycie genów fuzyjnych, których produkty wiążą się z DNA, regulują procesy transkrypcji [45].

O ile badania cytogenetyczne nowotworów hematologicznych mają znaczenie nie tylko diagnostyczne, ale również, w wielu przypadkach, rokownicze [46], o tyle w guzach litych znaczenie tych badań nie jest jasne [45]. Pojawiają się jednak prace, w których autorzy próbują określić rolę różnych aberracji chromosomowych w przebiegu choroby i prognozowaniu klinicznym chorych z nowotworami tkanek miękkich. Obecność genu fuzyjnego *SS18/SSX2* oraz prosty kariotyp w mięsaku maziówkowym daje lepsze rokowanie niż *SS18/SSX1* i złożony kariotyp z tym, że znaczenie mutacji genowej jest większe [45, 74]. Z kolei dodatkowe kopie chromosomu 13q wydają się asocjować ze złym rokowaniem dla pacjentów z tłuszczakomięsakiem dobrze zróżnicowanym [85], a utraty ww. chromosomu zwiększają ryzyko przerzutów u pacjentów z chrzęstniakomięsakiem [53]. Stwierdzono również, że pęknięcia w chromosomach 1p1, 1p4, 14q1 i 17q2 oraz dodatkowe kopie chromosomu 6p obserwowane w mięsakiach tkanek miękkich o wysokim stopniu złośliwości, zwiększają ryzyko wystąpienia przerzutu [57].

W niniejszej pracy, po raz pierwszy, przedstawiono wyniki badań cytogenetycznych tak licznej grupy (łącznie 136) guzów dwóch typów histologicznych mięsaków: tłuszczakomięsaków (WDLPS,DDLPS i M/RLPS) i mięsaków maziówkowych (MoSS, BiSS i PDSS). Skupiono się przede wszystkim na ocenie zaburzeń równowagi genomowej komórek nowotworowych, wykorzystując w tym celu metody cytogenetyki klasycznej (GTW) i molekularnej (CGH). Stwierdzono, iż bardziej szczegółową charakterystykę cytogenetyczną guza można uzyskać poprzez wykorzystanie obu ww. metod do badania jednego guza, aniżeli przy stosowaniu jednej, wybranej metody.

Uzyskane wyniki zwiększają wiedzę na temat zmian w genomie komórek, nie tylko poszczególnych podtypów histologicznych, ale także w guzach pierwotnych, nawrotowych i przerzutowych badanych mięsaków, jak również w guzach pojawiających się w trakcie trwania choroby nowotworowej u jednego pacjenta.

Pomimo, że nie wykryto wspólnych, wtórnych aberracji chromosomowych charakterystycznych dla każdego z typów histologicznych mięsaków, ani zmian wspólnych dla guzów P, R czy M, to znajomość zaburzeń genomowych dotyczących określonych regionów chromosomów człowieka otwiera drogę do dalszych badań molekularnych nad mechanizmami rozwoju i progresji mięsaków.

6. WNIOSKI

1. Guzy tłuszczakomięsaków dobrze zróżnicowanych (WDLPS) i odróżnicowanych (DDLPS) różnią się cechami niezrównoważenia genomu, co świadczy o odmiennej biologii tych nowotworów.
2. Niezrównoważenie genomu komórek guzów tłuszczakomięsaków śluzowatych/okrągłokomórkowych (M/RLPS) powoduje występowanie dodatkowego materiału genetycznego pochodzącego głównie z chromosomów 1q i 8 oraz utraty z chromosomów 6q i 16p/q.
3. Najwyższa częstość guzów z zaburzeniami równowagi genomowej występuje w podtypie niskozróżnicowanym mięsaka maziówkowego (PDSS) a najniższa w podtypie dwufazowym (BiSS).
4. Nie stwierdzono wtórnych aberracji chromosomowych charakterystycznych dla nawrotowych i przerzutowych guzów mięsaków LPS i SS.
5. W przypadku występowania ukrytych swoistych translokacji w guzach tłuszczakomięsaków M/RLPS i w mięsakach maziówkowych oraz braku występowania charakterystycznych chromosomów markerowych w guzach tłuszczakomięsaków WDLPS i DDLPS, badania metodami FISH i CGH w znaczący sposób uzupełniają ocenę stanu genomu komórki określanej za pomocą cytogenetyki klasycznej.
6. Potwierdzono możliwość istnienia tłuszczakomięsaka mieszanego: śluzowatego z dobrze zróżnicowanym (M/WDLPS), łączącego zmiany chromosomowe swoiste dla obu komponent histologicznych guza.
7. Guzy nawrotowe oraz przerzutowe tłuszczakomięsaków WDLPS i MLPS, pojawiające się w trakcie trwania choroby nowotworowej, cechuje większa stabilność kariotypowa, aniżeli guzy tłuszczakomięsaków DDLPS i mięsaków maziówkowych.
8. Jednoczesne zastosowanie metod CGH i analizy prążkowej kariotypu jednego guza pozwala na bardziej precyzyjną i pełną ocenę zaburzeń równowagi genomowej w komórkach mięsaków.

7. STRESZCZENIE

Mięsaki, to złośliwe, lite guzy nowotworowe człowieka lokalizujące się głównie w tkankach miękkich i kościach. Te histologicznie zróżnicowane guzy stanowią mniej niż 1% wszystkich nowotworów człowieka, z czego 20% to tłuszczomięsaki (LPS) a 5-10% mięsaki maziówkowe (SS). Tłuszczakiomięsaki śluzowate/okrągłokomórkowe (M/RLPS) i mięsaki maziówkowe charakteryzują pierwotne wysoce swoiste chromosomowe translokacje odp.: t(12;16)(q13;p11) i t(X;18)(p11;q11), w wyniku których powstają geny fuzyjne: *FUS/DDIT3* i *SS18/SSX1-4* związane z rozwojem tych nowotworów. Natomiast w tłuszczakiomięsakach dobrze zróżnicowanych (WDLPS) i odróżnicowanych (DDLPS) stwierdza się występowanie chromosomów pierścieniowych (*r*) i/lub olbrzymich chromosomów markerowych (*mar*), w których występuje amplifikacja chromosomu 12q11/13-q22/24. W trakcie rozwoju choroby, w guzach powstają wtórne aberracje chromosomowe prowadzące do zaburzeń równowagi genomowej.

Celem pracy było zastosowanie metod cytogenetyki klasycznej (GTW) i molekularnej (FISH, CGH) w określeniu częstości występowania swoistych aberracji chromosomowych oraz zaburzeń genomowych w komórkach różnych podtypów LPS i SS. Porównano także zaburzenia genomowe w guzach pierwotnych (P), nawrotowych (R) i przerzutowych (M) oraz zbadano ewolucję zmian cytogenetycznych w guzach pochodzących od jednego pacjenta, pojawiających się w trakcie trwania choroby.

Zaburzenia genomowe określano na podstawie analizy kariotypów 76 guzów czterech podtypów histologicznych LPS: WDLPS, DDLPS i M/RLPS oraz 60 guzów trzech podtypów histologicznych SS: jednofazowych (MoSS), dwufazowych (BiSS) i niskozróżnicowanych (PDSS). Dodatkowo, zaburzenia genomowe określono metodą CGH w 51 guzach różnych podtypów LPS i 15 guzach SS. Obecność translokacji swoistej potwierdzono metodą FISH z zastosowaniem sond swoistych dla genów *DDIT3* w 21 guzach M/RLPS oraz *SS18/SSX1-2* w 25 guzach SS.

Przyczyną zaburzeń równowagi genomowej wszystkich guzów były zarówno utraty jak i dodatkowe kopie różnych chromosomów. Niezrównoważenia genomu obserwowano we wszystkich guzach WDLPS i DDLPS oraz w 80% guzów M/RLPS i SS. W tych ostatnich guzach zjawisko to było spowodowane obecnością wtórnych, niezrównoważonych aberracji chromosomowych, podczas gdy w guzach WD i DDLPS, obecnością amplifikacji różnych fragmentów chromosomu 12q i/lub wtórnymi aberracjami niezrównoważonymi.

Stwierdzono, że guzy WDLPS i DDLPS charakteryzują się odmiennymi cechami niezrównoważenia genomu, co świadczy o odmiennej biologii tych nowotworów. Fragment chromosomu 12q23-24 ulegał amplifikacji wyłącznie w guzach DDLPS, a amplifikacje różnych fragmentów chromosomu 14q występowały tylko we wznowach guzów WDLPS. Ponadto w guzach WDLPS stwierdzono występowanie dodatkowych kopii chromosomów 3/3p oraz 5p, natomiast w guzach DDLPS występowały dodatkowe kopie chromosomu 5q oraz utraty 20q.

Niezrównoważenie genomu komórek guzów M/RLPS powoduje występowanie dodatkowego materiału genetycznego pochodzącego głównie z chromosomów 1q i 8 oraz utraty chromosomów 6q i 16p/q.

Przyczyną zaburzeń równowagi genomowej w mięsakach SS były, przede wszystkim, dodatkowe kopie chromosomów: 8, 12, 2 i 7 oraz utraty chromosomów 1p i 3. Analiza porównawcza zaburzeń równowagi genomowej w podtypach histologicznych

SS wykazała, iż najwyższa częstość guzów z zaburzeniami równowagi genomowej występuje w podtypie niskozróżnicowanym (91% guzów), a najniższa w dwufazowym (70%).

Nie stwierdzono wtórnych aberracji chromosomowych charakterystycznych dla nawrotowych i przerzutowych guzów mięsaków LPS i SS.

W guzach WDLPS (87% guzów) i DDLPS (74%) stwierdzono obecność charakterystycznych chromosomów pierścieniowych i/lub olbrzymich chromosomów markerowych, a w podtypie M/RLPS (79%), swoistej t(12;16)(q13;p11). Wszystkie trzy podtypy histologiczne SS (73%) charakteryzowała t(X;18)(p11;q11) lub jej warianty.

We wszystkich typach mięsaków, dzięki zastosowaniu technik FISH i CGH, wykrywalność zmian swoistych wzrosła do 100%. W przypadku występowania ukrytych swoistych translokacji lub braku innych charakterystycznych chromosomów markerowych, badania metodami FISH i CGH w znaczący sposób uzupełniają ocenę stanu genomu komórki określanej za pomocą cytogenetyki klasycznej. Jednoczesne użycie metod CGH i analizy prążkowej kariotypu jednego guza pozwala na bardziej precyzyjną i pełną ocenę zaburzeń równowagi genomowej w komórkach mięsaków.

Potwierdzono możliwość istnienia tłuszczakomięsaka mieszanego: śluzowatego z dobrze zróżnicowanym (M/WDLPS), łączącego zmiany chromosomowe swoiste dla obu komponentów histologicznych guza.

Stwierdzono, iż guzy R/M tłuszczakomięsaków WDLPS i MLPS, pojawiające się w trakcie trwania choroby nowotworowej, cechuje większa stabilność chromosomowa, aniżeli guzy tłuszczakomięsaków DDLPS i mięsaków SS. W mięsakiach WDLPS i M/RLPS identyczne wtórne zmiany chromosomowe obserwowano w guzach pojawiających się nawet w kilkadziesiąt miesięcy od badania pierwszego guza. Natomiast guzy DDLPS i SS charakteryzowały różnorodne wtórne aberracje chromosomowe.

Znajomość zaburzeń genomowych dotyczących określonych regionów chromosomów człowieka otwiera drogę do dalszych badań molekularnych nad mechanizmami rozwoju i progresji mięsaków.

8. SUMMARY

Sarcomas are aggressive solid tissue tumors localized mostly in soft tissues or in the bones. This histologically varied group of tumors accounts for less than 1% of all human cancer cases. The most frequent sarcomas are liposarcoma (LPS) and synovial sarcoma (SS) representing, respectively, 20% and 5-10% of all mesenchymal malignancies. Myxoid and round-cell liposarcomas (M/RLPS) as well as all the subtypes of synovial sarcomas are characterized by the presence of specific translocations: t(12;16)(q13;p11) and t(X;18)(p11;q11), respectively. These translocations lead to the fusion of the *DDIT3/FUS* genes located on the chromosomes 12q13 and 16p11 and *SS18/SSX1-4* located on the 18q11 and Xp11. Conversely, cytogenetic features present in well-differentiated (WDLPS) and dedifferentiated (DDLPS) liposarcomas are supernumerary ring (*r*) and/or giant chromosomes (*mar*) both associated with amplification of chromosome regions 12q11/13-q22/24. During progression of the disease new, so-called secondary, chromosome changes arise what leads to genome imbalance.

The aim of the present work was to characterize genome imbalances and to assess the frequency of specific chromosomal changes in all histological subtypes of liposarcomas and synovial sarcomas. The above mentioned imbalances were analyzed in primary (P), recurrent (R) and metastatic sarcoma lesions (M). Advancement of cytogenetic changes was followed in subsequent samples of tumors resected from an individual patient during disease progression. Classical karyotyping, comparative genomic hybridization (CGH) and fluorescence in situ hybridization (FISH) methods were used in the study.

Classical karyotype study was used to estimate genome imbalances in all histological subtypes of 76 liposarcoma and 60 synovial sarcoma tumors. CGH technique was applied in 51 LPS and 15 SS tumors. To confirm the presence of a specific translocation FISH analysis using probes specific for fragments of the fusion genes: *DDIT3/FUS* for M/RLPS and *SS18/SSX1-2* for SS was performed.

The main cause of genomic imbalance in all of the analyzed sarcomas were deletions and additional copies of various chromosomes. Genomic imbalances were found in all WDLPS and DDLPS and in 80% of M/RLPS and SS tumors. In the later cases, the lost of genomic balance was attributable to the presence of secondary unbalanced chromosomal changes. Amplification of different fragments of chromosome 12q and/or secondary changes were the cause of genomic imbalance in WDLPS and DDLPS tumors.

