

CITOGENETSKE KARAKTERISTIKE LIMFOMA

RUŽICA LASAN TRČIĆ¹, IKA KARDUM-SKELIN², JOSIP KONJA³, LJUBICA RAJIĆ³, ERNEST BILIĆ³, RANKA FEMENIĆ³, MAJA PAVLOVIĆ³, BERNARDA LOZIĆ⁴, SRĐANA ČULIĆ⁴, BILJANA JELIĆ-PUŠKARIĆ², DAVOR BEGOVIĆ¹

U zadnjih nekoliko desetljeća naučili smo da su kromosomske abnormalnosti specifično povezane s pojedinim subtipovima leukemija, limfoma i sarkoma. Prema učestalosti javljanja na trećem mjestu dječjih tumorskih bolesti su zloćudni limfomi. Karakteriziraju ih genetske promjene koje se u većini slučajeva mogu otkriti citogenetskim metodama. Citogenetska ispitivanja na velikim serijama limfoma ukazuju da klonski poremećaji nisu slučajno raspoređeni duž genoma, te su česti tumor specifični klonski poremećaji. Patogenetski je najvažnije identificirati primarne klonske poremećaje koji su najčešće pojedinačni. Detaljna karakterizacija kromosomskih abnormalnosti pribavila je temelj za klasifikaciju bolesti i definiranje prognoze. Genske karakteristike limfoma istražuju se molekularnom genetikom, konvencionalnom tehnikom G-oprugavanja kromosoma i molekularnom citogenetikom tehnikom fluorescentne in situ hibridizacije na razini jezgre i/ili mitoze.

Deskriptori: MALIGNI LIMFOMI, NON-HODGKIN LIMFOM, HODGKIN LIMFOM, CITOGENETIKA LIMFOMA

Klasifikacije malignih limfoma još od prvog objavljenog rada Thomasa Hodgkina 1832. godine do danas bile su brojne i ne baš precizne. Današnja klasifikacija prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji 2008. godine (Engl. World Health Organization, WHO) uključuje 27 različitih tipova Non-Hodgkin limfoma (NHL) i tri tipa Hodgkin limfoma (HL), ne uključujući subtipove i subkategorije (Tablica 1) (1). Klasifikacija je temeljena na morfološkim, imunološkim odlikama, te kliničkom fenotipu na određenom stupnju razvoja tumorogeneze uz uključivanje osjetljivosti na terapiju i preživljavanje. Non-Hodgkin limfomi su grupa klinički važnih neoplazmi s komplek-

snom biologijom čime je otežana njihova klasifikacija i tretman. NHL rezultira transformacijom B i T/natural killer (NK) stanica. Njihova glavna oznaka su kromosomske translokacije koje nastaju aberantnim rearanžmanom imunoglobulinskog (IG) gena i T-staničnog receptorskog gena (TRC), što dovodi do nepravilne ekspresije gena na recipročnim mjestima loma koji reguliraju različite stanične funkcije uključujući transkripciju gena, stanični ciklus, apoptozu i tumorsku progresiju. NHL proizašli iz preinake B i T limfoidne loze u difrenencijaciji, prezentirani su kompleksnim histološkim i imunološkim fenotipom. U grupi NHL, B-stanični zauzimaju više od 70%, dok T/NK stanični limfomi čine ostatak. Dva su puta odgovorna u inicijaciji progresa neregulatorne proliferacije limfoidnih stanica pri čemu se isključuje odnosno ukida normalna regulacija ekspresije protoonkogeni ili se gubi ekspresija tumor-supresor gena. Genetski mehanizmi u limfomima koji vode u takvu abnormalnu funkciju gena uključuju kromosomske translokacije, amplifikaciju gena, somatsku mutaciju i gensku deleciju. Iako je epidemiologija razvoja limfoma nejasna, u rizične faktore za neke tipove limfoma uključuju

se kronične infekcije, imunosupresija i obiteljsko opterećenje (2). Usprkos ubrzanoj sistematizaciji i raščlanjivanju faktora uključenih u limfomogenezu, NHL su još daleko od rasvjetljavanja njihove kompleksne biologije, morfološke i kliničke različitosti te bolesti. Sada je poznato kako su određene kromosomske abnormalnosti povezane s dobrim, dok druge s lošim ishodom. Mnogi protokoli liječenja temelje se na određenim rezultatima citogenetske ili molekularne analize.

Maligni limfomi u djece prisutni su s udjelom od 13% u malignim bolestima. U kliničkoj studiji Poirela i sur. 2008. NHL u djece i adolescenata najzastupljenija je grupa Burkitt limfoma 76%, 8% Burkitt-like limfoma i 13% difuznih B-veliko staničnih limfoma, nešto rjeđe Hodgkin limfom (HL) oko 6% (3).

Citogenetika s molekularnom analizom omogućuje novi uvid u limfome, tumorogenezu i staničnu biologiju za što je potreban svježi punkt limfnog čvora tankom iglom (Engl. Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC), pleuralni izljev i/ili aspirat koštane srži, kratkotrajnim kultiviranjem (4). Citogenetski rezultati su opisani prema Internacionalnom

Tablica 1.

