

Barbara Bobrowska, Dorota Skrajnowska, Andrzej Tokarz, Małgorzata Kamińska

## NIESTABILNOŚĆ MIKROSATELITARNA JAKO POTENCJALNY MARKER W RAKU PIERSI

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

*Celem badania była ocena występowania niestabilności sekwencji DIMgh6, D5Mit11, D5Mgh3, D15Mgh4, D18Mgh3 DNA izolowanego z krwi i guzów szczurów, traktowanych w celu wywołania nowotworu sutka 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem. Celem pracy była ocena wybranych sekwencji mikrosatelitarnych pod kątem możliwości ich wykorzystania w charakterze markera w badaniach oddziaływania składników diety na genom, jako wstęp do badań nutrigenomicznych. W wyniku przeprowadzonych badań, występowanie niestabilności mikrosatelitarnej stwierdzono w przypadku 22% próbek guzów dla sekwencji DIMgh6. Nie wykazano występowania niestabilności dla DIMgh6 we krwi szczurów zarówno traktowanych, jak i nie traktowanych DMBA (materiał odniesienia). Stabilność mikrosatelitarna występowała w przypadku sekwencji D5Mit11, D5Mgh3, D15Mgh4, D18Mgh3, zarówno w guzach, jak i w krwi badanych zwierząt, bez względu czy otrzymywały czynnik kancerogeny czy też nie.*

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

W Polsce rak sutka stanowi około 12% wszystkich zachorowań na nowotwory, będąc na pierwszym miejscu wśród nowotworów dotykających kobiety oraz na pierwszym miejscu jako przyczyna zgonów kobiet (1).

Pomimo licznych badań prowadzonych w różnych dziedzinach nauki, w tym badań genetycznych, nadal nie udało się uzyskać wiarygodnego markera, który umożliwiłby wykrywanie tworzenia nowotworu na etapie inicjacji, jak również brakuje danych dotyczących oceny wpływu diety na rozwój procesu patologicznego (2).

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 (3).

Celem badania była ocena występowania niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych (MI) w DNA guzów wyindukowanych 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem u szczurów, w odniesieniu do DNA izolowanego z krwi zwierząt otrzymujących bądź - nie czynnik kancerogeny. Badaniem objęto

następujące sekwencje mikrosatelitarne: D1Mgh6 (wielkość produktu PCR 127 pz), D5Mit11 (wielkość produktu PCR 145 pz), D5Mgh3 (wielkość produktu PCR 102 pz), D15Mgh4 (wielkość produktu PCR 122 pz), D18Mgh3 (wielkość produktu PCR 171 pz). Celem pracy była zatem ocena wybranych sekwencji mikrosatelitarnych pod kątem możliwości ich wykorzystania jako markera w badaniach oddziaływania składników diety na genom, co mogłoby stanowić wstęp do badań nutrigenomicznych.

## MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były guzy i krew pełna samic szczurów szczepu *Sprague–Dawley* (n=15). 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 (mieszanka LAB-H, wytwórnia pasz *Andrzej Morawski*, ul. Żurawia 19, 89-240 Kcynia). Przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze oraz o kontrolowanym fotookresie noc/dzień (12h/dzień).

