

Klinický význam chromozomálních změn u nádorů kostí a měkkých tkání dětí a mladistvých

Clinical relevance of chromosomal aberrations in bone and soft tissue tumors in children and young adults

Stejskalová E.¹, Jarošová M.², Mališ J.¹, Sumerauer D.¹, Urbánková H.², Krsková L.³, Pýcha K.⁴, Schovanec J.⁵, Balcárková J.², Šmelhaus V.¹, Kodetová D.³, Starý J.¹

¹ Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

² Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc

³ Ústav patologické anatomie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha

⁴ Klinika dětské chirurgie 2. LF UK a FN Motol, Praha

⁵ Ortopedická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha

Souhrn

Východiska: V práci předkládáme cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření u pacientů s nádory kostí a měkkých tkání. **Soubor pacientů a metody:** Cytogeneticky a molekulárně cytogeneticky, technikami M-FISH a arrayCGH, jsme vyšetřili soubor 26 pacientů s diagnózou Ewingův sarkom/PNET, 15 pacientů s rabdomyosarkomem, 5 se synoviosarkomem a jednu pacientku s nediferencovaným sarkomem. **Výsledky:** U většiny pacientů jsme prokázali nenáhodné chromozomální strukturální a početní změny s významem pro stanovení diagnózy i pro odhad prognózy. U osmi pacientů s ES/PNET byla cytogeneticky prokázána pouze t(11;22)(q24;q12), dalších osm mělo vedle této změny sekundární aberace a šest pouze sekundární aberace. Vyšetřením pacientů s RMS jsme prokázali jednou t(1;13)(p36;q14) a čtyřikrát t(2;13)(q35;q14), typické pro alveolární, prognosticky nepříznivý podtyp, a početní změny charakterizující embryonální podtyp u pěti pacientů. U čtyř pacientů se synoviosarkomem byla přítomna diagnostická t(X;18)(p11.2;q11.2), u jednoho jako komplexní translokace t(X;18;21)(p11.2;q11.2;q11.2) v komplexním karyotypu společně s dalšími translokacemi t(2;5)(q24-32;p13-14) a t(12;20)(p11;q13). Vyšetření karyotypu nádorových buněk jsme korelovali s histopatologickým morfologickým vyšetřením a s klinickými údaji o průběhu onemocnění. Získané výsledky jsme porovnali se zahraničními literárními závěry. **Závěr:** Cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření je přínosné v diferenciální diagnostice nádorů kostí a měkkých tkání, zvláště u podtypů s méně diferencovanou morfologií, a mělo by tvořit integrální součást léčebné péče o pacienty s tímto onemocněním.

Klíčová slova

Ewingův sarkom/PNET – rabdomyosarkom – synoviosarkom – děti a mladiství – cytogenetika – arrayCGH – M-FISH – chromozomy

Práce byla podpořena grantem IGA MZ č. NR/9050-3.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Eva Stejskalová
Klinika dětské hematologie
a onkologie 2. LF UK a FN Motol
V úvalu 84
150 06 Praha 5 – Motol
e-mail: eva.stejskalova@lfmotol.cuni.cz

Obdrženo/Submitted: 6. 1. 2009

Přijato/Accepted: 13. 2. 2009

Summary

Backgrounds: We present the results of a cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of a series of patients with bone and soft tissue tumors. **Patients and methods:** We analyzed a cohort of 26 patients with Ewing sarcoma/PNET, 15 patients with rhabdomyosarcoma, 5 with synovial sarcoma and one patient with an undifferentiated sarcoma using the cytogenetic and molecular cytogenetic techniques M-FISH and arrayCGH. **Results:** We found nonrandom chromosomal structural and numerical changes with diagnostic and prognostic relevance in most patients. Eight patients with ES/PNET had only a t(11;22)(q24;q12), eight patients had secondary aberrations as well and six had only secondary aberrations. In the RMS patients we detected the t(1;13)(p36;q14) once and the t(2;13)(q35;q14) four times, both of them characteristic for the alveolar subtype with poor prognosis and numerical aberrations, characteristic for the embryonal subtype, in five patients. Four patients with synovial sarcoma had the diagnostic t(X;18)(p11.2;q11.2), one of them had a complex karyotype with a complex t(X;18;21) (p11.2;q11.2;q11.2) together with t(2;5)(q24-32;p13-14) and t(12;20)(p11;q13). We correlated the karyotype of cancer cells with histopathologic morphologic analysis, clinical outcome and foreign published results. **Conclusion:** Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis is a valuable diagnostic tool in bone and soft tissue tumors, especially in less differentiated subtypes, and as such it should be an integral part of curative care.

Key words

Ewing sarcoma/PNET – rhabdomyosarcoma – synovial sarcoma – children – adolescent – cytogenetics – arrayCGH – M-FISH – chromosomes

Úvod

Sarkomy měkkých tkání participují podle různých údajů ve spektru nádorů dětí 6–15 %. Nejčastějšími z nich jsou rhabdomyosarkom (RMS), nediferencovaný sarkom a synoviosarkom. Fibrosarkom, liposarkom a u dospělých vůbec nejčastěji diagnostikovaný zhoubný nádor měkkých tkání – maligní fibrózní histiocytom – jsou u dětí spíše výjimkou [1]. Diferenciální diagnostika může být i dnes, přes možnost využití moderních imunohistochemických technik, obtížná, zvláště u méně diferencovaných podtypů kulatobuněčných či vřetenobuněčných nádorů, díky jejich velmi podobnému histopatologickému obrazu. S výhodou lze v diferenciálně diagnostické rozvaze využít existenci charakteristických cytogenetických translokací, a to t(1;13)(p36;q14) a t(2;13)(q35;q14) u alveolárního, prognosticky nepříznivého RMS, vyskytující se až u 90 % pacientů a t(X;18)(p11.2;q11.2) u 90 % synoviosarkomů [2,3]. Na molekulární úrovni lze příslušnými technikami prokázat fúzní gen *PAX/FKHR* u RMS a *SYT/SSX* u synoviosarkomu [4,5,6].

