

SPONTANA PREMATURNA KONDENZACIJA KROMOSOMA U DJECE S AKUTNOM LEUKEMIJOM

ISKRA PETKOVIĆ¹, MELITA NAKIĆ¹, JOSIP KONJA²

Ispitivanja spontane pojave prematurne kondenzacije kromosoma (PCC) u djece s malignom bolešću su oskudna. Nije poznata učestalost PCC-a i njegovo biološko i kliničko značenje. U ovom radu prikazujemo rezultate ispitivanja spontane pojave fuzijom-potaknute-PCC u 85-ero djece s akutnom leukemijom. Analiza je obavljena u vrijeme postavljanja dijagnoze na preparatima dobivenim 24-satnom kulturom stanica koštane srži i/ili periferne krvi bez stimulacije mitogenom. PCC je otkriven u 6-ero (7,1%) pacijentata, u 3-je (9,4%) od 32-je bolesnika s AML-om i u 3-je (5,7%) od 53-je djece s ALL-om (uključujući 3-je bolesnika s morfološki nediferenciranom leukemijom, i fenotipskim svojstvima ALL-a). Rezultati upućuju na to da PCC nije rijetka pojava u djece s hemoblastozama. Ispitivanje, međutim, ne potvrđuje pretpostavku da je fenomen PCC jedan od mehanizama nastanka varijabilnosti genoma i evolucije tumorskog kлона u djece s akutnom leukemijom.

Deskriptori: KROMOSOMSKE ABERACIJE; KROMOSOMI – ultrastruktura; MIJELOIČNA LEUKEMIJA, AKUTNA – genetika; LIMFOCITNA LEUKEMIJA, AKUTNA – genetika

UVOD

Poznato je da su kromosomi dinamične strukture koje tijekom staničnog ciklusa mijenjaju stupanj spiralizacije. Kromosomi su despiralizirani tijekom interfaze, a proces spiralizacije započinje ulaskom stanice u mitozu. Spiralizacija kromosoma i stanična dioba strogo su kontrolirani procesi, jer osiguravaju podjednaku raspoređenost identičnih replika kromosoma u dvije novonastale stanice kćerke. Malo znamo, međutim, o mehanizmima spiralizacije i genetičkoj kontroli procesa te su ispitivanja od znanstvenog i praktičnog zanimanja (1). Prematurna kondenzacija kromosoma (PCC) označava poremećaj u procesu kondenzacije

kromatina i spiralizaciju genoma u fazi staničnog ciklusa, kad su kromosomi despiralizirani i čine finu mrežicu unutar jezgrine membrane (2). Poremećaj kondenzacije kromatina može biti konstitucijski ili stečen, induciran ili spontan, te može biti posljedica stanične fuzije ili poremećaja gena koji kontroliraju spiralizaciju kromatina i stanični ciklus (3-7). Nitzel i sur. su 2002. godine opisali autosomno recesivan PCC sindrom [OMIM # 606858] u dvoje djece s prematurnom kondenzacijom kromosoma, mikrocefalijom, niskim rastom i mentalnom retardacijom (3). Spontana pojava fuzijom-potaknutog-PCC-a opisana je u populaciji čovjekovih tumorskih stanica. PCC je posljedica fuzije dviju stanica od kojih je jedna stanica u metafazi, a druga u interfazi (4). Fuzijom stanica dolazi do morfoloških promjena genoma interfazne jezgre. Morfološki izgled prematurno kondenziranih kromosoma je varijabilan i ovisan je o stadiju staničnog ciklusa u kojem se nalazila interfazna jezgra u trenutku fuzije (8). Tako su kromosomi interfazne stanica u G1 fazi ciklusa građeni od jedne kromatide, u G2 fazi od dvije tijesno priljubljene kromatide, dok je kon-

denzacija kromatina interfazne jezgre u S fazi neujednačena i fragmentirana. PCC je opisan u otprilike 70-ero bolesnika sa solidnim tumorom, leukemijom i premlignim stanjima (9-13). Dosad provedena istraživanja obuhvatila su populaciju odraslih bolesnika, dok su ispitivanja u djece oskudna. Biološko i kliničko značenje PCC-a u malignom procesu nije jasno. Smatra se da su produkti stanične fuzije i stanice s prematurno kondenziranim kromosomima sposobni za život i znače izvor genomske heterogenosti populacije tumorskih stanica (14,15).

