

Barbara Bobrowska, Andrzej Tokarz, Małgorzata Kamińska

NIESTABILNOŚĆ MIKROSATELITARNA JAKO MARKER W BADANIACH WPŁYWU SKŁADNIKÓW DIETY NA POWSTAWANIE NOWOTWORÓW

Katedra i Zakład Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. nadzw. dr hab. *A. Tokarz*

*Celem badań było sprawdzenie możliwości zastosowania zjawiska niestabilności pięciu wybranych sekwencji mikrosatelitarnych (fragmentów D1Mgh6, D5Mit11, D15Mgh4, D18Mgh3, D5Mgh3) we krwi u szczurów traktowanych 7,12-dimetylobenzo[*a*]antracenenem do diagnozowania wczesnych etapów nowotworu piersi, jak również oceny wpływu składników diety na powstawanie biopskaźnika i przebieg procesu nowotworzenia.*

Hasła kluczowe: niestabilność sekwencji mikrosatelitarnych, kancerogeneza, DMBA.

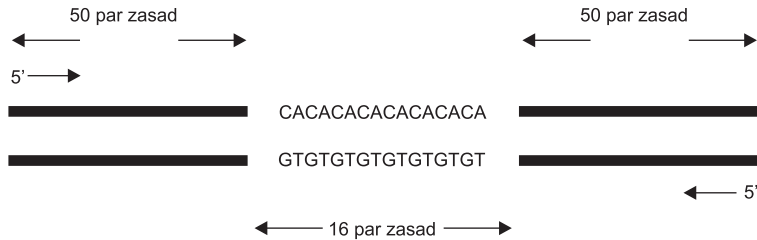
Key words: microsatellite instability, carcinogenesis, DMBA.

Obecnie na całym świecie dużo uwagi poświęca się badaniom dotyczącym niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych pod kątem możliwości ich wykorzystania do diagnozowania wczesnych etapów rozwoju stanów patologicznych. Bardzo ważnym elementem tych prac jest uwzględnienie wpływu czynników dietetycznych na powstawanie i reagowanie wybranego biopskaźnika w przebiegu procesu chorobowego.

Około 30% genomu człowieka tworzą tzw. sekwencje powtarzające się, wśród których na szczególną uwagę zasługują te, które mają ułożenie tandemowe i formują tzw. satelitarny DNA. Satelitarny DNA stanowi ok. 10% genomu i dzieli się na 3 frakcje: makro-, mini-, mikrosatelitarny DNA (1).

Odcinki mikrosatelitarnego DNA nie są dłuższe od 1 kb, składają się z ok. 10–100 powtórzeń określonej sekwencji 2–6 zasad (ryc. 1). Najczęściej występującymi sekwencjami mikrosatelitarnymi w genomach większości gatunków są powtórzenia dwunukleotydowe. Często występują układy typu: (AC)*n*, (AGC)*n*, (AATG)*n* (A-adenina, G-guanina, C-cytozyna, T-tymina). Funkcją bądź/i efektem obecności mikrosatelit w genomie są: organizacja chromatyny (organizacja chromosomów, struktura DNA, struktura telomerów i centromerów), regulacja procesów metabolicznych w DNA (replikacja, rekombinacja, cykl komórkowy) oraz regulacja działania genów (transkrypcja, translacja, wiązanie białek) (1, 2, 3).

Zmienność sekwencji mikrosatelitarnych może być skutkiem zachodzących w tych regionach mutacji, prowadzących w konsekwencji do rozwoju procesu patologicznego. Zjawisko to określamy mianem niestabilności mikrosatelitarnej (MI). Im dłuższy motyw tym większe tempo mutacji. Badania niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych coraz częściej wykorzystywane są jako narzędzie w klasyfikacji



Ryc. 1. Zjawisko występowania sekwencji mikrosatelitarnych w DNA (2).

Fig. 1. Occurrence of microsatellite sequences in DNA (2).

różnych typów chorób w tym: nowotworów, chorób układu nerwowego, przewodu pokarmowego, płuc (1, 2, 3).

Niestabilność mikrosatelitarna została po raz pierwszy opisana w dziedzicznych niepolipowatych rakach jelita grubego. Występuje ona w większości przypadków tego typu nowotworu (55–86%). Częstość obecności MI związana jest ze stopniem klinicznego zaawansowania choroby, w tym przerzutami, stopniem zróżnicowania histopatologicznego nowotworu, jak również przeżywalnością. Niestabilność mikrosatelitarną stwierdzono ponadto w rakach endometrium, sutka, żołądka, trzustki, jajnika, prostaty, płuc, miedniczek nerkowych i moczowodu (1, 3).

