

Wartość prognostyczna analizy niestabilności mikrosatelitarnej DNA w raku piersi

Artur Bocian¹, Jolanta Szkudlarek², Jacek Bartkowiak²

Wstęp. Rak piersi jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych u kobiet, a jego karcynogeneza nadal pozostaje nieznana. Utrata funkcji sytemu MMR naprawiającego błędy powstałe podczas procesu replikacji DNA prowadzi do niestabilności genomu, która może być wykryta poprzez obecność polimorfizmu w mikrosatelitach (powtórzeń określonych 1–6 par zasad). Jest to nazwane niestabilnością mikrosatelitarną (MSI) i jest charakterystycznym znacznikiem dysfunkcji systemu MMR w rakach jelita grubego i innych nowotworach złośliwych.

Materiał i metody. W przeprowadzonej analizie badaliśmy występowanie MSI w 81 inwazyjnych rakach piersi i oceniliśmy jej związek z cechami klinicznymi takimi jak: wiek pacjentek, wielkość guza, typ nowotworu, przerzuty do węzłów chłonnych, przerzuty do wątroby, przerzuty do mózgu, występowanie wznowy miejscowej i inne. Analizę mikrosatelitarną przeprowadzono za pomocą 10 markerów służących do wykrywania niestabilności mikrosatelitarnej w raku piersi.

Wyniki. MSI wykryto w 40 z 81 przypadków (49,4%), gdzie MSI-H była w 15 przypadkach (18,5%), a MSI-L — w 25 przypadkach (30,9%). Zaobserwowano istotną statystycznie korelację między MSI i występowaniem przerzutów w wątrobie oraz przerzutów w mózgu. Znaleźliśmy także tendencję do podwyższonego wystąpienia MSI-H w raku zrazikowym (nieistotne statystycznie).

Wnioski. W przeprowadzonych przez nas analizach obecność MSI w rakach piersi wiązała się z krótszym przeżyciem i większą agresywnością (przerzutami do wątroby i mózgu).

The prognostic value of DNA microsatellite instability analysis in breast cancer

Introduction. Breast carcinoma is one of the most common malignancies in women, and its carcinogenesis etiology is still unknown. Loss of MMR function prevents the correction of replicative errors leading to instability of the genome, and can be detected by polymorphisms in micro satellites (1–6 nucleotide repeat sequences). This is known as microsatellite instability (MSI), and is a hallmark of MMR dysfunction and can thus be used as a marker of MMR dysfunction in colorectal and other malignancies.

Material and methods. We studied the presence of MSI in 81 invasive breast cancers and evaluated its relationship with patient age, tumor size, tumor type, lymph node metastasis, liver metastasis, brain metastasis, local recurrence, and other. Microsatellite analysis was performed using 10 markers selected for sensitive detection of microsatellite instability in breast cancer.

Results. MSI was detected in 40 of 81 cases (49.4%), where MSI-H was in 15 cases (18.5%) and MSI-L was in 25 cases (30.9%). A statistically significant correlation was observed between MSI and liver metastasis and brain metastasis. We also found a correlation (not statistically significant) between MSI-H and lobular carcinoma.

Conclusion. The analyzes performed showed that the presence of MSI in breast cancer was associated with shorter survival and was more aggressive when metastases to the liver and brain were present.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2013; 63, 1: 21–27

Słowa kluczowe: rak piersi, niestabilność mikrosatelitarna (MSI)

Key words: breast carcinoma, microsatellite instability (MSI)

¹Dział Chirurgii Onkologicznej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach

²Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wstęp

Proces tworzenia się komórek nowotworowych obejmuje różnorodne wieloetapowe zmiany w genomie dotyczące również sekwencji mikrosatelitarnych. Mikrosatelity to krótkie sekwencje DNA składające się z powtórzeń określonych 1–6 par zasad, których całkowita długość wynosi od 10 do 100 par. Powtórzenia te występują zarówno w kodujących, jak i niekodujących obszarach w genomie, a najczęstszą u ludzi jest sekwencja (CA)_n. W trakcie procesu replikacji DNA mikrosatelity mają znaczenie promotorowe, ułatwiają kontrolowaną rekombinację oraz wiązanie enzymów aparatu replikacyjnego [1]. Niestabilność mikrosatelitarna w rozumieniu pojedynczego *locus* polega na zmianie ilości powtórzeń repetatywnego rdzenia w markerze mikrosatelitarnym w DNA komórek nowotworowych w porównaniu z DNA w komórkach niezmiennych tego samego pacjenta [2, 3]. System naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR) jest ważnym poreplikacyjnym procesem naprawy DNA i jest zaangażowany w utrzymanie stabilności genomu. Utrata funkcji systemu MMR naprawiającego błędy powstałe podczas procesu replikacji DNA prowadzi do niestabilności genomu, która może być wykryta poprzez obecność polimorfizmu w mikrosatelitach. Ten fenomen nazwany niestabilnością mikrosatelitarną (MSI) jest charakterystycznym znacznikiem dysfunkcji systemu MMR w rakach jelita grubego i innych nowotworach złośliwych [4].