Klasifikacija NHL prema WHO 2008, prema Elaine S. Jaffe

WHO 2008: the mature B-cell neoplasms.
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
<i>Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma*</i>
<i>Hairy cell leukemia-variant*</i>
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Heavy chain diseases
Alpha heavy chain disease
Gamma heavy chain disease
Mu heavy chain disease
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extracerebral plasmacytoma
Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone B-cell lymphoma (MZL)
<i>Pediatric type nodal MZL</i>
Follicular lymphoma
<i>Pediatric type follicular lymphoma</i>
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), not otherwise specified
T cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma
<i>DLBCL associated with chronic inflammation</i>
<i>Epstein-Barr virus (EBV)+ DLBCL of the elderly</i>
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
<i>Primary cutaneous DLBCL, leg type</i>
ALK+ large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Primary effusion lymphoma
<i>Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castlemans disease</i>
Burkitt lymphoma
<i>B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma</i>
<i>B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma</i>
Hodgkin Lymphoma
Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma
Classical Hodgkin lymphoma
Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
<i>Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma</i>
WHO 2008: the mature T-cell and NK-cell neoplasms.
T-cell prolymphocytic leukemia
T-cell large granular lymphocytic leukemia
Chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells*
Aggressive NK cell leukemia
<i>Systemic EBV+ T-cell lymphoproliferative disease of childhood (associated with chronic active EBV infection)</i>
<i>Hydroa vacciniforme-like lymphoma</i>
Adult T-cell leukemia/lymphoma
Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type
Enteropathy-associated T-cell lymphoma
Hepatosplenic T-cell lymphoma
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Mycosis fungoides
Sézary syndrome
Primary cutaneous CD30+ T-cell lymphoproliferative disorder
Lymphomatoid papulosis
Primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma
<i>Primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8+ cytotoxic T-cell lymphoma*</i>
<i>Primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma</i>
<i>Primary cutaneous small/medium CD4+ T-cell lymphoma*</i>
Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ALK+
<i>Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ALK-</i>
*Italik slova označavaju novo uključene neoplazme

sistemu citogenetske nomenklature za humane kromosome (engl. An international system for human cytogenetic nomenclature ISCN 2009) (5). Zbog kompleksnosti izrade metafaznih preparata, FISH na biopsiji limfnog čvora smatra se "zlatnim standardom" pri uspostavljanju dijagnoze (6).

Kromosomske i genetske amplifikacije i genske delecije prepoznate su kao učestale genetske promjene koje igraju važnu ulogu u progresiji limfoma i kliničkog ponašanja. Pristup analizi biološke kompleksnosti uključuje konvencionalnu citogenetiku s G-opruganim kromosomima i molekularnu citogenetiku (FISH i tehniku komparativne genomске hibridizacije na mikrostroju (array CGH)). Citogenetska analiza uz molekularnu doprinosi identifikaciji i analizi funkcije gena, deregulatornoj inaktivaciji ili overekspresiji tumora (7).

Ponavljajuće kromosomske abnormalnosti karakteriziraju Non-Hodgkin limfome.

Kromosomske abnormalnosti stečene kasnije tijekom života karakteristika su humanih malignih bolesti. Često je samo jedan kariotipski događaj prisutan u stanici i ta se promjena smatra primarnom i specifičnom (8). Sekundarne kromosomske abnormalnosti smatraju se one koje nastaju u kasnijim fazama bolesti pa se čini jasnim da i pored svoje postojanosti ne utječu na nastanak tumora; one se nakupljaju istodobno sa širenjem tumora i razvitkom njegove otpornosti na lijekove (9). Identifikacija kromosomskih abnormalnosti važna je nit u lokalizaciji mjesta loma na kromosomu posebice u translokacijama, te vodi identifikaciji gena koji igraju kritičnu ulogu u transformaciji normalnih stanica u maligne. Molekularna genetika klonirala je translokacijska mjesta loma i mjesta loma u inverzijama te okarakterizirala mnoge gene uključene u te rearanžmane (10).

Translokacije kromosoma u koje su uključeni IG i TCR geni uz mnoge druge, glavna su oznaka limfoidnih neoplazmi. Te translokacije smatraju se greškom fizioloških rearanžmana pri kopiranju IG i TCR gena tijekom normalnog B i T-staničnog razvoja. Svakako,

¹Zavod za genetiku Klinike za pedijatriju KBC Zagreb Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu²Zavod za citologiju i patologiju KB Merkur Zagreb³Zavod za hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju KBC Zagreb Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu⁴Zavod za hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju KBC Split Medicinskog fakulteta u Splitu

Adresa za dopisivanje:

Mr. sc. Ružica Lasan Trčić

Zavod za genetiku Klinike za pedijatriju KBC Zagreb Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 10000 Zagreb, Kišpatićeva 12

E-mail: lasan_ruzica@hotmail.com

Tablica 2.
Kromosomske amplifikacije u DLBCL limfomu

	Kromosomsko mjesto
1.	1q21-23
2.	2p12-16
3.	8q24
4.	9q34
5.	12q12-16
6.	13q2
7.	16p12
8.	18q21-22
9.	22q12

pojedine translokacije su specifične ili pak ukazuju na visok stupanj asocijacije sa specifičnim histološkim subtipovima. Prva translokacija tako analizirana je t(8;21)(q24;q32) u Burkittovom limfomu, pri čemu myc proto-onkogen, smješten na 8q24 dolazi u rearanžman s IGH genom na 14q32 pri čemu je ekspresija MYC gena deregulirana. Geni uključeni u translokacije i insercije sudjeluju u različitim staničnim funkcijama kao što je kontrola staničnog ciklusa, apoptoza, regulacija staničnog rasta i diferencijacije te tumorskih metastaza (10, 11).

