

ROBERT ŚMIGIEL<sup>1</sup>, AGNIESZKA STEMBAŁSKA<sup>2</sup>, ALEKSANDER STAL<sup>3</sup>, ANNA JONKISZ<sup>4</sup>,  
ALICJA TRUSEWICZ<sup>2</sup>, TADEUSZ DOBOSZ<sup>4</sup>, ZYGMUNT GRZEBIENIAK<sup>3</sup>, MARIA SAŚIADEK<sup>2</sup>

## The Microsatellite Instability in Patients with Colon Cancer Treated in Lower Silesia

### Badania niestabilności mikrosatelitarnej u pacjentów chorych na raka jelita grubego leczonych na Dolnym Śląsku

<sup>1</sup> Katedra Patofizjologii AM we Wrocławiu

<sup>2</sup> Katedra Genetyki AM we Wrocławiu

<sup>3</sup> II Klinika Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej AM we Wrocławiu

<sup>4</sup> Zakład Technik Molekularnych Katedry Medycyny Sądowej AM we Wrocławiu

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Niestabilność mikrosatelitarna (MSI – *microsatellite instability*) jest markerem fenotypu mutatorowego i polega na zmianie długości alleli na skutek zwiększenia lub zmniejszenia liczby powtórzeń nukleotydowych. Ocena występowania fenotypu RER (*replication error phenotype*) może służyć do diagnostyki i określenia rokowania w raku jelita grubego, szczególnie w niepolipowatym raku jelita grubego (HNPCC – *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*). Nowotwory jelita grubego są w Polsce drugim co do częstości występowania nowotworem złośliwym. W ostatnim dwudziestoleciu zachorowalność na raka jelita grubego wzrosła dwukrotnie.

**Cel pracy.** Ocena częstości występowania niestabilności mikrosatelitarnej u pacjentów z rakami jelita grubego zarówno sporadycznymi, jak i dziedzicznymi oraz opracowanie algorytmu postępowania diagnostyczno-leczniczego umożliwiającego wyłonienie spośród pacjentów chorych na raka jelita grubego tych, u których rozwinął się on na podłożu niestabilności genetycznej.

**Materiały i metody.** Pacjentów podzielono na cztery grupy: do pierwszej zaliczono chorych spełniających kryteria amsterdamskie (rozpoznanie HNPCC), do drugiej chorych z podejrzeniem HNPCC (s-HNPCC), do trzeciej pacjentów z rodzinnym rakiem jelita grubego (FCC – *familial colorectal cancer*) oraz pacjentów z rodzinną agregacją raka (CFA – *cancer familial aggregation*), a do ostatniej grupy zaliczono pacjentów ze sporadycznym rakiem jelita grubego (s.r.j.g.). Badania niestabilności mikrosatelitarnej zostały przeprowadzone u 173 pacjentów z użyciem fluorescencyjnych markerów mononukleotydowych BAT25, BAT26 oraz BAT40. Wyniki analizowano w sekwencjatorze (ABI310), porównując krzywe dla wybranych markerów mikrosatelitarnych dla DNA wyizolowanego z tkanki nowotworu oraz dla DNA pochodzącego z krwi obwodowej tego samego pacjenta.

**Wyniki.** Niestabilność mikrosatelitarną wykazano u 49 spośród wszystkich badanych pacjentów (28,34%). W grupie HNPCC niestabilność mikrosatelitarną stwierdzono u 55,5% zbadanych pacjentów. Podobną częstość występowania MSI wykazano u pacjentów z s-HNPCC oraz FCC i CFA. W grupie pacjentów ze sporadycznymi rakami jelita grubego niestabilność mikrosatelitarną wykazano w 32 przypadkach (22,37%). W pracy wykazano ponadto, że wśród pacjentów z fenotypem MSI w 15% przypadków stwierdzono stadium G3 zaawansowania histopatologicznego, a w grupie pacjentów z fenotypem stabilnym w nieco ponad 5% (*Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 1, 29–36).

**Słowa kluczowe:** niestabilność mikrosatelitarna, raki jelita grubego, nowotwory dziedziczne.

#### Abstract

**Background.** Microsatellite instability (MSI) is a hallmark of mutator phenotype. MSI means a change in the length (size) of an allele caused by an increase or decrease in the number of microsatellite repeats. The replication error phenotype (RER) could be applied as a marker for the diagnosis and defining prognosis for colon cancer,

especially for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). Morbidity for colon cancer in Polish population has increased in the last two decades and is located in the second place of total incidence of malignant cancer. **Objectives.** An evaluation of the incidence of microsatellite instability in patients with colon cancer, both sporadic and hereditary. The authors plan to elaborate an algorithm of diagnostic and therapeutic procedure to find, among all patients with colon cancer, those with microsatellite instability.