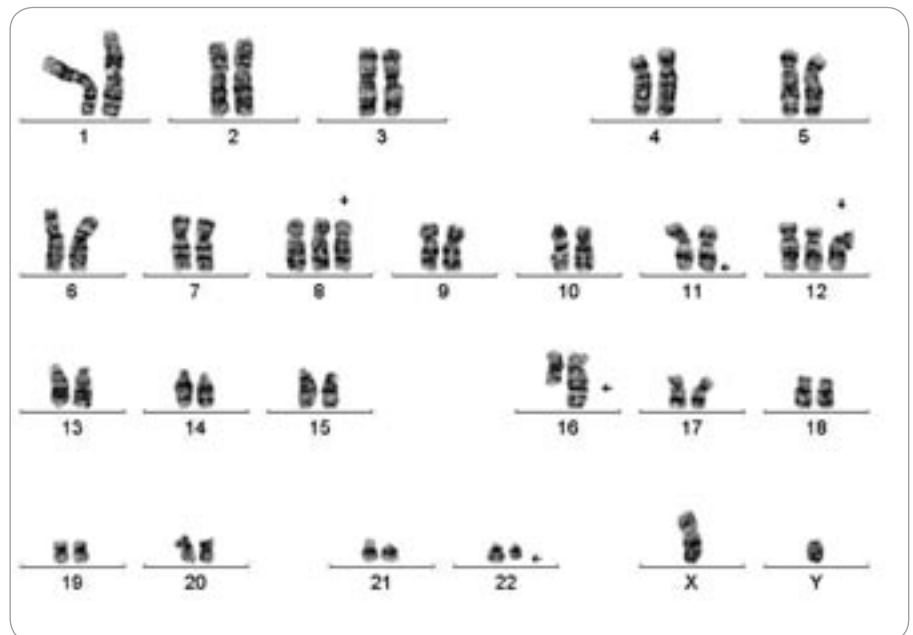
Nádory ze skupiny Ewingův sarkom/periferní neuroektodermální nádor (ES/PNET) tvoří 4,4 % všech nádorů dětského a adolescentního věku. ES/PNET postihuje převážně dlouhé a ploché kosti, avšak jeho mimokostní výskyt není výjimečný. Jedná se o systémové onemocnění, které se rychle šíří hematogenní cestou. Přibližně 25 % nemocných má již v době stanovení diagnózy metastázy. Zavedením multimodální léčby, kombi-

nující intenzivní chemoterapii s lokální léčbou (operace a radioterapie), se významně zlepšila prognóza pacientů [1].

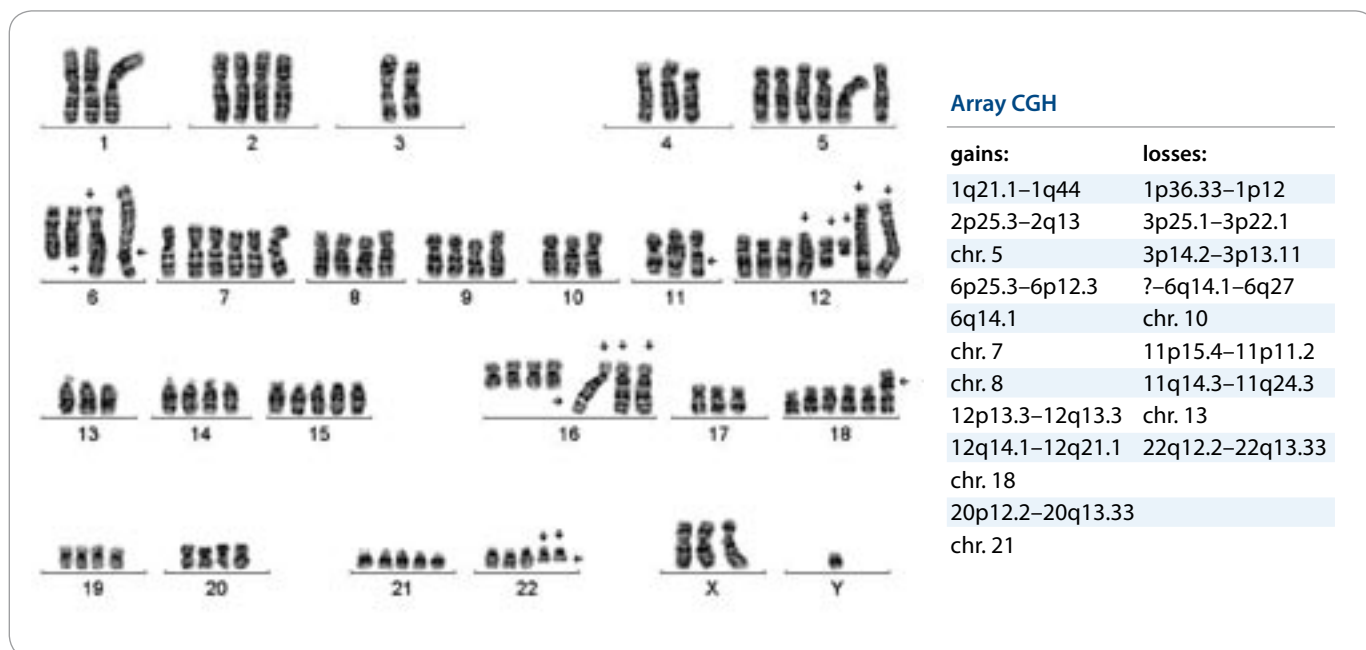
Morfologicky patří ES/PNET do skupiny nádorů z malých tmavých buněk. Tyto nádory představují 15 % dětských nádorů. V absolutních číslech to znamená ročně 15–20 nově diagnostikovaných nádorů tohoto typu u dětí a mladistvých. Nádory této skupiny mají velmi podobnou histologickou stavbu z malých buněk s chudou cytoplazmou a kulatým bazofilním jádrem. Jejich patologicko-anatomická

diagnostika je velmi obtížná, zhruba u jedné čtvrtiny pacientů není možné stanovit jednoznačnou diagnózu. Proto je výhodné využít k upřesnění diagnózy některých dnes již známých a specifických chromozomálních změn.

Ewingův sarkom (ES) byl po meningeomu prvním nádorem měkkých tkání s popsanou charakteristickou chromozomální změnou. U pacientů s ES/PNET lze cytogenetickým vyšetřením nádorových buněk nejčastěji prokázat patognomickou balancovanou translokaci mezi



Obr. 1. Pacient s ES/PNET lopaty kosti kyčelní a plicními metastázami, zemřel za 2 roky od stanovení diagnózy. Karyotyp s indikátory negativní prognózy: 48,XY,+8,t(11;22)(q24;q12),-16,der(16)t(1;16)(q21;q13),+12[6]/polyploidní mitózy. Cytogenetické vyšetření bylo upřesněno arrayCGH: arr cgh 1q21.2q44(RP11-326G21→GS-167K11)×3,8(167 BAC)×3,12(166 BAC)×3,16q12.1q24.3 (RP11-283C7→RP11-533D19)×1.



