

Ocena niezrównoważenia genomu  
w przypadkach rozrostu oraz raka  
*endometrium*Evaluation of genomic imbalance in endometrial hyperplasia  
and carcinomaMichał Bednarek<sup>1</sup>, Maria Constantinou<sup>1</sup>, Łukasz Kępczyński<sup>1</sup>, Agata Shiar Kassassir<sup>2</sup>,  
Anna Sobczuk<sup>2</sup>, Maria Wieszczycka<sup>3</sup>, Jacek Suzin<sup>3</sup>, Bogdan Kałużewski<sup>1</sup><sup>1</sup> Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej, Zakład Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska<sup>2</sup> Klinika Ginekologii i Położnictwa II Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska<sup>3</sup> Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologicznej I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

## Streszczenie

**Cel pracy:** *Celem podjętych badań było zidentyfikowanie w grupie pacjentek z rozrostem endometrium najwcześniejszych i specyficznych zmian genetycznych, które można identyfikować z podwyższonym ryzykiem transformacji nowotworowej, a także charakterystyka zmian genetycznych związanych z rozwiniętą formą nowotworu.***Materiał i metody:** *Badaniami objęto 44 pacjentki: w 5 przypadkach histopatologicznie nie potwierdzono cech rozrostu, w 26 przypadkach potwierdzono histopatologicznie rozrost endometrium, u 13 pacjentek zdiagnozowano raka błony śluzowej trzonu macicy.***Wyniki:** *Badania przeprowadzono przy użyciu mikromacierzy typu custom-made 4x180K firmy BlueGnome. W przypadkach bez rozrostu zdiagnozowaliśmy zmiany o charakterze CNV's (Copy Number Variation), które z różną częstością występują w genomie populacji osób zdrowych. Istotne niezrównoważenie genomu zostało wykryte u 26 (100 %) pacjentek z rozpoznanymi rozrostami oraz u 11 (84, 6%) pacjentek z rozpoznanym rakiem endometrium. Wykryliśmy również dotąd nieopisywane zmiany zlokalizowane w charakterystycznych regionach genomu.***Wnioski:** *Technika aCGH jest efektywnym narzędziem do analizy aberracji chromosomowych. Badanie niestabilności chromosomowej, czyli określenie rodzaju i zakresu zmian w chromosomach, jest badaniem pozwalającym ustalić regiony krytyczne, a co za tym idzie zidentyfikować geny lub grupy genów ważne dla powstawania i rozwoju raka endometrium. W oparciu o przeprowadzone badania zaproponowaliśmy hipotetyczny model sekwencji zmian genetycznych towarzyszących wielostopniowemu procesowi transformacji nowotworowej endometrium. Schemat przedstawia Rycina 2.*Słowa kluczowe: **rozrost endometrium / rak endometrium / aCGH /**

## Adres do korespondencji:

Michał Bednarek  
Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej, Zakład Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,  
Centrum Kliniczno-Dydaktyczne UM  
Polska, 92-213 Łódź, ul. Pomorska 251  
tel./fax: + 42 272 57 67, e-mail: robin4307@wp.plOtrzymano: 22.01.2014  
Zaakceptowano do druku: 19.06.2014

## Abstract

**Objective:** The main goal of our study was to identify the earliest and specific genetic changes which could be associated with an increased risk of neoplastic transformation in a group of patients with endometrial hyperplasia. Another goal was to characterize genetic changes associated with advanced forms of cancer.

**Material and methods:** The study involved forty-four (44) female patients, including five (5) patients with no histopathologically confirmed hyperplastic features, twenty-six (26) patients with histopathologically confirmed endometrial hyperplasia, and thirteen (13) patients with diagnosed carcinoma of the endometrium. The study was conducted using a custom-made 4x180K microarray of BlueGnome.

**Results:** Copy number variations (CNV) were found in the cases without endometrial hyperplasia. Such changes occur with varying frequency in the genome of healthy female population. Significant genome imbalance was identified in the twenty-six (26) (100%) patients with diagnosed hyperplasia and in eleven (11) subjects (84.6%) with diagnosed endometrial cancer. Other, not yet reported, changes localized in characteristic regions of the genome were also found.

