

АБНОРМАЛНОСТИ ХРОМОЗОМА 8 КОД БОЛЕСНИКА СА ПРИМАРНИМ МИЈЕЛОДИСПЛАСТИЧНИМ СИНДРОМИМА: КЛИНИЧКИ И БИОЛОШКИ ЗНАЧАЈ

Драгомир МАРИСАВЉЕВИЋ¹, Милена ПАНТИЋ-ЛУДОШКИ²,
Ангелина НОВАК², Весна ЂОРЂЕВИЋ²

¹Клиничко-болнички центар „Бежанијска коса”, Београд;
²Институт за хематологију, Клинички центар Србије, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Код болесника са примарним мијелодиспластичним синдромима (*MDS*) сваки је хромозом подложен реаранжману.

Циљ рада Циљ рада је да утврди клинички и биолошки значај абнормалности хромозома 8 код болесника са примарним *MDS*.

Метод рада Цитогенетска анализа вршена је на ћелијама костне сржи директним методом и методом 24-сатне, односно 48-сатне нестимулисане ћелијске културе. Хромозоми су добијани модификованом методом *HG*-трака.

Резултати Кариотип ћелија костне сржи анализиран је при постављању дијагнозе код 271 болесника. Утврђено је да нормалан кариотип има 162 болесника, а аберантан кариотип 109 болесника (40,2%). Код 22 од 109 болесника са аберантним кариотипом (10,9%) установљене су абнормалности хромозома 8. Тризомија хромозома 8 била је присутна код 13 болесника, као „једноставна” аберација код њих 10, а удружена са другим аберацијама у склопу „комплексних” кариотипова код још 3 болесника. Монозомија или делеција хромозома 8 запажена је код 9 болесника, искључиво у склопу „комплексних” кариотипова. У току цитогенетског праћења, ни код једног болесника није утврђена појава +8 у еволутивном кариотипу, док је код два болесника који су при дијагнози имали +8 утврђено спонтано ишчезавање клона током 23, односно 72 месеца од њеног постављања и прве анализе кариотипа. Преживљавање болесника са +8 као једином аномалијом у кариотипу није се статистички значајно разликовало од преживљавања болесника са нормалним кариотипом ($p=0,47$), наспрот веома кратком преживљавању болесника са губитком генетског материјала на хромозому 8, у склопу „комплексних” кариотипова (медијана 4 месеци).

Закључак Абнормалности хромозома 8 честе су у примарном *MDS*. Присуство +8 као једине аномалије у кариотипу не утиче неповољно на исход болести, за разлику од абнормалности у којима постоји губитак генетског материјала на хромозому 8.

Кључне речи: хромозом 8; абнормалности; мијелодиспластични синдроми; биологија; прогноза; учесталост

УВОД

Испитивање хромозома је базично испитивање болесника са мијелодиспластичним синдромима (*MDS*), имајући у виду да је налаз „понављаних” хромозомских аберација објективни показатељ присуства клона [1]. Најчешће су нумеричке аберације хромозома 5, 7, 8 и Y, и структурне аберације (углавном интерстицијалне делеције) хромозома 5, 7, 11, 12 и 20, али ниједан од ових хромозомских реаранжмана није карактеристичан за одређени *FAB* подтип [2]. Хромозомске аберације су вероватно „касни” догађаји у патогенези *MDS* и одраз унутарклонске еволуције болести. На то указује знатно мања учесталост хромозомских аберација у *MDS* ниског ризика (*RA*, *RARS*) него у знапредовалог *MDS* (*RAEB*, *RAEB-t*), а нарочито терапијом посредованог *MDS* (*t-MDS*) или *MDS/AML* [3]. Присуство хромозомских аберација при дијагнози *MDS* једна је од најзначајнијих варијабли за прогнозу исхода болести, при чему су, по Интернационалном прогностичком бодовном систему [4], болесници са +8 сврстани у групу „интермедијарног” ризика.

ЦИЉ РАДА

Циљ овог рада је да утврди клинички и биолошки значај абнормалности хромозома 8 код болесника са примарним мијелодиспластичним синдромима.

МЕТОД РАДА

Испитан је 271 болесник са новоткривеним примарним *MDS*, дијагностикован у периоду од јула 1987. године до децембра 1998. године [5]. Дијагноза *MDS* постављена је на основу стандардних критеријума *FAB* кооперативне групе [6], уз модификације предложене од Рајзенштајна (*Reizenstein*) и Оста (*Ost*) [7].

