

## CITOGENETIKA I TUMORSKE BOLESTI

ISKRA PETKOVIĆ\*

*U ovom radu dat je pregled metoda za analizu kromosoma i kromosomskih poremećaja u djece sa solidnim tumorom, s osvrtom na danas poznate citogenetičke osobine populacije tumorskih stanica, poremećaje kromosoma specifične za pojedine tipove i stadije bolesti, s posebnim naglaskom na kliničku primjenu citogenetičkih ispitivanja u postavljanju dijagnoze, procijeni stadija bolesti, predikciji tijeka i ishoda bolesti.*

Deskriptori: SOLIDNI TUMORI, CITOGENETIKA, DJECA

## Citogenetika i solidni tumori

Tijo i Levan su 1956. god. otkrili da somatske stanice čovjeka sadrže 46 kromosoma. Par godina kasnije otkriveni su prvi konstitucijski i stečeni poremećaji genoma u humanoju populaciji, a u godinama koje slijede upoznata je raznolikost numeričkih i strukturnih aberacija kromosoma. Aberacije kromosoma uzrokuju višak, manjak ili prestrukturiranje genetičkog materijala, te imaju štetne posljedice na funkcionalnu aktivnost stanice te na rast i razvoj organizma.

U proteklih pet desetljeća učinjen je znatan napredak i usvojene su mnoge nove metode ispitivanja. Tako su klasične metode ispitivanja morfološkog izgleda kromosoma upotunjene metodama diferencijalnog bojenja kromosoma za preciznu identifikaciju pojedinih kromosomskih tipova i specifičnih kromosomskih regija. Od posebnog su praktičnog i znanstvenog interesa metode molekularne citogenetike kao što su metode fluorescentne in situ hibridizacije, komparativne genomske hibridizacije i "microarray-CGH" (1-4). Metode sjedinjuju prednosti citogenetičkih i molekularnih

metoda ispitivanja. Zasnivaju se na hibridizaciji komplementarnih sekvenci nukleinskih kiselina. Nove metode ispitivanja omogućuju detaljnu analizu strukture kromosoma, kromosomskih aberacija i identifikaciju sitnih submikroskopskih poremećaja genoma što klasičnim pristupom ispitivanja nije moguće.

Suvremene metode molekularne citogenetike, za razliku od klasičnih citogenetičkih metoda, nisu ovisne o proliferativnoj aktivnosti stanica. Tako se korisne informacije mogu dobiti analizom stanica koje su zbog diferencijacije izgubile sposobnost proliferacije ili se u trenutku ispitivanja nalaze u stadiju interfaze. Mogućnost analize genoma interfaznih stanica je od praktičnog interesa u onkologiji, a posebno u ispitivanjima kromosomskih poremećaja stanica solidnih tumora. Neophodno je imati na umu da svaka od spomenutih metoda ima prednosti i nedostatke. Odabir metode ispitivanja ovisi o uputnoj dijagnozi, cilju ispitivanja i uzorku, dok interpretacija rezultata ispitivanja ovisi o upotrijebljenoj metodi analize. U populaciji djece sa solidnim tumorom provode se citogenetička ispitivanja konstitucijskog kariotipa i analize genoma tumorskih stanica.

Cilj ispitivanja konstitucijskog kariotipa bolesnika je:

- otkrivanje stanja koja se mogu povezati s većim rizikom za nastanak tumorske bolesti;
- identifikacija kromosomskih regija koje imaju važnu ulogu u malignom procesu.

Upravo su ispitivanja konstitucijskog kariotipa u bolesnika s tumorskom bolesti te analize genoma tumorskih stanica omogućila otkrivanje tumor supresorskih gena i razumijevanje njihove uloge u malignom procesu. Od posebnog je interesa nalaz intersticijske delecije dugog kraka kromosoma 13 (13q14) u bolesnika s retinoblastomom i kratkog kraka kromosoma 11 (11p13) u bolesnika s Wilmsovom tumorom (5). Identifikacija konstitucijske delecije u limfocitima bolesnika te stečene delecije dugog kraka kromosoma 13 i kratkog kraka kromosoma 11 u stanicama tumora omogućila je otkrivanje gena za retinoblastom i Wilmsov tumor i ispitivanje molekularnih mehanizama njihova djelovanja. Tako gen za retinoblastom kodira RB protein. RB protein ima ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. Aktivan oblik proteina je vezan za E2F1 transkripcijski faktor te inhibira tranziciju stanice iz G1 u S fazu ciklusa. Pod djelovanjem ciklina D dolazi do fosforilacije RB proteina, njegove inaktivacije, oslobađanja E2F1 transkripcijskog faktora i aktivacije transkripcije gena neophodnih za ulazak stanice u S

\*Klinika za dječje bolesti Zagreb

Adresa za dopisivanje:  
Prof. dr. sc. Iskra Petković  
Klinika za dječje bolesti Zagreb  
10000 Zagreb, Klaićeva 16

fazu ciklusa i početak DNA replikacije. Gubitak funkcije RB proteina uzrokuje nekontroliranu proliferaciju stanica.