Key words: **endometrial hyperplasia / endometrial carcinoma / aCGH /**

## Wstęp

Rak endometrium jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych żeńskich narządów płciowych w krajach rozwiniętych, o wysokim standardzie życia. Liczba przypadków szacowana jest na 15-20 na 100 tys. kobiet rocznie. Rak endometrium zajmuje czwarte miejsce wśród zachorowań na raka u kobiet w Polsce [1-3].

Techniki cytogenetyczne, klasyczne i molekularne oraz technika porównawczej analizy DNA pozwoliły na wytypowanie zmian genomowych towarzyszących transformacji nowotworowej w raku endometrium. Aberracje chromosomów 1, 2, 8 i 10 wydają się być najczęstszymi. Wśród aberracji liczbowych duplikacje chromosomu 10 i 1q spotykane były najczęściej, podczas gdy duplikacje chromosomów 2, 7 i 12 spotykane są rzadziej, tabela nr II. Zmiany wykrywane w regionie 1p były częstsze w atypowych rozrostach złożonych niż w rozrostach złożonych bez cech atypii czy też w rozrostach prostych. Często dominującymi aberracjami chromosomowymi diagnozowanymi w raku endometrium są duplikacje dup1q oraz dup8q. Brak obecności tych zmian w rozrostach może być tłumaczony faktem, że są one nabywane w chwili transformacji atypowego rozrostu złożonego do raka endometrium [4-9].

Trzeba nadmienić, że niektórzy autorzy zajmowali się tylko rozrostami endometrium nie uwzględniając typów rozrostów, inni zajmowali się nowotworami endometrium bez rozróżniania typów histologicznych.

Teoria klonalności nowotworów zakłada, że powstanie guza jest poprzedzone klonalnym rozrostem komórek, które nabyły zmianę umożliwiającą wyłamanie się spod mechanizmów regulujących procesy wzrostu i apoptozy. Każdy następny klon komórkowy, w toku procesu kancerogenezy może nabywać dodatkowe zmiany cytogenetyczne, które powodują, że rozrost guza stanie się bardziej gwałtowny [10].

Prawdopodobnie zmiany chromosomowe mają wpływ na morfologię komórek nowotworowych. Większość guzów litych charakteryzuje się złożonymi aberracjami chromosomowymi. Niestabilność genomowa może występować spontanicznie ze zmienną częstotliwością. Każda z komórek nabywa różnego typu aberracje chromosomowe, jednak początek rozrostowi klonalnemu może dać wyselekcjonowana grupa komórek, która uzyskała szczególny zestaw zmian cytogenetycznych predisponujący je do transformacji nowotworowej [11].

## Materiał i metody

Badaniami objęto 44 pacjentki, u których odnotowano, niepoddające się leczeniu farmakologicznemu krwawienia okresu okołomenopauzalnego. W 5 przypadkach histopatologicznie nie potwierdzono obecności cech rozrostu ani raka. W 26 przypadkach potwierdzono histopatologicznie rozrost endometrium. U 6 pacjentek z rozrostem prostym oraz u 11 pacjentek z rozrostem złożonym mikroskopowo nie stwierdzono cech atypii. Atypię komórkową stwierdzono u 2 pacjentek z rozrostem prostym oraz u 7 z rozrostem złożonym. U 13 pacjentek zdiagnozowano raka błony śluzowej trzonu macicy, w 7 przypadkach o stopniu złośliwości histologicznej G1, natomiast w 6 przypadkach o stopniu G2. Pacjentki w chwili wykonywania zabiegu były w przedziale wiekowym od 39 do 87 lat. Z badania wyłączono pacjentki, u których rozpoznano w przeszłości lub stwierdzono aktualnie współistnienie innego nowotworu złośliwego.

W 26 przypadkach pozyskano materiał w trakcie operacyjnego usunięcia trzonu macicy, w 18 przypadkach drogą biopsji aspiracyjnej jamy macicy.

Projekt badawczy uzyskał pozytywną opinię komisji bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, decyzja nr RNN/80/10/KE. Każdorazowo lekarz informował pacjentki o celach eksperymentu, po czym dobrowolnie uzyskiwał pisemną zgodę na uczestnictwo w projekcie badawczym.