Obr. 2. Pacient s generalizovaným ES malé pánve, cytogenetické a arrayCGH vyšetření provedeno při 1. relapsu, nyní po 2. relapsu do plic, LU mediastina a dutiny břišní. Karyotyp s indikátory negativní prognózy: s mnohočetnými změnami, o modálním počtu 55–100, der(16)t(1;16)(q21;q13)x3.

chromozomy 11 a 22, se zlomovými místy v pruzích q24 a q12 – t(11;22)(q24;q12). Translokace se vyskytuje u 85–95% pacientů s tímto onemocněním. V důsledku této translokace se vytváří aktivní chimerický fúzní gen *EWS-FLI1*, jehož transkript lze jednoduše prokázat molekulárně genetickou metodou reverzní transkripce-polymerázové řetězové reakce (RT-PCR), která je dnes rutinně využívána pro stanovení diagnózy [7].

Translokaci t(11;22) lze prokázat jak u ES, tak u vzácnějšího Askinova malobuněčného nádoru torakopulmonální oblasti a periferních neuroepiteliomů, což dokládá jejich společný neuroektodermální původ. Vedle nejobvyklejší t(11;22) se vyskytují zhruba u 10% nemocných tzv. variantní translokace t(21;22), t(7;22) a t(16;22), které mají rovněž význam pro stanovení správné diagnózy [8]. Na chromozomu 22 je vždy zahrnuta oblast, ve které je lokalizován gen *EWS*, který fúzuje s geny *FLI 1*, *ERG* nebo *ETV 1* na chromozomech 11, 21 nebo 7. Změna v oblasti genu *EWS* je tedy s největší pravděpodobností primární [9].

U řady pacientů s ES/PNET lze prokázat další přídatné (sekundární) chromozomální změny, které jsou v současnosti předmětem intenzivního výzkumu. Názory na jejich klinický význam, přede-

vším pro odhad prognózy nemocných, nejsou totiž jednotné. Předpokládá se, že některé změny by mohly upozorňovat na onemocnění více rezistentní vůči terapii, s rizikem progresu či lokální recidivy. Mezi sledované sekundární změny patří del(1p),+8,+12 [10,11].

U další sekundární změny, nebalancované translokace der(16)t(1;16), se předpokládá negativní vliv na přežití pacientů s ES/PNET. Ve většině zveřejněných studií se uvádí, že se vyskytuje u pacientů s metastázami nebo s časným relapsem onemocnění [10,12]. Tato změna není vysloveně specifická pro Ewingův sarkom, relativně častá je u Wilmsova nádoru, retinoblastomu, nádorů mléčné žlázy či u mnohočetných myelomů. Byla dále prokázána jako sekundární změna u alveolárního rhabdomyosarkomu a extraskelárního myxoidního chondrosarkomu. Zlomová místa na příslušných chromozomech jsou variabilní [13,14]. S největší pravděpodobností představuje obecně platný specifický cytogenetický marker nádorové progresu [15]. Její odhalení v karyotypu nádorových buněk pacienta může přispět k volbě intenzivnější terapie. Rovněž polyploidie (zmnožení chromozomů sady) a komplexní karyotyp zřejmě představují indikátor ne-

gativní prognózy u ES/PNET [10]. V práci Kullendorf et al měli pacienti s nadbytečným 1q chromozomem a s celkovým počtem chromozomů nad 50 infaustní prognózu [15].

Molekulární studie prokázaly ztrátu heterozygoty (LOH) na 11p15.5, společnou pro několik dětských nádorů: RMS, Wilmsův tumor a hepatoblastom. Stejná změna hraje roli v etiologii Beckwith-Wiedemannova syndromu, s nímž se tyto nádory často sdružují, a proto se předpokládá jejich společná genetická vývojová cesta [16].

Cílem naší práce bylo prezentovat výsledky cytogenetického a molekulárně cytogenetického vyšetření u souboru 47 pacientů s diagnostikovanými nádory kostí a měkkých tkání.

Pacienti a metody

Náš soubor tvoří 26 pacientů s ES/PNET, 15 pacientů s RMS, 5 pacientů se synoviosarkomem a jedna pacientka s nediferencovaným sarkomem. U většiny z nich jsme prokázali změny v karyotypu jejich nádorových buněk.

Pacienti byli léčeni dle léčebných protokolů platných v době trvání jejich onemocnění.

Materiál pro cytogenetické vyšetření, odebraný za přísně sterilních podmínek,

byl získán při diagnostických operacích a vyšetřeni paralelně s histopatologickým vyšetřením. Menší část vzorků pochází

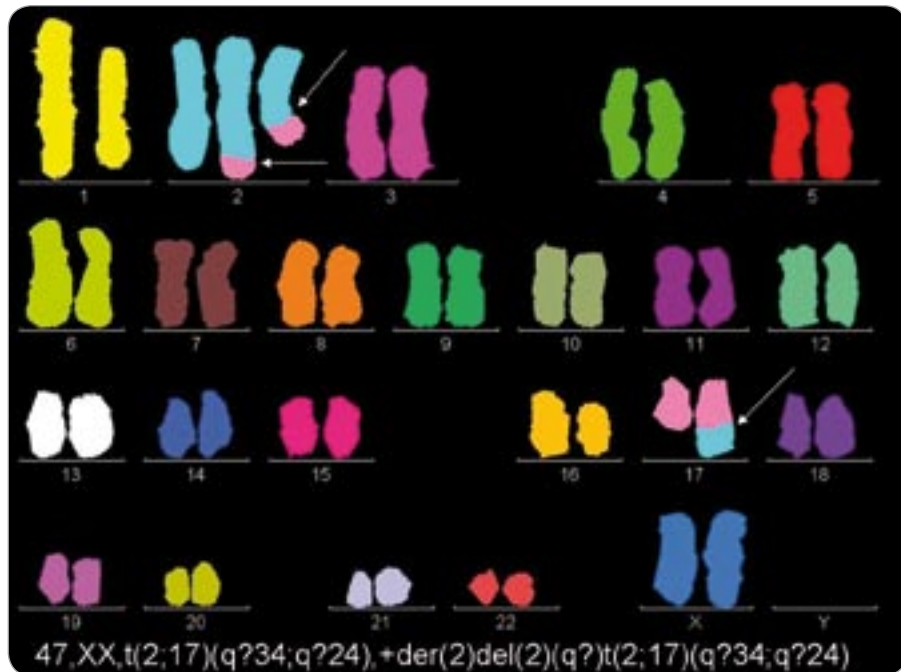
z biopsií při relapsu, tedy již po léčbě. Základem úspěšnosti je čerstvá nádorová tkáň s živými nádorovými buňkami. Tech-

niky in vitro kultivace se řídí typem nádoru, pracovní diagnózou, lokalizací odebrané tkáně. Zpracování suspenze nádorových buněk je provedeno dle standardně v literatuře popsaných technik [17,18]. Vyšetření je v případech potřeby a při dostatku materiálu i mitózy doplněno fluorescenčními technikami FISH, M-FISH a arrayCGH. Výsledky všech metod byly hodnoceny podle kritérií ISCN 2005 [19]. Studie byla schválena etickou komisí FN Motol.

