

(84)

# Niestabilność genetyczna w guzach barwnikowych błony naczyniowej oka

## Genetic instability in human malignant uveal melanomas

Ewa Proniewska-Skrętek<sup>1</sup>, Witold Pepiński<sup>2</sup>,  
Małgorzata Skawrońska<sup>2</sup>, Zofia Mariak<sup>1</sup>,  
Renata Zalewska<sup>1</sup>, Jerzy Janica<sup>1</sup>, Andrzej Stankiewicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Z Kliniki Okulistyki Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: dr hab. n. med. Zofia Mariak

<sup>2</sup>Z Zakładu Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jerzy Janica

**Summary:** Purpose: The aim of the study was evaluation of genetic changes: loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI) in the genome of cells of the uveal melanoma.

Material and methods: The incidence of MSI and LOH in cells of uveal melanomas was examined in tissue specimens obtained at surgical resection of the tumour in 14 patients. The results were related to respective MSI and LOH incidence in the genome of peripheral blood cells of the same patients. DNA was isolated with organic extraction. The fluorescent multiplex polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify microsatellite loci included in commercially available human identification kits. Phenotyping was performed with the use of ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Results: MSI and LOH was found in 6 of 14 cases of uveal melanoma, manifested at one or more loci. MSI was present in chromosomes 3, 11 and 16. LOH was detected in chromosomes: 2, 3, 8, 13, 16 and 19. Genetic instability of the LOH / MSI type was detected in 3 patients with long anamnesis and large tumor infiltrating retrobulbar structures (pT4 feature). Two patients died within a year because of generalized cancer disease.

Conclusions: 1 Loss of heterozygosity and microsatellite instability is present in uveal melanomas. 2. Genetic instability of LOH / MSI type associates with advanced size of tumour and progression of neoplastic disease.

**Słowa kluczowe:** czerniak złośliwy naczyniówki, zaburzenia genetyczne, utrata heterozygotyczności, niestabilność mikrosatelitarna.

**Key words:** choroidal melanoma, genetic instability, loss of heterozygosity (LOH), microsatellite instability (MSI).

Ogromny postęp w badaniach genetycznych przyczynił się do innego spojrzenia na istotę procesu nowotworowego. Obecnie uważa się, że jest to choroba genów, a nowotwór złośliwy stanowi następstwo kumulacji błędów genetycznych w pojedynczej, pierwotnie prawidłowej komórce. Mutacje w protoonkogenach i genach supresorowych doprowadzają do powstania klonów komórek, obdarzonych selektywną zdolnością proliferacji. Analiza ich materiału genetycznego stwarza szansę zidentyfikowania mutacji, charakteryzujących błędne transformacje komórkowe.

Ważną rolę w diagnostyce molekularnej odgrywa pośrednia analiza genetyczna, czyli badanie naturalnego polimorfizmu genetycznego DNA i markerów. Szczególnie przydatna jest metoda badania polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych. W genomie człowieka znajduje się około 100 tysięcy tzw. loci z tym typem sekwencji. Sekwencje te, złożone z 1 do 6 nukleotydów, pojawiają się w pojedynczym locus od 5 do 100 razy, a rozłożone są co 6-10 kbp (10<sup>3</sup> par zasad). Do analizy dziedziczenia uszkodzonego genu wykorzystywany jest zazwyczaj polimorfizm markera genetycznego, pozwalający rozszyfrować sekwencje mikrosatelitarne, najczę-

ściej sekwencje nukleotydów (CA)<sub>n</sub> / (GT)<sub>n</sub>. Analiza markera genetycznego sprowadza się do oceny zmiany w strukturze, sekwencji lub ekspresji materiału genetycznego, położonego blisko znanych lub prawdopodobnych loci genów supresorowych.

W komórkach ulegających transformacji nowotworowej obserwuje się na ogół zmiany genomu komórkowego w postaci: 1) utraty heterozygotyczności – LOH (loss of heterozygosity), która jest wynikiem delekcji fragmentu DNA, i 2) niestabilności mikrosatelitarnej – MSI (microsatellite instability), czyli zmiany jakościowej, polegającej na przesunięciu lub przeobrażeniu intensywności fragmentu w sekwencji mikrosatelitarnej w pobliżu genu naprawczego DNA, prowadzącej do tzw. błędu replikacji. Ponieważ LOH i MSI pojawiają się szczególnie często w różnego typu nowotworach złośliwych, przypuszcza się, że markery mikrosatelitarne mogą znacznie ułatwić wykrywanie i rozpoznawanie predyspozycji do rozwoju takich nowotworów (18).