It was found that the features of genomic imbalance differ between WDLPS and DDLPS tumors. The finding provides an explanation for the observed biological differences between these tumor subtypes. Certain chromosome changes were present in a particular tumor subtype only. For instance amplification of 12q23-24 region was present exclusively in DDLPS tumors while amplification of various regions of chromosome 14q was found only in recurrent WDLPS tumors. Furthermore, additional copies of chromosomes 3/3p and 5p were present exclusively in WDLPS tumors, whilst of chromosomes 5q in DDLPS tumors only. The genomic imbalance in M/RLPS tumors is attributable primarily to the presence of additional genetic material mainly from chromosomes 1q and 8, and to losses of chromosomes 6q and 16p/q.

Synovial sarcoma tumors display distinct features of genomic imbalance. Additional copies of chromosomes 8, 12, 2 and 7 and losses of chromosomes 1p and 3 are charac-

teristic for this type of sarcoma. The imbalances were most frequent in poorly differentiated subtype PDSS (91% tumors) in contrary to biphasic subtype (70%).

There were no chromosomal changes characteristic for recurrent and metastatic LPS and SS tumors.

The analysis of the specific and/or characteristic chromosome aberrations has shown that recurrent ring and/or giant marker chromosomes are present in 87% of WDLPS and 74% of DDLPS tumors. In the M/RLPS subtype specific translocation t(12;16)(q13;p11) was present in 79% of tumors. In 73% of tumors belonging to all three synovial sarcoma subtypes specific t(X;18)(p11;q11) or its variants were detected.

For all types of the sarcomas analyzed in the study the detectability of specific chromosomal rearrangements reached 100% when all three cytogenetic techniques: G-banding, CGH and FISH were applied. In the case of cryptic specific translocations or if no characteristic chromosomal markers were present, application of FISH and CGH techniques radically improved the evaluation of genomic status of the cell as determined in classical karyotype study. Simultaneous application of G-band karyotyping and CGH techniques in the analysis of an individual tumor sample allows for more precise and comprehensive evaluation of the of genetic imbalance of sarcoma cells.

In view of the results of the present study the possibility of development of a mixed liposarcoma tumor containing both myxoid and well-differentiated (M/WDLPS) histological components was confirmed. Such a tumor, characterized by the presence of chromosomal changes specific for both subtypes, is a very rare finding.

As compared to DDLPS and SS tumors, the two subtypes of liposarcoma: WDLPS and M/RLPS display a considerably more stable chromosomal changes in consecutive tumor samples resected from an individual patient during disease progression. Identical chromosomal changes were found in recurrent or metastatic lesions which were resected several months after cytogenetical evaluation of the first tumor. Conversely, during disease progression DDLPS and SS tumors developed a wide range of secondary chromosome changes.

Knowledge of genomic imbalances of particular human chromosome regions may open the way to the molecular studies on the mechanisms of sarcoma development and progression.

9. PIŚMIENICTWO

1. Antonescu C.R.: The role of genetic testing in soft tissue sarcoma. *Histopathology*. 2006, 48, 13-21.
2. Bettio D., Rizzi N., Colombo P., Bianchi P., Gaetani.: Unusual cytogenetic finding in synovial sarcoma arising in the paranasal sinuses. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004, 155, 79-81.
3. Betts D.R., Avoleo P., von der Weid N., Greiner J., Niggli F.: Cytogenetic characterization of Ewing tumors with high-ploidy. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005, 159, 160-63.
4. Birdsall S., Osin P., Lu Y.J., Fisher C., Shipley J.: Synovial sarcoma specific translocation associated with both epithelial and spindle cell components. *Int J Cancer*. 1999, 82, 605-08.
5. Bocian E., Limon J.: Metody badania genomu. W: Bal J. (red.): *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Warszawa: PWN, 2007, s. 162-87.
6. Bode-Leśniewska B., Frigerio S., Exner U., Abdou M.T., Moch H., Zimmermann D.R.: Relevance of translocation type I myxoid liposarcoma and identification of a novel *EWSRI-DDIT3* fusion. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007, 46, 961-71.
7. Bridge J.A., Sanger W.G., Neff J.R., Hess M.M.: Cytogenetic findings in a primary malignant fibrous histiocytoma of bone and the lung metastasis. *Pathology*. 1990, 22, 16-19.
8. Bridge R.S. Jr, Bridge J.A., Neff J.R., Naumann S., Althof P., Bruch L.A.: Recurrent chromosomal imbalances and structurally abnormal breakpoints within complex karyotypes of malignant peripheral nerve sheath tumor and malignant triton tumor: a cytogenetic and molecular cytogenetic study. *J Clin Pathol*. 2004, 57, 1172-78.
9. Brożek I., Limon J.: Rola badań cytogenetycznych we współczesnej onkohematologii. *Współczesna Onkologia*. 1998, 5, 54-57.
10. Chen Z., Coffin C.M., Smith L.M., Issa B., Arndt S., Shepard R., Brothman L., Stratton J., Brothman A.R., Zhou H.: Cytogenetic-clinicopathologic correlations in rhabdomyosarcoma: a report of five cases. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001, 131, 31-36.
11. Cho Y.L., Bae S., Koo M.S., Kim K.M., Chun H.J., Kim C.K., Ro D.Y., Kim J.H., Lee C.H., Kim Y.W., Ahn W.S.: Array Comparative Genomic Hybridization analysis of uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol*. 2005, 99, 545-51.
12. Coindre J.M., Hostein I., Maire G., Derré J., Guillou L., Leroux A., Ghnassia J.P., Collin F., Pedeutour F., Aurias A.: Inflammatory malignant fibrous histiocytomas and dedifferentiated liposarcomas: histological review, genomic profile, and MDM2 and CDK4 status favour a single entity. *J Pathol*. 2004, 203, 822-30.
13. Dal Cin P., Boghosian L., Sandberg A.A.: Chromosome changes in a prostatic leiomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1988, 30, 339-40.
14. Deeb G., Baer M.R., Gaile D.P., Sait S.N., Barcos M., Wetzler M., Conroy J.M., Nowak N.J., Cowell J.K., Cheney R.T.: Genomic profiling of myeloid

- sarcoma by array Comparative Genomic Hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005, 44, 373-83.
15. Dos Santos Aquiar S., de Jesus Giroto Zambaldi L., Dos Santos A.M., Pinto W., Brandalise S.R.: Comparative Genomic Hybridization analysis of abnormalities in chromosome 21 in childhood osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007, 175, 35-40.
 16. Farag S.S., Archer K.J., Mrózek K., Vardiman J.W., Carroll A.J., Pettenati M.J., Moore J.O., Kolitz J.E., Mayer R.J., Stone R.M., Larson R.A., Bloomfield C.D.: Isolated trisomy of chromosomes 8, 11, 13 and 21 is an adverse prognostic factor in adults with de novo acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B 8461. *Int J Oncol*. 2002, 21, 1041-51.
 17. Fioretos T., Johansson B.: Chronic myeloid leukemia. W: Heim S., Mitelman F.: *Cancer cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells*. Third edition. New York: Willey-Liss, 2009, s. 179-208.
 18. Fletcher D.M., Unni K.K., Mertens F.: *Pathology and Genetics. Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon: IARC Press, 2002, s. 35-43.
 19. Forus A., Florenes V.A., Maelandsmo G.M., Meltzer P.S., Fodstad O., Myklebost O.: Mapping of amplification units in the q13-14 region of chromosome 12 in human sarcomas: some amplicons do not include *MDM2*. *Cell Growth Diff*. 1993, 4, 1065-70.
 20. Forus A., Bjerkehagen B., Sirvent N., Meza-Zepeda L.A., Coindre J.M., Berner J.M., Myklebost O., Pedetour F.: A well-differentiated liposarcoma with a new type of chromosome 12-derived markers. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001, 131, 13-18.
 21. Fugazza G., Garuti A., Marchelli S., Miglino M., Bruzzone R., Gatti A.M., Castello S., Sessarego M.: Masked Philadelphia chromosome due to atypical *BCR/ABL* localization on the 9q34 band and duplication of the der(9) in a case of chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005, 163, 173-75.
 22. Gibas L.M., Gibas Z., Sandberg A.A.: Technical aspects of cytogenetic analysis of human tumors. *Karyogram*. 1984, 10, 25-27.
 23. Gibas Z., Miettinen M., Limon J., Nedoszytko B., Mrózek K., Roszkiewicz A., Ryś J., Niezabitowski A., Dębiec-Rychter M.: Cytogenetic and immunohistochemical profile of myxoid liposarcoma. *Am J Clin Pathol*. 1995, 103, 20-26.
 24. Hazelbag H.M., Szuhai K., Tanke H.J., Rosenberg C., Hogendoorn P.C.: Primary synovial sarcoma of the hand: a cytogenetic and molecular genetic analysis combining RT-PCR and COBRA-FISH of a case with a complex karyotype. *Mod Pathol*. 2004, 17, 1434-39.
 25. Hellmann A.: *Przewlekła białaczka szpikowa*. W: Moszyńska A., (red.), Robak T. (red.): *Podstawy hematologii*. Lublin: Czelej, 2003, s. 321-23.
 26. Hostein I., Coindre J.M., Derré J., Mariani O., Chibon F., Aurias A.: Comparative Genomic Hybridization study of paraffin-embedded dedifferentiated liposarcoma fixed with Holland Bouin's Fluid. *Diagn Mol Pathol*. 2003, 12, 166-73.
 27. Iliszko M., Mandahl N., Mrózek K., Denis A., Pandis N., Pejovic T., Babińska M., Nedoszytko B., Dębniak J., Emerich J., Hrabowska M., Bloomfield C.D., Limon J.: Cytogenetics of uterine sarcomas: presentation of eight new cases and review of the literature. *Gynecol Oncol*. 1998, 71, 172-76.

28. Iliszko M., Ryś R., Woźniak A., Chosia M., Sciot R., Dębiec-Rychter M., Limon J.: Complex tumor-specific t(X;18) in seven synovial sarcoma tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009, 189, 118-21.
29. ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, LG Shaffer, ML Slovak, JL Campbell N (red.); Basel: S Karger, 2009. ISBN 978-3-8055-8985-7.
30. Italiano A., Cardot N., Dupré F., Monticelli I., Keslair F., Piche M., Mainguéné C., Coindre J.M., Pedoutour F.: Gains and complex rearrangements of the 12q13-15 chromosomal region in ordinary lipomas: The "missing link" between lipomas and liposarcomas? *Int J Cancer.* 2007, 121, 308-15.
31. Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Piper J., Isola J., Waldman F.M., Gray J.W., Pinkel D.: Optimizing Comparative Genomic Hybridization for analysis of DNA sequence copy number in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 1994, 10, 231-43.
32. Knuutila S., Björkqvist A.M., Autio K., Tarkkanen M., Wolf M., Monni O., Szymańska 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, 1107-123.
33. Knuutila S., Aalto Y., Autio K., Björkqvist A.M., El-Rifai W., Hemmer S., Huhta T., Kettunen E., Kiuru-Kuhlefelt S., Larramendy M.L., Lushnikova T., Monni O., Pere H., Tapper J., Tarkkanen M., Varis A., Wasenius V.M., Wolf M., Zhu Y.: DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol.* 1999, 155, 683-94.
34. Kresse S.H., Berner J.M., Meza-Zepeda L.A., Gregory S.G., Kuo W.L., Gray J.W., Forus A., Myklebost O.: Mapping and characterization of the amplicon near *APOA2* in 1q23 in human sarcomas by FISH and array CGH. *Molecular Cancer.* 2005, 4, 1-12.
35. Larramendy M.L., Mandahl N., Mertens F., Blomqvist C., Kivioja A.H., Karaharju E., Valle J., Böhling T., Tarkkanen M., Rydholm A., Akerman M., Bauer H.C., Anttila J.P., Elomaa I., Knuutila S.: Clinical significance of genetic imbalances revealed by Comparative Genomic Hybridization in chondrosarcomas. *Hum Pathol.* 1999, 30, 1247-53.
36. Lau C.C., Harris C.P., Lu X.Y., Perlaky L., Gogineni S., Chintagumpala M., Hicks J., Johnson M.E., Davino N.A., Huvos A.G., Meyers P.A., Healy J.H., Gorlick R., Rao P.H.: Frequent amplification and rearrangement of chromosomal bands 6p12-p21 and 17p11.2 in osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004, 39, 11-22.
37. Lazar A., Abruzzo L.V., Pollock R.E., Lee S., Czerniak B.: Molecular diagnosis of sarcoma. Chromosomal translocation in sarcomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2006, 130, 1199-207.
38. Lestou V.S., O'Connell J.X., Robichaud M., Salski C., Mathers J., Maguire J., Chudoba I., Sorensen P.H., Lam W., Horsman D.E.: Cryptic t(X;18), ins(6;18), and *SYT-SSX2* gene fusion in a case of intraneural monophasic synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002, 138, 153-56.
39. Limon J., Turc-Carel C., Dal Cin P., Sandberg A.A.: Recurrent chromosome translocations in liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986, 22, 93-94.