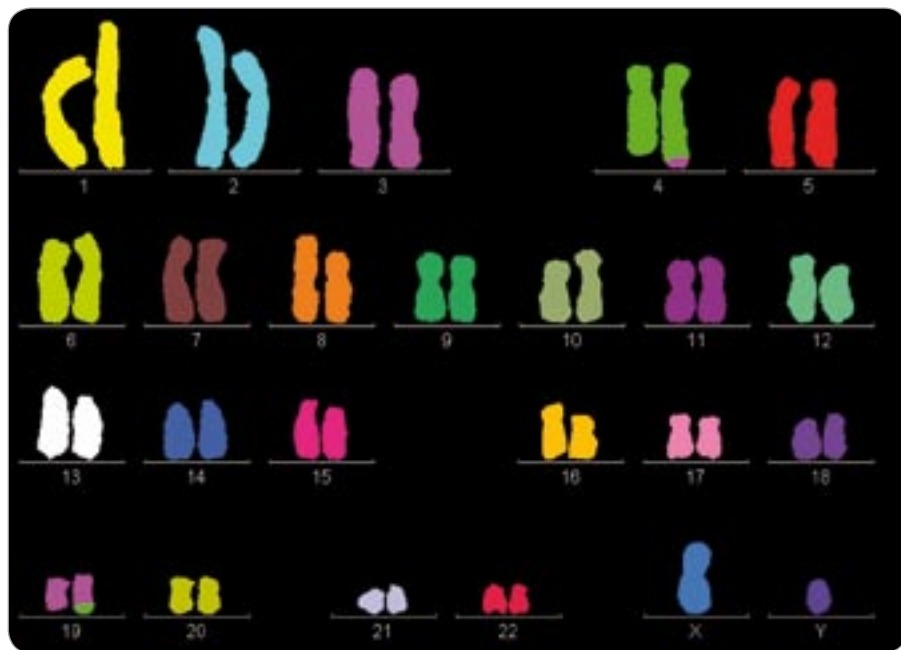
Výsledky

U osmi pacientů s ES/PNET byla cytogeneticky prokázána pouze $t(11;22)(q24;q12)$, dalších osm mělo vedle této změny sekundární aberace a dalších šest mělo pouze sekundární změny. Nález nebalancované $der(16)t(1;16)$, trizomie 12 a komplexní karyotyp se zmnožením chromozomální sady byl spojen s velmi nepříznivým průběhem onemocnění, časným relapsem a úmrtím. Trizomie 8 se vyskytla u čtyř pacientů s příznivým průběhem onemocnění a u tří pacientů s metastatickým postižením již při diagnóze a nepříznivým průběhem. U jednoho pacienta byla prokázána místo typické $t(11;22)$ nenáhodná $t(4;19)(q35;q?13.1-2)$. U pacientky s nediferencovaným sarkomem a konstituční aberací 14. chromozomu, s mentálním postižením, byly v karyotypu prokázány dva klony, jeden s typickou trizomií 8 a druhý s dosud nepublikovanou $t(2;17)(q?34;q?24)$. ArrayCGH vyšetření u pacienta s generalizovaným extraskeletárním ES malé pánve, z materiálu z prvního plicního relapsu, významně zpřesnilo cytogenetické změny včetně exaktních zlomových míst u karyotypu s mnohočetnými aberacemi (obr. 2). U dalšího pacienta s recidivujícím ES/PNET kosti křížové, s plicními metastázami, arrayCGH vyšetření rovněž zpřesnilo cytogenetický karyotyp s indikátory negativní prognózy (obr. 1). Výsledky cytogenetického a arrayCGH vyšetření uvádíme v tab. 1 v korelaci s klinickými údaji. ArrayCGH vyšetření bylo možné provést jen při dostatku materiálu.

Vyšetřením pacientů s RMS jsme prokázali jednu $t(1;13)(p36;q14)$ a čtyřikrát $t(2;13)(q35;q14)$, typické pro alveolární, prognosticky nepříznivý podtyp. U dvou pacientek s $t(2;13)$ byl druhý partner translokace, derivovaný chromozom 13, zduplikován. Obě pacientky zemřely na



Obr. 3. M-FISH. Pacientka s nediferencovaným sarkomem a konstituční aberací 14. chromozomu, s mentálním postižením. V karyotypu nádorových buněk byly prokázány dva klony, jeden s typickým nadbytečným chromozomem 8 a druhý s dosud nepublikovanou $t(2;17)(q?34;q?24)$.



Obr. 4. M-FISH. 46,XY, $t(4;19)(q35;q?13.1-2)$ [7]. Pacient s nediferencovaným embryonálním sarkomem a plicními metastázami zemřel na progresi onemocnění v plicích a kostech 10 měsíců od stanovení diagnózy. Dosud byly v literatuře popsány pouze čtyři primitivní kulatobuněčné sarkomy s $t(4;19)$, která je tím považována za nenáhodnou rekurentní translokaci u primitivních mezenchymálních nádorů.

Tab. 1. Charakteristika studovaných pacientů s ES/PNET.