Wobec powyższego **celem pracy** jest zidentyfikowanie zmian o typie LOH i MSI w genomie komórek nowotworowych guzów barwnikowych błony naczyniowej oka oraz określenie częstości ich występowania.

Lp. No	Płeć Sex	Wiek Age	Lokalizacja guza Localization	Wielkość guza średnica/ wysokość (mm) Size of tumor diameter/ height (mm)	Klasyfikacja patologiczna Pathological classification		
					T	N	M
1	M	52	góra - skroń	26,9 x 5,4	4	1	0
2	M	64	dół - skroń	29,1 x 5,8	4	1	0
3	K	65	góra - skroń	24,6 x 4,9	4	0	0
4	K	67	dół - skroń	23,0 x 3,9	3	0	0
5	K	68	dół - nos	12,5 x 7,8	3	0	0
6	K	38	góra - nos	23,4 x 3,5	3	0	0
7	M	59	góra - skroń	18,5 x 4,7	3	0	0
8	K	57	góra - skroń	12,4 x 5,0	2	0	0
9	M	74	dół - nos	17,9 x 7,9	3	0	0
10	K	66	dół - nos	14,2 x 5,6	3	0	0
11	K	71	góra - skroń	12,1 x 4,8	2	0	0
12	M	62	góra - skroń	10,2 x 3,9	2	0	0
13	K	68	dół - skroń	16,3 x 3,1	3	0	0
14	M	59	dół - nos	13,8 x 4,9	2	0	0

Tab. I. Dane kliniczne badanych pacjentów.

Tab. I. Clinical characteristic of tested patients. T - tumor, N - nodulus, M - metastases.

## Materiał

Badaniami objęto grupę 14 osób, 8 kobiet i 6 mężczyzn, w wieku od 36 do 74 lat ( $62,1 \pm 10,6$ ), leczonych w Klinice Okulistyki

Akademii Medycznej w Białymstoku w latach 2000-2001, z podejrzaniem czerniaka złośliwego błony naczyniowej oka. Pełne badanie okulistyczne zostało poszerzone o badania ultrasonograficzne gałki ocznej w prezentacji A i B, kolorową ultrasonografię dopplerowską (CD, PD) oraz angiografię fluoresceinową. W niektórych przypadkach wykonano tomografię komputerową gałki ocznej i oczodołu. Ze względu na rozległość procesu nowotworowego (zmiana endofityczna obejmowała od  $1/2$  do  $2/3$  przestrzeni wewnątrzgałkowej) u wszystkich chorych leczeniem z wyboru była enukleacja gałki ocznej, tym bardziej że po konsultacji onkologicznej wykluczono możliwość zastosowania brachyterapii. Zestawienie materiału klinicznego przedstawia tab. I.

Fragmenty tkanki guza, wypreparowane z usuniętych gałek ocznych, poddano badaniu histopatologicznemu. We wszystkich 14 przypadkach potwierdzone zostało wcześniej postawione kliniczne rozpoznanie czerniaka złośliwego błony naczyniowej.

## Metodyka

Materiałem do badań genetycznych były fragmenty tkanki nowotworowej, pobrane w trakcie zabiegu operacyjnego i zamrożone do momentu izolacji DNA, oraz krew obwodowa z żyły łokciowej chorego. Materiał genetyczny komórek krwi obwodowej stanowił wzorzec porównawczy.