Po raz pierwszy niestabilność mikrosatelitarna została opisana w 1993 roku w niepolipowatym raku jelita grubego (HNPCC), nazywanym też zespołem Lyncha. W rakach jelita grubego u rodzin z HNPCC w większości przypadków (55–90%) występuje fenotyp nowotworu wykazującego niestabilność *loci* mikrosatelitarnych. Wadliwe działanie systemu MMR dotyczące głównie genów *MSH2*, *MLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* czy *GTBP* jest przyczyną powstania HNPCC [5].

Rola niestabilności mikrosatelitarnej w raku piersi pozostaje w literaturze niewyjaśniona [6]. Od dwóch dekad rola systemu MMR w rakach piersi jest coraz częściej badana, a wykrywalność niestabilności mikrosatelitarnej waha się w szerokich granicach [7]. Częstość jej występowania wynosi od 0% do 85% [8, 9].

W dwóch wcześniejszych pracach: Yee (20 raków piersi) oraz Conteggiacomo — (28 raków piersi) sugerowano udział MSI w procesie karcynogenezy, identyfikując wzrastającą ilość niestabilności mikrosatelitarnej, która wynosiła od 20% do 21% w rakach w porównaniu z tkankami zdrowymi pobranymi od tych samych pacjentek. Autorzy ci wiazali występowanie MSI z I/II stopniem zaawansowania klinicznego, 1 lub 2 stopniem złośliwości histologicznej (G1, G2), guzami z dodatnimi receptorami estrogenowymi, a także z rakami zrazikowymi, występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych i wielkością guza [10, 11]. Inne badanie, obejmujące 100 przypadków, wykazało zdecydowanie mniejszą ilość niestabilności mikrosatelitarnej (5% MSI) w sporadycznych

rakach piersi [12]. Od tamtej pory ukazały się kolejne badania potwierdzające związek MSI z rakiem piersi zarówno przedinwazyjnym, jak i inwazyjnym [13, 14]. Potwierdzono w nich większą częstość MSI w rakach inwazyjnych (47,4%) w porównaniu z rakami przedinwazyjnymi (20%) [14], częstsze występowanie MSI w rakach zrazikowych (39%) w porównaniu z rakami przewodowymi (13,5%) [15] oraz większą ilość MSI w rakach dużych rozmiarów, z przerzutami do węzłów chłonnych i gorszym rokowaniem klinicznym [16, 17].

Wielu innych autorów sugeruje, że MSI może nie odgrywać ważnej roli w procesie tworzenia się raka piersi. Khilko i wsp. w pracy z 2007 roku sugerują, że geny *MMR* mogą nie odgrywać kluczowej roli w większości przypadków raka piersi [6]. Ozer i inni badali 16 przypadków pierwotnego wczesnego raka piersi u kobiet pomiędzy 29 a 34 rokiem życia. Nie potwierdzili oni występowania MSI w badanej grupie i postawili tezę, według której niestabilność mikrosatelitarna nie jest powszechnym zjawiskiem we wczesnym raku piersi u kobiet i nie wydaje się, by występowanie fenotypu MSI było związane z prognozowaniem choroby [18]. Podobne wyniki uzyskali Adem i wsp. [19]. Orlandi i inni nie stwierdzili obecności MSI w żadnym analizowanym przypadku, potwierdzając tezę, że MSI występuje w raku piersi rzadko [20].

Obecne badanie miało na celu ocenę występowania MSI w grupie 81 inwazyjnych raków piersi oraz związek MSI z parametrami klinicznymi, jak wiek pacjentek, rodzaj guza, wielkość guza, obecność przerzutów do węzłów chłonnych, wystąpienie wznowy miejscowej oraz przerzutów odległych do poszczególnych narządów, całkowita długość przeżycia oraz współistnienie innych nowotworów.

Materiał i metody

Materiałem do badań molekularnych była tkanka nowotworów piersi oraz zdrowa tkanka otaczająca nowotwór. Do badań niestabilności mikrosatelitarnej zakwalifikowano 95 preparatów pobranych z bloczków parafinowych zawierających fragmenty guzów i zdrowej tkanki otaczającej guzy, pochodzące od pacjentek zoperowanych z powodu raka piersi w latach 1995–1999 w Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym w Kielcach, u których wykonano mastektomię radykalną w modyfikacji sposobem Pateya (obecnie wykonuje się mastektomię w modyfikacji Maddena). 14 preparatów okazało się niereprezentatywnych, dlatego badania prowadzono dla grupy 81 przypadków. Obserwacja pooperacyjna i leczenie uzupełniające były prowadzone w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w Kielcach.