Amplifikacija gena unutar kromosomske regije vodi do proizvodnje više istih kopija gena i u asocijaciji je sa staničnom proliferacijom ili rezistencijom na tretman lijekovima i pokazala se kao važan put tumorske progresije kao i kliničkog ishoda u brojnim tumorima. Mikroskopski prepoznatljive strukture takvog procesa su double minute kromosomi (dmin) i homogeno obojene regije kromosoma (HSR), najčešće opažene u B-staničnim limfomima. U manjem broju NHL identificirana je amplifikacija MYC (8q24), BCL2 (18q21) i REL (2p12) gena (u skriningu: REL gen amplificiran je u više od 20% difuznog velikostaničnog B limfom (Engl. Diffuse Large B-cell Lymphomas, DLBCL). Ujedno je i identificirano devet mjesta kromosomske amplifikacije u DLBCL limfomu s više od četiri kopije (Tablica 2) (12). Amplifikacije i translokacije predstavljaju nezavisne događaje u deregulaciji ekspresije gena u B-staničnim NHL.

Somatske mutacije su česte u 5' regulatornoj regiji MYC, BCL2 i BCL6 kao i nezavisnog IG gena. Neki od mutiranih alela sposobni su aktivirati gene bez asocijacije s translokacijama. Mutacije BCL6 su najčešće u folikularnim limfomima (eng. Follicular lymphoma FL) i DBCL, a rijetke u ostalim.

Delecije kromosoma dovode do gubitka funkcije tumor-supresor gena u značajnom broju regija, te sudjeluju u razvoju limfoma i kliničke slike. U usporedbi s malignim solidnim tumorima tumor-supresor geni slabije su proučeni u limfomogenezi. Uočeno je da histološka progresija kao i druga klinička obilježja s t(14;18)(q32;q21) u FL, dok t(11;14)(q13;q32) ishoduje limfom plaštenih stanica (engl. Mantle Cell Lymphoma, MCL), a povezane su s TP53 genskom mutacijom (Tablica 3) (9). Regije minimalne molekularne delecije definirane su gubitkom heterozigotnosti (engl. Lost of Heterozigosity, LOH) kromosoma 6q, 7q i 13q iako geni kandidati nisu još izolirani. Neke od regija minimalne molekularne delecije kao što su 6q i 7q u asocijaciji su sa subtipom nisko-rizič-

nih limfomima, dok je t(14;18)(q32;q21) u asocijaciji s FL.

Rezultati citogenetskih analiza objavljeni su više od 2000 slučajeva NHL (Tablica 4) (9). Ovdje se fokusira na glavne klonske promjene u B- i T/NK-staničnim neoplazmama klasificiranim prema Revised European-American Lymphoma (REAL) i WHO klasifikaciji.

B-stanične neoplazme dale su najviše citogenetskih informacija u limfomima S obzirom na kliničko prisustvo najzastupljenija su i istraživanja su subtipova kao što FL i DLBCL u asocijaciji s IG genom uključenim u translokacije.

Kronična limfocitna leukemija/Limfom malih limfocita (CLL/SLL) je limfom u periferiji s cirkulirajućim CD5, CD23 B stanicama. Klonske kromosomske promjene nađene su u 50% do 60% slučajeva s najčešćom promjenom +12 i del(13q). Ove dvije patologije često su nađene zajedno te predstavljaju divergentne rute u patogenezi CLL-a. Stalna korelacija uočena je između +12 i atipičnih morfoloških i imunofenotipskih odlika. Del(11q) zastupljena je u 25%

Tablica 3.
Kromosomske delecije u B-staničnim NHL

Kromosom	Kromosomska pruga	Histološka subgrupa
1.	p36	DLBCL
	p33-34	DLBCL
	p31	DLBCL
3.	q32	DLCL
	p25-26	DLBCL
	p21	DLBCL
	q21	DLBCL
6.	q25-27	DLBCL, FL
	q15	DLBCL, FL
	q21	DLBCL, FL
	q21-23	SLL, FL
	q21-q24	DLBCL
7.	q32	SLL, FL
10.	q22-25	FL, DLBCL
11.	q22-q23	MCL, CLL
13.	q14	CLL/SLL, MM

Tablica 4.
Ponavljajuće kromosomske abnormalnosti NHL i njihovo dijagnostičko i prognostičko značenje prema radu Chagnattija i sur.