**Material and Methods.** All patients were divided into four groups. The first group included patients who fulfil Amsterdam criteria (diagnosis of HNPCC), the second group – patients with suspected HNPCC (s-HNPCC), the third – patients with familial colon cancer (FCC) and with cancer familial aggregation (CFA). The last group included patients with sporadic colon cancer (SRJG). Molecular analysis using fluorescent, mononucleotide markers such as BAT25, BAT26 and BAT40, was carried out on the DNA isolated from the blood lymphocytes and primary colon cancer cells of 173 patients. To investigate MSI, PCR fragment analysis was applied. The size and quantity of fluorescent PCR products were evaluated in an automated sequencer (ABI310).

**Results.** MSI was found in 49 (28.34%) of all examined patients. Furthermore, MSI was revealed in 55.5% of patients from HNPCC group. The incidence of MSI phenotype in s-HNPCC and FCC/CFA group was similar to HNPCC patients. And MSI was observed in 32 patients (22.37%) of the informative cases with sporadic cancer. Moreover, the results showed that the G3 status in histopathological examination was associated in 15% of cases among patients with MSI phenotype but three times less among patients with stable phenotype (*Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 1, 29–36).

**Key words:** microsatellite instability, colon cancer, hereditary cancer.

Jedną z cech komórek nowotworowych jest niestabilność genetyczna, która wyraża się nagromadzeniem aberracji chromosomowych i/lub molekularnych, tj. niestabilności mikrosatelitarnej i utraty heterozygotyczności. Niestabilność mikrosatelitarna (MSI – *microsatellite instability*) jest markerem fenotypu mutatorowego. MSI polega na zmianie długości (wielkości) alleli na skutek zwiększenia lub zmniejszenia liczby powtórzeń nukleotydowych. W procesie transformacji nowotworowej MSI może być zjawiskiem pierwotnym lub wtórnym.

Niestabilność mikrosatelitarna i fenotyp mutatorowy (RER(+)) – *replication error phenotype* zostały po raz pierwszy opisane w 1993 r. w dziedzicznym niepolipowatym raku jelita grubego (HNPCC – *hereditary nonpolyposis colorectal Cancer*). Fenotyp RER(+) jest obserwowany u około 90% pacjentów z HNPCC i u około 15% chorych ze sporadycznym rakiem jelita grubego [1, 2]. Niestabilność mikrosatelitarną wykazuje również w 2–64% innych nowotworów zarówno dziedzicznych, jak i sporadycznych [3–6].

Mechanizm molekularny niestabilności mikrosatelitarnej nie jest do końca wyjaśniony. W odniesieniu do guzów z grupy HNPCC przyjmuje się obecnie dwie główne teorie: jedna zakłada, że MSI wynika z nieprawidłowości podczas rekombinacji DNA, druga z tzw. efektu poślizgu polimerazy DNA. Podczas replikacji odcinka DNA, dwa łańcuchy DNA (matrycowy i nowo syntetyzowany) rozdzielają się, a następnie ponownie łączą się w błędnej konfiguracji. Jeżeli błędnie sparowane pary zasad są zlokalizowane w nowo syntetyzowanym łańcuchu, to kontynuowanie wydłużania łańcucha będzie powodować zwiększenie długości odcinka DNA. Niewłaściwie sparowane zasady, umiejscowione na matryco-

wym łańcuchu DNA, będą powodować utratę jego krótkich odcinków [7].

Raki jelita grubego (r.j.g.) są w Polsce drugim co do częstości występowania nowotworem złośliwym zarówno u kobiet, jak i mężczyzn. W ostatnim dwudziestoleciu zachorowalność na raka jelita grubego wzrosła dwukrotnie. W 2002 r. na Dolnym Śląsku zarejestrowano 1138 zachorowań na nowotwory złośliwe jelita grubego. Według *American Cancer Society* w ciągu całego życia ryzyko zachorowania na r.j.g. wynosi 6% [8]. Mimo postępu onkologii w ciągu ostatnich dziesięcioleci, odnotowano jedynie nieznaczne zmniejszenie śmiertelności z powodu nowotworu złośliwego jelita grubego.

Celem pracy była ocena częstości występowania niestabilności mikrosatelitarnej u pacjentów chorych na raka jelita grubego, zarówno sporadycznego, jak i dziedzicznego. Wiodącym celem jest natomiast opracowanie algorytmu postępowania diagnostyczno-leczniczego umożliwiającego wyłonienie spośród pacjentów chorych na raka jelita grubego tych, u których rozwinął się on na podłożu niestabilności genetycznej i może być dziedziczny.

## Material i metody

Analizę rodowodów przeprowadzono u 318 pacjentów (177 mężczyzn, 141 kobiet) hospitalizowanych i operowanych z powodu nowotworu złośliwego jelita grubego na oddziałach chirurgicznych na Dolnym Śląsku w latach 2001–2003. Do celów statystycznych pacjentów podzielono na cztery grupy (tab. 1):

1. Chorzy spełniający kryteria amsterdamskie rozpoznania HNPCC: przynajmniej 3 krewnych z rakiem związanym z HNPCC (rak jelita grube-

**Tabela 1.** Wyniki badań niestabilności mikrosatelitarnej w poszczególnych grupach pacjentów chorych na raka jelita grubego.**Table 1.** Results of microsatellite instability study in separated groups of patients with colon cancer