40. Limon J., Dal Cin P., Sandberg A.A.: Translocations involving the X chromosome in solid tumors: Presentation of two sarcoma with t(X;18)(q13;p11). *Cancer Genet Cytogenet.* 1986, 23, 87-91.
41. Limon J., Dal-Cin P., Sandberg A.A.: Application of long-term collagenase de-segregation for the cytogenetic analysis of human solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986, 23, 305-13.
42. Limon J., Mrózek K., Nedoszytko B., Babińska M., Jaśkiewicz J., Kopacz A., Żółtowska A., Borowska -Lehman J.: Cytogenetic findings in two synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1989, 38, 215-22.
43. Limon J., Mrózek K., Mandahl N., Nedoszytko B., Verhest A., Ryś J., Niezabitowski A., Babińska M., Nosek H., Ochalek T., Kopacz A., Willén H., Rydholm A., Heim S., Mitelman F.: Cytogenetics of synovial sarcoma: Presentation of ten new cases and review of the literature. *Genes Chromosomes Cancer.* 1991, 3, 338-45.
44. Limon J.: Aberracje chromosomowe w guzach nowotworowych tkanek miękkich - znaczenie diagnostyczne i rokownicze. *Współczesna Onkologia.* 2001, 5, 85-89.
45. Limon J.: Znaczenie aberracji chromosomowych w guzach nowotworowych tkanek miękkich. *Nowotwory.* 2002, 52, 110-16.
46. Limon J.: Choroby nowotworowe. W: Bal J. (red.): *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej.* Warszawa: PWN, 2007, s. 397-407.
47. Macarenco R.S., Erickson-Johnson M., Wang X., Jenkins R.B., Nascimento A.G., Oliveira A.M.: Cytogenetic and molecular genetic findings in dedifferentiated liposarcoma with neural-like whorling pattern and metaplastic bone formation. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007, 172, 147-50.
48. Mandahl N., Heim S., Arheden K., Rydholm A., Willén H., Mitelman F.: Separate karyotypic features in a local recurrence and metastasis of a fibrosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1989, 37, 139-40.
49. Mandahl N., Mertens F., Åman P., Rydholm A., Brosjö O., Willén H., Mitelman F.: Nonrandom secondary chromosome aberrations in liposarcomas with t(12;16). *Int J Oncol.* 1994, 4, 307-10.
50. Mandahl N., Limon J., Mertens F., Nedoszytko B., Gibas Z., Denis A., Willén H., Rydholm A., Szadowska A., Kreichbergs A., Ryś J., Dębiec-Rychter M., Mitelman F.: Nonrandom secondary chromosome aberrations in synovial sarcoma with t(X;18). *Int J Oncol.* 1995, 7, 495-99.
51. Mandahl N.: Cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Res.* 1996, 89, 88-91.
52. Mandahl N., Limon J., Mertens F., Arheden K., Mitelman F.: Ring marker containing 17q and chromosome 22 in a case of dermatofibrosarcoma protuberans. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996, 89, 88-91.
53. Mandahl N., Gustafson P., Mertens F., Akerman M., Baldetorp B., Gisselsson D., Knuutila S., Bauer H.C., Larsson O.: Cytogenetic aberrations and their prognostic impact in chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002, 33, 188-200.
54. Mandahl N., Mertens F.: Soft tissue tumors. W: Heim S., Mitelman F.: *Cancer cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells.* Third edition. New York: Willey-Liss, 2009, s. 675-711.

55. Meis-Kindblom J.M., Sjögren H., Kindblom L.G., Peydró-Mellquist A., Røijer E., Aman P., Stenman G.: Cytogenetic and molecular genetic analyses of liposarcoma and its soft tissue simulators: recognition of new variants and differential diagnosis. *Virchows Arch.* 2001, 439, 141-51.
56. Merchant S.H., Haines S., Hall B., Hozier J., Viswanatha D.S.: Fluorescence *in situ* hybridization identifies cryptic t(16;16)(p13;q22) masked by del(16)(q22) in a case of AML-M4 Eo. *J Mol Diagn.* 2004, 6, 271-74.
57. Mertens F., Strömberg U., Rydholm A., Gustafson P., Bauer H., Brosjö O., Mandahl N.: Prognostic significance of chromosome aberrations in high-grade soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol.* 2006, 24, 315-20.
58. Meloni-Ehrig A.M., Chen Z., Guan X.Y., Notohamiprodjo M., Shepard R.R., Spanier S.S., Trent J.M., Sandberg A.A.: Identification of a ring chromosome in a myxoid malignant fibrous histiocytoma with chromosome microdissection and fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999, 109, 81-85.
59. Mezzelani A., Sozzi G., Nesslering M., Riva C., Della Torre G., Testi M.A., Azzarelli A., Pierotti M.A., Lichter P., Pilotti S.: Low grade fibromyxoid sarcoma: a further low-grade soft tissue malignancy characterized by a ring chromosome. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000, 122, 144-48.
60. Mhaweche-Fauceglia P., Ramzy P., Bshara W., Sait S., Rigual N.: Synovial sarcoma of the larynx in a 79-year-old woman, confirmed by karyotyping and fluorescence *in situ* hybridization analysis. *Ann Diagn Pathol.* 2007, 11, 223-27.
61. Micci F., Teixeira M.R., Bjerkehagen B., Heim S.: Characterization of supernumerary rings and giant marker chromosomes in well-differentiated lipomatous tumor by a combination of G-banding, CGH, M-FISH, and chromosome- and locus- specific FISH. *Cytogenet Genome Res.* 2002, 97, 13-19.
62. Miettinen M.: Liposarcoma W: Miettinen M.: Diagnostic soft tissue pathology. New York: Churchill Livingstone, 2003, s. 227-39.
63. Miettinen M.: Soft tissue tumors with epithelial differentiation W: Miettinen M.: Diagnostic soft tissue pathology. New York: Churchill Livingstone, 2003, s. 463-87.
64. Mitelman F., Johansson B., Mertens F.: The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Reviews.* 2007, 7, 233-45.
65. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2009). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
66. Mrózek K., Arthur D.C., Karakousis C.P., Koduru P., Le Beau M.M., Pettenati M.J., Tantravahi R., Mrózek E., Perez-Mesa C., Rao U., Frankel S.R., Davey F.R., Bloomfield C.D.: 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, 531-38.
67. Mrózek K., Heinonen K., de la Chapelle A., Bloomfield C.D.: Clinical significance of cytogenetic in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* 1997, 24, 17-31.
68. Mrózek K., Iliszko M., Ryś J., Babińska M., Niezabitowski A., Bloomfield C. D., Limon J.: Spectral karyotyping reveals 17;22 fusions in a cytogenetically

- atypical dermatofibrosarcoma protuberans with a large marker chromosome as a sole abnormality. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001, 31, 182-186.
69. Nakagawa Y., Numoto K., Yoshida A., Kunisada T., Ohata H., Takeda K., Wai D., Poremba C., Ozaki T.: Chromosomal and genetic imbalances in synovial sarcoma detected by conventional and microarray Comparative Genomic Hybridization. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006, 132, 444-50.
 70. Nilsson M., Meza-Zepeda L.A., Mertens F., Forus A., Myklebost O., Mandahl N.: Amplification of chromosome 1 sequences in lipomatous tumor and other sarcomas. *Int J Cancer*. 2004, 109, 363-69.
 71. 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 Hybridization. *J Clin Pathol*. 2006, 59, 978-83.
 72. Örndal Ch., Mandahl N., Rydholm A., Willén H., Brosjö O., Heim S., Mitelman F.: Supernumerary ring chromosomes in five bone and soft tissue tumors of low or borderline malignancy. *Cancer Genet Cytogenet*. 1992, 60, 170-75.
 73. Örndal C., Mandahl N., Willén 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, 401-08.
 74. Panagopoulos I., Mertens F., Isaksson M., Limon J., Gustafson P., Skytting B., Akerman M., Sciort R., Cin P. D., Samson I., Iliszko M., Ryś J., Dębiec-Rychter M., Szadowska A., Brosjö O., Larsson O., Rydholm A., Mandahl N.: Clinical impact of molecular and cytogenetic findings in synovial sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001, 31, 362-372.
 75. Papachristou D.J., Goodman M.A., Cieply K., Hunt J.L., Rao U.N.: Comparison of allelic losses in chondroblastoma and primary chondrosarcoma of bone and correlation with fluorescence in situ hybridization analysis. *Human Pathol*. 2006, 37, 890-98.
 76. 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.
 77. Pedeutour F., Suijkerbuijk R.F., Van Gaal J., Van de Klundert W., Coindre J.M., Van Haelst A., Collin F., Huffermann K., Turc-Carel C.: Chromosome 12 origin rings and giant markers in well-differentiated liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993, 66, 133-34.
 78. 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.
 79. Popov P., Virolainen M., Tukiainen E., Asko-Scljavaara S., Huuhtanen R., Knuutila S., Tarkkanen M.: Primary soft tissue sarcoma and its local recurrence: genetic changes studied by Comparative Genomic Hybridization. *Mod Pathol*. 2001, 14, 978-84.
 80. Rieker R.J., Joos S., Bartsch C., Willeke F., Schwarzbach M., Otaño-Joos M., Ohl S., Högel J., Lehnert T., Lichter P., Otto H.F., Mechttersheimer G.: Distinct chromosomal imbalances in pleomorphic and in high - grade dedifferentiated liposarcomas. *Int J Cancer*. 2002, 99, 68-73.

81. Sala A.: *B-MYB*, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer. *Eur J Cancer*. 2005, 41, 2479-84.
82. Sandberg A.A., Bridge J.: Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002, 133, 1-23.
83. Sandberg A.A.: Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004, 155, 1-24.
84. Schmidt H., Taubert H., Würfl P., Kappler M., Lange H., Bartel F., Bache M., Holzhausen H.J., Hinze R.: Gains of 12q are the most frequent genomic imbalances in adult fibrosarcoma and are correlated with a poor outcome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002, 34, 69-77.
85. Schmidt H., Bartel F., Kappler M., Würfl 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, 638-44.
86. Schneider-Stock R., Ryś J., Walter H., Limon J., Iliszko M., Niezabitowski A., Roessner A.: A rare chimeric *TLS/FUS-CHOP* transcript in a patient with multiple liposarcomas: A case report. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999, 111, 130-33.
87. Segura-Sánchez J., González-Cámpora R., Pareja-Megia M.J., Garcia-Escudero A., Galera-Ruiz H., López-Beltrán A.: Chromosome-12 copy number alterations and *MDM2*, *CDK4* and *TP53* expression in soft tissue liposarcoma. *Anti-cancer Res*. 2006, 26, 4937-42.
88. Shimada S., Ishizawa T., Ishizawa K., Matsumura T., Hasegawa T., Hirose T.: The value of *MDM2* and *CDK4* amplification levels using real-time polymerase chain reaction for the differential diagnosis of liposarcomas and their histologic mimickers. *Hum Pathology*. 2006, 37, 1123-29.
89. Sirvent N., Forus A., Lescaut W., Burel F., Benzaken S., Chazal M., Bourgeon A., Vermeesch J.R., Myklebost O., Turc-Carel C., Ayraud N., Coindre J.M., Pedeutour F.: Characterization of centromere alterations in liposarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000, 29, 117-29.
90. Skytting B.T., Szymańska J., Aalto Y., Lushnikova T., Blomqvist C., Elomaa I., Larsson O., Knuutila S.: Clinical importance of genomic imbalances in synovial sarcoma evaluated by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999, 115, 39-46.
91. Spillane J., Fisher C., Meirior J.T.: Myxoid liposarcoma - The frequency and the natural history of nonpulmonary soft tissue metastases. *Ann Surg Oncol*. 1999, 6, 389-94.
92. Sreekantaiah Ch., Karakousis C.P., Leong S.P., Sandberg A.A.: Trisomy 8 as a nonrandom secondary change in myxoid liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1991, 51, 195-205.
93. Suijkerbuijk R.F., Olde Weghuis D.E., Van den Berg M., Pedeutour F., Forus A., Myklebost O., Glier C., Turc-Carel C., Geurts van Kessel A.: Comparative genomic hybridization as a tool to define two distinct chromosome 12-derived amplification units in well-differentiated liposarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994, 9, 292-95.
94. Subramaniam M.M., Noguera R., Piqueras M., Navarro S., Carda C., Pellin A., López-Guerrero J.A., Llombart-Bosch A.: Evaluation of genetic stability of the

- SYT* gene rearrangement by break - apart FISH in primary and xenotransplanted synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007, 172, 23-28.
95. Suzuki H., Komiya A., Emi M., Kuramochi H., Shiraishi T., Yatani R., Shimazaki J.: Three distinct commonly deleted region of chromosome arm 16q in human primary and metastatic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996, 17, 225-33.
 96. Szadowska A., Olborski B., Nedoszytko B., Limon J.: Usefulness of cytogenetic analysis in the diagnosis of undifferentiated synovial sarcoma of the chest wall. A case report. *Pat Pol.* 1995, 46, 199-202.
 97. Szuhai K., Knijnenburg J., Ijszenga M., Tanke H.J., Baatenburg de Jong R.J., Bas Douwes Dekker P., Rosenberg C., Hogendoorn P.C.: Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of synovial sarcoma of larynx with a t(X;18)(p11.2;q11.2) and trisomies 2 and 8. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004, 153, 48-52.
 98. Szuhai K., Ijszenga M., Knijnenburg J., Dijkstra S., de Schepper A., Tanke H.J., Hogendoorn P.C.: Does parosteal liposarcoma differ from other atypical lipomatous tumor/well-differentiated liposarcomas? A molecular cytogenetic study using combined multicolor COBRA-FISH karyotyping and array-based Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007, 176, 115-20.
 99. Szymańska J., Tarkkanen M., Wiklund T., Virolainen M., Blomqvist C., Asko-Seljavaara S., Tukiainen E., Elomaa I., Knuutila S.: A cytogenetic study of malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995, 65, 91-96.
 100. Szymańska J., Tarkkanen M., Wiklund T., Virolainen M., 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.
 101. Szymańska J., Virolainen M., Tarkkanen M., Wiklund T., Asko-Seljavaara S., Tukiainen E., Elomaa I., Blomqvist C., Knuutila S.: Overrepresentation of 1q21-23 and 12q13-21 in lipoma-like liposarcoma but not in benign lipomas: a Comparative Genomic Hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997, 99, 14-18.
 102. Szymańska J., Serra M., Skytting B., Larsson O., Virolainen M., Åkerman M., Tarkkanen M., Huuhtanen R., Picci P., Bacchini P., Asko-Seljavaara S., Elomaa I., Knuutila S.: Genetic imbalances in 67 synovial sarcomas evaluated by Comparative Genomic Hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998, 23, 213-19.
 103. Tarkkanen M., Böhling T., Gamberi G., Ragazzini P., Benassi M.S., Kivioja A., Kallio P., Elomaa I., Picci P., Knuutila S.: Comparative Genomic Hybridization of low-grade central osteosarcoma. *Mod Pathol.* 1998, 11, 421-26.
 104. Tarkkanen M., Huuhtanen R., Virolainen M., Wiklund T., Asko-Seljavaara S., Tukiainen E., Lepäntalo M., Elomaa I., Knuutila S.: Comparison of genetic changes in primary sarcomas and their pulmonary metastases. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999, 25, 323-31.
 105. Tijo J.L., Levan A.: The chromosomes number of man. *Hereditas.* 1956, 42, 1-6.

