

UNIWERSYTET MEDYCZNY
im. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU
WYDZIAŁ LEKARSKI I

Anna-Maria Barciszewska

**Analiza składników DNA
guzów nowotworowych mózgu u człowieka**

Praca doktorska

Promotor

Prof. dr hab. med. Stanisław Nowak



Poznań 2010

*Praca wykonana
w
Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
oraz
Instytucie Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.*

*Serdecznie dziękuję
Panu Prof. dr hab. med. Stanisławowi Nowakowi
Kierownikowi Kliniki oraz Promotorowi
za pomoc w realnym przygotowaniu niniejszej pracy.*

*Bardzo dziękuję
Panu Prof. dr hab. med. Ryszardowi Żukielowi
za pomoc i dyskusję wyników.*

*Podziękowania składam
Pani Prof. IChB PAN dr hab. Elizie Wyszko,
Dr Katarzynie Rolle
Mgr Monice Piweckiej,
oraz
Pani Iwonie Gawrońskiej
z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN
za okazaną pomoc w realizacji badań.*

*Serdecznie dziękuję
Koleżankom i Kolegom z Katedry i Kliniki Neurochirurgii
za codzienne wsparcie
oraz
Personelowi Pielęgniarskiemu Oddziału Klinicznego i Bloku Operacyjnego
za pomoc w pobieraniu materiału do badań.*

Spis treści

1. Wprowadzenie	3
2. Cel pracy	5
3. Wykaz stosowanych skrótów	6
4. Opracowanie literaturowe	8
4.1. Guzy mózgu	8
4.1.1. Epidemiologia	9
4.1.2. Etiopatogeneza	11
4.1.3. Klasyfikacja guzów mózgu	13
4.1.4. Charakterystyka wybranych nowotworów OUN	18
4.1.5. Metody diagnostyczne	30
4.1.6. Metody terapeutyczne	33
4.1.6.1. Leczenie operacyjne	33
4.1.6.2. Radioterapia i radiochirurgia	34
4.1.6.3. Chemioterapia	35
4.1.6.4. Niestandardowe metody terapeutyczne	37
4.1.7. Rokowanie	38
4.2. Epigenetyczna regulacja ekspresji genów	39
4.2.1. Właściwości i funkcja 5-metylocytozyny	41
4.2.2. Metylotransferazy DNA	48
4.2.3. Metody oznaczania 5-metylocytozyny	54
4.2.3.1. Analiza metylacji pojedynczego genu	56
4.2.3.2. Analiza całkowitej metylacji genomu	61
4.2.4. Metylacja DNA w komórkach nowotworowych	67
4.3. Główne czynniki modyfikujące składniki komórki	69
5. Materiały i metody	80
5.1. Materiały	80
5.1.1. Enzymy	80
5.1.2. Odczynniki	80
5.2. Metody	81
5.2.1. Pozyskiwanie materiału do badań	81
5.2.2. Izolacja DNA	81
5.2.3. Hydroliza enzymatyczna DNA	83
5.2.4. Znakowanie hydrolizatu DNA radioaktywnym fosforem	83

5.2.5. Trawienie nukleazą P1 _____	83
5.2.6. Rozdział chromatograficzny znakowanych deoksynukleotydów _____	83
5.2.7. Ocena względnej zawartości m ⁵ dC _____	83
5.2.8. Analiza statystyczna uzyskanych wyników _____	84
6. Nomenklatura guzów mózgu _____	85
7. Wyniki badań własnych _____	89
7.1. Analiza hydrolizatu DNA metodą chromatografii cienkowarstwowej _____	89
7.2. Określenie względnej zawartości m ⁵ dC w badanym DNA _____	91
7.3. Wpływ sposobu pobierania i przechowywania tkanek na zawartość m ⁵ dC w DNA _____	93
7.4. Charakterystyka materiału pobranego do badań (tkanki nowotworowe guzów mózgu) _____	95
7.5. Zawartość m ⁵ dC w DNA wyizolowanym z tkanek guzów mózgu _____	100
7.6. Zawartość m ⁵ dC w DNA z tkanek i krwi obwodowej pacjentów z guzami mózgu _____	111
8. Dyskusja _____	115
9. Wnioski _____	122
10. Załączniki _____	126
11. Literatura _____	144
12. Streszczenie _____	161
13. Abstract _____	162

1. Wprowadzenie

Powszechnie akceptowany jest pogląd, że podstawowym celem nauki jest dostarczanie informacji, wiedzy, technik i technologii służących dobru człowieka. Dotyczy to zarówno nowych sposobów powiększania zasobów żywnościowych, jak i zapewnienia skutecznych metod diagnozy, dostępności różnorodnych leków oraz nowych form terapii.

Zainteresowanie nauki ochroną zdrowia człowieka zawsze było duże, ale w ostatnich latach wyraźnie wzrosło, głównie na skutek poznania pierwszorzędowej struktury genomów wielu bakterii i licznych *Eukariota*, a przede wszystkim DNA człowieka. Znajomość kolejności ułożenia około 3.5 miliarda czterech podstawowych zasad azotowych jest warunkiem koniecznym, ale nie wystarczającym do zrozumienia ekspresji informacji genetycznej zakodowanej w DNA. Brakującym i niezwykle ważnym elementem funkcjonowania genów eukariotycznych jest obecność w nich „piątej” zasady, 5-metylocytozyny (m^5C). Poznanie jej ilości i rozmieszczenia niesie ze sobą duży potencjał diagnostyczny. Obniżony poziom metylacji (głównie dinukleotydu m^5CG) obserwuje się w licznych sekwencjach powtarzających się oraz w genach białkowych. Metylacja DNA w rejonach regulatorowych niektórych genów supresorowych (np. BRCA1, p53, p16) powoduje ich inaktywację. Można zatem obecność oraz ilość m^5C wiązać jednoznacznie z nowotworzeniem.

Obecnie medycyna molekularna dysponuje przekonującymi dowodami, że większość chorób, szczególnie nowotworowych (rak sutka, płuc, piersi, gruczołu krokowego) ma bezpośredni związek z uszkodzeniami materiału genetycznego wywołanymi działaniem aktywnych związków tlenu (ROS), szczególnie najbardziej reaktywnego z nich, rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$). Modyfikacji tej mogą ulegać nie tylko cztery podstawowe zasady DNA: adenina, guanina, cytozyna i tymina, ale też powszechnie występująca, choć często nieidentyfikowana, 5-metylocytozyna, której obecność w genomie człowieka wynosi około 1%. Ze względu na swoiste właściwości jest ona, obok modyfikowanych i acetylowanych reszt lizyn i arginin w histonach, jednym z najważniejszych znaczników epigenetycznych. Stabilność genomu oraz ekspresja genów w prawidłowej komórce ściśle zależy od wzoru (ang. *pattern*) metylacji DNA, który w komórkach nowotworowych jest wyraźnie zaburzony. Wielokrotnie pokazano, że zmiany w poziomie m^5C odgrywają istotną rolę w procesie tumorogenezy. Zarówno globalna hipometylacja lub lokalna hipermetylacja CpG może powodować transformację nowotworową. Oznaczanie zmian metylacji cytozyny może dostarczyć informacji niezbędnej w ich profilaktyce, leczeniu i monitorowaniu stopnia

zaawansowania zmian neoplazmatycznych. Stosowane do tej pory metody analizy metylacji poszczególnych genów wymagają specjalistycznego sprzętu (np. spektrometr mas) oraz informacji strukturalnych (sekwencja genu), przez co nie mogą być stosowane na szeroką skalę w medycznych laboratoriach diagnostycznych. Istnieje zatem potrzeba opracowania skutecznej metody oznaczania globalnego (genomowego) poziomu m⁵C.

Wysokozłośliwe glejaki (HGG) są najczęstszymi pierwotnymi guzami mózgu charakteryzującymi się szczególnie wysoką inwazyjnością. Szybko prowadzą do uszkodzenia mózgu manifestującego się ubytkowymi objawami neurologicznymi. Ich najbardziej złośliwą postacią, jaką jest glejak wielopostaciowy (GBM), charakteryzuje średni czas przeżycia chorego do kilkunastu miesięcy, co nie uległo istotnej zmianie w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat pomimo postępu technologicznego w neurochirurgii, radioterapii oraz wprowadzenia nowych chemioterapeutyków. Jest to wynik niezwyklej zdolności do samorzutnego przenikania i rozprzestrzeniania się komórek glejaka w mózgu, co czyni je wyjątkowo odpornymi na dotychczasowe metody lecznicze.

Osiągnięcia biologii molekularnej stwarzają nadzieję na poznanie nowych znaczników nowotworzenia, lepsze zrozumienie procesów odpowiadających za powstawanie glejaków oraz przyspieszenie tworzenia nowych metod diagnostyki i leczenia tych nowotworów.

2. Cel pracy

Strategicznym celem moich badań było opracowanie metody analizy zawartości m^5dC w DNA z ograniczonej ilości materiału biologicznego mogącej mieć zastosowanie diagnostyczne. Aby zrealizować to zadanie wyznaczono następujące cele szczegółowe:

1. Przeprowadzenie analizy globalnego (genomowego) poziomu metylacji w DNA wyizolowanym z tkanek nowotworowych guzów i krwi obwodowej pacjentów operowanych z powodu nowotworu mózgu.
2. Pokazanie zależności metylacji DNA w guzach mózgu od stopnia złośliwości choroby nowotworowej.
3. Wykorzystanie krwi obwodowej jako źródła DNA i informacji o metylacji mogącej umożliwić wczesną diagnozę jeszcze przed interwencją chirurgiczną. Zmiana poziomu metylacji (m^5C) w DNA mogłaby stanowić dobry znacznik wczesnego wykrywania nowotworu, monitorowania jego rozwoju oraz oceny agresywności.
4. Opracowanie metody prognostycznej o wysokim stopniu ufności dla pacjentów z chorobą nowotworową mózgu.

Na przeprowadzenie badań uzyskałam zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu nr 152/08.

3. Wykaz stosowanych skrótów

- [³²P] ATP 5'trifosforan adenozyiny znakowany radioaktywnym fosforem-32,
- 8-okso-G 8-okso-guanozyna,
- A adenozyina (nukleozyd adeniny),
- AA gwiaździak anaplastyczny (ang. *anaplastic astrocytoma*),
- ATP 5'trifosforan adenozyiny,
- BER mechanizm naprawy DNA poprzez wycięcie nieprawidłowych zasad (ang. *base excision repair*),
- Bicyna N,N-di-(2-hydroksyetylo)-glicyna,
- bp pary zasad (ang. *base pairs*),
- C cytydyna (nukleozyd cytozyny),
- CEDD zwiększone konwekcyjnie dostarczanie leków (ang. *convection-enhanced drug delivery*),
- Ci jednostka radioaktywności (1 Ci = 2.22*10¹² cpm),
- CpG dinukleotydy cytozyna-guanina,
- cpm liczba cząsteczek β emitowanych w ciągu minuty (ang. *counts per minute*),
- CT badanie tomografii komputerowej (ang. *computed tomography*),
- CTH chemioterapia (ang. *chemotherapy*),
- DNA kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*),
- dnmt gen metylotransferazy DNA
- DNMT metylotransferaza DNA (ang. *DNA methyltransferase*),
- dNp deoksynukleotydy podstawowe (A, G, T, C),
- dNTP deoksynukleozydotrifosforan (ang. *deoxynucleoside triphosphate*), w miejsce N ulegają podstawieniu: A, T, C, G,
- DSA cyfrowa angiografia subtrakcyjna (ang. *digital subtraction angiography*),
- DTT ditiotretiol,
- EDTA kwas etylenodiaminotetraoctowy (wersenowy),
- EGFR receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*),
- G guanozyna (nukleozyd guaniny),
- GBM glejak wielopostaciowy (ang. *glioblastoma multiforme*),
- Gy grej, jednostka dawki pochłoniętej w układzie SI (ilość energii promieniowania (w dżulach) pochłoniętej przez kilogram materii,
- HAT acetylotransferaza histonów (ang. *histone acetyltransferase*),
- HGG glejaki wysokiego stopnia złośliwości (ang. *high grade gliomas*),
- KPS skala wydolności chorego wg Karnofsky'ego (ang. *Karnofsky Performance Scale*),
- LGG glejaki niskiego stopnia złośliwości (ang. *low grade gliomas*),
- LOH utrata heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*),

-
- M stężenie molowe (mol/l),
 - m⁵C 5-metylocytozyna,
 - m⁵dC 5-metylodeoksytydyna (m⁵C w DNA),
 - MBD białka zawierające domenę wiążącą się do m⁵CpG (ang. *m⁵CpG-binding domain protein*),
 - MeCP białka wiążące się do m⁵CpG (ang. *m⁵CpG-binding protein*),
 - MN nukleaza z *Micrococcus*,
 - MRI badanie rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging*),
 - mtDNA DNA mitochondrialne
 - ncRNA niekodujące RNA
 - OUN ośrodkowy układ nerwowy,
 - PCR reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*),
 - PDGF płytkowo zależny czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor*),
 - PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*)
 - R_f wskaźnik opóźnienia / retencji (ang. *retardation factor*); iloraz odległości przebytej przez substancję rozdzielaną np. w chromatografii cienkowarstwowej przez odległość przebytą przez czoło eluentu (układu rozwijającego),
 - RISC indukowany przez RNA kompleks wyciszający (ang. *RNA-induced silencing complex*),
 - RNA kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*),
 - ROS reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*),
 - RTH radioterapia (ang. *radiotherapy*),
 - SAM (AdoMet) S-adenozyl-L-metionina,
 - SD odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*),
 - SDS sól sodowa siarczanu dodecyłu,
 - SOD dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*),
 - SPD fosfodiesteraza ze śledziony (ang. *spleen phosphodiesterase*),
 - Spermidyna 4-azaoktano-1,8-diamina,
 - T tymidyna (nukleozyd tyminy),
 - TCL chromatografia cienkowarstwowa (ang. *thin layer chromatography*),
 - TNM system klasyfikacji nowotworów (ang. *tumor, nodules, metastases*),
 - Tris hydroksymetyloaminometan,
 - U urydyna,
 - UICC Międzynarodowa Unia Walki z Rakiem (fran. *l'Union Internationale Contre le Cancer*),
 - VEGF czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (ang. *vascular epithelial growth factor*),
 - VPD fosfodiesteraza z jadu węża (ang. *venom phosphodiesterase*),
 - WHO Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*).
-

4. Opracowanie literaturowe

4.1. Guzy mózgu

Guzy mózgu stanowią 2% wszystkich nowotworów rozwijających się w organizmie człowieka. Pojawiają się one we wszystkich grupach wiekowych, najczęściej jednak w średnim wieku. W wielu przypadkach występowanie danego rodzaju guza jest charakterystyczne dla określonego przedziału wiekowego. Nowotwory pierwotne mózgu występują najczęściej między 20 a 60 rokiem życia, a pochodzące z pozostałości embrionalnych - w pierwszych dwóch dekadach życia. Guzy mózdzku są częstsze u dzieci niż u dorosłych, a pierwotne złośliwe nowotwory mózdzku występują prawie wyłącznie u dzieci.

Nowotwory mózgu mogą być pierwotne lub przerzutowe. Pierwotne guzy mózgu stanowią heterogenną grupę schorzeń ze względu na rodzaj komórek, z których pochodzą, swoją biologię, obraz histologiczny, leczenie i rokowanie. Powstają one z komórek progenitorowych mózgu, opon mózgowo-rdzeniowych, mózgowych naczyń krwionośnych, a także przysadki, szyszynki i pozostałości embrionalnych, rzadko kości czaszki.

Guzy mózgu mogą wywoływać objawy miejscowe związane ze swoją lokalizacją i uszkodzeniem czynności określonego obszaru mózgu, oraz ogólne, spowodowane wzmożonym ciśnieniem wewnątrzczaszkowym.

Najważniejszymi badaniami neuroobrazowymi używanymi przy diagnozowaniu nowotworów mózgu są: tomografia komputerowa (CT), rezonans magnetyczny (MRI) oraz angiografia rezonansu magnetycznego (MRA) [Jinkins i da Costa Leite 1998, Ross i in. 1985, Paprzycki i in. 2000, Shapiro 1983, Taveras 1996]. Leczenie chirurgiczne znajduje zastosowanie w większości przypadków nowotworów mózgu, a jego wynik zależy od zakresu usunięcia, lokalizacji oraz charakteru histologicznego guza [Tindall i in. 1996].

4.1.1. Epidemiologia

Według Rejestru Nowotworów Centrum Onkologii w Warszawie w 2006 roku w Polsce stwierdzono 2850 zachorowań na złośliwe nowotwory mózgu. Współczynnik zachorowalności na 100 000 ludności wyniósł 7.84 u mężczyzn (10. miejsce) i 7.13 u kobiet (10. miejsce), natomiast współczynnik umieralności odpowiednio 7.4 (10. miejsce) i 7.0 (8. miejsce). Ich udział w ogólnej liczbie zgonów spowodowanych nowotworami wynosił 2.6% u mężczyzn i 3.5% u kobiet [Wojciechowska i in. 2008]. Wraz z rozwojem technik diagnostycznych i większą ich dostępnością wzrasta liczba wykrywanych nowotworów mózgu. Zachorowalność na guzy nowotworowe mózgu na świecie wynosi w ciągu roku średnio 3.7 / 100 000 osób dla mężczyzn i 2.6 / 100 000 dla kobiet. Częstość występowania pierwotnych guzów mózgu waha się pomiędzy 3.0 a 5.8 na 100 000 osób rocznie dla mężczyzn i 2.1 a 4.1 na 100 000 dla kobiet, odpowiednio dla krajów rozwijających się i wysoko rozwiniętych [Ferlay i in. 2004]. Zachorowalność na guzy mózgu cechuje tendencja wzrostowa w ciągu ostatnich 20 lat (około 1% rocznie), szczególnie u osób w starszym wieku [Ohgaki i Kleihues 2005b, Makino i in. 2006, McKinley i in. 2000]. Pierwotne guzy mózgu są 10 razy rzadsze niż przerzuty z nowotworów złośliwych o ogniskach pierwotnych znajdujących się poza mózgiem [Patchell 2003].

Obserwuje się zróżnicowaną częstość występowania pierwotnych nowotworów OUN [CBTRUS 2007-2008]:

- glejaki (wszystkie postaci histologiczne) - 39%, w tym:
 - glioblastoma - 19% guzów pierwotnych i 51% wszystkich glejaków,
 - gwiaździaki - 8.5% guzów pierwotnych,
(GBM i gwiaździaki stanowią razem 75% wszystkich glejaków),
 - skąpodrzewiaki - 3% guzów pierwotnych
- oponiaki (wszystkie postaci histologiczne) - 32%,
- nerwiaki osłonkowe - 9%,
- gruczolaki przysadki - 8.4%,
- rdzeniaki / guzy embrionalne / PNET - 1.5%,
- chłoniaki - 2.8%.

Glejaki występują z częstością 3.55 do 5.7 przypadków na 100 000 osób, obejmując 60-70% pierwotnych guzów mózgu [Ohgaki i Kleihues 2005a]. Glejaki częściej występują u osób rasy kaukaskiej (z wyraźną predylekcją do obszarów uprzemysłowionych na terenie Europy, Ameryki, Australii, północnej Azji), niż pochodzenia azjatyckiego lub afrykańskiego [Ohgaki i Kleihues 2005a]. Można wyróżnić dwa szczyty wiekowe występowania glejaków wewnątrzczaszkowych – pierwszy w dzieciństwie [Peris-Bonet i in. 2006], a drugi – między 55 a 65 rokiem życia [Louis i in. 2002]. Glejaki są częstsze u mężczyzn niż u kobiet (odpowiednio 6.2 i 4.9 / 100 000) [Byrne i in. 1996, Daizo i in. 2003, Giles 1995]. Dokładne przyczyny wzrostu ilości glejaków u osób w starszym wieku nie są poznane, chociaż jedną z nich jest coraz większa dostępność diagnostyki neuroobrazowej. Wprowadzenie badania CT głowy na początku lat 70-tych oraz badania MRI głowy we wczesnych latach 80-tych zwiększyło wielkość populacji poddanej nieinwazyjnym badaniom mózgu [Mukerji i in. 2006, Ohgaki i Kleihues 2005a]. W tym czasie nastąpił również znaczny postęp w technice wykonywania biopsji stereotaktycznej dostarczającej tkankowego materiału diagnostycznego z jednoczesnym niewielkim odsetkiem powikłań związanym z ograniczonym uszkodzeniem mózgu. Postęp technologiczny połączony z agresywnym podejściem diagnostycznym u osób z ubytkowymi objawami neurologicznymi odegrały znaczną rolę w opisywanym wzroście występowania glejaków u ludzi starszych. W tej populacji częstość występowania pierwotnych guzów mózgu wykazuje zależność od płci – obserwuje się mniej przypadków glioblastoma multiforme (GBM) u kobiet niż u mężczyzn. Wydaje się, że estrogeny mogą mieć działanie protekcyjne [Kuratsu i Ushio 1996, Plunkett i in. 1999]. Pokazano również, że ryzyko wystąpienia GBM zwiększa się u kobiet w wieku postmenopauzalnym [McKinley i in. 2000].

4.1.2. Etiopatogeneza

Chociaż dokładne przyczyny występowania glejaków nie są znane uważa się, iż ważną rolę odgrywają tu zarówno czynniki nabyte, głównie środowiskowe, jak i wrodzone (genetyczne) [Daizo i in. 2003]. Z danych epidemiologicznych wynika, że ryzyko rozwoju glejaka mózgu może być związane z rodzajem wykonywanego zawodu. Zidentyfikowane czynniki ryzyka pierwotnych guzów mózgu obejmują ekspozycję na terapeutyczne promieniowanie jonizujące, chlorek winylu i pestycydy oraz zatrudnienie w przemyśle gumowym i przy rafinacji ropy naftowej. Takiego związku nie dowiedziono w przypadku palenia papierosów z filtrem, używania telefonów komórkowych oraz ekspozycji na diagnostyczne promieniowanie jonizujące, stałe pole elektromagnetyczne i formaldehyd [Wrensch i in. 2002]. Czynnikiem sprzyjającym rozwojowi glejaka mózgu są również urazy głowy [Henderson 2000] oraz palenie marihuany i picie dużej ilości kawy [Efird i in. 2004]. Ważne są też uwarunkowania genetyczne - rodzinne występowanie glejaków mózgu [Fitzgerald 2000, Fountaine i in. 2006, Van der Wiel 1960] i niektóre choroby dziedziczne (np. neurofibromatoza typu 1 i 2, stwardnienie guzowate, zespół Li-Fraumeni), które predysponują do rozwoju glejaka mózgu [Giles 1995]. W badaniu kohortowym wśród krewnych pierwszego stopnia pacjentów z rozpoznanymi guzami mózgu całkowite ryzyko wystąpienia guza mózgu o identycznej histopatologii jak probanda wzrastało 2-3-krotnie [Malmer i in. 2003].