Etapy badania były następujące:

1. Izolacja DNA metodą cheleksową (16) oraz organiczną; dodatkowe oczyszczanie w mikrokolumnach (6).
2. Amplifikacja multipleksowa loci STR na wybranych chromosomach oraz analiza fenotypowa z użyciem analizatora genetycznego 310 ABI Prism 31 (Applied Biosystems USA) i komercyjnie dostępnych zestawów. W badaniach wstępnych uwzględniono markery na chromosomach: 2., 3., 4., 8., 11., 12., 13., 16., 18.,

Lokalizacja chromosomowa Chromosomal localization	Badane markery Analyzed markers
3p	D3S1358
12p 12pter	VWA
16q24-ter	D16S539
2q35-37.1	D2S1338
8	D8S1179
21q11.1-q21	D21S11
18q21.3	D18S51
19q12-13.1	D19S433
11p15.5	TH01
4q28	FGA
2p23-2pter; intron 10	TPOX
4q28; intron 3	FGA
7q	D7S820
13q22-q31	D13S317
5q33.3-34	CSF1PO
2p22.3-16.1	BAT 26

Tab. II. Badane markery mikrosatelitarne i ich lokalizacja chromosomowa.

Tab. II. Analyzed microsatellite markers and their chromosomal localization.

19. i 21. Dodatkowo dokonano analizy układu mikrosatelitarne-go BAT 26 (2), co obrazuje tab. II.
3. Określenie częstotliwości występowania niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) i utraty heterozygotyczności (LOH) w badanych przypadkach.

### Ad. 2. Analiza markerów w systemie multiplex

Amplifikację i typowanie z użyciem multipleksowego systemu AmpFISTR SGM Plus (Applied Biosystems, USA) przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Elektroforezę i analizę alleli wykonano z użyciem analizatora genetycznego 310 ABI Prism. Pomiar wielkości produktów amplifikacji przeprowadzono w odniesieniu do wewnętrznego standardu wielkości (ROX 500) za pomocą programu komputerowego ABI Prism Gene Scan Analysis 2.1. Genotypowania dokonano na podstawie wyników pomiarów długości produktów amplifikacji w odniesieniu do drabiny alleli z użyciem programu komputerowego ABI Prism Genotyper 2.0.

### Analiza markera BAT 26 Amplifikacja enzymatyczna

Preparaty DNA poddano enzymatycznej amplifikacji (PCR) z użyciem polimerazy Taq, nukleotydów firmy Promega (USA) oraz komercyjnie syntetyzowanych primerów o następujących sekwencjach:

- ❖ primer 1: TGA, CTA, CTT, TTG, ACT, TCA, GCC,
- ❖ primer 2: AAC, CAT, TCA, ACA, TTT, TTA, ACC.

### Elektroforeza

Fragmenty rozdzielono, stosując elektroforezę poziomą w nieciągłym systemie buforowym na cienkowarstwowych żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących. Barwienie żeli wykonano metodą srebrową. Wielkość produktów amplifikacji odnoszono do wzorca wielkości 100bp (Gibco, BRL).

### Wyniki

Badaniom poddano 14 par próbek DNA z guza melanoma malignum choroideae i odpowiadających im próbek krwi obwodowej. Wyniki zamieszczono w tab. III.

W 6 przypadkach (42,8%), oznaczonych numerami 1, 2, 3, 10, 11 i 12, obserwowano dwa typy zmian mikrosatelitarnych: 1) niestabilność mikrosatelitarną (MSI), polegającą na zmianie ruchliwości elektroforetycznej alleli lub wielkości pików, oraz 2) utratę heterozygotyczności (LOH). MSI dotyczyła chromosomów 3., 6. i 11.; LOH – chromosomów: 2., 3., 8., 13., 16. i 19. Utratę heterozygotyczności w loci BAT 26 stwierdzono w 5 przypadkach (35,7%), tych samych, w których w obrębie innych markerów obserwowano MSI lub LOH (próbki: 2, 6, 8, 11, 12).

U pacjentów z numerami 1, 2 i 3, z wywiadem chorobowym trwającym od 6 do 9 miesięcy, oftalmoskopowo i ultrasonograficznie stwierdzono w kwadrantach skroniowych guzy znacznych rozmiarów z towarzyszącym naciekiem pozagałkowym. Stopień zaawansowania anatomo-klinicznego tych guzów (cecha pT) określono jako T4. Z powodu uogólnienia się procesu nowotworowego dwie z tych trzech osób zmarły: jedna po 2 miesiącach od enukleacji, druga po 6 miesiącach. W badaniu przed operacją w obu tych przypadkach stwierdzono zajęcie okolicznych węzłów chłonnych. U pozostałych trzech pacjentów, oznaczonych numerami 10, 11 i 12, guzy nie osiągnęły tak dużych rozmiarów, zgodnie z kryteriami

pT zakwalifikowano je do grupy T2 i T3. W większości przypadków guzy zlokalizowane były w kwadrantach skroniowych.