106. Todorić-Zivanović B., Marisavljević D., Surach C., Čemerikić V., Marković O., Koviljka K., Tatomirović Ž., Cikota B., Magić Z., Rocchi M.: A Ph-negative chronic myeloid leukemia with a complex *BCR/ABR* rearrangement and a t(6;9)(p21;q34.1). *Cancer Genet Cytogenet.* 2006, 166, 180-85.
107. Van Kessel G., de Bruijn D., Hermsen L., Janssen I., dos Santos N.R., Willems R., Makkus L., Schreuder H., Veth R.: Masked t(X;18)(p11;q11) in a biphasic synovial sarcoma revealed by FISH and RT-PCR. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998, 23, 198-201.
108. Van den Berg E., Molenaar W.M., Hoekstra H.J., Kamps W.A., de Jong B.: DNA ploidy and karyotype in recurrent and metastatic soft tissue sarcomas. *Mod Pathol.* 1992, 5, 505-14.
109. Weiss S.W., Goldblum J.R.: Liposarcoma. W: Weiss S.W., Goldblum J.R. (red.) *Einzinger and Weiss's Soft tissue tumors.* St. Louis: wyd. 4, Mosby, 2001, s. 641-83.
110. Weiss SW, Goldblum JR: Synovial sarcoma. W: Weiss S.W., Goldblum J.R. (red.) *Einzinger and Weiss's Soft tissue tumors.* St. Louis: wyd. 4, Mosby, 2001, s. 1483-509.
111. Weng W.H., Wejde J., Ahlén J., Pang S.T., Lui W.O., Larsson C.: Characterization of large chromosome markers in a malignant fibrous histiocytoma by spectral karyotyping, Comparative Genomic Hybridization (CGH), and array CGH. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004, 150, 27-32.
112. Yang K., Lui W., Xie Y., Zhang A., Skytting B., Mandahl N.: Co-existence of *SYT-SSX1* and *SYT-SSX2* fusion in synovial sarcomas. *Oncogene.* 2002, 21, 4181-90.
113. Yunis J.J.: New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Hum Pathol.* 1981, 21, 1112-16.

10. ANEKS

Spis tabel

Tab. 26-29

Dane kliniczne 78 pacjentów i histologiczne 93 mięsaków, których badania cytogenetyczne wykonano w niniejszej pracy.

Tab. 30, 31

Dane kliniczne, histologiczne i wyniki badań cytogenetycznych opublikowanych sześciu guzów M/RLPS i 37 SS, w których określono zaburzenia genomu (metoda analizy kariotypów).

Tab. 32-39

Wyniki badań cytogenetycznych wykonanych metodami: prążkową GTW, FISH oraz CGH wszystkich podtypów histologicznych tłuszczakomięsaków (LPS) i mięsaków maziówkowych (SS).

Tab. 26. Dane kliniczne i histologiczne 23 guzów (18 pacjentów) tłuszczakomięsaków dobrze zróżnicowanych - WDLPS

Tab. 26. Clinico-pathologic data on 23 tumors (18 patients) of well-differentiated liposarcomas - WDLPS

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć* / wiek <i>Sex / age</i>	Rodzaj guza** <i>Status</i>	Leczenie przed bada- niem*** <i>Prior therapy</i>	Lokalizacja <i>Site</i>
1	K/53	P	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
2	M/38	P	nie / not	klatka piersiowa <i>thorax</i>
3	M/46	P	nie / not	udo / <i>thigh</i>
4	M/50	P	nie / not	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>
5	M/51	P	nie / not	udo / <i>thigh</i>
6	M/51	P	nie / not	nadnercze <i>adrenal gland</i>
7	K/49	P	nie / not	ściana brzucha <i>abdominal wall</i>
8	M/65	P	nie / not	udo / <i>thigh</i>
9	M/38	P	nie / not	udo / <i>thigh</i>
10	K/64	P	nie / not	udo / <i>thigh</i>
11	M/41	R	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
12	K/32	R	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
13	K/51	R	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
14	K/64	R	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
15-1	M/38	R	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
15-2	M/36	R	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
15-3	M/39	R	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
15-4	M/40	R	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
15-5	M/39	R	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
16-1	M/46	R	nie / not	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>
16-2	M/48	R	tak / yes	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć* / wiek <i>Sex / age</i>	Rodzaj guza** <i>Status</i>	Leczenie przed bada- niem*** <i>Prior therapy</i>	Lokalizacja <i>Site</i>
17	K/38	R	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
18	M/27	R	tak / <i>yes</i>	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>

* M- mężczyzna, K- kobieta, ** P- guz pierwotny, R- wznowa, *** przed badaniem chemio - i/lub radioterapia
* *M- man, K- woman, ** P- primary, R- recurrent, *** prior chemo - and/or radiotherapy*

Tab. 27. Dane kliniczne i histologiczne 19 guzów (9 pacjentów) tłuszczakomięsaków odróżnio-
wanych - DDLPS

Tab. 27. *Clinico-pathologic data on 19 tumors (9 patients) of dedifferentiated liposarcomas –
DDLPS*

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć* / wiek <i>Sex / age</i>	Rodzaj guza** <i>Status</i>	Leczenie przed badaniem*** <i>Prior therapy</i>	Lokalizacja / site
1	M/51	P	nie / <i>not</i>	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
2	M/48	P	nie / <i>not</i>	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
3	M/50	P	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
4-1	K/77	R	nie / <i>not</i>	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>
4-2	K/77	R	nie / <i>not</i>	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>
4-3	K/78	R	nie / <i>not</i>	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>
4-4	K/78	R	nie / <i>not</i>	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>
5	K/52	R	tak / <i>yes</i>	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
6	K/47	R	tak / <i>yes</i>	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
7	K/39	R	nie / <i>not</i>	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
8	M/78	R	tak / <i>yes</i>	okolice lędźwiowe <i>loins</i>
9-1	K/31	M	nie / <i>not</i>	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
9-2	K/35	R	tak / <i>yes</i>	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
9-3	K/37	M	tak / <i>yes</i>	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
9-4	K/37	R	tak / <i>yes</i>	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć* / wiek <i>Sex / age</i>	Rodzaj guza** <i>Status</i>	Leczenie przed badaniem*** <i>Prior therapy</i>	Lokalizacja / site
9-5	K/38	M	tak / <i>yes</i>	ściana brzucha <i>abdominal wall</i>
9-6	K/38	M	tak / <i>yes</i>	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>
9-7	K/39	M	tak / <i>yes</i>	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>
9-8	K/39	M	tak / <i>yes</i>	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>

* M- mężczyzna, K- kobieta, ** P- guz pierwotny, R- wznowa, M- przerzut, *** przed badaniem chemio - i/lub radioterapia

* *M- man, K- woman, ** P- primary, R- recurrent, M- metastatic *** prior chemo - and/or radiotherapy*

Tab. 28. Dane kliniczne i histologiczne 28 guzów (17 pacjentów) tłuszczakomięsaków śluzowatych / okrągłokomórkowych

Tab. 28. Clinico-pathologic data on 28 tumors (17 patients) of myxoid / round cell liposarcomas

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć* / wiek <i>Sex / age</i>	Podtyp histol. ** <i>Subtype</i>	Rodzaj guza*** <i>Status</i>	Leczenie przed bada- niem**** <i>Prior therapy</i>	Lokalizacja <i>Site</i>
1	K/49	MLPS	P	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
2	M/48	MLPS	P	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
3	M/41	MLPS	P	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
4-1	M/48	MLPS	P	nie / <i>not</i>	śródpiersie <i>mediastinum</i>
4-2	M/50	MLPS	R	nie / <i>not</i>	szyja / <i>neck</i>
4-4	M/51	MLPS	M	tak / <i>yes</i>	śródpiersie <i>mediastinum</i>
5-1	M/52	MLPS	P	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
5-2	M/55	RLPS	R	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
6	M/53	MLPS	R	nie / <i>not</i>	ramię / <i>arm</i>
7	K/58	MLPS	R	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
8	K/52	MLPS	R	tak / <i>yes</i>	udo / <i>thigh</i>
9	K/58	MLPS	R	tak / <i>yes</i>	udo / <i>thigh</i>
10	M/48	MLPS	R	tak / <i>yes</i>	udo / <i>thigh</i>
11	M/55	MLPS	R	tak / <i>yes</i>	udo / <i>thigh</i>

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć* / wiek <i>Sex / age</i>	Podtyp histol. ** <i>Subtype</i>	Rodzaj guza*** <i>Status</i>	Leczenie przed bada- niem**** <i>Prior therapy</i>	Lokalizacja <i>Site</i>
12	M/56	MLPS	R	nie / not	udo / thigh
13-1	M/45	MLPS	R	nie / not	dół podkolanowy <i>popliteal fossa</i>
13-2	M/45	MLPS	M	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
14-1	K/39	MLPS	M	nie / not	śródpiersie <i>mediastinum</i>
14-2	K/44	MLPS	M	tak / yes	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
14-3	K/44	MLPS	M	tak / yes	nadgarstek / wrist
14-4	K/46	MLPS	M	tak / yes	udo / thigh
14-5	K/46	MLPS	M	tak / yes	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
14-6	K/46	MLPS	R	tak / yes	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
14-7	K/47	MLPS	R	tak / yes	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
15	K/55	MLPS	M	nie / not	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>
16-1	K/25	MLPS	M	nie / not	zaotrzewnowo <i>retro peritoneum</i>
17-1	K/60	RLPS	R	tak / yes	podudzie / shin
17-2	K/62	RLPS	M	tak / yes	jama brzucha <i>peritoneal cavity</i>

* M- mężczyzna, K- kobieta, ** MLPS- tłuszczakomięsak śluzowaty, RLPS- tłuszczakomięsak okrągłomórkowy, *** P- guz pierwotny, R- wznowa, M- przerzut, **** przed badaniem chemio - i/lub radioterapia

* M- man, K- woman ** MLPS- myxoid liposarcoma, RLPS- round cell liposarcoma, *** P- primary, R- recurrent, M- metastatic **** prior chemo - and/or radiotherapy

Tab. 29. Dane kliniczne i histologiczne 23 guzów (17 pacjentów) mięsaków maziówkowych
Tab. 29. Clinico-pathologic data on 23 tumors (17 patients) of synovial sarcoma

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć* / wiek <i>Sex / age</i>	Podtyp histol. ** <i>Subtype</i>	Rodzaj guza*** <i>Status</i>	Leczenie przed bada- niem**** <i>Prior therapy</i>	Lokalizacja <i>Site</i>
1	K/49	Mo	P	nie / not	staw skokowy <i>ankle</i>
2	K/62	Mo	P	nie / not	udo / thigh
3	M/39	Mo	P	nie / not	ramię / arm

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć* / wiek <i>Sex / age</i>	Podtyp histol. ** <i>Subtype</i>	Rodzaj guza*** <i>Status</i>	Leczenie przed bada- niem**** <i>Prior therapy</i>	Lokalizacja <i>Site</i>
4-1	M/45	Mo	P	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
4-2	M/45	Mo	P	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
5	K/41	Mo	P	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
6-1	M/70	Mo	P	nie / <i>not</i>	klatka piersiowa <i>thorax</i>
6-2	M/70	Mo	P	nie / <i>not</i>	klatka piersiowa <i>thorax</i>
6-3	M/71	Mo	M	nie / <i>not</i>	szyja / <i>neck</i>
7	K/35	Mo	R	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
8	M/65	Mo	R	nie / <i>not</i>	obwód biodrowa <i>pelvic girdle</i>
9-1	K/26	Mo	R	tak / <i>yes</i>	ręka / <i>hand</i>
9-2	K/26	Mo	R	tak / <i>yes</i>	ręka / <i>hand</i>
10	M/49	Mo	R	nie / <i>not</i>	przedramię/ <i>forearm</i>
11	M/54	Mo	R	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
12	K/29	Mo	R	nie / <i>not</i>	ramię / <i>arm</i>
13	M/25	Mo	R	nie / <i>not</i>	stopa / <i>foot</i>
14	K/26	Bi	P	nie / <i>not</i>	udo / <i>thigh</i>
15-1	M/17	PD	R	tak / <i>yes</i>	ramię / <i>arm</i>
15-2	M/17	PD	R	tak / <i>yes</i>	ramię / <i>arm</i>
16	M/42	PD	R	nie / <i>not</i>	staw kolanowy <i>knee joint</i>
17-1	M/43	PD	R	nie / <i>not</i>	przedramię/ <i>forearm</i>
17-2	M/44	PD	M	tak / <i>yes</i>	węzły chłonne <i>lymphatic nodes</i>

* M- mężczyzna, K- kobieta, ** Mo- jednofazowy, Bi- dwufazowy, PD- niskozróżnicowany, *** P- guz pierwotny, R- wznowa, M- przerzut, **** przed badaniem chemio - i/lub radioterapia

* *M- man, K- woman* ** *Mo- monophasic, Bi- biphasic, PD- poorly differentiated*, *** *P- primary, R- recurrent, M- metastatic*, **** *prior chemo - and/or radiotherapy*