Niestabilność mikrosatelitarna (Microsatellite instability)	Grupa 1 (Group 1) HNPCC	Grupa 2 (Group 2) s-HNPCC	Grupa 3 (Group 3) FCC/CFA	Grupa 4 (Group 4) s.r.j.g.	Razem (Total)	Różnice istotne statystycznie (Statistical significance) $p < 0,05$
	Liczba pacjentów (Number of patients) %					
MSI ogólnie	5 (55,5)	9 (60)	3 (50)	32 (22,37)	49 (28,34)	grupa 1 i 4; 2 i 4; 3 i 4
MSI-H	5 (55,5)	8 (53,3)	3 (50)	29 (20,27)	45 (26,01)	grupa 1 i 4; 2 i 4; 3 i 4
MSI-L	0	1 (6,6)	0	3 (2,09)	4 (2,31)	nieistotne
MSS	4 (44,4)	6 (40)	3 (50)	111 (77,62)	124 (71,67)	grupa 1 i 4; 2 i 4; 3 i 4
Razem (Total)	9	15	6	143	173	

go, trzonu macicy, jelita cienkiego, układu moczowego); jeden z nich powinien być krewnym I° dwóch pozostałych; rak występował w co najmniej dwóch kolejnych pokoleniach; co najmniej 1 rak zdiagnozowany < 50. roku życia.

2. Chorzy z podejrzeniem HNPCC (s-HNPCC), którzy nie spełniali klasycznych kryteriów amsterdamskich, spełniali natomiast następujące kryteria rodowodowo-kliniczne: co najmniej 2 krewnych I° z rakiem związanym z HNPCC (rak jelita grubego, trzonu macicy, jelita cienkiego, układu moczowego) lub co najmniej 1 rak zdiagnozowany < 50. roku życia.

3. Pacjenci z rodzinnym rakiem jelita grubego (FCC – *familial colorectal cancer*): rak jelita grubego u co najmniej 2 krewnych I° lub II° lub rak zdiagnozowany w wieku < 50 lat (wykluczono u nich HNPCC) oraz pacjenci z rodzinną agregacją raka (CFA – *cancer familial aggregation*): co najmniej 3 krewnych I° z nowotworem w każdej lokalizacji.

4. Pacjenci ze sporadycznym rakiem jelita grubego (s.r.j.g.).

Wszystkie nowotwory były zweryfikowane histopatologicznie. U pacjentów zakwalifikowanych do ww. grup wykluczono ponadto polipowatość rodzinną (FAP – *familial adenomatous polyposis*).

Materiałem do badań molekularnych było DNA wyizolowane z limfocytów krwi obwodowej i z tkanki nowotworu jelita grubego usuniętego podczas zabiegu operacyjnego. Izolację DNA przeprowadzono metodą fenolowo-solną. Na podstawie analizy rodowodowej do badań niestabilności mikrosatelitarnej zakwalifikowano 173 pacjentów (71 kobiet i 102 mężczyzn).

Badania niestabilności mikrosatelitarnej zostały przeprowadzone z użyciem fluorescencyjnych markerów mononukleotydowych BAT25, BAT26 oraz BAT40. Wymienione markery są wysoko swoiste i szczególnie przydatne do oceny MSI [8] (tab. 1, 2). BAT26 jest mononukleotydowym markerem zawierającym 26 powtórzeń deoksyadenozyny, odpowiada sekwencji zlokalizowanej w obrębie intronu 5. genu *MSH2*, BAT25 zawiera sekwencję (T)<sub>7</sub>A(T)<sub>25</sub> umiejscowioną w obrębie intronu onkogenu *c-kit*. BAT40 natomiast zawiera sekwencję umiejscowioną w obrębie intronu genu dehydrogenazy 3-β-hydroksysteroidu (tab. 2) [8].

Reakcja amplifikacji metodą PCR została przeprowadzona z poszczególnymi markerami osobno dla DNA z krwi i z guza dla każdego pacjenta w amplifikatorze MJ Research PTC-200 Thermocycler zgodnie ze standardowymi protokołami (REDTaq DNA Polimeraza, Sigma) 1 U/μl, 10× bufor dla polimerazy (Sigma), MgCl<sub>2</sub> (Qiagen),

**Tabela 2.** Charakterystyka mononukleotydowych markerów mikrosatelitarnych**Table 2.** Description of mononucleotide microsatellite markers

Marker (Marker)	Lokalizacja (Localization)	Gen (Gene)	Wielkość – bp-pary zasad (Size – base pair)	Temperatura przyłączenia C° (Annealing temperature)
BAT25	4q12	<i>c-kit</i>	90	58
BAT26	2p16	<i>MSH2</i>	80–100	58
BAT40	1p13.1	dehydrogenaza 3-β-hydroksysteroidu (dehydrogenase 3-β-hydroxysteroid gene)	80–100	58

każdy z nukleotydów: dATP, dGTP, dCTP, dTTP o końcowym stężeniu w reakcji 1 mM, para startów F i R o stężeniu każdy 10 pmol/μl, genomowe DNA z krwi obwodowej i tkanki guza o stężeniu 50 ng/μl, H<sub>2</sub>O do 25 μl całkowitej objętości reakcji PCR). Warunki amplifikacji dobrano indywidualnie dla każdej pary markerów (tab. 2).