### Dyskusja

Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) i utrata heterozygotyczności (LOH) są to zaburzenia w strukturze genomu, mogące występować w komórkach w trakcie transformacji nowotworowej. LOH jest procesem, w którym komórka traci, np. poprzez inaktywację, fragment chromosomu zawierający jeden aktywny, prawidłowy allel genu supresorowego transformacji nowotworowej. Inaktywacja taka dotyczy najczęściej markera nowotworowego, związanego z genem przeciwnowotworowym. MSI natomiast stanowi przekształcenie jakościowe w sekwencji powtórzeniowej, czyli zmianę liczby powtórzeń wstawki lub utratę motywu powtórzeń, prowadzącą w konsekwencji do powstania błędu replikacji i świadcząca pośrednio o mutacji w genie mutatorowym.

Wybór badanych chromosomów, jak również poszczególnych ich regionów, w których możliwy jest defekt genetyczny, jest w dużej mierze sprawą przypadkową. Nie jest bowiem dokładnie znana lokalizacja wszystkich protoonkogenów i genów supresorowych, mających wpływ na stabilność genomu komórkowego. Pierwsze badania zjawiska niestabilności mikrosatelitarnej w guzach barwnikowych dotyczyły czerniaka złośliwego skóry i obejmowały stosunkowo duży, liczący 35-62 przypadki, materiał badawczy (3,4,14). Szczególną uwagę zwrócono wówczas na chromosomy: 2., 3., 5., 6., 17. i 18. Według różnych autorów MSI stwierdza się w blisko 20% badanych guzów w chromosomie 9. (loci 21 i 22). LOH w chromosomie 9. spotyka się znacznie częściej, bo w 22-40% (3,14), a nawet w 71% przypadków (11). Zauważono również następującą prawidłowość: LOH w regionie p21 chromosomu 9. występuje częściej w zmianach rozległych (3,4).

Genetyka czerniaka złośliwego błony naczyniowej jest gorzej poznana. Wynika to z mniejszej częstości występowania tego nowotworu, mniejszej dostępności do badania bezpośredniego i, co za tym idzie, ze znacznie skromniejszego materiału badawczego. Millikin i wsp. (9) badali mikrosatelity u 20 pacjentów z czerniakiem błony naczyniowej w wielu chromosomach (1., 12., 17., 18.), zwracając szczególną uwagę na chromosom 6. (loci c-MYB, ESR). Wykryli oni LOH w ponad 40% badanych przypadków. Zmiany w innym locus chromosomu 6. wykazali Metzelaar i wsp. (7). Badając 20 preparatów czerniaka złośliwego błony naczyniowej, stwierdzili oni LOH w 55% w locus D6S105 i w 40% w locus D6STNFa badanych guzów.

Dobrze poznany jest region 9p21-23, badany przez Ohta i wsp. (10,11) oraz Merbsa i wsp. (7) na materiale rzędu 19-33 przypadków. Autorzy ci sugerują, że uszkodzenie genów CDKN4 i CDKN2 (grupa kinaz, zależnych od cyklu komórkowego), poprzez zaburzenia fosforylacji białek, prowadzi do deregulacji cyklu komórkowego i tym samym może stanowić związek przyczynowo-skutkowy z rozwojem nowotworu błony naczyniowej. Podobnie Peris i wsp. (14), badając region 9p21, stwierdzili LOH w 40% spośród 40 przypadków, w regionie zaś 9p22 – w 22% badanych guzów. Przypuszczalnie w okolicy markerów MT51 i CDKN2 znajduje się gen supresorowy, którego dysfunkcja zapoczątkowuje proces nowotworowy. Z uszkodzeniem tego samego chromosomu wiąże się również uogólnianie się procesu nowotworowego, zjawisko MSI bowiem występuje częściej w przypadku obecności przerzutów (12). W swoich badaniach Takata i wsp. (17) analizują różnice w występowaniu