Tab. 30. Dane kliniczne, histologiczne i cytogenetyczne i cytogenetyczne opublikowanych wyników sześciu guzów (4 pacjentów) tłuszczakomięsaków słuźowatych / okrągłokomórkowych

Tab. 30. *Clinico-pathologic and cytogenetic data of previously published results on six tumors (4 patients) of myxoid / round cell liposarcomas*

Nr* nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć** / wiek <i>Sex / age</i>	Podtyp histol. <i>Subtype</i>	Rodzaj guza*** <i>Status</i>	Leczenie przed badaniem**** <i>Prior therapy</i>	Kariotyp / <i>Karyotype</i> *****	Literature/ <i>Reference</i>
16-2	K/25	MLPS	M	nie / not	45-48,XX,+der(1;16)(q10;p10),t(12;16)(q13;p11),der(16)t(12;16)(q13;p11),+19,+20[cp4]	86
18-1	M/47	MLPS	R	tak / yes	46,XY,t(12;16)(q13;p11),t(11;17)(q13;q25)[3]	23
18-2	M/50	MLPS	M	tak / yes	46,XY,t(2;10)(q33;q22),t(12;16)(q13;p11)[5]	23
19	K/49	RLPS	P	nie / not	46,XY,t(12;16)(q13;p11)[20]	23
20-1	K/55	MLPS	R	nie / not	46,XX,i(6)(p10),t(12;16)(q13;p11),der(16)t(1;16)(q21;q13)[4]/47,idem,der(16)t(1;16)(q21;q13)x2[4]	23
20-2	K/55	MLPS	R	nie / not	46,XX,i(6)(p10),t(12;16)(q13;p11),der(16)t(1;16)(q21;q13)[14]/47,idem,der(16)t(1;16)(q21;q13)x2[3]	23

* kontynuowano numerację z Tab. 28, ** M- mężczyzna, K- kobieta; MLPS- tłuszczakomięsak słuźowaty, RLPS- tłuszczakomięsak okrągłokomórkowy, **** P- guz pierwotny, R- wznowa, M- przerzut, ***** przed badaniem chemio - i/lub radioterapia, ***** wytluszczone translokacje swoista

* *table numbers continue from the previous Tab. 28, ** M- man, K- woman; MLPS- myxoid liposarcoma, RLPS- round cell liposarcoma, **** P- primary, R- recurrent, M- metastatic, ***** prior chemo - and/or radiotherapy, ***** specific translocation are in bold*

Tab. 31. Dane kliniczne, histologiczne i cytogenetyczne opublikowanych wyników 37 guzów (25 pacjentów) mięsaków maziówkowych
 Tab. 31. *Clinico-pathologic and cytogenetic data the previously published results on 37 tumors (25 patients) of synovial sarcoma*

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć** / wiek <i>Sex / age</i>	Podtyp. histol <i>Subtype</i>	Rodzaj guza*** <i>Status</i>	Leczenie przed badaniem**** <i>Prior therapy</i>	Gen fuzyjny <i>Fusion gene</i>	Kariotyp / <i>Karyotype</i> *****	Literatura <i>Reference</i>
18	M/21	Mo	P	nie / <i>not</i>	nb	46, Y, t(X;18)(p11;q11)[6]	96
19	K/21	Mo	P	nie / <i>not</i>	SYT/SSX1	46, XX[17]	74
20-1	M/50	Mo	P	nie / <i>not</i>	nb	46, Y, t(X;18)(p11;q11)[5]	50
20-2	M/55	Mo	R	nie / <i>not</i>	nb	46, Y, t(X;18)(p11;q11)[5]/49, Y, t(X;18)(p11;q11), del(3)(p13p21), +4, +7, +8[4]	50
21	K/67	Mo	R	nie / <i>not</i>	SYT/SSX1	44-47, X, t(X;18)(p11;q11), add(5)(q13), t(5;10) (q13;q24), -6, +12, add(20)(q13), mar[cp8]	74
22-1	K/44	Mo	R	tak / <i>yes</i>	nb	53-66, XX, t(X;18)(p11;q11), der(1)t(1;19) (p13;p13)x2, add(2)(p21), der(2)t(2;5)(q31;q15), del(3)(p13), add(7)(q11), i(12)(q10), add(15)(p11.2), der(17;21)(q10;q10), inc[cp4]	50
22-2	K/44	Mo	R	tak / <i>yes</i>	nb	35-39, X, t(X;18)(p11;q11), +der(X)t(1;X)(p13;q26), der(1)t(1;19)(p13;p12), der(3)t(3;11)(p21;q13)add(3) (q21), add(14)(q32), add(15)(p11.2), +mar1, +mar2, +r, inc[cp5]	50
22-3	K/45	Mo	R	tak / <i>yes</i>	nb	62-71, X, t(X;18)(p11;q11)X2, +1, der(1)t(1;19) (p13;p12), der(1)t(1;7)(p12;p11), +2, del(2)(q32)x2, del(4)(q12), +6, der(6)t(6;7)(p23;q11.2), +7, der(7) t(7;12)(q11.2;q11), add(7)(q11.2), del(7)(q11), +8, +9, add(9)(q11), +10, add(10)(q24), del(11)(q11), der(11;17)(p10;q10), -13, -13, -14, -14, add(15)(p11), - 16, der(19)t(12;19)(q11;q13), -22, -22, +mar1, +mar2, +mar3, inc[cp8]	50

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć** / wiek <i>Sex / age</i>	Podtyp. histol <i>Subtype</i>	Rodzaj guza*** <i>Status</i>	Leczenie przed badaniem**** <i>Prior therapy</i>	Gen fuzyjny <i>Fusion gene</i>	Kariotyp / <i>Karyotype</i> *****	Literatura <i>Reference</i>
22-4	K/45	Mo	R	tak / yes	nb	70-78,X,t(X;18)(p11;q11)x2,der(1)t(1;19)(p13;p12),der(1)t(1;7)(p12;p11),del(2)(q32),del(4)(q12),add(7)(q11.2),add(9)(q11),add(10)(q24),del(11)(q11),der(11;17)(p10;q10),+mar1,+mar2,inc [cp8]	50
22-5	K/45	Mo	R	tak / yes	nb	65-71,X,t(X;18)(p11;q11)x2,der(1)t(1;19)(p13;p12),der(1)t(1;11)(p13;q13),der(1)t(1;7)(p12;p11),del(2)(q32),der(6)t(6;7)(p23;q11.2),del(6)(q23),der(7)t(7;12)(q11.2;q11),add(7)(q11.2),add(8)(q13),i(10)(q10),i(12)(p10),dup(12)(q13q24),del(14)(q22q24),der(13;17)(q10;q10),add(15)(p11),der(21)t(5;21)(q11.2;q22),add(22)(q13),+r,inc[cp8]	50
23-1	K/15	Mo	P	nie / not	SYT/SSX2	37-46,X,t(X;18)(p11;q11),t(1;11)(p36;q13),add(3)(p13),add(9)(q22),-17,+mar[cp9]	74
23-2	K/15	Mo	R	tak / yes	SYT/SSX2	37-45,X,t(X;18)(p11;q11),t(1;11)(p36;q13),add(3)(p13),add(9)(q22)[5]	74
23-3	K/16	Mo	R	tak / yes	SYT/SSX2	45-46,X,t(X;18)(p11.2;q11.2),der(1)t(1;2)(p36;q11),add(3)(p11),-4,add(6)(p11),der(7)t(6;7)(p11.2;p13),add(9)(q22),add(11)(q13),+12[cp20]	74
24-1	M/29	Mo	P	nie / not	nb	40-45,ins(X;18)(p11.2;q11.2q21),Y,-20[5]	50
24-2	M/29	Mo	R	nie / not	SYT/SSX1	40-45,ins(X;18)(p11.2;q11.2q21),Y,-20[5]	74
24-3	M/29	Mo	M	tak / yes	SYT/SSX1	40-45,ins(X;18)(p11.2;q11.2q21),Y[9]	74
25	M/38	Mo	R	nie / not	SYT/SSX1	43-48,Y,t(X;18)(p11;q11),t(6;13)(p21;q36),+7,del(8)(p21),der(?)t(?;2)(?;q13)[cp11]	74
26	M/44	Mo	M	nie / not	nb	41-46,Y,t(X;18)(p11;q11),t(2;21)(q31;q22),add(10)(q24),-17[cp7]	50

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć** / wiek <i>Sex / age</i>	Podtyp. histol <i>Subtype</i>	Rodzaj guza*** <i>Status</i>	Leczenie przed badaniem**** <i>Prior therapy</i>	Gen fuzyjny <i>Fusion gene</i>	Kariotyp / <i>Karyotype</i> *****	Literatura <i>Reference</i>
27	M/24	Mo	M	nie / <i>not</i>	<i>SYT/SSX1</i>	47,t(X;18)(p11.2;q11.2),Y,-3,t(11;16)(q23;p13),+der(15)t(3;15)(p21;q21),+18[cp10]	74
28	K/16	Bi	P	nie / <i>not</i>	nb	48,X,t(X;18)(p11;q11),+7,+15[20]	43
29	M/43	Bi	P	nie / <i>not</i>	<i>SYT/SSX2</i>	44-45,t(X;18)(p11;q11),Y,der(9;12)(p10q10),der(10)t(3;10)(p21;q26),del(17)(p11.2),-19,add(19)(q13),+mar,+r[cp15]	74
30	M/23	Bi	R	nie / <i>not</i>	nb	46,t(X;15;18)(p11;q11),Y[13]	43
31	M/46	Bi	R	nie / <i>not</i>	nb	47,t(X;18)(p11;q11),Y,+2,t(4;22)(q22;p11.2),t(7;19)(q22;q11),t(12;13)(q13;p11)[16]	43
32-1	M/22	Bi	R	nie / <i>not</i>	nb	43-45,t(X;18)(p11;q11),Y,der(12;17)(q10;q10),-17,inc[cp9]/45,idem,t(1;12)(q21;q24),t(3;18)(p23;q21),add(17)(p11)[cp24]	42
32-2	M/22	Bi	R	nie / <i>not</i>	nb	45,Y,t(X;18)(p11;q11),der(12;17)(q10;q10)[4]/48,idem,+8,+10[3]/88-89,idemx2,-der(12;17),der(11;17)(q10;q10)[cp4]	43
32-3	M/26	Bi	R	nie / <i>not</i>	nb	45,t(X;18)(p11;q11),Y,der(12;17)(q10;q10),-17[16]/80-89,idem,-der(12;17),der(11;17)(q10;q10)[cp12]	43
33	M/31	Bi	R	nie / <i>not</i>	nb	35-38,t(X;18)(p11;q11),Y,-1,-3,-4,-10,-11,inv(11)(q14p15),-12,der(12)t(12;13)(p13;q12),-13,-15,-16,-20,-21,-22,der(22)t(1;22)(q12;p11)[cp11]/46,XY[3]	43
34	M/28	Bi	R	nie / <i>not</i>	<i>SYT/SSX1</i>	46,t(X;18)(p11;q11),Y[10]	74
35	K/43	Bi	R	nie / <i>not</i>	<i>SYT/SSX1</i>	43,X,t(X;18)(p11;q11)[3]/47,XX,+7[2]/46,XX,del(7)(q22)[2]/46,XX[4]	74

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Płeć** / wiek <i>Sex / age</i>	Podtyp. histol <i>Subtype</i>	Rodzaj guza*** <i>Status</i>	Leczenie przed badaniem**** <i>Prior therapy</i>	Gen fuzyjny <i>Fusion gene</i>	Kariotyp / <i>Karyotype</i> *****	Literatura <i>Reference</i>
36	K/33	Bi	R	nie / <i>not</i>	<i>SYT/SSX2</i>	64-76,X,t(X;18)(p11;p11)x2,+2,-3,+8,+9,-10,+12,+13,-14,+16,-19,+20,+21[cp9]	74
37	K/59	Bi	R	nie / <i>not</i>	<i>SYT/SSX1</i>	46,XY[26]	74
38	M/35	PD	P	nie / <i>not</i>	nb	45,t(X;18)(p11;q11),Y,r(1)(p13-cen-q44:),-5,-11,+12[22]/44,idem,-12[11]	40
39	M/32	PD	P	nie / <i>not</i>	nb	49,XY,t(5;18)(q11.2;q11.2),+7,+8,+9[25]	42
40	M/43	PD	P	nie / <i>not</i>	<i>SYT/SSX1</i>	63-77,X,t(X;18)(p11.2;q11.2),der(1)t(1;18)(p13;q11.2),-3,del(6)(q15),del(9)(p12),-11,-13,+der(12)t(6;12)(p21;p13),add(16)(q2?)-16,-20[cp19]	74
41	M/34	PD	P	nie / <i>not</i>	<i>SYT/SSX1</i>	40-46,Y,del(X)(q13),del(6)(q23),+mar[cp6]	74
42-1	K/27	PD	R	nie / <i>not</i>	<i>SYT/SSX1</i>	46,XX[9]	74
42-2	K/27	PD	R	tak / <i>yes</i>	<i>SYT/SSX1</i>	40-56,t(X;18)(p11;q11),-X,add(4)(q12)[2],der(6)t(3;6)(p21;p21)[4],der(6)t(6;12)(q13;q13)[2],der(7)t(2;7)(q11;q22)[3],der(7;12)(q10;q10)[2],add(7)(p22)[2],+8,-10,+del(12)(p11)[5],+12,+der(14)t(5;14)(q13;q24)[2],+14,+14,+15,+15,add(17)(q25)[2],add(19)(q13)[3],+21.mar1[5][cp10]	74

* kontynuowano numerację z tab. 29, ** M-mężczyzna, K-kobieta; Mo- jednofazowy, Bi- dwufazowy, PD- niskoroznicowany, **** P- guz pierwotny, R- wznowa, M- przerzut, nb- nie badano ***** przed badaniem chemio - i/ lub radioterapia, ***** wytluszczone translokacje swoich