Limfom	Klonska abnormalnost	Učestalost u %	Klinički markeri		
			Progresija/Transformacija	Povoljan ishod	Nepovoljan ishod
B-stanične neoplazme					
B-CLL/SLL	+12, del(13q) t/der(14q), del(11q) del(6q, 17p)	10-55 ~ 25 5-20	+12 del(11q,6q, 17p) t/der(14q)	+12 del(11q) del(17p)	del(13q)
B-PLL	t(14;19)(q32;q13), t(11;14)(q13;q32) t(11;14)(q13;q32), +12, der(1p/q), del(6q,11q,13q)	> 2 ~ 20			
LPL	t(9;14)(p13;q32),der(1p/q,7p/q), dup(17q)	~ 50			
SMZL	+3/+3q +18, del(17q), der(1p/q, 8q)	15-55 10-25			
SLVL	t(11;14)(q13;q32), t/der(14q), +3/+3q, del(7q), der(2p11, 17p), +12	0-26 0-15			
HCL	inv/int del(5q13), ili +5, der(11q) inv/int del(2q, 19q), der(1p/q), del(1q, 6q, 20q)	~ 40 ~ 10			
Variantni oblici	+12	10-20			
PCM(MM)	t(11;14)(q13;q32) t(4;14)(p16.3;q32) +3, +5, +7, +9, +11, +15, +19 -13/del(13q) der(1p/q), del(6q,11q)	~ 30 ~ 15 30-70 15-40 5-20	-13	-13/13q del(11q)	
MALT	t(11;18)(q21;q21) t(1,14)(p22;q32) +3/+3q der(1p/q, 14q), +7, +2, +18, +X, +8q, +11q, del(6q), -17/del(17p)	30 ~ 6 slučajeva 15-70 5-15			
NMZL	+3/+3q, der(1p/q), +7, +12, +18				
FL	t(14;18)(q32;q21) ili variante t(3q27) t(8;14)(q24;q32), +X, +7, +12, +18, +der(18), t(14;18), del(6q, 10q, 17p), dup(1q,12q), der(1p/q)	90 6-26 <5	+7, del(6q, 17 p),t(8;14) der(1)(q21)	del(17p), t(8;14)	
MCL	t(11;14)(q13;q32) del(11q, 13q), der(3q) +12, del(6q, 1p, 9p, 17p)	30-70 10-50 5-15			
DLBC	t(3q27) t(14;18)(q32;q21) t(8;14)(q24;q32) t(14;15)(q32;q11), t(10q24), t(1;14)(q21;q32) +7, +12, +X, +11, -6, +3, +18, -Y, -X, del(1p/q, 3p/q, 6q, 7q, 17p), der(1p/q, 2p/q, 3p, 11p/q, 12p/q, dup(1q,12q)	15-40 10-30 5-10 <5 10-30	+7, del(6q,17p) der(1)(q21)	der(1)(q21) del(6q)	
HG-PL	+2p, +7q, +11q, der(1q), del(6q)				
MLBCL	+9p, +12q, +Xq				
PEL	+12, +7, der(1p/q)				
BL	t(8;14)(q24;q32) dup(1q), del(6q,9p,13q), +7, +12 t(2;8)(p12;q24), t(8;22)(q24;q11)	> 90 ~ 50	dup(1q)		
Variantni oblici					
T-stanične i NK-stanične neoplazme					
T-PLL	i(8)(q10), ili t(8;8)(p23q11), ili +8 inv(14)(q32q11), ili t(14;14)(q11q32) t(X;14)(q28;q11) del(6q, 11q), -14	60-90 40-75 <2 10-20			
NKLL	+7, +X, +8, i(1q, 6p, 17q), del(6q, 13q, 17p, 11q)				
ATLL/HTLV	t/der(14q32), t/der(14q11), del(6q) -X, -Y, +3, +7, +21, del(10p, 3q, 5q, 9q, 1p, 7p) i(17q)	30-50 ~ 10 ~ 75 ~ 30			
HGDTL	+8, -Y				
MF/SS	-10, neklonske abnormalnosti kromosoma: 1p11,1p 36, 2p11-24, 6q, 17q, 14q11, 14q32, 11q, 13q11-14, 9q	20-40			
PTCL-NOC	t(14q11), t(14q32) t(7q34), t(7p15), t(5q23-32), dup(5q23-32), +5, +7/+7q, del(1p, 6q), -13/del(13q)	50-75 10-25			
LEL & TZL	+3	30-50			
AILD	+3 +X, +5 del(1p31-32), dup(6p), t/del(6q), -7/+7q, -13/del(13q)	50-80 20-40 10-25		+X, t/del(1p31-32)	
ALCL-T/Null-cell	t(2;5)(p23;q35) +7, +X, -Y, +9, del(6q,17p)	40-90 10-30			t(2;5) (p23;q35)

Prema WHO klasifikaciji limfoidnih neoplazmi: CLL/SLL, chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma; LPL, lymphoplasmacytic lymphoma; PCM(MM), plasma cell myeloma/plasmacytoma (multiple myeloma); MALT, extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type; MCL, mantle cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; BL, Burkitt's lymphoma; ALCL, anaplastic large cell lymphoma; B-PLL, B-cellprolymphocytic leukemia; SMZL, splenic marginal zone lymphoma; SLVL, splenic lymphoma withvillous lymphocytes; HCL, hairy cell leukemia; NMZL, nodal marginal zone B-cell lymphoma; HG-PGL, high-grade primary gastric lymphoma; MLBCL mediastinal large B-cell lymphoma; PEL, primary effusion lymphoma; T-PLL, T-cell prolymphocytic leukemia; NKLL, NK-cell leukemia/lymphoma; ATLL, adult T-cell leukemia/lymphoma (HTLV); HGDTL, hepatosplenic gamma delta T-cell lymphoma; MF/SS, mycosis fungoides/Sézary syndrome; PTCL-noc, preipheral T-celllymphoma-not otherwise characterized; LEL, lymphoepitheloid lesion; TZL, T-zone lymphoma; AILD, angioimmunoblastic T-cell lymphoma.

slučajeva. U translokacije s IG (14q32) genskim mjestom uključena su različita partner kromosomska mjesta i zastupljene su u prlici 25% slučajeva. S kliničkog aspekta +12, del(11)(q21-23), del(6q) i abnormalnosti koje zahvaćaju 17p i 14q su u asocijaciji s uznapredovalim stadijem bolesti i lošim preživljenjem. Nasuprot tome, limfomi s aberacijama 13q s tipičnom morfologijom i progresom ponašaju se kao oni s normalnim karitipom.