Powszechnie wiadomo, że rozwój nowotworu jest efektem zachwiania mechanizmu kontroli ekspresji genów. Nagromadzenie mutacji DNA prowadzących do nadmiernej proliferacji komórek, braku starzenia komórkowego i apoptozy, nadmiernej angiogenezy, a niekiedy przerzutów skutkuje powstaniem guza [Louis 2006, Nupponen i Joensuu 2006, Ohgaki 2005]. Neuroektodermalne komórki pnia obecne w dorosłych mózgach ssaków, posiadające duży potencjał proliferacyjny i migracyjny, są wielokrotnie bardziej podatne na transformację nowotworową niż dojrzałe astrocyty. Jest to wynik mutacji DNA tych komórek prowadzący do powstania pierwotnych guzów mózgu [Nupponen i Joensuu 2006, Ohgaki 2005]. Dotychczas znaleziono wiele czynników transformujących komórki prekursorowe do glejaków [Ohgaki 2005]. Mutacje genu p53 pojawiają się głównie w trakcie transformacji złośliwej, a rzadziej podczas złośliwienia glejaków [Biernat 1999, Nupponen i Joensuu 2006]. Występują głównie w gwiaździakach dyfuzyjnych od II do IV stopnia złośliwości z częstotnością

24-34%. Niekiedy są obserwowane w guzach o ograniczonym wzroście. Powodują one nadekspresję receptora PDGF. W około 50% przypadków GBM obserwowano zmiany w genie EGFR. Najczęściej jest to amplifikacja, występująca w 30-60% glejaków złośliwych, a rzadziej obserwowana w glejakach o niskim stopniu złośliwości [Biernat 1999, Halatsch i in. 2006, Huang i in. 2007, Nupponen i i Joensuu 2006, Tsatas i in. 2002, Weiner 1995]. W subpopulacjach komórek glejaka o tej samej złośliwości można stwierdzić różny stopień amplifikacji tego onkogenu [Biernat 1999, Huang i in. 2007]. Mutacje PTEN obserwowano w 25-44% przypadków GBM i w 18-23% AA, ale nie w nisko złośliwych glejakach. Mutacje PTEN i delecje chromosomu 10 charakteryzują progresję skąpodrzewiaków [Baeza i in. 2003, Biernat 1999]. W guzach glejowych obserwuje się LOH w ramieniu krótkim lub długim chromosomu 10, bądź delecję całego chromosomu 10, a także LOH części chromosomów 19, 22, 17 i krótkiego ramienia chromosomu 11. Utrata fragmentu chromosomu 19 występuje u ok. 40% gwiaździaków, głównie o wysokim stopniu złośliwości [Nupponen i Joensuu 2006]. Często występująca aberracja w skąpodrzewiakach jest wynikiem utraty heterozygotyczności ramienia krótkiego chromosomu 1 i ramienia długiego chromosomu 19 (LOH 1p/19q). Występuje ona w 40-80% tych guzów. LOH 1p/19q pojawia się również z podobną częstotliwością w skąpodrzewiakogwiaździakach mieszanych [Engelhard i in. 2002, Louis 2006]. W GBM poziom VEGF jest 50-krotnie wyższy w porównaniu z prawidłowymi tkankami mózgu. Występuje on głównie w komórkach tworzących pseudopalisady otaczające strefy martwicy [Brat i van Meir 2001, Seock-Im i in. 1999]. Silne unaczynienie tych guzów jest wynikiem angiogenezy, wynikającej z nadekspresji VEGF, proporcjonalnej do stopnia złośliwości guza. VEGF jest m.in. odpowiedzialny za uszkodzenie bariery krew-mózg i wynikający z niego obrzęk okołoguzowy oraz za indukcję ekspresji angiopoetyny 2 [Harrigan 2003, Wesseling i in. 1997, Zagzag i in. 2000].

4.1.3. Klasyfikacja guzów mózgu

Podstawowym kryterium diagnostycznym i prognostycznym w neuroonkologii jest obraz histopatologiczny i cytogenetyczny, aktywność proliferacyjna i przebieg kliniczny nowotworu. Wskazują one na stopień złośliwości guza. Złośliwy (anaplastyczny) nowotwór charakteryzuje się:

- polimorfizmem i atypią komórek oraz wysoką aktywnością mitotyczną,
- dużą gęstością komórek w utkaniu nowotworowym i zaburzeniem architektury tkankowej,
- naciekającym typem rozrostu,
- obecnością ognisk martwicy,
- rozrostem naczyń krwionośnych (neoangiogeneza).

Guzy OUN o stopniach złośliwości I i II cechują się stosunkowo łagodnym przebiegiem, III jest złośliwy, a IV wysoko złośliwy (Tab. 1).

Tabela 1. Stopnie złośliwości biologicznej nowotworów ośrodkowego układu nerwowego [Kleihues i in. 1995].

Stopień złośliwości (Grade)	Złośliwość nowotworu	Przeżycie po operacji	Mikroskopowo
I	niezłośliwy	≥ 5 lat lub całkowite wyleczenie	zróżnicowane komórki przypominające prawidłowe utkanie tkankowe
II	względnie niezłośliwy	3-5 lat	duża gęstość komórkowa
III	względnie złośliwy	2-3 lata	cechy II i wysoki indeks mitotyczny
IV	złośliwy	6-15 miesięcy	cechy II i III oraz proliferacja naczyń i/lub martwica

W praktyce klinicznej, poza złośliwością biologiczną nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, wyróżnia się również złośliwość wynikającą z lokalizacji, nawet łagodnego biologicznie nowotworu, w okolicy niedostępnej operacyjnie, np. w pniu mózgu.

Ze względu na dużą różnorodność guzów mózgu ich systematyka nie jest jednoznaczna. Pierwsza klasyfikacja guzów OUN została opracowana przez WHO w 1979, natomiast jej ostatnią aktualizację przeprowadzono w 2007 roku (Tab. 2) [Louis i in. 2007a]. Podział ten opiera się na histologicznej ocenie typów komórek nowotworowych z wykorzystaniem konwencjonalnej mikroskopii optycznej, immunohistochemii oraz badań cytogenetycznych. Diagnostyka histopatologiczna obejmuje klasyfikację typu nowotworu w systematyce histologicznej (ang. *typing*) oraz określenie stopnia biologicznej złośliwości (ang.

grading) i stanu zaawansowania procesu nowotworowego w klasyfikacji TNM (ang. *staging*). Polega ona na ocenie mikroskopowej barwionych preparatów z uwzględnieniem danych klinicznych (wiek, płeć, wywiad), wyników badań neuroradiologicznych oraz opisu zabiegu operacyjnego. Morfologiczna analiza charakterystycznych zmian cech fenotypowych obserwowanych w mikroskopie świetlnym umożliwia prawidłowe rozpoznanie w 90% przypadków. Dodatkowych informacji dostarcza immunohistochemia, mikroskopia elektronowa i morfometria. Ograniczeniem diagnostyki histopatologicznej jest brak danych klinicznych (dotyczących lokalizacji nowotworu oraz wieku i płci pacjenta), błędy techniczne w utrwalaniu materiału lub zbyt mała jego ilość, użycie koagulacji podczas zabiegu operacyjnego oraz niereprezentatywna próbka materiału.

Tabela 2. Klasyfikacja histologiczna nowotworów ośrodkowego układu nerwowego wg WHO [Louis i in. 2007a].

TUMORS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE**Astrocytic tumours**

Pilocytic astrocytoma
 - Piloxyoid astrocytoma
 Subependymal giant cell astrocytoma
 Pleomorphic xanthoastrocytoma
 Diffuse astrocytoma
 - Fibrillary astrocytoma
 - Gemistocytic astrocytoma
 - Protoplasmic astrocytoma
 Anaplastic astrocytoma
 Glioblastoma
 - Giant cell glioblastoma
 - Gliosarcoma
 Gliomatosis cerebri

Oligodendroglial tumours

Oligodendroglioma
 Anaplastic oligodendroglioma

Oligoastrocytic tumours

Oligoastrocytoma
 Anaplastic oligoastrocytoma

Ependymal tumours

Subependymoma
 Myxopapillary ependymoma
 Ependymoma
 - Cellular
 - Papillary
 - Clear cell
 - Tanycytic
 Anaplastic ependymoma

Choroid plexus tumours

Choroid plexus papilloma
 Atypical choroid plexus papilloma
 Choroid plexus carcinoma

Other neuroepithelial tumours

Astroblastoma
 Choroid glioma of the third ventricle
 Angiocentric glioma

Neuronal and mixed neuronal-glia tumours

Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)

Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioglioma
 Dysembryoplastic neuroepithelial tumour
 Gangliocytoma
 Ganglioglioma
 Anaplastic ganglioglioma
 Central neurocytoma
 Extraventricular neurocytoma
 Cerebellar liponeurocytoma
 Papillary glioneuronal tumour [PGNT]
 Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle
 Paraganglioma

Tumours of the pineal region

Pineocytoma
 Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation
 Pineoblastoma
 Papillary tumour of the pineal region [PTPR]

Embryonal tumours

Medulloblastoma
 - Desmoplastic/nodular medulloblastoma
 - Medulloblastoma with extensive nodularity
 - Anaplastic medulloblastoma
 - Large cell medulloblastoma
 CNS primitive neuroectodermal tumour
 - CNS Neuroblastoma
 - CNS Ganglioneuroblastoma
 - Medulloepithelioma
 - Ependymblastoma
 Atypical teratoid/rhabdoid tumour

TUMOURS OF CRANIAL AND PARASPINAL NERVES

Schwannoma (neurilemoma, neurinoma)
 - Cellular
 - Plexiform
 - Melanotic
 Neurofibroma
 - Plexiform
 Perineurinoma
 - Perineurinoma, NOS
 - Malignant perineurinoma

Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)

- Epithelioid MPNST
- MPNST with mesenchymal differentiation
- Melanotic MPNST
- MPNST with glandular differentiation

TUMOURS OF THE MENINGES

Tumours of meningotheial cells

Meningioma

- Meningothelial
- Fibrous (fibroblastic)
- Transitional (mixed)
- Psammomatous
- Angiomatous
- Microcystic
- Secretory
- Lymphoplasmacyte-rich
- Metaplastic
- Chordoid
- Clear cell
- Atypical
- Papillary
- Rhabdoid
- Anaplastic (malignant)

Mesenchymal tumours

Lipoma

Angiolipoma

Hibernoma

Liposarcoma

Solitary fibrous tumour

Fibrosarcoma

Malignant fibrous histiocytoma

Leiomyoma

Leiomyosarcoma

Rhabdomyoma

Rhabdomyosarcoma

Chondroma

Chondrosarcoma

Osteoma

Osteosarcoma

Osteochondroma

Haemangioma

Epithelioid haemangioendothelioma

Haemangiopericytoma

Anaplastic haemangiopericytoma

Angiosarcoma

Kaposi sarcoma

Ewing sarcoma (PNET)

Primary melanocytic lesions

Diffuse melanocytosis

Melanocytoma

Malignant melanoma

Meningeal melanomatosis

Other neoplasms related to the meninges

Haemangioblastoma

LYMPHOMAS AND HAEMATOPOIETIC NEOPLASMS

Malignant lymphomas

Plasmocytoma

Granulocytic sarcoma

GERM CELL TUMOURS

Germinoma

Embryonal carcinoma

Yolk sac tumour

Choriocarcinoma

Teratoma

- Mature

- Immature

- Teratoma with malignant transformation

Mixed germ cell tumour

TUMOURS OF THE SELLAR REGION

Craniopharyngioma

- Adamantinomatous

- Papillary

Granular cell tumour

Pituicytoma

Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis

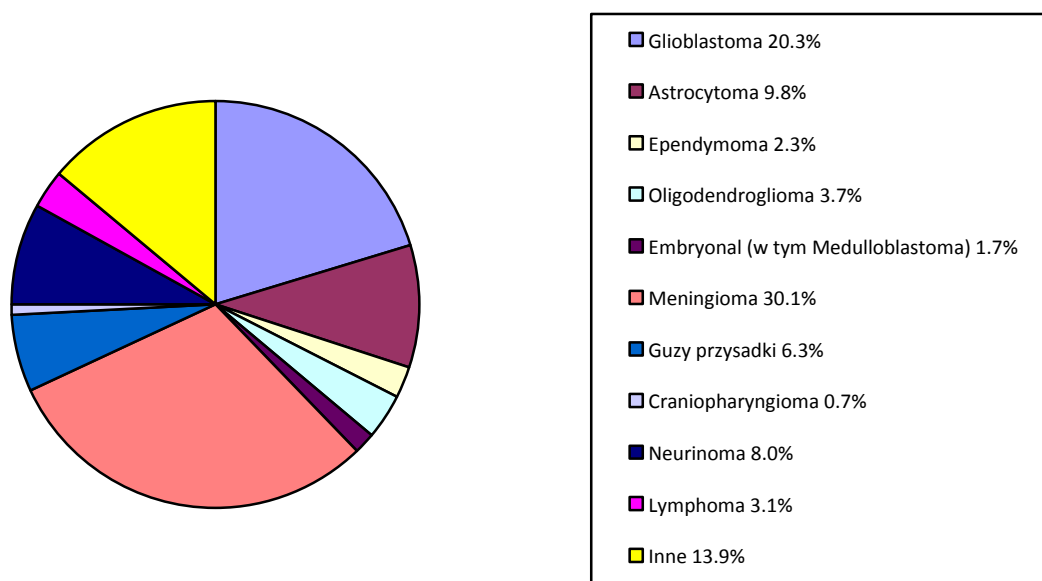
METASTATIC TUMOURS

WHO Grading of Tumours of the Central Nervous System

	I	II	III	IV
Astrocytic tumours				
Subependymal giant cell astrocytoma	●			
Pilocytic astrocytoma	●			
Pilomyxoid astrocytoma		●		
Diffuse astrocytoma		●		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		●		
Anaplastic astrocytoma			●	
Glioblastoma				●
Giant cell glioblastoma				●
Gliosarcoma				●
Oligodendroglial tumours				
Oligodendroglioma		●		
Anaplastic oligodendroglioma			●	
Oligoastrocytic tumours				
Oligoastrocytoma		●		
Anaplastic oligoastrocytoma			●	
Ependymal tumours				
Subependymoma	●			
Myxopapillary ependymoma	●			
Ependymoma		●		
Anaplastic ependymoma			●	
Choroid plexus tumours				
Choroid plexus papilloma	●			
Atypical choroid plexus papilloma		●		
Choroid plexus carcinoma			●	
Other neuroepithelial tumours				
Angiocentric glioma	●			
Choroid glioma of the third ventricle		●		
Neuronal and mixed neuronal-glia tumours				
Gangliocytoma	●			
Ganglioglioma	●			
Anaplastic ganglioglioma			●	
Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioglioma	●			
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	●			

Central neurocytoma		●		
Extraventricular neurocytoma		●		
Cerebellar liponeurocytoma		●		
Paraganglioma of the spinal cord	●			
Papillary glioneuronal tumour [PGNT]	●			
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	●			
Pineal tumours				
Pineocytoma	●			
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation		●	●	
Pineoblastoma				●
Papillary tumour of the pineal region [PTPR]		●	●	
Embryonal tumours				
Medulloblastoma				●
CNS primitive neuroectodermal tumour				●
Atypical teratoid/rhabdoid tumour				●
Tumours of the cranial and paraspinal nerves				
Schwannoma	●			
Neurofibroma	●			
Perineurinoma	●	●	●	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		●	●	●
Meningeal tumours				
Meningioma	●			
Atypical meningioma		●		
Anaplastic/malignant meningioma			●	
Haemangiopericytoma		●		
Anaplastic haemangiopericytoma			●	
Haemangioblastoma	●			
Tumours of the sellar region				
Craniopharyngioma	●			
Granular cell tumour of the neurohypophysis	●			
Pituicytoma	●			
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	●			

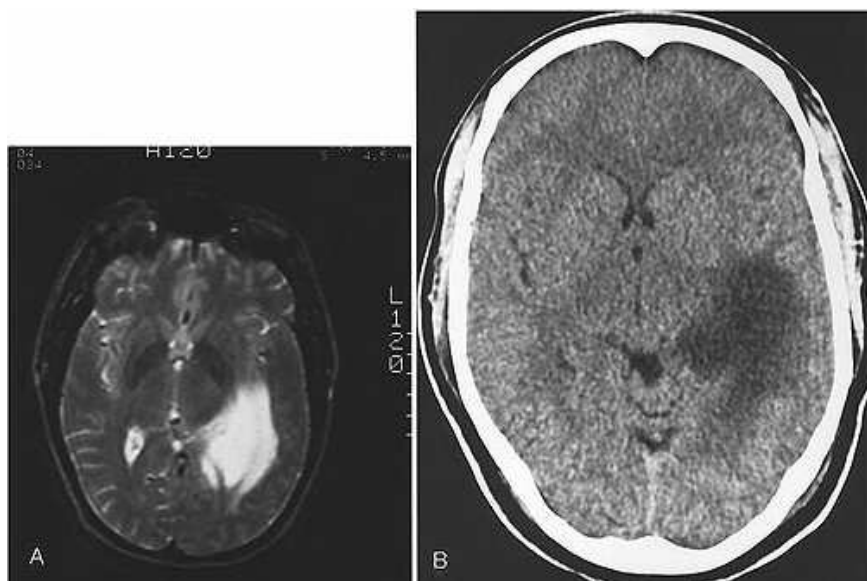
4.1.4. Charakterystyka wybranych nowotworów OUN



Rycina 1. Procentowy udział poszczególnych rodzajów pierwotnych guzów mózgu. Glejaki stanowią w sumie 40% tych nowotworów i 78% wszystkich złośliwych guzów mózgu [CBTRUS 2005].

Glejaki (ang. *glioma*)

Glejaki są guzami pochodzenia neuroepitelialnego, wywodzącymi się z prekursorów komórek glejowych. Stanowią ok. 40% pierwotnych guzów wewnątrzczaszkowych (Ryc. 1). Z punktu widzenia klinicznego, stosuje się podział na glejaki niskiego stopnia złośliwości (ang. *low grade gliomas*, LGG) - występujące w I i II stopniu biologicznej złośliwości wg WHO oraz wysokiego stopnia złośliwości (ang. *high grade gliomas*, HGG) - klasyfikowane jako guzy w III i IV stopnia złośliwości biologicznej wg WHO [Behin i in. 2003, Nutt i in. 2003, Zagzag i in. 2000]. Pojęcie „łagodność” czy „złośliwość” w stosunku do nowotworów rozrastających się w obrębie mózgu w sposób naciekający, bez wyraźnych granic, dotyczy tylko stopnia dojrzałości i zróżnicowania komórek nowotworowych oraz rokowania po zastosowanym leczeniu. Nie stosuje się tu kryteriów ogólnie przyjętych w onkologii. Wokół guza unaczynienie jest uboższe, mniejsze są: martwica komórkowa, pleocytoza i obrzęk. LGG wzrastają wolniej niż HGG, często tworzą torbiele, naciekają otoczenie. Mogą ulegać transformacji blastycznej do IV stopnia WHO włącznie, przechodząc w GBM [Mossakowski i Liberski 1997]. Początkowy etap wzrostu glejaka jest zwykle bezobjawowy, gdyż naciekający nowotwór nie zaburza czynności mózgu i nie zwiększa ciśnienia wewnątrzczaszkowego (Ryc. 2).



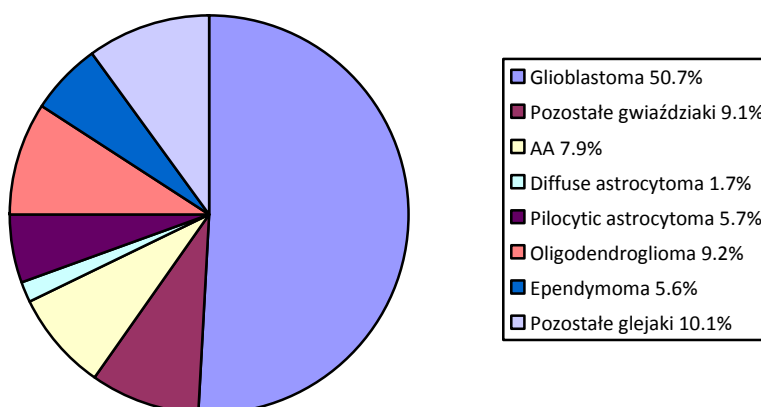
Rycina 2. Obrazy radiologiczne glejaka. **A** - obraz MRI w płaszczyźnie osiowej, w czasie T2, wykazuje naciekającą masę w istocie białej okolicy skroniowo-ciemieniowej lewej, powodującą regionalny wzrost ciśnienia - zaciśnięcie rogu potylicznego komory bocznej i spłaszczenie zakrętów w okolicy ciemieniowo-potylicznej, **B** – obraz CT u tego samego pacjenta przedstawia obszar o niskiej gęstości umiejscowiony dokładnie tak samo jak w badaniu MRI. Obrazy w obu tych badaniach są typowe dla gwiazdziaka w I lub II stopniu biologicznej złośliwości [Żukiel i Nowak 2002].

Gwiazdziaki (ang. *astrocytoma*)

Astrocytoma wywodzą się z gleju gwiaździstego i stanowią ok. 75% wszystkich glejaków (Ryc. 3). Najczęściej występują w przedziale 30-60 r.ż., głównie u mężczyzn. Poza gwiazdziakiem włosowatokomórkowym (ang. *astrocytoma pilocyticum*), obserwowanym w podwzgórzu, nerwie wzrokowym i mózdzku (głównie u dzieci), który po całkowitym usunięciu operacyjnym nie odrasta, pozostałe typy mają złe rokowanie. Najczęściej następują wznowy, które przekształcają się w postaci bardziej złośliwe do glejaka wielopostaciowego (GBM) włącznie [Greenberg 2006]. Podstawą rozpoznania klinicznego jest rezonans magnetyczny z podaniem środka kontrastującego wskazujący na charakterystyczne cechy LGG lub HGG.

Glejaki astrocytarne można podzielić na dwie większe grupy w oparciu o zakres naciekania i ich transformację w bardziej złośliwe guzy. Pierwsza, większa grupa składa się z dyfuzyjnych guzów astrocytarnych o naciekającym, rozlanym wzroście. Nowotwory te cechuje wysoka zdolność do inwazji z infiltracją poza makroskopowy obszar guza oraz znaczny potencjał progresyjny. Zaliczamy do nich: *astrocytoma diffusum* (WHO II i III), *oligodendroglioma* (WHO II i III), *glioblastoma* (WHO IV) i *gliomatosis cerebri* [Kleihues i in. 2002]. Druga grupa obejmuje guzy, które mają mniejszy potencjał inwazyjny i mniejszą

zdolność do złośliwej transformacji. Cechują się ograniczonym wzrostem ogniskowym i mniej agresywnym zachowaniem, co wyklucza ich klasyfikację z innymi, bardziej naciekającymi glejakami. Należą do nich: *pilocytic astrocytoma* (WHO I), *pleomorphic xanthoastrocytoma* (WHO II), *gangliocytoma* (WHO I), *astroblastoma* i *ependymoma*, *dysembryoplastic neuroepithelial tumor* (WHO I), *subependymoma* (WHO I), *central neurocytoma* (WHO II), *haemangioblastoma* (WHO I), *pituicytoma* (WHO I), *choroid plexus papilloma* (WHO I), *hypothalamic neuronal hamartoma*.



Rycina 3. Procentowy udział poszczególnych rodzajów glejaków. Gwiaździaki, w tym glioblastoma, stanowią w sumie 75% tych nowotworów [CBTRUS 2000-2004].

Wskazaniami do leczenia operacyjnego w przypadku LGG są: torbielowaty guz mózdzku (najczęściej u dzieci), nadnamiotowy gwiaździak włosowato komórkowy, duży guz dający efekt masy (cechy wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkowego z ryzykiem wklonowania oraz neurologiczne objawy ubytkowe spowodowane uciskiem guza), guz powodujący obturacyjne wodogłowie wynikające z zamknięcia głównych dróg przepływu płynu mózgowo-rdzeniowego oraz guz objawiający się padaczką.

W przypadku glejaków wysokozłośliwych (HGG) operacja chirurgiczna ma na celu zmniejszenie masy guza i stanowi przygotowanie do uzupełniającej radioterapii. W przypadkach wątpliwych co do rodzaju uszkodzenia wykonywana jest biopsja stereotaktyczna z następujących wskazań:

- lokalizacja guza w okolicach niedostępnych operacyjnie,
- duże ryzyko uszkodzenia czynności danego obszaru mózgu podczas klasycznej operacji,
- ogniska mnogie,

- rozległy nowotwór,
- niewielki guz z minimalnymi objawami ubytkowymi,
- rozstrzygnięcie wątpliwości co do natury procesu nowotworowego i jego złośliwości,
- zły stan ogólny chorego, nie pozwalający na dużą operację w znieczuleniu ogólnym.