Otrzymane produkty były następnie rozdzielane na 2% żelu agarozowym i obrazowane za pomocą barwienia bromkiem etydyny. Ocenę produktów reakcji PCR przeprowadzono na sekwenatorze ABI 310 (*Applied Biosystems*). Mieszaninę reakcyjną przygotowano z użyciem formamidu oraz kontrolnego markera wewnętrznego – standardu wielkości par zasad (TAMRA 350). Otrzymaną mieszaninę denaturowano w 95°C przez 3 min, następnie umieszczano próbówki w lodzie.

Do opracowania wyników reakcji w ABI 310 użyto programów komputerowych GENESCAN oraz Genotypem (*Applied Biosystem*). Analiza wyników w sekwenatorze polegała na porównaniu uzyskanych krzywych dla markerów mikrosatelitarnych między DNA wyizolowanym z tkanki nowotworu a DNA pochodzącym z krwi obwodowej tego samego pacjenta. MSI rozpoznawano na podstawie każdej zmiany długości allelu, będącej wyrazem zmiany liczby jednostek powtarzalnych w mikrosatelitach w komórkach guza w porównaniu z tkanką prawidłową. Również nieswoista utrata heterozygotyczności, wyrażająca się utratą jednego z dwóch alleli danego markera w mniej niż 20% badanych guzów, była traktowana jako wyraz MSI. Analizę niestabilności mikrosatelitarnej w automatycznym sekwenatorze przeprowadzono zarówno u konstytucjonalnych homozygot, jak i heterozygot w odniesieniu do badanego markera.

Przyjęto następujące kryteria klasyfikacji MSI w nowotworach [9]: MSI-H (*microsatellite instability, high*) – 2 spośród badanych markerów wykazują niestabilność; MSI-L (*microsatellite instability, low*) – jeden z badanych markerów wykazuje niestabilność; MSS (*microsatellite stability*) – gdy żaden z badanych markerów nie wykazuje niestabilności.

Kryteria oceny MSI w żelach denaturujących oraz w sekwenatorze zostały przedstawione w tabeli 3. Przykłady wyników badań MSI przedstawiono na rycinach 1a i 1b.

Do oceny zależności między zmianami molekularnymi w badanych markerach a danymi klinicznymi pacjentów wykorzystano test chi-kwadrat Pearsona (test  $\chi^2$ ) oraz test dokładny Fishera. Dla wszystkich testów przyjęto poziom istotności 0,05. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 6.0 (Statsoft, Inc).

**Table 3.** Evaluation criteria of microsatellite instability (MSI)

**Tabela 3.** Kryteria oceny niestabilności mikrosatelitarnej (MSI)

	Rozdział w denaturującym żelu poliakryamidowym – metoda srebrzenia (Separation in denaturing polyacrylamid gel – silver staining method)	Analiza fragmentów w sekwenatorze z użyciem markerów fluorocencyjnych (Fragment analysis in sequencer using fluorescent markers)
Kryteria oceny MSI (Evaluation criteria of MSI)	dotatkowe prążki, przesunięcie ( <i>shift</i> ) prążków, zmiany w intensywności prążków, utrata prążka	dotatkowe piki alleli, przesunięcie pików alleli, utrata pików alleli

