

Addukty DNA w narządach płciowych kobiety

DNA adducts in human female genital organs

Postawski Krzysztof^{1*}, Prządka-Rabaniuk Dorota¹, Monist Marta¹,
Baranowski Włodzimierz^{2*}

*jednakowy wkład pracy

¹ II Katedra i Klinika Ginekologii AM w Lublinie

² Klinika Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej WIM w Warszawie

Streszczenie

Addukty DNA, jako jeden z markerów uszkodzenia materiału genetycznego poprzedzają wystąpienie onkogennych mutacji. Powstają w wyniku oddziaływania na DNA wielu czynników środowiskowych m. in. promieniowania jonizującego, ultrafioletowego, zanieczyszczeń środowiska, toksyn, a także substancji endogennych, na przykład estrogenów.

Uważa się, że formowanie adduktów DNA jest konieczne, ale niewystarczające dla wystąpienia przemiany nowotworowej komórki.

W artykule przedstawiono w oparciu o dostępne piśmiennictwo, w sposób syntetyczny ogólne informacje o adduktach DNA oraz stan wiedzy o poziomie tych modyfikacji w prawidłowych i nowotworowo zmienionych tkankach narządów płciowych u kobiet.

Słowa kluczowe: **narządy płciowe kobiety / addukty DNA / rak endometrium /**

Abstract

DNA adducts, one of genetic damages markers, precede and finally can lead to oncogenic mutations. They appear in genome as a result of DNA bases damages caused by various and numerous environmental factors eg. ultraviolet light, ionic radiation, toxins and also endogenic substances, for example estrogens.

It is believed that the creation of DNA adducts is a necessary but insufficient process for the neoplastic transformation of the cell.

The following review presents concise knowledge about the DNA adducts creation and their sequels served in healthy and cancerous tissues of the female genital organs, on the base of the available data.

Key words: **human female genital organs / DNA adducts / endometrial cancer /**

Adres do korespondencji:

Krzysztof Postawski
II Katedra i Klinika Ginekologii AM w Lublinie
20-954 Lublin, ul. Jaczewskiego 8
e-mail: postawski@onet.eu

Otrzymano: 18.05.2007
Zaakceptowano do druku: 10.10.2007

Co to są addukty DNA?

Addukty DNA zaliczane są do markerów uszkodzeń materiału genetycznego [1]. Powstają w wyniku oddziaływań na DNA nie tylko czynników fizycznych w postaci promieniowania ultrafioletowego czy jonizującego, ale także endogennych substancji chemicznych, w tym estrogenów [2]. W ich powstawaniu biorą też udział substancje chemiczne zanieczyszczające środowisko naturalne człowieka, w postaci policyklicznych węglowodorów aromatycznych – PAH, mykotoksyn, aromatycznych i heterocyklicznych amin, czy związki zawarte w dymie tytoniowym.

Kreację adduktu w większości przypadków poprzedza metaboliczna, katalizowana głównie przez enzymy zależne od cytochromu P450, aktywacja substancji chemicznych w tkankach docelowych [1]. Wytworzone w jej wyniku wysoce aktywne, dodatkowo naładowane (elektrofilowe) pochodne, łącząc się silnymi wiązaniami kowalencyjnymi z nukleofilowymi (posiadającymi ujemny ładunek) miejscami akceptorowymi nukleozasad, głównie guaniny, generują uszkodzenia DNA, ale także RNA i białek, w postaci adduktów (*adducts = addiction products*) [1, 2, 3, 4].

Addycja elektrofilowych pochodnych do grupy aminowej zlokalizowanej poza pierścieniem nukleozasady prowadzi do powstania adduktów stabilnych, których eliminacja z genomu możliwa jest jedynie w wyniku naprawy DNA, głównie na drodze NER (*nucleotide excision repair*). Połączenia produktów metabolicznej aktywacji z nukleofilowymi miejscami akceptorowymi w pierścieniu nukleozasad implikują formowanie adduktów niestabilnych. Tak zmodyfikowane zasady azotowe w wyniku przebiegającej najczęściej spontanicznie hydrolizy wiązania glikozydowego, odłączają się od DNA wytwarzając miejsca apurynowe/apirimidynowe (miejsca AP) [5]. Stres oksydacyjny jest przyczyną powstawania adduktów 8-OH-dezoksyguanozyny, a także pęknięć nici DNA, które podobnie jak wspomniane wcześniej modyfikacje są przyczyną destabilizacji genomu [6].