W badaniach prowadzonych przez *Mayall* i współpr. (4), w których uczestniczyło 17 kobiet chorych na raka piersi niestabilność mikrosatelitarną stwierdzono w 3 z badanych próbek guzów i w 1 z badanych próbek surowicy. U jednej z pacjentek niestabilność sekwencji FgA występowała zarówno w surowicy, jak i zmiennej nowotworowej tkance. Badania dotyczyły następujących sekwencji mikrosatelitarnych: AR(X), ACTBP2, UT762, D14, DRLPA, FgA, 15q11, GGAA4D07, GGA2E02, D18S34, D17S513. *Silva* i współpr. (5) zbadali występowanie polimorfizmu 6 markerów (D17S855, D17S654, D16S421, TH2, D10S197, D9S161) i mutacje w genie TP53 w surowicy i guzach u 142 pacjentów, u których zdiagnozowano nowotwór piersi. Niestabilności w minimum jednym markerze zaobserwowano w 73% (104/142) analizowanych próbek tkanki guza oraz w 43% (61/142) próbek surowicy. Wykazano zależność występowania MI od wielkości guza, etapu rozwoju stanu patologicznego, okresu przeżycia po usunięciu guza. Niestabilności wybranych biowskaźników nie stwierdzono w żadnej z 35 badanych próbek surowicy pochodzących od zdrowych osób. Zbiorcze zestawienie uzyskanych wyników badań dotyczących występowania niestabilności mikrosatelitarnych w różnego typu nowotworach u ludzi przedstawił *Fleischhacker* i *Schmidt* (3).

Dahiya i współpr. (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 (dokładna lokalizacja genu na chromosomie): 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 współpr. (7) 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]antracemem (DMBA). 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. W przypadku zwierząt traktowanych DMBA niestabilności występowały w loci: D15Mgh4 oraz D18Mgh3, natomiast w przypadku szczurów otrzymujących PhIP MI wykryto w loci: D3Mgh9, D9Mit3, D20Mgh1, TNF, D6Mgh3, D20Mit1, PND, MT1PA, DXmgh1, TNF, D2N91, D16Mgh3, RBP-2, D6Mgh7, D2Mit2, TAT, REN, D14Mgh2.

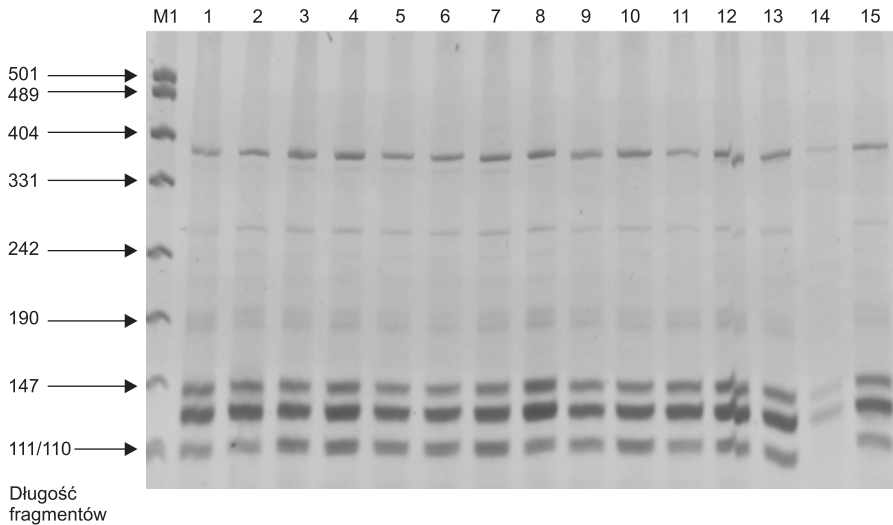
Celem badań była próba oceny niestabilności pięciu wybranych sekwencji mikrosatelitarnych we krwi szczurów traktowanych, w celu wywołania nowotworu, 7,12-dimetylobenzo[a]antracemem w odniesieniu do zwierząt nie traktowanych czynnikiem kancerogennym. Badania dotyczyły następujących sekwencji mikrosatelitarnych: D1Mgh6 (wielkość produktu PCR 127 par zasad), D5Mit11 (wielkość produktu PCR 145 par zasad), D5Mgh3 (wielkość produktu PCR 102 par zasad), D15Mgh4 (wielkość produktu PCR 122 par zasad), D18Mgh3 (wielkość produktu PCR 171 par zasad), wybranych na podstawie danych z piśmiennictwa. Celem podjętych badań była ocena wybranych sekwencji mikrosatelitarnych pod kątem możliwości ich wykorzystania do diagnozowania wczesnych etapów i ryzyka rozwoju nowotworów piersi, jak również możliwości oceny wpływu oddziaływania składników diety, w tym związków polifenolowych, olejów roślinnych, pierwiastków, na ich powstawanie.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań była krew samic szczurów szczepu *Sprague-Dawley*. Zwierzęta pochodziły z Pracowni Zwierząt Laboratoryjnych Katedry i Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Warszawie. Badania na zwierzętach uzyskały zgodę Komisji Etycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Szczury miały zapewniony ciągły dostęp do wody i paszy, przetrzymywane były w pomieszczeniu o stałej temperaturze i kontrolowanym fotookresie (12 h/dzień). Zwierzęta podzielono na dwie grupy: grupa I, szczury które otrzymały w celu wywołania nowotworu piersi jednorazowo DMBA w dawce 80 mg/kg mc w oleju rzepakowym (n = 9, masa ciała 195 g, ryc. 2 – numer analizy 8–15); grupa II, zwierzęta, nie traktowane DMBA (n = 6, masa ciała 208 g, ryc. 2 – numer analizy 1–7). Krew szczurów pochodziła z wczesnej fazy tworzenia nowotworu, okresu przed uformowaniem wyczuwalnego palpacyjnie guza (12 tydzień życia zwierząt).