## Wyniki

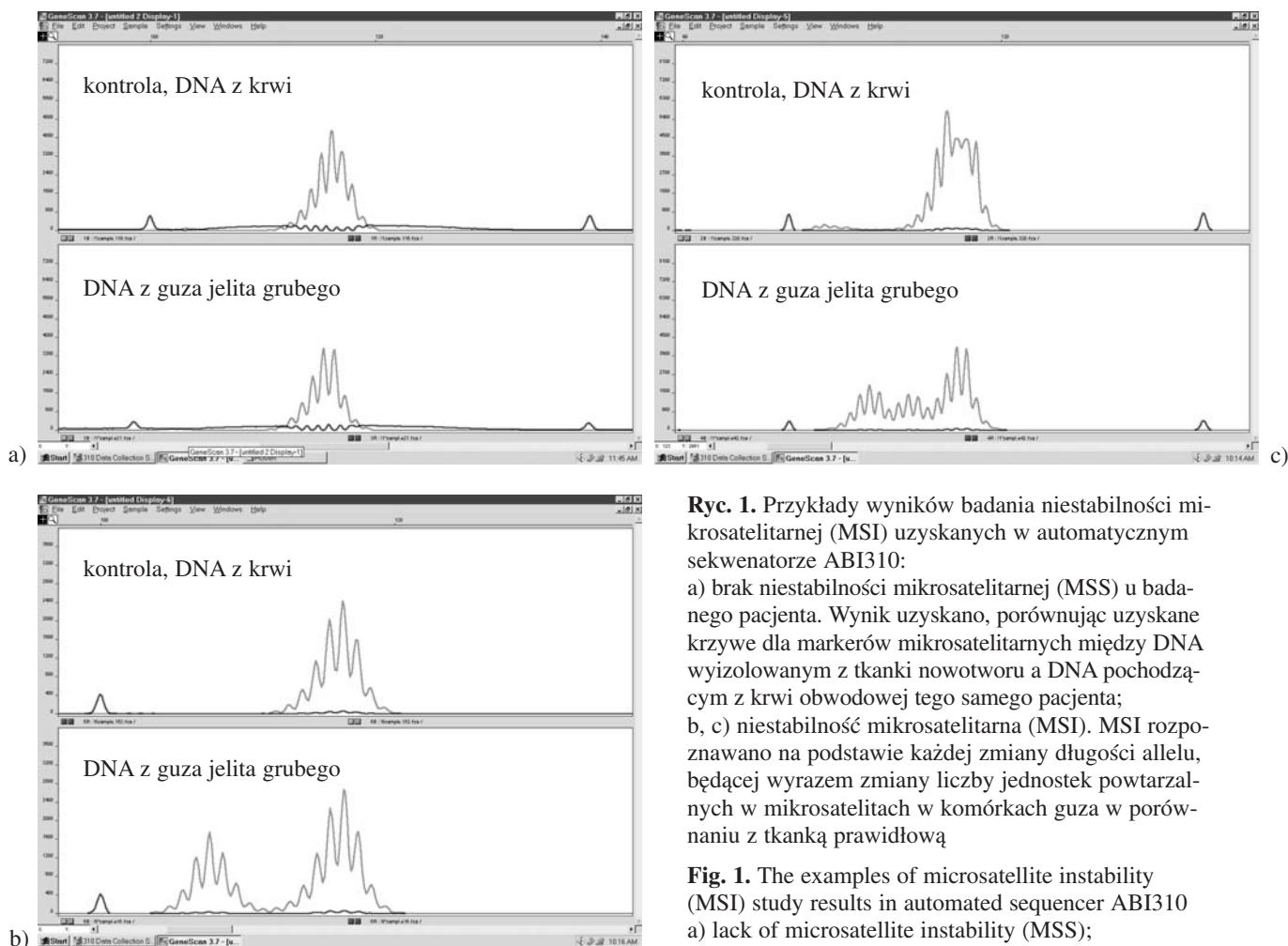
Z grupy 318 pacjentów poddanych ocenie rodowodowej 12 pacjentów (3,77%) spełniło kryteria amsterdamskie, 22 (6,91%) zostało zakwalifikowanych do grupy s-HNPCC, 7 (2,2%) do grupy trzeciej (FCC oraz CFA). Do czwartej grupy zakwalifikowano 280 pacjentów (88,05%) ze sporadycznymi rakami jelita grubego (s.r.j.g.).

Badanie genetyczne wykonano u 173 osób: 9 pacjentów (5,2%) należało do grupy pierwszej, 15 (8,67%) do drugiej grupy, 6 (3,46%) do trzeciej grupy oraz 143 (82,65%) do czwartej grupy.

Niestabilność mikrosatelitarną wykazano u 49 spośród wszystkich badanych pacjentów (28,34%). U 45 pacjentów stwierdzono MSI-H, a u 4 MSI-L. W grupie HNPCC stwierdzono niestabilność mikrosatelitarną u 55,5% zbadanych pacjentów. Podobną częstość występowania MSI wykazano w grupie pacjentów z s-HNPCC (60%) oraz grupie pacjentów z FCC i CFA (50%). W grupie pacjentów ze sporadycznymi rakami jelita grubego niestabilność mikrosatelitarną wykazano natomiast w 32 przypadkach (22,37%).

Średni wiek rozpoznania r.j.g. dla wszystkich grup pacjentów wyniósł 58,3 lat (mężczyźni – 57,6; kobiety – 62,6). Średni wiek rozpoznania r.j.g. dla grupy pacjentów spełniających kryteria amsterdamskie wyniósł 53,07 lat, dla grupy s-HNPCC 62,2, dla grupy FCC/CFA 58,9 lat oraz dla grupy sporadycznych raków jelita grubego 59,03 lat. We wszystkich czterech grupach nie stwierdzono różnic statystycznych między MSI a MSS w odniesieniu do wieku pacjentów.