B-staničnu prolimfocitnu leukemiju (B-PLL) karakteriziraju CD5, CD23 periferne B stanice, može nastati de novo ili evoluirati iz CLL i okarakterizirana je hiperdiploidnim karitipom s t(11;14)(q13;q32). Druge kromosomske promjene su -12, rearanžmani kromosoma 1p/q, del(6q), del(11q23) i del(13q).

Limfoplasmocitoidni limfom (LPL) je nisko-rizični imunoproliferativni poremećaj koji potječe od CD5 i CD10 perifernih B limfocita. Po prilici 50% slučajeva uključuje t(9;14)(p13;q32). Posttretmansi tumori pokazuju porast kompleksnosti karitipa s aberacijama koje zahvaćaju kromosome 1 i 7 te dup(17q).

Splenički limfom marginalne zone (SMZL) je relativno kasno prepoznat s različitom morfologijom, imunofenotipom i kliničkopatološkim karakteristikama. Tumorske stanice su derivirane iz perifernih B-stanica u dijelu spleničkih stanica marginalne zone. Delecija 7(q23) najčešći je citogenetski nalaz kao jedina promjena karitipa u više slučajeva. Čitava ili djelomična trisomija 3q, kao i -18. Česti su rearanžmani 1p34, 1q21 i 8q. U SLVL česta je t(11;14)(q13;q32), dok je -3 nešto rjeđa nego u SMZL.

Hairy cell leukemia (HCL) je nisko-rizičan limfom koji potječe iz perifernih B-stanica na nepoznatom stupnju diferencijacije. Otprilike u dvije trećine bolesnika prisutne citogenetske abnormalnosti uključuju deleciju 5q13 ili +5, rearanžmane 11p/q, pericentričnu inverziju/del(2)(q11), inv/del 19q, rearanžmane 1p/q, del(6)(q21-25) i del (20q). Varijantna forma HCL-V često pokazuje +12 i rearanžmane 7q32-36.

Plazmastanični mijelom (PCM) (MM)/Plazmacitom nastaje izotipnim gašenjem plazma stanica. Klonske ab-

normalnosti otkrivene su u samo 30% od 50% slučajeva G-pruganjem, dok su delecije nađene u svim slučajevima FISH tehnikom. Česte su translokacije koje zahvaćaju 14q32. Uobičajene citogenetske abnormalnosti uključuju t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), t(14;16)(q32;q23) i -13/del(13). Frekvencija i intenzitet karitipskih abnormalnosti je u koleraciji s kliničkim stupnjem bolesti. Kromosomske abnormalnosti nađene su u 20% u I stupnju, 60% u II i više od 80% u ekstramedularnom plazmacitomu. U kliničkom kontekstu, t/del(11q), -13/del(13q) i rearanžmani 17p nose lošiju prognozu.

Ekstranodalni limfom marginalne zone (MALT) razvija su uz kronični inflamatorni proces, a okidač može biti infekcija ili autoimuna deficijencija. Klonske kromosomske abnormalnosti nađene su 65% slučajeva i karitip je jednostavan, po prilici 30% slučajeva sadrži t(11;18)(q21;q21), često kao jedinu promjenu. Visoko-rizični tumori sadrže multiple kompleksne karitipove, a t(8;14)(q24;q32) jedina je ponavljajuća. Druge abnormalnosti nađene i u nisko- i visoko-rizičnim tumorima uključuju, +3/3q+, rearanžamane 1p/q i 14q32, +7, +12, +18, +X, +(8q), +11q, del(6q) i -17/del(17p).

Nodalni NHL marginalne zone (NMZBCL) klinički je daleko agresivniji nego nisko-rizični MALT. Citogenetski podaci ove podgrupe su ograničeni. Rearanžmani 1p/q, +3/+3q, +12 i +18 su najčešći.

Folikularni limfom (FL) je zrela B-stanična neoplazma što zahvaća 40% odraslih NHL na Zapadu. Glavna oznaka folikularnog limfoma je t(14;18)(q32;q21) viđena je u više od 75% slučajeva. Translokacije koje uključuju 3q27 i BCL6 rearanžmane zabilježene su u 25% slučajeva, i podjednako su zastupljene kako u t(14,18)(q32;q21) pozitivnom tako i u negativnom obliku, izgleda da su te dvije grupe genetski i klinički različite. Prisustvo t(8;14)(q21;q32) udruženo s t(14;18)(q32;q21) predstavlja klinički agresivan tijek, dok je ishod samo s t(8;14)(q24;q32) izgleda sličan ostalim FL slučajevima. Za t(14;18)(q32;q21), smatra se da nije prognostički signifi-

kantna. No, +7, del(6q) i del(17p) opisana je u asocijaciji s histološkom ili kliničkom transformacijom u DLBCL. U nekim slučajevima zabilježena je t(8;14)(q24;q32) kao i pojedinačni rearanžmani BCL2 i MYC gena (kompleksni karitipovi) u tim slučajevima znatno je brži progres bolesti s refleksijom na kemoterapiju, veća incidenca uključivanja centralnog nervnog sustava, i izrazito loša prognoza.