Analizę wybranych niestabilności mikrosatelitarnej wykonano na żelach poliakrylamidowych barwionych azotanem srebra bądź bromkiem etydy w metody opartej o PCR na podstawie danych z piśmiennictwa (6, 7). Chromosomalne DNA z krwi szczurów wyizolowano metodą opartą o zestaw do izolacji DNA z krwi mrożonej firmy A&A Biotechnology (Gdynia, Polska), zmodyfikowaną.

Przykład uzyskanych wyników badań markerów fragmentu D1Mgh6 przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 2. Analiza niestabilności mikrosatelitarnych dla markera D1Mgh6 (wielkość produktu 127 pz) we krwi u szczurów traktowanych bądź nie DMBA.

Elektroforeza poliakrylamidowa produktów PCR, 12% żel poliakrylamidowy, wywoływanie – bromek etydyny.

Fig. 2. D1Mgh6 microsatellite marker analysis in blond of rats treated or untreated with DMBA, 12 % polyacrylamide gel electrophoresis, ethidium bromide staining.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Analiza wybranych sekwencji mikrosatelitarnych w zastosowanym modelu z indukowaniem guzów piersi za pomocą 7,12-dimetylobenzo[a]antracenu u szczurów nie wykazała różnic w długości wybranych fragmentów DNA mikrosatelitarnego. Warto podkreślić, że materiał badany pochodził z wczesnej niewyczuwalnej palpacyjnie fazy tworzenia się guza.

Pomimo, że w prezentowanych badaniach nie stwierdzono występowania niestabilności mikrosatelitarnych i w związku z tym nie można było ich wykorzystać do oceny wpływu diety na ich powstawanie, to w piśmiennictwie pojawia się coraz więcej danych wskazujących zależność oddziaływania składników diety na MI materiału genetycznego. *Manku* (8) wykazał, że suplementacja diety kwasami tłuszczowymi rodziny omega 3 (2 g/dzień etylo-EPA w odniesieniu do placebo), powoduje znaczący spadek w ilości powtórzeń typu CAG (cytozyna, adenozyzna, guanina) u pacjentów z chorobą *Huntingtona* (HD), u których wcześniej stwierdzono 44 i więcej powtórzeń tego fragmentu. Warto dodać, że choroba mózgu *Huntingtona* odznaczała się wzrostem długości tripletu CAG obecnego w genie zlokalizowanym na chromosomie 4p16.3. Pacjenci z tą chorobą mają od 36 do 100 powtórzeń tego

