

*Barbara Bobrowska-Korczak, Dorota Skrajnowska,
Andrzej Tokarz, Katarzyna Szpaderska*

NIESTABILNOŚĆ MIKROSATELITARNA JAKO POTENCJALNY MARKER DO BADAŃ NUTRIGENOMICZNYCH

Katedra i Zakład Bromatologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik: dr hab. *A. Tokarz* prof. nadzw.

Celem badania była ocena występowania niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych (D1Mgh6, D3Mgh7, D3Mgh9, D8Mgh11) w DNA guzów i tkance okołonowotworowej szczurów traktowanych w celu wywołania nowotworu piersi 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem, w odniesieniu do DNA izolowanego z tkanki wątrobowej zwierząt nie otrzymujących czynnika kancerogennego.

Spośród czterech badanych markerów niestabilność mikrosatelitarną stwierdzono w przypadku mikrosatelit D1Mgh6 oraz D3Mgh9. Przeprowadzone badania nie wykazały zależności między występowaniem niestabilności w 2 loci, a efektywnością indukcji nowotworowej wyrażoną ilością guzów u jednego szczura, jak również maksymalną masą guza u jednego szczura. Bardzo interesującym materiałem do badań, ze względu na obecność niestabilności mikrosatelitarnych, jest tkanka okołonowotworowa.

Hasła kluczowe: nutrigenomika, niestabilność mikrosatelitarna, nowotwór piersi
Key words: nutrigenomic, microsatellite instability, breast cancer

W ostatnich latach jednym z wiodących celów nauki o żywieniu stało się badanie, w jaki sposób składniki żywności mogą wpływać na materiał genetyczny. Nutrigenomika opisuje biologiczne i statystyczne interakcje pomiędzy związkami chemicznymi w żywności a genami, bada w jaki sposób składniki żywnościowe mogą wpływać na równowagę między stanem choroby, a stanem zdrowia poprzez wpływ na ekspresję genów lub/i strukturę genomu (1). W piśmiennictwie brakuje danych dotyczących wpływu składników diety na mechanizmy zmian genetycznych prowadzących do rozwoju raka piersi, brakuje również danych dotyczących jednolitego modelu z zastosowaniem zwierząt do prowadzenia tego typu badań (2-4).

Bardzo interesującym markerem do badań z dziedziny nutrigenomiki wydaje się być niestabilność mikrosatelitarna. Liczne prace potwierdzają występowanie zmian w mikrosatelitarnych sekwencjach DNA w raku piersi (5).

Celem badania była pilotażowa ocena występowania niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych w DNA guzów i tkance okołonowotworowej szczurów traktowanych w celu wywołania nowotworu piersi 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem, w odniesieniu do DNA izolowanego z tkanki wątrobowej zwierząt nie otrzymujących czynnika kancerogennego. Badaniem objęto następujące sekwencje mikrosateli-

tarne: D1Mgh6 (wielkość produktu PCR 127), D3Mgh7 (wielkość produktu PCR 128 pz), D3Mgh9 (wielkość produktu PCR 125 pz), D8Mgh11 (wielkość produktu PCR 146 pz).

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były guzy, tkanka okołonowotworowa oraz wątroby samic szczurów szczepu Sprague –Dawley (n=16). Zwierzęta pochodziły z Pracowni Zwierząt Laboratoryjnych Katedry i Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania uzyskały zgodę Komisji Etycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

Zwierzęta miały zapewniony ciągły dostęp do wody i paszy. Dodatkowo suplementowane były genisteiną w połączeniu z cynkiem. Przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze oraz o kontrolowanym fotookresie noc/dzień (12h/dzień).