Izolowanie DNA z tkanki nowotworowej i z prawidłowej tkanki piersi, utrwalonych w bloczkach parafinowych

1. Za pomocą skalpela rozdrabniano na szkiełku mikroskopowym zatopione w parafinie fragmenty tkanki nowotworowej i tkanki zdrowej, następnie skrawki parafi-

Tabela I. Charakterystyka zastosowanych starterów w reakcji PCR

Starter	Sekwencja nukleotydowa starterów (5'-3')	Lokalizacja startera na chromosomie	Długość produktu PCR w pz.
AFM 119	ACC ACT GCA CTT CAG GTG AC GTG ATA CTG TCC TCA GGT CTC C	10q	~ 180
AFM 164	GCT CCC GGC TGG TTT T GCA GGA AAT CGC AGG AAC TT	18q22.3	~180
AFM 248	CTC TTT CTC TGA CTC TGA CC GAC TTT CTA AGT TCT TGC CAG	18q21	~140
APC	ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T	5q21-22	~125
BAT 25	TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC	4q12	~125
BAT 26	TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C	2p	~125
BAT 40	ATT AAC TTC CTA CAC CAC AAC GTA GAG CAA GAC CAC CTT G	1p13.1	~140
D2S 123	AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC	2p16	~200-250
Mfd 15	GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC	17q11-12	~170
MYCLI	TGC CGA GAC TCC ATC AAA G CTT TTT AAG CTG CAA CAA TTT C	1p32	~200

nowe zalewano 1 ml ksylenu, wytrząsano przez 30 min i odwirowywano przez 3 min przy 13 000 obrotów/min w wirowce typu MPW-310, po czym usuwano górną warstwę; czynność wykonywano w celu pozbycia się parafiny i powtarzano 5 razy.

- Następnie do osadu dodawano 1 ml alkoholu absolutnego, wytrząsano 10 min, po czym odwirowywano w sposób opisany powyżej (tę czynność powtarzano 3 razy).
- Osad zebrany po usunięciu górnej warstwy osuszano i rozpuszczano w 300 µl buforu do lizy (10 mM Tris/HCL pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,5% SDS).
- Do całości dodawano po 4 µl proteiny K (20 mg/ml), następnie wytrząsano w łaźni wodnej przez noc (temp. 55°C).
- Do próbek dodawano po 150 µl H₂O i 500 µl mieszaniny fenolu, chloroformu, alkoholu izoamyloвого z 8-hydroksychinoliną w stosunku 25:24:1 i wytrząsano 10 min, a potem wirowano przez 3 min przy 13 000 obrotów/min.
- Zbierano górną warstwę wodną i dodawano do niej po 400 µl mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamyloвого w stosunku 24:1, wytrząsano i wirowano jak wyżej.
- Czynność tę powtarzano, używając 350 ml mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamyloвого (24:1).
- Zebraną z dna chloroformu wodną warstwę dodawano do mieszaniny 100 µl 10 M octanu amonu i 7 µl glikogenu (5 mg/1 ml), mieszano, dodawano 1 ml 96% etanolu i pozostawiono na noc w temperaturze 80°C w celu wytrącenia DNA.
- Wytrącony DNA odwirowywano przez 10 min przy 13 000 obr./min, odrzucono supernatant, osad przepłukiwano 2 × 75% alkoholem etylowym, odwirowywano jak wyżej, a osad DNA odsączano i suszono w próżni.
- Końcowy osad DNA rozpuszczono w 30 µl buforu LOTE (3 mM TRIS-HCL i 0,5 mM EDTA o pH 8,0).

Reakcja PCR w badaniu niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych (tab. I i II)

Mieszanina użyta w reakcji zawierała następujące składowe (w 20 µl):

Tabela II. Temperatury i czas trwania poszczególnych etapów PCR (35 cykli, 1 min)

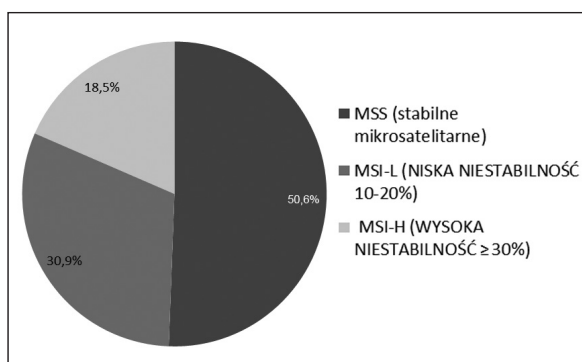
Starter	Denaturacja	Annealing	Elongacja
AFM 119	95°C	58-62°C	72°C
AFM 164	94°C	50-56°C	72°C
AFM 248	94°C	56-58°C	72°C
APC	94°C	56°C	72°C
BAT 25	94°C	56°C	72°C
BAT 26	94°C	56°C	72°C
BAT 40	94°C	56°C	72°C
D2S 123	94°C	56-60°C	72°C
Mfd 15	94°C	50-62°C	72°C
MYCLI	94°C	52-60°C	72°C
Czas	1 min	1 min	1 min