fragmentu, natomiast osoby nie dotknięte tą chorobą mieszczą się w przedziale 30–60 powtórzeń. Największa liczba powtórzeń charakteryzuje pacjentów w początkowym stadium choroby. *Sung* i współpracownicy (9) podjęli próbę analizy zależności występowania niestabilności mikrosatelitarnych od nawyków żywieniowych u pacjentów z rakiem okrężnicy. Wykazali oni odwrotną korelację między występowaniem MI, a spożywaniem ryboflawiny. *Cravo* i współpracownicy (10) badali wpływ suplementacji kwasu foliowego u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego na niestabilność następujących markerów: D1S216, D2S118, D3S1298, D3S1611, D5S404, D8S260, D17S783, D18S440, D22S282. DNA zostało wyizolowane z próbek w wyniku biopsji tkanek odbytnicy pacjentów. Materiał kontrolny stanowiły limfocyty krwi obwodowej. Kolonoskopia została wykonana dwukrotnie – na początku badań i po sześciu miesiącach, w ciągu których część pacjentów otrzymywała kwas foliowy w ilości 5 mg/dzień, podczas gdy reszta zażywała placebo. Stwierdzono, że tylko u jednego pacjenta wykazującego MI, suplementacja kwasu foliowego doprowadziła do normalizacji niestabilności mikrosatelitarnej w trzech z sześciu badanych markerów. Można by wysnuć wniosek, że wynik ten jest spowodowany błędem pobrania próbek, jednak niestabilność mikrosatelitarna występowała w trzech pozostałych markerach, a pacjenci otrzymujący placebo nie wykazywali żadnych zmian. Autorzy zaobserwowali, że stężenie kwasu foliowego w błonie śluzowej jelita było o 30–50% niższe u pacjentów wykazujących MI.

Markery mikrosatelitarne są coraz częściej wykorzystywane w celu oceny narażenia środowiskowego na substancje o charakterze genotoksycznym i mutagenym. Związkami, którym udowodniono indukcję niestabilności mikrosatelitarnej są niektóre pierwiastki. *Hirose* i współpracownicy (11) podjęli się analizy niestabilności mikrosatelitarnej u pacjenta długotrwale narażonego na związki chromu, u którego doszło do powstania guza w jamie nosowej. Zastosowano cztery markery mikrosatelitarne: D2S123, D3S1067, TP53 i D18S474. Porównano DNA tkanki guza z próbkami otrzymanymi z błony śluzowej jamy nosowej nie objętej chorobą oraz z leukocytów krwi obwodowej, jednak nie udało się stwierdzić MI w żadnym z badanych loci. Natomiast *Kondo* i współpracownicy (12), którzy analizowali niestabilność mikrosatelitarną w sześciu loci (D3S647, D3S966, D3S1289, D5S346, D9S161, TP53) wykazali, że jest ona znacząco wyższa u pacjentów z nowotworem płuc narażonych na chrom w porównaniu z próbkami uzyskanymi od pacjentów z nowotworem płuc nie deklarujących ekspozycji na związki chromu. *Ghor* i współpracownicy (13) zastosowali trzy markery mikrosatelitarne – D6Mit3, D9Mit2 i D15Mgh1 w celu sprawdzenia czy narażenie szczurów *in vivo* na kadm indukuje niestabilność mikrosatelitarną w leukocytach zwierząt. Szczury zostały podzielone na dwie grupy – pierwsza otrzymała jednorazową, doustną dawkę chlorku kadmu stanowiącą 1/10 LD₅₀, i służyła do oceny zatrucia ostrego. Grupa druga, służąca do oceny narażenia przewlekłego, otrzymywała przez cztery tygodnie, codziennie (oprócz niedziel), doustną dawkę CdCl₂ będącą 1/30 LD₅₀. Próbkę krwi pobrano dwukrotnie, pierwszą – stanowiącą jednocześnie próbę kontrolną – przed podaniem chlorku kadmu, drugą 24 h po podaniu ostatniej dawki badanego związku. Po jednorazowym podaniu kadmu nie zaobserwowano zmiany wielkości alleli w żadnym z trzech badanych loci. W badaniu narażenia przewlekłego w każdym badanym loci zaobserwowano niestabilność mikrosatelitarną mającą postać delekcji 2–3 par zasad lub addycji 3–6

par zasad. *Slebos* i współpracownicy (14) badali wpływ kadmu przy użyciu linii komórkowej ludzkiego włókniakomięsa HT1080. Użyli w tym celu trzech następujących markerów mikrosatelitarnych: MycL1, D7S1482 i DXS981. W badaniu wykazano, że ekspozycja na kadm powoduje indukcję niestabilności mikrosatelitarnej w ludzkich komórkach linii HT1080.