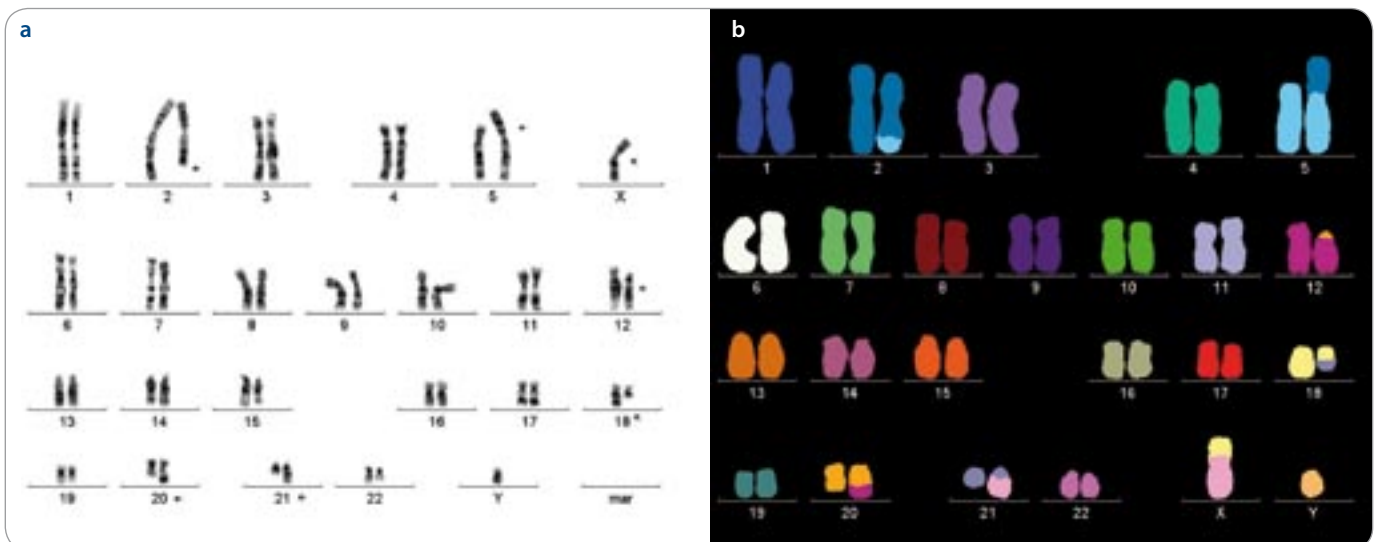
Pacient číslo	Pohlaví/věk (roky)	Rozsah onemocnění	Lokalizace	Cytogenetika/arrayCGH/PCR/karyotyp/parciální karyotyp	Stav onemocnění
1	M/2	lokalizovaný proces	tělo obratle L4	t(11;22)	CR
2	Ž/7	lokalizovaný proces	lopatka	+2,+8,+12,+21 bez t(11;22) i s RT-PCR	CR
3	Ž/13	lokalizovaný proces	lopatka kosti kyčelní	t(11;22),+8	CR
4	Ž/12	lokalizovaný proces	hrudní stěna s postižením axilárních uzlin	+5,+5,+6,-9,+20,+21, -22,+2×M bez t(11;22) i s RT-PCR	CR
5	Ž/14	lokalizovaný proces	lopatka kosti kyčelní	t(11;22)	DP a časný exitus atypická forma venookluzivní choroby jater
6	M/15	generalizovaný proces (plíce, skelet)	stydka kost	t(11;22),+12	DP a exitus za 2 roky od dg.
7	Ž/10	lokalizovaný proces	ledvina	t(11;22),del(5p)	zemřela na komplikace léčby
8	M/22	generalizovaný proces (plíce)	lopatka	der(16)t(1;16)×2 RT PCR: t(21;22)	DP a exitus za rok od dg.
9	M/18	lokalizovaný proces	femur	t(11;22)	CR
10	M/15	lokalizovaný proces	10. žebro	t(11;22),+2,+8	CR
11	Ž/10	generalizovaný proces (kostní dřev, skelet)	4. žebro	t(11;22) aCGH: neúspěšná	DP a exitus za rok od stanovení dg.
12	M/21	generalizovaný proces (plíce)	7. žebro	t(11;22),+8,+21	DP a exitus 2 roky od stanovení dg.
13	M/6	lokalizovaný proces	LS páteř	t(11;22)	CR
14	M/17	generalizovaný proces (plíce)	femur	51~56,XY,del(5p), +8,+12,+12, der(16)t(1;16) , +20,+21,+21, +del(22q),+M×2 bez t(11;22) i s RT-PCR	exitus za rok od dg.
15	Ž/3	lokalizovaný proces	1. žebro	46,XX aCGH: gain 5, 8	CR
16	M/18	generalizovaný proces (skelet)	malá pánev extraskeletární	mnohočetné aberace, přesněji aCGH – viz legenda k obr. 2	DP, žije v 3. CR
17	Ž/3	lokalizovaný proces	extraoseální – stehenní svalstvo	t(11;22) aCGH: normální profil	DP – plíce (za 12 let!) po ukončení léčby, žije v 2. CR
18	M/14	generalizovaný proces (plíce)	extraoseální – stehenní svalstvo	mnohočetné aberace	exitus za rok od dg.
19	Ž/12	lokalizovaný proces	10. žebro	t(11;22),del(22q)	CR
20	M/15	generalizovaný proces (plíce)	lopatka kosti kyčelní	t(11;22), der(16)t(1;16) , +8,+12 aCGH: zápis viz obr. 1	DP a exitus za 2 roky od stanovení dg.
21	Ž/2	lokalizovaný proces	hrudní stěna	46,XX aCGH: loss22q11.22–22q12.2 bez t(11;22) i s RT-PCR	CR
22	M/15	generalizovaný proces (plíce)	8. žebro	t(11;22)	CR



Pokračování tab. 1.

Pacient číslo	Pohlaví/věk (roky)	Rozsah onemocnění	Lokalizace	Cytogenetika/arrayCGH/PCR/karyotyp/parciální karyotyp	Stav onemocnění
23	M/14	generalizovaný proces (plíce, skelet)	lopata kosti kyčelní	t(11;22)	CR
24	M/17	generalizovaný proces (plíce)	perineum	t(4;19)(q32;q13.2)	DP a exitus za rok po stanovení dg.
25	M/3	lokalizovaný proces	LS páteř s propagací do páteřního kanálu	46,XY	CR
26	Ž/19	generalizovaný proces (plíce)	extraoseální – stehenní svalstvo	t(11;22),+7	léčena, t.č. dobrá dopověď

M – mužské pohlaví, Ž – ženské pohlaví, CR – kompletní remise, DP – progresse onemocnění, dg – diagnóza



Obr. 5a. Pacient se synoviosarkomem a komplexním karyotypem s t(2;5)(q24–32;p13–14),t(12;20)(p11;q13),t(X;18;21)(p11.2;q11.2;q11.2)[20]. Obr. 5b. M-FISH od téhož pacienta.

progresi základního onemocnění. U další pacientky s alveolárním RMS byla místo translokace přítomna rovněž typická změna add(17)(q25). Početní změny charakterizující embryonální podtyp, s modálním počtem 51~60 chromozomů, mělo pět pacientů.