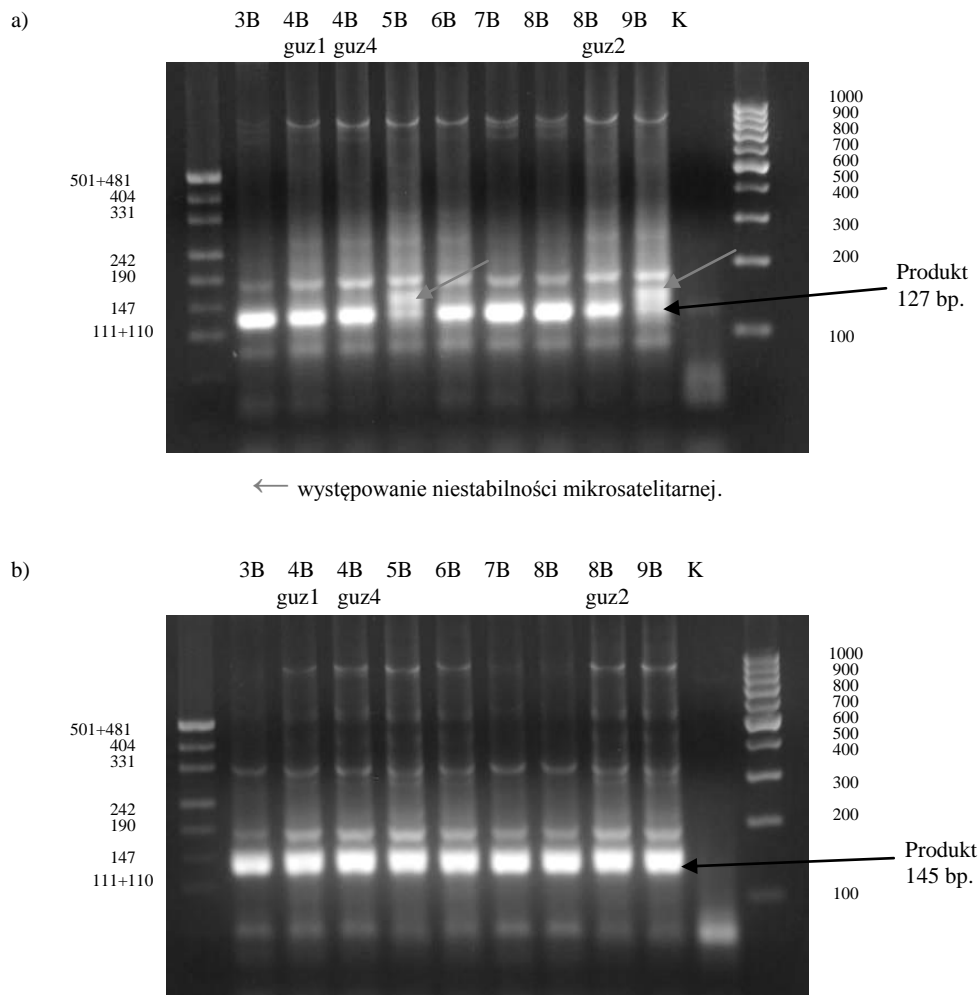
Szczurom w 50 dniu życia podano jednorazowo sondą dożołądkową 7,12-dimetylobenzo[a]antracen (7,12-dimethylbenz[a]anthracene, nr katalogowy: D 3254, Sigma, Chemical CO 14 508 St. Louis MO 63178, USA) w oleju rzepakowym, w dawce 80 mg/kg masy ciała, w celu wywołania nowotworu sutka (n=9). Dodatkowo badania niestabilności mikrosatelitarnej wykonano w DNA krwi 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 został dokonany w oparciu o dane opracowane przez *Dahiya* i współpr. (4) i *Toyota* i współpr. (5) z kilkoma własnymi modyfikacjami. Analizę wybranych sekwencji mikrosatelitarnych przeprowadzono metodą elektroforezy na żelach poliakrylamidowych bądź agarozowych barwionych bromkiem etydy. Powielanie sekwencji DNA przeprowadzono metodą łańcuchowej reakcji polimerazy PCR. Niestabilność mikrosatelitarną oceniano na podstawie obecności dodatkowego ampliconu w żelu o innej wielkości w próbce z tkanki w porównaniu do próbki z krwi, oznaczającego delecję/inercję pojedynczego nukleotydu w badanej sekwencji DNA.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W wyniku przeprowadzonych badań, występowanie niestabilności mikrosatelitarnej stwierdzono w dwóch z dziewięciu próbkach guzów (22% próbek)

w przypadku sekwencji D1Mgh6 (ryc. 1). Nie wykazano występowania niestabilności dla D1Mgh6 we krwi szczurów zarówno traktowanych, jak i nie traktowanych DMBA. Stabilność mikrosatelitarna występowała w przypadku sekwencji D5Mit11, D5Mgh3, D15Mgh4, D18Mgh3 (ryc. 1), zarówno w guzach, jak i krwi badanych zwierząt, bez względu na obecność lub – nie czynnika kancerogenego.



