

MOLEKULARNO BIOLOŠKE PREISKAVE LIMFOPROLIFERATIVNIH BOLEZNI Z UPORABO KLASIČNE METODE PCR

Ira Koković, Rastko Golouh, Janez Jančar, Andreja Zidar,
Srdjan Novaković

Onkološki inštitut Ljubljana

Uvod

Določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij in dokazovanje specifičnih genetskih sprememb ima pomembno vlogo v diagnostiki limfoidnih neoplazem, saj omogoča ločevanje med neoplastičnimi lezijami in reaktivnimi procesi. Klonalno populacijo limfoidnih celic lahko dokažemo s pomnoževanjem preurejenih genov, ki kodirajo težko verigo imunoglobulina (IgH) pri B-celičnih limfomih in γ verigo receptorja T (TcR γ) pri T-celičnih limfomih. Z metodo PCR lahko dokažemo tudi kromosomsko translokacijo t(14;18)(q32;q21) oziroma preurejeno področje bcl-2/IgH pri folikularnem limfomu. Uvedli smo tehnike za določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij in dokazovanje specifične kromosomske translokacije t(14;18), ki temeljijo na polimerazni verižni reakciji.

Metode

Opravili smo molekularno biološko preiskavo 168 biopsij različnih limfoproliferativnih bolezni, ki jih nismo mogli opredeliti s klasičnimi morfološkimi in imunofenotipskimi metodami. Tkivne vzorce fiksirane v formalinu in vklopljene v parafin smo zbirali na Oddelku za patologijo Onkološkega inštituta v času od 1997-2005. DNA smo izolirali po ustaljeni metodi. Preurejene gene za IgH in TcR γ smo pomnožili z uporabo oligonukleotidnih začetnikov, ki se prilagajajo na ohranjena področja variabilnih (angl. variable, V) in spajalnih (angl. joining J) genskih segmentov. Pomnožene produkte smo analizirali z gelsko elektroforezo v 10% poliakrilamidnem gelu, obarvanem z etidijevim bromidom, in fotografirali pod UV svetlobo.

Rezultati

Z uporabo novih, molekularnih metod smo določili klonalnost pri 146/167 analiziranih primerov (87,4%). Štiriinpetdeset lezij (32,3%) je bilo monoklon-skih in 92 lezij (55,1%) poliklon-skih. Pri 21 primerih (12,6%) nismo mogli

določiti klonalnosti: 3 primeri so bili oligoklonalski, 12 primerov smo opredelili kot »monoklonsko v poliklonskem ozadju« in 6 primerov je bilo negativnih. Upoštevajoč rezultate tako klasičnih histopatoloških, kot molekularnih preiskav, smo določili tip limfoidne neoplazije pri 94,6% primerov. Od tega je bilo 31,5% B-celičnih limfomov, 21,4% T-celičnih limfomov, 4,8% primerov Hodgkinove bolezni in 36,9% reaktivnih limfoidnih proliferacij. Pri preostalih 5,4% primerov nismo mogli določiti tip limfoidne proliferacije. Preiskali smo tudi 26 limfoproliferacij suspektnih za folikularni limfom. Pri 8 primerih (30,8%) smo dokazali kromosomsko translokacijo t(14;18)(q32;q21), 15 primerov (57,7%) je bilo negativnih in 3 primeri (11,5%) so bili nekonkluzivni.

Zaključki

Opisane molekularne metode so enostavne, hitre in uporabne tudi na majhnih količinah formalinsko fiksiranega, v parafin vklopljenega tkiva. V času sodobnih tehnik genomike in proteomike, določanje klonalnosti in specifičnih genetskih sprememb s klasičnimi metodami PCR še vedno prispeva pomembne klinične in diagnostične informacije.