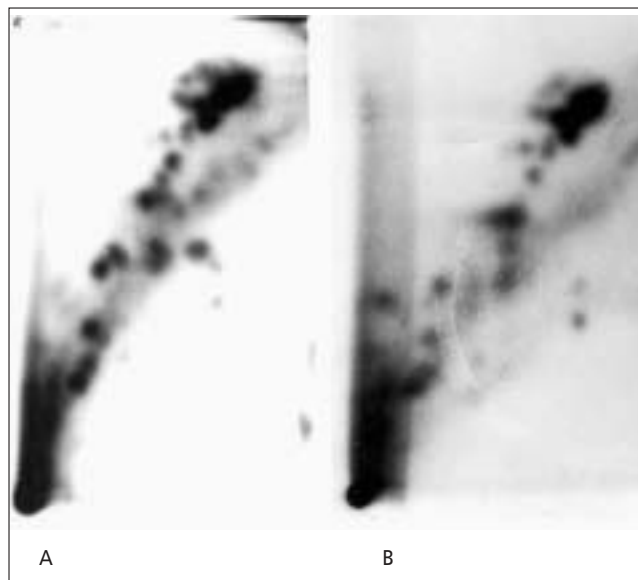
Addukty DNA formowane z udziałem pochodnych cisplaty (szczególnie cis-dwuaminodwuchloroplatyny, cis-DDP) wywołując powstanie międzyniciowych wiązań krzyżowych są przyczyną cytotoksycznego działania leku wykorzystywanego w chemioterapii raka jajnika i zaawansowanych postaci raka szyjki macicy u kobiet [7, 8].

Rola adduktów w karcinogenezie

Addukty DNA powstrzymują lub spowalniają replikację, co wraz z wywołanym przez nie przedłużeniem faz G1 i G2 cyklu komórkowego, umożliwia bardziej efektywną eliminację zmian genotoksycznych przez system naprawy DNA, zapobiegając utrwaleniu zmian genetycznych w nowo syntetyzowanej makromolekule [5, 9].

Liczba adduktów DNA w tkankach docelowych uzależniona jest od szybkości formowania i usuwania ich drogą naprawy oraz „rozcieńczenia” w wyniku wzmoczonej replikacji w szybko dzielących się komórkach, ponieważ nić siostrzana w relacji do nici matrycowej nie zawiera adduktów [10].

Do badania stężenia stabilnych adduktów DNA powszechnie wykorzystywana jest m. in. wysoce czuła metoda ³²P-postlabeling [11].



Rycina 1. Autoradiogram hydrofobowych adduktów DNA w A) adenocarcinoma endometriale clarocellulare, B) adenocarcinoma endometriale G3 naciekającego jajowód.

Wspomniana technika badawcza umożliwia nie tylko ilościową oceną liczby adduktów (nawet jednego w genomie), ale także ustalenie ich mapy (*pattern*) (Rycina 1, badania własne) w próbkach zawierających nawet jedynie 2µg DNA.

Chang i wsp. [12] uważają, że ekspozycja na działanie karcinogenów dopiero po upływie co najmniej 10 lat doprowadza do pojawienia się onkogennych mutacji w komórkach somatycznych. W opinii Lutz i Gaylora [13] powstawanie adduktów oraz zależnych od nich zmian genetycznych jest proporcjonalne (*linear*) tylko w zakresie niskich dawek karcinogenu. Zarówno u zwierząt jak i u człowieka stwierdzono ścisły związek pomiędzy liczbą adduktów DNA a mutagenезą oraz powstawaniem złośliwych guzów pęcherza moczowego, okrężnicy, przełyku czy gruczołu sutkowego [14, 15].

