



## Analiza gubitka heterozigotnosti tumor-supresor gena p53 i BRCA1 kod karcinoma ovarijuma

### Analysis of loss of heterozygosity of the tumor suppressor genes p53 and BRCA1 in ovarian carcinomas

Bojana Petrović\*, Milica Perović\*, Ivana Novaković†, Jasmina Atanacković\*,  
Branka Popović‡, Ljiljana Luković†, Spasoje Petković\*

Klinički centar Srbije, \*Institut za ginekologiju i akušerstvo, Beograd;  
Medicinski fakultet, †Institut za biologiju i humanu genetiku, Beograd;  
Stomatološki fakultet, ‡Institut za biologiju i humanu genetiku, Beograd

#### Apstrakt

**Uvod/Cilj.** Među genima uključenim u proces ovarijumske karcinogeneze pažnju privlače tumor-supresor geni p53 i BRCA1. Oba gena kontrolišu ćelijski ciklus, reparaciju DNK i apoptozu. Dok je p53 univerzalni „čuvar genoma“ čija se inaktivacija nalazi u više od 50% maligniteta čoveka, mutacije BRCA1 se nalaze pre svega kod karcinoma dojke i ovarijuma. Istraživanje je sprovedeno sa ciljem da se utvrdi učestalost gubitka heterozigotnosti (LOH) u regionima gena p53 i BRCA1 kod karcinoma ovarijuma i da se ispita njegova korelacija sa stadijumom i prognozom bolesti. **Metode.** Ispitivanjem je obuhvaćeno 20 bolesnica sa potvrđenom dijagnozom karcinoma ovarijuma. Za molekularno genetičku analizu DNK izolovana je iz tumorskog tkiva i krvi kao kontrolnog zdravog tkiva iste osobe. Mikrosatelitni markeri u regionu gena p53 i BRCA1 umnožavani su PCR metodom, a analiza alelskog statusa i pojave LOH je vršena nakon poliakril-amidinom (PAA) gel elektroforeze. **Rezultati.** Oba analizirana mikrosatelitna markera bila su informativna u po 13 do 20 slučajeva (65%). U regionu gena p53 nađen je LOH u 4 od 13 slučajeva (30,7%). Po jedan od ovih tumora bio je histološkog gradusa G1 i G2, a dva histološkog gradusa G3, dok je FIGO stadijum u svim slučajevima bio IIIc. U regionu gena BRCA1 LOH je nađen u 5 od 13 slučajeva (38,5%). Od ovih uzoraka četiri su bila histološkog gradusa G2, a jedan histološkog gradusa G3. Po FIGO klasifikaciji jedan uzorak sa LOH bio je u stadijumu Ic, jedan u stadijumu IIb, dok su tri bila u stadijumu IIIc. Istovremeni gubitak heterozigotnosti za oba ispitivana gena detektovan je u jednom uzorku histološkog gradusa G3, u stadijumu IIIc, što čini 7,7%. **Zaključak.** Učestalost LOH kod karcinoma ovarijuma iznosila je 30,7% u regionu gena p53, odnosno 38,5% u regionu gena BRCA1. Najveći broj tumora sa LOH bio je histološkog gradusa G2 ili G3, u kliničkom stadijumu IIIc, pa se može zaključiti da je ova pojava povezana sa kasnijom fazom razvoja bolesti.

**Ključne reči:** jajnik, neoplazme; gubitak heterozigotnosti; gen p53; gen BRCA1.

#### Abstract

**Background/Aim.** Among the genes involved in ovarian carcinogenesis, there has been increased interest in tumor-suppressor genes p53 and BRCA1. Both of the genes make control of cell cycle, DNA repair and apoptosis. The p53 is a “genome guardian” inactivated in more than 50% of human cancers, while BRCA1 mutations are found mostly in breast and ovarian cancer. The aim of this investigation was to establish the frequency of loss of heterozygosity (LOH) in the regions of the genes p53 and BRCA1 in ovarian carcinomas, and to analyze the association of LOH with the disease stage and prognosis. **Methods.** We analyzed 20 patients with a confirmed diagnosis of epithelial ovarian carcinoma. DNA for molecular-genetic analysis was extracted from the tumor tissue and blood as normal tissue of each person. Microsatellite markers of the regions of genes p53 and BRCA1 were amplified by PCR method. The determination of allelic status of microsatellites and detection of LOH was performed after PAA gel electroforesis. **Results.** Both of the analyzed microsatellite markers were informative in 13/20 (65%) cases. In the region of gene p53, LOH was established in 4/13 (30.7%) tumors. One of them had histological gradus G1, one had gradus G2, and two of them had gradus G3, while all were with the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) IIIc stage. In the region of gene BRCA1, LOH was detected in 5/13 (38.5%) tumors. Four of them had histological gradus G2, and one had gradus G3, while by the (FIGO) classification one was with stage Ib, one was with stage IIb, while the three were with stage IIIc. LOH in both of the analyzed regions was detected in one tumor (7.7%), with histological gradus G3 and the FIGO IIIc stage. **Conclusion.** The frequency of LOH in epithelial ovarian carcinomas was 30.7% and 38.5% for p53 and BRCA1 gene regions, respectively. Most of tumors with LOH had histological gradus G2 or G3, and the clinical FIGO stage IIIc, suggesting the association of this occurrence with a later phase of the disease.

**Key words:** ovarian neoplasms; loss of heterozygosity; genes, p53; genes, BRCA1.

## Uvod

Karcinom ovarijuma je peti među vodećim uzrocima smrti žena u svetu. Incidencija karcinoma ovarijuma je 1 : 2 500 žena iznad 55 godina i 1 : 3 800 žena starijih od 25 godina, a ukupna stopa preživljavanja preko pet godina je 40%<sup>1</sup>. Bolest je najčešće asimptomatska u svojim ranim fazama i u najvećem broju slučajeva otkriva se u kasnim, metastatskim stadijumima. U oko 1% slučajeva oboljenje je familijarne prirode, a najznačajniji faktor rizika je upravo porodična istorija bolesti<sup>2</sup>. Utvrđeno da se najčešći tipovi, serozni i mucinozni karcinomi, razvijaju od adenoma preko granične (*borderline*) forme, dok endometrioidnim karcinomima i karcinomima svetlih ćelija prethodi endometrioza<sup>3</sup>. Uprkos brojnim istraživanjima molekularni mehanizmi ovarijumske kancerogeneze još uvek su nejasni.

Danas je prihvaćen stav da je kancer u osnovi genska bolest koja se razvija u više faza. Za malignu transformaciju je najčešće potrebno 5–7 nezavisnih mutacija, a u ovaj proces su neposredno uključene dve glavne klase gena: protonogeni i tumor-supresor geni (TSG)<sup>4,5</sup>.

Osnovna funkcija TSG je regulisanje ćelijskog ciklusa, kontrola procesa proliferacije i diferencijacije i očuvanje ukupne stabilnosti genoma. Nedostatak ekspresije TSG dovodi do gubitka kontrole ćelijskog ciklusa i povezuje se sa malignom alteracijom ćelije. Mutacije TSG su recesivne, pa je za njihovo ispoljavanje neophodna inaktivacija oba genska alela. Najčešće je jedan alel deletiran, a drugi je zahvaćen tačkastom (*point*) mutacijom, a moguće su i genske konverzije, mitotičke rekombinacije, kao i epigenetski mehanizmi koji dovode do inaktivacije TSG usled metilacije<sup>4,5</sup>. Takođe, produkti TSG mogu biti neutralisani interakcijama sa virusnim ili ćelijskim onkoproteinima<sup>1</sup>.

Među većim brojem TSG koji su uključeni u proces ovarijumske kancerogeneze pažnju privlače TSG p53 i BRCA1. Oba gena se nalaze na hromozomu 17, a njihovi produkti su jedarni proteini – transkripcioni faktori koji kontrolišu ćelijski ciklus, reparaciju DNK i apoptozu<sup>6,7</sup>. Univerzalni „čuvar genoma“ je p53 (lokus 17p13.3), čija inaktivacija učestvuje u patogenezi više od 50% maligniteta čoveka. BRCA1 (lokus 17q21) je značajan, pre svega, za nastanak karcinoma dojke, odakle i potiče njegov naziv (*breast cancer*), i ovarijuma. Mutacije BRCA1 gena otkrivene su kod preko polovine familijarnih i manje od 5% sporadičnih karcinoma dojke, a predstavljaju i značajan rizik za razvoj karcinoma ovarijuma kod žena heterozigota, kod kojih može doći do gubitka drugog, normalnog alela<sup>7</sup>.

Jedan od prihvaćenih pristupa u analizi TSG jeste ispitivanje gubitka heterozigotnosti (*loss of heterozygosity* – LOH), koji predstavlja gubitak jednog od dva genska alela u analiziranom tkivu<sup>8</sup>. Za analizu LOH koriste se polimorfni regioni DNK, označeni kao mikrosateliti. Mikrosateliti su tandemski ponovci niza od dva do četiri nukleotida (najčešće dinukleotida CA) koji se nalaze na različitim lokacijama duž svih hromozoma. Usled visokog stepena polimorfizma mikrosatelitnih lokusa jedna osoba može da ima različit broj ponovaka na homologom hromozomskom paru, što se označava kao heterozigotnost<sup>9</sup>. Da bi se utvrdio LOH, neophodno je poređenje

DNK iz tumorskog tkiva i konstitutivne DNK iz zdravog tkiva iste osobe. Ako u zdravom tkivu postoje dva alela određenog mikrosatelitnog lokusa, a u tumorskom samo jedan, kažemo da je u tumoru došlo do gubitka heterozigotnosti, tj. LOH. LOH ukazuje na deleciju segmenta u molekulu DNK i na gubitak TSG koji se nalazi u tom regionu. Analizom mikrosatelita u tumorskom tkivu može da se uoči i pojava mikrosatelitne nestabilnosti (MIS), što podrazumeva da je veličina jednog mikrosatelitnog alela u tumoru drugačija nego u zdravom tkivu. Posledica nefunkcionalnosti sistema za *mismatch* reparaciju DNK je MIS, i ukazuje na inaktivaciju gena odgovornih za ovaj proces (hMLH1, hMSH2, hMSH6 i dr.)<sup>9</sup>.

Imajući u vidu klinički značaj karcinoma ovarijuma i brojna pitanja u vezi njegove molekularne osnove, istraživanje je sprovedeno sa ciljem da se utvrdi učestalost LOH u regionima gena p53 i BRCA1 kod karcinoma ovarijuma i da se ispita njegova korelacija sa stadijumom i prognozom bolesti.

## Metode

Uzorci tumorskog tkiva dobijeni su od 20 bolesnica operisanih u Institutu za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije u Beogradu, sa kliničkom dijagnozom karcinoma ovarijuma. Stadijum bolesti određivan je prema FIGO klasifikaciji (stadijum I: karcinom ograničen na ovarijum, Ia: jedan ovarijum, Ib: oba ovarijuma, Ic: ruptura kapsule; II: zahvaćeni organi male karlice, IIa: uterus i/ili jajovodi, IIb: ostali organi male karlice, IIc: ascites; III: intraperitoneumske metastaze, IIIa: mikroskopske metastaze, IIIb: makroskopske metastaze < 2 cm, IIIc: makroskopske metastaze > 2 cm i/ili regionalni limfni čvorovi; IV: metastaze van trbušne duplje)<sup>10</sup>. Patohistološkom analizom je potvrđena dijagnoza i određen histološki gradus tumora (G1-G4, u zavisnosti od stepena gubitka ćelijske diferencijacije)<sup>10</sup>.

Uzorci tumora za molekularno genetičku analizu uzimani su neposredno nakon operacije i čuvani na -20 °C u NE puferu (25 mM EDTA, 150 mM NaCl). Od svake bolesnice je uzeta i krv iz periferne vene kao kontrolno zdravo tkivo.

Za izolaciju DNK korišćena je standardna proteinaza K-SDS-fenol/hloroform procedura, za uzorke tumora, odnosno metoda izolovanja<sup>11</sup>, za uzorke krvi. Amplifikacija mikrosatelitnih markera vršena je metodom lančane reakcije polimerizacije (*polymerise chain reaction* – PCR), u aparatu Perkin Elmer Thermal Cycler 2 400.

Mikrosatelitni markeri koji su analizirani u PCR reakcijama su bili: TP53 u regionu 17p13.1 (p53 gen) i D17S855 u regionu 17q21 (BRCA1 gen). Sekvenca prajmera za mikrosatelitni lokus TP53 je bila: 5'-AGGGATACTATTCAGCCCGAGGTG-3' i 5'-ACTGCCACTCCTTGCCCCATTC-3'<sup>12</sup>, a za lokus D17S855: 5'-GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG-3' i 5'-ACACAGACTTGCTCTACTGCC-3'<sup>13</sup>.

Amplifikacija je vršena po sledećem programu: 94 °C/5 min (denaturacija); 45 ciklusa sa tri koraka: 94 °C/45 (denaturacija), 62 °C (za BRCA1) odnosno 68 °C (za p53)/45 (vezivanje prajmera) i 72 °C/45 sec (elongacija); 72 °C/7 min (završna elongacija)<sup>12,13</sup>. Veličina alela je bila 103–135 bp za marker TP53<sup>12</sup> i 143–155 bp za marker D17S855<sup>13</sup>.

Po završenoj PCR reakciji amplifikati su nanošeni u parovima na 10% poliakril-amidni (PAA) gel dimenzija 20 × 30 cm. Par su činili PCR produkt iz tumora i normalnog tkiva iste osobe. Trajanje elektroforeze na PAA gelu u 1 × TBE puferu pri P = 35W zavisilo je od veličine mikrosatelitnog markera, a za orijentaciju tokom elektroforeze korišćene su boje ksilen-cijanol (migrira sa fragmentom od 110 bp) i bromfenol plavo (migrira sa fragmentom od 40 bp)<sup>14</sup>.

Posle elektroforeze gelovi su bojeni etidijum-bromidom i posmatrani prosvetljeni UV svetlom na transiluminatoru. Poređenjem veličine markera u tumoru i kontroli bilo je moguće utvrditi: prisustvo dve različite trake (dva različita alela) mikrosatelita u tumoru i kontroli bilo je označeno kao heterozigotnost (Het.) i ovi slučajevi su bili informativni za analizu LOH; prisustvo jedne trake (dva identična alela) u tumoru i kontroli, što je bilo označeno kao homozigotnost (Homo.), koja je neinformativna za analizu LOH; prisustvo jedne trake (alela) u tumoru i dve različite trake (dva alela) u kontroli, što je bilo označeno kao gubitak heterozigotnosti u tumorskom tkivu, tj. LOH. Gubitak heterozigotnosti – LOH konstatovan je ukoliko u uzorku tumora potpuno nedostaje

alel prisutan u normalnom tkivu ili je on bio predstavljen trakom čija je gustina < 1/3 normalnog alela<sup>4,5,9</sup>.

Na istim gelovima analizirana je i pojava mikrosatelitne nestabilnosti (MIS), koja je bila konstatovana kao pojava novog alela u tumoru u odnosu na kontrolno tkivo<sup>9</sup>.

Kompletno ispitivanje je obavljeno uz saglasnost Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije.

### Rezultati

Godine starosti, patohistološki nalaz, gradus tumora i FIGO stadijum, kao i rezultati analize LOH, prikazani su u tabeli 1. Prosečna starost bolesnica bila je 58 godina.

Od 20 uzoraka karcinoma tri su bila histološkog gradusa I, 12 histološkog gradusa II i pet histološkog gradusa III. U odnosu na FIGO klasifikaciju svi karcinomi bili su od I do III stepena invazivnosti. dva karcinoma bila su u FIGO stadijumu Ia, tri u FIGO stadijumu Ic, četiri u FIGO stadijumu IIIb, a 11 u FIGO stadijumu IIIc.

U tabeli 2 prikazan je procenat informativnih slučajeva (heterozigoti u normalnom tkivu), utvrđenih LOH i MIS za

**Tabela 1**

**Starost bolesnica, histološki gradus, stadijum karcinoma i rezultati analize LOH za gene p53 i BRCA**

Redni broj	Godine starosti	Gradus	Stadijum	p53	BRCA1
1.	55	G3	IIIb	HOMO*	HET <sup>†</sup>
2.	58	G2	IIIc	HET	HET
3.	68	G2	IIIc	HOMO	HOMO
4.	65	G2	IIIc	HET	LOH <sup>‡</sup>
5.	40	G3	Ic	HOMO	HET
6.	51	G3	IIIc	LOH	HOMO
7.	64	G1	Ia	HET	HOMO
8.	67	G3	IIIc	HET	HET
9.	55	G2	Ic	HOMO	LOH
10.	56	G2	IIIb	HET	HET
11.	55	G2	IIIc	LOH	HOMO
12.	26	G1	Ia	HET	MIS <sup>§</sup>
13.	71	G2	Ic	HET	HOMO
14.	72	G3	IIIc	LOH	LOH
15.	72	G2	IIIc	HOMO	HET
16.	65	G1	IIIc	LOH	HOMO
17.	59	G2	IIIb	HET	HET
18.	55	G2	IIIc	HOMO	LOH
19.	59	G2	IIIb	HOMO	LOH
20.	44	G2	IIIc	HET	HOMO

\*homozigot, neinformativan; <sup>†</sup>heterozigot, informativan; <sup>‡</sup>gubitak heterozigotnosti; <sup>§</sup>mikrosatelitna nestabilnost

**Tabela 2**

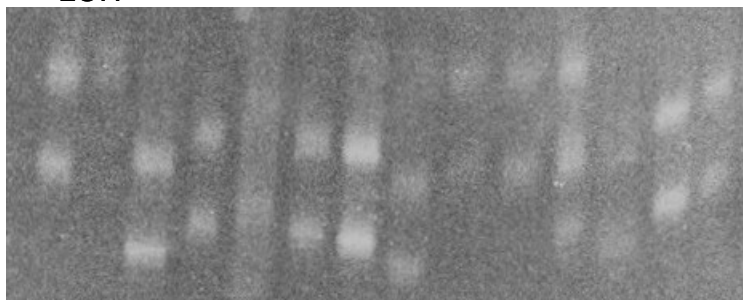
**Učestalost (%) informativnih slučajeva gubitka heterozigotnosti i mikrosatelitne nestabilnosti u uzorcima karcinoma ovarijuma**

Lokus	Informativno	LOH*	MIS <sup>†</sup>
p53	13/20 (65%)	4/13 (30,7%)	0/20 (0%)
BRCA1	13/20 (65%)	5/13 (38,5%)	1/20 (5%)

\*gubitak heterozigotnosti; <sup>†</sup>mikrosatelitna nestabilnost

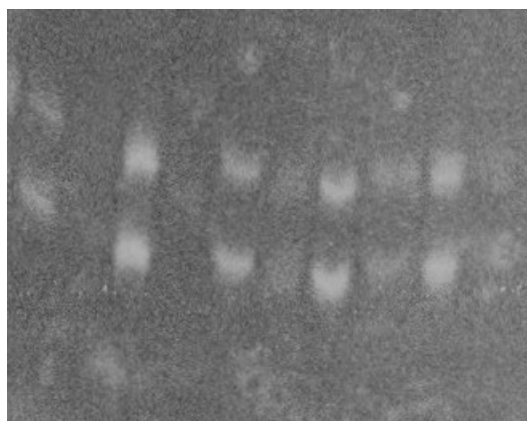
svaki mikrosatelitni marker. Na slici 1 i slici 2 prikazani su reprezentativni rezultati molekularno genetičke analize.

K T K T K T K T K T K T K T  
LOH



Sl. 1 – PCR produkti na poliakril-amidinom gelu za lokus p53  
K (zdravo tkivo), T (tumor)

K T K T K T K T K T  
LOH



Sl. 2 – PCR produkti na poliakril-amidinom gelu za lokus  
BRCA1  
K (zdravo tkivo), T (tumor)

Od ukupno 20 uzoraka karcinoma ovarijuma, 13 (65%) je bilo informativno u analizi LOH u regionu gena p53. LOH je nađen u četiri od 13 (30,7%), informativnih slučajeva. Od četiri uzorka sa LOH, po jedan je bio histološkog gradusa G1 i G2, a dva su bila histološkog gradusa G3. U svim slučajevima sa LOH FIGO stadijum je bio IIIc.

U regionu gena BRCA1 bilo je takođe 65% (13 od ukupno 20) informativnih slučajeva. LOH u regionu gena BRCA1 nađen je u 5 od 13 informativnih slučajeva, što čini 38,5%. Četiri uzorka sa LOH bila su histološkog grdusa G2, a jedan histološkog gradusa G3. Po FIGO klasifikaciji jedan uzorak sa LOH bio je u stadijumu Ic, jedan u stadijumu IIb, dok su tri bila u stadijumu IIIc. Istovremeni gubitak heterozigotnosti za oba ispitivana gena detektovan je u jednom uzorku (7,7%), histološkog gradusa G3, u stadijumu IIIc.

U jednom uzorku (7,7%) histološkog gradusa G1, u FIGO stadijumu Ia, nađena je mikrosatelitna nestabilnost (MIS).

## Diskusija

Gubitak heterozigotnosti ili LOH indirektni je pokazatelj gubitka jednog alela TSG u tumorskom tkivu<sup>9</sup>. U sklopu proučavanja složenog procesa ovarijumske kancerogeneze LOH je detektovan na različitim hromozomima, pa i u više regiona na dugom i na kratkom kraku hromozoma 17<sup>4, 5, 15-17</sup>. Važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa u ovarijumskom epitelu imaju TSG p53 (17p13.1) i BRCA1 (17q21) i predmet su brojnih molekularno-genetičkih analiza kod maligniteta ove lokalizacije.

U našem istraživanju LOH u regionima gena p53 i BRCA1 uzorci karcinoma ovarijuma bili su informativni u po 13 do 20 slučajeva (65%) za oba analizirana lokusa. Frekvencija LOH bila je 4 do 13 (30,7%) na lokusu p53 i 5 do 13 (38,5%) na lokusu BRCA1. LOH je na oba lokusa istovremeno detektovan u jednom slučaju (7,7%).

Podaci iz literature o LOH na oba kraka hromozoma 17 u karcinomima ovarijuma pokazuju značajne varijacije. Leary i sar.<sup>18</sup> su pronašli LOH sa učestalošću od 82% u regionu 17p i 62% u regionu 17q. Za razliku od ovih autora, Otis i sar.<sup>19</sup> su u seriji od 34 karcinoma ovarijuma našli LOH na lokusu p53 gena u 44% i na lokusu BRCA1 u 83% slučajeva. U studiji Quezado i sar.<sup>20</sup>, rađenoj na 12 karcinoma ovarijuma, procenat LOH u regionima p53 i BRCA1 bio je 62,5%, odnosno 66,6%. Različiti rezultati našeg istraživanja i nalazi drugih autora najverovatnije su posledica različitog broja analiziranih uzoraka, različitog broja i informativnosti korišćenih mikrosatelitnih markera, kao i patohistološke nehomogenosti ispitivanih karcinoma ovarijuma.

Klasični prognostički pokazatelji za karcinom ovarijuma su stadijum tumora u vreme postavljanja dijagnoze, histološki tip, stepen maligniteta i reziduum tumora nakon hirurškog tretmana<sup>2</sup>. Sa stanovišta prognoze bolesti mogla bi da bude značajna i potencijalna korelacija između pojave LOH i kliničko-patoloških karakteristika karcinoma ovarijuma<sup>4,5</sup>.

U našem istraživanju 50% karcinoma kod kojih je otkriven LOH na lokusu gena p53 je bilo histološkog gradusa G3. LOH u regionu BRCA1 je u našem radu bio udružen sa nižim histološkim gradusima, pa je 80% svih karcinoma sa LOH na ovom lokusu bilo histološkog gradusa G2. Uzorak karcinoma kod koga je detektovan LOH za oba ispitivana lokusa istovremeno bio je histološkog gradusa G3. Ova činjenica navodi na zaključak da je kod karcinoma ovarijuma istovremeni LOH u regionima p53 i BRCA1 u korelaciji sa izraženijim malignim fenotipom. Podaci iz literature potvrđuju naše nalaze. Utvrđeno je da 50% uznapredovalih ovarijumskih karcinoma ima mutiran p53 gen, što koreliše sa višim gradusom i kraćim preživljavanjem<sup>21</sup>. Wang i sar.<sup>22</sup> su analizirali ulogu BRCA1 u malignoj transformaciji. U toj studiji LOH u regionu BRCA1 nije nađen kod benignih tumora ovarijuma, kod graničnih (*borderline*) tipova tumora učestalost LOH je bila 15%, dok je kod karcinoma iznosila 66%.

Što se tiče kliničkog stadijuma, u našem istraživanju najveći broj karcinoma ovarijuma kod kojih je detektovan LOH bio je u FIGO stadijumu IIIc. Naime, svi karcinomi sa LOH za lokus p53 bili su u FIGO IIIc stadijumu, a od karcinoma sa LOH na lokusu BRCA1 jedan je bio u stadijumu Ic, jedan u stadijumu IIb, a tri u stadijumu IIIc. Uzorak tumora kod koga je istovremeno nađen LOH za oba ispitivana loka bio je takođe u FIGO IIIc stadijumu. Može se zaključiti da je u našoj grupi bolesnica LOH u regionima p53 i BRCA1 bio udružen sa kasnijom fazom razvoja karcinoma i uznapredovalim stadijumom bolesti.

Nekoliko grupa autora takođe je proučavalo povezanost LOH na hromozomu 17 sa kliničkim stadijumom karcinoma ovarijuma. Leary i sar.<sup>18</sup> došli su do zaključka da ne postoji značajna udruženost između LOH na hromozomu 17 i stadijuma ovarijumskih tumora, histološkog tipa, gradusa ili ishoda bolesti. Nasuprot njima, Pieretti i sar.<sup>23</sup> i Chenevix-Trench i sar.<sup>24</sup> u novijim istraživanjima zaključili su da LOH na hromozomu 17 koreliše sa višim stadijumom, lošijom prognozom bolesti i kraćim preživljavanjem. Podaci Kato i sar.<sup>25</sup> ukazuju da je LOH u regionu BRCA1 udružen sa ranijim početkom bolesti (50,7 god. u grupi sa LOH prema 58,7 god. u grupi bez LOH), ali nije nađena povezanost sa patohistološkim tipom, kliničkim stadijumom i preživljavanjem. Zanimljivo je da je u istom istraživanju FISH metodom u nekim slučajevima karcinoma ovarijuma utvrđena amplifikacija BRCA1 gena.

U našem istraživanju u jednom tumoru (5%) nađena je MIS u regionu gena BRCA1. Ovaj fenomen se može objasniti nefunkcionalnošću *mismatch* reparacionog sistema, koji ne ispravlja greške tokom replikacije, što povećava mogućnost akumulacije brojnih genskih lezija.<sup>9</sup> Pojava MIS kod

karcinoma ovarijuma je ređa od LOH i u podacima iz literature. U studiji Furlan i sar.<sup>26</sup> MIS je nađen sa učestalošću od 16%, a utvrđeno je da se inaktivacija reparacionih gena dešava u ranim stadijumima kancerogeneze, naročito u slučajevima udruženih maligniteta ovarijuma i endometrijuma.

Iz svega navedenog jasno je da su neophodna dalja istraživanja uloge TSG p53 i BRCA1 i fenomena genomske nestabilnosti (LOH i MIS) u ovarijumskoj kancerogenezi. Najnovija istraživanja ukazuju da se u regionu 17p13.3 verovatno nalazi još jedan TSG, označen kao HICI. Ovaj gen je česta meta inaktivacije kod karcinoma ovarijuma, a njegov gubitak se najčešće poklapa sa gubitkom p53 lokusa.<sup>15</sup> Nova saznanja treba da omoguće ne samo razumevanje mehanizama nastanka već i razvoj metoda za skrining, dijagnostiku, a možda i gensku terapiju ove važne grupe karcinoma kod žena. Interesantan pristup proučavanju LOH u regionima p53 i BRCA1 kod karcinoma ovarijuma dali su Tu i sar.<sup>27</sup> Oni su analizirali DNK, ne iz primarnog tumora, već iz seruma bolesnica (metastaske ćelije) i našli LOH na bar jednom lokusu u 81,8% slučajeva. Ovo istraživanje ukazuje na moguću upotrebu LOH na lokusima p53 i BRCA1 kao još jednog tumorskog markera kod karcinoma ovarijuma.

### Zaključak

Učestalost LOH kod karcinoma ovarijuma iznosila je 30,7% u regionu gena p53, odnosno 38,5% u regionu gena BRCA1. Najveći broj tumora sa LOH bio je histološkog gradusa G2 ili G3, u kliničkom stadijumu IIIc, pa se može zaključiti da je ova pojava povezana sa kasnijom fazom razvoja bolesti.

### L I T E R A T U R A

1. Simpson JL, Elies S. Genetics in Obstetrics and Gynecology. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2003.
2. Holschneider CH, Berck JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19(1): 3–10.
3. Christie M, Oehler MK. Molecular pathology of epithelial ovarian cancer. *J Br Menopause Soc* 2006; 12(2): 57–63.
4. Launonen V, Mannermaa A, Stenback F, Kosma VM, Puistola U, Huusko P, et al. Loss of heterozygosity at chromosomes 3, 6, 8, 11, 16, and 17 in ovarian cancer: correlation to clinicopathological variables. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 122(1): 49–54.
5. Buller RE, Shabin MS, Holmes RW, Hatterman M, Kirby PA, Shord AK. p53 mutations and microsatellite instability in ovarian cancer: yin and yang. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184(5): 891–902.
6. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253(5015): 49–53.
7. Quaresima B, Faniello MC, Baudi F, Crughiano T, Cuda G, Costanzo F, et al. In vitro analysis of genomic instability triggered by BRCA1 missense mutations. *Hum Mutat* 2006; 27(7): 715.
8. Pecorino L. Molecular biology of cancer. Oxford: Oxford University Press; 2005. Available from : <http://www.oup.com/uk/booksites/content/0199264724/student/glossary.htm>
9. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genes and cancer. In: Thomson MW, editor. *Thompson & Thompson's Genetics in medicine*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001. p. 311–32.
10. Popović DN. Ovarian carcinomas. In: Drobniak P, Berić B, Đurlović V, editors. *Gynecology*. Beograd: Medicinska knjiga; 1985. p. 112. (Serbian)
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
12. Jones MH, Nakamura Y. Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5(1): 89–90.
13. Anderson LA, Friedman L, Osborne-Lawrence S, Lynch E, Weissenbach J, Bowcock A, et al. High-density genetic map of the BRCA1 region of chromosome 17q12-q21. *Genomics* 1993; 17(3): 618–23.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
15. Chopin V, Leprince D. Chromosome arm 17p13.3: could HIC1 be the one? *Med Sci (Paris)* 2006; 22(1): 54–61. (French)
16. Feltmate CM, Lee KR, Johnson M, Schorge JO, Wong KK, Hao K, et al. Whole-genome allelotyping identified distinct loss-of-heterozygosity patterns in mucinous ovarian and appendiceal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11(21): 7651–7.
17. Arnold JM, Huggard PR, Cummings M, Ramm GA, Chenevix-Trench G. Reduced expression of chemokine (C-C motif) li-

- gand-2 (CCL2) in ovarian adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92(11): 2024–31.
18. *Leary JA, Doris CP, Boltz EM, Houghton CR, Kefford RF, Friedlander ML.* Investigation of loss of heterozygosity at specific loci on chromosomes 3p, 6q, 11p, 17p and 17q in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1993; 3(5): 293–298.
  19. *Otis CN, Krebs PA, Quezada MM, Albuquerque A, Bryant B, San Juan X, et al.* Loss of heterozygosity in P53, BRCA1, and estrogen receptor genes and correlation to expression of p53 protein in ovarian epithelial tumors of different cell types and biological behavior. *Hum Pathol* 2000; 31(2): 233–8.
  20. *Quezada MM, Moskaluk CA, Bryant B, Mills SE, Merino MJ.* Incidence of loss of heterozygosity at p53 and BRCA1 loci in serous surface carcinoma. *Hum Pathol* 1999; 30(2): 203–7.
  21. *Lee-Jones L.* Ovary: Epithelial tumors. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.* Available from: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Tumors/OvaryepithTumID5230.html>
  22. *Wang C, Horiuchi A, Imai T, Ohira S, Itob K, Nikaido T, et al.* Expression of BRCA1 protein in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. *J Pathol* 2004; 202(2): 215–23.
  23. *Pieretti M, Hopenhayn-Rich C, Khattar NH, Cao Y, Huang B, Tucker TC.* Heterogeneity of ovarian cancer: relationships among histological group, stage of disease, tumor markers, patient characteristics, and survival. *Cancer Invest* 2002; 20(1): 11–23.
  24. *Chenevix-Trench G, Kerr J, Hurst T, Shib YC, Purdie D, Bergman L, et al.* Analysis of loss of heterozygosity and KRAS2 mutations in ovarian neoplasms: clinicopathological correlations. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18(2): 75–83.
  25. *Kato H, Arakawa A, Suzumori K, Kataoka N, Young SR.* FISH analysis of BRCA1 copy number in paraffin-embedded ovarian cancer tissue samples. *Exp Mol Pathol* 2004; 76(2): 138–42.
  26. *Furlan D, Carnevali I, Marcomini B, Cerutti R, Dainese E, Capella C, et al.* The high frequency of de novo promoter methylation in synchronous primary endometrial and ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006; 12(11 Pt 1): 3329–36.
  27. *Tu H, Gao HF, Fu SL, Chen H.* Quantitative analysis of circulating DNA in serum of cancer patients. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004; 26(10): 606–8. (Chinese)

Rad je primljen 21. III 2006.