Na podstawie analizy rodowodów pacjentów z HNPCC, u których wykonano badania genetyczne, stwierdzono, że w rodzinach 3 pacjentów występowały nowotwory pozaokrężnicze (nowotwory pęcherza moczowego, nerki, żołądka, trzustki,



**Ryc. 1.** Przykłady wyników badania niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) uzyskanych w automatycznym sekwenatorze ABI310:

a) brak niestabilności mikrosatelitarnej (MSS) u badanego pacjenta. Wynik uzyskano, porównując uzyskane krzywe dla markerów mikrosatelitarnych między DNA wyizolowanym z tkanki nowotworu a DNA pochodzącym z krwi obwodowej tego samego pacjenta; b, c) niestabilność mikrosatelitarna (MSI). MSI rozpoznawano na podstawie każdej zmiany długości allelu, będącej wyrazem zmiany liczby jednostek powtarzalnych w mikrosatelitach w komórkach guza w porównaniu z tkanką prawidłową

**Fig. 1.** The examples of microsatellite instability (MSI) study results in automated sequencer ABI310  
a) lack of microsatellite instability (MSS);  
b, c) microsatellite instability (MSI)

pluc, jamy ustnej). Tylko u jednego pacjenta wykazano MSI. Fenotyp RER(+) wykazano natomiast u 4 na 6 pacjentów (66,6%) z grupy, w której w rodzinie stwierdzono nowotwory przewodu pokarmowego. U 7 z 10 pacjentów (70%) z s-HNPCC, w których rodzinach występowały dodatkowo nowotwory układu pokarmowego, wykazano fenotyp MSI. W rodzinie kolejnych 5 pacjentów z tej grupy, u których występowały nowotwory układu moczowego, płuc, nowotwory narządu rodowego i gruczołu krokowego oraz skóry, tarczycy i kości, MSI stwierdzono u dwóch pacjentów (40%).

Badając zależności między niestabilnością mikrosatelitarną a histopatologicznym typem raka, stwierdzono istotne statystycznie zależności dla stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych (*grading*). Fenotyp MSS stwierdzono u 5,81% pacjentów, u których w badaniu histopatologicznym stopień zróżnicowania komórek nowotworowych oceniono na G3, fenotyp MSI wykazano natomiast u 15% pacjentów z rakiem jelita grubego w stadium G3 ( $p < 0,05$ ).

## Omówienie

Rak jelita grubego jest jednym z najczęściej występujących nowotworów w populacji europejskiej. Jak wykazano, u około 80–90% pacjentów z rodzinnym niepolipowatym rakiem jelita grubego i u około 15% chorych ze sporadycznym rakiem jelita grubego występują mutacje genów mutatorowych warunkujące powstanie fenotypu charakteryzującego się niestabilnością genetyczną (RER – *replication error tumor phenotyp*) [1, 2, 10]. Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) jest wykazywana również w innych nowotworach dziedzicznych i sporadycznych z różną częstością. Rozbieżności w ocenie częstości występowania MSI w nowotworach mogą wynikać z różnic w metodzie i metodyce badań, jak np. doborze i liczbie analizowanych markerów mikrosatelitarnych, interpretacji wyników oraz w kryteriach rozpoznawania MSI.

Badania nad mechanizmem powstawania MSI w nowotworach doprowadziły do zidentyfikowania genów kodujących białka, które rozpoznają błędnie dobrane zasady, wycinają je i wymieniają

na właściwe nukleotydy. Ten system naprawy DNA został nazwany systemem usuwania błędnie sparowanych zasad (MMR – *mismatch repair system*). Obecnie zidentyfikowano kilka genów mutatorowych, które kodują białka usuwające błędnie sparowane zasady (*MLH1* 3p31; *MSH2* 2p21-22; *MSH6* 2p16; *PMS2* 7p22; *PMS1* 2q31-33; *MLH3* 14q24.3) [4, 5]. Pierwsza mutacja w MMR występuje w linii komórek płciowych [4, 5]. Druga jest mutacją somatyczną. Inaktywacja allelu typu dzikiego (prawidłowego) genu naprawczego DNA powoduje utratę lub obniżenie sprawności naprawy błędów powstałych w procesie replikacji DNA i prowadzi do wystąpienia fenotypu RER. W efekcie mutacje zachodzą od 100 do 1000 razy częściej niż w komórkach prawidłowych [5]. Obniżona sprawność reperacji DNA z jednej strony zwiększa ryzyko rozpoczęcia procesu transformacji nowotworowej, z drugiej może przyczyniać się do progresji guza. W nowotworach rozwijających się na podłożu dziedzicznych mutacji genów kodujących białka naprawy DNA, jak np. uwarunkowany autosomalnie, dominująco dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego, niestabilność genetyczna jest zjawiskiem pierwotnym.

W badaniach własnych uzyskano istotną statystycznie różnicę między częstością występowania fenotypu RER(+) u pacjentów z dziedziczną postacią nowotworów jelita grubego (HNPCC, FCC, CFA), a także u pacjentów podejrzanych o HNPCC niespełniających ściśle kryteriów amsterdamskich (s-HNPCC), a częstością występowania niestabilności mikrosatelitarnej u pacjentów ze sporadycznym rakiem jelita grubego ( $p < 0,05$ ) (tab. 3). Wyniki niniejszej pracy pokazują, że fenotyp RER(+) obserwuje się u 55% pacjentów z HNPCC w badanej grupie. Dane literaturowe natomiast opisują częstsze występowanie fenotypu RER(+) w tej grupie pacjentów [1, 2]. Badania własne potwierdzają wyniki uzyskane przez innych autorów dotyczące częstości występowania MSI u chorych na s.r.j.g. [9, 11]. Fenotyp MSI(+) nie musi wskazywać na zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów u krewnych pacjenta, ponieważ może być skutkiem wtórnych zmian somatycznych prowadzących do inaktywacji genu mutatorowego, np.: nieprawidłowej metylacji promotora genu *MLH1* [11–13].