Gwiaździak anaplastyczny (ang. *anaplastic astrocytoma*, AA)

Gwiaździak anaplastyczny (WHO III) występuje głównie u osób dorosłych [Louis i in. 2007b]. Stanowi około 4 % wszystkich złośliwych guzów OUN, a częstość nowych zachorowań wynosi 3 na 100 000 osób rocznie. Szczyt zachorowań obserwuje się pomiędzy 45 a 69 r.ż. W tym przedziale wiekowym zachorowalność jest większa i wynosi od 5 do 7 na 100 000. Częściej występuje u mężczyzn [Stupp i in. 2007]. Średni czas przeżycia leczonych chorych wynosi od 30 do 40 miesięcy [Chang i in. 2001, Lin i in. 2003]. Jednak czas przeżycia do 1 roku dotyczy około 43% chorych, a tylko 16% przeżywa ponad 5 lat. Czynniki prognostycznymi są: wiek, czas trwania objawów, stan chorego (KPS) i zakres resekcji guza [Stupp i in. 2007]. W badaniu histopatologicznym AA wykazuje cechy odróżnicowania: anaplazję, dużą gęstość komórkową i liczne mitozy. Nie występują, charakterystyczne dla GBM, martwica pseudopalisadowa i proliferacje endotelialne. Nie jest również widoczna granica pomiędzy prawidłowym mózgiem a guzem [Lewis 1995, Louis i in. 2007b]. AA występuje głównie nadnamiotowo, w półkulach mózgu. W badaniach CT i MRI guzy te charakteryzują się nieregularnym kształtem, wzmocnieniem kontrastowym i często centralną martwicą. W badaniu CT są zwykle hipodensyjne, natomiast w badaniach MRI hipointensywne w sekwencjach T1, a hiperintensywne w sekwencjach T2. Gwiaździaki te zwykle otoczone są strefą obrzęku [Henson i in. 2005, Stupp i in. 2007].

Glejak wielopostaciowy (ang. *glioblastoma multiforme*, GBM)

Glejak wielopostaciowy (WHO IV) jest najbardziej złośliwym nowotworem ośrodkowego układu nerwowego (Ryc. 4 i 5) i najczęściej występującym pierwotnym guzem mózgu u dorosłych. Stanowi ok. 50% guzów glejowych [Cervoni i in. 1998, Kraus i in. 2000, Mineo i in. 2002] i 20% wszystkich operowanych guzów wewnątrzczaszkowych. Występuje z częstością 3.5 przypadków na 100 000 w ciągu roku. GBM zajmuje czwarte miejsce wśród nowotworów powodujących zgon wśród ludzi w średnim wieku. Rzadko występuje u dzieci stanowiąc od 3% do 6.5% wszystkich guzów śródczaszkowych w tej grupie wiekowej.



Rycina 4. Obraz MRI w płaszczyźnie osiowej przedstawia obecność guza w istocie białej, umiejscowionego głęboko w lewej półkuli, wzmacniającego się intensywnie na obwodzie, z niską gęstością w środku („pstra martwica”) oraz towarzyszącym obrzękiem. Są to charakterystyczne cechy glejaka wielopostaciowego [Żukiel i Nowak 2002].

Rokowanie u pacjentów z GBM jest bardzo złe. Średni czas przeżycia wynosi od 6 do 12 miesięcy [Phuphanich i in. 1993, Puzzilli i in. 1998, Scott i in. 1999], a tylko około 3-5% chorych przeżywa ponad 3 lata [Krex i in. 2007], natomiast ponad 5-letnie okresy przeżycia należą do rzadkości [Reis i in. 2001, Walker i Pamphlett 1999]. Czas przeżycia po resekcji wynosi około 12 miesięcy z zastosowaniem radio- i chemioterapii [Mineo i in. 2007, Utsuki i in. 2006]. Spośród czynników mających wpływ na długość przeżycia pacjenta z GBM wymienia się: wiek < 45 r.ż., stan pacjenta przed zabiegiem (KPS > 80), zakres resekcji guza, stopień martwicy w przedoperacyjnym badaniu MRI, mała liczba mitoz, indeks proliferacyjny MIB-1 4-10%, rozpoznanie wtórnego glejaka wielopostaciowego i olbrzymiokomórkowego, brak amplifikacji EGFR, delecje (1p i 19q), mutacje genu p53, radio- i chemioterapia po zabiegu operacyjnym [Brandes i Fiorentino 1998, Hulshof i in. 2001, Lacroix i in. 2001, Laws i in. 2003, Morita i in. 1996, Scott i in. 1998, Scott i in. 1999, Senger i in. 2003, Shrieve i in. 1999, Yung 2000, Yung i in. 2000]. Wieloletnie przeżycia powyżej 5 lat są bardzo rzadkie i dotyczą 1-5% chorych [Cervoni i in. 1998, Chandler i in. 1993, McLendon i Halperin 2003, Morita i in. 1996, Puzzilli i in. 1998, Sabel i in. 2001, Senger i in. 2003, Vertosick i Selker 1992].

Dla GBM dominuje lokalizacja nadnamiotowa w obrębie półkul mózgu. Podnamiotowo GBM najczęściej umiejscawia się w pniu mózgu, a stosunkowo rzadko w obrębie mózdzku [Cokgor i in. 1998]. Przerzuty GBM poza OUN są rzadkie i obejmują mniej niż 0.5%

przypadków [Grief i in. 1998, Healey i Davis 1998, Walker i Pamphlett 1999]. GBM cechuje się [Scott i in. 1998, Shinojima i in. 2004]:

- zmiennym utkaniem histologicznym i cytologicznym, również w obrębie tego samego guza,
- występowaniem obszarów martwicy otoczonych strefami pseudopalisad,
- dynamiczną angiogenezą z proliferacją śródbłonek naczyń,
- występowaniem gemistocytarnych astrocytów.



Rycina 5. Przekrój mózgu w płaszczyźnie wieńcowej wykazuje wgłobienia i przemieszczenia mózgu spowodowane olbrzymim glejakiem wielopostaciowym prawej półkuli. Zakręt obręczy przemieszczony jest na lewą stronę (wgłobienie pod sierp), nowotwór nacieka i przemieszcza spoidło wielkie, zaciska i deformuje układ komorowy, powoduje również wgłobienie hipokampa pod namiot. [Żukiel i Nowak 2002].

U większości chorych z GBM proces transformacji nowotworowej związany jest z mutacją genu p53. Guz rozwija się w obrębie gwiazdzika włóknkowego lub gemistocytarnego (glejak wielopostaciowy wtórny). Powstanie GBM może wiązać się z utratą heterozygotyczności (LOH) w chromosomie 10q lub amplifikacją EGFR bądź MDM2. Drugi rodzaj GBM (glejak wielopostaciowy pierwotny) nie zależy od mutacji genu p53 i ulega transformacji złośliwej bezpośrednio do GBM. Guzy te charakteryzują się LOH dla chromosomu 10, 19q lub 17p [Mineo i in. 2002, Schmidt i in. 2002, Senger i in. 2003].

Skąpodrzewiak (ang. *oligodendroglioma, O*)

Skąpodrzewiaki (Ryc. 6) są dobrze zróżnicowanymi nowotworami o małej aktywności mitotycznej. Częstość ich występowania wynosi 2-5% pierwotnych guzów mózgu, co daje im trzecie miejsce wśród glejaków (4-15%) [Engelhard 2002, Engelhard i in. 2002, Engelhard i in. 2003]. Średni wiek pojawienia się objawów chorobowych wynosi ok. 40 lat. Stwierdzono dwukrotnie większą częstość ich występowania u kobiet w stosunku do mężczyzn. Skąpodrzewiaki w 90% występują nadnamiotowo, najczęściej w obrębie płatów czołowych.

Mniej niż 10% występuje w tylnej jamie czaszki i rdzeniu kręgowym [Engelhard i in. 2003, Nadkarni i in. 2005]. Guzy te w 1-2% przypadków mogą rozprzestrzeniać się drogą płynu mózgowo-rdzeniowego [Engelhard i in. 2003]. Znane są również przypadki (około 5%) przerzutów do płuc lub opłucnej, kości, wątroby, otrzewnej, ślinianki, występujące głównie w anaplastycznej postaci skąpodrzewiaka [Al-Ali i in. 2005, Ng i in. 2006]. Czynnikiem sprzyjającym powstawaniu przerzutów jest dłuższy niż w innych złośliwych glejakach czas przeżycia wynoszący ok. 109 miesięcy w skąpodrzewiaku anaplastycznym [Hamlat i in. 2005].



Rycina 6. Obraz CT z kontrastem wykazuje obecność guza w lewej okolicy ciemieniowej z ogniskiem zwapnienia, oraz towarzyszącym obrzękiem. Pooperacyjne badanie histologiczne – skąpodrzewiak [Żukiel i Nowak 2002].

Podstawą leczenia jest makroskopowo doszczętna resekcja nowotworu. Mimo obserwowanej niekiedy w badaniach obrazowych granicy guza rozprzestrzeniającej się poprzez naciekanie zazwyczaj trudno jest go usunąć w całości. Można zastosować odbarczenie wewnętrzne usuwając, poza guzem, sąsiadujący z nim biegun płata skroniowego lub czołowego. Pozytywne aspekty późniejszej radioterapii dla skąpodrzewiaków są słabiej udokumentowane niż dla gwiaździaków.

Z guzów pochodzących z gleju skąpowypustkowego, 23% stanowią postacie anaplastyczne (WHO III) posiadające bardziej złośliwy fenotyp, dużą heterogenność z ogniskami martwicy, proliferacje mikronaczyniowe i zwiększone ryzyko krwawienia do guza oraz większą aktywność mitotyczną. Podobnie jak nowotwory o niższej złośliwości mogą posiadać zwapnienia [Engelhard i in. 2003, Whitmore i in. 2007].

Skąpodrzewiakogwiaździak (ang. *oligoastrocytoma, OA*)

Skąpodrzewiakogwiaździaki występują najczęściej u dorosłych mężczyzn ze szczytem zapadalności w okresie 35 - 45 r.ż.. Lokalizują się głównie w płacie czołowym i skroniowym [Beckmann i Prayson 1997]. Manifestują się zwykle napadami padaczkowymi [Behin i in. 2003]. W postaciach klasyfikowanych w II stopniu złośliwości średni czas przeżycia wynosi około 6.3 roku, a 10 lat przeżywa do 32% chorych. Rokowanie i częstość występowania OA są zbliżone do skąpodrzewiaka anaplastycznego [Shaw i in. 1994].

Skąpodrzewiakogwiaździak anaplastyczny (WHO III) jest nowotworem mieszanym o utkaniu histologicznym podobnym do skąpodrzewiaków i gwiaździaków. Obie komponenty są wyraźnie rozróżnialne i mogą być od siebie oddzielone. W badaniu mikroskopowym ujawniają się typowe cechy złośliwości, takie jak: pleomorfizm, atypie jądrowe, duża gęstość komórkowa i liczne mitozy. Można zaobserwować również proliferacje mikronaczyniowe i ogniska martwicy, których obecność utrudnia rozpoznanie różnicowe z GBM [Kleihues i in. 2002].

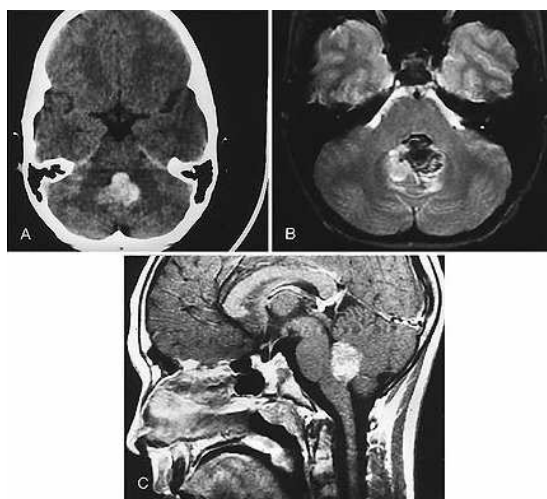
Wyściółczak (ang. *ependymoma*)

Jest to rzadszy typ glejaka mózgu obejmujący ok. 1% guzów wewnątrzczaszkowych. Rozrasta się wolno, jest dość dobrze ograniczony. W 60% występuje podnamiotowo, w okolicy dna komory IV, a nadnamiotowo zwykle w okolicy komory bocznej i tylnej części komory III. Takie umiejscowienie powoduje ucisk na główne drogi przepływu płynu mózgowo-rdzeniowego i sprzyja powstawaniu wodogłowia. Znane są przypadki przerzutów nowotworu przez drogi płynowe (zwłaszcza w przypadkach złośliwych). 1/3 wyściółczaków nadnamiotowych daje napady padaczkowe. Wyrastając ze ściany komory penetruje zarówno w jej głąb, jak i w otaczające tkanki mózgu. Utrudnia krążenie płynu mózgowo-rdzeniowego i przyczynia się w ten sposób do wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkowego. Pozostałą po niecałkowitym usunięciu operacyjnym część guza można zniszczyć promieniowaniem gamma, gdyż jest to nowotwór bardzo podatny na radioterapię, w odróżnieniu od innych glejaków [Gabryel i Szymaś 1991, Mossakowski i Liberski 1997].

Prymitywne guzy neuroektodermalne (ang. *primitive neuroectodermal tumor, PNET*)

Guzy te wywodzą się z pozostałości embrionalnych [Beigel i in. 1989, Dumas-Duport i in. 1988]. Ich przedstawicielem jest: rdzeniak (ang. *medulloblastoma*) występujący najczęściej u dzieci [Allen i Epstein 1982]. Lokalizuje się on w różnych częściach mózgowia,

głównie w tylnej jamie czaszki zajmując IV komorę, półkule mózdzku, a niekiedy również pień mózgu. Zajmując drogi płynowe wczesnie wywołuje objawy wzmożonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego spowodowanego wodogłowiem niekomunikującym (Ryc. 7). Rozprzestrzenia się poprzez płyn mózgowo-rdzeniowy i jego przerzuty mogą umiejscawiać się zarówno w korze półkul mózgu, jak i w kanale kręgowym. Całkowite operacyjne usunięcie rdzeniaka nie jest możliwe i dlatego po interwencji neurochirurgicznej należy zastosować radio- i chemioterapię [Berger i in. 1983].



Rycina 7. Medulloblastoma u 11-letniego chłopca. **A** – CT w płaszczyźnie osiowej – guz z ogniskami krwawień w IV komorze stanowi przeszkodę dla odpływu płynu mózgowo-rdzeniowego, **B** – MRI T2 w tej samej projekcji, **C** – MRI T1 w płaszczyźnie strzałkowej wykazuje wzmocnienie po podaniu kontrastu [Żukiel i Nowak 2002].

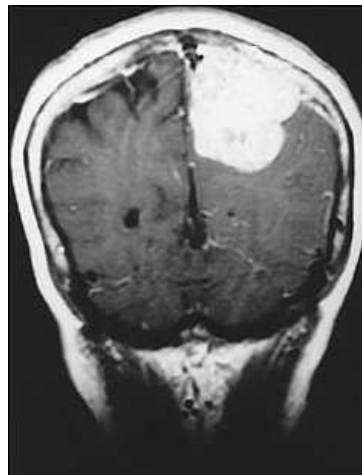
Oponiaki (ang. meningioma)

Oponiaki są drugą największą (18% przypadków) podgrupą pierwotnych nowotworów wewnątrzczaszkowych. Częściej występują u kobiet, w piątej i szóstej dekadzie życia, niekiedy rodzinnie. Powstają z komórek ziarnistości pajęczynówki. Zazwyczaj zlokalizowane są [Cushing i Eisenhardt 1938, Yamashita i in. 1980]:

- przystrzałkowo > 20%,
- na sklepiści mózgu 15-20%,
- nadsiodłowo 10-13%,
- na skrzydle kości klinowej 12-20%,
- w okolicy rynienki węchowej ok. 10%,
- przylegając do sierpa mózgu 8%,
- w środkowym dole czaszki < 5%,
- w świetle komory bocznej < 5%,

- na namiocie mózdzku ok. 3-4%,
- wewnątrzczodołowo ok. 1%,
- w kanale kręgowym ok. 1 %,
- w szczelinie Sylwiusza < 1%,
- zewnątrzczaszkowo < 1%,
- w tylnej jamie czaszki < 10%,
- guzy mnogie ok. 1%.

Oponiaki rosną wolno, bez naciekania otaczającej tkanki, jednakże uciskając i przemieszczając mózg. Niekiedy rozrastają się płasko (*en-plaque*) na powierzchni mózgu. Powolny wzrost pozwala na stopniową adaptację mózgu lub rdzenia kręgowego do zwiększającej się patologicznej masy i dlatego mogą one osiągnąć znaczne rozmiary zanim u chorego pojawią się objawy ogniskowego uszkodzenia OUN (Ryc. 8).



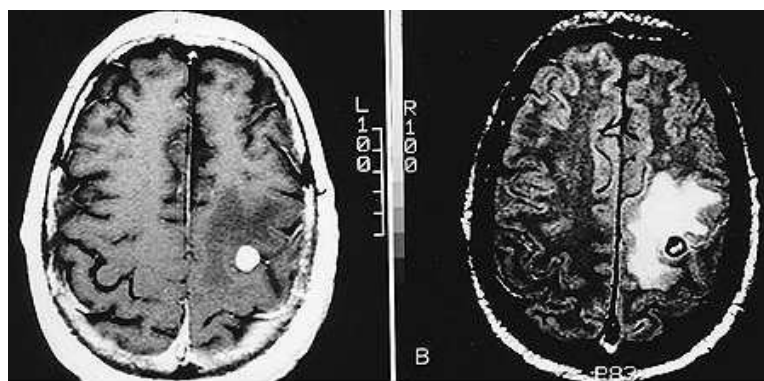
Rycina 8. Duży oponiak przystrzałkowy w lewej okolicy ciemieniowej [Żukiel i Nowak 2002].

Guzy okolicy siodła tureckiego

Najczęstsze guzy tej okolicy, stanowiące niemal 10% wszystkich objawowych guzów mózgu, powstają z komórek gruczolowych przedniej części przysadki. Poza gruczolakami przysadki w okolicy siodła tureckiego mogą umiejscowić się: oponiaki (głównie guzka siodła i osłonki nerwu wzrokowego), czaszokardlaki, glejaki nerwu wzrokowego oraz torbiele naskórkowe. Obraz guza okolicy nadsiodłowej mogą dać także duże tętniaki, ziarniniaki swoiste (gruźliczaki) i zmiany w sarkoidozie [Greenberg 2006].

Nowotwory przerzutowe

Nowotwory przerzutowe dziesięciokrotnie przekraczają liczbę pierwotnych nowotworów wewnątrzczaszkowych i występują u 20-40% chorych na nowotwory złośliwe, ale częstość ich rozpoznawania podczas badania autopsyjnego jest znacznie większa [Barnholtz-Sloan i in. 2004, Patchell 2003]. Ich główną przyczyną jest rak płuca (spotyka się je u 50% tych pacjentów), ale także rak piersi, jelita grubego i odbytnicy, nerki oraz czerniak złośliwy. W 10-15% przypadków przerzutów do mózgu ognisko pierwotne pozostaje nieznane [Patchell 2003, Barnholtz-Sloan i in. 2004]. Przerzuty mogą występować pojedynczo, jednak częściej (w 50-60% przypadków) obserwuje się zmiany mnogie [Patchell 1997, Sneed 2002]. Przerzuty do mózgu lokalizują się w półkulach mózgu z predylekcją do okolicy ciemieniowej (Ryc. 9). Większość przerzutów umiejscowiona jest na granicy istoty białej i szarej półkul mózgu, często obserwuje się również zmiany położone głębiej, ponad namiotem mózdzku, rzadziej natomiast pojawiają się one w obrębie mózdzku i pnia mózgu [Delattre i in. 1988]. Pojawiają się przeważnie u osób w wieku średnim lub starszych, jednakże zależy to od lokalizacji ogniska pierwotnego. Przerzuty czerniaka złośliwego występują najczęściej w przedziale wiekowym 50-59 r.ż., z raka płuca – w 40-49 r.ż., a z raka piersi – w 20-39 r.ż. [Barnholtz-Sloan i in. 2004]. Najlepszą metodą ich wykrywania jest MRI z podaniem kontrastu [Yokoi i in. 1999]. W zależności od umiejscowienia i ilości przerzutów stosowane jest leczenie operacyjne, radioterapia, chemioterapia lub postępowanie paliatywne [Tindall i in. 1996].



Rycina 9. Chory po nefrektomii z powodu raka nerki. A – MRI T1 wykazuje przerzut w lewej okolicy ciemieniowej, B – MRI T2 – widoczna strefa obrzęku wokół guza [Żukiel i Nowak 2002].

W niedrobnokomórkowych rakach płuca przerzuty pojawiają się najczęściej w ciągu roku od rozpoznania [Schouten i in. 2002] lub synchronicznie, tj. stwierdza się je w chwili rozpoznania raka płuca. W przebiegu drobnokomórkowego raka płuca przerzuty do mózgu

rozpoznaje się u 10% chorych, a u blisko 50% pozostałych pojawiają się one w trakcie choroby [Quan i in. 2004]. Są one zwykle mnogie i o dużej dynamice wzrostu.

Przerzuty z raka piersi często pojawiają się po kilku latach od jego rozpoznania i dotyczą ok. 5% chorych [Chang i Lo 2003, Schouten i in. 2002]. Jeżeli umiejscowione są na zewnątrz opony twardej mogą naśladować oponiak. Mózg rzadko jest jedynym miejscem rozsiewu i zwykle przerzutom do niego towarzyszą zmiany w innych narządach. Zaleca się agresywne leczenie przerzutów do mózgu z ich resekcją i radiochirurgią, ponieważ wiele przerzutów układowych wykazuje wrażliwość na działanie cytostatyków i obserwuje się dłuższe przeżycie związane z charakterem nowotworu pierwotnego [Wroński i in. 1997].

Raki jelita grubego i odbytnicy powodują powstanie przerzutów do mózgu u ok. 2% chorych [Barnholtz-Sloan i in. 2004, Schouten i in. 2002]. Mogą one mieć charakter torbieli. Często występują w tylnym dole czaszki, co wiąże się ze złym rokowaniem [Wroński i Arbit 1999].

Przerzuty z raka nerki obserwuje się u około 5-10% chorych i wykrywa najczęściej po 2-3 latach od rozpoznania pierwotnego ogniska [Barnholtz-Sloan i in. 2004, Cimatti i in. 2004, Schouten i in. 2002]. Mogą one być bogato unaczynione, co nie wyklucza możliwości ich doszczętnego usunięcia [Wroński i in. 1996]. Skuteczna jest również radiochirurgia [Brown i in. 2008, Sheehan i in. 2003].

Przerzutom czerniaka, częściej niż w przypadku innych typów histologicznych, towarzyszy krwawienie do guza. Rozsiew do mózgu obserwuje się u około 7% chorych i następuje po kilku latach od rozpoznania nowotworu [Fife i in. 2004, Sampson i in. 1998]. Mimo dużej radiooporności komórek czerniaka jego przerzuty do mózgu są podatne na radiochirurgię [Brown i in. 2008, Mori i in. 1998, Seung i in. 1998].

Obecnie główną metodą leczenia większości osób z mnogimi przerzutami do mózgu jest frakcjonowane napromienianie całego tego narządu z pól zewnętrznych (ang. *whole-brain radiotherapy*, WBRT) [Borgelt i in. 1980, Gelber i in. 1981, Sneed 2002]. Metoda ta u wielu chorych pozwala uzyskać dobry efekt paliatywny [Bezjak i in. 2001, Bezjak i in. 2002, Borgelt i in. 1980, Gerrard i in. 2003, Hoskin 2003]. Mediana czasu do pojawienia się progresji pojedynczego przerzutu do mózgu poddanego samodzielnej WBRT wynosi około 5 miesięcy, a u 85% chorych, którzy przeżyli rok stwierdza się lokalną wznowę [Patchell i in. 1990]. Poza krótkotrwałą miejscową kontrolą wśród niekorzystnych następstw WBRT wymienia się wczesną toksyczność (np. nudności, osłabienie) oraz częstą konieczność przewlekłego przyjmowania kortykosteroidów.

4.1.5. Metody diagnostyczne

Symptomatologia

Rozrost nowotworu w obrębie jamy czaszkowej daje objawy spowodowane uciskiem niszczącym i podrażniającym neurony. Część guzów (gruczolaki przysadki, guzy szyszynki, potworniaki) może dawać objawy endokrynologiczne, związane z nadmiernym wydzielaniem hormonów w obrębie gruczolaka lub zbyt niskim ich stężeniem na skutek ograniczenia wydzielania.