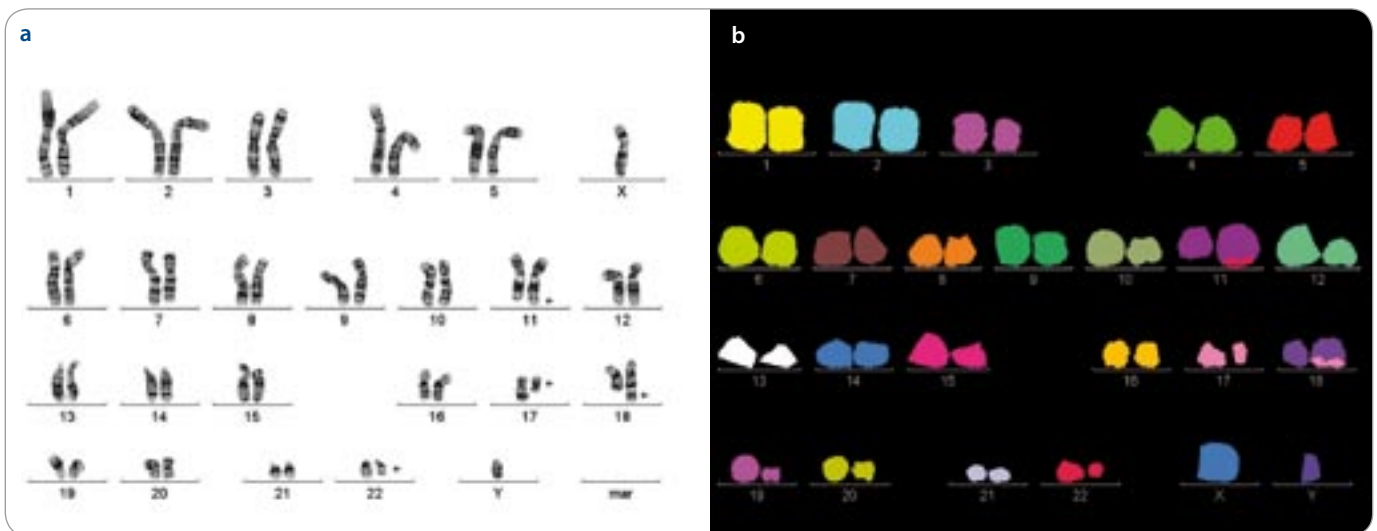
U 4 pacientů se synoviosarkomem byla přítomna diagnostická t(X;18)(p11.2;q11.2), u jednoho jako komplexní translokace t(X;18;21)(p11.2;q11.2;q11.2) v komplexním karyotypu společně s dalšími translokacemi t(2;5)(q24–32;p13–14) a t(12;20)(p11;q13). Komplexní karyotyp i translokace byly potvrzeny M-FISH technikou (obr. 5b). U pátého pacienta byla cytogeneticky odhalena t(11;22)(q24;q12)

spolu s t(17;18)(q21.2;q22.3–23). Následně byl nález t(11;22) potvrzen RT-PCR technikou.

Diskuze

Optimální léčba pacientů s nádory měkkých tkání a kostí úzce souvisí s přesnou diagnostikou. Diferenciální diagnostika, s použitím standardních morfologických vyšetření, může být i dnes obtížná, a to jak pro patologa, tak pro klinického lékaře. Cytogenetickým vyšetřením těchto nádorů byly objeveny nenáhodné a v některých případech specifické, tedy diagnosticky využitelné, chromozomální translokace s odpovídající změnou na molekulární úrovni, většinou v podobě fúzního genu.

Molekulární techniky PCR umožňují prokázat fúzní gen i v případě nedostupnosti vitální tkáně pro cytogenetické vyšetření či v případě neúspěšnosti cytogenetiky, proto jsou často využívány pro potvrzení klinické a histopatologické diagnostiky. Když byla počátkem 80. let popsána mezi prvními t(11;22)(q24;q12), vyskytující se až u 95% nádorů ze skupiny Ewingova sarkomu/PNET, byla považována za dostatečně specifickou. Průkaz této translokace či jejich variantních forem některou z dostupných technik umožňoval jednoznačně zařadit nádor a potvrdit diagnózu. Novější výzkumy překvapivě ukázaly značnou promiskuitu *EWS* genu, který je schopen vstupovat do přestaveb



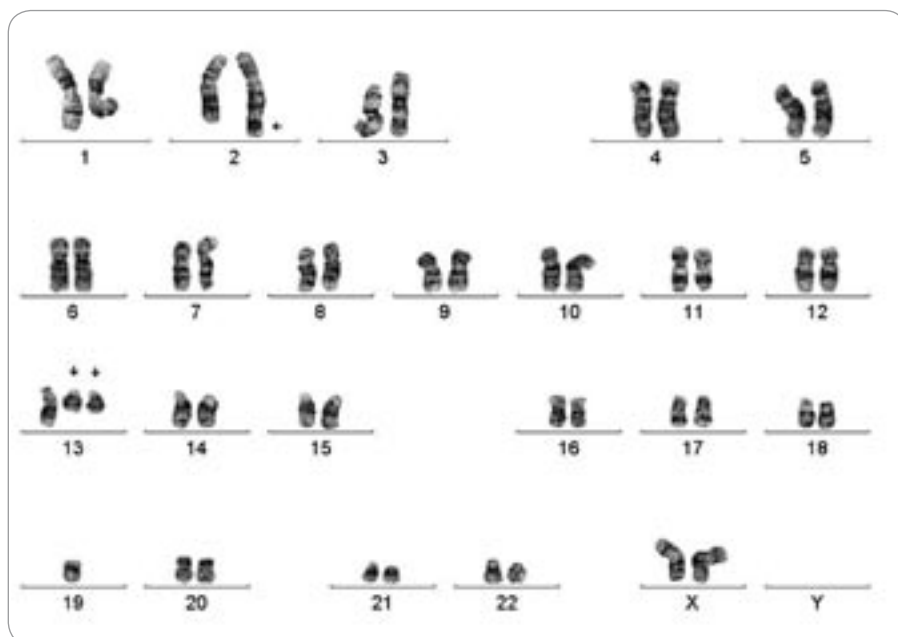
Obr. 6a. 46,XY,t(11;22)(q24;q12),t(17;18)(q21.2;q22.3-23) [4]. Pacient s monofázickým synoviosarkomem dlaně pravé ruky, bez generalizace a s t(11;22), typickou pro Ewingův sarkom. Translokace (11;22) s fúzí genů *EWS/FLI1* byla následně potvrzena RT-PCR technikou. Bez cytogenetického vyšetření by nebyla odhalena. M-FISH ani PCR technikou se nepodařilo prokázat t(X;18) či fúzní gen *SYT-SSX*, typický pro synoviosarkom. Pacient byl léčen s přihlédnutím k t(11;22) a nyní je v klinické remisi 4 roky od stanovení diagnózy. Obr. 6b. M-FISH od téhož pacienta.

i s dalšími geny, nejen ve skupině nádorů Ewingova sarkomu, ale i u dalších nádorů, jako je myxoidní chondrosarkom, rabdomyosarkom, neuroblastom, a dokonce i u akutní myeloidní leukemie (AML). *EWS/FLI1* fúzní gen exprimují bifenotypické sarkomy, s morfologií typickou jak pro myogenní, tak pro neurální diferenciaci a polyfenotypické sarkomy [20,21].