Na sali operacyjnej fragmenty guza lub materiał pochodzący z biopsji był zamrażany w temperaturze oparów ciekłego azotu (-196 °C). Kolejne fragmenty guza utrwalano w płynie Bouina, a następnie poddawano ocenie histopatologicznej. Ocenę preparatów przeprowadzali patolodzy z dwóch niezależnych ośrodków diagnostycznych.

Do ustalenia zmian o charakterze CNVs posłużyła grupa kontrolna licząca 45 osób. Do grupy odniesienia zostali zakwalifikowani pacjenci Poradni Genetyki Klinicznej, u których w chwili badania nie zdiagnozowano chorób nowotworowych [11].

DNA izolowano metodą kolumnkową Sherlock AX firmy A&A Biotechnology. Jakość uzyskanego DNA oceniano przy pomocy spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

Ocena niezrównoważenia genomu została przeprowadzona z wykorzystaniem mikromacierzy *CitoChyp Cancer* 4x180K firmy BlueGnome. Znakowanie i hybrydyzacja mikromacierzy zostały przeprowadzone zgodnie z protokołem opracowanym przez firmę Agilent.

Tabela I. Najczęstsze aberracje chromosomowe wykryte techniką aCGH w prezentowanym eksperymencie.

	Rozrost endometrium		Rak endometrium
	bez cech atypii	atypowy	
Regiony chromosomowe	dup 14q32.33	del 15q11.2	dup/del 20q13.33
	dup 5q13.2	dup/del 8p11.23	dup/del 19p13.3
	dup 6q14.1	dup 12p13.31	dup 16p13.3
	dup 1p34.1	del 6p21.32	dup13q14.2
	dup/del 6q25.2	dup 11q13.2	dup11p15.5
		dup/del 8p23.1	del 10q26.3
		dup16q23.1	dup7p22.3
			dup/del1p36.32
			dup 8q24.3
			dup 17q25.3
			dup 5p15.33
			Dup/del 8p12
			Dup/del 17q12
			dup 19q13.42

Po hybrydyzacji mikromacierze skanowano przy użyciu skanera InnoScan 900AL firmy Innopsys. Analizy skanów przeprowadzono przy użyciu programu Mapix. Graficzną obróbkę obrazu przeprowadzono z wykorzystaniem programu BlueFuse Multi 2.6.

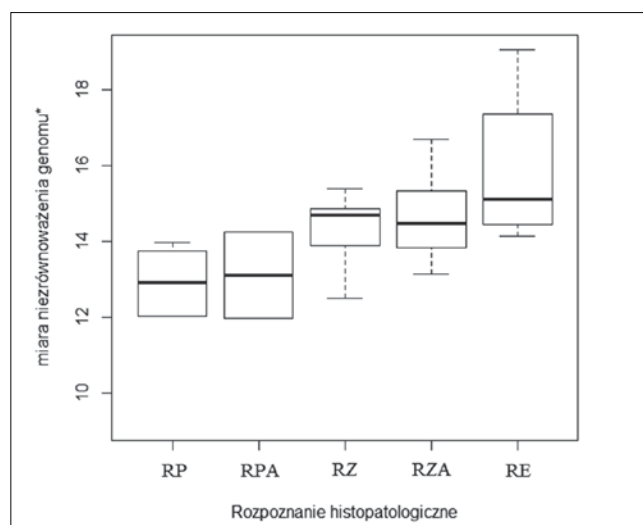
## Wyniki

W przypadkach, w których nie potwierdzono rozrostu nie wykryto niezrównoważenia genomu z wyjątkiem zmian o charakterze CNV's (*Copy Number Variation*), które z różną częstością występują w genomie populacji osób zdrowych. Technika aCGH (*array Comperative Genomic Hybridization*) pozwoliła na wykrycie niezrównoważenia genomu u 26 (100%) pacjentek z rozpoznanymi rozrostami. Aberracje chromosomowe zostały wykryte u 11 (84,6%) pacjentek z rozpoznanym rakiem endometrium. Najczęstsze aberracje chromosomowe wykryte techniką aCGH w naszym eksperymencie zostały przedstawione w tabeli I.