Tumor supresorski geni su recesivni na staničnom nivou te je za razvoj tumora neophodna inaktivacija oba alela u istoj somatskoj stanici. Kod hereditarnih oblika tumora prisutna je konstitucijska inaktivacija jednog od dva alela, dok je za nastanak tumora neophodan gubitak funkcije drugog alela u odgovarajućoj somatskoj stanici. Za razliku od hereditarnih oblika bolesti, kod sporadičnih tumora prisutna je inaktivacija oba alela u istoj somatskoj stanici. Mehanizmi inaktivacije tumor supresorskih gena su različiti, a uključuju točkaste mutacije i poremećaje kromosoma kao što su delecije. Poznato je da mnogi genetički sindromi nose veći rizik za pojavu tumorske bolesti. Tako se Wilmsov tumor javlja u 30-50% bolesnika s WAGR mikrodelecijskim sindromom i Denys-Drash sindromom te u 10% bolesnika s Beckwith-Wiedermannovim sindromom. Sindrom testikularne feminizacije se povezuje s pojavom gonadoblastoma, dok autosomno recesivne sindrome kromosomskih lomova obilježava nestabilnost genoma i češća pojava leukemija, limfoma i solidnih tumora (6). Svrha citogenetičkih ispitivanja tumorskih stanica jest:

- identifikacija stečenih kromosomskih poremećaja;
- otkrivanje poremećaja specifičnih za pojedine oblike i stadije tumorske bolesti;
- identifikacija kromosomskih regija koje imaju važnu ulogu u nastanku i evoluciji bolesti.

U tumorskim stanicama otkriveni su različiti poremećaji genoma kao što su delecije, duplikacije, translokacije, homogenoobojene regije (hsr), double minutes (dms) kromosomi, poremećaji broja kromosoma kao što su poliploidije i aneuploidije. Danas su poznate osnovne citogenetičke osobine populacije tumorskih stanica i to:

- klonska priroda kromosomskih poremećaja;

- specifičnost kromosomskih aberacija za pojedine tipove tumora;
- nestabilnost genoma;
- evolucija tumorskog klona;
- postojanje primarnih i sekundarnih kromosomskih poremećaja.

Od posebnog znanstvenog i praktičnog interesa u medicini su aberacije specifične za pojedine tipove bolesti. Citogenetskim ispitivanjem malignih stanica otkriveni su danas brojni kromosomski poremećaji specifični za pojedine tipove i podtipove bolesti. Većina podataka se odnosi na leukemije, dok su rezultati ispitivanja solidnih tumora oskudni i za sada nezadovoljavajući. Razlog tome su poteškoće na koje se nailazi prilikom citogenetske analize solidnog tumora kao što su poteškoće u obraditkiva i pripremi odgovarajuće suspenzije stanica, niska proliferativna aktivnost tumorskih stanica, loš morfološki izgled kromosoma i kompleksnost kromosomskih aberacija. Tumorski proces se najčešće otkriva u kasnijim stadijima evolucije malignog klona kada su pored primarnih prisutne brojne, često veoma složene sekundarne kromosomske aberacije. U ta-

kovim je situacijama veoma teško razlučiti primarane od sekundarnih aberacija, te identificirati kromosomsku aberaciju specifičnu za pojedini tip tumora. Unatoč navedenim poteškoćama i relativno malog broja izvršenih analiza, danas poznajemo citogenetske osobine i specifične aberacije za neke tipove solidnih tumora dječje dobi (Tablica 1) (7, 8).

Pored praktične koristi u dijagnostici, istraživanja stečenih kromosomskih poremećaja, identifikacija zahvaćene kromosomske regije i mjesta loma su od znanstvenog interesa jer doprinose otkrivanju onkogena i razumijevanju molekularnih mehanizama njihova djelovanja. Onkogeni su druga skupina gena koji imaju važnu ulogu u procesu nastanka i evoluciji tumorske bolesti. Njihova je uloga na staničnom nivou dominantna, a to znači da je dovoljna aktivacija jednog alela za manifestaciju tumorskog fenotipa. Citogenetički poremećaji kromosoma, kao što su traslokacije, su jedan od mehanizama njihove aktivacije. Rezultati citogenetičkih ispitivanja tumorskih stanica imaju praktičnu primjenu u medicini i to prilikom:

Tablica 1.