Цитогенетска анализа вршена је на ћелијама костне сржи директним методом и методом 24-сатне, односно 48-сатне нестимулисане ћелијске културе. Хромозоми су добијани модификованом методом *HG*-трака [8]. Различит број ћелија у деоби био је анализиран по сваком болеснику понаособ, а у случајевима болесника са нормалним кариотипом прегледано је најмање 20 митоза. За сваког болесника сложена су најмање два кариограма. Номенклатура коришћена за опис цитогенетске абнормалности следила је препоруке Интернационалног система цитогенетичке номенклатуре код људи [9]. Према препорукама Четвртог међународног састанка о хромозомима у леукемији (*Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1984*), патолошки клон је дефинисан као присуство најмање 2 ћелије са истим екстрахромозомом или структурном аберацијом, или најмање три ћелије са недостатком истог хромозома. Маркером (*mar*) је сматран структурно аберантан хромозом чији распоред трака није могао бити

препознат, док је дериватом (*der*) сматран познати хромозом са непознатим структурним реаранжманом. По препоруци ISCN [9], хромозомске аберације је класификоване су као „једноставне” („појединачне” и „двоструке” аберације) и „комплексне” хромозомске аберације (у реаранжман је укључено ≥ 3 хромозома). У случају могућег постојања конституционалног кариотипа паралелно су анализирани хелије костне сржи и РНА-стимулисани лимфоцити периферне крви.

Статистичка обрада података урађена је компјутеризованом обрадом података. За непараметријске тестове је проценена значајности разлика вршена применом медијана и χ^2 -теста, док су параметријски тестови упоређивани Студентовим *t*-тестом. За анализу функција преживљавања болесника кориштена је метода Каплана (*Kaplan*) и Мејера (*Meier*). Анализа значајности ових разлика у функцији испитиваних варијабли вршена је *log-rank* тестом.

РЕЗУЛТАТИ

Нормалан кариотип утврђен је код 162 болесника, док је 109 болесника (40,2%) имало аберантан кариотип. Број анализираних метафаза код болесника са аберантним кариотипом варирао је од 6 до 48. Код 22 од 109 болесника са аберантним кариотипом (10,9%) биле су присутне абнормалности хромозома 8. Абнормалности хромозома 8 биле су, ако из вида изумемо хромозоме 5, најчешће аберације у кариотипу наших болесника са *pMDS* (Табела 1). У већини случајева *pMDS* са реаранжманом хромозома 8 (91,3%) постојао је мозаични кариотип, односно истовремено присуство нормалних и абнормалних метафаза. При томе, проценат абнормалних метафаза у мозаичном кариотипу варирао је у опсегу 10-95%.

Абнормалности хромозома 8 биле су присутне у кариотипу болесника са *pMDS*, било као „једноставне” аберације, било удружене са другим хромозомским абнормалностима у оквиру такозваних „комплексних” кариотипова. Тризомија хромозома 8 (+8) запажена је код 13 болесника – као „једноставна” аберација код 10 болесника, а удружена са другим аберацијама у склопу „комплексних” кариотипова код још 3. У 3 од 10 случајева „једноставних” аберација, +8 је била удружена са аберацијама типа тризомије још по једног хромозома: +12, +14 и +18. „Једноставне” аберације хромозома 8 биле су присутне у свим *FAV* подтипovima (углавном *RA* и *RAEB*).

Абнормалности хромозома 8 биле су чест налаз у „комплексним” кариотиповима наших болесника – установљене су код 12 од 26 болесника са „комплексним” кариотипом (45%). При томе, типови абнормалности хромозома 8 у „комплексним” кариотиповима разликовали су се од типова абнормалности у „једноставним” кариотиповима, пошто је доминирала монозомија (код 7 болесника), односно делеција дугог (*q*) крака (код 2 болесника).

У току цитогенетског праћења ни код једног болесника није утврђена појава +8 у „еволутивном” кариотипу, док је код два болесника који су при дијагнози имали +8 утврђено спонтано ишчезавање клона

ТАБЕЛА 1. Типови и учесталост реаранжмана свих хромозома (код 109 болесника, укључујући и мултипле аберације кариотипа).
TABLE 1. The incidence of different types of chromosomal rearrangements in 109 patients, including multiple karyotypic aberrations.