Analiza danych pochodzących od pacjentek z rozpoznaniem rozrostem prostym i złożonym, zarówno z cechami atypii jak i bez cech atypii komórkowej, pozwoliła wyłonić najczęściej powtarzające się zmiany o charakterze delecji: del15q11.2 oraz duplikacji: dup 14q32.33, dup12p13.31, dup 6q14.1, dup5q13.2. Regionem, w którym najczęściej dochodziło do zmian zarówno o charakterze delecji i duplikacji, był region: dup/del 8p11.23.

Najczęstszymi niezrównoważeniami genomu obserwowanymi w raku endometrium były: dup/del 20q13.33, dup/del 19p13.3, dup 16p13.3, dup13q14.2, dup11p15.5, del 10q26.3, dup7p22.3, dup/del1p36.32. Zmiany te były obserwowane z różną częstością.

Została stwierdzona istotna statystycznie ( $p=0,03$ ) zależność między poszczególnymi grupami pacjentów a poziomem



Rycina 1. Zależność między poziomem niezrównoważenia genomu, a nasileniem zmian architektoniki tkanki endometrium i poziomem atypii komórkowej w pięciu grupach pacjentek: RP: rozrost prosty; RPA: rozrost prosty atypowy; RZ: rozrost złożony; RZA: rozrost złożony atypowy; RE: rak endometrium.

niezrównoważenia genomu. Im bardziej nasilone były zmiany architektoniki tkanki endometrium i wyższy poziom atypii komórkowej, tym wykrywano był wyższy stopień niezrównoważenia genomu. Miarą niezrównoważenia genomu jest log sumy par zasad, które uległy duplikacji i delecji, rycina 1.

Do analizy statystycznej danych zastosowano test istotności t-Studenta dla współczynnika korelacji r Pearsona.

Tabela II. Zestawienie wyników analizy niezrównoważeń genomu w rozrostach i raku endometrium uzyskanych przez różnych autorów.

Chromosom	Autor						
	Sonoda i wsp. 1997	Kiechle i wsp. 2000	Baloglu i wsp. 2001	Micci i wsp. 2004	Muslimanoglu i wsp. 2005	Levan i wsp. 2006	Nasze wyniki
1	+q	-p; +q	+q; +p	+q; +p	-p, +q	+q	+/- p36.32
2				+p +q	+p		
3				+q	+q		
4		+q		-q	+q	-q	
5	+p			+p -q			+q13.2
6				+p; +q; -q			+q14.1
7				+p; +q			+ p22.3
8	+q	+q	+ /- 8	+q; +p	+q	+q	+p11.23 +/-p23.1
9				-p; -q			
10	+p; +q		+q; +p	+q; +p	-q	+q, +p	-q26.3
11							+ p15.5
12				+q			+ p13.31
13	+q						+ q14.2
14							+q32.33 +/- q11.1
15							-q11.2
16		-p		+p			+p13.3
17				-p; -q; +q	-q		
18				+q		-q	
19				-p; -q		+p; +q	+/- p13.3
20		-q		+q; +p	-q		+/- q13.33
X				-p; -q			
Y							

## Dyskusja

W prezentowanej pracy zastosowano technikę cytogenetyki molekularnej o największej dostępnej rozdzielczości, zwaną porównawczą hybrydyzacją do mikromacierzy aCGH, w celu wykrycia niezrównoważenia genomu komórki na różnych etapach kancerogenezy. Porównanie czułości zastosowanej metody CGH z wynikami uzyskanymi przez innych autorów przemawia za wielokrotnie wyższą czułością metody aCGH. (Tabela II).