Guzy i tkanki okołonowotworowe (losowo wybrane do badań) uzyskano od szczurów (n=10), którym w 50 i 80 dniu życia podano, w celu wywołania nowotworu sutka, sondą dożołądkową 7,12-dimetylobenzo[a]antracen w oleju rzepakowym, w dawce 80 mg/kg masy ciała. Dodatkowo badania niestabilności mikrosatelitarnej wykonano w DNA pochodzącym z tkanki wątrobowej szczurów nie traktowanych DMBA, a które przebywały w identycznych warunkach jak zwierzęta z grupy pierwszej, jak również otrzymywały tę samą dietę (n=6). W badaniu patomorfologicznym, indukowane DMBA guzy zostały zidentyfikowane jako adenocarcinoma sutka. Na ogół rak gruczołowy sutka występował w II i III stopniu złośliwości histologicznej. Nie stwierdzono występowania spontanicznych nowotworów w grupie nie otrzymującej DMBA.

Wybór markerów mikrosatelitarnych oraz metody procedur analitycznych zostały dokonane w oparciu o dane opracowane przez *Dahiya i współprac.* (6). Analizę wybranych sekwencji mikrosatelitarnych przeprowadzono metodą elektroforezy na żelach poliakrylamidowych barwionych bromkiem etydy. Powielanie sekwencji DNA przeprowadzono metodą łańcuchowej reakcji polimerazy PCR. Niestabilność mikrosatelitarną oceniano na podstawie braku ampliconu bądź obecności dodatkowego ampliconu, o innej wielkości, w żelu, w próbce badanej w porównaniu do tkanki kontrolnej, oznaczającego delecję/insercję pojedynczego nukleotydu w badanej sekwencji DNA (7).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Dla lepszego zrozumienia mechanizmów prowadzących do rozwoju raka piersi u ludzi, w badaniach laboratoryjnych często wykonuje się eksperymenty na szczurach traktowanych 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem. Nowotwory sutka indukowane chemicznie u szczurów są podobne do ludzkiego raka piersi pod wieloma względami, w tym histopatologicznie, pochodzeniem z komórek nabłonka gruczołu piersiowego, zależnością od hormonów jajnika i rozwojem guza (8).

W zastosowanym modelu badawczym efektywność indukcji nowotworowej za pomocą DMBA wynosiła 90% (9/10 szczurów) (tabela 1).

Tabela 1. Efektywność indukcji nowotworowej u szczurów traktowanych DMBA
Table 1. Effectiveness of the tumors induction at treated DMBA rats

Efektywność indukcji nowotworowej	numer szczura									
	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B
czas pojawienia się pierwszego guza u szczura [tydzień życia szczurów]	17	17	16	16	17	18	brak	18	15	17
liczba guzów	3	4	6	6	3	1	brak	2	brak danych	3
maksymalna masa guza [g]	1,85	8,71	7,14	3,39	9,05	14,68	brak	9,14	brak danych	1,44

Pierwsze palpacyjnie wyczuwalne guzy pojawiły się w 15 tygodniu życia zwierząt, czyli 3 tygodnie po podaniu drugiej dawki DMBA (w 80 dniu życia). Występowały zarówno guzy pojedyncze, jak i mnogie – maksymalnie do 6/szczura, a masa poszczególnych guzów dochodziła nawet do 15 g (14,68g).

Spośród czterech badanych markerów niestabilność mikrosatelitarną stwierdzono w przypadku mikrosatelit D1Mgh6 oraz D3Mgh9 (tabela 2). W przypadku D1Mgh6 loci niestabilność dotyczyła 2 próbek guzów (20%) oraz 3 próbek tkanki okołonowotworowej (43%), natomiast w przypadku D3Mgh9 aż 100% guzów, 100% próbek tkanki okołonowotworowej oraz 50% próbek wątroby. Niestabilność mikrosatelitarną w przypadku 2 loci stwierdzono dla próbek pochodzących od szczurów oznaczonych numerami 8B i 10B - guzy nowotworowe, 5B, 8B i 10B – tkanka okołonowotworowa. Przeprowadzone badania nie wykazały zależności między występowaniem niestabilności w 2 loci, a efektywności indukcji nowotworowej wyrażonej ilością guzów u jednego szczura, jak również maksymalną masą guza u jednego szczura. Stabilność mikrosatelitarną w przypadku wszystkich badanych próbek stwierdzono w przypadku mikrosatelit D3Mgh7 oraz D8Mgh11. Bardzo interesującym materiałem do badań, ze względu na obecność niestabilności mikrosatelitarnych, jest tkanka okołonowotworowa. W piśmiennictwie brakuje danych dotyczących tej tkanki. Tkanka okołonowotworowa jako tkanka prawidłowa powinna wykazywać cechy charakterystyczne dla materiału kontrolnego. W związku z uzyskanymi wynikami badań nasuwa się pytanie czy obecność niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych w tkance otaczającej guz piersi może świadczyć o rozprzestrzenianiu się komórek nowotworowych na sąsiednie tkanki.