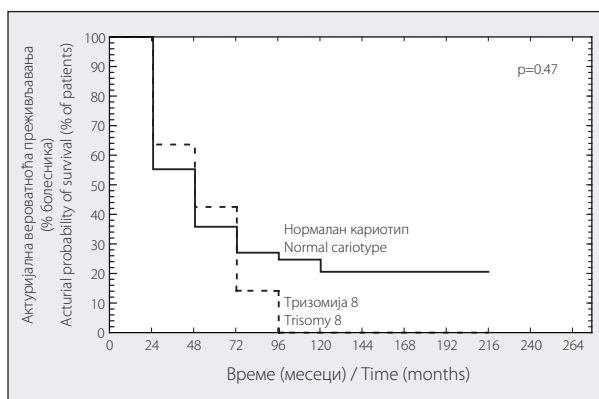
Хромозом Chromosome	Тризомија Trisomy	Монозомија Monosomy	Делеција Deletions	Остале аберације Other*	Укупно Total
1		1	3	10	14 (6.9%)
2				4	4 (2.0%)
3	1	3		6	10 (5.0%)
4		4		1	5 (2.5%)
5		6	21	3	30 (14.8%)
6	1		3	2	6 (3.0%)
7		11	5	1	17 (8.4%)
8	13	7	2		22 (10.9%)
9		4	1	3	8 (4.0%)
10		2			2 (<1.0%)
11		1		1	2 (<1.0%)
12	1	3	1		5 (2.5%)
13		2	1		3 (1.5%)
14	2	1		1	4 (2.0%)
15	1	1			2 (<1%)
16			2	4	6 (3.0%)
17		2	5	7	14 (6.9%)
18		4		1	4 (2.0%)
19	1	3		1	5 (2.5%)
20	1		7	3	11 (5.4%)
21	2	5	2	2	11 (5.4%)
22	1	4	1	1	7 (3.5%)
Y		6		1	7 (3.5%)
X			1	1	2 (<1.0%)
Укупно Total	24 (11.9%)	70 (34.7%)	55 (27.2%)	53 (26.2%)	202 (100%)

* (Не)балансиране транслокације, инверзије, дупликације, инсерције, „ринг” и друго

* (Un)balanced translocations, inversions, duplications, insertions, "rings" and similar

током 23, односно 72 месеца од њеног постављања и прве анализе кариотипа. Код другог, раније поменутог болесника, који је у кариотипу имао +8,+12 у 50% анализираних митоза, спонтано ишчезавање клона било је праћено и клиничко-хематолошком регресијом болести.

Преживљавање болесника са +8 као једином аномалијом у кариотипу није се статистички значајно разликовало од преживљавања болесника са нормалним кариотипом (27 месеци наспрам 32 месеци, $p=0,47$) (Графикон 1). Такође, између болесника са +8 као једином аномалијом у кариотипу и болесника са нормалним кариотипом нису утврђене разлике у старости, полу, тежини цитопенија, броју бласта у периферној крви и костној сржи, као и одговору на терапију (резултати нису приказани). Насупрот њима, преживљавање болесника са присуством абнормалности хромозома 8 у „комплексним” кариотиповима било је веома кратко (медијана 4 месеца), у половини случајева због брзе еволуције у акутну леукемију.



ГРАФИКОН 1. Преживљавање болесника са нормалним кариотипом наспрам болесника са тризомијом 8 као једином кариотипском аберацијом (Каплан-Мејерова крива, *log-rank* тест).

GRAPH 1. Survival of patients with normal karyotype compared to patients with trisomy 8 (Kaplan-Meier, *log-rank* test).

ДИСКУСИЈА

Учесталост хромозомских аберација од 40,2% у испитиваној групи болесника са *pMDS* у складу је са до сада објављеним резултатима метаанализа [3,4]. Наша испитивања су такође потврдила да је практично сваки хромозом подложен реаранжману у *pMDS*, да код већине болесника доминира губитак генетског материјала настао услед монозомије, делеције или небалансиране транслокације, при чему је најчешћа нумеричка аберација +8 [10] (Табела 1).

Типови реаранжмана хромозома 8 били су различити у „једноставним” и „комплексним” аберацијама болесника. Тризомија хромозома 8 била је једина аберација у „једноставним” кариотиповима, наспрот честог налаза монозомије у „комплексним” кариотиповима, при чему патогенетски значај преференцијалне појаве монозомије 8 у „комплексним” кариотиповима није јасан. У целини, абнормалности хромозома 8 су при дијагнози болести чест налаз у „комплексним” кариотиповима болесника са *pMDS* (45% болесника).