Stało się również możliwym przypisanie niezrównoważenia genomu do subregionów chromosomowych, co było dotychczas niemożliwe, ze względu na ograniczoną do jednego prążka czułość techniki CGH. Pozostaje to jednak bez istotnego wpływu na częstość wykrywanych jakościowo-ilościowych zmian genomu w przypadkach rozrostów i raka endometrium. Jest zastanawiające, że w 15,4% raka endometrium nie obserwowano niezrównoważenia genomu. Być może świadczy to o tym, że ilościowo-jakościowe zmiany genomu nie są okolicznością bezwzględnie towarzyszącą kancerogenezie, choć zastanawiające jest, że nie znajduje to odzwierciedlenia w strukturze szczegółowego obrazu histopatologicznego i dynamice procesu kancerogenezy.

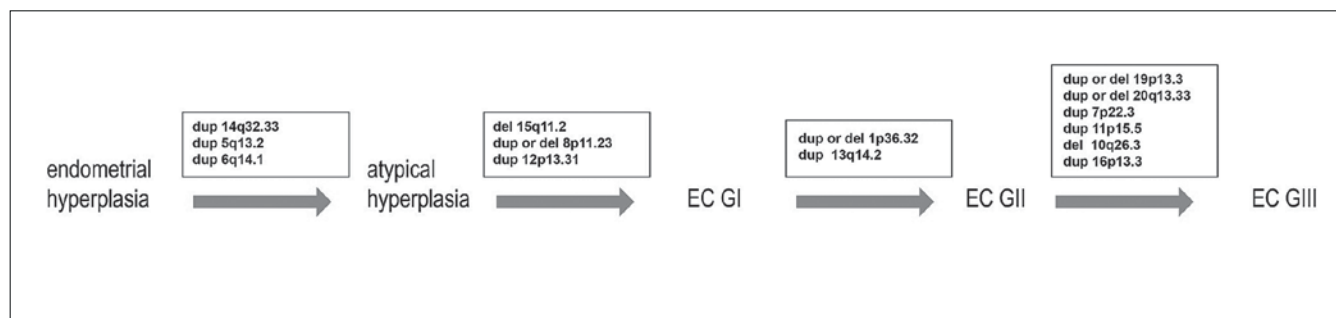
Analiza danych uzyskanych techniką aCGH w naszym badaniu pozwoliła wyłonić kilka zmian genomu, które nie były opisywane wcześniej. Były to aberracje: dup14q32.33 (10/44 22.7%), oraz del15q11.2 (9/44 20.5%).

Znamiennym jest fakt zwiększenia ilości wykrywanych zmian niezrównoważenia genomu na etapie rozrostów atypowych. Zwielenokrotnienie liczby rejestrowanych aberracji w genomie świadczy o nasilonych procesach kancerogenezy na tym etapie transformacji. Jest to argument przemawiający za tezą, że rozrost atypowy jest bezpośrednim stadium poprzedzającym rozwój raka endometrium.

Regionem chromosomowym, który najczęściej ulegał rearanżacjom był subregion 14q32.33. Jest interesującym, że w subregionie tym zmapowany jest gen *SIVA*. Gen ten pełni istotną rolę w regulacji procesu apoptozy. Białko siva wiąże się z cząsteczką CD27, która jest członkiem rodziny *TNFR* (receptor czynnika martwicy nowotworów). Powstały po przyłączeniu siva kompleks wykazuje zdolność indukowania apoptozy w hodowlach linii komórkowych [13].

Region 15q11.2 zawiera *locus* dla genu *CYFIP1*. Gen ten koduje białko FMR1. *CYFIP1* reguluje zmiany architektury aktywnego cytoszkieletu [14]. Silva i wsp. odkryli, że *CYFIP1* często ulega delecjom w ludzkich nowotworach nabłonkowych. Obniżona ekspresja *CYFIP1* jest często obserwowana podczas ekspansji nowotworów nabłonkowych oraz jest związana ze złym rokowaniem. Dane doświadczalne Silvy wskazują, że *CYFIP1* może wpływać na kancerogenezę poprzez działanie, jakie wywiera na dynamikę zmian cytoszkieletu oraz interakcję komórka-komórka [15].

Michał Bednarek et al. Ocena niezrównoważenia genomu w przypadkach rozrostu oraz raka endometrium...



Rycina 2. Model akumulacji zmian genetycznych występujących w transformacji nowotworowej endometrium.