- 10-100 ng matrycy DNA,
- 0,7-2,0 µl każdego z pary starterów o stężeniu 50 µM,
- 0,5-3 µl mieszaniny czterech dNTP (każdy o stężeniu 1 mM),
- przy zastosowaniu znakowanego substratu [α^{35} S]-dATP,
- 1,2 µl MgCl₂ o stężeniu 25 mM,
- 2,0 µl 10 × buforu dla Taq polimerazy (10 mM Tris-HCL pH 9,0; 500 mM KCl oraz 0,1% Triton X-100),
- 0,5 U Taq DNA polimerazy (Taq DNA Polymerase-Promega Corporation, USA).

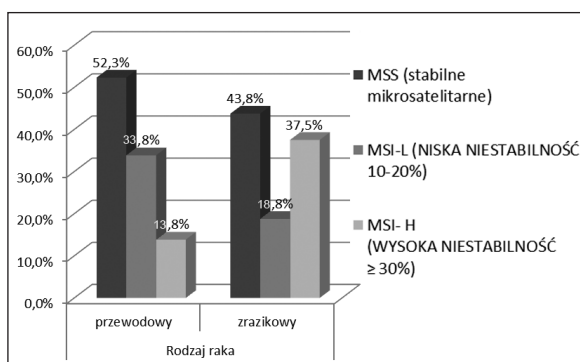
W wielu próbach zastosowano także wzmacniacz amplifikacji (z betainą) firmy EPICENTRE. Reakcje amplifikacji wykonywano w termocyklerach UNO-Thermoblock firmy Biometra.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Otrzymane produkty z reakcji PCR każdego *loci* poddawano elektroforezie w 8% żelu poliakrylamidowym (w stosunku monomeru do bisakrylamidu 20:1) w buforze o pH 7,8 o składzie: 40 mM Tris, 2 mM EDTA, 20 mM octan sodu (bufor octanowy).



Rycina 1. Podział badanej grupy na przypadki stabilne mikrosatelitarne — MSS oraz niestabilne mikrosatelitarne: MSI-L, MSI-H



Rycina 2. Występowanie niestabilności mikrosatelitarnej w zależności od rodzaju raka

Przygotowanie i rozdział radioaktywnych produktów PCR na poliakrylamidowym żelu sekwencyjnym

Znakowane izotopem produkty PCR wytrącano z roztworu w celu ich zagęszczenia. Całą objętość próbki (20 µl) mieszano z 480 µl LOTE, następnie dodawano 150 µl 2M nadtlenku sodu, 10 µl glikogenu i 340 µl izopropanolu. Próbkę wstawiono do lodówki na 30 min, a następnie wirowano przez 10 min przy 130 00 obr./min. Następnie przepłukiwano zawartość próbki 70% etanolem i znów odwirowywano. Osad suszono w próżni i rozpuszczano w 4 µl barwnika (95% formamid, 10 mM EDTA, 0,1% fuksyna, pH9). Próbkę podgrzewano przez 10 min do 95°C w celu denaturacji, a następnie przenoszono do lodu. Objętość 1 lub 2 µl mieszaniny barwnika i DNA nanoszono na ogrzany do 55°C 6% żel poliakrylamidowy sekwencyjny (stosunek monomeru do bisakrylamidu 19:1) z 8M mocznikiem. Rozdział prowadzono przy stałym napięciu 2000 mV w 0,6 × buforze TBE (45 mM Tris-HCl, pH = 7, 45 mM kwas borowy, 2 mM EDTA). Czas elektroforezy wynosił 2 godziny. Po rozdzieleniu żele przenoszono na bibułę Whatman 3MM i suszono przez 1,5 godziny w 80°C w suszarce do żeli (Biometra), a następnie ekspozowano w kasie rentgenowskiej wobec kliszy autoradiograficznej.