** *table numbers continue from the previous table 29*, ** *M- man, K- woman; Mo- monophasic, Bi- biphasic, PD- poorly differentiated.*

*** *P- primary, R- recurrent, M- metastatic*, **** *prior chemo - and/or radiotherapy*, nb - *not research*, ***** *specific translocation are in bold.*

Tab. 32. Wyniki badań kariotypów 23 guzów (19 pacjentów) oraz niezrównoważenia genomowego metodą CGH w 21 (18 pacjentów) guzach tłuszczakomięśniaków dobrze zróżnicowanych

Tab. 32. Karyotypes on 23 tumor (19 patients) and genomic imbalances determined by the CGH method on 21 tumors (18 patients) of well-differentiated liposarcomas

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Kariotyp / Karyotype*	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie / Gains**	
				Chromosom 12 <i>Chromosome 12</i>	Inne chromosomy <i>Other chromosomes</i>
1	P	47,XX,+r[8]/46,XX[5]	brak / absent	12q13-24	brak / absent
2	P	48,XY,+r1,+r2[4]	19, 22	12q13-23	3p11-14, 6q23-25
3	P	46,XY,-6,+r[7]/64,idem[4]/46,XY[3]	brak / absent	12q13-22 (a)	11q14-22
4	P	46,mar1,inc[8]	10q25-qter	12q13-22 (a)	3p11-13, 18p
5	P	48,XY,+r1,+r2[7]	brak / absent	12q14-21(a)	14q10-12
6	P	63-64,mar1,mar2,inc[cp6]	11, 12q23-qter, 14q23-qter, 16q22-qter, 17, 21, 22	12q12-22(a)	1p21-22, 2q22-32, 3p12-13, 5pter-q23, 7q21-32, 9q, 10q11-24
7	P	46-48,XX,r1,r2,mar[cp8]	brak / absent	12q12-qter (a)	18q11-21
8	P	46,XY[4]	brak / absent	12q13-24 (a)	brak / absent
9	P	46,XY[8]	6, 7p14-pter, 9, 13, 14, 16,	12	3, 4, 5, 8, 18, 21
10	P	46,XX[25]	brak / absent	12q11-22 (a)	1p13-q31,
11	R	42-50,XY,r1,r2,inc[cp3]/92-97,r1,r2,mar1,inc[cp3]	brak / absent	12q12-22 (a)	5p, 14q11-22 (a)
12	R	25-98,X,t(2;3;?)(p26;?;q29;?) [cp3]/25-85,add(18)(q13)[2],add(19)(q13)[2],r1[3],r2[4],inc[cp8]	brak / absent	12q11-22 (a)	1q11-31, 2q21-22, 11q14-22, 14q24-qter(a) , 15q14-22,

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Kariotyp / <i>Karyotype*</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie / <i>Gains**</i>	
				Chromosom 12 <i>Chromosome 12</i>	Inne chromosomy <i>Other chromosomes</i>
13	R	46-48,XX,+der(19)t(5;19)(q13;q13),+r1,+r2[cp10]	11q22-qter	12q11-21 (a)	5p14-ter
14	R	50,XX,+r,+mar1,+mar2,+mar3[7]	brak / <i>absent</i>	12q12-22 (a)	6q23-ter, 14 (a)
15-1	R	47,XY,+r[3]/75-90,idem[cp3]	brak / <i>absent</i>	12q11-21 (a)	5p13-15, 5p13-15,
15-2	R	47,XY,+r[8]/46,XY[7]	brak / <i>absent</i>	12q11-21 (a)	5p13-15,
15-3	R	44-45,r1,r2,inc[cp5]	19, 22	12q11-21 (a)	5p13-15,
15-4	R	42-48,XY,r1,r2[cp6]	brak / <i>absent</i>	12q11-21 (a)	5p14-15, 6q1 5-qter,
15-5	R	31-46,r,mar,inc[cp10]	16, 19, 22	12q11-21 (a)	4p13-15, 5p14-15, 14q11-12 (a)
16-1	R	46-48,XY,r1,dminx2,inc[3]/87-96,XXYY,r1,r2,mar1,mar2,inc[cp7]	brak / <i>absent</i>	12q13-22 (a)	6q22-24
16-2	R	35-52,XY,dic(1;22)(p36.1;q13),r1,r2,inc[cp6]	nb	nb	nb
17	R	41-46,X,-X,dic(1;7)(p36;p11),-2,-4,+der(5)t(1;5)(p22;p15),del(9)(p13),+dic(9;?) (p24;?),+12,+16,-9,r1,r2,mar1[cp7]	5p,18p, 19, 22	12q12-22 (a) ,	2q24-qter, 5q14-23, 6q22-24 (a), 14q11-21 (a)
18	R	46,XY,+der(1)(1;12)(p11;q13),-12,r[3]	nb	nb	nb

P- guz pierwotny, R- wznowa, * wyliczono aberracje charakterystyczne, ** pogrubionym drukiem zaznaczono chromosomy ulegające amplifikacji, nb- nie badano
P- primary, R- recurrent, * characteristic aberrations are in bold, ** amplifications are in bold, nb- not research

Tab. 33. Wyniki badań kariotypów 19 guzów (9 pacjentów) oraz niezrównoważenia genomowego metodą CGH w 15 guzach (8 pacjentów) tłuszczakomięśniaków odróżnicowanych

Tab. 33. Karyotypes on 19 tumors (9 patients) and genomic imbalances determined by the CGH method on 15 tumors (8 patients) of dedifferentiated liposarcomas

Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Kariotyp / <i>Karyotype*</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie / <i>Gains**</i>	
				Chromosom 12 <i>Chromosome 12</i>	Inne chromosomy <i>Other chromosomes</i>
1	P	42-52,mar1,mar2,inc[cp5]	brak / absent	12q13-22 (a)	4p, 6q22-25, 7q32-34
2.	P	63-71,mar1,mar2,mar3,mar4,inc[cp5]	5p, 11q, 14,	12q11-24(a)	4p14-pter, 8q
3.	P	46,XY	1q25-42, 8p, 13,	12q13-24(a)	5, 7, 14, 19, 20
4-1	R	40-46,r1,r2,inc[cp3]	1p36-pter, 6p21-pter, 7q32- qter, 11q23-qter, 19, 20q12- qter, 22	12q11-23 (a)	2p22-pter, 5q21-23
4-2	R	36-47,XX,r,mar,inc[cp6]	1p36-pter, 6p21-pter, 19, 20q12-qter, 22	12q11-23(a)	5q21-23
4-3	R	41-55,add(4)(q31),add(7)(q11),add(9)(q11), add(22)(q13),der(?)(1:?) (p13:?),r1,r2,mar, inc[cp7]	6p21-pter	12q11-23 (a)	16q12-22
4-4	R	44-46,r1,r2,mar,inc[cp11]	6p21-pter, 7q32-35, 13q10- 21	12q11-23(a)	2p22-pter, 16q12-qter
5.	R	32-46,XX,del(6)(q13),add(6)(p25),add(11) (q21),der(14;18)(q10;q10),der(17)(6;17) (q13;q25),mar1,mar2,inc[cp11]	1p32-pter, 17, 19, 20q13- qter, 22	12cen-23(a)	4q12-28, 5q14-23, 6q12-23, 7p15-pter, 13q21-22
6.	R	48,XX,+r,+mar[6]	nb	nb	nb

7.	Nr pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	R	38-45, r,mar1,mar2,inc[cp6]/71-84,r1,r2,mar1,inc[cp4]	brak / absent	12q11-21 (a)	1q22-24, 11q14-22, 14q32-qter
8.	Rodzaj guza <i>Status</i>	R	Kariotyp / <i>Karyotype*</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Chromosom 12 <i>Chromosome 12</i>	Inne chromosomy <i>Other chromosomes</i>
7.						
8.			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]	2q32-qter, 6p21-pter, 8q23-qter, 10q21-22, 11p13-pter	12q12-23 (a)	1q21-25, 8q12-21, 10p13-pter
9-2		R	47,XX,+r[5]/46,XX[14]	nb	nb	nb
9-4		R	46,XX[10]	7q32-qter,	12q12-23 (a)	6q23-26
9-3		M	43-46,r,inc[5]	brak / absent	12q12-23 (a)	brak / absent
9-5		M	46,XX,del(19)(p13)[2]/46,XX[5]	nb	nb	nb
9-6		M	45-47,X,der(X)t(X;4)(q22;q12)[2],del(2)(p21)[2],add(14)(q22)[2],r[2],mar1[2],mar2[5],inc[cp6]/46,XX[30]	17p, 19, 20q, 22	12q12-23 (a)	4, 5q13-31, 6q22-26, 9q32-pter, 14q10-21
9-7		M	46,XX[7]	1p36-pter, 11q12-13, 19, 22	12q12-23(a), 12p	brak / absent
9-8		M	30-46,der(7)add(7)(p11)add(7)(q22)[2],mar[4],inc[cp8]	1p36-pter, 11q12-13, 17, 19, 22	12q12-23(a)	5q15-23, 6q22-26
9-1		M	44-49,X,-X,-x2[4],der(2)t(2;?:4)(q37;?:q12),del(2)(p21),del(5)(p13),der(5)t(3;5)(q12;p13),add(9)(q34),add(11)(p15),add(12)(p11.2),r,mar[cp9]	nb	nb	nb

P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy, nb- nie badano, * wytuszczono aberracje charakterystyczne, ** pogrubionym drukiem zaznaczono amplifikacje (a) P- primary, R- recurrent, M- metastatic, * characteristic aberrations are in bold, ** amplifications are in bold (a), nb- not research

Tab. 34. Wyniki badań kariotypów 28 guzów (17 pacjentów) oraz badań FISH przy użyciu sondy swoistej dla genu *CHOP* w 22 guzach (20 pacjentów) tiszczakomięsaków śluzowatych / okrągłokomórkowych

Tab. 34. Karyotypes on 28 tumors (17 patients) and FISH analyzes using *CHOP* probe on 22 tumors (20 patients) of myxoid / round cell liposarcomas

Nr* pacjenta - nr guza Patient No. - tumor No.	Podtyp Subtype	Rodzaj guza Status	Kariotyp / Karyotype**	Wyniki badań FISH*** FISH result
1	MLPS	P	45-46,XX,t(12;16)(q13;p11)[5]	brak hybridyzacji the lack of hybridiza- tion
2	MLPS	P	92,XXYY,t(12;16)(q13;p11)[5]46,XY[5]	CHOP+
3	MLPS	P	46,XY,der(8)t(8;18)(p23;q22),t(12;16)(q13;p11)[8]	CHOP +
4-1	MLPS	P	46,XY[3]	CHOP +
4-2	MLPS	R	46,XY,t(6;9)(p21;q34),de(16)(p11)[10]	CHOP +
4-3	MLPS	M	46,XY,t(6;9)(p21;q34),de(16)(p11)[9]	CHOP+
5-1	MLPS	P	46,XY,t(12;16)(q13;p11),der(16)t(1;16)(q21;q12)[10]	CHOP+
5-2	RLPS	R	51,XY,+5,+i(7)(q10),+8,t(12;16)(q13;p11),+13,+14[10]	nb
6	MLPS	R	44-46,XY,add(2)(q37),-4,t(12;16)(q13;p11)[cp7]	CHOP+
7	MLPS	R	46,XX,t(12;16)(q13;p11)[2]/47,XX,i(7)(q10),+8,t(12;16)[5]/ 72-73,XXX,+1,+8,t(12;16),-14,-17,-18,+19,+21,+22[cp4]	CHOP+
8	MLPS	R	47,XX,+8,t(12;16)(q13;p11)[7]	CHOP +
9	MLPS	R	44-47,X,dic(X;6)(p11.2;q27),+del(5)(q11.2),+8,t(12;16)(q13;p11)[cp10]	CHOP+

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Kariotyp / Karyotype**	Wyniki badań FISH*** <i>FISH result</i>
10	MLPS	R	46,XY,der(1)del(1)(p13p31.2)ins(1)(q21p31.2p13),der(2)t(2;14)(p25;q24),del(3)(q13.2q26.2),t(6;7)(p23;p13),t(12;16)(q13;p11),der(14)t(3;14)(q23;q22)[10]	CHOP +
11	MLPS	R	80-91,t(12;16)(q13;p11),der(16)t(12;16)(q13;p11)add(12)(q24)x2,add(19)(p13)x2,r1,r2,mar1,mar2,mar3,incl[cp9]	CHOP + amp+
12	MLPS	R	46,XY[4]	CHOP+
13-1	MLPS	R	85-92,XXYY,der(8)t(1;8)(p13;q12)x2,+8,t(12;16)(q13;p11)x2,-17[cp9]	CHOP+
13-2	MLPS	M	47,XY,+8,t(12;16)(q13;p11)[12]	nb
14-1	MLPS	M	46,XX,del(6)(q15q23),t(12;16)(q13;p11)[10]	nb
14-2	MLPS	M	46,XX,del(6)(q15q23),t(12;16)(q13;p11)[5]	nb
14-3	MLPS	M	47,XX,+add(1)(p13),del(6)(q15q23),add(8)(p11),t(12;16)(q13;p11)[8]	nb
14-4	MLPS	M	46,XX,del(6)(q15q23),t(12;16)(q13;p11)[5]	CHOP+
14-5	MLPS	M	46,XX,del(6)(q15q23),t(12;16)(q13;p11)[10]	nb
14-6	MLPS	R	46,XX,del(6)(q15q23),t(12;16)(q13;p11)[10]	nb
14-7	MLPS	R	46,XX,del(6)(q15q23),t(12;16)(q13;p11)[10]	nb
15	MLPS	M	46,XX[3]	CHOP+
16-1	MLPS	M	46,XX[10]	CHOP +
17-1	RLPS	R	46,XX,t(12;16)(q13;p11)[3]	CHOP+
17-2	RLPS	M	47,XX,+5,t(12;16)(q13;p11)[10]	nb