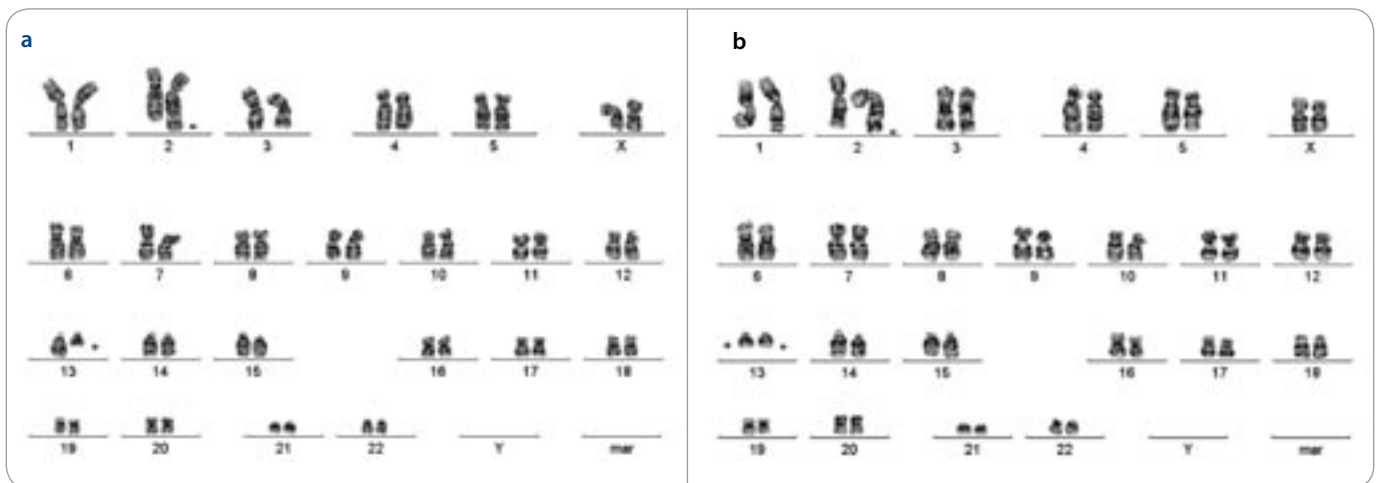
Předpokládá se, že ačkoli *EWS/FLI1* přestavba je nejspíš transformující událostí, fenotypické vyjádření této transformace může být různorodé v závislosti na faktorech buněčného prostředí. Použití pouze molekulárně diagnostických technik založených na průkazu specifických přestaveb se jeví jako nedostatečně spolehlivé [22]. Samozřejmostí by měla být vzá-

jemná korelace všech dostupných technik s histopatologií a klinikou.

V našem souboru pacientů je z tohoto hlediska zajímavý pacient, u něhož se, vzhledem k pracovní diagnóze synoviosarkomu, původně po t(11;22) nepátralo. Rutinně prováděné cytogenetické vyšetření odhalilo tuto pro synoviosarkom zcela neobvyklou t(11;22). Byla následně potvrzena i RT-PCR technikou, naopak t(X;18), typická pro synoviosarkom, nebyla prokázána ani na molekulární úrovni. Tyto vzájemně se doplňující nálezy pak byly argumentem pro chemoterapeutický postup podávaný obvykle u nádorů skupiny ES/PNET. Dalším zajímavým pacientem je pacient s nediferencovaným, blíže nezařaditelným embryonálním sarkomem, původně vyšetřovaným jako Ewingův nediferencovaný extraoseální sarkom. Translokace t(11;22) nebyla prokázána ani na molekulární úrovni, místo ní je pacient nositelem t(4;19)(q35;q13.1-2), již dříve popsané u primitivních mezenchymálních nádorů [23] a u agresivního primitivního neuroektodermálního ES/PNET [24].



Obr. 7. Translokace t(2;13)(q35;q14) je diagnostická pro alveolární RMS, vyskytuje se s frekvencí 70–90% u tohoto nádoru a je známkou horší prognózy. Zde je druhý partner translokace, derivovaný chromozom 13, zduplikován.



Obr. 8a a 8b. U této pacientky s RMS a $t(2;13)(q35;q14)$ lze pozorovat klonální vývoj, u převládajícího klonu je opět druhý partner translokace, derivovaný chromozom 13, zduplikován.

těchto změn pro prognózu. Pro sledování některých četnějších změn lze vedle klasické cytogenetiky využít i interfázickou FISH techniku, případně mnohobarevnou FISH techniku, pokud je dostatečné množství mitóz. Posledně jmenovaná technika je užitečná pro odhalení nových kryptických translokací, které nemusí být klasickou cytogenetikou zjištělné. Naopak zcela nevhodné je vyšetření pouze molekulárními technikami PCR, které jsou založené na záchytu některé z již známých translokací a jejich fúzních produktů. V současnosti se sledují sekundární změny delece (1p), trizomie chromozomů 8 a 12 a nebalancovaná $der(16)t(1;16)$. Původně se předpokládalo, že všechny tyto změny představují marker proliferace buněk, některé novější studie [10] spojují trizomii 8 naopak s příznivějším průběhem onemocnění, což se ukázalo i v našem souboru. Čtyři z našich pacientů s trizomií 8 žijí v kompletní remisi onemocnění. Další tři však zemřeli. Dva z nich měli v karyotypu kromě +8 indikátory negativní prognózy +12 a $der(16)t(1;16)$. Trizomie 12 bývá spojena s komplexně změněným karyotypem a v současnosti se považuje za indikátor negativní prognózy hlavně u pacientů s lokalizovaným onemocněním [12]. Všichni tři pacienti měli metastatické postižení již v době stanovení diagnózy.