Ustalanie wartości MSI

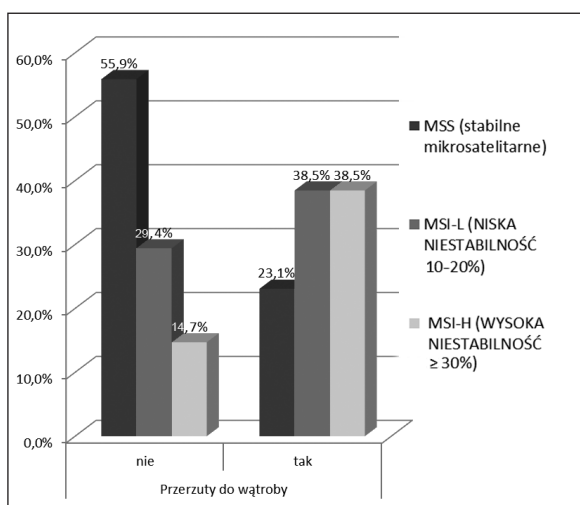
Brak zmian — próbki stabilne MSS

Próbki, w których na 10 badanych loci były 1 lub 2 przypadki niestabilności mikrosatelitarnej, kwalifikowano jako nisko niestabilne (MSI-L). Przy obecności 3 i więcej przypadków określano je jako wysoce niestabilne MSI-H.

Wyniki

Analizując otrzymane dane, wyodrębniono: 15 przypadków MSI-H, co stanowiło 18,5% badanych, 25 przypadków MSI-L, tj. 30,9% oraz 41 przypadków MSS, tj. 50,6% (ryc. 1).

Badano korelacje pomiędzy występowaniem niestabilności mikrosatelitarnej a poszczególnymi czynnikami klinicznymi. Rodzaj raka: przewodowy czy zrądkowy, nie wpływały istotnie na wystąpienie MSI, p wartość = 0,0816. Zaznaczona



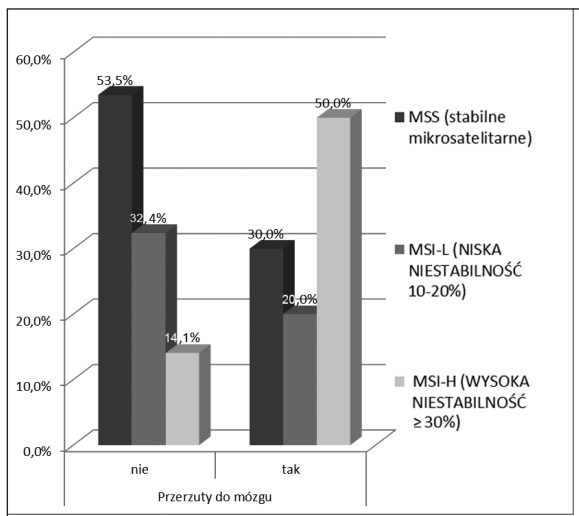
Rycina 3. Rozkład niestabilności mikrosatelitarnej u chorych na raka piersi z przerzutami do wątroby, p = 0,0514

była jednak tendencja do podwyższonego wystąpienia MSI-H w raku zrądkowym (ryc. 2).

Stwierdzono statystycznie istotną zależność (p) wystąpienia przerzutów do wątroby od występowania MSI, p = 0,0514. Z grupy 13 pacjentek, u których stwierdzono przerzuty do wątroby, aż u 10, tj. 76,9% stwierdzono niestabilność mikrosatelitarnej, w tym u 5 pacjentek niestabilność wysoką (MSI-H) i u 5 niestabilność niską (MSI-L) (ryc. 3).

Zaobserwowano ponadto znamieny statystycznie wpływ MSI na wystąpienie przerzutów do mózgu p = 0,0235. Wśród 81 badanych chorych stwierdzono przerzuty do mózgu w 10 przypadkach, tj. 12,3%. W grupie chorych z przerzutami do mózgu w 7 potwierdzono występowanie niestabilności, w tym 2 przypadki MSI-L oraz 5 przypadków MSI-H (ryc. 4).

W badanej grupie nie stwierdzono zależności MSI od wieku, długości przeżycia, wielkości guza i obecności przerzutów do węzłów chłonnych, przerzutów do płuc, skóry, kości, wystąpienia wznowy miejscowej, podwyższonych wartości markerów nowotworowych oraz występowania nowotworów współistniejących.



Rycina 4. Występowanie MSI u chorych na raka piersi z przerzutami do mózgu, $p = 0,0235$

W grupie 81 kobiet chorych na raka piersi 71,4% badanych przeżyło 5 lat po zabiegu operacyjnym, natomiast 10 letni czas obserwacji uzyskano w 52,4%. Po 3 latach od zabiegu w obserwacji znajdowało się tylko 75,2% chorych, co prawdopodobnie miało związek z agresywnym przebiegiem choroby nowotworowej. Analizując typ histologiczny guza, stwierdzono, że raki zrazikowe rokują gorzej niż raki przewodowe. Żadna z 16 chorych na zrazikowego raka piersi nie dożyła 10 lat po operacji, co okazało się istotne statystycznie $p = 0,0274$.