Występowanie fenotypu RER(+) ma istotne znaczenie w molekularnej patologii nowotworów i praktyce klinicznej. Według Chiaravalli et al. fenotyp MSI i MSS charakteryzują dwie różne drogi w karcynogenezie [14]. Tę teorię potwierdzają Lynch i de la Chapelle [15]. Obecnie ocenę niestabilności mikrosatelitarnej w komórkach guza nowotworowego wykorzystuje się do diagnostyki i określenia rokowania w raku jelita grubego,

szczególnie w HNPCC i innych nowotworach z tej grupy. Progresja, rokowanie i odpowiedź na leczenie raków jelita grubego wykazujących dużą niestabilność mikrosatelitarną różni się od guzów nowotworowych z fenotypem RER(-). Pacjenci z szybciej rosnącymi rakami jelita grubego MSI(+) zbudowanymi z komórek histologicznie mniej zróżnicowanych wykazują lepsze wyniki leczenia, lepsze rokowanie oraz mniejsze ryzyko wystąpienia przerzutów [3, 16]. Niektórzy autorzy sugerują, że w najbliższych latach określanie fenotypu MSI w rakach jelita grubego będzie służyło nie tylko do oceny rokowania, ale również do wyboru sposobu leczenia chemioterapeutycznego [17]. W uzyskanych wynikach badań własnych stwierdzono blisko trzykrotnie większą częstość występowania fenotypu RER w histologicznie mniej zróżnicowanych rakach jelita grubego (stpień G3 zróżnicowania komórek nowotworowych). Może to również świadczyć o dominacji klonu komórek z uszkodzonym genem mutatorowym, czyli mających największy potencjał proliferacyjny. Potwierdza to także teorię klonalnego rozwoju nowotworu.

Rozpoznanie HNPCC wiąże się z dużymi trudnościami, ponieważ w zespole tym nie występują charakterystyczne zmiany kliniczne pozwalające na postawienie właściwej diagnozy [15]. Rozpoznanie jest ustalane na podstawie analizy rodowodu (tzw. *nuclear pedigree*). Na Międzynarodowym Kongresie w Amsterdamie w 1991 r. ustalono obowiązujące kryteria rozpoznania HNPCC, które następnie modyfikowano w kolejnych latach. Obecnie omawia się dwie różne strategie postępowania diagnostycznego mającego na celu wytypowanie osób z dziedziczną predyspozycją do HNPCC spośród chorych na raka jelita grubego. Jedna ze strategii opiera się jedynie na analizie rodowodu, druga zakłada, że u osób spełniających kryteria rodowodowe należy wykonać badania w kierunku niestabilności mikrosatelitarnej, a nawet poszukiwać mutacji w genach mutatorowych. Wykazano, że prawie wszyscy pacjenci z HNPCC, u których występują mutacje germinalne w genach MMR, wykazują MSI-H w badanych guzach, dlatego rozważa się, czy ocena niestabilności mikrosatelitarnej może być wystarczająca do oceny ryzyka nowotworów dziedzicznych u pacjentów chorych na raka jelita grubego, u których rozwinął się na podłożu niestabilności genetycznej [11].

Do badania MSI wykorzystuje się polimorfizm długości markerów mikrosatelitarnych. Według Perucho do określenia MSI może służyć jedynie ocena tylko dwóch mononukleotydowych i jednego dinukleotydowego markera [18]. Mononukleotydowymi markerami mogą być BAT26, BAT25 oraz BAT40. W niniejszej pracy do badań

nad niestabilnością genetyczną wykorzystano te trzy bardzo swoiste markery do oceny fenotypu RER. Obecnie poszukuje się takiego markera, który pozwoliłby na uzyskanie jednoznacznego wyniku badania MSI. De la Chapelle et al., Hong et al. oraz Boland et al wykazali, że do wykrywania MSI można zastosować tylko jeden mononukleotydowy marker – BAT26-poli(A)<sub>26</sub> [19]. W opinii cytowanych autorów marker ten jest tak swoisty, że do oceny MSI wystarczy stwierdzenie zmiany liczby powtórzeń poli(A), bez konieczności porównania wyników z guza z wynikami z tkanki prawidłowej [9, 19, 20]. W badaniach własnych jedynie u 4 pacjentów stwierdzono MSI-L, u których wykazano niestabilność w jednym z badanych markerów. W ww. przypadkach tym markerem był BAT26, który wykazywał niestabilność u wszystkich 49 pacjentów z MSI. Potwierdza to opinię ww. autorów, że mononukleotydowy marker BAT26 może być jedynym, wystarczającym

markerem, na podstawie którego ocenia się występowanie niestabilności mikrosatelitarnej. Ostatnio sugeruje się, że do określenia fenotypu mutatorowego komplementarnie można wykorzystywać immunohistochemiczną ocenę ekspresji genów MMR, jak *MLH1*, *MSH2* oraz *MSH6* [21–23].