Numer próbki	D3S1358	VWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	D21S11	D18S51	D19S433	TH01	FGA	BAT26	TPOX	CSF1PO	D5S818	D13S317	D7S820
1	HZ	HZ	HZ	<u>LOH</u>	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HM	<u>LOH</u>	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ
2	HZ	HZ	<u>LOH</u>	HM	HZ	HZ	HM	<u>LOH</u>	HZ	HZ	<u>LOH</u>	HM	HZ	HZ	HZ	HZ
3	<u>MSI</u>	HZ	HM	HM	<u>LOH</u>	HZ	HZ	HZ	<u>MSI</u>	HZ	<u>LOH</u>	HZ	HZ	HZ	<u>LOH</u>	HZ
4	HZ	HM	HZ	HZ	HM	HZ	HM	HM	HZ	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	HZ	HZ
5	HZ	HM	HM	HZ	HM	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	HZ
6	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	HM	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	HM	HZ	HM	HZ	HM
7	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	HZ	HM	HZ	HZ	HZ	HZ
8	HZ	HZ	HM	HM	HZ	HZ	HM	HM	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	HZ	HZ	HM
9	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	HM	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HM	HZ
10	<u>LOH</u>	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	HM	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HM	HZ
11	<u>MSI</u>	HM	<u>MSI</u>	<u>LOH</u>	HZ	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	<u>LOH</u>	HZ	HM	HM	<u>LOH</u>	HZ
12	<u>MSI</u>	HZ	HZ	<u>LOH</u>	HM	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	<u>LOH</u>	HM	HM	HZ	<u>LOH</u>	HZ
13	HZ	HZ	HZ	HM	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	<u>LOH</u>	HZ
14	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HZ	HM

Tab. III. Zmiany mikrosatelitarne w badanej tkance guzowej. LOH - utrata heterozygotyczności, MSI - niestabilność mikrosatelitarna, HZ - heterozygota, HM - homozygota.

Tab. III. Microsatellite changes in tested tumors. LOH - loss of heterozygosity, MSI - microsatellite instability, HZ - heterozygote, HM - homozygote.

LOH w subklonach komórkowych chromosomów 6., 9., 10. i 18., pochodzących z ogniska pierwotnego (10 przypadków) i przerzutowego (15 preparatów). Może się to okazać przydatne w ocenie leczenia i szacowaniu rokowania. Spostrzeżono także, że uszkodzenia w chromosomie 9. dominują u osób starszych (15).

Badania Parrelli i wsp. (13), Sisleya i wsp. (14) oraz Blasiego (1) wykazują występowanie LOH i MSI w różnych loci chromosomów 3., 8. i 6. Zmiany w analizowanych markerach genetycznych stwierdzano w 28% do 60% badanych guzów. Isskiki i wsp. (5) zwracają uwagę na chromosom 10., gdzie na ramieniu długim znajdują się geny supresorowe, których dysfunkcję w pośredni sposób określa obecność LOH w ponad połowie analizowanych przypadków, i to aż w 10 różnych loci.

Konsekwentnie prowadzone badania zmian mikrosatelitarnych LOH i MSI w loci różnych chromosomów sprawiają, że liczba chromosomów, w których te zjawiska nie zostały jeszcze opisane, jest coraz mniejsza. Potencjalnie niezidentyfikowane markery nowotworowe dotyczą chromosomów: 15., 20. i 21. Jednak wstępne badania, przeprowadzone przez Isskikiego i wsp. (5), sugerują, że w obrębie właśnie tych chromosomów nie stwierdza się zaburzeń genetycznych, mogących doprowadzić do transformacji nowotworowej w błonie naczyniowej oka.

Analiza wstępnych wyników naszych badań, z wykorzystaniem posiadanych zestawów paneli do badań układów mikrosatelitarnych markerów nowotworowych, wykazała w 6 na 14 przypadków (42,8%) zaburzenia w genomie komórek czerniaka złośliwego błony naczyniowej. Utratę heterozygotyczności obserwowaliśmy w obszarze markerów, zlokalizowanych w chromosomach 2., 3., 8., 13., 16. i 19. Podobną lokalizację uszkodzeń podają również inni autorzy

(2,3,13). Zmiany jakościowe w markerach (MSI) dotyczyły chromosomów 3., 10. i 11., co pokrywa się z wynikami badań Parrellego i wsp. (13), Sisleya i wsp. (15) oraz Blasiego i wsp. (1).