Тризомија хромозома 8 виђена је у свим *FAB* подтипovima – и као „једноставна” аберација, и у оквиру „комплексних” реаранжмана. Иако је +8 једна од најчешћих аберација у мијелоидним малигнитетима, веома се мало зна о њеном патогенетском значају или молекуларним генетским последицама. Могући патогенетски механизми одговорни за малигну трансформацију су: ефекат генске дозе, присуство специфичне мутације или „криптичне” фузије гена на дуплицираном хромозому. У последњем наведеном случају +8 би била секундарни догађај у односу на „криптични” примарни реаранжман, и тиме пре укључена у туморску прогресију него у леукемогенезу само по себи [11]. С друге стране, сматра се да конституционални тризомија 8 мозаицизам (*CT8M*) може бити значајан први корак у „мултистеп” карциногенези [12], јер су они који су од ње оболели предиспонирани развоју малигнитета, посебно мијелопродиферативних и лимфопродиферативних болести [12,13]. *CT8M* се фенотипски различито испољава (од тешких малформација и скелетних абнормално-

сти на рођењу до благо сниженог коефицијента интелигенције), па се у свим случајевима налаза +8 у кариотипу болесника препоручује пажљиво трагање за клиничким знацима *CT8M* [12].

Праћење промена у кариотипу болесника је од великог значаја за разумевање патогенезе и еволуције *MDS*, при чему поједини аутори указују да су „клонска еволуција” и „клонска експанзија” патобиолошки потпуно различити процеси [14]. Искључиво је „клонска еволуција” праћена и клиничком прогресијом болести, док „експанзија клона” може представљати експанзију већ постојећег, али до тада непознатог клона (технички гледано, неоткривеног у 20 метафаза рутинског, иницијалног прегледа кариотипа), или унутарклонску еволуцију са појавом нових, цитогенетски сродних субклонова, другачијег хромозомског реаранжмана, али без значајно повећаног малигног потенцијала у односу на матични клон [14]. Еволутивне промене у кариотипу установљене су код 25% испитиваних болесника [5], али ни код једног од тих болесника у еволутивном кариотипу нису биле присутне абнормалности хромозома 8. Насупрот томе, код два смо болесника утврдили спонтано ишчезавање +8, које је у једном случају било праћено спонтаном клиничко-цитогенетском регресијом болести, а у другом је протумачено као флукуација абнормалног клона [14,15]. Спонтано ишчезавање +8 највероватније је последица компетиције између *MDS* клона са нормалним кариотипом и +8-позитивног клона [14,16], што уз чест налаз +8 у оквиру цитогенетски „несродних” клонова [17] указује да је тризомија 8 заправо „касни” цитогенетски догађај у вишестепеном процесу настанка *MDS*.

Иако се по Интернационалном прогностичком бодовном систему [4] болесници са присуством +8 као једином аберацијом сврставају у групу „интермедијарног” ризика, нисмо утврдили разлике у дужини преживљавања између ових и болесника са нормалним кариотипом. При томе, поуздан суд о прогностичком значају присуства +8 умногоме зависи од примењене технике детекције клона. Наиме, интерфазна флуоресцентна *in situ* хибридизација (*I-FISH*) је супериорни метод за детекцију минорних или „окултних” клонова са анеуплоидијом хромозома 8, који се не могу детектовати конвенционалном (метафазном) цитогенетском анализом [18,19]. Клинички посматрано, присуство *I-FISH* абнормалности код болесника са „нормалним” кариотипом (процеђеним конвенционалном анализом) лош је прогностички знак, што указује да „окултни” клонови могу имати значајну улогу у прогресији болести [18].

ЗАКЉУЧАК

Резултати ове студије указују на значајну учесталост абнормалности хромозома 8 у примарном *MDS*, посебно у „комплексним” кариотиповима. Присуство +8 као једине аномалије у кариотипу не утиче неповољно на исход болести, за разлику од абнормалности у којима постоји губитак генетског материјала на хромозому 8.