*Pregled specifičnih kromosomskih poremećaja za pojedine solidne tumore dječje dobi*

Table 1

*An overview of specific chromosomal disturbances for specific solid tumours in childhood*

Tumor	Kromosomski poremećaj	Geni
Neuroblastom	Dms/hsr Del(1p) Višak 17q21-qter	N-Myc
Alveolarni rabdomiosarkom	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	PAX3-FKHR PAX7-FKHR
Ewingov sarkom, periferni neuroektodermalni tumor	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12)	FLI1-EWS ERG-EWS
PNET	i(17q)	TP53
Sinovijalni sarkom	t(X;18) (p11.2;q11.2)	SSX-SYT
Germ cell tumor	i(12p)	?
Kongenital fibrosarkoma	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3
Miksoid liposarkom	t(12;16)(q13;p11)	FUS-CHOP
"Clear cell" sarkom	t(12;22)(q13;q12)	ATF1-EWS
Miksoidni hondrosarkom	t(9;22)(q22;q12)	CHN-EWS
Dezmoplastični tumor "malih okruglih stanica"	t(11,22)(p13;q12)	WT1-EWS

- određivanja klonskog podrijetla tumorskih stanica;
- postavljanja precizne dijagnoze tumorske bolesti;
- postavljanja precizne dijagnoze stadija bolesti;
- prosudbe učinkovitosti terapijskog postupka;
- prosudbe tijeka i ishoda bolesti.

Brojna sustavna ispitivanja stečenih poremećaja kromosoma ukazala su na citogenetičku heterogenost pojedinih morfoloških tipova bolesti. Kako se proširuju naše spoznaje o specifičnim kromosomskim aberacijama tako i citogenetičke analize solidnih tumora imaju sve veći značaj u postavljanju dijagnoze i predikciji tijeka bolesti u djece sa solidnim tumorom. Uloga citogenetičkog ispitivanja u postavljanju dijagnoze, procjeni stadija te predikciji tijeka bolesti može se ilustrirati na primjeru neuroblastoma. Neuroblastom je jedan od najčešćih solidnih tumora dječje dobi. Danas je poznato da u stanicama neuroblastoma nalazimo opsežne kvantitativne promjene gena, double minute kromosomi, homogenoobojene regije, N-myc amplifikaciju, strukturne aberacije kromosoma broj 1 i 17 (9, 10). Poznata je također genetička heterogenost tumora te se razlikuju tumori s vrijednostima količine DNA ili modalnim brojem kromosoma u diploidnoj, triploidnoj i tetraploidnoj regiji. Uočena je, također, povezanost količine DNA i dobi te stadija bolesti. Tako su tumori s triploidnom količinom DNA češći u bolesnika do godine dana starosti i 1, 2, 4-S stadijem bolesti.

Većina bolesnika s neuroblastomom u diploidnoj ili tetraploidnoj regiji su stariji od jedne godine i tumorom u 3 i 4 stadiju. Ispitivanja količine DNA ukazuju da je DNA indeks vrijedan indikator tijeka i ishoda bolesti te odgovora na terapijski postupak. Neuroblastomi s DNA indeksom u triploidnoj regiji imaju povoljniji tijek, dok tumori u diploidnoj i tetraploidnoj regiji imaju agresivniji tijek i loše reagiraju na terapiju.

Većina tumora s modalnim brojem kromosoma u diploidnoj i tetraploidnoj

regiji ima pridružene strukturne aberacije kromosoma, dok su ove veoma rijetka pojava u triploidnim tumorima. Double minute kromosomi i homogeno obojene regije su druga citogenetička osobina neuroblastoma. Tako su dms otkriveni u otprilike 30% primarnih tumora dok su hsr znatno rjeđa pojava. Danas znamo da su dms i hsr u stanicama neuroblastoma citološka manifestacija amplifikacije N-myc onkogeno. Promjena je prisutna već u vrijeme postavljanja dijagnoze. Amplifikacija N-myc je povezana s diseminiranim oblicima tumora, uznapredovanim stadijem bolesti i lošom prognozom. Otkrivena je u svega 5-10% tumora u stadiju 1, 2 ili 4-S, te u 38% u stadiju 3 i 4. Dokazana je također povezanost amplifikacije onkogeno i tijeka bolesti. To je loš prognostički znak neovisan o stadiju bolesti, dobi ili drugim kliničkim parametrima. Strukturni poremećaj kromosoma broj 1 uz gubitak terminalnog segmenta kratkog kraka identificiran je u 70-85% primarnih tumora i staničnih linija. Strukturni poremećaji kromosoma broj 1 u stanicama neuroblastoma su veoma raznoliki. Mjesta loma raspoređena su po čitavoj dužini kratkog kraka, a najčešće se nalaze između 1p32 → 1pter.