Rosnący guz mózgu może wywołać zespół wzmożonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego, z bólem głowy jako objawem dominującym, połączonym z nudnościami i wymiotami. Przemieszczanie struktur mózgu może prowadzić do powstania stanu zagrożenia życia poprzez ucisk na pień mózgu, wklonowanie podstawno-przyśrodkowych części płatów skroniowych we wcięcie namiotu mózdzku (w przypadku guzów nadnamiotowych) lub wklonowanie fragmentów mózdzku ku górze, we wcięcie namiotu i ku dołowi – migdałków mózdzku w otwór potyliczny wielki (w przypadku guzów podnamiotowych). Nowotwory mózgu mogą doprowadzić do wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkowego poprzez: biologiczny rozrost nowotworu, krwawienie z patologicznych naczyń guza (z i do guza) i utworzenie ogniska krwotocznego, zablokowanie dróg krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego i powstanie wodogłowia, obrzęk mózgu towarzyszący nowotworowi, udar niedokrwienny wskutek ucisku tętnicy przez nowotwór, przekrwienie mózgu poprzez ucisk żył (szczególnie mostkowych) przez nowotwór lub towarzyszący mu obrzęk. Objawy wzmożonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego dominują w szybko rosnących złośliwych guzach rozwijających się w nieelokwentnych obszarach mózgowia (prawy płąt czołowy, płaty skroniowe, tylna jama), które często powodują uszkodzenie bariery krew-mózg, prowadzące do obrzęku mózgu.

Nowotwór, uszkadzając tkankę mózgu, powoduje ograniczenie jego czynności w zależności od zaatakowanego obszaru, co jest widoczne i badalne w postaci charakterystycznych objawów ogniskowych. Nadnamiotowe glejaki powodują głównie deficyty czuciowe i motoryczne, niedowidzenie połowicze i kwadrantowe, afazję lub kombinację powyższych. Lokalizacja podnamiotowa skutkuje zaburzeniem funkcji nerwów czaszkowych, uszkodzeniem aferentnych i eferentnych długich dróg pnia mózgu oraz

zespółem mózdzkowym. Osobną grupę objawów stanowią napady padaczkowe, zarówno uogólnione, jak i częściowe, które zdecydowanie częściej występują w glejakach łagodnych (do 80% przypadków), niż w przypadku guzów wysoko złośliwych (około 30%). Zaburzenia poznawcze, myślenia i świadomości związane są z rozlanym naciekaniem mózgu lub opon [Behin i in. 2003, Ohgaki i Kleihues 2005a, Stupp i in. 2007].

Diagnostyka obrazowa

W procesie diagnostycznym wykorzystuje się tomografię komputerową (CT), rezonans magnetyczny (MRI), pozytronową tomografię emisyjną (PET), komputerową tomografię emisyjną pojedynczego fotonu (SPECT) i cyfrową angiografię subtrakcyjną (DSA).

W badaniu CT glejaki o niskich stopniach złośliwości dają obraz jednorodnego hipodensyjnego ogniska, nie ulegającego zwykle wzmocnieniu kontrastowemu. Glejaki wysokozłośliwe charakteryzują się natomiast zróżnicowanym współczynnikiem osłabienia, nieregularnym kształtem, rozległym obrzękiem i intensywnym wzmocnieniem kontrastowym. Obecnie szeroko stosuje się perfuzję tomografii komputerowej, która polega na dynamicznej ocenie krążenia w czasie pierwszego przejścia podanego z dużą prędkością jodowego środka kontrastowego. Pozwala to na czynnościową ocenę przepływu krwi przez mózg, co umożliwia odróżnienie wzmocnienia spowodowanego wzrostem nowotworowym od wywołanego radionekrozą [Dziubińska i in. 2006].

Obrazowanie MRI, zarówno w obecności kontrastu, jak i bez, jest podstawowym narzędziem w diagnostyce glejaków ze względu na wyższą czułość i swoistość w porównaniu z badaniem CT [Behin i in. 2003]. Niskozłośliwe glejaki (LGG) w badaniu MRI charakteryzują się zmniejszonym lub zmienionym sygnałem w obrazie T1-zależnym i nieznacznie zwiększonym w obrazach T2- i PD-zależnych oraz sekwencjach FLAIR. Wysokozłośliwe glejaki (HGG) są zazwyczaj hipointensywne w obrazach T1-zależnych i silnie hiperintensywne w obrazach T2- i PD-zależnych. W porównaniu z LGG, glejaki wysokozłośliwe cechuje większa heterogenność w obrazie MRI, a towarzyszący im obrzęk mózgu jest bardziej nasilony. Pojawienie się wyraźnego wzmocnienia obrazu guza po podaniu środka kontrastowego jest wykładnikiem radiologicznej złośliwości nowotworu [Henson i in. 2005]. W obrazie MRI HGG obszar centralny otoczony obrączkowym wzmocnieniem (ang. *ring enhancement*) jest najczęściej obrazem martwicy. Obszar wzmocnienia zawiera tkanki cechujące się wzmożoną angiogenezą i zwiększoną przepuszczalnością ścian naczyń krwionośnych. Jednak

wzmocnienie kontrastowe może być również zwiększone w wyniku działalności chirurgicznej czy też radioterapii [Smith i in. 2005]. Wykazanie granicy pomiędzy naciekającym glejakiem a otaczającym mózgiem w badaniu MRI jest niezwykle trudne, a często niemożliwe, podobnie jak wyróżnienie granicy pomiędzy obrzękiem i naciekającym glejakiem w obrazach T1, T2, i FLAIR [Cavaliere i in. 2005]. Nowe techniki MRI: spektroskopia (MRS) i obrazowanie czynnościowe (fMRI) zwiększają precyzję rozpoznania nowotworu i bezpieczeństwo zabiegu [Le Bihan i in. 2001, Narayana i in. 2007, Saraf-Lavi i in. 2003].

PET i SPECT pozwalają na uzyskanie obrazu przestrzennego rozkładu radiofarmaceutyku w badanych strukturach. LGG dają hipometaboliczne - „zimne” obszary, natomiast „gorące” obszary sugerują obecność HGG. Badania te są użyteczne w określaniu stopnia złośliwości i rozległości procesu nowotworowego oraz różnicowaniu wznowy i zmian popromiennych. Celem zwiększenia czułości i swoistości tych badań wykorzystuje się ich fuzję z CT lub MRI [De Witte i in. 2000, Le Jeune i in. 2006, Minn 2005, Pauleit i in. 2005].

Na podstawie badań obrazowych określa się stopień zaawansowania choroby wg klasyfikacji TNM, która została wprowadzona dla potrzeb praktyki klinicznej w 1968 przez UICC (Tab. 3).

Tabela 3. Klasyfikacja TNM dla guzów mózgu [Hermanek i Sobin 1987].

T	guz pierwotny
TX	niemożność stwierdzenia guza pierwotnego
T0	nieobecność guza pierwotnego
<i>Guzy nadnamiotowe</i>	
T1	guz o średnicy ≤ 5 cm w największym wymiarze
T2	guz o średnicy > 5 cm w największym wymiarze
T3	zajęcie układu komorowego
T4	guz przekracza linię środkową i nacieka przeciwległą półkulę
<i>Guzy podnamiotowe</i>	
T1	guz o średnicy ≤ 3 cm w największym wymiarze
T2	guz o średnicy > 3 cm w największym wymiarze
T3	zajęcie układu komorowego
T4	guz przekracza linię środkową i nacieka przeciwległą półkulę
N	ocena zajęcia węzłów chłonnych (nie ma zastosowania)
M	przerzuty odległe
MX	niemożność stwierdzenia przerzutów odległych
M0	nieobecność przerzutów odległych
M1	obecność przerzutów odległych

4.1.6. Metody terapeutyczne

4.1.6.1. Leczenie operacyjne

Celem leczenia operacyjnego glejaka mózgu jest makroskopowo doszczętne usunięcie guza, zmniejszenie ciasnoty wewnątrzczaszkowej, ustalenie rozpoznania histopatologicznego, aplikacja drenu do brachyterapii, chemioterapeutyku bądź bioterapeutyku oraz przedłużenie życia chorego bez pogarszania jego jakości [Fijuth i in. 2004, Lacroix i in. 2001, Mitchelln i in. 2005].

Podczas resekcji glejowego guza mózgu nie jest możliwe usunięcie nowotworu zgodnie z zasadami obowiązującymi w chirurgii onkologicznej. Wynika to z rozległego naciekania mózgu przez komórki glejaka poza obszarem uwidocznionym w badaniach obrazowych lub sąsiedztwa ważnych czynnościowo struktur [Wilson 1990]. Większość zabiegów usunięcia guza wewnątrzczaszkowego można określić jako makroskopowo całkowite, kiedy usunięte zostają wszystkie tkanki, które można w czasie zabiegu zidentyfikować jako nowotwór lub częściowe, gdy z powodu w/w ograniczeń totalna resekcja nie jest możliwa. W większości przypadków guzów neuroepitelialnych uważa się, iż czas przeżycia chorych zależy od zakresu usunięcia guza i dlatego resekcja makroskopowo całkowita powinna być celem zabiegu. Zakres operacji jest jednak uwarunkowany ryzykiem wystąpienia powikłań, przede wszystkim deficytu neurologicznego [Lacroix i in. 2001, Stupp i in. 2007]. Ryzyko powikłań można zmniejszyć przez mapowanie ważnych czynnościowo struktur, monitorowanie elektrofizjologiczne podczas zabiegu, obrazowanie śródoperacyjne (CT, MRI, US), użycie mikroskopu operacyjnego lub technik endoskopowych, aspiratora ultradźwiękowego, nawigacji i stereotaksji [Mitchelln i in. 2005, Willems i in. 2006, Yoshikawa i in. 2006]. Celem ustalenia rozpoznania histopatologicznego w guzach trudno dostępnych nawet przy wykorzystaniu techniki mikrochirurgicznej stosuje się biopsję sterotaktyczną lub kontrolę za pomocą neuronawigacji [Mitchelln i in. 2005].

Jeżeli nowotwór ogranicza krążenie płynu mózgowo-rdzeniowego powodując wodogłowie i nie jest możliwe odblokowanie tej przeszkody, zakłada się zastawkę komorowo-otrzewnową, komorowo-dosercową lub endoskopowo przebija się dno komory III (wentrikulostomia) czy udrażnia wodociąg (akweduktoplastyka). U chorych ze znacznym

wzrostem ciśnienia wewnątrzczaszkowego usunięcie wodogłowia poprawia stan neurologiczny i komfort życia [Fijuth i in. 2004].

W przypadku guzów glejowych pnia mózgu zabieg operacyjny jest możliwy gdy guz jest dobrze ograniczony lub naciek ma charakter egzofityczny. Interwencję taką przeprowadza się bezwzględnie przy wykorzystaniu mikrochirurgii, najlepiej z asystą neuronawigacji i monitoringiem śródoperacyjnym potencjałów wywołanych [Majchrzak i in. 2005, Willems i in. 2006].

Zabieg operacyjny daje możliwości prowadzenia innych form terapii guza takich jak brachyterapia (aplikacja drenu w czasie zabiegu), chemioterapia (aplikacja chemioterapeutyku) lub bioterapia (aplikacja bioterapeutyku).

4.1.6.2. Radioterapia i radiochirurgia

Podstawową techniką radioterapii (RTH) stosowaną w leczeniu glejaków jest frakcjonowana teleradioterapia z zastosowaniem jednorazowej dziennej dawki 1.8 - 2 Gy na frakcję. Dawka całkowita zależy od typu histologicznego guza. W RTH paliatywnej najczęściej stosuje się 5 lub 10 dawek frakcyjnych po odpowiednio 4 lub 3 Gy na frakcję. W LGG dąży się do ograniczenia napromieniania prawidłowych tkanek mózgu, które reagują późnym odczynem i dlatego w leczeniu radykalnym nie należy stosować dawek frakcyjnych powyżej 2 Gy [Fijuth i in. 2004, Stupp i in. 2007].

W przypadku gdy guz jest dobrze odgraniczony od tkanek prawidłowych zalecana jest RTH konformalna lub stereotaktyczna. Stereotaktyczna radiochirurgia (SRS) i stereotaktyczna radioterapia frakcjonowana (SFR) umożliwiają napromienianie precyzyjnie określonej i niewielkiej objętości tkanek nerwowych (maksymalna średnica zmiany 3.5 - 4 cm). Planowanie i wykonanie SRS i SFR wymaga zastosowania ramy stereotaktycznej lub odpowiednich masek i przestrzennego układu odniesienia oraz dostosowanego komputerowego systemu planowania leczenia. W ramach SFR podawanych jest kilka frakcji (najczęściej po 5 - 7 Gy) lub realizowany jest schemat teleradioterapii konwencjonalnie frakcjonowanej [Fijuth i in. 2004, Selker i in. 2002].

Radiochirurgia polega na jednorazowym podaniu stereotaktycznie wysokiej dawki promieniowania od kilku do dwudziestu kilku Gy. Ponieważ takie dawki wywołują nieodwracalne zmiany w komórkach zarówno guza, jak i mózgu, dlatego wymagana jest dużo

większa precyzja pozycjonowania niż przy zastosowaniu SFR [Crowley i in. 2006, Mitchelln i in. 2005]. Przy przestrzennym planowaniu RTH należy uwzględnić uwidoczniony obszar glejaka, obszar subklinicznego szerzenia się nowotworu, położenie guza względem „narządów krytycznych”, objętość planowaną do napromieniania, margines uwzględniający ruchomość oddechową i błędy pozycjonowania [Fijuth i in. 2004].

Brachyterapia polega na wprowadzeniu do guza lub łoża pooperacyjnej izotopów promieniotwórczych (najczęściej ^{192}Ir i ^{125}I) w celu uzyskania równomiernego rozkładu dawki w stosunkowo niewielkiej objętości (maksymalna średnica guza 5 - 6 cm). W przypadku zmian torbielowatych możliwe jest zastosowanie izotopów w formie koloidalnej (^{32}P , ^{198}Au , ^{90}Y). Dawki podawane w brachyterapii wahają się od kilkunastu do kilkudziesięciu Gy (w przypadku implantów stałych ^{125}I > 100 Gy). Aplikatory umieszcza się przy pomocy ramy stereotaktycznej lub śródoperacyjnie w czasie zabiegu resekcji guza [Mitchelln i in. 2005, Nieder i in. 2000, Shrieve i in. 1995].

Wskazaniami do radioterapii glejaków są: częściowe wycięcie guza niezależnie od stopnia histologicznej złośliwości, rozpoznanie nowotworu anaplastycznego bez względu na zakres zabiegu, nieoperacyjność guza ze względu na lokalizację (np. glejak nerwu wzrokowego, guz w pniu mózgu lub we wzgórzu) lub zaawansowanie kliniczne. Do podjęcia radioterapii lub chemioterapii bez potwierdzenia rozpoznania histopatologicznego nowotworu upoważnia typowy obraz radiologiczny. Wydaje się, że radykalne napromienianie glejaka powinno opierać się na strategii opracowanej przez zespół złożony z radioterapeuty, chemioterapeuty, neurochirurga i fizyka przy wykorzystaniu skomputeryzowanego systemu planowania [Fijuth i in. 2004].

4.1.6.3. Chemioterapia

Klasyczna chemioterapia (CTH) ma ograniczone zastosowanie w leczeniu glejaków mózgu. Niewielka skuteczność CTH w tej grupie nowotworów jest spowodowana: barierą krew-mózg, niską chemiowrażliwością pierwotną, wczesną chemioopornością wtórną, niekorzystnym oddziaływaniem cytostatyków i innych leków (np. przeciwdrgawkowych), neurotoksycznością niektórych leków cytotoksycznych, neurotoksycznością skojarzenia niektórych leków cytotoksycznych i RTH. Do grupy leków przechodzących przez barierę krew-

mózg należą: pochodne nitrozomocznika (karmustyna - BCNU, lomustyna - CCNU, nimustyna - ACNU, prokarbazyna - PCB i temozolamid - TMZ) [Fijuth i in. 2004].

W glejakiach CTH może być stosowana w wybranych przypadkach nawrotów lub jako leczenie paliatywne po wyczerpaniu możliwości chirurgii i RTH, u chorych rokujących przeżycie przynajmniej 3 miesięcy. Nie wykazano przewagi wielolekowej CTH nad monoterapią [Fijuth i in. 2004]. Wyjątek stanowią skąpodrzewiaki, gdzie pokazano dużą skuteczność leczenia schematem PCV, szczególnie w przypadkach skąpodrzewiaków anaplastycznych. W monoterapii zalecane jest stosowanie lomustyny co 6 tygodni lub karmustyny jednorazowo, a w wybranych przypadkach temozolamidu przez 5 kolejnych dni, co 4 tygodnie. Schemat PCV wykorzystywany w leczeniu skąpodrzewiaków i skąpodrzewiakogwiaździaków zawiera lomustynę, prokarbazynę i winkrystynę (cykle powtarzane co 6-8 tygodni). Dobrą odpowiedź na chemioterapię zgodną z tym schematem dają guzy z utratą informacji genetycznej w obrębie chromosomu 1p i 19q (LOH 1p/19q) [Cairncross i in. 1998, Engelhard i in. 2003]. Schemat PCV w terapii neoadjuwantowej w przypadku wznowy guza nie daje dużych korzyści [Bauman i in. 2000].

Lekiem o najlepiej udokumentowanej skuteczności w leczeniu wysoko złośliwych gwiaździaków jest temozolamid (doustny związek alkilujący). Wykazano jednak tylko nieznaczną aktywność tego leku w przypadku wznowy glejaka [Yung i in. 2000]. W połączeniu z radioterapią, u chorych z nowo rozpoznanym glejakiem wielopostaciowym temozolamid istotnie wydłuża czas przeżycia. Korzystne działanie TMZ obserwuje się jednak głównie w przypadku guzów z metylowanym promotorem genu kodującego metylotransferazę O⁶-metyloguaniny (MGMT) [Stupp i in. 2001, Stupp i in. 2005].

Karmustyna jest chemioterapeutyką używaną w monoterapii w leczeniu złośliwych glejaków. Przy jej ogólnym podawaniu osiągnięcie odpowiedniego stężenia leku w tkankach mózgu jest trudne. Ponieważ do nawrotów glejaka złośliwego często dochodzi w obrębie marginesu uprzedniej resekcji, a także w celu ominięcia bariery krew-mózg opracowano biodegradowalne polimery zawierające karmustynę, które umieszcza się w łożu po resekcji guza [Mitchell i in. 2005]. Przenikanie leku w oparciu o mechanizm transportu biernego jest ograniczone do zaledwie kilku milimetrów. Nie udało się wykazać by ten sposób terapii wydłużał medianę przeżycia chorych lub czas przeżycia wolnego od progresji choroby [Olivi i in. 2003, Westphal i in. 2003].

4.1.6.4. Niestandardowe metody terapeutyczne

Obecnie w terapii guzów mózgu stosuje się nowoczesne technologie oparte na zjawisku interferencji RNA (RNAi). Metoda ta polega na indukcji hydrolizy informacyjnego RNA (mRNA) przy pomocy kompleksu wyciszającego RISC powstałego z udziałem dwuniciowego RNA dostarczanego do komórki. W Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu opracowano ATN-RNA, cząsteczkę RNA, która indukuje specyficzną hydrolizę mRNA swoistego dla tenascyny C. ATN-RNA podawany pacjentom po resekcji guza mózgu ograniczył rozrost guza i wydłużył czas przeżycia [Rolle i in. 2010, Wyszko i in. 2008, Żukiel i in. 2006]. Opis innych technik molekularnych w terapii nowotworów OUN można znaleźć w niedawno wydanej książce dotyczącej zastosowania technologii kwasów nukleinowych w leczeniu guzów mózgu [Erdmann i in. 2009].

Niezbędnym czynnikiem warunkującym działanie bioterapeutyku jest jego obecność w glejaku lub w sąsiadujących tkankach mózgu. Czynniki molekularne hamujące tumorigenezę można podawać do nieusuniętej części guza lub ścian łoża pooperacyjnej drogą bezpośrednich iniekcji podczas operacji neurochirurgicznej lub w postaci bolusów terapeutyku za pomocą drenu umieszczonego w nieusuniętej części guza, co prowadzi do konwekcyjnego rozmieszczenia leku w masie guza (CEDD) [Chen i in. 1999].

W terapii neuroonkologicznej dąży się do opracowania terapeutyków wysoce selektywnie działających na nowotwór, z ograniczeniem uszkodzenia reszty organizmu. Krokiem w kierunku tego rodzaju leczenia jest bewacizumab. Jest to humanizowane przeciwciało monoklonalne blokujące funkcje VEGF. Wiele danych wskazuje na jego wysoką skuteczność w leczeniu GBM, ze względu na nadprodukcję tego białka w komórkach guza [van Meir i in. 2010].

4.1.7. Rokowanie

Czynnikami prognostycznymi dla czasu przeżycia są: rodzaj histopatologiczny nowotworu, lokalizacja guza (czołowy lub ciemieniowy), zakres operacji (resekcja całkowita lub subtotalna), ocena przedoperacyjna w KPS, wiek (powyżej 50 lat) oraz wielkość dawki radioterapeutycznej (60 Gy). Prawdopodobieństwo przeżycia 5 lat po zdiagnozowaniu GBM jest mniejsze od 5%, a średni czas przeżycia rzadko przekracza 12 miesięcy. Średni czas przeżycia po operacji AA wynosi około 30 miesięcy. Pacjenci po resekcji totalnej lub subtotalnej mieli lepszą prognozę niż pacjenci, u których wykonano częściową resekcję lub biopsję. Wykazano, że wydłużenie czasu przeżycia średnio do 13 miesięcy związane jest z resekcją ponad 98% masy guza. Usunięcie mniejszej ilości tkanki skraca czas przeżycia do 8 miesięcy [Lacroix i in. 2001]. Chorzy, którzy otrzymali dawkę większą od 60 Gy mieli lepsze rokowanie niż ci, którzy otrzymali 60 Gy lub mniej [Nomiya i in. 2007]. Wiek, przedoperacyjny stan neurologiczny, napady drgawek i stopień złośliwości mają istotny wpływ na czas przeżycia. Chorzy w młodszym wieku z guzem w płatach czołowym, skroniowym lub potylicznym mają dłuższy czas przeżycia [Huo i Zhang 2002]. Czas przeżycia jest krótszy u osób w starszym wieku [Sneed i in. 1995]. Z badań klinicznych wynika, że ta różnica w czasie przeżycia chorych z GBM może wynikać z większej oporności starszych chorych na radioterapię niż z wewnętrznych różnic w zakresie wzrostu guza [Barker i in. 2001].

W większości przypadków do wznowy GBM dochodzi w czasie 6 - 12 miesięcy, natomiast wznowa AA następuje 18 – 36 miesięcy po operacji. Pojawia się ona w około 80% przypadków w postaci odrostu w marginesie tkanek 2 - 3 cm od operowanego guza. W centrum guza znajduje się 92% komórek glejaka, natomiast w strefie szerokości 20 mm otaczającego mózgu – 6%, w odległości 20-40 mm – 1.8%, a powyżej 40 mm od guza – 0.2% [Wilson 1990].

W ciągu ostatnich lat obserwuje się wydłużenie czasu przeżycia po reoperacji wznowy HGG. Średnie czasy przeżycia w przypadku reoperacji wznowy wynoszą: 14-50 tygodni (GBM) i 55-88 tygodni (AA). Przy zastosowaniu chemioterapii adjuwantowej odpowiednio: 19-28 tygodni (GBM) i 44-81 tygodni (AA), natomiast przy uzupełniającej radioterapii: 34-47 tygodni (GBM) i 42-105 tygodni (AA) [Nieder i in. 2000].