Na podstawie literatury i badań własnych można stwierdzić, że rozpoznanie HNPCC oraz nowotworów dziedzicznych z jego grupy powinno opierać się na analizie klinicznej oraz rodowodowej, a także na podstawie oceny niestabilności mikrosatelitarnej i mutacji w genach mutatorowych. Pozytywny test MSI u pacjentów z kliniczno-rodowodowej grupy ryzyka pozwala zidentyfikować tych pacjentów, u których należałoby wykonać ocenę mutacji genów mutatorowych przez ich sekwencjonowanie. Wymagania techniczne, pracochłonność oraz koszty badania ograniczają jednak dostępność sekwencjonowania w rutynowej diagnostyce dziedzicznych raków jelita grubego.

## Piśmiennictwo

- [1] **de la Chapelle A, Peltomaki P:** Genetic of hereditary colon cancer. *Annu Rev Gen* 1995, 29, 329–348.
- [2] **Samowitz WS, Slattery ML:** Regional Reproducibility of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer. *Genes Chrom Cancer* 1999, 26, 106–114.
- [3] **Peltomaki P:** DNA mismatch repair and cancer. *Mutation Res* 2001, 488, 77–85.
- [4] **Eshelman JR, Marcowitz SD:** Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. *Curr Opin Oncol* 1995, 7, 83–89.
- [5] **Simpson AJ:** The natural somatic mutation frequency and human carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 1997, 71, 209–240.
- [6] **Ichikawa Y, Lemon SJ, Wang S, Franklin B, Watson P, Knezetic JA, Bewtra C, Lynch HT:** Microsatellite instability and expression of *MLH1* and *MSH2* in normal and malignant endometrial and ovarian epithelium in hereditary nonpolyposis colorectal cancer family members. *Cancer Genet Cytogenet* 1999, 112, 2–8.
- [7] **Kunkel TA:** Slippery DNA and diseases. *Nature* 1993, 365, 207–208.
- [8] [www.cancer.org](http://www.cancer.org)
- [9] **Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S:** A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1998, 58, 5248–5257.
- [10] **Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR:** Clues to the pathogenesis of Familial Colorectal Cancer. *Science* 1993, 260, 812–816.
- [11] **Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, Tester DJ, Parc Y, Burgart LJ, Halling KC, McDonnell SK, Schaid DJ, Walsh Vockley C, Kubly V, Nelson H, Michels VV, Thibodeau SN:** The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet* 2001, 69, 780–790.
- [12] **Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Fukayama N, Igarashi S, Kotake K, Matsui T, Koyama Y, Maekawa M, Nagai H:** Methylation profile of the *MLH1* promoter region and their relationship to colorectal carcinogenesis. *Genes Chrom Cancer* 2003, 36, 17–25.
- [13] **Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R:** Methylation of the *hMLH1* promoter correlates with lack of expression of *hMLH1* in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997, 57, 808–811.
- [14] **Chiaravalli AM, Furlan D, Facco C, Tibiletti MG, Dionigi A, Casati B, Albarello L, Riva C, Capella C:** Immunohistochemical pattern of *hMSH2/hMLH1* in familial and sporadic colorectal, gastric, endometrial and ovarian carcinomas with instability in microsatellite sequences. *Virchows Arch* 2001, 438, 39–48.
- [15] **Lynch HT, de la Chapelle A:** Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999, 36, 801–818.
- [16] **Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK:** Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Eng J Med* 2000, 342, 69–77.
- [17] **Lindor NM, Sloan J, Goldberg R, Bowen D, Nigon S, Roche A, Petersen G, Thibodeau SN, Burgart L, Leontovich O, Morlan BW:** Colorectal tumour microsatellite instability test results: perspectives from patients. *Hereditary Cancer Clin Pract* 2004, 2, 69–75.

- [18] **Perucho M:** Correspondence re: CR Boland et al., A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1998, 58, 5248–5257. *Cancer Res* 1999, 59, 249–256.
- [19] **de la Chapelle A, Peltomaki P:** Genetic of hereditary colon cancer. *Annu Rev Gen* 1995, 29, 329–348.
- [20] **Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R:** BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997, 58, 300–303.
- [21] **Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, Walsh-Vockley C, Petersen GM, Walsh MD, Leggett BA, Young JP, Barker MA, Jass JR, Hopper J, Gallinger S, Bapat B, Redston M, Thibodeau SN:** Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002, 20, 1043–1048.
- [22] **Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J:** Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997, 57, 4749–4756.
- [23] **Lynch HT, de la Chapelle A:** Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003, 348, 919–932.

### **Adres do korespondencji:**

Maria M. Sasiadek  
Zakład Genetyki AM we Wrocławiu  
ul. Marcinkowskiego 1  
50-368 Wrocław  
e-mail: sasiadek@gen.am.wroc.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 3.02.2005 r.

Po recenzji: 1.06.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 9.06.2005 r.

Received: 3.02.2005

Revised: 1.06.2005

Accepted: 9.06.2005