Słonność do powstawania defektów genetycznych dodatkowo potwierdza 5 dodatknych wyników w markerze BAT. Najczęściej, bo w 5 przypadkach, stwierdziliśmy je w układzie mikrosatelitarnym BAT26. Jest to sekwencja poliadeninowa, znajdująca się w intronie 5. genu reperacyjnego hMSH2 (2p22.3-16.1). Niestabilność tego markera może mieć wpływ na prawidłowe działanie genu, np. może spowodować zaburzenie kontroli procesów naprawczych. Podobnie niestabilność markera D2S1338, zlokalizowanego na chromosomie 2. w pobliżu genu (2q35q31.1), który koduje syntezę fosfatazy tyrozyny – aminokwasu, będącego wyjściowym substratem w przemianach barwnikowych – może mieć związek z zaburzeniem genomu pierwotnie prawidłowych melanocytów. Podobnie również stwierdzone przez nas w 3 przypadkach uszkodzenia w obrębie chromosomu 13., w pobliżu markera 13q31-q32, kodującego tzw. proteinę 2, związaną z tyrozyną, mogą destabilizować prawidłowe przemiany melaniny w komórkach czerniaka złośliwego.

Wydaje się, że częstość występowania zaburzeń w układach mikrosatelitarnych w loci prawdopodobnych markerów nowotworowych koreluje z wielkością guza i jego ekspansją. W naszych badaniach zmiany genomu obserwowano w zaawansowanych guzach, o średnicy 24,6-29,1 mm i wysokości 4,9-5,8 mm, określanych w klasyfikacji patologicznej jako stopień najwyższy – pT4, oraz ze stwierdzonymi w 2 przypadkach przerzutami do węzłów chłonnych (N1). Konsekwencją ekspansji procesu rozrostowego był zgon 2 pacjentów.

Porównywanie wyników, uzyskiwanych przez różnych naukowców, jest niezmiernie trudne, a czasami wręcz niemożliwe, ponie-

waż badając zjawisko niestabilności genetycznej w obrębie tych samych chromosomów, z reguły analizowano różne markery. Na przykład w chromosomie 9. Ohta i wsp. (10) określali markery D9S157 i D9S171, natomiast Smeds i wsp. (16) – marker D9S736. Jednak prace dotyczące tego tematu umożliwiają tworzenie coraz bardziej kompletnego wizerunku mapy genetycznej, determinującej przebieg choroby nowotworowej, w tym także czerniaka złośliwego błony naczyniowej oka. Innymi słowy, w badaniach tych bardziej chodzi o uzupełnianie i kompletowanie informacji w tym zakresie niż wyłącznie o porównywanie wyników, uzyskiwanych przez poszczególnych autorów.

Reasumując, ocena polimorfizmu sekwencji DNA może być wykorzystywana jako wskaźnik istnienia defektu genetycznego i może świadczyć o predyspozycjach do zachorowania na chorobę nowotworową, nie oznacza to jednak stuprocentowej pewności co do takiej prognozy. Wykrywanie genetycznych markerów nowotworowych stwarza nadzieję na wczesne rozpoznawanie predyspozycji do transformacji nowotworowej.

### Wnioski

1. Niestabilność genetyczna typu LOH i MSI bywa obecna w guzach błony naczyniowej oka.
2. Zaburzenia w genomie komórki nowotworowej o charakterze LOH i MSI wykazują związek z rozmiarem guza oraz stopniem zaawansowania choroby nowotworowej.

**PIŚMIENNICTWO:** 1. Blasi M. A., Roccella F., Blestrasi E., Del-Porto G., Felice N., Roccella M., Rota R., Grammatico P.: *3p13 region: a possible location of a tumor suppressor gene involved in uveal melanoma*. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1999, 108 (1), 81-83. 2. Budolowe B., Allen R.: *Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis of DNA fragments. Methods in Molecular Biology Vol. 9: Protocols in Human Molecular Genetics*. Eds. C. Matthew copyright, The Humana Press Inc. Califton N, J., 1991. 3. Funk J. O., Schiller P. I., Barrett M. T., Wong D. J., Kind O., Sander C. A.: *p16INK4 expression in frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma*. *J. Cutan. Pathol.*, 1995, 25 (6), 291-296. 4. Holland E. A., Beaton S. C., Edwards B. G., Kefford R. F., Mann G. J.: *Loss of heterozygosity and homozygous deletions on 9p21-22 in melanoma*. *Oncogene*, 1994, 9 (5), 1361-1365. 5. Isshiki K., Elder D. E., Guerry D., Linnenbach A. J.: *Chromosome 10 allelic loss in malignant melanoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1993, 8 (3), 178-184. 6. Kunkel L. M., Smith K. D., Boyer S. H., Bargaoner D., Wachtel S. S., Miller O. J., Berg W. R., Joner H. W., Ray M.: *Analysis of human Y chromosome-specific reiterated DNA in chromosome*