18-1	MLPS	R	46,XY,t(11;17)(q13;q25);t(12;16)(q13;p11)[3]	CHOP+
Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Kariotyp / Karyotype**	Wyniki badań FISH*** <i>FISH result</i>
19	RLPS	P	46,XY,t(12;16)(q13;p11)[20]	CHOP+
20-2	MLPS	R	46,XX,i(6)(p10),t(12;16)(q13;p11),der(16)t(1;16)(q21;q13)[14]/47,idem, +der(16)[3]	CHOP+

* wytuszczono numery pacjentów, których wyniki badań cytogenetycznych guzów były wcześniej opublikowane. Dane histologiczne, kliniczne i literaturowe zawarto w tab. 30, ** wytuszczono translokację swoistą oraz chromosomy r i mar pacjenta nr 11, MLPS- tuszczakomięsak śluzowaty, RLPS- tuszczakomięsak okrągłokomórkowy, P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy, *** amp- amplifikacja genu CHOP, nb- nie badano

* *The patients whose tumor karyotypes were published before are in bold.* *Clinico-pathologic data and references are in tab. 30.* *MLPS- myxoid liposarcoma, RLPS- round cell liposarcoma, P- primary, R- recurrent, M- metastatic, ** specific translocation and ring and large markers, patient 11 are in bold, *** gene CHOP amplification, nb- not research*

Tab. 35. Porównanie niezrównoważenia genomowego określonego metodą CGH z wynikami uzyskanymi poprzez analizę kariotypów w 16 guzach (11 pacjentów) tłuszczakomięśniaków śluzowatych / okrągłokomórkowych

Tab. 35. Comparison of genomic imbalances determined by the CGH method with karyotype analyses on 16 tumors (11 patients) of myxoid / round cell liposarcoma

Nr* pacjenta - nr guza Patient No. - tumor No.	Podtyp Subtype	Rodzaj guza Status	Zaburzenia równowagi genomowej określone metodą CGH ** Genomic imbalances determined using CGH		Zaburzenia równowagi genomowej określone w oparciu o kariotyp ** Genomic imbalances determined using karyotype analyses	
			Utraty chromosomów Chromosome losses	Dodatkowe kopie chromosomów Chromosome gains	Utraty chromosomów Chromosome losses	Dodatkowe kopie chromosomów Chromosome gains
3	MLPS	P	brak / absent	18q22-qter	brak / absent	18q22-qter
5-1	MLPS	P	16q	1q	16q	1q
5-2	RLPS	R	brak / absent	5, 7q, 8, 13, 14	brak / absent	5, 7q, 8, 13, 14
4-2	MLPS	R	brak / absent	brak / absent	16p11-pter	brak / absent
6	MLPS	R	brak / absent	brak / absent	4	brak / absent
7	MLPS	R	7p	7q, 8	7p, 14, 17, 18	1, 7q, 8, 19, 21
9	MLPS	R	brak / absent	8p21-qter	Xp11-pter	6q21-qter, 5pter - q11, 8
10	MLPS	R	3q13-24, 14q22-24	brak / absent	3q13-q23, 14q22-q24	brak / absent
12	MLPS	R	16pter-q22, 22	1p22-q12, 3p13-qter, 4q13-21, 5p, 5q15-21, 6q22-23, 7p13-15, 9q10-21, 11q14-22, 13q21-q31	brak / absent	brak / absent
13-1	MLPS	R	17	1q, 8	17	1q, 8

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Zaburzenia równowagi genomowej określone metodą CGH ** <i>Genomic imbalances determined using CGH</i>		Zaburzenia równowagi genomowej określone w oparciu o karyotyp ** <i>Genomic imbalances determined using karyotype analyses</i>	
			Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i>
14-7	MLPS	R	6q15-23	1q	6q15-23	brak / <i>absent</i>
4-3	MLPS	M	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>	16p11-pter	brak / <i>absent</i>
14-4	MLPS	M	6q15-23	1q	6q15-23, 8p11-pter	1p13-qter
15	MLPS	M	brak / <i>absent</i>	13	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
16-1	MLPS	M	brak / <i>absent</i>	1q, 12q13-qter, 19p, 20p	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
16-2	MLPS	M	brak / <i>absent</i>	1q, 12q13-qter, 16p11-pter, 16q, 19, 20	brak / <i>absent</i>	1q, 12q13-qter, 16p11-pter, 16q, 19, 20

* wyłuszczone numery pacjentów, których wyniki badań cytogenetycznych guzów były wcześniej opublikowane (tab. 30), MLPS- tłuszczakomięsak słuzowaty, RLPs- tłuszczakomięsak okrągłokomórkowy, P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy, ** wyłuszczone niezrównoważone aberracje stwierdzone zarówno metodą CGH, jak i w wyniku analizowania karyotypu.

* *The patients whose tumor karyotypes were published before are in bold (tab. 30), MLPS- myxoid liposarcoma, RLPs- round cell liposarcoma, P- primary, R- recurrent, M- metastatic, ** imbalances aberrations state by CGH and by karyotype analyzed are in bold*

Tab. 36. Niezrównoważenie genomowe określone poprzez analizę kariotypów w 18 guzach (13 pacjentów) tłuszczakomięsaków śluzowatych / okrągłokomórkowych (M/RLPS).

Tab. 36. Imbalances determined by karyotyping on 18 tumors (13 patients) of myxoid / round cell liposarcoma (M/RLPS)

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i>
1	MLPS	P	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
2	MLPS	P	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
4-1	MLPS	P	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
19	RLPS	P	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
8	MLPS	R	brak / <i>absent</i>	8
11	MLPS	R	16p11-pter, 19p13-pter	brak / <i>absent</i>
14-6	MLPS	R	6q21-qter	brak / <i>absent</i>
17-1	RLPS	R	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
18-1	MLPS	R	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
20-1	MLPS	R	6q	6p, 1q21-qter
20-2	MLPS	R	6q	6p, 1q21-qter
13-2	MLPS	M	brak / <i>absent</i>	8
14-1	MLPS	M	6q21-qter	brak / <i>absent</i>
14-2	MLPS	M	6q21-qter	brak / <i>absent</i>
14-4	MLPS	M	6q21-qter	brak / <i>absent</i>
14-5	MLPS	M	6q21-qter	brak / <i>absent</i>
17-2	RLPS	M	brak / <i>absent</i>	5
18-2	MLPS	M	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>

* wytłuszczono numery pacjentów, których wyniki badań cytogenetycznych guzów były wcześniej opublikowane (tab. 30), MLPS- tłuszczakomięsak śluzowaty, RLPS- tłuszczakomięsak okrągłokomórkowy, P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy, nb- nie badano

* *The patients whose tumor karyotypes were published before are in bold (tab. 30), MLPS- myxoid liposarcoma, RLPS- round cell liposarcoma, P- primary, R- recurrent, M- metastatic, nb- not research*

Tab. 37. Wyniki badań kariotypów 23 guzów (17 pacjentów) oraz badań FISH przy użyciu sondy swoistej dla genu *SS18* w 25 guzach (22 pacjentów) i sondy swoistej dla genów *SSX1-2* w 10 guzach (7 pacjentów) różnych podtypów histologicznych mięsaków maziówkowych

Tab. 37. *Karyotypes on 23 tumors (17 patients) and FISH analyzes using SS18 probe on 25 tumors (22 patients) and SSX1-2 probe on 10 tumors (7 patients) of different subtype of synovial sarcoma*

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Kariotyp / Karyotype**	wynik badań FISH *** <i>FISH result</i>
1	Mo	P	50,X,t(X;18)(p11;q11),+der(X)t(X;18)(p11;q11),+8,+11,+21[10]	SS18+
2	Mo	P	53,X,t(X;18)(p11;q11),+4,+6,+7,+8,+9,+12,+22[14]	SS18+
3	Mo	P	95-97,YY,t(X;17;18)(p11;q11)x2,+8,der(9)t(8;9)(p11;q11),del(11)(p11.2),+12,+12,-14,+15[cp7]	SS18+
4-1	Mo	P	40-41,Y,der(X)t(X;15)(p11;q11),der(1)t(1;3)(p36;p21)add(1)(q23),del(2)(q21q35),der(3;14)(q10;q10)[4],der(3)t(3;20)(q12;p12)[3],add(4)(q12),der(5)t(5;8)(p13;q22),-7,dic(11;12)(p11;p11),der(11)t(8;11)(q22;q21),dic(12;22)(p11;p11)[5],+12,der(13)t(10;13)(q21;q14)[3],-14,add(16)(q12),-16,der(18)t(X;18)(p11;q11),+der(18)t(6;18)(q13;q11),-19,-20,-21,-22,mar[cp10]	SS18+
4-2	Mo	P	38-40,Y,der(X)t(X;15)(p11;q11),del(2)(q21q31),der(3;14)(q10;q10)[3],add(4)(q12),der(5)t(5;8)(p13;q22),-7,dic(9;19)(p13;q13)[5],der(11)t(8;11)(q22;q21)[3],der(11)t(11;16)(p11;p11),dic(7;12)(q11;p12)[6],der(13)t(13;18)(q22;q11),-14,der(16)t(16;20)(q12;q11),add(16)(q12)x2,der(18)t(X;18)(p11;q11),der(18)t(6;18)(q11;q11),-19,-20,-21,-22,mar[cp10]	nb
5	Mo	P	46,XX[7]	SS18+
6-1	Mo	P	41-42,X,-Y,add(5)(q13),add(7)(q22),der(9;10)(q10;q10),der(11)t(11;13)(p11;q11),-13,+del(16)(q12),der(17)t(12;17)(p11;p11),-18,-21,-22[cp6]	SSX2+ SS18+
6-2	Mo	P	41-43,X,-Y,add(5)(q13),add(7)(q22),der(11)t(11;13)(p11;q11),-13,+del(16)(q12),der(17)t(12;17)(p11;p11),-18,-21,-22[cp6]	SSX2+ SS18+

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Kariotyp / <i>Karyotype**</i>	wynik badań FISH *** <i>FISH result</i>
7	Mo	R	46,X,t(X;18)(p11;q11)[15]	SSX1+ SS18+
8	Mo	R	46,Y,t(X;18)(p11;q11)[3]/46,XY[5]	SS18+
9-1	Mo	R	45-48,t(X;18)(p11;q11),-X,der(1;5)(p10;p10),der(1)(t(1;2)(p13;p11),der(2)(t(2;15)(p13;q14)add(2)(q37),add(2)(p13,-3,del(4)(q21q31),-5,der(6)t(6;14)(q13;q13),der(7)(7;9)(p11;p13),+add(8)(p21),-der(9)t(1;9)(p32;q34),add(10)(q26),der(11)t(5;11)(q13;q25)del(11)(p11),der(12)t(1;12)(q25;p13),add(14)(p11),+der(15)t(14;15)(q24;q22),add(16)(p13),der(20)t(7;20)(q11;p13)add(7)(q32)[cp10]	SS18+
9-2	Mo	R	44,XX,-2,add(6)(q11),dup(12)(q13q24),-14,+der(17)(14;17)(q11;q11),-22,der(?)t(7;?)p11;?)[3]	SS18+
10	Mo	R	52,Y,der(X)t(X;18)(p11;q11),+der(X)t(X;18),+Y,der(Y)t(X;1)(p11;q24),+2,inv(5)(p15,q13),del(6)(p23),+7,+8,der(9)t(6;9)(p21;p13),+12,-13,+14,der(16)t(13;16)(q32;q13),del(18)(p11),der(19)t(1;19)(?;p13)[14]	SS18+ SSX1+
11	Mo	R	38-40,der(X)t(X;18)(p11;q11),-Y,der(2)t(2;9)(p21;q13)x2,der(3;6)(q10;p10),-9,-11,-4,del(17)(p11),der(18)t(X;18)(p11;q11)t(X;12)(p22;q15)[cp10]	SSX1+ SS18+
12	Mo	R	43-45,X,t(X;18)(p11;q11),der(1)(1;21)(p22;q11),der(2)t(2;12)(p21;q13)x2,+der(2),+8,+9,der(12)t(2;12)(p12;q13),-13,-16,+add(17)(q23),add(19)(p13),add(20)(q11),-21,-22,-22[cp11]	SS18+
13	Mo	R	35-42,Y,der(X)t(X;15)(p11;q11),der(1)(1;5)(p13;p13),-3,+4,-8,der(10)t(X;10)(p11;p11),der(11)t(2;1)(q21;p11)[2],-11,+der(12)t(3;12)(p21;q15)[3],der(13;13)(q10;q10)[3],-14,-15,der(13;15)(q10;q10)[2],-15,der(18)t(X;18)(p11;q11)[cp18/81-83,YY,der(X),der(1)x2,-3,-3,-10,-11,+der(12)[3],-14,-14,-15,-15[cp7]	SSX1+ SS18+
20-2	Mo	R	46,Y,t(X;18)(p11;q11)[5]/49,Y,t(X;18)(p11;q11),del(3)(p13p21),+4,+7,+8[4]	SS18+
6-3	Mo	M	37-49,XY,add(5)(q13),add(7)(q22),der(9;10)(q10;q10),der(10)t(10;18)(p11;q11)[2],der(11)t(11;13)(p11;q11),-13,+del(16)(q12),der(17)t(12;17)(p11;p11),-18,-21,-22[cp7]	SSX2+ SS18+