U ovom radu obavljeno je ispitivanje spontanog fuzijom potaknutog PCC-a u djece s akutnom leukemijom, a radi procjene učestalosti i biološke uloge poremećaja.

MATERIJAL I METODE

Ispitano je 85-ero djece, 32 djevojčice i 53 dječaka, u dobi od 1 mjeseca do 15 godina. Kod 50-ero bolesnika postavljena je dijagnoza akutne limfocitne leukemije (ALL), kod troje su otkrivene morfološki nediferencirane stanice te je postavljena dijagnoza akutne nediferencirane leukemi-

¹ Klinika za dječje bolesti Zagreb

² Klinika za pedijatriju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Zahvala: Ovaj rad je izrađen u okviru projekta br. 072-1083107-0361 Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH.

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Iskra Petković, z.sav., Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb, Klaićeva 16

je (ANL), ali su zbog fenotipskih svojstava uključeni u skupinu ALL. Dijagnoza akutne mijeloidne leukemije (AML) postavljena je kod 32-je djece. Citogenetičko ispitivanje je provedeno u vrijeme postavljanja dijagnoze i prije početka terapije na preparatima dobivenim kratkotrajnom nestimuliranom kulturom stanica koštane srži ili periferne krvi. Nakon 24-satne kulture stanica slijedila je obrada s kolhicinom (0.1 µg/mL), hipotoničnom otopinom (0.075M KCl, 15 min., 37°C) i na kraju fiksacija stanica u mješavini metanola i octene kiseline u omjeru 3:1. Preparati su pripremljeni metodom sušenja na zraku i bojani klasičnom metodom po Giemsi, GTG- i BCG- metodama pruga.

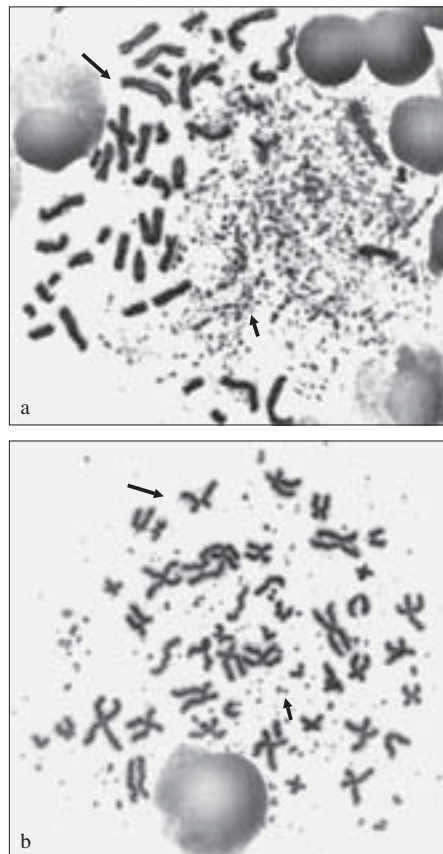
Ispitano je više od 15 stanica po bolesniku, te procijenjen modalni kariotip populacije stanica, prisutnost poliploidnih stanica i spontana pojava fuzijom potaknutog PCC-a.