W badaniach występowania niestabilności mikrosatelitarnych w nowotworach piersi w modelu z zastosowaniem szczurów oprócz DMBA stosowane są również inne związki. Najczęściej badanym materiałem są guzy i krew bądź próbki wątroby, z pominięciem tkanki okołonowotworowej (5,9-10).

Tabela 2. Analiza niestabilności mikrosatelitarnych, markerów D1Mgh6, D3Mgh7, D3Mgh9, D8Mgh11 w DNA guzów, tkanki okołonowotworowej i próbek wątroby u szczurów.
 Table 2. Analysis of microsatellite instabilities, D1Mgh6, D3Mgh7, D3Mgh9, D8Mgh11 markers, in DNA of tumors, around tissues and samples of hepatic tissues at rats.

Marker	Material badany (numer szczura/numer guza)																							
	guzy									wątroby									tkanka okołonowotworowa					
	2B guz1	3B guz3	3B guz4	4B guz2	4B guz3	5B guz2	5B guz3	8B guz1	8B guz2	10B guz1	1K	2K	3K	4K	5K	6K	1B	2B	3B	4B	5B	8B	10B	
D1Mgh6	+	+	+	+	+	+	L	+	L	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	L	L	L	
D3Mgh7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D3Mgh9	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	
D8Mgh11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

L - występowanie niestabilności mikrosatelitarnej (utrata heterozygotyczności)
 L - microsatellite instability (loss of heterozygosity)

Dahiya i współpracownicy (6) przebadali 27 różnych markerów mikrosatelitarnych występujących na chromosomach 1, 3, 5, 7, 8 DNA wyizolowanego z guzów pochodzących od szczurów z nowotworami piersi indukowanymi metylnitrozomocznikiem (50 mg/kg masy ciała). Wykazali, że w 30% (9/30) przypadków badanych próbek niestabilność mikrosatelitarna występowała w minimum 1 locus: sześć przypadków MI stwierdzono dla loci D5Mit11, D5Mgh3, pięć dla loci D1Mit14, D1Mgh6, D5Mgh5, D8Mgh10, cztery dla loci D1Mgh2, D3Mgh7, dwa dla loci D7Mit11. *Toyota* i współpracownicy (11) zbadali niestabilność mikrosatelitarną 62 markerów DNA guzów szczurów traktowanych w celu wywołania nowotworu piersi (*adenocarcinoma*) 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydyną (PhIP) bądź 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem. Zmiany długości analizowanych sekwencji występowały w 60% (9/15) próbek pochodzących od zwierząt traktowanych PhIP i w 17% (2/12) próbek pochodzących od zwierząt otrzymujących DMBA, w tym mutacje w 4 loci: D3Mgh9, D9Mit3, D20Mgh1, TNF wykryto tylko w jednej analizowanej próbce, pochodzącej od szczura traktowanego PhIP. *Watanabe* i współpracownicy (12) nie wykazali występowania niestabilności mikrosatelitarnych u szczurów traktowanych PhIP.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania nie wykazały zależności między występowaniem niestabilności mikrosatelitarnej w 2 loci, a efektywnością indukcji nowotworowej wyrażonej ilością guzów u jednego szczura, jak również maksymalną masą guza u jednego szczura. Bardzo interesującym materiałem do badań, ze względu na obecność niestabilności mikrosatelitarnych, jest tkanka okołonowotworowa. Istnieją przesłanki do prowadzenia dalszych badań w kierunku poznania mechanizmów oddziaływania składników diety na częstotliwość występowania niestabilności mikrosatelitarnych z zastosowaniem wypracowanego modelu badawczego, a szczególnie z uwzględnieniem w badaniach tkanki okołonowotworowej.