*variants*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977, 74, 1245-1249. 7. Merbs S. L., Sidransky D.: *Analysis of p 16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) alterations in primary sporadic uveal melanoma*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999, 40 (3), 779-783. 8. Metzelaar-Bolk J. A., Jager M. J., Moghaddam P. H., van der Silk A. R., Giphard M. J.: *Frequent loss of heterozygosity on chromosome 6p in uveal melanoma*. *Hum. Immunol.*, 1999, 60 (10), 962-969. 9. Millikin D., Meese E., Vogelstein B., Witkowski C., Trent J.: *Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma*. *Cancer Res.*, 1991, 51 (20), 5449-53. 10. Ohta M., Nagai H., Shimizu M., Rasio D., Berd D., Mastrangelo M., Singh A. D., Shields J. A., Shields C. L., Croce C. M.: *Rarity of somatic and germline mutation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene CDK4I in melanoma*. *Cancer Res.*, 1994, 54 (20), 5272. 11. Ohta M., Berd D., Shimizu M., Nagai H., Cotticelli M. G., Mastrangelo M., Shields J. A., Shields C. L., Croce C. M., Huebner K.: *Deletion mapping of chromosome region 9p21-p22 surrounding the CDKN2 locus in melanoma*. *Int. J. Cancer*, 1996, 65 (8): 762-767. 12. Palmieri G., Cossu A., Ascierio P. A., Botti G., Strazullo M., Lissia A., Colombino M., Casula M., Floris C., Tanda F., Pirastu M., Castello G.: *Definition of the role of chromosome 9p21 in sporadic melanoma through genetic analysis of primary tumors and their metastases*. *Br. J. Cancer*, 2000, 83 (12), 1707-1714. 13. Parrella P., Sidransky D., Merbs S. L.: *Allelotype of posterior melanoma: implications for bifurcated tumor progression pathway*. *Cancer Res.*, 1999, 59 (13), 3032-3037. 14. Peris K., Keeler G., Chimenti S., Amantea A., Keri H., Hofler H.: *Microsatellite instability and loss of heterozygosity in melanoma*. *J. Invest. Dermatol.*, 1995, 105 (4), 5625-5628. 15. Sisley K., Curtis D., Rennie I. G., Rees R. C.: *Loss of heterozygosity of the thyroid hormone receptor B in posterior uveal melanoma*. *Melanoma Res.*, 1993, 3 (6), 457-461. 16. Smeds J., Kumar R., Rozell B. L., Hemminki K.: *Increased frequency of LOH on chromosome 9 in sporadic primary melanomas is associated with increased patient age: diagnosis*. *Mutagenesis*, 2000, 15 (3), 257-260. 17. Takata M., Morita R., Takehara K.: *Clonal heterogeneity in sporadic melanomas as revealed by loss of heterozygosity analysis*. *Int. J. Cancer*, 2000, 1585 (4), 492-497. 18. Walsh P. S., Metzger D., Higuchi R.: *Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material*. *BioTechniques*, 1991, vol. 10, 4, 506-513. 19. Yamaguchi T., Toguchida J., Wadayama B., Kanoe H., Nakayama T., Ishizaki K., Ikenaga M., Kotoura Y., Sasakim S.: *Loss of heterozygosity and tumor suppressor gene mutation in chondrosarcomas*. *Anticancer Res.*, 1996, 16, 2009-2015.

Praca wpłynęła do Redakcji 29.08.2002 r. (144).

Adres do korespondencji (Reprint requests to):  
dr n. med. Ewa Proniewska-Skrętek  
Klinika Okulistyki Akademii Medycznej w Białymstoku  
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a  
15-276 Białystok