Ryc. 1. Analiza niestabilności mikrosatelitarnych, markerów a) D1Mgh6 (127 pz), b) D5Mit11 (145 pz), w guzach szczurów traktowanych DMBA.

Fig. 1. The analysis of microsatellite instability of markers D1Mgh6 (a) and D5Mit11 (b), in tumor rats treated by DMBA.

Z analizy uzyskanych danych wynika, że wypracowanie modelu badawczego efektywnie łączącego w sobie proces nowotworowy, niestabilność sekwencji mikrosatelitarnych, jak również nutrigenomikę jest bardzo trudne. Podobną ocenę wyrażają również w swoich pracach inni autorzy.

Negatywne wyniki dotyczące występowania niestabilności mikrosatelitarnej u zwierząt z guzami indukowanymi chemicznie uzyskali również *Weber* i współpr. (6) oraz *Watanabe* i współpr. (7). *Weber* i współpr. (6) analizując materiał pochodzący od szczurów, u których chemicznie wywoływano mięsaki (*sarcoma*), stwierdzili, że żadna spośród 140 analizowanych sekwencji, nie wykazała niestabilności mikrosatelitarnej w DNA pochodzącym z tkanki nowotworowej w odniesieniu do materiału kontrolnego, którym była tkanka prawidłowa. Podobne rezultaty uzyskali *Watanabe* i współpr. (7), którzy do indukcji nowotworu sutka u samic szczurów użyli PhIP. W żadnym z 21 analizowanych loci badacze nie zaobserwowali zmiany długości sekwencji mikrosatelitarnych. Eksperyment wykazał natomiast dużą liczbę mutacji punktowych, które powiązano ze zjawiskiem niestabilności pojedynczego nukleotydu, ang. single nucleotide instability, SNI.

*Sjöling* i współpr. (8) poddali analizie materiał uzyskany od szczurów, którym podawano DMBA w celu wywołania nowotworu typu *fibrosarcoma*. Autorzy zbadali, pod kątem występowania niestabilności, aż 215 mikrosatelitarnych loci, rozproszonych po wszystkich chromosomach. Eksperyment wykazał liczne przypadki występowania zmian loci mikrosatelitarnych w materiale pochodzącym z objętych procesem nowotworowym tkanek, zmiany te występowały najczęściej w sekwencjach ulokowanych na chromosomach 1 i 2. *Yamasaki* i współpr. (9) poza stwierdzeniem niestabilności mikrosatelitarnej w materiale pochodzącym od szczurów z indukowanymi brodawczakami, wykazali także, iż komórki, w których dochodzi do zmian sekwencji mikrosatelitarnych są bardziej podatne na występowanie mutacji genów zaangażowanych w procesy kancerogenezy.

Dane dotyczące występowania zjawiska niestabilności mikrosatelitarnej u ludzi z chorobą nowotworową piersi także są zróżnicowane. *Rush* i współpr. (10). zbadali materiał pochodzący od 47 kobiet z pierwotnym guzem piersi, posługując się do oceny MI siedmioma markerami mikrosatelitarnymi: TP53, D17S1291, D17S855, D17S856, D17S807 – ulokowanymi na chromosomie 17, 1GF1R znajdującym się na chromosomie 15q oraz D19S75 – ulokowanym na chromosomie 19. Zmianę długości sekwencji mikrosatelitarnych wykryto w ponad 28% guzów, z czego prawie 11% charakteryzowało się zmianą w co najmniej dwóch analizowanych loci. *Powierska-Czarny* i współpr. (11) poddali analizie materiał pochodzący od 70 pacjentek chorych na raka piersi pod kątem występowania MI oraz utraty heterozygotyczności. Autorzy w badaniu tym posłużyli się sześcioma markerami mikrosatelitarnymi: HUMD1S103, HUMTH01, HUMD21S11, HUMD18S51, HUMFIBRA oraz HUMAMGXY. U 6 (8%) spośród 70 pacjentek objętych badaniem stwierdzono MI-pozytywne guzy, a w guzach pochodzących od 31 kobiet (44%) wykryto utratę heterozygotyczności. Natomiast według *Anbazhagana* i współpr. (12) niestabilność mikrosatelitarna jest bardzo rzadkim zjawiskiem w raku piersi. Do tego wniosku doszli oni analizując 267 próbek guzów uzyskanych od kobiet chorych na raka piersi, z wykorzystaniem aż 104 markerów mikrosatelitarnych ulokowanych na 11 chromosomach. Jedynie w 10 przypadkach