B. Bobrowska, D. Skrajnowska, A. Tokarz, K. Szpaderska

MICROSATELLITE INSTABILITY AS THE POTENTIAL MARKER FOR NUTRIGENOMICS EXAMINATIONS

Summary

The aim of the present study was to assess the frequency of microsatellite instability (D1Mgh6, D3Mgh7, D3Mgh9, D8Mgh11) in DNA of tumors and around tissues of rats with mammary cancer induced with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, with reference to DNA isolated from hepatic tissues of rats not receiving the carcinogenic factor.

Out of four examined markers the microsatellite instability was stated in the case of microsatellites D1Mgh6 and D3Mgh9. The results indicate that there is not a positive correlation between the frequency of microsatellite instability in 2 loci and the intensity of DMBA induced carcinogenicity. The around tissue, on account of the presence of microsatellite instabilities, is very interesting material for examinations.

PIŚMIENICTWO:

1. *Bialek A., Tokarz A.*: Nutrigenomika-nowe spojrzenie na rolę diety w żywieniu podstawowym i leczniczym. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2006; 39, 1: 57-63.- 2. *Satia J.A., Keku T., Galanko J.A., Martin C., Doctolero R.T., Tajima A., Sandler R.S., Carethers J.M.*: Diet, lifestyle and genomic instability in the North Carolina colon cancer study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14, 2: 429-436.- 3. *Slattery M.L., Andersson K., Curtin K., Khe-Ni M., Schafter D., Samowitz W.*: Dietary intake and microsatellite instability in colon tumours. *Int. J. Cancer* 2001; 93: 601-607.- 4. *Bianchi F., Galizia E., Catalani R., Belvederesi L., Ferretti C., Corradini F., Cellerino R.*: CAT25 is a mononucleotide marker to identify HNPCC patients. *J. Mol. Diagn.* 2009; 11, 3: 248-252.- 5. *Fleischhacker M., Schmidt B.*: Circulating nucleic acids (CNAs) and Cancer - a survey. *Biochem. Biophys. Acta*, 2007; 1775: 181-232.- 6. *Dahiya R., Lee C., Zhu Z., Thompson H. J.*: Microsatellite instability in an animal model of mammary carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 1998; 13: 23 - 28.- 7. *Oda S., Maehara Y., Ikeda Y., Egashira A., Okamura Y., Takahashi I., Kakeji Y., Sumiyoshi Y., Miyashita K., Yamada Y., Zhao Y., Hattori H., Kenichi T., Ikeuchi T., Suzuki T., Sekiguchi M., Karran P., Yoshida M.A.*: Two models of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: 1628-1636.- 8. *Shan L., He M., Yu M., Qiu C., Lee N. H., Liu E. T., Snyderwine E. G.*: cDNA microarray profiling of rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 2002; 10 (23): 1561-1568.- 9. *Demokan S., Muslumanoglu M., Yazici H., Igci A., Dalay.*: Investigation of microsatellite instability in Turkish breast cancer patients. *Pathol. Oncol. Res.* 2002; 8, 2: 138-141.- 10. *Richard S.M., Bailliet G., Paez G.L., Bianchi M.S., Peltomaki P., Bianchi N.O.*: Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60: 4231-4237.- 11. *Toyota M., Ushijima T., Weisburger J. H., Hosoya Y., Canzian F., Rivenson A., Imai K., Sugimura T., Nagao M.*: Microsatellite Instability and Loss of Heterozygosity on Chromosome 10 in rat Mammary Tumors Induced by 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,4-b]pyridine. *Mol. Carcinogen.* 1996; 15: 176-182.- 12. *Watanabe N., Okochi E., Hirayama Y., Shimada Y., Yanagihara K., Yoshida M. C., Takahashi S., Mochizuki M., Sugimura T., Nagao M., Ushijima T.*: Single Nucleotide Instability without Microsatellite Instability in Rat Mammary Carcinomas. *Cancer Res.* 2001; 61: 2632-2640.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.

Praca zrealizowana w ramach projektu badawczego własnego nr N N405358339 finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego