

PIOTR M. WIERZBICKI¹, KRYSZTOF ADRYCH², DOROTA KARTANOWICZ¹,
JOANNA WYPYCH², MARCIN STANISŁAWOWSKI¹, SEBASTIAN DOBROWOLSKI³,
JANUSZ CHYBICKI⁴, MAŁGORZATA ZWOLIŃSKA-WCISŁO⁵, KRZYSZTOF CELIŃSKI⁶,
BARTŁOMIEJ KORYBALSKI⁷, MARIAN SMOCZYŃSKI², ZBIGNIEW ŚLEDZIŃSKI³,
ZBIGNIEW KMIEĆ¹

NIESTABILNOŚĆ MIKROSATELITARNA W PRZEWLEKŁYCH ZAPALNYCH CHOROBAH JELITA GRUBEGO I W RAKU JELITA GRUBEGO

MICROSATELLITE INSTABILITY STATUS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE AND COLORECTAL CANCER

¹ Zakład Histologii Katedry Histologii i Immunologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
kierownik: prof. dr Zbigniew Kmiec

² Klinika Gastroenterologii i Hepatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
kierownik: dr hab. Marian Smoczyński, prof. nadzw.

³ Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
kierownik: prof. dr Zbigniew Śledziński

⁴ Oddział Chirurgii Ogólnej Szpitala MSWiA w Gdańsku
kierownik: lek. Janusz Chybicki

⁵ Katedra Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych Collegium Medicum UJ
kierownik: prof. dr Tomasz Mach

⁶ Katedra i Klinika Gastroenterologii z Samodzielną Pracownią Endoskopii Uniwersytetu Medycznego
w Lublinie, kierownik: prof. dr Maria Słomka

⁷ Pracownia Endoskopii SPZOZ św. Wojciecha w Gdańsku
kierownik: dr Mirosława Chelstowska

Celem projektu było określenie częstości występowania zjawiska niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) w nieswoistych zapalnych chorobach jelit oraz w raku jelita grubego na poziomie genomowego DNA w oparciu o referencyjny panel markerów mikrosatelitarnych BAT25, BAT26 i BAT40. W grupie 57 raków jelita grubego stwierdzono występowanie niestabilności mikrosatelitarnej wysokiego stopnia (MSI-H) w 1 (1,7%) przypadku, niestabilność mikrosatelitarną niskiego stopnia (MSI-L) wykryto w przypadku 5 pacjentów (8,7%), a największy odsetek mutacji zaobserwowano w obrębie genu naprawy DNA MSH2- BAT26 (6/57; 10,5%). Wśród 30 pacjentów z colitis ulcerosa, 9 z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz 9 z wykrytą dysplazją niskiego stopnia w przebiegu *colitis ulcerosa* nie stwierdzono występowania MSI.

Zjawisko niestabilności mikrosatelitarnej (*microsatellite instability* – MSI) związane z karcynogenezą, spowodowane jest wadliwym funkcjonowaniem białek uczestniczących w naprawie DNA. Uszkodzenie systemu naprawy DNA skutkuje brakiem możliwości usuwania mutacji punktowych powstałych podczas przygotowań do podziału komórki oraz czynnikami onkogennymi podczas interfazy. W efekcie dochodzi do wzrostu ilości mutacji od 100 do 700 razy w porównaniu do komórek posiadających sprawny system reperacji DNA [19]. Mutacje te najczęściej pojawiają się w mononukleotydowych mikrosatelitarnych sekwencjach repetytywnych. Analiza wybranych markerów mikrosatelitarnych jest istotna z punktu widzenia molekularnej klasyfikacji raków jelita grubego, takich jak: lokalizacji guza, szybkości rozwoju raka, złośliwości komórek oraz zdolności do przerzutowania. Równie istotną kwestią jest molekularna ocena wybranych markerów mikrosatelitarnych w stanach zapalnych zwiększających ryzyko rozwoju procesu nowotworowego.

Przewlekłe nieswoiste zapalne choroby jelita grubego (NZChJ), na które składa się wrzodzące zapalenie jelita grubego (WZJG, czyli *colitis ulcerosa*) oraz choroba Leśniowskiego-Crohna (ChLC), są uznanymi zespołami zwiększonego ryzyka powstania i rozwoju raka jelita grubego [6]. Szczególnie WZJG o długim czasie trwania (ponad 10 lat) usposabia do wystąpienia zaawansowanych zmian dysplastycznych komórek nabłonka jelitowego, będących odpowiednikiem *carcinoma in situ* w innych narządach [2]. W przypadku wykrycia dysplazji niskiego i wysokiego stopnia w przebiegu WZJG zalecana jest hemikolektomia lub pełna kolektomia [8].

Celem projektu było określenie częstości występowania zjawiska niestabilności mikrosatelitarnej w nieswoistych zapalnych chorobach jelit oraz w raku jelita grubego na poziomie genomowego DNA w oparciu o referencyjny panel markerów mikrosatelitarnych BAT25, BAT26 i BAT40.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Materiał kliniczny uzyskano od 57 chorych na raka jelita grubego, 30 pacjentów z aktywnym rzutem WZJG, 9 z dysplazją w przebiegu WZJG oraz 9 z ChLC. Pacjenci z rakiem jelita grubego operowani byli w Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej GUMed oraz na Oddziale Chirurgii Ogólnej Szpitala MSWiA w Gdańsku, próby od pacjentów z WZJG, dysplazją w przebiegu WZJG i ChLC pochodziły z Kliniki Gastroenterologii i Hepatologii GUMed, Pracowni Endoskopii SPZOZ św. Wojciecha w Gdańsku, Samodzielnej Pracowni Endoskopii Kliniki Gastroenterologii UM w Lublinie oraz Katedry Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Próby pobierano po wcześniejszym uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej właściwej dla danego ośrodka. Przed pobraniem materiału (bioptatu i krwi) każdy pacjent został poinformowany o celach i sposobie przeprowadzenia badania endoskopowego oraz wyraził pisemną zgodę na udział w badaniach. Rozpoznanie WZJG i ChLC dokonywał lekarz gastroenterolog na podstawie całości obrazu klinicznego z uwzględnieniem wyników badań dodatkowych (m.in. morfologii krwi, wielkości odczynu sedymentacji krwinek czerwonych oraz stężenia żelaza, białka całkowitego, albumin i białka C-reaktywnego w surowicy krwi),

Tabela I. Dane kliniczne chorych z nieswoistymi zapalnymi chorobami jelit

Table I. Clinical data of inflammatory bowel disease patients

	Wrzodzące zapalenie jelita grubego Ulcerative colitis		Dysplazja na podłożu WZJG Ulcerative colitis – associated dysplasia	Choroba Leśniowskiego-Crohna Crohn's disease	
	Aktywność w skali CAI Clinical Activity Index		Dysplazja typu niskiego (IIA, IIB) Low-grade dysplasia	Aktywność w skali CDAI Crohn's Disease Activity Index	
	Średnio-zaawansowana 5<CAI<12 Moderate	Wysoka CAI>12 Severe		Średnio-zaawansowana 150–250 Moderate	Wysoka >250 Severe
Liczba pacjentów Number of patients	18	12	9	4	5
Płeć (K/M) Sex (F/M)	10/8	7/5	7/2	6/8	2/3
Średni wiek § Age	40,1±14,7	39,2±12,7	49±19	37±7,5	28±4,4
Czas trwania choroby § Disease duration	6,2±3,5	12,8±7,5	12,4±8,1	4,5±2,7	5,8±3,5

§ podano wartości średnie w latach ±SD / shown as mean [years] ±SD,
CAI – clinical activity index, CDAI – Crohn's disease activity index

a także w oparciu o kryteria endoskopowe, po konfrontacji z badaniem histopatologicznym biopsji jelita grubego. Przy postawieniu diagnozy brano też pod uwagę wyniki badań radiologicznych. Klasyfikację ciężkości rzutu WZJG prowadzono na podstawie klasyfikacji CAI (*Clinical Activity Index*), opisanej przez Rachmilewita [15], natomiast aktywność kliniczną ChLC oceniano według skali CDAI (*Crohn's Disease Activity Index*) [3]. Rozpoznanie dysplazji w przebiegu WZJG oparte było na podstawie wyników badania histopatologicznego wycinków pobieranych w trakcie badania. We wszystkich badanych 9 przypadkach wykryto niskozróżnicowane zmiany dysplastyczne (UC IIa, b) [8]. Pacjenci z dysplazją towarzyszącą WZJG poddani byli częściowej lub całkowitej kolektomii. Krótką charakterystykę kliniczną pacjentów z NZChJ przedstawia tabela I. Nie zanotowano statystycznie znamiennych różnic pomiędzy badanymi grupami. W przypadku chorych z wykrytym guzem w świetle jelita grubego, rozpoznanie raka jelita grubego dokonywał lekarz gastroenterolog na podstawie wyników oceny histopatologicznej biopsji fragmentu guza pobranego podczas kolonoskopii poprzedzającej zabieg operacyjny oraz na podstawie analizy histologicznej fragmentu jelita grubego poddanego resekcji. Ocena histopatologiczna obejmowała klasyfikację TNM, UICC/AJCC i stopień zróżnicowania histologicznego komórek G [9].

Material kliniczny

Material od pacjentów z WZJG, chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz dysplazją w przebiegu colitis ulcerosa pobierany był przez lekarza gastroenterologa w trakcie kolonoskopii. Przy pomocy kolonoskopu pobierano wycinki błony śluzowej jelita grubego o rozmiarach 3x3x3 mm i masie około 20 mg. Do badania histopatologicznego pobierano wycinki z makroskopowo zmienionej zapalnie błony śluzowej. Uzyskiwano cztery wycinki błony śluzowej z tej samej okolicy, z których dwa przekazywano do oceny histopatologicznej, a pozostałe dwa natychmiast zamrażano w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania dalszych oznaczeń. W przypadku guzów jelita grubego, material biopsyjny pobierany był przez lekarza chirurga z fragmentu guza podlegającego resekcji. Do badań molekularnych pobierano dwa wycinki o wymiarach 5x5x5 mm. Fragment jelita podlegający resekcji przekazywany był do oceny histopatologicznej, ze szczególnym uwzględnieniem oceny miejsca pobrania biopsji do analiz molekularnych. W niniejszym projekcie nie analizowano guzów odbytu. Charakterystykę kliniczną i histopatologiczną chorych na raka jelita grubego przedstawia tabela II.

Od każdego pacjenta uczestniczącego w projekcie pobierano ponadto 1 ml krwi żyłnej do probówki zawierającej EDTA w celu izolacji genomowego DNA.

Izolacja DNA

Izolację DNA z biopsji kolonoskopowych i śródoperacyjnych przeprowadzono przy użyciu zestawu Sherlock AX opierającego się na wykorzystaniu membran jonowo-wymiennych wiążących efektywnie DNA (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Procedurę izolacji prowadzono zgodnie z protokołem producenta, do końcowej objętości 100 μl TRIS-EDTA pH 8,3. DNA genomowe z 1 ml krwi prowadzono przy użyciu zestawu BloodMini (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), opartego na złożach krzemionkowych. Procedurę prowadzono zgodnie ze wskazaniami producenta do końcowej objętości 70 μl TRIS-EDTA pH 8,3.

Izolowane DNA z biopsji oraz krwi podlegało ocenie ilościowej i jakościowej z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific Inc., Wilmington, DE, USA), następnie było przechowywane w -20°C do czasu dalszych analiz.

Analiza niestabilności mikrosatelitarnej

Zjawisko niestabilności mikrosatelitarnej obejmowało analizę polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych w obrębie sekwencji kodujących geny uczestniczące w procesie karcynogenezy: BAT26 dla genu naprawy DNA MSH2, BAT25 dla onkogenu c-kit, BAT40 dla genu supresorowego dehydrogenazy 3- β -hydroksysteroidowej HSD3B2. Analiza tych markerów jest zgodna z zaleceniami badawczymi National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition dotyczącej statusu stabilności mikrosatelitarnej w tkance nowotworowej [5].

Sekwencje starterów uzyskano z bazy UniSTS. Stosowano mieszaniny reakcyjne z wykorzystaniem odczynników Fermentas (Wilno, Litwa) o następujących składach: 30 ng genomu-

wego DNA, 0,5 U polimerazy Taq, 200 μ M mieszanina dNTP's, 2 mM $MgCl_2$, 10x stężony bufor do PCR zawierający $(NH_4)_2SO_4$, dopełniano destylowaną wodą do końcowej objętości 15 μ l. Profil temperaturowo-czasowy wyznaczono przy użyciu oprogramowania Vector NTI (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) i obejmował on następujące etapy: 95°C (300 s), 35 cykli; 95°C (15 s), 49°C – dla BAT25, BAT26, 54°C – dla BAT40 (20 s), 72°C (30 s). Rozdział produktów PCR prowadzono przy zastosowaniu elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących. 1,5 μ l mieszaniny PCR inkubowano z 1,5 μ l 99% formamidem w 95°C przez 4 min. Po tym czasie próbki szybko chłodzono i przenoszono do aparatu SequiGen II Sequencing Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Do sąsiednich studzienek nanoszono produkty PCR na matrycy DNA pochodzącego od tego samego pacjenta z tkanki oraz, osobno, z krwi w celu bezpośredniego porównania wielkości produktów PCR. Charakterystyka rozdziału: 6% żel poliakrylamidowy zawierający 7 M mocznik (POCh, Gliwice, Polska), grubość żelu 400 μ m, temperatura żelu – 50–52°C, czas rozdziału 2,5 h przy napięciu 2000 V. Po zakończeniu rozdziału, płytę z żelem wybarwiano 0,15% $AgNO_3$ (POCh, Gliwice, Polska). Następnie obraz archiwizowano z wykorzystaniem skanera HP PSC 500 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). Analizę uzyskanych obrazów prowadzono przy użyciu oprogramowania Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Niestabilność mikrosatelitarną (MSI) oceniano na podstawie obecności dodatkowego amplikonu w żelu o innej wielkości w próbce z tkanki w porównaniu do próby pochodzącej z krwi, oznaczającego delecję/insercję pojedynczego nukleotydu w badanej sekwencji DNA. Niestabilność mikrosatelitarna niskiego stopnia (MSI-L) określana jest w przypadku mutacji w 1-2 badanych markerach, natomiast mutacja wykryta we wszystkich 3 badanych markerach BAT oznacza niestabilność mikrosatelitarną wysokiego stopnia (MSI-H) [5].

Analiza statystyczna

Zastosowano oprogramowanie Statistica, wersja 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Do oceny zależności między MSI a cechami kliniczno-patologicznymi wykorzystano test χ^2 z poprawką Yatesa. Badane grupy nie spełniały założeń normalności rozkładu (test W Shapiro-Wilka), dlatego też do porównań wartości parametrycznych pomiędzy 2 grupami stosowano test U Manna-Whitney'a. We wszystkich obliczeniach wartości $p < 0,05$ przyjmowano jako znamienne statystycznie.

WYNIKI

W grupie 57 raków jelita grubego stwierdzono występowanie niestabilności mikrosatelitarnej wysokiego stopnia (MSI-H) tylko w 1 przypadku, co stanowi 1,7% puli badanych przypadków. Wykryte zjawisko MSI-H zanotowano w przypadku raka kątnicy o najwyższym stopniu zaawansowania (T4N2M1, wg klasyfikacji Aster-Coler) oraz największej złośliwości komórek raka wg skali stopnia zróżnicowania G. Niestabilność mikrosatelitarną niskiego stopnia (MSI-L) wykryto w przypadku 5 pacjentów (8,7%), przy czym największy odsetek mutacji zaobserwowano w obrębie genu naprawy DNA MSH2- BAT26 (6/57; 10,5%). U pozostałych 89,5% pacjentów stwierdzono występowanie raka jelita grubego o genotypie stabilności mikrosatelitarnej (*microsatellite stability* – MSS) według przyjętych kryteriów. Nie

Tabela II. Dane kliniczne pacjentów z rakiem jelita grubego wraz z analizą mikrosatelitarną
 Table II. Clinical data and results of microsatellite instability analysis of colorectal cancer cases

Cecha kliniczna / Clinical data			Raki jelita grubego Colorectal cancer N=57	Marker MSI MSI marker		
				BAT 26	BAT 25	BAT 40
Wiek (średnia±SD) [lata] Age (mean±SD) [y]			67±10,1			
Płeć i wiek Sex and age	M M	n=40	66,1±10,9	3	2	0
	K F	n=17	68,4±8,1	3	0	1
Lokalizacja [n] Tumor location	prawostronna right-side		37	4	1	1
	lewostronna left-side		20	2	1	0
Zaawansowanie histopatologiczne wg UICC/AJCC [n] UICC/AJCC tumor grading	I – II		27	3	1	0
	III – IV		30	3	1	1
Stopień zróżnicowania komórek G [n] Differentiated (G stage)	G0		7	1	1	0
	G1		21	3	0	0
	G2		29	2	1	1
MSI – podsumowanie (N=57) n (%) Summary of MSI results				6 (10,5)	2 (3,5)	1 (1,7)

stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem MSI a cechami kliniczno-patologicznymi, takimi jak: wiek, płeć, lokalizacja guza, stopień zaawansowania UICC/AJCC czy zróżnicowanie histologiczne komórek G. Sumaryczne przedstawienie wyników analizy MSI w raku jelita grubego przedstawia tabela II.

W przypadku analizowanych przypadków 30 chorych na WZJG, 9 na ChLC oraz 9 pacjentów z dysplazją na podłożu colitis ulcerosa nie stwierdzono występowania zjawiska niestabilności mikrosatelitarnej w obrębie badanych markerów.

DYSKUSJA

Zjawisko niestabilności mikrosatelitarnej związane jest z karcynogenezą, a spowodowane jest wadliwym funkcjonowaniem białek uczestniczących w naprawie DNA.

W grupie 57 raków jelita grubego stwierdzono występowanie niestabilności mikrosatelitarnej wysokiego stopnia (MSI-H) zaledwie w 1,7% puli badanych raków. Dane literaturowe mówią o 5–15% udziale MSI-H i 4–12% MSI-L w analizowanych populacjach raka jelita grubego w Chinach [10] oraz w USA [11]. Najwyższy odsetek niestabilnych mikrosatelitarnie raków jelita grubego w stopniu wysokim, sięgający 43% w puli 49 przypadków wykryto u

Afroamerykanów [1]. W populacji polskiej, MSI-H stwierdzono w 20%, a MSI-L u 20,1% pacjentów w puli 143 operowanych w latach 2001–2003 w regionie Dolnego Śląska [17]. W niniejszym projekcie, wyniki analiz statystycznych porównujących profil MSS/MSI z cechami klinicznymi i histopatologicznymi nie wykazały zależności pomiędzy lokalizacją guza, stopniem zaawansowania wg skali TNM, stopniem zróżnicowania komórek G a występowaniem MSS/MSI. Rezultaty te są różne od danych z piśmiennictwa, w którym podano, że raki o genotypie MSS charakteryzuje szybszy rozwój, większa przerzutowość i złośliwość, natomiast nowotwory jelita grubego o genotypie MSI zlokalizowane są najczęściej w prawej okrężnicy i cechuje je słabe zróżnicowanie komórek [4]. Rozbieżność uzyskanych rezultatów z wynikami innych autorów sugeruje rolę selekcji środowiskowej specyficznej dla danego regionu geograficznego, co może mieć związek z częstszym występowaniem chorób nowotworowych w województwie pomorskim i z tego względu może nie odzwierciedlać sytuacji w innych rejonach Polski. Ponadto, badana populacja obejmowała liczbę 57 przypadków, co nie musi być odzwierciedleniem ogólnej puli chorych na raka jelita grubego. Kolejną przyczyną rozbieżności może mieć związek z oparciem badania niestabilności mikrosatelitarnej na analizie 3 markerów bez uwzględniania sekwencjonowania genów naprawy DNA (MSH2, MLH1) lub też histochemicznej oceny występowania białek systemu naprawy DNA w tkance guza [4].

W analizowanej grupie pacjentów z wykrytą dysplazją na podłożu WZJG nie stwierdzono występowania niestabilności mikrosatelitarnej. Wyniki badań grup amerykańskich mówią o 15% odsetku MSI-H w puli 124 pacjentów [16] i 9% udziale w populacji 148 chorych z wykrytymi zmianami dysplastycznymi [7]. Z kolei rezultaty badań grupy szwedzkiej wykazały bardzo mały udział MSI w dysplazji na podłożu WZJG, wykryty u 1 pacjenta w puli 28 przypadków [12]. Dla populacji holenderskiej MSI wykryto u 3 z 21 pacjentów (14%). Wyniki analizy badań holenderskich sugerują istotną rolę niestabilności chromosomalnej, związanej z delecjami i utratą heterozygotyczności w powstawaniu i progresji procesu dysplastycznego [20]. Powodem dużej rozbieżności wyników publikacyjnych wydaje się być zbyt mała pula badanych prób. Rezultaty uzyskane w niniejszej pracy sugerują, iż zjawisko niestabilności mikrosatelitarnej nie ma udziału w procesie powstawania dysplazji niskiego stopnia w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.

Wśród 30 analizowanych prób pochodzących od pacjentów z WZJG oraz 9 z chorobą Leśniowskiego-Crohna nie wykryto występowania niestabilności mikrosatelitarnej w obrębie badanych markerów. Jest to zgodne z wynikami autorów z Portugalii, którzy nie stwierdzili występowania MSI w przypadku 51 prób od pacjentów z WZJG w obrębie 10 badanych markerów [13]. Także w populacji japońskiej nie stwierdzono występowania zjawiska MSI w 121 próbach chorych na WZJG [18]. W przypadku analizy niestabilności mikrosatelitarnej w chorobie Leśniowskiego-Crohna rezultaty grupy amerykańskiej wykazały występowanie MSI u 1 chorego w puli 33 przypadków [14].

WNIOSKI

Ocena niestabilności mikrosatelitarnej w oparciu o panel referencyjnych markerów mikrosatelitarnych sugeruje bardzo mały udział tego zjawiska w rozwoju raka jelita grubego oraz znikomy w przypadku uznanych stanów podwyższonego ryzyka powstania tego typu nowotworu w analizowanych grupach chorych.

PIŚMIENNICTWO

1. Ashktorab H., Smoot D.T., Farzanmehr H., Fidelia-Lambert M. [i in.]: Clinicopathological features and microsatellite instability (MSI) in colorectal cancers from African Americans. *Int. J. Cancer* 2005, 116, 6, 914-919. – 2. Bartnik W: Choroby jelita grubego. W: Interna. Pod red.: W. Januszewicza, F. Kokota. T1. Warszawa, PZWL, 2003; 495-530. – 3. Best W.R., Becketl J.M., Singleton J.W., Kern F.: Development of a Crohn's disease activity index. *Gastroenterology* 1976, 70, 3, 439-444. – 4. Blanes A., Diaz-Cano S.J.: Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12, 37, 5932-5940. – 5. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R., Sidransky D., Eshleman J.R., Burt R.W., Meltzer S.J., Rodriguez-Bigas M.A., Fodde R., Ranzani G.N., 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, 22, 5248-5257. – 6. Eaden J.A., Abrams K.R., Mayberry J.F.: The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001, 48, 4, 526-535. – 7. Fleisher A.S., Esteller M., Harpaz N., Leytin A. [i in.]: Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res.* 2000, 60, 17, 4864-4868. – 8. Glickman R.: Nieswoiste zapalne choroby jelit. W: Interna Harrisona. T. 3. Wyd. 14. Lublin, Czelej, 1998, 2825-2843. – 9. TNM classification of malignant tumours (UICC). Pod red. Sobin L. H., Wittekind C. Wyd 6. New York, Wiley-Liss, 2002. – 10. Jin H.Y., Lai R.S., Ding Y.J., Xie L.: Detection of microsatellite instability in colorectal cancer by fluorescence multiplex polymerase chain reaction and its clinical value. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi.* 2007, 10, 3, 217-220.
11. Kitisin K., Mishra L.: Molecular biology of colorectal cancer: new targets. *Semin. Oncol.* 2006, 33, 6, Suppl 11, 14-23. – 12. Løvig T., Andersen S.N., Clausen O.P., Rognum T.O.: Microsatellite instability in long-standing ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 2007, 42, 5, 586-591. – 13. Maia L., Dinis J., Cravo M., Claro I., Baltazar C.: Who takes the lead in the development of ulcerative colitis-associated colorectal cancers: mutator, suppressor, or methylator pathway? *Cancer Genet. Cytogenet.* 2005, 162, 1, 68-73. – 14. Noffsinger A., Kretschmer S., Belli J., Fogt F. [i in.]: Microsatellite instability is uncommon in intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 2000, 45, 2, 378-384. – 15. Rachmilewitz D.: Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ* 1989, 298, 82-86. – 16. Schulmann K., Mori Y., Croog V., Yin J. [i in.]: Molecular phenotype of inflammatory bowel disease-associated neoplasms with microsatellite instability. *Gastroenterology.* 2005, 129, 1, 74-85. – 17. Śmigiel R., Stembalska A., Stal A., Jonkisz A. [i in.]: The Microsatellite Instability in Patients with Colon Cancer Treated in Lower Silesia. *Adv. Clin. Exp. Med.*: 2006, 15, 1, 29-36. – 18. Takahashi S., Kojima Y., Kinouchi Y., Negoro K. [i in.]: Microsatellite instability and loss of heterozygosity in the nondysplastic colonic epithelium of ulcerative colitis. *J. Gastroenterol.* 2003, 38, 8, 734-739. – 19. Turyn J.: Mikrosatelitarny DNA. *Post. Bioch.* 2004, 50, 3, 198-208. – 20. van Dieren J.M., Wink J.C., Vissers K.J., van Marion R.: Chromosomal and microsatellite instability of adenocarcinomas and dysplastic lesions (DALM) in ulcerative colitis. *Diagn. Mol. Pathol.* 2006, 15, 4, 216-222.

P. M. Wierzbicki, K. Adrych, D. Kartanowicz, J. Wypych, M. Stanisławowski, S. Dobrowolski, J. Chybicki, M. Zwolińska-Wcisło, K. Celiński, B. Korybalski, M. Smoczyński, Z. Śledziński, Z. Kmieć

MICROSATELLITE INSTABILITY STATUS IN INFLAMMATORY
BOWEL DISEASE AND COLORECTAL CANCER

Summary

Microsatellite instability (MSI) is caused by damaged cellular DNA repairing system. MSI analysis in colorectal cancer (CRC) and in long-standing inflammatory bowel disease (IBD) is useful to differentiate various molecular pathways between MSI and MSS (microsatellite stable) cancers. AIM: To check the occurrence of MSI in DNA of CRC and IBD patients on the basis of microsatellite marker reference panel. MATERIALS and METHODS: DNA was isolated from inflamed/cancer biopsies as well as venous blood of 57 CRC patients, 30 active ulcerative colitis (UC), 9 Crohn's disease (CD) and 9 UC-associated dysplastic lesions. PCR reactions were performed using primers of BAT26, BAT25 and BAT40 markers, followed by denaturing polyacrylamide electrophoresis. RESULTS: MSI-H (mutation in all markers) was found in 1/57 (1.7%), whereas MSI-L was found in 5/57 (8.7%) of CRC patients. The highest occurrence of mutations was revealed in BAT26 marker – 6/57 (10.5%). We found no statistically significant relationships between MSI status and clinical and histopathological data in CRC. None MSI was found in UC, CD and UC-associated dysplastic lesions. CONCLUSION: MSI assessment based on 3 microsatellite reference markers suggest small participation of this process in the development of CRC and its minimal role in IBD in the studied groups.

Adres: Piotr Mieczysław Wierzbicki, dr n. med. inż.
Zakład Histologii GUMed
Collegium Biomedicum, Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail: pwierzb@gumed.edu.pl