REZULTATI

Prematurna kondenzacija kromosoma otkrivena je u 6-ero od 85-ero djece s akutnom leukemijom. Spontana pojava PCC-a utvrđena je u 3-je (9,4%) od 32-je djece s AML-om i u 3-je (5,7%) od 53-je djeteta s ALL-om (uključujući 3-je bolesnika s ANL-om) (tablica 1.). PCC je otkriven kod 1-og od 14-ero bolesnika s AML-M2, u 2-je od 10-ero djece s AML-M5 te u 3-je od 15-ero bolesnika s

Tablica 1. Učestalost premature kondenzacije kromosoma u 85-ero djece s akutnom leukemijom
Table 1. Frequency of premature chromosome condensation in 85 children with acute leukemia

Tip leukemije Type of leukemia	Bolesnici Patients	PCC	PCC %
AML	32	3	9,37
M1	2		
M2	14	1	
M3	2		
M4	3		
M5	10	2	
M7	1		
ALL	53	3	5,45
L1	15	3	
L2	32		
L3	3		
ANL	3		
Ukupno Total	85	6	7,1



Slika 1. Spontana prematurna kondenzacija kromosoma u bolesnika s ALL-L1 (a) i AML-M5 (b), pokazuje cjelovite metafazne kromosome (velika strjelica) i kondenzirane kromatinske elemente interfazne stanice u S-fazi staničnog ciklusa (mala strjelica)
Figure 1. Spontaneous premature chromosome condensation from patients with ALL-L1 (a) and AML-M5 (b) showing intact metaphase chromosomes (large arrow) and condensed chromatin fragments of interphase cell in S-phase of the cell cycle (small arrow).

ALL-L1. Sve stanice s PCC-om imaju, uz metafazne kromosome, sitne kromosomske fragmente varijabilne veličine i intenziteta bojanja, što upućuje na fuziju mitotske i interfazne stanice u S-fazi staničnog ciklusa (Slika 1). Frekvencija stanica s PCC-om varira od bolesnika do bolesnika i nalazi se u rasponu od 5%-13,6%. Aberantan maligni klon identificiran je u 2-je od 6-ero djece s PCC-om. Kod bolesnika s AML-M2 analizirano je 38 mitotičkih koštane srži. PCC je otkrivena u 7,9% stanica, dok ostale imaju uredan broj i morfološki izgled kromosoma. Analizom stanica koštane srži pacijenta s AML-M5 identificiran je aberantan klon sa 46 kromosoma i translokacijom kromosoma 4 i 15. Klonski kromosomski poremećaj prisutan je u 12 od 22 ispitane stanice, dok je PCC otkriven u 13,6% stanica. Kod drugog bolesnika s AML-M5 ispitane su 23 stanice. Otkriveno je 8,7% stanica s

PCC-om, dok 17 stanica pripada aberantnom klonu sa 46 kromosoma i translokacijom kromosoma br. 9 i 11. Kod troje bolesnika s ALL-L1 ispitano je 20, 108 i 40 stanica periferne krvi i otkriveno 5%, 5,6% i 5% stanica s PCC-om, dok su ostale urednog citogenetskog nalaza. Ovim ispitivanjem nisu identificirane poliploidne stanice u bolesnika a PCC-om.

RASPRAVA

Ovim ispitivanjem otkrivena je prematurna kondenzacija kromosoma u 6-ero (7,1%) od 85-ero ispitane djece s akutnom leukemijom.

Istraživanja PCC-a u selekcioniranim skupinama bolesnika s tumorskom bolešću su rijetka i obuhvaćaju odrasle bolesnike s leukemijom, solidnim tumorom i premalignim stanjem, dok izostaju sustavna ispitivanja u selekcioniranim skupinama djece. Učestalost PCC-a je varijabilna i kreće se od 0% do 56,25%. Tako su Williams i sur. otkrili PCC u 8-ero (16,2%) od 37-ero pacijenata s AML-om, te Kovacs i sur. u 1-og (3,22%) od 31-og bolesnika s akutnom leukemijom (9,10). Dva provedena istraživanja upućuju na povezanost perzistentne poliklonalne B limfocitoze s binuklearnim limfocitima (PPBL) i PCC-om. PCC je otkriven u 18-ero (56,25%) od 32-je bolesnika s PPBL-om (11, 16). S druge strane PCC nije identificiran u 97-ero bolesnika s CML-om (9,10). Uz ispitivanje PCC-a u bolesnika s hemoblastozama, značajne su analize u onih sa solidnim tumorom. Reichman i Levin otkrili su PCC u 2-je (7,1%) od 28-ero bolesnika s karcinomom debelog crijeva (12). Kovacs i sur. su opisali pojavu PCC-a u troje (8,57%) od 35-ero bolesnika s karcinomima različitih histoloških tipova i podrijetla (10). Visoka frekvencija je utvrđena u bolesnika s karcinomom grlića maternice. PCC je otkriven u 22-je (14,7%) od 150-ero bolesnika s tumorom (13). Frekvencija PCC-a je u većini provedenih ispitivanja, uključujući i naše istraživanje, u rasponu od 1-13%, dok je visok udio stanica s PCC-om opisan u bolesnika s akutnom eritroleukemijom (9).