Limfom plaštenih stanica (MCL) neoplastičnom proliferacijom CD5 prirodnih B-stanica. Citogenetska oznaka MCL je t(11;14)(q13;q32). Translokacije koje uključuju kromosome 3, 8, 10, 13 i 17 se obično susreću uz t(11;14)(q13;q32). Više od 59% slučajeva s t(11;14)(q13;q32) pokazuje dodatne mnogobrojne karitipske abnormalnosti, uključujući del(11q), del(13q), rearanžmane 3q, +12 i delecije 6q, 1p, 9p i 17p. Između abnormalnosti brojnih regija kromosoma (gubitak/dobitak/amplifikacija) predominantna je amplifikacija regije 3q26.1-29.

Difuzni veliko B-stanični limfom (DLBCL) predstavlja različitu grupu kliničkih, histoloških i genetskih subtipova i čine 40% u grupi odraslih bolesnika s NHL. Najčešća translokacija je t(14;18)(q32;q21), potom t(3q27) i t(8;14)(q24;q32). Pruga 3q27 ima brojne partner gene smještene u: 14q32, 2q21, 9p13, 12q22 i 22q11. Kao grupa, DLBCL u kojima nedostaju 14q32 rearanžmani pokazuju višu tendenciju dobitka dodatnih kromosomskih promjena nego translokacija. Česte su (>10%) numeričke abnormalnosti uključujući +7, +12, +X, +11, -6, +3, +18, -Y i -X. Uz numeričke strukturne promjene su delecije kromosoma: 1, 3, 6, 7, 9 i 17. Brojne studije sugeriraju da vrsta kromosomskih abnormalnosti između nodalnog i ekstranodalnog DLBCL-a može biti različita, no ti podaci nisu sa sigurnošću potvrđeni na velikom broju pacijenata. Utjecaj t(14;18) s BCL2 rearanžmanom na prognozu je kontraverzan. Neka istraživanja našla su povezanost s povoljnim ishodom, dok druga nisu pronašla tako povoljan ishod. Nesuglasje može se pravdati porijeklom uzorka, veličinom uzorka ili samom populacijom. Isto tako genetski mehanizmi amplifikacija ili mutacija češće nego translokacije vode do deregulacije BCL2

ekspresije. Imunohistokemijske studije pokazale su BCL2 pozitivnost u 50% slučajeva, mnogo češće nego što se računa uz rearanžman. Rearanžman BCL2 gena povezuje se lošom prognozom. Rearanžman s BCL6 genom korelira s daleko povoljnijim kliničkim ishodom, no ta razmatranja treba tek potvrditi.

Burkitt limfom (BL) je agresivan limfom karakteriziran klonalnom ekspanzijom B stanica na nepoznatom stupnju, najvjerojatnije B blasta. Označava ga t(8;14)(q24;q32) ili njene varijante t(8;22)(q24;q11) i t(2;8)(p12;q24), viđene su gotovo u svakom slučaju. Dodatna najčešća kromosomska promjena je duplikacija 1, ili strukturne alteracije 1q, a rezultiraju parcijalnom trisomijom 1q, uključene regije mogu biti različite, ali uvijek je prisutna 1q21-32 regija. Druge kromosomske promjene uključuju del(6q), del(9p), del(13q), +7 i +12.

T-stanični limfomi i NK-stanične neoplazme broje otprilike 12% do 30% NHLa, ovisno o istraživanoj geografskoj regiji. Uz izuzetak ALCL T-stanični limfomi nisu tako intenzivno proučavani kao B-stanični. Prema njihovoj učestalosti (rijetko) i histološkim preklapanjima T-stanični subtipovi limfoma su citogenetski nedorečeni.

T-stanična prolimfocitna leukemija (T-PLL) je rijetka post-timisna limfoidna neoplazma karakterizirana kompleksnim karitipom. Najčešće citogenetske abnormalnosti su trisomija 8q koja proizlazi iz izokromosoma (8q), t(8;8)(p23;q11), ili +8, potom inverzija (14)(q11q32) ili t(14;14)(q11;q32). Rjeđe je prisutna del(6q), del(11q) i -14. Bolesnici s naslijeđenom ataxiom-telangiectasiom (A-T) su skloni razvoju T-PLL s t(X;14)(q28;q11) često s proliferacijom T-stanica prije pojave leukemije.

NK-stanična leukemia / limfom (NKLL). NK neoplazme su rijetke, prototip je nazalni tip NK-T-stanični limfom i agresivna NK-stanična leukemija/limfom. Uobičajeno su izraženi citotoksični proteini TIA-1, perforin i granzim B, ali ne pokazuju TCR rearanžmane. NKLL je u asocijaciji s Epstein-Barr virusom i hemofagocitnim sindromom. Malo je znano o citogenetici u ovoj vrsti tumo-

ra, zbog rijetkog prisustva i teškoće u uzimanju adekvatnog uzorka. Karitip je najčešće hiperdiploidan s više od 46 kromosoma i mnogo kompleksniji u nazalnom tipu limfoma nego u agresivnom NK-cell leukemia/limfom. Najčešće abnormalnosti su del(6q), ili i(6p) i +7. Druge ponavljajuće abnormalnosti uključuju +X, i(1q), +8 i rearanžmane u koje su uključeni 17p/q, 1q, 13q i 11q.