ЛИТЕРАТУРА

- Hamblin T, Oscier D. The myelodysplastic syndrome – a practical guide. *Haematol Oncol* 1987; 5:19-34.
- Boogaerts M, Verhoef G, Demuyne H. Treatment and prognostic factors in myelodysplastic syndromes. *Baillieres Clinical Haematology* 1996; 9(1):161-83.
- Mufti G, Galton D. Myelodysplastic syndromes: natural history and features of prognostic importance. *Clin Haematol* 1986; 15:953-74.
- Greenberg P, Cox C, Le Beau M, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89(6):2079-88.
- Marisavljević D. Evolucija primarnog mijelodisplastičnog sindroma [doktorska disertacija]. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2000.
- Bennett J, Catovsky D, Daniel M, et al. FAB cooperative Group. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51:189-99.
- Reizenstein P, Ost A. Minimal diagnostic criteria for the myelodysplastic syndrome in clinical practice. *Leuk Res* 1992; 16(1):3-11.
- Novak A, Krušić M, Ludoški M, Jurkovski V. Rapid method for obtaining high quality chromosome banding in the study of hemopoietic neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 74(6):109-14.
- ISCN: An International System for Human Genetic Nomenclature. Felix Mitelman, editor. Basel: Karger; 1995.
- Mufti G. Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1992; 15:35-41.
- Paulsson K, Fioretos T, Strombeck B, Mauritzson N, Tanke HJ, Johansson B. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a multicolor and locus-specific fluorescence in situ hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 140(1):66-9.
- Seghezzi L, Maserati E, Minelli A, et al. Constitutional trisomy 8 as first mutation in multistep carcinogenesis: clinical, cytogenetic, and molecular data on three cases. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 17(2):94-101.
- Secker-Walker LM, Fitchett M. Constitutional and acquired trisomy 8. *Leuk Res* 1995; 19(10):737-40.
- White A, Hoy T, Jacobs A. Extended cytogenetic follow-up and clinical progress in patients with myelodysplastic syndrome (MDS). *Leuk Lymphoma* 1994; 12:401-12.
- Geddes A, Bowen D, Jacobs A. Clonal karyotype abnormalities and clinical progress in the myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1990; 76:194-202.
- Matsuda A, Yagasaki F, Jinnai I, et al. Trisomy 8 may not be related to the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: disappearance of trisomy 8 in a patient with refractory anaemia without haematological improvement. *Eur J Haematol* 1998; 60(4):260-1.
- Musilova J, Michalova K, Zemanova Z, Brezinova J. Multiple unrelated clones in myelodysplastic syndrome and in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 88(2):141-3.
- Rigolin GM, Bigoni R, Milani R, et al. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia* 2001; 15(12):1841-7.
- Beyer V, Castagne C, Muhlematter D, et al. Systematic screening at diagnosis of -5/del(5)(q31), -7, or chromosome 8 aneuploidy by interphase fluorescence in situ hybridization in 110 acute myelocytic leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome patients: concordances and discrepancies with conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 152(1):29-41.

ABERRATIONS OF CHROMOSOME 8 IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES: CLINICAL AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE

Dragomir MARISAVLJEVIĆ¹, Milena PANTIĆ-LUDOŠKI², Angelina NOVAK², Vesna ĐORĐEVIĆ²

¹Medical Center "Bežanijska kosa", Belgrade; ²Institute of Hematology, Clinical Center of Serbia, Belgrade

INTRODUCTION Rearrangements of any single chromosome in human karyotype have been reported in patients with pMDS.

OBJECTIVE To examine the role of aberrations of chromosome 8 in pathogenesis, clinical presentation and progression of myelodysplastic syndromes.

METHOD Cytogenetic analysis of bone marrow cells was carried out by direct method and by means of 24- and/or 48-hour unstimulated cell culture. Chromosomes were obtained by modified method of HG-bands.

RESULTS On presentation, 109 out of 271 successfully karyotyped patients (40,2%) had abnormal karyotypes. Among them, 22 patients (10,9%) had aberrations of chromosome 8. Ten patients had trisomy 8 as "simple" aberration whilst additional three cases had trisomy 8 included in "complex" karyotypes (≥ 3 chromosomes). Cases with constitutional trisomy 8 mosaicism (CT8M) were excluded using the chromosome analyses of PHA-stimulated blood cultures. On the contrary, monosomy (seven patients) or deletion of chromosome 8 (two patients) were exclusively found in "complex" karyotypes. During prolonged cytogenetic follow-up, trisomy 8 was not recorded in evolving karyotypes. In contrast, trisomy 8 disappeared in two cases during subsequent cytogenetic studies, i.e. 23 and 72 months from diagnosis, accompanied in one patient with complete hematological remission. No difference

regarding age, sex, cytopenia, blood and marrow blast count or response to treatment was found between patients with trisomy 8 as the sole aberration compared to those with normal cytogenetics. Median survival of patients with trisomy 8 as the sole aberration was 27 months, as compared to 32 months in patients with normal cytogenetics ($p=0.468$), whilst median survival of patients with aberrations of chromosome 8 included in "complex" karyotypes was only 4 months.

CONCLUSION Aberrations of chromosome 8 are common in patients with pMDS. The presence of a clone with trisomy 8 is not always the sign of disease progression or poor prognosis in MDS patients, in contrast to clones with aberrations of chromosome 8 manifesting the loss of genetic material.

Key words: chromosome 8; aberrations; myelodysplastic syndromes; biology; prognosis; incidence

Dragomir MARISAVLJEVIĆ
Kliničko-bolnički centar „Bežanijska kosa“
Autoput bb, 11070 Novi Beograd
Tel.: 011 301 0749
Faks: 011 699 937
E-mail: maris@tehnicom.net