na ponad 10000 wykonanych reakcji amplifikacji wybranych sekwencji mikrosatelitarnego DNA, autorzy odnotowali zmianę długości produktu PCR w próbkach badanych w odniesieniu do materiału kontrolnego, którym było DNA wyizolowane ze zdrowych tkanek. Badacze stwierdzili również brak mutacji genów naprawy typu mismatch w analizowanych guzach.

## WNIOSKI

1. W wyniku przeprowadzonych badań, występowanie niestabilności mikrosatelitarnej stwierdzono w przypadku 22% próbek guzów dla sekwencji D1Mgh6. Nie wykazano występowania niestabilności dla D1Mgh6 we krwi szczurów zarówno traktowanych, jak i nie traktowanych DMBA (materiał odniesienia).

2. W zastosowanym modelu badawczym, nie wykazano występowania niestabilności mikrosatelitarnej w przypadku sekwencji D5Mit11, D5Mgh3, D15Mgh4, D18Mgh3, zarówno w guzach, jak i we krwi badanych zwierząt, bez względu na fakt otrzymywania lub nie-czynnika kancerogenego.

3. Występowanie niestabilności mikrosatelitarnej w przypadku sekwencji D1Mgh6 daje podstawę do poszukiwania, w zastosowanym modelu badawczym, następnym markerów do badań nutrigenomicznych.

B. Bobrowska, D. Skrajnowska, A. Tokarz, M. Kamińska

## MICROSATELLITE INSTABILITY MARKERS IN MAMMARY CELLS

### Summary

The aim of the present study was to investigate the effect of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on microsatellite instability at D1Mgh6, D5Mit11, D5Mgh3, D15Mgh4, D18Mgh3 loci within the rat genome. In this study we examined the possible role of microsatellite instability as a marker for detection dietary interventions on the development of mammary cancer.

## PIŚMIENNICTWO

1. Smolarz B., Romanowicz-Makowska H., Kozłowska E., Zadrozny M., Stetkiewicz T., Pertyński T., Kulig A.: Niestabilność mikrosatelitarna w raku piersi. *Prz. Menopauz.*, 2004; 6: 40–46. - 2. Fleischhacker M., Schmidt B.: Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer - a survey. *Biochem. Biophys. Acta*, 2007; 1775(1): 181-232. - 3. 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; 23(10): 1561-1568. - 4. Dahiya R., Lee C., Zhu Z., Thompson H.J.: Microsatellite instability in an animal model of mammary carcinogenesis. *Int. J. Oncol.*, 1998; 13(1): 23–28. - 5. 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. Carcinog.*, 1996; 15(3): 176-182. - 6. Weber A., Strehl A., Springer E., Hansen T., Schad A., Kirkpatrick J.: Biomaterial-induced sarcomagenesis is not associated with microsatellite instability. *Virchows. Arch.*, 2009; 454(2): 195-201. - 7. 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(6): 2632-2640. - 8. *Sjöling Å., Walentinsson A., Levan G., Klinga-Levan K.*: Microsatellite marker analysis of allelic imbalance in a rat fibrosarcoma model. *J. Exp. Anim. Sci.* 2000; 41: 27-31. - 9. *Yamasaki H., Mironov N.*: Genomic instability in multistage carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, 2000; 112-113: 251-256. - 10. *Rush E.B., Calvano J.E., Van Zee K.J., Zelenetz A.D., Borgen P.I.*: Microsatellite instability in breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 1997; 4(4): 310-315.

11. *Powierska-Czarny J., Miścicka-Śliwka D., Czarny J., Grzybowski T., Woźniak M., Drewa G., Czechowicz W., Sir J.*: Analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer with the use of a well characterized multiplex system. *Acta Biochim. Pol.*, 2003; 50(4): 1195-1203. - 12. *Anbazhagan R., Fujii H., Gabrielson E.*: Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5(4): 839-844.

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