4.2. Epigenetyczna regulacja ekspresji genów

Działanie systemów biologicznych nie może być i nie jest oparte na pojedynczej cząsteczce czy procesie, ani nawet na jednym genie. Polega ono raczej na szerokich oddziaływaniach na licznych poziomach pomiędzy wieloma składnikami komórki, takimi jak białka i kwasy nukleinowe. Większość komórek organizmu ssaka zawiera ten sam zestaw genów, a jednak ich cechy zewnętrzne i funkcje są niekiedy skrajnie różne. Różnicowanie komórkowo-tkankowe jest w zasadzie nieodwracalne, jednakże potencjalnie każda dojrzała komórka może stać się totipotenna. Te indywidualne, specyficzne właściwości komórek i ich niezwykła plastyczność są wynikiem selektywnej ekspresji i represji genów, które decydują o składzie białkowym komórki, a więc i jej funkcji. Ekspresja genów odpowiedzialnych za proces różnicowania, utrzymywania w ciągu życia specyficznych właściwości poszczególnych tkanek i plastyczność komórek stanowi wypadkową bezpośrednich zmian w sekwencji DNA oraz oddziaływań o charakterze ponadgenomowym (epigenetycznym), do których należą między innymi: metylacja DNA, modyfikacja białek histonowych (acetylacja, fosforylacja, metylacja, ubiquitynacja), rodzicielskie piętno genomowe (ang. *genomic imprinting*), oddziaływanie białek Polycomb i Trithorax oraz interferencja RNA [Bredburry 2003, Curradi i in. 2002, Fischle i in. 2003, Grewal i Moazed 2003, Hendrich i in. 1998]. Wzór tych modyfikacji tworzy tzw. epigenotyp, którego dynamicznym wpływom podlega chromatyna, czyli DNA wraz z białkami histonowymi.

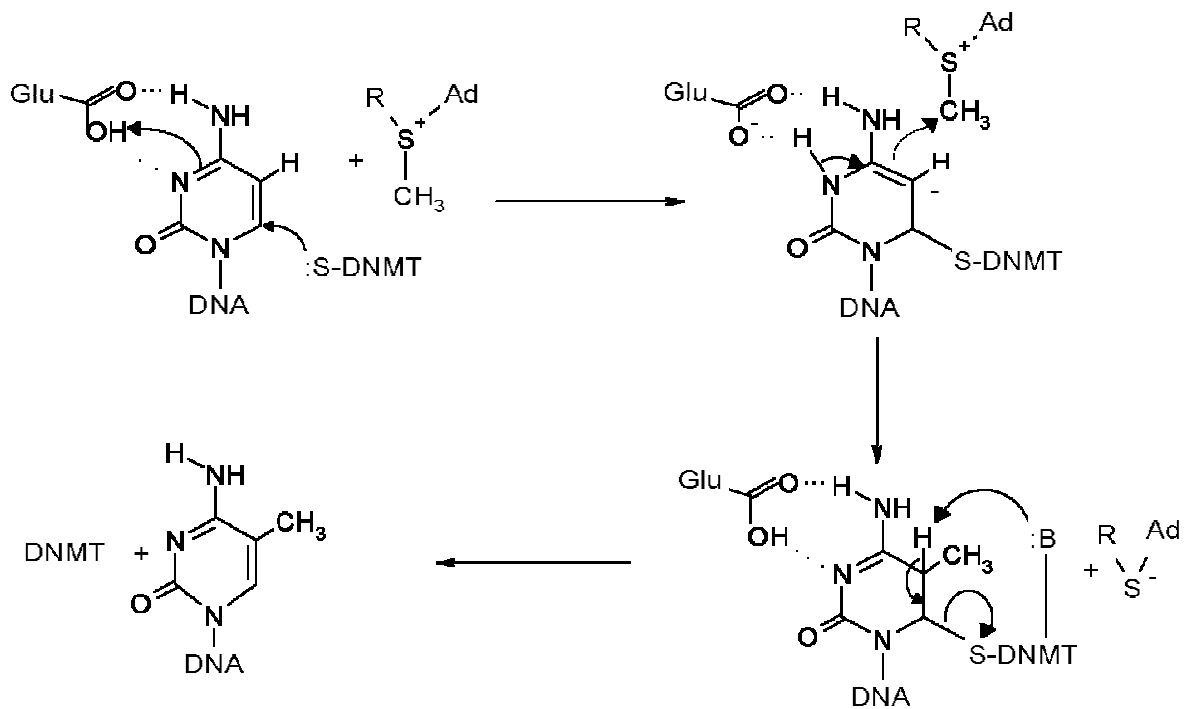
Mechanizmy epigenetyczne są to mitotycznie i/lub mejotycznie dziedziczone zmiany w funkcjonowaniu genów nie będące zmianami w sekwencji DNA [Russo i in. 1996]. W przeciwieństwie do genomu, który jest identyczny w różnych typach komórek danego organizmu, epigenom ma charakter dynamiczny i różni się między komórkami. Modyfikacje epigenetyczne są odwracalne i, oprócz modulacji ekspresji genów, wpływają na stabilność struktury chromatyny, integralność genomu, rozwój zarodkowy, koordynację czasową replikacji, piętnowanie genomowe i inaktywację chromosomu X [Chow i Brown 2003, Ehrlich 2003, Robertson i in. 2004, Rousseaux i in. 2004, Ting i in. 2004]. Mechanizmy epigenetyczne uniemożliwiają również ekspresję genów wirusowych [Jähner i in. 1982] oraz wyciszają sekwencje endogennych retrowirusów. Zapobiegają także destabilizacji wywołanej homologiczną rekombinacją pomiędzy sekwencjami powtórzonymi w genomach ssaków [Colot i Rossignol 1999, Yoder i in. 1997] oraz są zaangażowane w funkcjonowanie mózgu

[Chen i in. 1999] i rozwój układu odpornościowego [Fitzpatrick i Wilson 2003, Nan i Bird 2001]. Poznanie i zrozumienie mechanizmów epigenetycznych, modyfikujących ekspresję genów i biorących udział w rozwoju ssaków ma kluczowe znaczenie dla medycyny.

4.2.1. Właściwości i funkcja 5-metylocytozyny

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) jest polimerem zbudowanym z nukleotydów, które składają się z nukleozydu (zasada azotowa i cukier) oraz grupy fosforanowej. Obok czterech głównych nukleozydów (adenozyny – A, tymidyny – T, guanozyny - G i cytydyny - C) eukariotyczne DNA zawierają wiele zmodyfikowanych zasad, z których 5-metylocytozyna (m^5C) ma kluczowe znaczenie w regulacji ekspresji genów. m^5C jest produktem reakcji metylacji DNA katalizowanej przez metylotransferazy, w której następuje kowalencyjne związanie grupy metylowej do pierścienia cytozyny w pozycji 5 (Ryc. 10).

Ponieważ atom węgla C-5 cząsteczki cytozyny jest mało reaktywny, jego metylacja w warunkach fizjologicznych jest możliwa jedynie w reakcji katalizowanej przez enzymy zwane metylotransferazami [Bestor 2000]. Reakcja metylacji cytozyny przebiega według mechanizmu zaproponowanego po raz pierwszy w 1987 roku [Wu i Santi 1987]. Donorem grupy metylowej w reakcji metylacji DNA, katalizowanej przez metylotransferazy, jest S-adenozylometionina (SAM) [Bestor 2000]. W pierwszym etapie reakcji metylotransferaza DNA katalizuje atak nukleofilowy na atom węgla C-6 łącząc się z nim kowalencyjnie. Na skutek tego następuje protonacja atomu azotu N-3 przez grupę karboksylową kwasu glutaminowego i powstaje 4,5-enamina, która atakuje cząsteczkę S-adenozylometioniny, będącą donorem grupy metylowej. Przyłącza się ona do aktywnego atomu węgla C-5, a cząsteczka S-adenozylometioniny przekształca się w S-adenozylhomocysteinę. Powstaje związek pośredni, z którego następnie uwalniana jest metylotransferaza DNA, co powoduje regenerację wiązania podwójnego pomiędzy węglami C-5 i C-6 [Pacholska i in. 2004].



Rycina 10. Mechanizm reakcji metylacji cytozyny katalizowanej przez enzym DNMT. Donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina, która w toku reakcji ulega przekształceniu do S-adenozylhomocysteiny [Plitta i in. 2008].

Metylacja DNA jest jednym z elementów szerokiego programu epigenetycznego. m^5C funkcjonuje jako przełącznik powodujący aktywację lub inhibicję ekspresji genów. Ocenia się, że ok. 5% wszystkich cytozyn w DNA jest metylowanych. Większość z nich (70-80%) znajduje się w CpG (dinukleotydy 5'-cytozyna-guanina-3') [Attwood i in. 2002, Bird 1986, Ehrlich i in. 2002]. Znana jest również metylacja cytozyn w obrębie dinukleotydów CpA i CpT, a także trójek CpNpG, jest to jednak zjawisko dużo rzadsze [Ho i Tang 2007].

Najbardziej uderzającą cechą wzoru metylacji DNA kręgowców jest obecność wysp CpG, czyli niemetylowanych regionów wielkości 500 - 5000 bp o większej niż reszta genomu częstości występowania CpG. Występują one w rejonach przy końcu 5' wielu ludzkich genów, najczęściej w promotorach i pierwszych eksonach [Bird 1987, Saxonov i in. 2006], jak również w regionach przy końcu 3' genu. W genomie ludzkim stwierdzono około 29 000 wysp CpG, które są związane z ok. 60% ludzkich genów [Antequera i Bird 1993, Baylin i Herman 2000, Bird 2002, Issa 2000, Lander i in. 2001, Venter i in. 2001]. Większość z nich pozostaje niemetylowana na wszystkich etapach rozwoju i we wszystkich tkankach [Antequera i Bird 1993]. Te wielkości odzwierciedlają czasową i przestrzenną zmienność organizmu. Stopień metylacji regulatorowych sekwencji DNA określa aktywność transkrypcyjną genu. Kiedy wyspa CpG ulega metylacji podczas rozwoju, to sąsiadujący z nią gen jest trwale wyciszony.

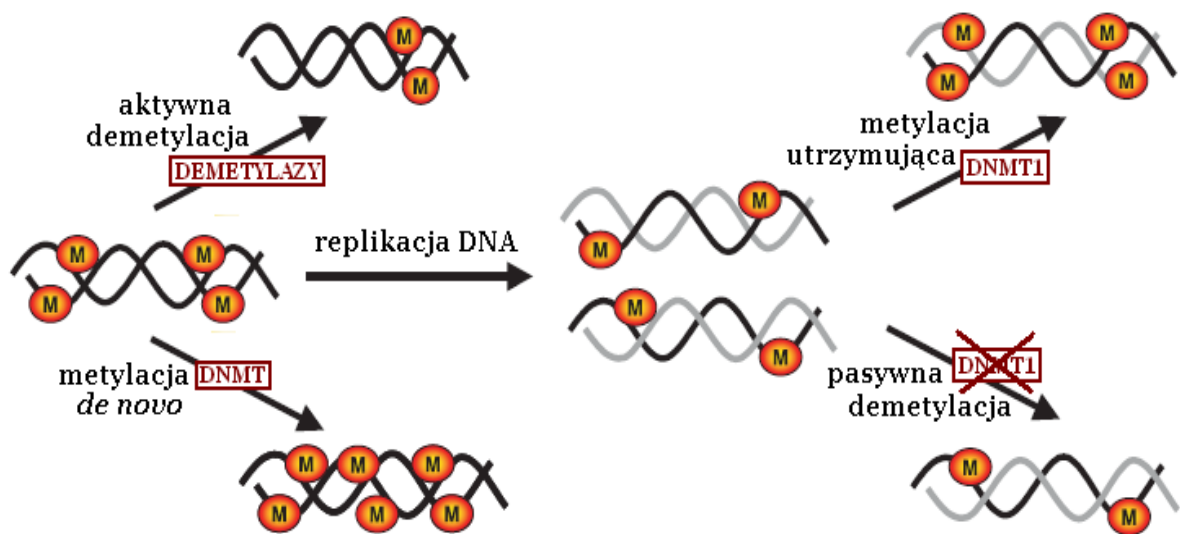
Większość metylowanych wysp CpG jest zlokalizowanych w obrębie sekwencji powtórzonych, włączając w to centromery, satelity i geny powtórzone [Baylin i Herman 2000].

Zróznicowanie wzorców metylacji u zwierząt wskazuje na możliwość pełnienia przez zmetylowany DNA odmiennych funkcji. Wzór metylacji genomu u ssaków zmienia się podczas ich rozwoju. Stwierdzono, że we wczesnej fazie rozwoju embrionalnego myszy, poziom metylacji DNA w wyniku demetylacji obniża się gwałtownie do ok. 30% poziomu typowego dla komórek somatycznych [Bird 2002, Jackson-Grusby i in. 2001, Jaenisch i Bird 2003, Pacholska i in. 2004]. Demetylacja jest procesem aktywnym i obejmuje tylko genom męski krótko po zapłodnieniu, w przeciwieństwie do genomu matczynego, który ulega pasywnej demetylacji podczas późniejszych podziałów komórek [Jaenisch i Bird 2003, Pennisi 2001, Reik i Dean 2001, Robertson i Jones 2000]. Następująca po implantacji zarodka metylacja *de novo* powoduje ponowne wprowadzenie grup metylowych do DNA. Wśród kręgowców występują różnice międzygatunkowe, które mogą odzwierciedlać rolę metylacji u tych organizmów. U myszy, i prawdopodobnie innych ssaków, wczesna demetylacja z następującą po niej ponowną metylacją jest ważna dla określania wzorca metylacji DNA w komórkach somatycznych. Metylacja *de novo* występuje rzadko podczas prawidłowego rozwoju pogastrulacyjnego, natomiast częściej w nowotworowych liniach komórkowych oraz w niektórych starzejących się tkankach, gdzie znacząca ilość wszystkich wysp CpG jest stopniowo metylowana [Baylin i Herman 2000, Bird 2002, Issa 2000, Jaenisch i Bird 2003, Pacholska i in. 2004]. Pokazano, że metylacja *de novo* może również wystąpić w dojrzałych komórkach somatycznych, ale jej tempo jest bardzo słabe [Bird 2002].

Chociaż monozygotyczne bliźnięta posiadają ten sam genotyp, to większość z par nie jest identyczna. Obserwuje się różnice fenotypowe, takie jak wrażliwość na choroby czy różnice w cechach antropomorficznych. Jednym z możliwych wyjaśnień tego zjawiska jest obecność różnic w metylacji DNA i białek histonowych tworzących chromatynę. Chociaż bliźnięta są epigenetycznie nierozróżnialne we wczesnych latach życia, to starsze wykazują już istotne różnice w ilości i rozmieszczeniu w genomie 5-metylocytozyny oraz acetylacji i metylacji histonów, co wpływa na ekspresję genów [Fraga i in. 2005]. Wzory modyfikacji epigenetycznych bliźniąt jednojajowych zmieniają się w miarę ich starzenia się. Różnice te mogą powstawać w wyniku działania zarówno czynników środowiskowych (np. palenie papierosów, aktywność fizyczna, dieta) [Bjornsson i in. 2004, Jaenisch i Bird 2003], jak i wewnętrznych (np. błędy w przepisywaniu informacji epigenetycznej przy kolejnych

podziałach komórek) [Cooney 1993, Bennett-Baker i in. 2003]. Gromadzenie mutacji epigenetycznych następuje szybciej niż genetycznych, ponieważ nie mają one tak dramatycznych konsekwencji, a komórki nie rozwinęły skutecznych mechanizmów ich naprawy [Fraga i Esteller 2002].

Grupa metylowa może być dołączona do DNA w pozycji N6 adeniny (u *Prokaryota* i większości *Eukaryota*) oraz w pozycjach N4 (głównie u bakterii termofilnych) i C5 (wszystkie organizmy) cytozyny (C) [Bestor 2000, Gromova i Khoroshaev 2003]. Epigenetyczna metylacja DNA dotyczy tylko pozycji 5 cytozyny w obrębie dinukleotydów CpG [Singal i Ginder 1999], których w genomie ludzkim jest ok. 5 - 10 razy mniej niż by tego statystycznie oczekiwano, są one także nierównomiernie rozmieszczone [Bird 2002]. Na skutek spontanicznej deaminacji m⁵C do tyminy (T), CpG u wyższych *Eukaryota* stanowią tzw. „gorące miejsca” mutacji, a tranzycja C→T skutkuje eliminacją miejsc CpG z genomów kręgowców podczas ewolucji. Wyjątkiem są tzw. wyspy CpG. Reakcja metylacji, której konsekwencją jest transkrypcyjne wyciszenie, katalizowana jest przez metylotransferazy DNA (DNMT) [Razin i Riggs 1980] (Ryc. 11).

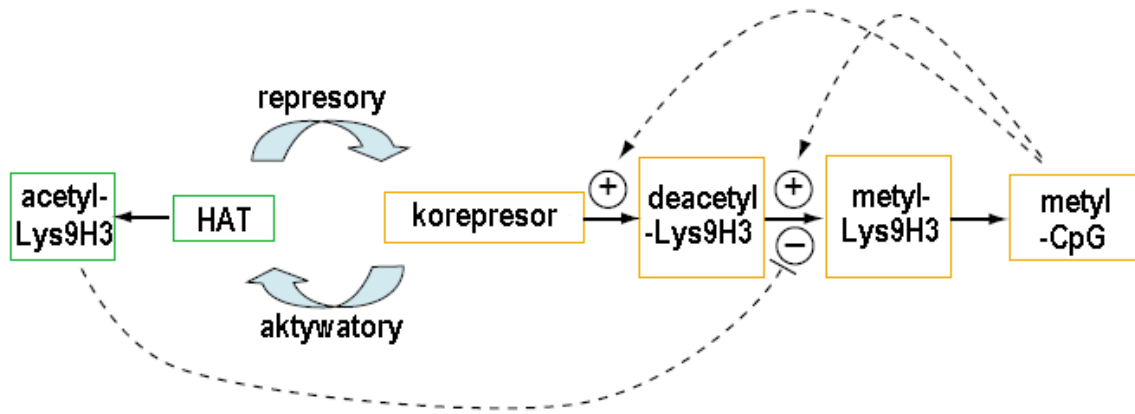


Rycina 11. Reakcje związane z metylacją DNA. Zgodnie z tym modelem wzór metylacji DNA jest wiernie kopiowany podczas replikacji przez DNMT1, ale jest on odwracalny [Głuszak i in. 2008].

Genomy zwierząt charakteryzują się różnorodnością poziomów i wzorów metylacji. U nicienia *Caenorhabditis elegans* nie znaleziono 5-metylocytozyny (m⁵C), ani DNA metylotransferaz, a z kolei u muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, której genom zawiera sekwencję podobną do genu znanych DNMT, poziom m⁵C jest bardzo niski natomiast metylacja dotyczy głównie C w obrębie dinukleotydów CpT, a nie CpG, jak u

większości zwierząt [Gowher i in. 2000, Hung i in. 1999, Lyko i in. 2000, Tweedie i in. 1999]. Większość genomów bezkręgowców charakteryzuje się umiarkowanie wysokim poziomem metylowanych dinukleotydów CpG ($m^5\text{CpG}$) i można w nich wyróżnić domeny metylovanego DNA oddzielone domenami niemetylovanego DNA [Bird i in. 1979, Tweedie i in. 1997]. Z kolei genomy kręgowców mają najwyższy spośród całego królestwa zwierząt poziom $m^5\text{C}$ w DNA, rozproszony w genomie (globalna metylacja). Różnorodność wzorów metylacji genomów zwierząt może odzwierciedlać różną funkcję tej modyfikacji DNA [Colot i Rossignol 1999].

Genom *Eukariota* można podzielić na dwie części: hipometylowaną, związaną z aktywną, acetylowaną chromatyną, i hipermetyleowaną, związaną z nieaktywną, hipoacetylowaną chromatyną [Razin i Cedar 1977]. Pierwsze badania sugerowały jednokierunkowy związek między dwoma mechanizmami epigenetycznymi, w którym metylacja DNA jest czynnikiem nadrzędnym regulującym modyfikacje histonów i w konsekwencji prowadzącym do wyciszenia transkrypcji [Cameron i in. 1999, Eden i in. 1998]. Uważano, że metylowany gen może być ponownie aktywowany po usunięciu grupy metylowej. Koncepcja, twierdząca iż metylacja DNA jest głównym, decydującym sygnałem w inaktywacji genów została eksperymentalnie potwierdzona wraz z odkryciem białek wiążących się do $m^5\text{CpG}$, mających również zdolność wiązania białek modyfikujących histony [Nan i in. 1998]. Jednakże zaobserwowano też odwrotną relację. Reorganizacja struktury chromatyny stymuluje zmiany we wzorze metylacji DNA. Istnieją białka zaangażowane w proces wyciszania chromatyny, które mogą wiązać DNMT-azy [Brenner i in. 2005, Fuks i in. 2000, Vire i in. 2006]. Również hipometylacja DNA może być powodowana zmianami w chromatynie [Szyf i in. 2004]. Jest zatem oczywiste, że pomiędzy tymi dwoma mechanizmami epigenetycznymi istnieje związek dwukierunkowy. Demetylacja DNA oraz demetylacja i acetylacja Lys9H3 oraz metylacja Lys4H3 są związane z tworzeniem chromatyny aktywnej transkrypcyjnie - euchromatyny. Odwrotnie, metylowany DNA oraz deacetylacja i metylacja Lys9H3 decydują o powstaniu chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie - heterochromatyny [Gilbert i in. 2003, Li 2002, Singh i Georgatos 2002]. Takie wzajemne synergistyczne powiązanie tworzy pętle zwrotne, które zapewniają stabilną aktywację lub dezaktywację transkrypcyjną domen chromatynowych (Ryc. 12). Przełączanie pomiędzy tymi dwoma stanami nie jest przypadkowe ponieważ wzajemnie wzmacniające się modyfikacje przeciwdziałają przypadkowości [Jaenisch i Bird 2003].



Rycina 12. Wzajemne powiązania mechanizmów epigenetycznych. Metylacja DNA (metyl-CpG) jest stymulowana przez metylowaną lizynę 9 histonu H3 (metyl-Lys9H3), a sama z kolei stymuluje zarówno deacetylację (deacetyl-Lys9H3), jak i metylację lizyny 9 histonu H3 (metyl-Lys9H3), które to modyfikacje wzajemnie się wykluczają [Głuszak i in. 2008].

Do niedawna nieodwracalność reakcji metylacji DNA uważano za dogmat, podobnie jak ideę biernego utrzymywania wzoru metylacji DNA w komórkach somatycznych. Sądzono, że wzór ten pozostaje niezmienny w życiu pozapłodowym, co sugerowałoby, że nie pełni on żadnej roli w odpowiedziach adaptacyjnych [D'Alessio i Szyf 2006]. Chociaż możliwe jest usunięcie grup metylowych w komórkach dzielących się drogą pasywnej demetylacji po zablokowaniu DNMT1 podczas syntezy DNA, to mechanizm ten nie może być odpowiedzialny za demetylację DNA w pełni zróżnicowanych komórkach postmitotycznych. Metylacja może jednak funkcjonować jako aktywny sygnał biologiczny w komórkach zróżnicowanych, ponieważ istnieje możliwość zmiany wzoru metylacji w sposób niezależny od replikacji DNA [Ramchandani i in. 1999]. W zróżnicowanych komórkach obserwuje się aktywną demetylację katalizowaną przez demetylasy DNA (Ryc. 11). Silnie metylowane geny genomu ojcowskiego ulegają gwałtownej demetylacji w zygocie w kilka godzin po zapłodnieniu, jeszcze przed pierwszą rundą replikacyjną [Oswald i in. 2000]. Ta aktywna demetylacja jest również specyficzna genowo i dotyczy m. in. locus Ig w dojrzewających komórkach B, genu α -aktyny w komórkach mięśniowych, genu miozyny w różnicujących się mioblastach i in. Sugeruje się, że aktywna demetylacja DNA jest katalizowana przez enzymy o aktywności demetylującej, takie jak białko MBD2 czy glikozylaza 5-metylocytozyny [Bird 2002]. Powyższe obserwacje nie wykluczają jednak roli pasywnej demetylacji w kształtowaniu wzoru metylacji cytozyn DNA [D'Alessio i Szyf 2006].

Modyfikacje epigenetyczne, w szczególności metylacja DNA, są odpowiedzialne za tzw. imprinting genomowy i inaktywację jednego chromosomu X u płci żeńskiej. Cechą wspólną tych mechanizmów jest monoalleliczna ekspresja genów. Inaktywacja chromosomu

X (lionizacja) w komórkach somatycznych jest losowa. Wybór chromosomu X i inicjacja procesu inaktywującego uwarunkowane są ekspresją Xist RNA (ang. *X-inactive specific transcript*) - niekodującego RNA transkrybowanego z nieaktywnego chromosomu. Utrzymanie piętna genomowego i inaktywacji chromosomu X ściśle zależą od nieprzerwanej aktywności DNMT1 (a w pierwszych etapach rozwoju zarodka również jej izoformy oocytarnej) [Beard i Jaenisch 1995, Howell i in. 2001, Li i in. 1993, Panning i Jaenisch 1996]. Metylacja DNA najprawdopodobniej nie jest jednak zaangażowana w lionizację, ponieważ aktywacja genu Xist poprzedza o kilka dni metylację *de novo* wysp CpG. Metylacja DNA jest natomiast niezbędna w utrzymywaniu stanu nieaktywnego, który wymaga ciągłej ekspresji genu Xist [Csankovszki i in. 2001, Keohane i in. 1996, Wutz i Jaenisch 2000]. Usunięcie piętna i aktywna demetylacja zachodzi podczas dojrzewania pierwotnych płodowych komórek płciowych [Lee i in. 2002, Hajkova i in. 2002].