Adultna T-stanična leukemija/limfom (HTLV) (ATLL)* je neoplazma zrelih helper T-stanica, kao uzročni agens smatra se humani T-stanični virus leukemije (HTLV1). Klonalne kromosomske abnormalnosti detektirane su u svakom slučaju. Karitip teži prema hiperdiploidnom, ali mnogo je kompleksniji u akutnoj fazi nego u kroničnoj ili usporenoj fazi. Translokacije i inverzije uključuju 14q32 i del(6)(q15-21) kao najčešće aberacije. Druge citogenetske promjene uključuju -X, -Y, +3, +7, +21 i delecije 10p, 3q, 5q, 9q, 1p i 7p. +3, +7, -X i del(6q) dominantno su nađene u akutnoj ATLL i mogu biti u vezi s progresijom.

Hepatosplenički T-stanični limfom (HGDTL) je rijetki, agresivni, periferni T-stanični limfom za koji se smatra da nastaje iz γ/δ T-stanica. Najčešće citogenetske abnormalnosti su i(7q), +8 i -Y. Izokromosom (7q) uočen je kao solitarna promjena u pojedinačnim slučajevima, isto tako je uočeno da evalouira tijekom bolesti.

Mycosis fungoides (MF)/Sézary sindrome (SS). MF je okarakteriziran mnogobrojnim neklonskim kromosomskim abnormalnostima, dok je u SS obično klonska promjena hiperdiploidni/near-tetraploidni kromosomski komplement. Rearanžmani uključuju kromosome: 1, 2, 6, 17, 14, 11, 13 i 9 s mjestima loma 1p11, 1p36, 2p11-24, 13q11-14, 14q11 i 14q32. Najčešća numerička promjena je -10.

T-periferni, nespecificirani tip (PTCL-NOC) predstavlja različitu grupu u morfološkom, histološkom i imunofenotipskom smislu, a izrasta iz pos-imičnih limfocita ili perifernih T-stanicana različitim stupnju transformacije. Klonske kromosomske aberacije su češće zastupljene u kompleksnim high-grade le-

zijama u usporedbi s low-grade lezijama. Najčešće translokacije uključuju: 14q11, 14q32, 7q34, 7p15, 5q23-32, duplikacije: dup(5)(q23.32), +5, +7/+7q i gobitci: del(1p), -13/del(13q) i deleciju (6q). T-zone limfomi i limfoepitelne lezije su udružene s +3.

Angioimunoblastični T-stanični limfom (AILD) karakteriziran je karitipski s nepovezanim klonovima. Abnormalni karitip prisutan je u više od 90% slučajeva. Najčešće karakteristične kromosomske promjene uključuju +3, +5 i +X, u kombinaciji +3 i +X, te +3 i +5. Ostale kromosomske promjene uključuju del(1)(p31-32), dup(6p), t/del(6q). U rijetkom objavljenim radovima citogenetski abnormalan klon je povezan s nižom incidencijom terapijski induciranim remisijom i kraćim vremenom preživljenja.

Anaplastični velikostanični limfom, T-stanični/null stanični (ALCL) je heterogeni entitet s različitim morfološkim, a i kliničkim oznakama, citogenetska karakteristika je translokacija (2;5)(p32;q35). Molekularnogenetičke i imunohistokemijske studije pokazale su da je ta translokacija predominantna u adolescentnoj populaciji s CD30+ALCL. Karitipovi u slučajevima s anaplastičnom morfologijom obično su više kompleksni nego u onima s neanaplastičnom morfologijom. Citogenetika, molekularna genetika i imunohistokemijska istraživanja identificirala su nekoliko varijantnih translokacija/rearanžmana s aktivnim ALK genom smještenim u 2p23 regiji: t(2;13)(p23;q34), inv(2)(p23;q35), t(2;2)(p23;p32), t(1;2)(p25;p23)(TPM3/ALK), t(2;3)(p23;q21)(ALK/TFG) i t(1;2)q21;p23. Dodatne kromosomske promjene su još promjene koje uključuju +7, +X, -Y, +9, del(6q) i del(17p). Klinički gledano bolesnici uz propisanu terapiju s t(2;5)(p23;q35) u ALK pozitivnim slučajevima imaju znatno bolju prognozu u usporedbi s ALK negativnim slučajevima (3, 11).