WNIOSKI

Z przedstawionych danych wynika, że ocena niestabilności mikrosatelitarnych, mimo naszych niepowodzeń wobec wybranych sekwencji, wydaje się być obiecującym markerem zarówno w diagnostyce stanu nowotworowego, jak również w ocenie wpływu składników diety i jej zanieczyszczeń na rozwój procesu patologicznego.

B. Bobrowska, A. Tokarz, M. Kamińska

MICROSATELLITE INSTABILITY AS THE MARKER IN THE RESEARCH OF THE IMPACT OF DIET ON CARCINOGENESIS

Summary

The aim of the present study was to assess instability of five selected microsatellite sequences in the blood of rats treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene administered to start carcinogenesis relative to untreated rats. The five studied sequences were D1Mgh6, D5Mit11, D5Mgh3, D15Mgh4, D18Mgh3. It was attempted to assess the feasibility of using those sequences to diagnose early stages and the risk of development of breast cancer, as well as to assay the feasibility of assessing the impact of elements of the diet, including polyphenolic compounds, vegetable oils, microelements, on the development of breast cancer. Analysis of selected microsatellite sequences in the applied model did not show differences in the length of the selected DNA fragments.

PIŚMIENNICTWO

1. Kordek R., Bartkowiak J.: Niestabilność mikrosatelitarna w nowotworach człowieka. *Onkol. Pol.*, 1999; 2(2): 109-112. – 2. <http://www.bio.davidson.edu/COURSES/genomics/method/microsatellite.html>. – 3. Fleischhacker M., Schmidt B.: Circulating nucleic acids (CNAs) and Cancer – A survey. *Biochem. Biophys. Acta*, 2007; 1775: 181-232. – 4. Mayall F., Fairweather S., Wilkins R., Chang B., Nicholls R.: Microsatellite abnormalities in plasma of patients with breast carcinoma: concordance with the primary tumour. *J. Clin. Pathol.*, 1999; 52: 363-366. – 5. Silva J.M., Silva J., Sanchez A., Garcia J.M., Dominguez G., Provencio M., Sanfrutos L., Jareno E., Colas A., Espana P., Bonilla F.: Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 3761-3766. – 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. 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[4,5-b]pyridine, Mol Carcinogen. 1996; 15: 176-182. – 8. Manku M.S.: Copy number variation, purified eicosapentaenoic acid, and central nervous system disorders. *J. Nutrigenet Nutrigenomics*, 2009; 2: 189-224. – 9. Oh S.W., Kim Y.H., Chang D.K., Son H.J., Rhee P-I, Kim J.J., Rhee J.Ch., Lee W.Y., Chun H.K., Kim D.H.: Nutrient intake and microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Gastroenterology*, 2008; 134(4): 285-286. – 10. Cravo M.L., Albuquerque C.M., Sousa S., Gloria L.M., Chaves P., Pereira D., Leitao N., Quina M.G., Mira C.: Microsatellite instability in non-neoplastic mucosa of patients with

ulcerative colitis: effect of folate supplementation. *Am. J. Gastroenterol.*, 1998; 93: 2060-2064.

11. *Hirose T., Kondo K., Takahashi Y., Ishikura H., Fujino H., Tsuyuguchi M., Hashimoto M., Yokose T., Mukai K., Kodama T., Monden Y.*: Frequent microsatellite instability in lung cancer from chromate-exposed workers. *Mol. Carcinogen.*, 2002; 33: 172-180. – 12. *Kondo K., Hirose T., Takahashi I.Y., Ishikura H., Fujino H., Yokose T., Kodama T., Hashimoto M., Tsuyuguchi M., Monden Y.*: Molecular carcinogenesis of human lung cancers with chromate exposure. *Lung Cancer*, 2000; 29(1): 182. – 13. *Ghor A.A., Noshay M.M., Ashmaoui H.M., Eid J.I., Hassanane M.S.*: Microsatellite instability at three microsatellite loci (D6mit3, D9mit2 and D15Mgh1) located in different common fragile sites of rats exposed to cadmium. *Mutat. Res.*, 2010; 696: 160-16614. – 14. *Slebos R.J.C., Li M., Evjen A.N., Coffa J., Shyr Y., Yarbrough W.G.*: Mutagenic effect of cadmium on tetranucleotide repeats in human cells. *Mutat. Res.*, 2006; 602: 92–99.

Adres: 02-097 Warszawa, ul Banacha 1.