Zwiększona metylacja (hipermetylacja) sekwencji promotorowych genu jest związana z utratą funkcji genu, podobnie jak ma to miejsce w przypadku zwykłych mutacji [Jones i Baylin 2002, Robertson i Wolffe 2000]. Hipermetylacja genomu ma ogromny wpływ na funkcjonowanie komórki. Inaktywacja kluczowych genów i ścieżek biologicznych odnosi się do tak bardzo zróżnicowanych procesów jak starzenie się i choroby serca [Post i in. 1999], powoduje zaburzenia rozwojowe [Li 2002], a przede wszystkim choroby nowotworowe [Post i in. 1999, Jones i Laird 1999, Robertson 2005]. Dla tych ostatnich również istotna jest obserwowana globalna hipometylacja genomu.

4.2.2. Metylotransferazy DNA

Metylację cytozyny katalizują enzymy zwane DNA metylotransferazami (DNMT). Istnieją dwie główne klasy tych enzymów:

- 1) metylotransferazy *de novo* biorące udział w ustanowieniu wzoru metylacji podczas gametogenezy i na wczesnym etapie rozwoju oraz
- 2) enzymy odpowiedzialne za utrzymanie wzoru metylacji podczas podziału komórki, na drodze specyficznej metylacji hemimetylowanego DNA [Goll i Bestor 2005].

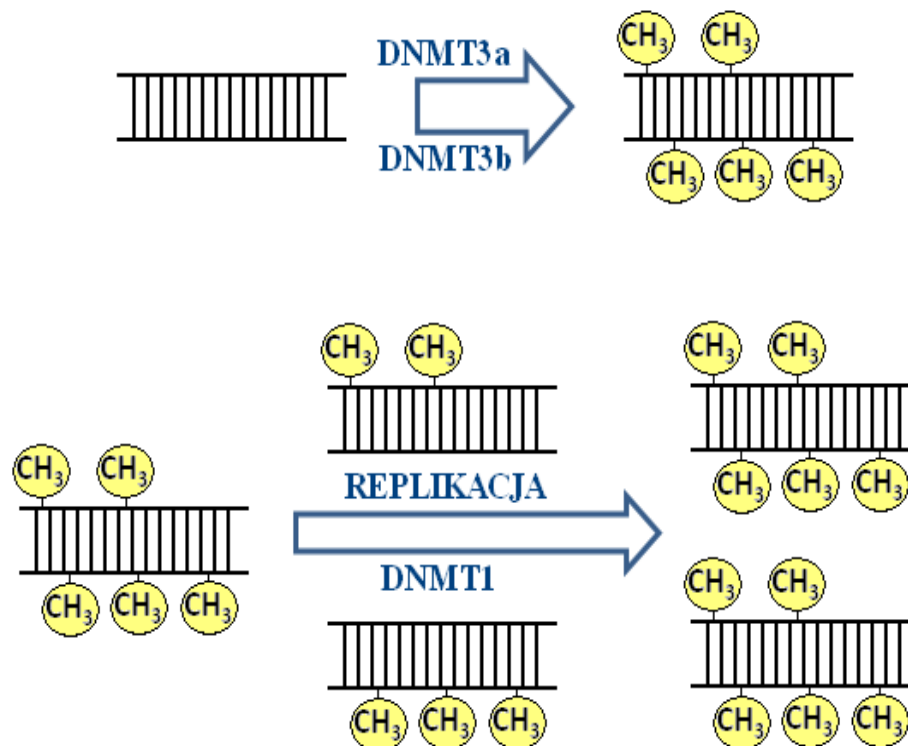
U *Eukaryota* występują trzy rodziny metylotransferaz DNA: DNMT1, DNMT2 oraz DNMT3, z których każda kontrolowana jest przez odmienne mechanizmy regulacyjne. Eukariotyczne metylotransferazy nie są specyficzne względem sekwencji w przeciwieństwie do enzymów bakteryjnych, które katalizują reakcję metylacji jedynie w obrębie określonych sekwencji [Bestor 2000, Goll i Bestor 2005]. Ich rola w metylacji była analizowana głównie poprzez analizę fenotypową efektów mutacji w genach je kodujących (Tab. 4).

Tabela 4. Fenotypy mutacji występujące w genach metylotransferaz DNA [Jaenisch i Bird 2003].

Białko	Funkcja	Fenotyp mutant
DNMT1	utrzymanie profilu metylacji	całkowita demetylacja genomu, letalność embrionów, utrata piętnowania i ekspresja genów związanych z chromosomem X; możliwe jest jednak występowanie embrionalnych komórek macierzystych z tym defektem
DNMT1	izoforma specyficzna dla oocytów	utrata piętnowania matczynego
DNMT2	metylacja w miejscach innych niż CpG w <i>Drosophila</i>	brak oczywistego fenotypu u myszy
DNMT3a DNMT3b	metylotransferazy <i>de novo</i> , ustanawianie profilu metylacji	letalność embrionów, syndrom ICF
DNMT3L	brak aktywności katalitycznej, występuje z DNMT3a i DNMT3b	nieprawidłowe piętnowanie matczynie

DNMT1 to enzym katalizujący kopiowanie wzoru metylacji podczas replikacji (DNMT-aza utrzymująca), a dwa kolejne enzymy, DNMT3a i DNMT3b to białka ustanawiające określony profil metylacji we wczesnym rozwoju zarodkowym, tzw. metylotransferazy *de novo*. Metylotransferaza utrzymująca katalizuje przyłączenie grupy metylowej preferencyjnie do hemimetylowanego DNA podczas replikacji, a metylotransferazy *de novo* mogą

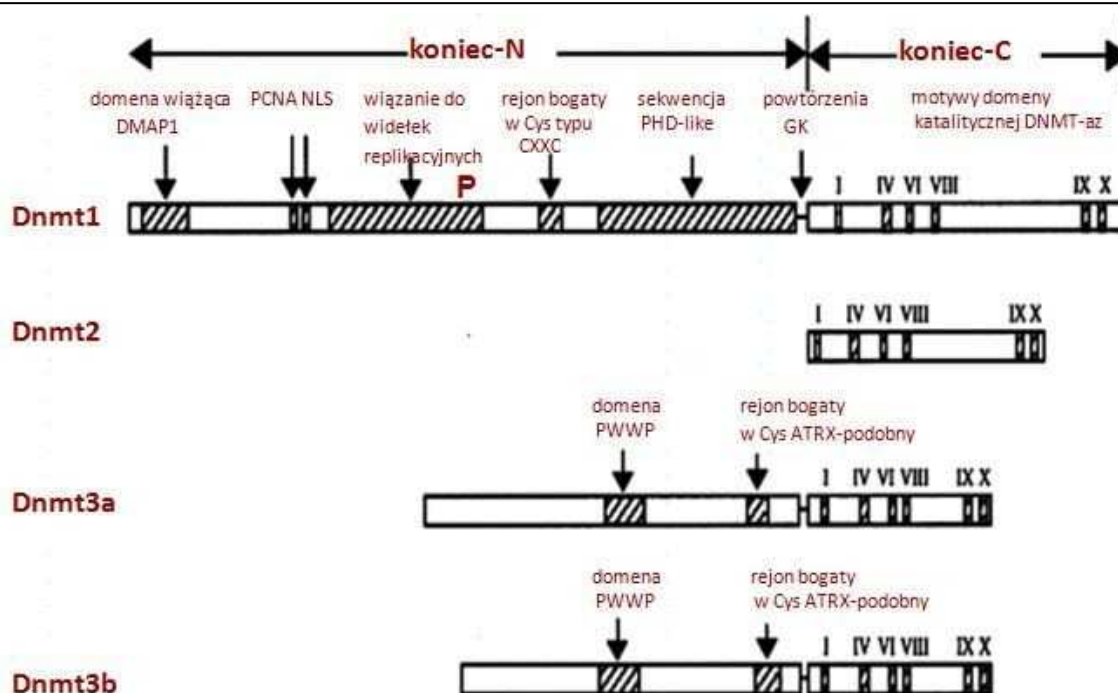
efektywnie metylować C do m⁵C po replikacji, w obrębie niemetylowanego DNA (Rys. 13) [Bestor 2000, Margot i in. 2003].



Rycina 13. DNMT3a i DNMT3b jako enzymy metylujące de novo oraz DNMT1 jako enzym utrzymujący wzór replikacji [Głuszak i in. 2008].

DNMT1, DNMT3a i DNMT3b wykazują aktywność katalityczną *in vitro* w obecności kofaktora S-adenozyl-L-metioniny (SAM, AdoMet). DNMT2 wykazuje podobieństwo do DNMT1, DNMT3a i DNMT3b, ale jej funkcja i specyficzność substratowa długo pozostawała niejasna [Okano i in. 1998]. Obecnie wiadomo, że enzym ten katalizuje metylację tRNA [Motorin i in. 2010]. Do ssaczych DNMT-az należy także DNMT3L (ang. *DNA methyltransferase 3-Like*), białko podobne do DNMT3a i DNMT3b, ale prawdopodobnie nie wykazujące aktywności metylotransferazowej.

Wszystkie znane DNMT-azy ssaków są białkami monomerycznymi posiadającymi 10 zachowanych motywów aminokwasowych charakterystycznych dla tej grupy enzymów (Ryc. 14).



Rycina 14. Ogólna struktura DNMT-az występujących u ssaków [Głuszak i in. 2008].

Wśród nich wyróżnić można motywy: II, III, V i VII, które nie występują u wszystkich DNMT-az, oraz motywy: I, IV, VI, VIII, IX i X (wysoko homologiczne), które są obecne w każdej DNMT-azie [Bestor 2000, Kumar i in. 1994, Lauster i in. 1989]. Ogólny schemat struktury metylotransferaz zakłada występowanie dwóch domen połączonych krótkim łącznikiem zbudowanym z dwuaminokwasowych powtórzeń GK (glicyna-lizyna) [Luczak i Jagodzinski 2006]. Duża domena zachowawcza znajdująca się przy końcu C zawiera miejsce wiązania S-adenozylometioniny oraz miejsce aktywne enzymu z charakterystyczną resztą cysteiny, kluczowej w czasie reakcji metylacji (donor grupy tiolowej). Znajdująca się przy końcu N polipeptydu mniejsza domena jest słabo konserwowana, przypisuje się jej funkcje regulatorowe oraz rozpoznawanie sekwencji, która ma ulec metylacji [Goll i Bestor 2005]. Oddziaływanie enzymu z docelową sekwencją następuje głównie w obrębie dużej bruzdy helisy DNA za pośrednictwem dwóch bogatych w glicynę pętli występujących w obrębie domeny N-końcowej [Klimasauskas i in. 1994]. DNMT1, DNMT3a i DNMT3b zawierają ponadto duże domeny regulatorowe przy końcu N, posiadające wiele miejsc interakcji, np. sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*, NLS).

Prokariotyczne DNA metylotransferazy są podobne pod względem wielkości do DNMT2 i mniej skomplikowane strukturalnie niż DNMT1, DNMT3a i DNMT3b. U ssaków

profil metylacji DNA jest ustanawiany i powielany przez wiele DNMT-az regulujących różne procesy w komórce.

DNMT1 jest enzymem o masie około 200 kDa złożonym z 1620 aminokwasów. Białko to zawiera przy końcu C cząsteczki domenę katalityczną o większej homologii do bakteryjnych metylotransferaz aniżeli do DNMT2, DNMT3a i DNMT3b ssaków. Domena regulatorowa przy końcu N pełni wiele funkcji, takich jak: import cząsteczki do jądra komórkowego, koordynację replikacji i metylacji podczas fazy S cyklu komórkowego (palec cynkowy odpowiadający za wiązanie DNA i domena odpowiadająca za rozpoznanie widełek replikacyjnych w fazie S cyklu komórkowego) oraz częściowe hamowanie metylacji *de novo* [Attwood i in. 2002, Bestor 2000, Robertson i Jones 2000]. Domena odpowiedzialna za rozpoznanie hemimetylowanych sekwencji znajduje się również przy końcu N [Araujo i in. 2001]. Zmiany DNMT1 u myszy powodują nieprawidłowy przebieg procesu piętnowania genów, letalność embrionów, redukcję poziomu metylacji DNA i aktywację endogennych retrowirusów [Bestor 2000, Li i in. 1992, Robertson i Jones 2000, Walsh i in. 1998].

DNMT2 jest najsilniej zachowaną i najbardziej powszechną rodziną enzymów katalizujących reakcję metylacji DNA. Metylotransferazy DNMT2 posiadają wszystkie charakterystyczne dla tej grupy enzymów motywy, z zachowaniem ich układu, jednak nie stwierdzono żadnej znaczącej aktywności katalitycznej tych białek [Goll i Bestor 2005]. Biologiczna rola tej klasy metylotransferaz nie jest jasna, aczkolwiek stwierdzono, że białka DNMT2 mają zdolność rozpoznawania specyficznych sekwencji w genomie i silnie się z nimi wiążą [Attwood i in. 2002, Motorin i in. 2010].

Rodzina DNMT3 składa się z dwóch enzymów: DNMT3a oraz DNMT3b, posiadających zdolność metylacji *de novo* reszt cytozyny w obrębie dinukleotydu CpG oraz dodatkowo CpA w przypadku DNMT3a. Do rodziny metylotransferaz DNMT3 zalicza się również białko DNMT3L, nie posiada ono jednak aktywności metylotransferazowej i funkcjonuje jedynie jako czynnik regulatorowy w komórkach generatywnych [Goll i Bestor 2005].

Metylotransferazy DNMT3a i DNMT3b są jak dotąd jedynymi zidentyfikowanymi enzymami eukariotycznymi o aktywności metylotransferazowej *de novo*. Są one spokrewnione z DNMT1 i DNMT2. Wykazują większą homologię do multispecyficznych metylotransferaz bakteriofagów infekujących rodzaj *Bacillus*. Geny *dnmt3A* oraz *dnmt3B* ulegają ekspresji w większości tkanek, ale na poziomie niższym w porównaniu do *dnmt1* [Bestor 2000, Goll i Bestor 2005]. Enzymy te ulegają wysokiej ekspresji w nieodróżnionych embrionalnych komórkach macierzystych, a ich poziom obniża się w różnicujących się

embrionalnych komórkach macierzystych i dojrzałych tkankach mysich [Bird 2002, Jaenisch i Bird 2003, Robertson i Jones 2000].

Białko DNMT3L wykazuje znaczne podobieństwa pod względem struktury ogólnej do enzymów DNMT3A oraz DNMT3B, występują jednak znaczące różnice w kluczowych sekwencjach motywów katalitycznych. DNMT3L nie posiada aktywności metylotransferazowej, ale jest niezbędne dla ustanowienia wzoru metylacji zarówno w męskich, jak i żeńskich komórkach generatywnych. Wykazano, że DNMT3L ma zdolność stymulacji aktywności katalitycznej DNMT3A, oraz, że te dwa białka współdziałają ze sobą podczas rodzicielskiego piętnowania genetycznego w komórkach generatywnych. DNMT3L jest charakterystyczne dla rozwijających się oocytów oraz prekursorów komórek macierzystych plemników (prospermatogonia), występujących przez bardzo krótki czas w okresie okołoporodowym [Goll i Bestor 2005].

Obecnie niewiele wiadomo o procesie demetylacji DNA *in vivo*, szczególnie w dojrzałych zróżnicowanych tkankach. Uważa się, że proces ten występuje powszechnie w stadium rozwijającego się zarodka, gdzie fala demetylacji poprzedzająca zapłodnienie powodują niemalże całkowitą konwersję metylocytozyny do cytozyny [Kafri i in. 1992].

Demetylacja genomowego DNA może być wynikiem dwóch odmiennych mechanizmów. Jeden z nich to tak zwana bierna demetylacja, występująca w kontekście replikacji DNA. Uważa się, że pewne czynniki wiążące DNA blokują metylację cytozyny, normalnie zachodzącą podczas fazy S cyklu komórkowego, co prowadzi do powstania w pierwszym etapie hemimetylowanego DNA, a następnie całkowitej jego demetylacji [Hsieh 2000]. Drugi mechanizm demetylacji naśladuje proces naprawy DNA i polega na enzymatycznym usunięciu m⁵C i zastąpieniu jej przez C, przeprowadzanym przez 5-MCDG (ang. *5-methylcytosine DNA glycosylase*), która występuje w kompleksie z RNA, odpowiadającym za rozpoznanie metylowanych dinukleotydów CpG [Jost i in. 1997, Zhu i in. 2001]. Aktywność glikozylazy 5-metylocytozyny posiada również białko wiążące grupę metylową MBD4 (ang. *methylcytosine binding protein*), ale enzym ten jest silnie inhibowany przez RNA [Zhu i in. 2000].

Warto nadmienić, że zjawisko demetylacji jest powszechne w czasie tumorogenezy oraz typowe dla procesu starzenia [Attwood i in. 2002]. Duże znaczenie ma tempo spontanicznych deaminacji i podziałów komórkowych. W modelowym systemie bakteryjnym stabilność 5-metylocytozyny i cytozyny jest podobna gdy komórki nie dzielą się. W ludzkich komórkach nowotworowych mutacje CpG były dużo częstsze, gdy podziały komórkowe były

stymulowane przez hormony, a także w zniszczonych tkankach podlegających regeneracji. Wiele zmian występujących w komórkach nowotworowych jest spowodowanych nie tylko przez zaburzenia genetyczne, ale również epigenetyczne [Jaenisch i Bird 2003].

Podczas kancerogenezy genom ulega jednocześnie ogólnej hypometylacji, jak i regionalnej hypermetylacji wysp CpG, co powoduje pojawienie się stanów wpływających na rozwój guzów nowotworowych [Jaenisch i Bird 2003, Robertson i Jones 2000]. Konsekwencją tego może być wyciszenie genów supresorowych, utrata piętnowania genów, aktywacja onkogenów przez demetylację, wzrost częstotliwości mutacji punktowych w obrębie zmetylowanych CpG i niestabilność mikrosatelitarnego DNA [Jaenisch i Bird 2003]. Jest wiele przykładów genów, głównie supresji nowotworowej, których rejony promotorowe ulegają hypermetylacji i wyciszeniu, zwiększając tym samym możliwości przeżycia komórek nowotworowych: *pRB* (siatkówczak złośliwy), *APC* (rak jelita grubego), *BRCA1* (rak piersi), *hMLH1* (rak jelita grubego) i inne. Trzeba jednak stwierdzić, że nie ma pełnej zgodności co do bezpośredniej roli metylacji DNA w kancerogenezie. Obecność hipermetylowanych alleli genów supresorowych najprawdopodobniej odzwierciedla ogólny defekt w utrzymaniu niezmetylowanych wysp CpG [Robertson i Jones 2000].

W ludzkich guzach stwierdzono nadekspresję zarówno DNMT1, jak i rodziny DNMT3, co może przyczyniać się do ogólnej nieprawidłowości procesu metylacji w komórkach nowotworowych. Jednakże wzrost ekspresji DNMT jest najprawdopodobniej tylko częściowo odpowiedzialny za obserwowane zaburzenia metylacji, ponieważ nie wszystkie guzy wykazują nadekspresję tych enzymów [Robertson i Jones 2000].

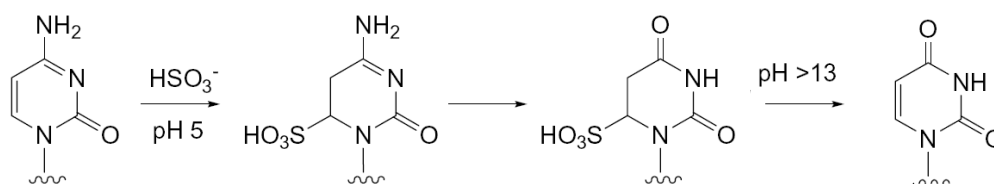
4.2.3. Metody oznaczania 5-metylocytozyny

Metylacja cytozyny w DNA i powstanie m^5C powoduje wyłączenie (inhibicję) niektórych genów supresorowych poprzez zmiany w strukturze chromosomów. Analiza genów związanych z nowotworami pozwala na ich podział według wzoru rozkładu metylacji [Nakao 2001]. Do tego celu wykorzystano enzymy restrykcyjne oraz chemiczną modyfikację m^5C tiosiarczynem sodowym, która powoduje deaminację C (nie m^5C). W związku z tym stosując łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) można zauważyć różnice w sekwencji związane z metylacją. Z enzymów restrykcyjnych najczęściej wykorzystuje się MspI, enzym hydrolizujący DNA zawierający m^5C oraz HpaII, który jest nieaktywny względem tych sekwencji. Metoda ta jest przydatna, ale do jej zastosowania konieczna jest znajomość sekwencji nukleotydowej określonego genu. Technikę tą stosuje się głównie do analizy pojedynczych genów.

Obecnie znanych jest wiele technik jakościowego i ilościowego oznaczania 5-metylocytozyny. Można je podzielić na techniki pozwalające na globalną analizę m^5C w całym genomie oraz techniki specyficznej analizy pojedynczych genów [Sulewska i in. 2007]. Opisane metody analizy wzoru metylacji w całym genomie wymagają jednak dużych ilości wyjściowego DNA, co znacznie utrudnia analizę materiału ludzkiego [Brena i in. 2006]. Wybierając metodę analizy m^5C należy wziąć pod uwagę rodzaj, ilość i jakość analizowanej próbki oraz dostępność specjalistycznego sprzętu. Najłatwiej dostępnym materiałem do badań są płyny ustrojowe, ale, jako że zawierają znikome ilości nowotworowo zmienionego DNA, wybrana metoda analizy musi charakteryzować się dużą czułością. Musi być ona również wystarczająco specyficzna, aby zagwarantować rozróżnienie zmian wzoru metylacji wynikających z transformacji nowotworowej od zmian normalnie występujących podczas wzrostu i różnicowania komórek normotypowych [Sulewska i in. 2007].

Pierwsza generacja testów wykrywających obecność 5-metylocytozyny w genomowym DNA opierała się na wykorzystaniu enzymów restrykcyjnych wrażliwych na metylację. Takie metody posiadają jednak wiele ograniczeń, poczynając od możliwości monitorowania wzoru metylacji jedynie w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez dany enzym do częstych fałszywie pozytywnych wyników oraz trudności w rozróżnieniu małej liczby metylowanych alleli od artefaktu wynikającego z niekompletnej restrykcji [Herman i in. 1996].

Innym podejściem do analizy metylacji genomowej (metylomu) jest chemiczna modyfikacja cytozyny do uracylu w reakcji z tiosiarczynem sodu. Reakcja ta jest podstawą wielu technik analizy metylacji DNA. W czasie reakcji z tiosiarczynem sodu w kwaśnym pH następuje przeniesienie grupy sulfonowej na C6 cytozyny, a następnie hydrolityczna deaminacja (Ryc. 15). Zmiana środowiska na alkaliczne wymusza transformację produktu przejściowego do uracylu na skutek desulfonacji. 5-metylocytozyna również może reagować z tiosiarczynem sodu dając tyminę, jednak wydajność tej reakcji jest znacznie niższa, tak że reakcja ta może być traktowana za statystycznie nieistotną. Zasady purynowe oraz szkielet fosfodiesterowy występujące w genomowym DNA są niewrażliwe na tiosiarczyn sodu [Tanaka i Okamoto 2007, Wang i in. 1980].



Rycina 15. Reakcja deaminacji cytozyny z użyciem tiosiarczynu sodu. Reakcja przebiega w kolejności: przeniesienie grupy sulfonowej na C6 cytozyny, hydrolityczna deaminacja oraz alkaliczna desulfonacja [Tanaka i Okamoto 2007].