ZAKLJUČAK

Kromosomske promjene udružene s kliničkim ponašanjem u različitim histološkim entitetima NHL izdvajaju abnormalnosti kromosoma 1, 6 i 17 prisutne u različitim tipovima tumora (he-

matopoetskih, epitelnih, mezenhimalnih, neuronskih i germinativnih stanica) udružene su općenito s lošijim kliničkim ishodom po bolesnika. Ovi citogenetski podaci snažno indiciraju uključenost mnogobrojnih gena smještenih na tim kromosomima tijekom tumorogeneze. Abnormalnosti oba kromosoma 1 i 6, uglavnom translociranih ili deletiranih nađeni su u 15% NHL, mjesta loma su u regijama 1p32-36, 1q21-23 i 6q13-q27. Mogu se naći udruženi s neovisnom translokacijom(14;18)(q32;q21) ili s drugim translokacijama u koje je uključen IG gen smješten na 14q32 (12). Općenito, te abnormalnosti indiciraju loš ishod u svim histološkim tipovima NHL, posebice u DLBCL-u. Molekularno mjesto loma 1q21-q23 je heterogeno, s tri mjesta udružena mjesta loma u asocijaciji s BCL9, FCGR2B i MUC1 genom (13). Strukturne abnormalnosti kromosoma 17 također su česte u mnogim entitetima, nađene su u preko 20% NHL s uključenim oba kraka, kao i i(17q). TP53 gen smješten na 17p13 regiji ima patogenetsku ulogu u nekim slučajevima. 17p- ili druge aberantnosti kromosoma 17, bilo pri dijagnozi bilo da su sastavni dio klonске evolucije, svakako nose povećani rizik transformacije FL u DLBCL, skraćivanje vremena preživljenja kao i u drugim subtipovima NHL (14). U suprotnosti s leukemijama, citogenetska saznanja u limfomima su nekompletna i često su interpretacije suprotstavljene. Potencijalne

vrijednosti citogenetike udružene s histološkom kompleksnošću, klasifikacijom malignih limfoma i odgovorom na liječenje doprinose boljem razumijevanju nastanka i razvoja malignih limfoma.

Autori izjavljuju da nisu bili u sukobu interesa.
Authors declare no conflict of interest.

LITERATURA

1. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009; 523-31.
2. Matasar MJ, Zelenetz AD. Overview of Lymphoma Diagnosis and Management. *Radiol Clin N Am* 2008; 46: 175-98.
3. Poirel HA, Cairo MS, Heerema NA et al. Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study; FAB/LMB 96 International Study Committee. *Leukemia*. 2009; 23 (2): 323-31.
4. Trčić RL, Sustercić D, Kuspilić M et al. Recurrent chromosomal abnormalities in lymphomas in fine needle aspirates of lymph node. *Coll Antropol*. 2010; 34 (1): 41-4.
5. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. *ISCN 2009: an international system for human cytogenetic nomenclature (2009)*. Basel; Unionville, CT: Karger; 2009.
6. Aurer I, Dominis M, Stern-Padovan R, Huić D, Santek F. Diagnosis and therapy of lymphomas-Croatian consensus. *Lijec Vjesn*. 2007; 129 (5): 111-7.
7. Whang-Peng J, Knutsen T, Jaffe ES et al. Sequential analysis of 43 patients with non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations with cytogenetic, histologic, immunophenotyping, and molecular studies. *Blood*. 1995; 85 (1): 203-16.
8. Burck KB, Liu Edison T, Larrick JW. *Oncogenes: An introduction to the concept of cancer genes* Springer-Verlag New York, Incorporated, New York, NY, U.S.A. 1998.
9. Mitelman M, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human Neoplasia *Nature genetics*. 1997; 15: 417-74.
10. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA et al. Karyotypic analysis predicts outcome of pre-remission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study. *Blood* 2000; 96 (13): 4075-83.
11. Chagnati RSK, Nanjangud G, Schmidt H et al. Recurring chromosomal abnormalities in Non-Hodgkin Lymphoma: Biologic and clinical significance. *Seminars in Hematology* 2000; 37 (4): 396-408.
12. Burck KB, Liu Edison T, Larrick JW. *Oncogenes: An introduction to the concept of cancer genes* Springer-Verlag New York, Incorporated, New York, NY, U.S.A. 1998.
13. Ambinder RF, Griffin CA. Biology of the lymphomas: cytogenetics, molecular biology, and virology. *Curr Opin Oncol*. 1991; 3 (5): 806-12.
14. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood* 2009; 114 (14): 3024-32.

Summary

CYTOGENETICS OF LYMPHOMA

R. Lasan Trčić, I. Kardum-Skelin, J. Konja, Lj. Rajić, E. Bilić, R. Femenić, M. Pavlović, B. Lozić, S. Čulić, B. Jelić-Puškarčić, D. Begović

In the last few decades we have learned that chromosomal abnormalities are specifically linked to certain subtypes of leukemias, lymphoma and sarcoma. Malignant lymphomas are third when it comes to frequency of juvenile tumor diseases. They are characterized by genetic changes which can be revealed by cytogenetic methods in most cases. Cytogenetic research on large series of lymphoma point to conclusion that clone disorders are non-randomly allocated along the genome, and are often tumor-specific clone disorders. Pathogenetically, the most important thing is to identify so-called primary clone disorders that are mostly individual. Detailed characterization of chromosomal abnormalities provides a basis for the classification of the disease and the defining of prognosis. Genetic characteristics of lymphoma are researched by molecular genetics, conventional technique of g-banding of chromosomes, and molecular cytogenetics with so-called fluorescent in-situ hybridization technique (FISH) on the level of nucleus and/or mitosis.

Descriptors: MALIGNANT LYMPHOMA, NON-HODGKIN LYMPHOMA, HODGKIN LYMPHOMA, CYTOGENETICS OF LYMPHOMA

Primljeno/Received: 26. 2. 2013.

Prihvaćeno/Accepted: 28. 3. 2013.