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Kariotyp / <i>Karyotype</i> **	wynik badań FISH *** <i>FISH result</i>
26	Mo	M	41-46, Y, t(X;18)(p11;q11),t(2;21)(q31;q22),add(10)(q24),-17[cp7]	SS18+
14	Bi	P	46,XX[8]	SS18+ SSX2+
33	Bi	R	35-38, Y, t(X;18)(p11;q11),-1,-3,-4,-10,-11,inv(11)(q14p15),-12,der(12)t(12;13)(p13;q12),-13,-15,-16,-20,-21,-22,der(22)t(1;22)(q12;p11)[cp11]/46,XY[3]	SS18+
38	PD	P	45, Y, t(X;18)(p11;q11),r(1)(p13-cen-q44:),-5,-11,+12[22]/44,idem,-12[11]	SS18+
15-1	PD	R	70-73, Y, t(X;5;18)(p11;q15;q11),x2,+Y,del(1)(q32),-3,der(5)t(X;5)(p11;q15),-6,+7,+der(8)t(8;19)(q13;q13),+8,+8,inv(9)(p11q21.2)x2c?,-11,+12,-14,+18,+21[cp14]	SSX1+
15-2	PD	R	64-67, YY,t(X;5;18)(p11;q15;q11),der(1)t(1;3)(p36.3;p21),del(1)(q32),i(8)(q10),inv(9)(p11q21.2),der(13)t(4;13)(p12;q22),incl[cp5]	SSX1+ SS18+
16	PD	R	47-49, t(X;18)(p11;q11),-Y,i(1)(q10),+i(4)(p10),der(5;14)(q10;q10),+der(5)t(1;5)(q21;q11),+6,+8,+der(8)t(1;8)(p13;q11),add(11)(q23),-13,-14,dic(15;?) (p11;?),der(16)t(14;16)(q11;p11),del(17)(p11),mar[cp8]/97-98,idem,-der(5),+del(5)(p15),-der(8),-der(16)[cp2]	SS18+
17-1	PD	R	43-45, Y, t(X;18)(p11;q11),+del(5)(p11.2),der(6)t(6;13)(p23;q12),-8,i(9)(q10),-11,-13,-13,+der(19)t(8;19)(q13;p13)[cp12]	SS18+
39	PD	R	49,XY,t(5;18)(q11.2;q11.2),+7,+8,+9[25]	SS18+
17-2	PD	M	41-44, Y, t(X;18)(p11;q11),add(5)(q35),der(6)t(6;13)(p23;q12),-8,der(9)t(5;9)(p13;p13),-11,-13,-13,+der(19)t(8;19)(q13;p13),mar[cp6]	nb

* wytłuszczono numery pacjentów, których kariotypy guzów były wcześniej opublikowane (tab. 31); kursywą zaznaczono numery pacjentów, których kariotypy opublikowano w 2009 r. [28], Mo- jednofazowy, Bi- dwufazowy, PD- niskodróżnicowany, P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy, ** wytłuszczono translacje swoistą i jej wariant (kursywa), *** wytłuszczono wyniki badań FISH genów SSX1-2, nb- nie badano

* *The patients whose tumor karyotypes were published before are in bold (tab. 31); the patients whose tumor karyotypes were published in 2009 are in italics [28]. Mo- monophasic, Bi- biphasic, PD- poorly differentiated sarcoma, P- primary, R- recurrent, M- metastatic, ** specific translocation are in bold, variant translocation are in italics bold, *** bold are genes SSX1-2 probe FISH result, nb- not research*

Tab. 38. Porównanie niezrównoważenia genomowego określonego metodą CGH z wynikami uzyskanymi poprzez analizę kariotypów 15 guzów (12 pacjentów) różnych podtypów mięsaków maziówkowych

Tab. 38. Comparison of genomic imbalances determined by the CGH method with karyotype analyses on 15 tumors (12 patients) of different synovial sarcoma subtype

Nr* pacjenta - nr guza Patient No. - tumor No.	Podtyp Subtype	Rodzaj guza Status	Zaburzenia równowagi genomowej określone metodą CGH** Genomic imbalances determined using CGH	Zaburzenia równowagi genomowej określone w oparciu o kariotyp** Genomic imbalances determined using karyotype analyses
3	Mo	P	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i> 11pter-p11, 14q22-qter, 16q22-qter, 19, 22	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i> 8, 12, 15
4-1	Mo	P	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i> 3p, 7q, 11pter-p14, 11q22-qter, 14, 16q, 19q	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i> 9q11-qter, 11pter-p11, 14p-cen-q22-qter
4-2	Mo	P	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i> 3p, 7q, 11p, 11q22-qter, 14, 16q, 19, 20p, 22	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i> 1p13-31, 1q23-31, 2q31-35, 6q, 8q22-qter, 18q11-qter,
6-1	Mo	P	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i> 3p, 7q, 11p, 11q22-qter, 14, 16q, 19, 20p, 22	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i> 6q11-23, 6q23-qter, 8q12-23, 8q23-qter, 12p12-cen-q14-q21, 12q21-qter
6-2	Mo	P	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i> 5q13-23, 10p, 13, 17pter-p11, 22	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i> 12pter-p11, 16pter-q12, 19
11	Mo	R	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i> 3pter-p21, 6q, 11, 14, 17pter-p11,	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i> 5q13-q21-qter, 11pter-p11, 13pter-q11, 17pter-p11, 18, 21, 22

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Zaburzenia równowagi genomowej określone metodą CGH** <i>Genomic imbalances determined using CGH</i>		Zaburzenia równowagi genomowej określone w oparciu o karyotyp** <i>Genomic imbalances determined using karyotype analyses</i>	
			Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i>
12	Mo	R	1pter-p22, 13, 16, 19p, 21, 22	2p21-qter, 8, 9, 12q13-22 (a), 17q23-qter	1pter-p22, 13, 16, 19p, 20q11-qter, 21, 22	2p21-qter, 8, 9, 12q13-qter, 17q23-qter
13	Mo	R	1pter-p13, 3, 10pter-p12, 11q, 14, 15q, 18q11-qter	1q24-31, 2p21-13, 2q11-35, 4, 5pter-p13, 6q, 8pter-p12, 8q22-qter, 9p-9q22, 12pter-q13, 12q15-q22, 21	1pter-p13, 3, 10pter-p11, 11p, 11q, 14, 15q, 18q11-qter	2q11-q35-qter, 4, 5pter-p13, 8, 12pter-q13, 13q
21	Mo	R	brak / <i>absent</i>	2p, 12,	5q13-qter, 6, 20q13-qter	12
6-3	Mo	M	13, 22	5p, 7, 9p, 12pter-p11, 12q14-22, 14q11-31,	5q13-qter, 10p, 11pter-p11, 13, 18, 21, 22	12pter-p11, 16pter-q12
27	Mo	M	3p21-qter	15q21-qter, 18, 22q12-qter	3p21-qter	15q21-qter, 18
14	Bi	P	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
40	PD	P	1pter-p13, 2q32-qter, 3, 4q, 10q, 11, 13, 16, 20	2pter-q21, 2q23-24, 5p, 6pter-p21, 6q10-q15-qter, 7q, 8p, 9p, 10p, 12, 15q21-qter, 17p, 18q11-qter, 19, 21	1pter-p13, 3, 9pter-p12, 11, 13, 16, 20	6pter-p21, 6q15-qter, 12, 18q11-qter

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Zaburzenia równowagi genomowej określone metodą CGH** <i>Genomic imbalances determined using CGH</i>		Zaburzenia równowagi genomowej określone w oparciu o kariotyp** <i>Genomic imbalances determined using karyotype analyses</i>	
			Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i>
15-2	PD	R	3, 6, 11, 14q22-qter	8, 12, 18	1q32-qter, 3, 6, 11, 14p-cen-q22-qter	Y, 7, 8, 12, 18 , 19q13-qter, 21
17-1	PD	R	9p, 11	brak / absent	6pter-p23, 8pter-q13, 9p, 11, 13	5p11-qter, 8q13-qter, 9q, 19pter-p13

* wytłuszczono numery pacjentów, których kariotypy guzów były wcześniej opublikowane (Tab. 31); kursywą zaznaczono numery pacjentów, których kariotypy opublikowano w 2009 r. [28], Mo- jednofazowy, Bi- dwufazowy, PD- niskozróżnicowany, P- guz pierwotny, R- wznowa, M- guz przerzutowy, ** wytłuszczono niezrównoważone aberracje chromosomowe stwierdzone zarówno metodą CGH, jak i w wyniku analizowania kariotypu

* *The patients whose tumor karyotypes were published before are in bold (Tab. 31); the patients whose tumor karyotypes were published in 2009 are in italics [28]. Mono-phasic, Bi- biphasic, PD- poorly differentiated, P- primary, R- recurrent, M- metastatic, ** imbalances aberrations state by CGH and by karyotype analyses are in bold*

Tab. 39. Niezrównoważenie genomowe określone poprzez analizę kariotypów w 45 guzach (31 pacjentów) różnych podtypów mięsaków maziówkowych

Tab. 39. Imbalances determined by karyotyping on 45 tumors (31 patients) of different synovial sarcoma subtype

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i>
1	Mo	P	brak / <i>absent</i>	Xp11- qter, 8, 11,18q11-qter
2	Mo	P	brak / <i>absent</i>	4, 6, 7, 8, 9, 12, 22
5	Mo	P	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
18	Mo	P	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
19	Mo	P	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
20-1	Mo	P	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
23-1	Mo	P	3pter -p13,9q22-qter,17	brak / <i>absent</i>
24-1	Mo	P	20	brak / <i>absent</i>
7	Mo	R	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
8	Mo	R	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
9-1	Mo	R	X, 1p13-32, 1q10-25, 3, 4q21-31, 5, 6q13-qter, 7pter-p11, 15q22-qter	7q11-qter, 8p21-qter, 9p13-qter, 14q13-qter, 15pter-q22
9-2	Mo	R	2, 6q11-qter,7pter-p11,22	12q13-qter, 14q11-qter, 17pter-q11
10	Mo	R	1q24-qter, 9pter-p13, 13, 16q13-qter	X, Y, 2, 7, 8, 12, 13q32-qter, 14, 18q11-qter
20-2	Mo	R	3p13-21	4, 7, 8
22-1	Mo	R	1pter-p13, 2pter-p21, 2q31-qter, 3pter-p13, 7q11-qter,12pter-p10, 17pter-p10,21pter-p10	5q15-qter, 12q10-qter, 19pter-p12
22-2	Mo	R	3	Xpter-q26,11q13-qter,19pter-p12
22-3	Mo	R	4q12-qter, 9, 11q11-qter, 13, 14, 15pter-p11, 17p, 22	1p12-qter, 2pter-q32, 6p23-qter, 7pter-q11, 8, 10pter-q24, 12q11-qter,
22-4	Mo	R	1pter-p12, 2q32-qter, 4q12-qter, 7q11-qter, 9q11-qter, 10q24-qter	1p12-qter, 7pter-p11, 11q, 17p, 19pter-p12

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie chromoso- mów <i>Chromosome gains</i>
22-5	Mo	R	1pter-p12, 2q32-qter, 8q13-qter, 10p, 13p, 14q22-24, 15pter-p11, 17p11-pter, 21q22-qter	5q11-qter, 7pter-p11, 10q, 11q13-qter, 12p
23-2	Mo	R	3pter-p13, 9q22-qter	brak / <i>absent</i>
23-3	Mo	R	3pter-p13, 9q22-qter, 11q13-qter	2q11-qter, 7pter-p13, 12
24-2	Mo	R	20	brak / <i>absent</i>
25	Mo	R	8pter-p21	2q13-qter, 7
24-3	Mo	M	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
24-3	Mo	M	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
26	Mo	M	10q24-qter, 17	brak / <i>absent</i>
28	Bi	P	brak / <i>absent</i>	7, 15
29	Bi	P	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
30	Bi	P	9p, 10p, 17pter-p11, 19q13-qter	3p21-qter
31	Bi	R	brak / <i>absent</i>	2
32-1	Bi	R	12p, 17	brak / <i>absent</i>
32-2	Bi	R	11p, 12p, 17	8, 10
32-3	Bi	R	11p, 12p, 17	brak / <i>absent</i>
33	Bi	R	1p, 3, 4, 10, 12p, 15, 16, 20, 21, 22	brak / <i>absent</i>
34	Bi	R	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
35	Bi	R	brak / <i>absent</i>	7pter-q22
36	Bi	R	3, 10, 14, 19	2, 8, 9, 12, 13, 16, 20, 21
37	Bi	R	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
38	PD	P	5, 11	12
39	PD	P	brak / <i>absent</i>	7, 8, 9
41	PD	P	Xq13-qter, 6q23-qter	brak / <i>absent</i>
15-2	PD	R	1q32-qter, 8p, 13q22-qter	3pter-p21, 4pter-p12

Nr* pacjenta - nr guza <i>Patient No. - tumor No.</i>	Podtyp <i>Subtype</i>	Rodzaj guza <i>Status</i>	Utraty chromosomów <i>Chromosome losses</i>	Dodatkowe kopie chromosomów <i>Chromosome gains</i>
16	PD	R	Y, 1p, 11q23-qter, 13, 14pter-q11, 16pter-p11, 17pter-p11	1q, 4p, 5q10-q21, 6, 8
42-1	PD	R	X, 4q12-qter, 6pter-p21, 6q13-qter, 7q11-qter, 19q13-qter	2q11-qter, 3pter-p21, 5q13-qter, 8, 12q13-qter, 14, 15, 21
42-2	PD	R	brak / <i>absent</i>	brak / <i>absent</i>
17-2	PD	M	6pter-p23, 8pter-q13, 9pter-p13, 11, 13pter- q11	5pter-p13, 19q13-qter

* wytłuszczono numery pacjentów, których wyniki badań cytogenetycznych guzów były wcześniej opublikowane (Tab. 31), Mo- jednofazowy, Bi- dwufazowy, PD- niskozróżnicowany, P - guz pierwotny, R - wznowa miejscowa, M - guz przerzutowy

* *The patients whose tumor karyotypes were published before are in bold (Tab. 31), Mo- monophasic, Bi - biphasic, PD- poorly differentiated, P - primary, R - recurrent, M - metastatic*