Całkowita deaminacja cytozyny może nastąpić przy zastosowaniu kilku kombinacji temperatury i czasu reakcji. Reakcja zachodzi najszybciej w temperaturze 55°C z całkowitą konwersją cytozyny do uracylu w czasie 4 do 18 godzin (4h: $99.48 \pm 0.39\%$; 18h: $99.65 \pm 0.52\%$). W temperaturze 95°C ponad 98% cytozyn jest deaminowanych w czasie 1 godziny ($98.05 \pm 2.2\%$). Nadmierne wydłużanie czasu reakcji prowadzi do degradacji DNA. Dochodzi wówczas do przecięcia wiązania N-glikozydowego i tworzenia się miejsc apurynowych [Grunau i in. 2001, Reeben i Prydz 1994, Tanaka i Okamoto 2007]. W warunkach alkalicznych dochodzi następnie do hydrolizy DNA, wprost proporcjonalnej do zastosowanej temperatury. Na ogół jednak pozostała część DNA wystarcza do przeprowadzenia reakcji PCR [Grunau i in. 2001, Tanaka i Okamoto 2007].

4.2.3.1. Analiza metylacji pojedynczego genu

MSRE - trawienie enzymami restrykcyjnymi wrażliwymi na metylację

MSRE (ang. *methylation-sensitive restriction enzyme digestion*) jest tradycyjną metodą detekcji metylacji wykorzystującą endonukleazy restrykcyjne wrażliwe na metylację. Po trawieniu enzymami restrykcyjnymi wzór metylacji może być analizowany przy pomocy PCR lub Southern blot. Podejście wykorzystujące PCR opiera się na założeniu, że amplifikacja przy użyciu starterów oskrzydających miejsce restrykcyjne nastąpi jedynie wtedy, gdy cięcie jest inhibowane przez metylację. Produkty amplifikacji analizowane są na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny i oznaczane densytometrycznie [Melnikov i in. 2005].

MSP - reakcja PCR specyficzna dla metylacji

MSP (ang. *methylation specific PCR*) jest szybką metodą dającą wynik jakościowy. Metoda ta wymaga modyfikacji DNA przy użyciu tiosiarczynu sodu wywołującej zależne od metylacji zmiany w sekwencji DNA (deaminacja C, bez wpływu na m⁵C). Zmodyfikowany DNA jest następnie powielany (amplifikowany) w obecności dwóch zestawów starterów (ang. *primers*) zaprojektowanych tak, aby rozróżnić sekwencje metylowane od niemetylowanych [Fraga i Esteller 2002].

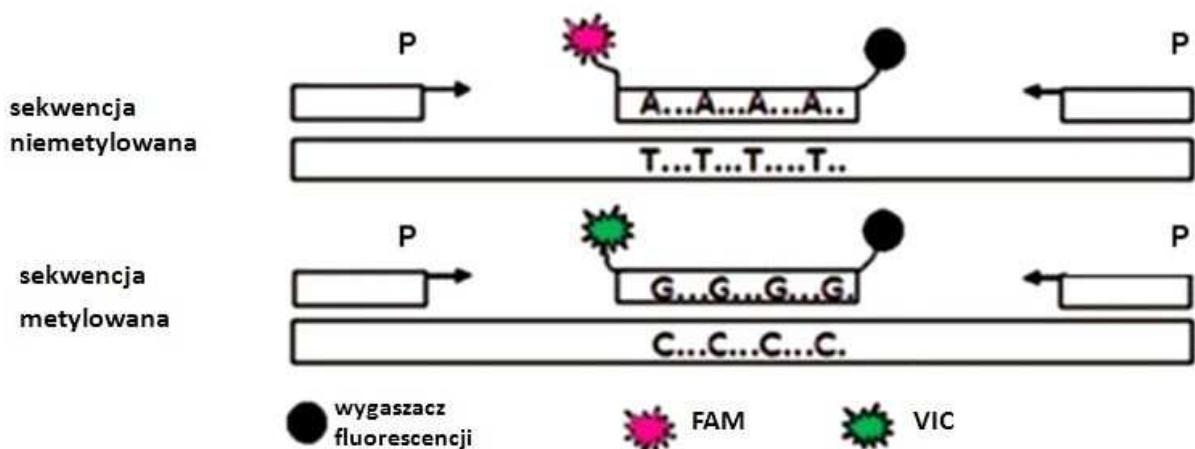
METHYLIGHT

- specyficzna dla metylacji reakcja PCR z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym

Methylight jest wysoce przepustową metodą analizy metylacji DNA, opartą na reakcji PCR z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR*). DNA poddawany jest najpierw reakcji z tiosiarczynem sodu, a następnie amplifikowany przy pomocy pary starterów oskrzydających miejsce wiązania sondy oligonukleotydowej. Sonda ma przy końcu 5' fluorochrom – tzw. *reporter* (np. 6FAM) i cząsteczkę wygaszającą fluorescencję - tzw. *quencher* (np. TAMRA) przy końcu 3'. Bliskie sąsiedztwo obu cząsteczek powoduje wygaszanie fluorescencji wzbudzonego fluorochromu. Na etapie elongacji następuje hydroliza sondy przez polimerazę *Taq* posiadającą aktywność 5' → 3' egzonukleazy, wskutek czego fluorofor zostaje oddzielony od wygaszacza i obserwuje się fluorescencję [Eads i in. 2000, Ogino i in. 2006].

QAMA - ilościowa analiza metylowanych alleli

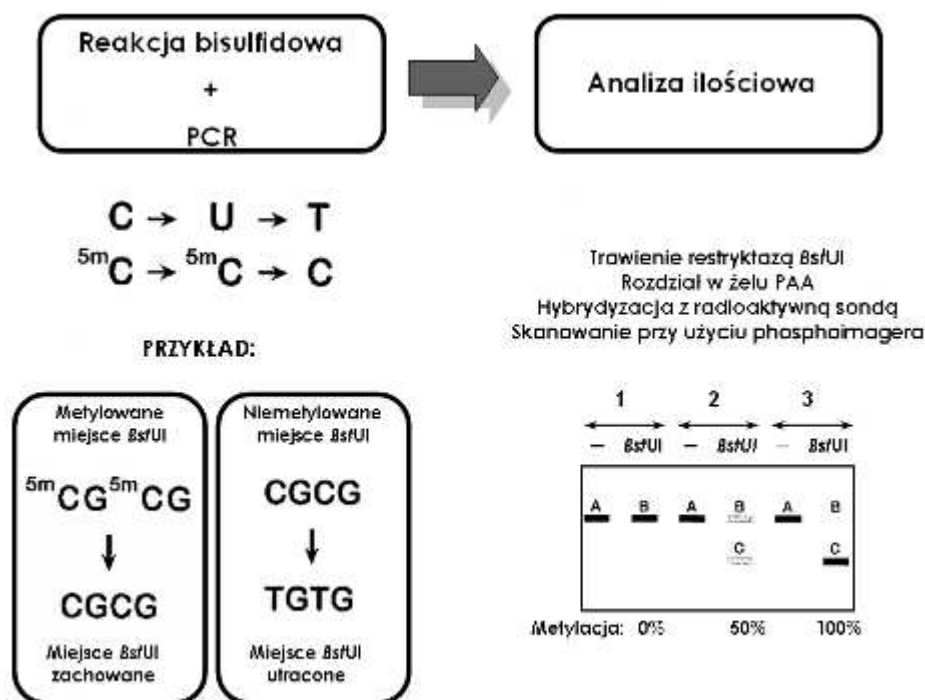
Metoda detekcji metylacji QAMA (ang. *quantitative analysis of methylated alleles*) opiera się na reakcji PCR z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond wiążących się z mniejszą bruzdą DNA (ang. *Minor Groove Binding*, MGB). QAMA (Ryc. 16) jest modyfikacją metody MethyLight i pozwala na stosowanie krótszych sond (12–17-nukleotydowych). Sondy takie są optymalne do wykrywania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP), ponieważ są one mało stabilne ze względu na występowanie niesparowanych nukleotydów w miejscu hybrydyzacji [McChlery i Clarke 2003, Zeschnigk i in. 2004].



Rycina 16. Schemat detekcji metylacji metodą QAMA. DNA modyfikowane tiosiarczynem sodu amplifikuje się przy pomocy jednego zestawu starterów. Detekcja metylacji odbywa się na etapie hybrydyzacji sondy. Sonda wyznakowana fluorochromem FAM jest komplementarna do sekwencji niesymetylowanej, a sonda VIC do sekwencji symetylowanej [Zeschnigk i in. 2004].

COBRA – metoda bisulfidowa połączona z analizą restrykcyjną

COBRA (ang. *combined bisulfite restriction analysis*) jest dobrą metodą do analizy ilościowej poziomu metylacji specyficznych loci. Procedura obejmuje reakcję z tiosiarczynem sodu, amplifikację PCR oraz trawienie enzymami restrykcyjnymi (Ryc. 17). Kombinacja reakcji bisulfidowej z PCR powoduje konwersję cytozyny do tyminy, a metylocytozyny do cytozyny. Zabieg ten prowadzi do powstania nowych miejsc restrykcyjnych lub zachowania już istniejących. Startery do reakcji amplifikacji dobierane są tak, aby nie zawierały dinukleotydów CpG, dzięki czemu metylacja DNA nie ma wpływu na przebieg reakcji PCR [Fraga i Esteller 2002, Xiong i Laird 1997].



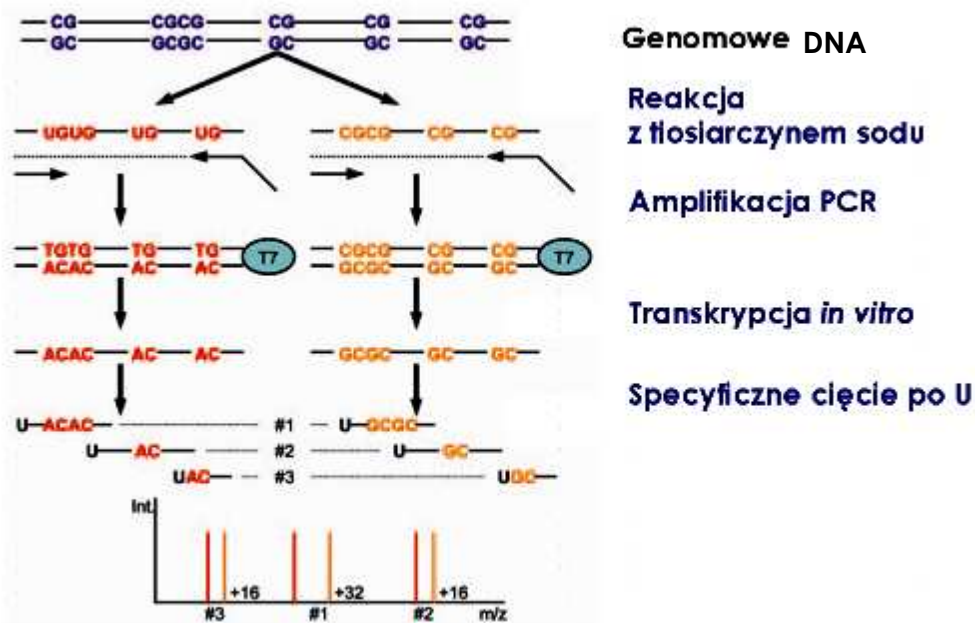
Rycina 17. Schemat metody COBRA. Obejmuje ona reakcję z tiosiarczynem sodu, amplifikację PCR, trawienie restryktazą BstUI, rozdzielanie w żelu poliakrylamidowym, przeniesienie na membranę nylonową oraz hybrydyzację z sondą wyznakowaną radioaktywnie. Wizualizacji dokonują się po skanowaniu membrany za pomocą phosphoimagera [Xiong i Laird 1997].

MALDI-TOF MS

– spektrometria mas metodą desorpcji laserowej z udziałem matrycy

oraz analizą czasu przelotu

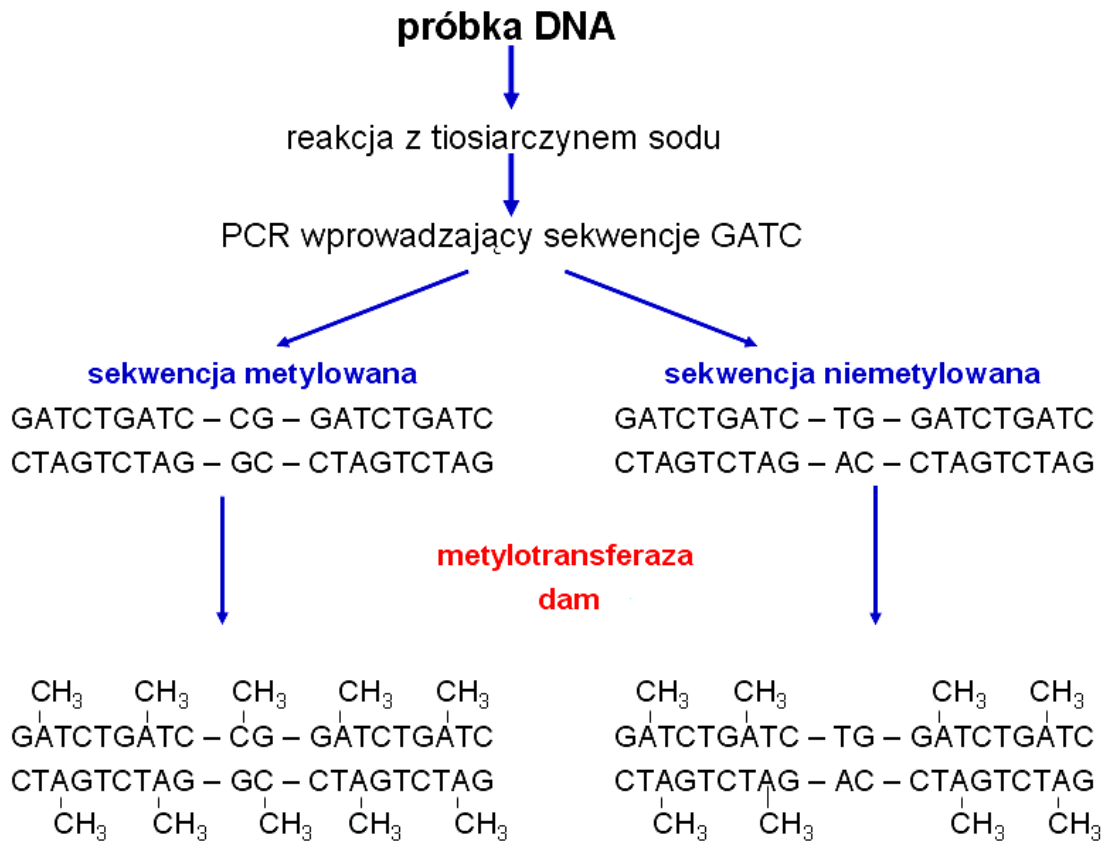
Analiza metylacji metodą spektrometrii mas z laserową desorpcją z matrycy bazuje na DNA modyfikowanym tiosiarczynem sodu. DNA po reakcji bisulfidowej jest amplifikowany w reakcji PCR i transkrybowany *in vitro* (Ryc. 18). Startery do reakcji PCR muszą być tak dobrane, aby nie faworyzować amplifikacji metylowanych/niemetylowanych sekwencji. Dlatego region hybrydyzacji startera powinien być wolny od dinukleotydów CpG. Dodatkowo jeden ze starterów wprowadza do amplifikowanej sekwencji region promotorowy dla polimerazy T7. Otrzymany jednoniciowy RNA jest następnie poddawany hydrolizie endorybonukleazą tnącą specyficznie sekwencję DNA po wybranym nukleotydzie [Ehrich i In. 2005].



Rycina 18. Schemat analizy metylacji przy pomocy MALDI-TOF MS. Produkt PCR po transkrypcji *in vitro* poddany jest specyficjnej reakcji hydrolizy U przy końcu 3'. Zaznaczona na żółto metylowana matryca DNA niesie zawsze reszty cytozyny, które w wyniku odwrotnej transkrypcji będą reprezentowane przez reszty G. Niemetylowana sekwencja DNA, zaznaczona na czerwono, utraciła reszty C, które zostały zastąpione resztami U. Skutkiem tego jest obecność reszt A w odwrotnym transkrypcie w pozycji odpowiadającej C wyjściowej sekwencji DNA. Zmiany sekwencji obserwowane są na chromatogramie w postaci przesunięcia piku masowego. Zmiana reszty G na A w analizowanej sekwencji powoduje przesunięcie piku masowego o 16 Da. W obrębie produktu nr 1 występują dwie reszty m^5C jako że pik masowy przesunął się o 32 Da względem piku referencyjnego [Ehrich i in. 2005].

ERMA – enzymatyczna analiza metylacji

ERMA (ang. *enzymatic regional methylation assay*) jest dobrą techniką do ilościowej oceny metylacji w obrębie określonej sekwencji [Galm i in. 2002]. Analizowana sekwencja DNA po uprzedniej reakcji z tiosiarczynem sodu jest amplifikowana przy pomocy starterów komplementarnych do sekwencji wolnej od dinukleotydów CpG, co gwarantuje niezależność reakcji PCR od metylacji (Ryc. 19).



Rycina 19. Schemat metody ERMA. DNA traktowany tiosiarczynem sodu poddawany jest reakcji PCR z wykorzystaniem starterów wprowadzających do amplifikowanej sekwencji dwa razy powtórzony oligonukleotyd GATC. Następnie przeprowadza się dwie rundy reakcji metylacji in vitro. Metylotransferaza SssI dołącza grupę metylową CH₃* (izotop ³H) do reszt cytozyny, a metylotransferaza dam dołącza grupę C*H₃ (izotop ¹⁴C) do adeniny w obrębie sekwencji GATC. Analizę metylacji przeprowadza się na podstawie porównania odczytu licznika scyntylicyjnego dla izotopów ³H i ¹⁴C [Galm i in. 2002].

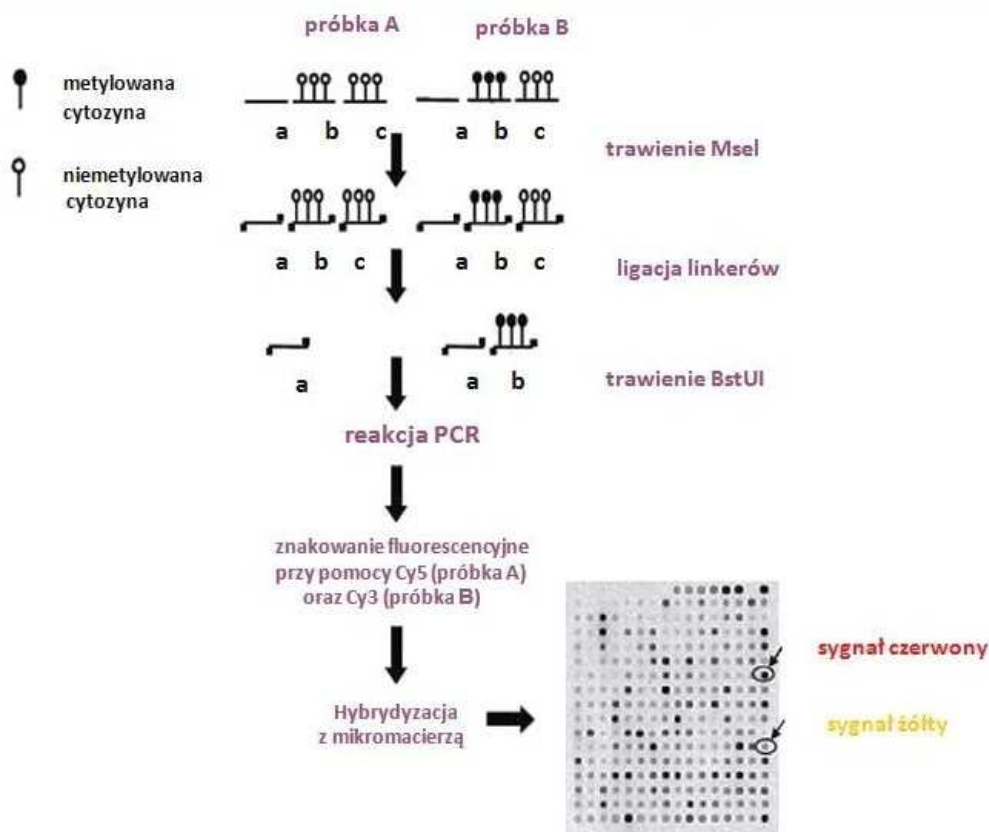
4.2.3.2. Analiza całkowitej metylacji genomu

Sekwencjonowanie genomu metodą bisulfidową

Metoda bisulfidowa oparta jest na selektywnej deaminacji cytozyny do uracylu podczas reakcji jednoniciowego genomowego DNA z tiosiarczynem sodu, a następnie sekwencjonowaniu produktów reakcji PCR [Frommer i in. 1992, Grunau i in. 2001]. Podczas reakcji amplifikacji metylacja DNA ulega wymazaniu, ponieważ polimeraza DNA nie rozróżnia cytozyny od 5-metylocytozyny. Dzięki reakcji z tiosiarczynem sodu powstały podczas amplifikacji PCR z cytozyny uracyl jest konwertowany do tyminy [Tanaka i Okamoto 2007]. 5-metylocytozyna nie ulega tej reakcji i dlatego jest identyfikowana jako amplifikowana cytozyna [Beier i in. 2007, Grunau i in. 2001].

DMH – mikromacierzowa analiza metylacji

Metoda DMH (ang. *differential methylation hybridization*) wykorzystuje technologię mikromacierzy, co pozwala na analizę metylacji całego genomu w niezwykle krótkim czasie. Podstawą metody jest biblioteka wysp CpG dla ludzkiego genomu licząca ok. 8000 sekwencji. Sekwencje wysp CpG zostały określone za pomocą chromatografii powinowactwa na kolumnie zawierającej domenę wiążącą 5-metylocytozynę, pochodzącą z białka szczura MeCP2 [Cross i in. 1994]. W pierwszym etapie analizy genomowej DNA izolowany z dwóch odmiennych próbek poddawany jest trawieniu endonukleazą *MseI* w celu otrzymania krótkich fragmentów liczących 100 - 200 bp (Ryc. 20). Trawienie to nie narusza integralności wysp CpG, jako że enzym *MseI* rozpoznaje i przecina sekwencję TTAA. Następnie za pomocą ligazy przyłączane są krótkie linkery i tak otrzymane fragmenty DNA są ponownie hydrolizowane za pomocą endonukleazy *BstUI* wrażliwej na metylację [Ho i Tang 2007].



Rycina 20. Schemat analizy wzoru metylacji metodą DMH. Wynik analizy odczytywany jest z mikromacierzy. Sondy do których hybrydują jedynie amplikony próbki A dają sygnał czerwony, punkty do których hybrydują jedynie amplikony próbki B - sygnał zielony. Żółty sygnał świadczy o jednakowej ilości amplikonów A i B hybrydujących do danej sondy i świadczy o braku różnic w poziomie metylacji danego loci między obiema próbkami [Ho i Tang 2007].