Addukty DNA są jedną z przyczyn występowania mutacji w genach supresorowych i protoonkogenach, co doprowadza do utraty dozoru nad różnicowaniem i wzrostem komórek oraz uniemożliwia kontrolę nad patologicznymi zmianami w genomie [16, 17]. W prowokowanych u zwierząt nowotworach oskrzeli i gruczołu sutkowego liczba mutacji P53, głównie pod postacią transwersji G→T, wzrasta relatywnie do dawki podawanego benzo[*a*]pirenu (BP) [14].

Uważa się, że formowanie adduktów DNA jest konieczne, ale nie wystarczające dla wystąpienia przemiany nowotworowej.

Chemiczne modyfikacje nukleotydów DNA w prawidłowych i w nowotworowo zmienionych tkankach narządów płciowych u kobiet

Nieliczne publikacje informują o występowaniu chemicznych modyfikacji nukleotydów w tkankach prawidłowych oraz w utkaniu nowotworów złośliwych narządu płciowego kobiet.

Addukty DNA w narządach płciowych kobiety.

King i wsp. [18] poinformowali, że przy zastosowaniu metody ^{32}P -*postlabeling* w ponad 70% próbek DNA izolowanych z biopłatów z szyjek macicy niezmiennych nowotworowo, lecz wykazujących nieprawidłowy obraz w rozmazie cytologicznym, stwierdzono obecność od 0,2 do 59,5 adduktów DNA na 108 nukleotydów. Grupa Kinga nie stwierdziła różnic w liczbie adduktów między kobietami palącymi i niepalącymi tytoń. Zaobserwowano jednak, że u palących stosujących doustną formę antykoncepcji, liczba zmodyfikowanych nukleotydów była istotnie wyższa niż u pacjentek nie zapobiegających ciąży. Autorzy sądzą, że wysoka liczba adduktów DNA oraz prowokowana przez estrogeny hiperproliferaacja nabłonka, może zwiększać możliwość wystąpienia raka szyjki macicy.

Melikian i wsp. [19] sugerują, że wzrost ryzyka wystąpienia raka u palących może być spowodowany przez ekspozycję nabłonka szyjki macicy na działanie PAH (policyklicznych węglowodorów aromatycznych), w tym pochodzących z dymu tytoniowego. Zespół Melikiana odnotował w służbie szpitalnej zarówno u palących jak i niepalących kobiet obecność rakotwórczych pochodnych BP (benzo[a]pirenu), a w prawie wszystkich pobranych wycinkach z niezmiennego nowotworowo narządu, stwierdzono także wywołane przez te substancje chemiczne, uszkodzenia DNA w nabłonku i podścielisku. Średnia liczba adduktów DNA formowanych z udziałem pochodnych BP przy zbliżonych wartościach w podścielisku, była w nabłonku szyjki macicy u palących tytoń prawie dwukrotnie wyższa niż u kobiet niepalących. Autorzy cytowanego doniesienia podejrzewają, że miejscem powstawania elektrofilowych pochodnych PAH, także tych pochodzących z dymu tytoniowego, są nie tylko komórki nabłonka szyjki macicy, a karcinogenne metabolity PAH mogą być transportowane do narządu docelowego także z innych tkanek.

Dorman i wsp. [20] badając wpływ BP na błonę śluzową macicy u kobiet stwierdzili, że najwyższe wiązanie karcinogenu z DNA wystąpiło w hodowlach *endometrium* uzyskanego po wycięciu macicy wykonanym między 10 a 21 dniem cyklu płciowego, zaś najniższe było w fazie wydzielniczej po 21 dniu cyklu. Reaktywność BP z DNA przedmenopauzalnego *endometrium* była wyższa niż zanotowano w tkance uzyskanej od kobiet operowanych po menopauzie. W opinii autorów zmiany w addycji BP do DNA mogą być zależne od stężenia estrogenów we krwi. Potwierdzeniem takiej zależności było odnotowanie najwyższej po ustąpieniu miesiączkowania aktywności promieniotwórczej przyłączonego kowalencyjnie BP do DNA błony śluzowej macicy – a więc wystąpienie najwyższej ilości adduktów DNA u operowanej po menopauzie, która stosowała preparaty estrogenowe.