Dyskusja

Celem pracy była ocena niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) w rakach piersi jako czynnika prognostycznego w korelacji z danymi klinicznymi. Niestabilność mikrostaelitarna jest używana do wykrywania defektów systemu naprawy DNA, w skład którego wchodzi geny mutatorowe i kodowane przez nie białka. Nieprawidłowe działanie tego układu prowadzi do błędów podczas replikacji DNA i może powodować powstawanie komórek nowotworowych. Zjawisko to zostało wykryte w rodzinie występujących niepolipowatych rakach jelita grubego (HNPCC) — Zespole Lyncha, gdzie MSI diagnozowano nawet w 90%, ale także w sporadycznych rakach jelita, endometrium, żołądka czy guzach mózgu [1, 5, 21]. Występowanie niestabilności mikrosatelitarnej w rakach piersi waha się w szerokich granicach od 0–85%, a jej rola nie jest do końca jasna [8, 9]. W pracy tej do badań MSI zakwalifikowano 81 raków piersi. W badanej grupie znalazły się chore w przedziale 30–78 lat, a najczęściej rak piersi występował w grupie chorych pomiędzy 60 a 65 rokiem życia. Dominowały raki przewodowe — w 80,2% badanych, raki zrazikowe rozpoznano u 19,8% całej grupy. Stopień zaawansowania badanej grupy został określony na podstawie klasyfikacji TNM z 1997 roku. Najlicniejszą grupę stanowiły przypadki

w stopniu T2 — guzy pomiędzy 2–5 cm, N1 — przerzuty do pojedynczych węzłów chłonnych, M0 — brak przerzutów odległych. Wszystkie chore zostały zakwalifikowane do radykalnej mastektomii w modyfikacji Pateya z radykalnym wycięciem węzłów chłonnych dołu pachowego, bez przedoperacyjnej chemioterapii. W leczeniu pooperacyjnym 91,4% wszystkich chorych otrzymało leczenie uzupełniające w różnej modyfikacji: chemioterapia, radioterapia lub hormonoterapia. Przed zakończeniem obserwacji zmarło 39,5% chorych, a średni czas obserwacji wyniósł 71,3 miesiąca. W trakcie leczenia i obserwacji pooperacyjnej stwierdzono w 25,9% przerzuty do kości, 18,5% przerzutów do płuc, 16% przerzutów do wątroby, 12,3% przerzutów do mózgu. W 21% doszło do wznowy miejscowej, a w 12,3% wystąpiły inne nowotwory, spośród których najczęstszym okazał się rak drugiej piersi. W przeprowadzonych badaniach potwierdziliśmy występowanie MSI w 49,4% guzów, przy czym MSI-H stwierdzono u 18,5% chorych. Nasze wyniki potwierdziły związek MSI z przerzutami do wątroby i mózgu, co jest zgodne z przeprowadzonymi wcześniej badaniami Pizzi, w których odnotowano zależność MSI od zaawansowanego stanu klinicznego chorych [16]. Uzyskane wyniki pokazały większą ilość MSI-H w rakach zrazikowych (37,5%) w stosunku do raków przewodowych (13,8%) i były zgodne z obserwacjami Luqmani [22], Aldazy [23], Contegiacomo [24] oraz De Marchis [25]. Niektóre badania odnotowują korelację MSI z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych [11, 17, 25], niektóre z wielkością guza [17, 25]. W części badań MSI jest związana z wczesnym rakiem piersi [26], w innych — z postaciami zaawansowanymi [27]. W naszym badaniu nie potwierdziliśmy zależności MSI od wielkości guza i stanu węzłów chłonnych. W rakach jelita grubego, zwłaszcza w Zespole Lyncha, gdzie rola systemu MMR została najlepiej zdefiniowana, guzy z obecnością MSI różnią się od guzów bez MSI parametrami biologicznymi, cytogenetycznymi oraz klinicznymi i — co więcej — obecność MSI w tych guzach wiąże się z lepszym przebiegiem klinicznym i mniejszą agresywnością [28]. W przeciwieństwie do HNPCC dysfunkcja systemu MMR i obecność MSI w rakach piersi jest zdecydowanie mniejsza. Sugeruje to istnienie innego mechanizmu onkogenezy w pierwotnych rakach piersi. Badania porównujące kliniczne i patologiczne parametry raka piersi z nieprawidłowym działaniem systemu MMR sugerują związek pomiędzy MSI a gorszymi czynnikami klinicznymi i patologicznymi, takimi jak: większy rozmiar guza, przerzuty do węzłów chłonnych, zaawansowany stopień kliniczny, brak ekspresji receptorów steroidowych, krótszy czas bez wznowy choroby i krótsze przeżycie [11, 17, 25, 27]. W przeprowadzonych przez nas analizach obecność MSI wiązała się z krótszym przeżyciem i większą agresywnością związaną z przerzutami do wątroby i mózgu. W rakach jelita grubego obecność MSI wiąże się z lepszą odpowiedzią na podawaną chemioterapię, co zwiększa przeżycia chorych.