Razlikujemo dva mehanizma spontane pojave fenomena PCC. Tako značajnu ulogu u procesu fuzijom potaknutog PCC-a ima fuzija stanica i faktor za poticanje mitoze (MPF) (8,17). Fuzija stanica je posljedica poremećaja permeabilnosti stanične membrane, povezivanja stanica

te spajanja staničnog sadržaja. Interfazna jezgra dolazi pod utjecaj MPF mitotske komponente stanične fuzije. MPF uzrokuje razgradnju jezgrine membrane uz kondenzaciju kromatina interfazne stanice u vidljiva tjelešca. Danas znamo da spontana pojava PCC-a može biti posljedica disfunkcije gena koji imaju značajnu ulogu u procesu spiralizacije kromosoma i kontrole stanične diobe. Značajan doprinos u razumijevanju ovih procesa dala su ispitivanja spontanog i kemijskim putem inducirano PCC-a (2, 18).

Uloga spontane pojave PCC-a u malignom procesu nije jasna. Pojedini autori drže da je spontani PCC, kao posljedica poremećaja kontrolne točke u G2/M fazi ciklusa, svojstvo tumorskih stanica i izvor genetičke heterogenosti te rezistencije na terapiju (15). Istraživanja fuzijom potaknutog PCC-a upućuju na češću pojavu fenomena u tumorima s poliploidnim brojem kromosoma, varijabilnim brojem kromosoma ili sekundarnom modalnom vrijednošću u tetraploidnoj regiji (12-14). Stoga se smatra da je stanična fuzija/PCC jedan od mehanizama nastanka poliploidnih stanica, genetičke varijabilnosti populacije tumorskih stanica i evolucije tumorskog kлона. Za razliku od solidnih tumora, rezultati provedenih ispitivanja ne upućuju na povezanost fuzijom potaknutog PCC-a i numeričkih poremećaja kromosoma u bolesnika s PPBL-om i leukemijom, uključujući i našu skupinu djece s AL-om. Stoga se može pretpostaviti da kod hemoblastoza novonastali poremećaj genoma ne pridonosi selektivnoj prednosti stanica.

Rezultati dosad provedenih ispitivanja u selekcioniranim skupinama osoba s tumorskom bolešću, uključujući i naše ispitivanje, upućuju na to da je stanična fuzija i spontana pojava PCC svojstvo pojedinih tipova bolesti i neovisna o dobi pacijenta. Ovim ispitivanjem nije dokazana povezanost fuzijom potaknutog PCC-a i poliploidije te rezultati upućuju na to da fenomen nije izvor genomske varijabilnosti tumorskih stanica u bolesnika s leukemijama. Nužna su, međutim, dodatna ispitivanja u selekcioniranim skupinama bolesnika, kako bi se procijenila povezanost PCC-a i drugih tipova i stadija tumorskih bolesti u djece.