Hemminki i wsp. [21] oraz Shibutani i wsp. [22] w przeciwieństwie do Carmichaela i wsp. [23] uważają, że tamoksyfenu stosowany u kobiet po leczeniu operacyjnym raka sutka wywołuje w niezmiennym nowotworowo *endometrium* powstawanie karcinogennych adduktów DNA. Zespół Shibutani wykazał w DNA *endometrium* u prawie połowy leczonych antyestrogenem kobiet, że liczba nukleotydów uszkodzonych przez pochodne tamoksyfenu wynosiła od 0,4 do 8,3 adduktów na 108 prawidłowych nukleotydów. Specyficznych dla leku adduktów DNA nie notowano u kobiet, które nie otrzymywały antyestrogenów.

Yang i wsp. [24] stwierdzili, że *endometrium* u kobiet jest miejscem formowania adduktów lipofilowych, których liczba – kilkakrotnie niższa niż odnotowano w limfocytach krwi obwodowej, w tkance płucnej czy w sutku, bądź w skórze, jest tylko nieznacznie wyższa od notowanej w DNA jelita grubego. Autorzy stwierdzili, że mapy adduktów były specyficzne dla każdej z badanych tkanek.

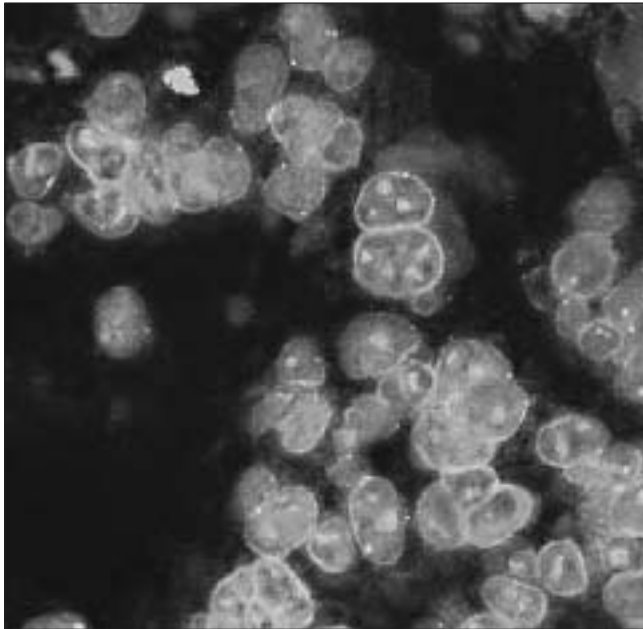
Wyniki badań własnych nad adduktami DNA w prawidłowym i nowotworowo zmienionym *endometrium* u kobiet

Badania własne [25, 26, 27, 28, 29] potwierdzają nieliczne opinie o formowaniu adduktów w prawidłowej błonie śluzowej macicy, dostarczając dowodów na występowanie chemicznych modyfikacji nukleotydów w przednowotworowym i w nowotworowo zmienionym *endometrium* u kobiet.