Wild i inni, badając 39 zaawansowanych raków piersi, stwierdzili, że obecność MSI jest wysoce znaczącym, niezależnym i niesprzyjającym czynnikiem ryzyka dla całkowitych przeżyć u chorych otrzymujących wysokie dawki chemioterapii pooperacyjnej [29]. Podobne wyniki uzyskał Chintamani, analizując korelacje MSI na kliniczną odpowiedź po zastosowaną chemioterapię przedoperacyjną. Pacjentki z wysoką ekspresją białek systemu MMR gorzej odpowiadały na zastosowaną chemioterapię przedoperacyjną, co objawiało się brakiem regresji guza i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych [7].

System naprawy błędnie sparowanych zasad MMR jest ważnym poreplikacyjnym procesem naprawy związanym z utrzymaniem stabilności genomu. Nieprawidłowe działanie tego systemu wykrywamy poprzez stwierdzenie obecności niestabilności mikrosatelitarnej. W rakach piersi dysfunkcja systemu MMR była dosyć rozlegle badana, a częstość występowania niestabilności mikrosatelitarnej wahała się w szerokich granicach. Część autorów uważa, że MSI odgrywa ważną rolę w procesie tworzenia się raka piersi, część zupełnie neguje jej udział. Yee i inni, używając siedmiu markerów mikrosatelitarnych w grupie 20 raków piersi, znaleźli MSI w 20% [10]. Patel i wsp. stwierdzili MSI w 11 na 13 badanych guzów, co stanowiło 85% całej grupy, używając 9 markerów mikrosatelitarnych [9]. Inne badania potwierdzają występowanie MSI w rakach piersi na poziomie 21–64% [16, 22, 23, 27]. Wielu innych autorów uważa, że MSI nie odgrywa ważnej roli w procesie karcynogenezy raka piersi. W pracy Khilko po przebadaniu 211 raków piersi nie stwierdzono w żadnym przypadku MSI [6]. Podobne wyniki uzyskał Anbazhagan, który przeanalizował 267 przypadków zawierających wszystkie główne histologiczne typy raka piersi. W żadnym z analizowanych przypadków nie stwierdzono fenotypu MSI, co skłoniło autorów do postawienia tezy, że niestabilność mikrosatelitarna nie jest powszechna w raku piersi [30]. Badania przeprowadzone przez kolejnych badaczy potwierdzają brak występowania MSI zarówno we wczesnych rakach piersi [18], jak i w postaciach zaawansowanych [9].

Największym problemem w porównaniu rezultatów w różnych badaniach jest fakt, że stosując metody bazujące na reakcji PCR, stosowano różne rodzaje markerów mikrosatelitarnych (mono, di, tri, tetranucleotydowe itd.), używano markery zlokalizowane na kodujących i niekodujących regionach genów, różną ilość markerów mikrosatelitarnych w każdym z badań i — co najważniejsze — stosowano różne kryteria oceny obecności MSI w przeprowadzonych testach, co uniemożliwia prawidłowe porównania.

Wnioski

1. Występowanie niestabilności mikrosatelitarnej w rakach piersi waha się w szerokich granicach. W przeprowadzonym przez nas badaniu potwierdziliśmy obecność MSI

w 49,4% przypadków, przy czym w 18,5% stwierdzono niestabilność mikrosatelitarną, w 3 lub więcej badanych *loci* kwalifikowaną jako wysoce niestabilną MSI-H.

2. Stwierdzono statystycznie istotną zależność występowania MSI i przerzutów do wątroby oraz przerzutów do mózgu, co wiązało się z gorszym przebiegiem klinicznych i krótszym przeżyciem.
3. Potwierdzono większą ilość MSI-H w rakach zrazikowych (bez istotności statystycznej) i krótsze przeżycia całkowite w tych przypadkach.

Lek. Artur Bocian

*Dział Chirurgii Onkologicznej
Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach
ul. Artwińskiego 3, 25–734 Kielce
e-mail: abocian@gmail.com*

Otrzymano: 6 kwietnia 2012 r.

Przyjęto do druku: 15 maja 2012 r.