## Wnioski

Technika aCGH jest efektywnym narzędziem do analizy aberracji chromosomowych. Badanie niestabilności chromosomowej, czyli określenie rodzaju i zakresu zmian w chromosomach, jest badaniem pozwalającym ustalić regiony krytyczne, a co za tym idzie zidentyfikować geny lub grupy genów ważne dla powstawania i rozwoju raka endometrium. W oparciu o przeprowadzone badania zaproponowaliśmy hipotetyczny model sekwencji zmian genetycznych towarzyszących wielostopniowemu procesowi transformacji nowotworowej endometrium. Schemat przedstawia Rycina 2.

### Oświadczenie autorów:

1. Michał Bednarek – autor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa, wykonanie badań laboratoryjnych.
2. Maria Constantinou – opracowanie wyników badań.
3. Łukasz Kępczyński – analiza statystyczna wyników.
4. Agata Shiar Kassassir – zebranie materiału.
5. Anna Sobczuk – zebranie materiału.
6. Maria Wieszczycka – zebranie materiału.
7. Jacek Suzin – zebranie materiału.
8. Bogdan Kałużewski – współautor tekstu pracy, ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu.

### Źródło finansowania:

- część projektu finansowana z grantu promotorskiego MNiSW nr N N407 687440
- część projektu finansowana była przez firmę "Genos" - członka Polskiej Platformy Technologicznej Innowacyjnej Medycyny, Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.

### Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

## Piśmiennictwo

1. Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2006 r. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa. 2008.
2. Silverberg SG, Kurman RJ, Nogales F, [et al.]. Epithelial tumors and related lesions. In: Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Organs. Eds. Devilee P, Tavassoli FA. Lyon, France: IARC Press. 2003.
3. Grosman-Dziewiszek P, Dziegiel P, Zabel M. Disturbance of gene expression in endometrial cancer as therapy aim. *Ginekolog Pol.* 2011, 82 (4), 276-280.
4. Levan K, Partheen K, Osterberg L, [et al.]. Chromosomal alterations in 98 endometrioid adenocarcinomas analyzed with comparative genomic hybridization. *Cytogenet Genome Res.* 2006, 115 (1), 16-22.
5. Muslumanoğlu HM, Oner U, Ozalp S, [et al.]. Genetic imbalances in endometrial hyperplasia and endometrioid carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005, 120 (1), 107-114.
6. Baloglu H, Cannizzaro LA, Jones J, Koss LG. Atypical endometrial hyperplasia shares genomic abnormalities with endometrioid carcinoma by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol.* 2001, 32 (6), 615-622.
7. Micci F, Teixeira MR, Haugom L, [et al.]. Genomic aberrations in carcinomas of the uterine corpus. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004, 40 (3), 229-246.
8. Sonoda G, du Manoir S, Godwin AK, [et al.]. Detection of DNA gains and losses in primary endometrial carcinomas by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997, 18 (2), 115-125.
9. Kiechle M, Hinrichs M, Jacobsen A, [et al.]. Genetic imbalances in precursor lesions of endometrial cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol.* 2000, 156 (6), 1827-1833.
10. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. 2013. *Karger Publishers*, 15 paź 2012.
11. Gisselsson D. Tumour morphology-interplay between chromosome aberrations and founder cell differentiation. *Histol Histopathol.* 2002, 17 (4), 1207-1212.
12. Constantinou M, Bednarek M, Zajac E, [et al.]. Wykorzystanie techniki genomowej hybrydyzacji porównawczej do chromosomu (CGH) i mikromacierzy (aCGH) w świetle 10 letnich badań własnych. Red. Kocki J. Kazylistyka wieku rozwojowego. Symptomatologia i diagnostyka. Lublin: *Pollhymnia*. 2010, 69-122.
13. Prasad KV, Ao Z, Yoon Y, [et al.]. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94 (12), 6346-6351.
14. Machesky LM, Tang HR. Actin-based protrusions: promoters or inhibitors of cancer invasion? *Cancer Cell.* 2009, 16 (1), 5-7.
15. Silva JM, Ezhkova E, Silva J, [et al.]. Cyfp1 is a putative invasion suppressor in epithelial cancers. *Cell.* 2009, 137 (6), 1047-1061.