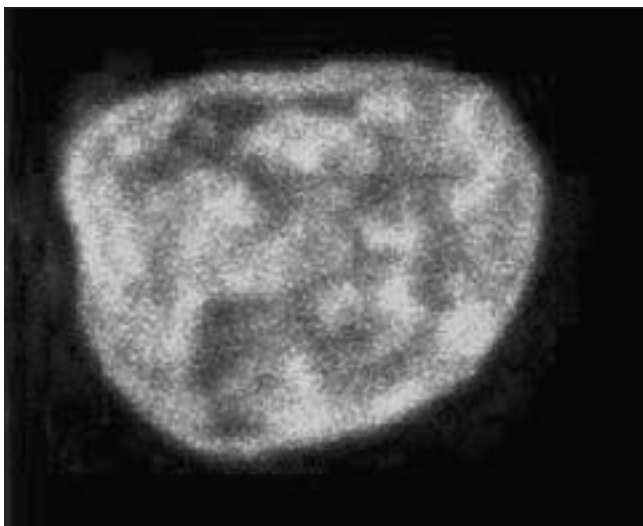
Stosując metodę ^{32}P -*postlabeling* stwierdziliśmy, że w prawidłowym *endometrium* średnia liczba hydrofobowych adduktów była niższa niż odnotowana zarówno w przypadkach atypowych rozrostów gruczolakowatych, jak i gruczolakoraków błony śluzowej macicy. Liczba genotoksycznych modyfikacji DNA w tkankach przednowotworowych nie różniła się od zanotowanej w nowotworach, a mapy adduktów były podobne. Gruczolakoraki *endometrium* noszące mutacje punktowe w kodonie 12 genu K-ras wykazywały w porównaniu do guzów bez mutacji niższą, statystycznie nieistotną, średnią liczbę adduktów DNA. W grupie guzów wykazujących ekspresję receptora estrogenowego typu a (ER+) średnia liczba adduktów była istotnie niższa w porównaniu do zanotowanej w nowotworach receptoronegatywnych. Raki posiadające miejsca wiążące progesteron (PR+) zawierały prawie trzykrotnie niższą liczbę adduktów DNA niż guzy receptoronegatywne. Stwierdzono wysoce znamienne, ujemną korelację między liczbą adduktów DNA, a wielkością indeksu *H-score* (półilościowy współczynnik ekspresji histochemicznej) dla ER ($r=0,67$). Ujemna korelacja liczby adduktów DNA w relacji do gęstości receptora progesteronowego ($r=-0,6$) wykazywała natomiast graniczną istotność statystyczną. Średnia liczba adduktów była wyższa w utkaniu nowotworów o najniższym stopniu histologicznego zróżnicowania, a najwyższy ich poziom występował w guzach G3 wytwarzających przerzuty. Nie stwierdzono istotnego wzrostu liczby adduktów u kobiet mieszkających w miastach w relacji do zamieszkujących wsie. Przy zastosowaniu techniki mikroskopii konfokalnej w gruczolakorakach stwierdzono istotnie wyższy niż w prawidłowym *endometrium* poziom adduktu 8-oksyo-guaniny, który nie narastał relatywnie do progresji schorzenia. (Rycina 2, badania własne).

Przedstawione wyniki badań własnych oraz innych autorów sugerują, że w tkankach narządów płciowych u kobiet jednym z molekularnych sygnałów zagrożenia transformacją nowotworową może być akumulacja adduktów DNA. W przypadkach gruczolakoraka *endometrium* liczba stabilnych adduktów DNA zwiększa się w relacji do ciężkości schorzenia.

Postawski K, et al.



Rycina 2a. Jądra komórek utkaniagruźlakoraka *endometrium* z klastrami 8-oksyo-Guaniny, (powiększenie 1000x).



Rycina 2b. Obraz pojedynczego jądra, (powiększenie 2000x).