Závěr

Naše zkušenosti, získané v průběhu deseti let působení v onkocytogenetické

laboratoři Kliniky dětské hematologie a onkologie FN Motol, potvrzují závěry vyslovené v zahraniční literatuře o smysluplnosti cytogenetického vyšetření u dětí a mladistvých s nádory kostí a měkkých tkání. Vyšetření by mělo tvořit integrální součást komplexní péče o pacienty s tímto nádorovým onemocněním, neboť může poskytnout informaci s již dnes uznávanou diagnostickou hodnotou. Zároveň pomáhá odhalit další chromozomální změny, jejichž význam pro prognózu se předpokládá a nejspíše bude v nedaleké budoucnosti na větších souborech ověřen. Z tohoto hlediska je přínosná účast v nadnárodních multicentrických studiích typu Euro-Ewing 99 či RMS-2005.

Základem úspěšnosti jakéhokoliv cytogenetického vyšetření je čerstvá nádorová tkáň s živými nádorovými buňkami. Tkáň nesmí být uchována dosud běžně zavedenou technikou fixace ve formolu, a dokonce nesmí být ani zamrazena (což nevede při použití molekulárně genetických technik). Dále musí být odebrána se zachováním podmínek přísné sterility a uložena nejlépe do speciálního cytogenetického transportního růstového média. Do cytogenetické laboratoře by měla být dopravena co nejdříve, nejpozději do 24 hodin po odběru.

Máme-li zájem, aby se výhody diagnostického vyšetření karyotypu nádorových buněk staly dostupnými pro všechny děti a mladistvé s nádory měkkých tkání a kostí, je nezbytná účinná spolupráce

mezi pediatry, operujícími chirurgy, patology, cytogenetiky a molekulárními genetiky. Všichni jmenovaní by měli být seznámeni s úrovní současných znalostí v nádorové biologii. Jedině tak mohou mít určitou představu o smysluplnosti zachování nádorové tkáně, odebrané při operačním výkonu, pro další vyšetření, kromě nezbytného vyšetření histopatologického.

Pokud se v histologicky málo diferencovaném či nediferencovaném nádoru podaří odhalit některou z diagnosticky uznávaných cytogenetických translokací či jiných specifických změn, mohou tyto změny podpořit ne zcela jednoznačnou histologickou diagnózu či být podnětem k event. přehodnocení diagnózy. Navíc jsou cytogeneticky prokázány změny předstupně cílenějších vyšetření v oblasti zlomových míst, s následným sekvenováním kandidátních genů, což otevírá nové možnosti pro mnohem citlivější diagnostiku molekulárně genetickými technikami i pro sledování minimální zbytkové choroby a volbu cílené terapie. Proto se předpokládá, že nádorová cytogenetika bude hrát stále důležitější roli v léčebné strategii solidních nádorů.

Poděkování

Autoři děkují laborantkám D. Honsové, I. Lakomé, H. Mendlové a J. Šulcové za vynikající technickou asistenci.

Literatura

1. Kouček J a kol. Nádorová onemocnění dětí a mladistvých. Praha: Karolinum 1997.

2. Lazar A, Abruzzo LV, Pollock RE et al. Molecular diagnosis of sarcomas: chromosomal translocations in sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1199–11207.
3. Sandberg AA. Cytogenetics and molecular genetics of bone and soft-tissue tumors. *Am J Med Genet* 2002; 115: 189–193.
4. Slater O, Shipley J. Clinical relevance of molecular genetics to paediatric sarcomas. *J Clin Pathol* 2007; 60: 1187–1194.
5. Antonescu CR. The role of genetic testing in soft tissue sarcoma. *Histopathology* 2006; 48: 13–21.
6. Miettinen M. From morphological to molecular diagnosis of soft tissue tumors. *Adv Exp Med Biol* 2006; 587: 99–113.
7. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors-Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 123(1): 1–26.
8. Zhao L, Hayes K, Van Fleet T et al. Detection of a novel reciprocal t(16;22)(q11.2;q12) in a Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 140: 55–57.
9. de Alava E. Molecular pathology in sarcomas. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 130–144.
10. Zielenska M, Zhang MZ, Kwan N et al. Acquisition of secondary structural chromosomal changes in pediatric Ewing sarcoma is a probable prognostic factor for tumor response and clinical outcome. *Cancer* 2001; 91: 2156–2164.
11. Hattinger CM, Rumpler S, Strehl S et al. Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors. *Genes Chromosom Cancer* 1999; 24: 243–254.
12. Hattinger CM, Potschger U, Tarkkanen M et al. Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing tumours. *Br J Cancer* 2002; 86: 1763–1769.
13. McManus AP, Min T, Swansbury GJ et al. Der(16)t(1;16)(q21;q13) as a secondary change in alveolar rhabdomyosarcoma. A case report and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 87: 179–181.
14. Day SJ, Nelson M, Rosenthal H et al. Der(16)t(1;16)(q21;q13) as a secondary structural aberration in yet a third sarcoma, extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20: 425–427.
15. Kullendorff CM, Mertens F, Donner M et al. Cytogenetic aberrations in Ewing sarcoma: are secondary changes associated with clinical outcome? *Med Pediatr Oncol* 1999; 32: 79–83.
16. Steenman M, Westerveld A, Mannens M. Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 1–13.
17. ACT cytogenetics laboratory manual. In: Barch MJ (ed). ACT cytogenetics laboratory manual. 2nd ed. New York: Raven Press 1991.
18. Stejskalová E, Jarošová M, Kabíčková E et al. Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma with a der(14)t(8;14)(q24;q32) and a translocation of MYC to the derivative chromosome 14 with a deleted IgH locus. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 170: 158–162.
19. Shaffer LG, Tommerup N (eds). ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: S. Karger 2005.
20. Rosoff PM, Hatcher S, West DC. Biphenotypic sarcoma with characteristics of both a Ewing sarcoma and a desmoplastic small round cell tumor. *Med Pediatr Oncol* 2000; 34: 407–412.
21. Sorensen PHB, Shimada H, Liu XF et al. Biphenotypic sarcomas with myogenic and neural differentiation express the Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Cancer Res* 1995; 55: 1385–1392.
22. Thorner P, Squire J, Chilton-MacNeil S et al. Is the EWS/FLI-1 fusion transcript specific for Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor? A report of four cases showing this transcript in a wider range of tumor types. *Am J Pathol* 1996; 148: 1125–1138.
23. Richkind KE, Romansky SG and Finklestein JZ. t(4;19)(q35;q13.1): A recurrent change in primitive mesenchymal tumors? *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 87: 71–74.
24. Somers GR, Shago M, Zielenska M et al. Primary subcutaneous primitive neuroectodermal tumor with aggressive behavior and an unusual karyotype: case report. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7: 538–545.