Piśmiennictwo

1. Kordek R, Bartkowiak J. Niestabilność mikrosatelitarna w nowotworach człowieka, *Onkol Pol* 1999; 2: 109–112.
2. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR i wsp. Microsatellite instability in sporadic colorectal cancer is not an independent prognostic factor *Cancer Res* 1998; 58: 5248–5257.
3. Hussein MR, Wood GS. Microsatellite instability and its relevance to cutaneous tumorigenesis. *J Cutan Pathol* 2002; 29: 257–267.
4. Chintamani B, Jha BP, Bhandari V i wsp. The expression of mismatch repair genes and their correlation with clinicopathological parameters and response to neo-adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Int Sem in Surg Oncol* 2007; 4: 5.
5. Hoogerbrugge N, Willems R, van Krieken HJ i wsp. Very low incidence of microsatellite instability in rectal cancers from families at risk for HNPCC. *Clin Genet* 2003; 63: 64–70.
6. Khilko N, Bourne P, Yang Q i wsp. Mismatch Repair Genes hMLH1 and hMSH2 May Not Play an Essential Role in Breast Carcinogenesis, *Int J Surg Pathol* 2007; 15: 233–241.
7. Murata H, Khattar NH, Gu L i wsp. Roles of mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1 in the development of sporadic breast cancer. *Cancer Lett* 2005; 223: 14.
8. Chagpar A, Magliocco A, Kerviche A i wsp. The replication error phenotype is associated with the development of distant metastases in hormonally treated patients with breast carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 913–919.
9. Patel U, Grundfest-Briniatowski S, Gupta M i wsp. Microsatellite instability at five chromosomes in primary breast tumors. *Oncogene* 1994; 9: 3695–3700.
10. Yee GJ, Rood N, Verrier CS i wsp. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Research* 1994; 54: 1641–1644.
11. Contegiacomo A, Palmirotta R, De Marchis L i wsp. Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. *International Journal of Cancer* 1995; 64: 264–268.
12. Shaw JA, Walsh T, Chapel SA i wsp. Microsatellite instability in early sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1996; 73: 1393–1397.
13. Toyama T i wsp. Microsatellite instability in in situ and invasive sporadic breast cancer of Japanese women. *Cancer Lett* 1995; 108: 205–209.
14. Shen KL, Yang LS, Hsieh HF i wsp. Microsatellite alterations on human chromosome 11 in in situ and invasive breast cancer: a microdissection microsatellite analysis and correlation with p53, ER (estrogen receptor), and PR (progesterone receptor) protein immunoreactivity. *J Surg Oncol* 2000; 74: 100–107.
15. Aldaz CM, Chen T, Sahin A i wsp. Comparative allelotyping of in situ and invasive human breast cancer: high frequency of microsatellite instability in lobular breast carcinomas. *Cancer Research* 1995; 55: 3976–3981.
16. Pizzi C, Panico L, de Marchis L i wsp. p53 expression is decreased in primary breast carcinomas with microsatellite instability. *Breast Cancer Research and Treatment* 2002; 73: 257–266.
17. Paulson TG, Wright FA, Parker BA i wsp. Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Research* 1996; 56: 4021–4026.

18. Ozer E, Yuksel E, Kizildag S i wsp. Microsatellite instability in early-onset breast cancer. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 525–530.
19. Adem C, Soderberg CL, Cunningham JM i wsp. Microsatellite instability in hereditary and sporadic breast cancers. *Int J Cancer* 2003; 107: 580–582.
20. Orlandi F, Barucca A, Biagini G i wsp. Molecular stability of DNA typing short tandem repeats in the mammary tree of patients with breast cancer. *Diagnostic Molecular Pathology* 2002; 11: 41–46.
21. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36: 801–818.
22. Luqmani YA, Mathew M, Lobo S. Frequent microsatellite alterations in a predominantly younger age of onest breast cancer population. *Int J Mol Med* 2003; 11: 117–124.
23. Aldaz CM, Chen T, Sahin A i wsp. Comparative allelotype of in situ and invasive human breast cancer: high frequency of microsatellite instability in lobular breast carcinomas. *Cancer Research* 1995; 55: 3976–3981.
24. Contegiacomo A, Palmirotta R, de Marchis L i wsp. Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. *Int J Cancer* 1995; 64: 264–268.
25. De Marchis L, Contegiacomo A, D'Amico C i wsp. Microsatellite instability is correlated with lymph node-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research* 1997; 3: 241–248.
26. Toyama T, Iwase H, Yamashita H i wsp. Microsatellite instability in sporadic human breast cancers. *Int J Cancer* 1996; 68: 447–451.
27. Kuo-liang Shen, Lien-shun Yang i wsp. Microsatellite alterations on human chromosome 11 in situ and invasive breast cancer: a microdissection microsatellite analysis and correlation with p53, ER (estrogen receptor), and PR (progesterone receptor) protein immunoreactivity. *J Surg Oncol* 2000; 74: 100–107.
28. Szaśiadek M i wsp. Niestabilność genetyczna w nowotworach. Niestabilność chromosomowa w nowotworach. *Postępy Biologii Komórki* 2003; 30: 259–272.
29. Wild PJ, Reichle A, Andreesen R i wsp. Microsatellite instability predicts poor short-term survival in patients with advanced breast cancer after high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 556–564.
30. Anbazhagan R, Fujii H, Gabrielson E. Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 839–844.