Piśmiennictwo

- Keith G, Dirheimer G. Postlabeling: a sensitive method for studying DNA adducts and their role in carcinogenesis. *Curr Opin Biotechnol.* 1995, 6, 3-11.
- Liehr J, Avitts T, Randerath E, [et al.]. Estrogen-induced endogenous DNA adduction: possible mechanism of hormonal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986, 83, 5301-5305.
- Hemminki K, Autrup H, Haugen A. DNA and protein adducts. *Toxicology.* 1995, 101, 41-53.
- Dipple A. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis.* 1995, 16, 437-441.
- Marnett L, Burcham P. Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem Res Toxicol.* 1993, 6, 771-785.
- Prządka-Rabaniuk D, Jakowicki J, Kwaśniewska A. [i wsp.] Udział oksydacyjnych uszkodzeń DNA w nowotworzeniu w tym w błonie śluzowej macicy u kobiet. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 148-154.
- Chválová K, Brabec V, Kaspárková J. Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 1812-1821.
- Darcy K, Tian C, Reed E. A Gynecologic Oncology Group study of platinum-DNA adducts and excision repair cross-complementation group 1 expression in optimal, stage III epithelial ovarian cancer treated with platinum-taxane chemotherapy. *Cancer Res.* 2007, 67, 4474-4481.
- Zhou B, Elledge S. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000, 408, 433-439.
- Braithwaite E, Wu X, Wang Z. Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutat Res.* 1999, 424, 207-219.
- Randerath K, Reddy M, Gupta R. 32P-labeling test for DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981, 78, 6126-6129.
- Chang L, Hsia S, Chan P, [et al.]. Macromolecular adducts: biomarkers for toxicity and carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1994, 34, 41-67.
- Lutz W, Gaylor D. Significance of DNA adducts at low dose: shortening the time to spontaneous tumor occurrence. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1996, 23, 29-34.
- Perera F. Environment and cancer: who are susceptible? *Science.* 1997, 278, 1068-1073.
- Poirier M, Santella R, Weston A. Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis* 2000, 21, 353-359.
- Sugimura T, Ushijima T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutat Res.* 2000, 462, 235-246.
- Ross J, Nesnow S. Polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations between DNA adducts and ras oncogene mutations. *Mutat Res.* 1999, 424, 155-166.
- King M, Hollingsworth A, Cuzick J, [et al.]. The detection of adducts in human cervix tissue DNA using 32P-postlabelling: a study of the relationship with smoking history and oral contraceptive use. *Carcinogenesis.* 1994, 15, 1097-1100.
- Melikian A, Sun P, Prokopczyk B, [et al.]. Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Lett.* 1999, 146, 127-134.
- Dorman B, Genta V, Mass M, [et al.]. Benzo[a]pyrene binding to DNA in organ cultures of human endometrium. *Cancer Res.* 1981, 41, 2718-2722.
- Hemminki K, Rajaniemi H, Lindahl B, [et al.]. Tamoxifen-induced DNA adducts in endometrial samples from breast cancer patients. *Cancer Res.* 1996, 56, 4374-4377.
- Shibutani S, Suzuki N, Terashima I, [et al.]. Tamoxifen-DNA adducts detected in the endometrium of women treated with tamoxifen. *Chem Res Toxicol.* 1999, 12, 646-653.
- Carmichael P, Sardar S, Crooks N, [et al.]. Lack of evidence from HPLC 32P-postlabelling for tamoxifen-DNA adducts in the human endometrium. *Carcinogenesis.* 1999, 20, 339-342.
- Yang K, Fang J, Hemminki K. Abundant lipophilic DNA adducts in human tissues. *Mutat Res.* 1998, 422, 285-295.
- Baranowski W, Semczuk A, Jakowicki J, [i wsp.] Addukty DNA w rakach endometrium u kobiet. *Ginekol Pol.* 1997, 68, 292.
- Postawski K, Semczuk A, Jakowicki J, [et al.] Hydrofobowe addukty DNA w relacji do gęstości receptorów estrogenowych i progesteronowego w gruczołakorakach błony śluzowej macicy u kobiet. *Ginekol Pol.* 2001, 72, 709-716.
- Postawski K. *Badania nad metylacją i hydrofobowymi adduktami DNA w gruczołakoraku błony śluzowej macicy u kobiet.* Lublin: Akademia Medyczna. 2002. *Rozprawa habilitacyjna.*
- Prządka-Rabaniuk D. *Ocena ilościowa markerów stresu oksydacyjnego – miejsc AP oraz 8-oksyo-Guaniny w DNA utkania gruczołakoraka błony śluzowej macicy u kobiet.* Lublin: Akademia Medyczna. 2006. *Rozprawa doktorska.*