Nalaz specifičnog kromosomskog poremećaja može biti bitan u postavljanju precizne dijagnoze bolesti i doprinijeti rješavanju dijagnostičkih problema. To se prije svega odnosi na skupinu tumora poznatu pod zajedničkim nazivom "tumori malih okruglih stanica". U skupinu tumora ubraja se Ewingov sarkom, rhabdomyosarkom (RMS), neuroblastom, non-Hodgkinov limfom, retinoblastom i Wilmsov tumor (8). Pojedine tipove tumora "malih-okruglih stanica" je ponekad veoma teško razlikovati na temelju morfoloških i histopatoloških osobina. U takovim se slučajevima za postavljane precizne dijagnoze koriste citogenetički markeri specifični za pojedine tipove bolesti. Tako je na primjer translokacija t(-11;22)(q24;q12) identificirana u otprilike 90% Ewing sarkoma. Rhabdomyosarkom je najčešći tumor mekih tkiva u djece i predstavlja heterogenu skupinu bolesti te se na osnovu histoloških osobina razlikuju 4 podtipa bolesti. Citogenetičkim ispitivanjem otkriveni su numerički i strukturni poremećaji. Recipročna tran-

slokacija t(2;13)(q35;q14) je specifična za alveolarni RMS. Aberacija je identificirana u 70-90% primarnih tumora. U pojedinim slučajevima, umjesto uobičajene t(2;13) identificirana je translokacija kromosoma 1 i 13 s mjestima loma u 1p36 i 13q14.

Iz ovog kratkog pregleda provedenih ispitivanja očito je da citogenetičke analize mogu biti od koristi u postavljanju precizne dijagnoze solidnog tumora, procjeni stadija te predikciji tijeka i ishoda bolesti.

#### LITERATURA

1. Kucheria K, Jobanputra V, Talwar R, Ahmed ME, Dada R, Sivakumaran TA. Human molecular cytogenetics: diagnosis, prognosis and disease management. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 2003; Suppl 1: 225-33.
2. Muhlmann M. Molecular cytogenetics in metaphase and interphase cells for cancer and genetic research, diagnosis and prognosis. *Application in tissue sections and cell suspensions. Genetics and Molecular Research* 2002; 1: 117-27.
3. Smeets DFCM. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clinical Biochemistry* 2004; 37: 439-46.
4. Wang N. Methodologies in cancer cytogenetics and molecular cytogenetics. *Am j med Genet* 2002; 115: 118-24.
5. Marsh D, Zorib RT. Genetic insights into familial cancer; update and recent discoveries. *Cancer Letter* 2002; 181: 125-64.
6. Durek NJ. Chromosome breakage syndromes and cancer. *Am J med genet (Semin. Med. Genet.)* 2002; 115: 125-9.
7. Raimondi SC. Fluorescence in situ hybridization: molecular probes for diagnosis of pediatric neoplastic diseases. *Cancer Invest* 2000; 18: 135-47.
8. Anderson J, Pritchard-Jones K. The molecular basis of children's cancer u Pinkerton R, Plowman PN. *Pediatric oncology*, ed. Arnold, London 2004; 25-51.
9. Trakhtenbrota L, Cohen N, Betts DR, Niggli FK, Amariglio N, brok-Simoni F, Rechavi G, Maitai D. Interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 17 and 17q region in neuroblastoma: are they secondary events? *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 137: 95-101.
10. Vasudevan SA, Nuchtern JG, Shohet JM. Gene profiling of high risk neuroblastoma. *World J Surg* 2005; 29: 317-24.

*Summary*

CYTOGENETICS AND NEOPLASTIC DISEASES

*I. Petković*

*This paper review the advances in cytogenetic methods, chromosome analysis and chromosome aberrations in children with solid tumours, briefly outlines the current knowledge on cytogenetic characteristics of malignant cell population, specific chromosomal abnormalities with special attention to the clinical usefulness of cytogenetic markers in diagnosis, prognosis and management of children with solid tumours.*

Descriptors: SOLID TUMOURS, CYTOGENETICS, CHILDREN