LITERATURA

1. Maton G, Lorca T, Giraut JA, Ozon R, Jessus C. Differential regulation of Cdc2 and Aurora-A in *Xenopus* oocytes: a crucial role of phosphatase 2A. *J Cell Sci* 2005;118:2485-94.
2. Gotoh E, Durante M. Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. *J Cell Physiol* 2006;209:297-304.
3. Neitzel H, Neumann LM, Schindler D, Wigres A, Tonnes H, Trimborn M, Krevsova A, Richter R, Sperling K. Premature chromosome condensation in humans associated with microcephaly and mental retardation: a novel autosomal recessive condition. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1015-22.
4. Sandberg AA. Some comments regarding chromosome pulverization (premature chromosome condensation or PCC, prophase). *Virchows Arch. B Cell Path* 1978;29:15-18.
5. Hittelman WN, Rao P. Mapping G1 phase by the structural morphology of the prematurely condensed chromosomes. *J Cell Physiol* 1978; 95:333-42.
6. Knuutila S, Siimes M, Vuopio P. Chromosome pulverization in blood diseases. *Hereditas* 1981;95: 15-24.
7. Bezrookove V, Smits R, Moeslein G, Fodde R, Tanke HJ, Raap AK, Darroudi F. Premature chromosome condensation revisited: a novel chemical approach permits efficient cytogenetic analysis of cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38: 177-186.
8. Johnson RT, Rao PN. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 1970;226: 717-22.
9. Williams DM, Scott CD, Beck MT. Premature chromosome condensation in human leukemia. *Blood* 1976;47:687-93.
10. Kovacs G. Premature chromosome condensation: evidence for in vivo cell fusion in human malignant tumors. *Int J Cancer* 1985;36: 637-41.
11. Mossafa H, Troussard X, Valensi F, Schillinger F et al. Isochromosome i(3q) and premature chromosome condensation are recurrent findings in chronic B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 1996;20:267-73.
12. Reichmann A, Levin B. Premature chromosome condensation in human large bowel cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1981;3:221-5.
13. Sreekantaiah C, Bhargava K, Shetty JN. Premature chromosome condensation in human cervical carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;24:263-9.
14. Atkin NB. Premature chromosome condensation in carcinoma of the bladder: presumptive evidence for fusion of normal and malignant cells. *Cytogenet Cell Genet* 1979;23:217-9.
15. Kovaleva OA, Glazko TT, Kochubey TP, Lukash LL, Kudryavets YI. Spontaneous premature condensation of chromosomes in normal and transformed mammalian cells. *Exp Oncol* 2007;29:18-22.
16. Mossafa H, Malaure H, Maynadie M, Valensi F et al. Persistent polyclonal B lymphocytosis with binucleated lymphocytes: a study of 25 cases. *Br J Haematol* 1999;104:486-93.
17. Miake-Lye R, Kirschner MW. Induction of early mitotic events in a cell-free system. *Cell* 1985;41: 165-75.
18. Trimborn M, Bell SM, Felix C, Rishid Y, Jafri H, Griffiths PD, Neumann LM, Krebs A, Reis A, Sperling K, Neitzel H, Jackson AP. Mutation in microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation. *Am J Hum Genet* 2004;75: 261-6.

Summary

SPONTANEOUS PREMATURE CHROMOSOME CONDENSATION IN CHILDREN WITH ACUTE LEUKEMIA

I. Petković, M. Nakić, J. Konja

Investigations of spontaneous premature chromosome condensation (PCC) in children with malignant disease are rare. The frequency and biological and clinical significance of PCC in the malignant process is not clear. Here we present the results of PCC analysis in 85 children with acute leukaemia. Analysis was performed at diagnosis on slides obtained by unstimulated bone marrow and/or peripheral blood culture. PCC were observed in 6 (7.1%) patients, 3 (9.4%) out of 32 patients with AML and in 3 (5.7%) out of 53 children with ALL (including 3 patients with morphologically unclassified acute leukaemia but phenotypically they fitted ALL). This study gives additional evidence that PCC is not a rare phenomenon in human malignancies, however, it does not support the idea that cell fusion is one of the mechanisms of the origin of tumour cell genomic variability at least in childhood acute leukaemia.

Descriptors: CHROMOSOME ABERRATIONS; CHROMOSOMES – ultrastructure; LEUKEMIA, MYELOID, ACUTE – genetics; PRECURSOR CELL LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA-LYMPHOMA - genetics

Primljeno/Received: 30. 7. 2007.

Prihvaćeno/Accepted: 6. 12. 2007.