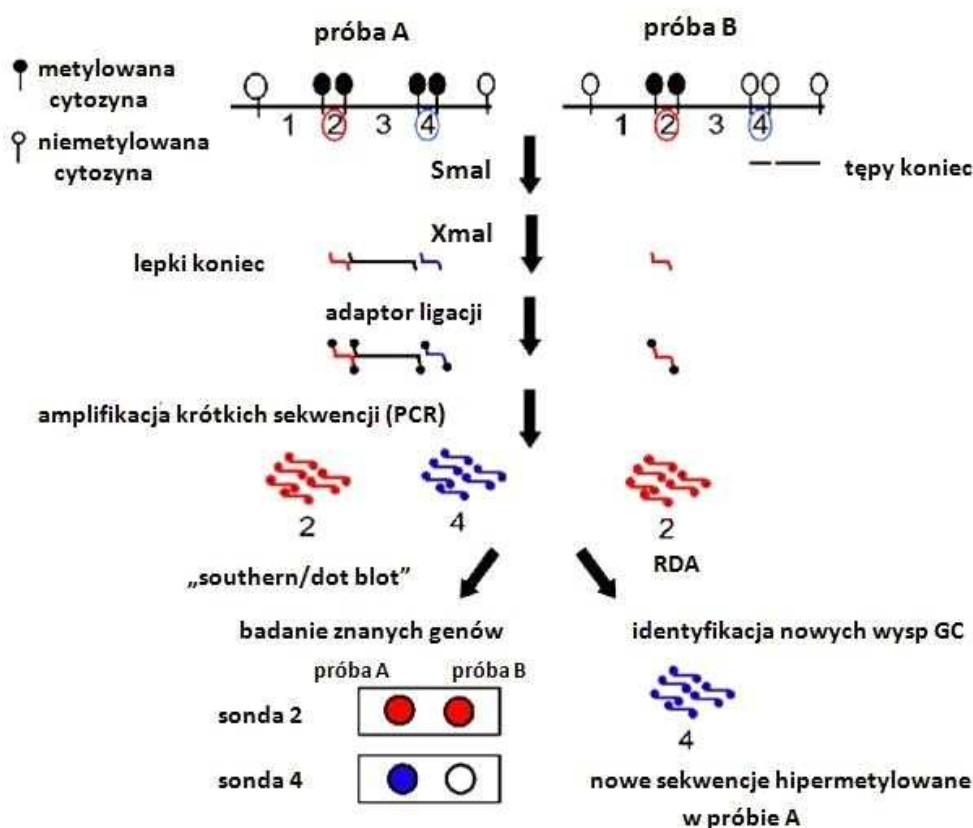
MSO - analiza mikromacierzowa specyficzna dla metylacji

MSO (ang. *m*ethylation-*s*pecific *o*ligonucleotide *m*icroarrays) jest metodą alternatywną do sekwencjonowania genomu modyfikowanego tiosiarczynem. Dzięki wykorzystaniu mikromacierzy jest to metoda o dużej przepustowości, pozwalająca na porównanie poziomu metylacji wielu wysp CpG w jednym eksperymencie. Jednak ze względu na możliwość analizy zaledwie kilku próbek jednocześnie jest to metoda mało przydatna do oceny dużej ilości próbek klinicznych w laboratoriach diagnostycznych. Metoda MSO wymaga ok. 2 - 3 μ g genomowego DNA. Badany DNA jest poddawany trawieniu dwoma enzymami restrykcyjnymi: *KpnI* oraz *NdeI*, a następnie modyfikowany przy pomocy tiosiarczynu sodu, amplifikowany i znakowany fluorochromem Cy5. Tak przygotowaną próbkę hybryduje się do mikromacierzy z nadrukowanymi (przyłączonymi) krótkimi sondami liczącymi ok. 21 - 25 bp. Mikromacierz zawiera dwa zestawy sond będących odpowiednikami metylowanych i niemetylowanych wysp CpG. Procent metylacji danego fragmentu bogatego w pary GC

wyznacza się na podstawie stosunku intensywności fluorescencji punktów odpowiadających „metylowanym” i „niemetylowanym” sondom [Gitan i in. 2002].

MCA-RDA – amplifikacja metylowanych wysp CpG połączona z klonowaniem

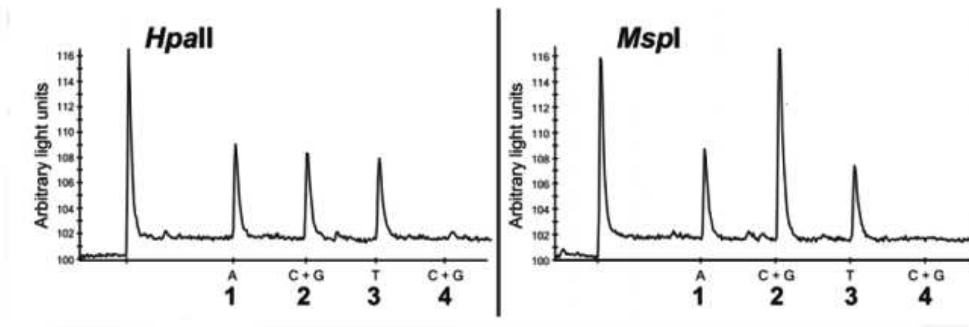
Metoda MCA-RDA (ang. *methylated CpG island amplification-representational difference analysis*) polega na amplifikacji wysp CpG, po której następuje klonowanie metodą RDA. Pozwala ona na jednoczesną identyfikację i klonowanie odmiennie metylowanych sekwencji w próbce badanej i kontrolnej. Pierwszym etapem analizy jest cięcie dwoma izoschizomerami różniącymi się wrażliwością na metylację rozpoznawanej sekwencji CCCGGG w genomowym DNA (Ryc. 21). Początkowo wykorzystuje się cięcie enzymem *SmaI*, który hydrolizuje sekwencje niemetylowane i pozostawia tępe końce. Następnie DNA hydrolizowany jest przy pomocy endonukleazy *XmaI*, rozpoznającej sekwencje metylowane i generującej czteronukleotydotowe lepkie końce, do których ligowane są adaptory [Ho i Tang 2007].



Rycina 21. Schemat analizy oceny wzoru metylacji metodą MCA-RDA. Genomowy DNA poddawany jest trawieniu dwoma izoschizomerami *SmaI* i *XmaI* różniącymi się wrażliwością na metylację rozpoznawanej sekwencji. Po etapie ligacji adaptorów następuje reakcja PCR, w której specyficznie amplifikowane są metylowane wyspy CpG. Jeśli istnieje sonda dla danej sekwencji, można zbadać jej metylację techniką Southern blot lub dot blot. Dotąd niezidentyfikowane wyspy CpG mogą zostać poddane klonowaniu i sekwencjonowaniu metodą RDA [Ho i Tang 2007].

LUMA – specyficzna dla metylacji bioluminometryczna reakcja PCR

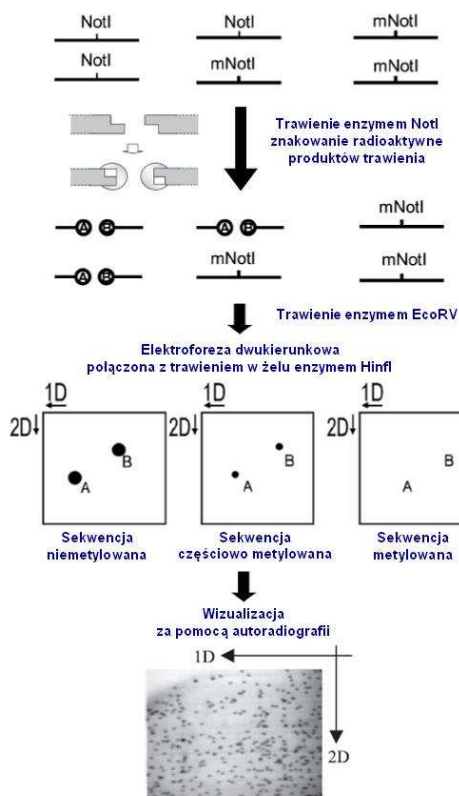
Metoda LUMA (ang. *luminometric methylation assay*) opiera się na bioluminometrycznej reakcji PCR poprzedzonej trawieniem genomowego DNA parą izoschizomerów. LUMA jest modyfikacją metody opracowanej w 1979 roku, wykorzystującej te same enzymy restrykcyjne, ale odmienną technikę detekcji - pirosekwencjonowanie [Cedar i in. 1979, Karimi i in. 2006]. Genomowe DNA poddawane jest restrykcji enzymami rozpoznającymi sekwencję CCGG i generującymi lepkie końce (5')-CG. DNA trawiony jest w dwóch równoległych reakcjach, bądź przy użyciu *HpaII* wrażliwego na metylację, lub jego izoschizomeru *MspI* tnącego sekwencje niezależnie od ich metylacji. W reakcji kontrolnej obie próby dodatkowo poddawane są trawieniu *EcoRI*, generującego wystające końce (5')-AATT. Powstałe po trawieniu enzymami restrykcyjnymi końcówki są uzupełniane w trakcie sekwencyjnej reakcji PCR, gdzie w czterech etapach dodaje się kolejno dATP α S, dGTP+dCTP, dTTP oraz dGTP+dCTP. Nieorganiczny pirofosforan (PPi) uwolniony w czasie reakcji jest wykorzystywany w reakcji syntezy ATP z adenylofosfosfianem (APS). Powstały w reakcji katalizowanej przez sulfurylazę ATP ulega dalszym przemianom. W reakcji katalizowanej przez lucyferazę następuje przekształcenie lucyferyny w lucyferolo-AMP. Następnie lucyferyna ulega utlenieniu do oksylucyferyny w stanie wzbudzonej, która przy przejściu do stanu podstawowego emituje strumień fotonów. Emitowany sygnał świetlny zostaje wychwycony przez kamerę CCD (ang. *charge coupled device*). Sygnały odpowiadające reakcji PCR w obecności dATP α S oraz dTTP reprezentują reakcję *EcoRI* i powinny być jednakowe dla próbek trawionych przy pomocy enzymów: *MspI*+*EcoRI* oraz *HpaII*+*EcoRI*. Intensywność sygnału próbki poddanej reakcji PCR w obecności dGTP+dCTP odpowiada liczbie rozciętych miejsc restrykcyjnych *MspI* lub *HpaII*. Poziom metylacji danej sekwencji wyznacza się ze stosunku intensywności sygnału próbki trawionej *HpaII* do intensywności sygnału próbki trawionej *MspI*. Jest on bliski jedności w przypadku próbek niemetylowanych i bliski zeru dla próbek metylowanych [Karimi i in. 2006, Ahmadian i in. 2006]. Przykładowe chromatogramy pirosekwencjonowania w metodzie LUMA przedstawiono na Ryc. 22.



Rycina 22. Chromatogramy pirosekwencjonowania w metodzie LUMA. Genomowy DNA poddano trawieniu enzymami *EcoRI* oraz *HpaII* lub *MspI*, a następnie sekwencyjnej reakcji PCR, gdzie w czterech krokach dodaje się kolejno inny dNTP. Intensywność sygnału luminescencji zależy bezpośrednio od liczby rozciętych miejsc restrykcyjnych i jest proporcjonalna do poziomu metylacji danej sekwencji DNA. Reakcją kontrolną jest PCR w obecności *dATPαS* oraz *dTTP*, polegający na uzupełnieniu wystających końców powstałych po trawieniu enzymem *EcoRI*. Intensywność sygnału powinna być jednakowa dla próbek trawionych *MspI+EcoRI* oraz *HpaII+EcoRI*. Ponowne dodanie *dCTP+dGTP* w kroku czwartym jest kontrolą amplifikacji w kroku drugim [Karimi i in. 2006].

RLGS –skanowanie miejsc restrykcyjnych specyficznych dla metylacji

Metoda RLGS (ang. *restriction landmark genomic scanning*) opiera się na trawieniu genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi wrażliwymi na metylację oraz rozdzieleniu fragmentów przy pomocy dwukierunkowej elektroforezy o dużej rozdzielczości. Metoda ta umożliwia analizę profilu metylacji całego genomu. Najczęściej używanym enzymem restrykcyjnym jest wrażliwa na metylację endonukleaza *NotI*, rozpoznająca sekwencje bogate w C i G. Po reakcji trawienia jej produkty są znakowane radioaktywnie przy pomocy [α - 32 P]dCTP i [α - 32 P]dGTP (Ryc. 23). Wszystkie cząsteczki są wyznakowane w jednakowym stopniu, jako że reakcja polega na uzupełnieniu powstałych w czasie trawienia *NotI* wystających końców 5'. Produkt reakcji następnie poddawany jest kolejnej reakcji trawienia innym enzymem restrykcyjnym - najczęściej jest to enzym „szóstkowy” np. *EcoRV*.



Rycina 23. Schemat analizy DNA metodą RLGS. Genomowy DNA trawione jest enzymem NotI, generującym wystające 5' końce, uzupełniane następnie przy pomocy radioaktywnie wyznakowanych dCTP i dGTP. Po trawieniu enzymem „szóstkowym” w celu wygenerowania krótszych fragmentów DNA rozdzielane jest przy pomocy dwukierunkowej elektroforezy. Po rozdzieleniu w pierwszym kierunku wykonuje się trawienie w żelu trzecim enzymem restrykcyjnym np. Hinfi. Wizualizacji dokonuje się przy pomocy autoradiografii [Ho i Tang 2007, Koike i in. 2008].

MSRF – analiza restrykcyjna specyficzna dla metylacji

MSRF (ang. methylation sensitive restriction fingerprinting) jest metodą opartą na reakcji PCR. Genomowe DNA poddaje się trawieniu enzymem *MseI*, rozpoznającym sekwencję TTAA. Miejsca restrykcyjne dla tego enzymu są niezwykle rzadko spotykane w sekwencjach bogatych w dinukleotydy CpG, dzięki temu możliwe jest trawienie genomowego DNA na mniejsze fragmenty bez naruszania integralności wysp CpG. Tak strawione DNA jest następnie dzielone na dwie próbki z których jedną poddaje się trawieniu drugim enzymem restrykcyjnym: *BstUI*, wrażliwym na metylację. Enzym *BstUI* rozpoznaje sekwencję CGCG, dlatego hydroliza następuje obrębie sekwencji bogatych w pary CpG pod warunkiem, że nie są one chronione przez metylację. Kolejnym etapem analizy jest reakcja amplifikacji PCR w obecności znakowanych radioaktywnie trójfosforanów deoksyrybonukleozydów [Davies 2002].

4.2.4. Metylacja DNA w komórkach nowotworowych

Lokalna hipermetylacja wysp CpG

Hipermetylacja związana jest z rejonami promotorowymi genów supresji nowotworowej (ang. *tumor suppressor gene*, TSG). Są to geny białek adhezyjnych i metastatycznych związane z regulacją cyklu komórkowego, apoptozy i naprawą DNA. Metylacja sekwencji promotorowej genu powoduje jego wyciszenie. Hipermetylacja jest zjawiskiem typowym dla wielu typów nowotworów, w tym guzów jelita grubego, jąder, mózgu, nerek, gruczołu sutkowego, jajnika, płuc, żołądka, a także białaczki szpikowej. Profil hipermetylacji sekwencji promotorowych zależy od typu nowotworu. Najwyższym współczynnikiem hipermetylacji charakteryzują się nowotwory jelita grubego [Luczak i Jagodzinski 2006, Esteller i in. 2001].

Jednym z genów, dla których hipermetylacja rejonu promotorowego wiąże się z rozwojem procesu nowotworowego, jest *hMLH1* kodujący białko biorące udział w naprawie niesparowanych zasad DNA. Zaburzenie metylacji wyspy CpG przy końcu 5' tego genu jest typowe dla występującego rodzinnie nowotworu okrężnicy i powoduje niestabilność satelitarnego DNA (ang. *microsatellite instability*, MSI). Zastosowanie 5-azacytydyny, inhibitora metylacji wbudowującego się podczas replikacji do DNA i wiążącego kowalencyjnie metylotransferazy, powoduje nie tylko ponowną ekspresję genu *hMLH1*, ale także przywraca zdolność naprawy niesparowanych nukleotydów w DNA [Herman i in. 1998]. Innym przykładem wpływu hipermetylacji na proces kancerogenezy jest wyciszenie transkrypcji genu *CDKN/p16* kodującego inhibitor kinaz zależnych od cyklin. Wymienione białko odgrywa kluczową rolę w ograniczaniu fosforylacji białka Rb i jego utrzymaniu w stanie aktywnym, co pośrednio wpływa na kontrolę cyklu komórkowego. Zaburzenia ekspresji genu *CDKN/p16*, wynikające z hipermetylacji jego rejonu promotorowego, są typowe dla wielu typów nowotworów, w szczególności raka okrężnicy [Herman i in. 1995].

Globalna hipometylacja wysp CpG

Hipometylacja towarzysząca transformacji nowotworowej najczęściej dotyczy sekwencji powtarzających się występujących w obrębie heterochromatyny, retrotranspozonów, a także endogennych elementów retrowirusowych. Hipometylacja może powodować niestabilność kariotypową na skutek aktywacji mobilnych elementów genomu, a

także mutagenезę insercyjną wynikającą z nieprawidłowej rekombinacji. Nieprawidłowa wymiana materiału genetycznego następuje najczęściej pomiędzy sekwencjami powtarzającymi się, które ulegają aktywacji na skutek dekondensacji heterochromatyny. Hipometylacja przyczynia się także do aktywacji transkrypcyjnej onkogenów i białek uczestniczących w przerzutach, na skutek deregulacji ekspresji genów zarówno w układzie *cis* jak i *trans*. [Ehrlich 2002b, Luczak i Jagodzinski 2006].

Badania wykorzystujące inhibitory metylacji *in vivo* i *in vitro*, a także eksperymenty z udziałem transgenicznych myszy z defektywnymi genami kodującymi metylotransferazy wskazują na ważność procesu demetylacji w czasie transformacji nowotworowej. Większość złośliwych nowotworów charakteryzuje się obniżeniem globalnego poziomu 5-metylocytozyny - w szczególności dotyczy to przerzutowego raka prostaty, przewlekłej białaczki limfatycznej, raka wątrobowokomórkowego oraz raka szyjki macicy. Wyjątkiem jest nowotwór gruczołu sutkowego, gdzie obserwuje się podwyższenie globalnego poziomu metylacji cytozyny w genomowym DNA [Ehrlich 2002a].

Procesowi nowotworzenia często towarzyszy hipometylacja sekwencji *LINE* (ang. *long interspersed nuclear elements*). Elementami *LINE* są retrotranspozony składające się powtórzonych tandemowo sekwencji, liczące ok. 6 kbp. Stanowią one ok. 15% ludzkiego genomu. Spośród ok. 4×10^5 elementów *LINE* występujących w genomie zaledwie 30 - 60 jest zdolnych do transpozycji. Jest to jednakże zjawisko stosunkowo częste podczas transformacji nowotworowej [Sassaman i in. 1997]. Innymi sekwencjami powtórzonymi często hipometylowanymi w czasie transformacji nowotworowej są elementy *Alu*. Powtórzenia *Alu* stanowią ponad 10% ludzkiego genomu. Pojedynczy element *Alu* liczy $> 10^6$ powtórzeń, a jego długość wynosi średnio ok. 0.3 kbp. Podobnie jak w przypadku sekwencji *LINE*, hipometylacja elementów *Alu* prowadzi do destabilizacji genomu i zwiększa prawdopodobieństwo mutagenезy insercyjnej [Rothberg i in. 1997]. Hipometylacji ulegają również pojedyncze geny, których produkty nie mają bezpośredniego związku z tumorogenezą. Dotyczy to na przykład genu kodującego hormon wzrostu, γ -globinę, γ -krystalinę czy gonadotropinę kosmówkową. Gruczolakorak sutka charakteryzuje się niższym poziomem metylacji w obrębie plejotropowego genu *pS2*, biorącego udział w kontroli wzrostu i podziału komórek. W przypadku białaczki limfoblastycznej obserwuje się między innymi hipometylację protoonkogenu *HOX11*. Hipometylacja może prowadzić do aktywacji tych genów i zaburzeń w obrębie proteomu [Ehrlich 2002b].

4.3. Główne czynniki modyfikujące składniki komórki

Określenie „reaktywne formy tlenu” (ang. *reactive oxygen species*, ROS) obejmuje zarówno rodniki tlenowe, jak i inne połączenia tlenu, takie jak: nadtlenek wodoru (H_2O_2), tlen singletowy, kwas podchlorawy (HOCl) oraz ozon (O_3). Są to bardzo reaktywne związki posiadające niesparowane elektrony na zewnętrznym orbitalu. Przykładem rodników tlenowych są: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$), rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$), tlenek azotu (NO^{\bullet}) (Tab. 5).

Tabela 5. Niektóre właściwości reaktywnych form tlenu [Bartosz 1995].

Cząsteczka	Symbol	Charakterystyka
Anionorodnik ponadtlenkowy	$O_2^{\bullet-}$	dobry reduktor, słaby utleniacz
Rodnik hydroksylowy	$\bullet OH$	wysoce aktywny, dyfunduje na niewielkie odległości
Rodnik wodoronadtlenkowy	HO_2^{\bullet}	silny utleniacz o większym powinowactwie do lipidów niż $O_2^{\bullet-}$, może inicjować peroksydację lipidów
Rodnik nadtlenkowy	ROO^{\bullet}	słaba zdolność do utleniania, ale dobra dyfuzja
Rodnik alkoksylowy	RO^{\bullet}	reaktywność względem lipidów (pomiędzy ROO^{\bullet} i $\bullet OH$)
Nadtlenek wodoru	H_2O_2	utleniacz, lecz reakcje z substratami organicznymi powolne; łatwo dyfunduje
Tlen singletowy	1O_2	silny czynnik oksydacyjny o okresie półtrwania $10^{-6}s$

Obecnie panuje przekonanie, że ekspozycja komórek na różne związki chemiczne (np. występujące w dymie tytoniowym) prowadzi do uszkodzenia materiału genetycznego, a następnie powstania i rozwoju nowotworów. Nie jest znany dokładny mechanizm powstawania takich uszkodzeń. Jedną z teorii wskazuje na czynniki środowiskowe odpowiedzialne za powstawanie w organizmie ROS. W wyniku ich reakcji z DNA powstają modyfikowane nukleozydy, które są bezpośrednią przyczyną mutacji. W medycynie i naukach biologicznych znany jest fakt związku wielu chorób z rodnikowymi uszkodzeniami DNA. Niezależnie od tego czy zmiany genetyczne są wrodzone, czy nabyte, nowotwór jest prawie zawsze wynikiem modyfikacji DNA, chociaż chemiczne zmiany innych składników komórki są również ważne i należy brać je pod uwagę (Ryc. 24). Jest to zrozumiałe, ponieważ

ROS (składniki kawy, herbaty, ozon atmosferyczny, czynniki dezynfekujące) znajdują się w otoczeniu człowieka. Ponadto anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$), rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$), rodnik nadtlenkowy (RO_2^{\bullet}) czy tlenek azotu powstają również w cytoplazmie komórek ludzkich jako normalne produkty metabolizmu komórkowego [Bartosz 1995, Bohr 2002, Dizdaroglu i in. 2002, Oliński i Jurgowiak 1996, Podmore i in. 1998] (Tab. 6).

Tabela 6. Endogenne źródła reaktywnych form tlenu.

Źródło ROS (enzym lub system)	Produkt
1. Fosforylacja oksydacyjna w mitochondriach	$O_2^{\bullet-}$
2. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)	H_2O_2
3. Oksydaza monoaminowa	H_2O_2
4. Oksydaza ksantynowa	$O_2^{\bullet-}$, H_2O_2
5. Oksydaza NADPH neutrofilii	$O_2^{\bullet-}$
6. Reakcja Fentona (z udziałem jonów Fe^{+2} i Cu^{+1})	$\bullet OH$
7. Syntaza tlenu azotu	NO^{\bullet}

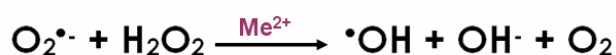
Wiele danych wskazuje na to, że utlenione (uszkodzone) makrocząsteczki stanowią przyczynę wielu chorób, także nowotworowych (Tab. 7). Dotyczy to takich schorzeń, jak: cukrzyca, choroby układu sercowo-naczyniowego, miopatie i encefalopatie [Kasprzak i in. 1997, Jurgowiak i Oliński 1997, Oliński i in. 2002, Oliński i in. 2007, Oliński i Jurgowiak 1999b, Oliński i Jurgowiak 2002]. W związku z powyższym analiza produktów wolnorodnikowych modyfikacji DNA może stanowić podstawę testów laboratoryjnych wskazujących na patologiczny stan organizmu [Bartosz 1995, Bohr 2002, Dizdaroglu i in. 2002, Oliński i Jurgowiak 1996].

Każda komórka aerobowa w czasie swego metabolizmu generuje ROS (Tab. 5 i 6). Przyjmuje się, że w zdrowym organizmie dorosłego człowieka powstawać może około 2 kg anionorodnika ponadtlenkowego w ciągu roku. $O_2^{\bullet-}$ jest produktem jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu która zachodzi w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Przemiany anionorodnika ponadtlenkowego w komórce mogą prowadzić do powstania H_2O_2 , zarówno na skutek spontanicznej, jak i katalizowanej przez enzym, dysmutazę ponadtlenkową (SOD), reakcji dysmutacji.

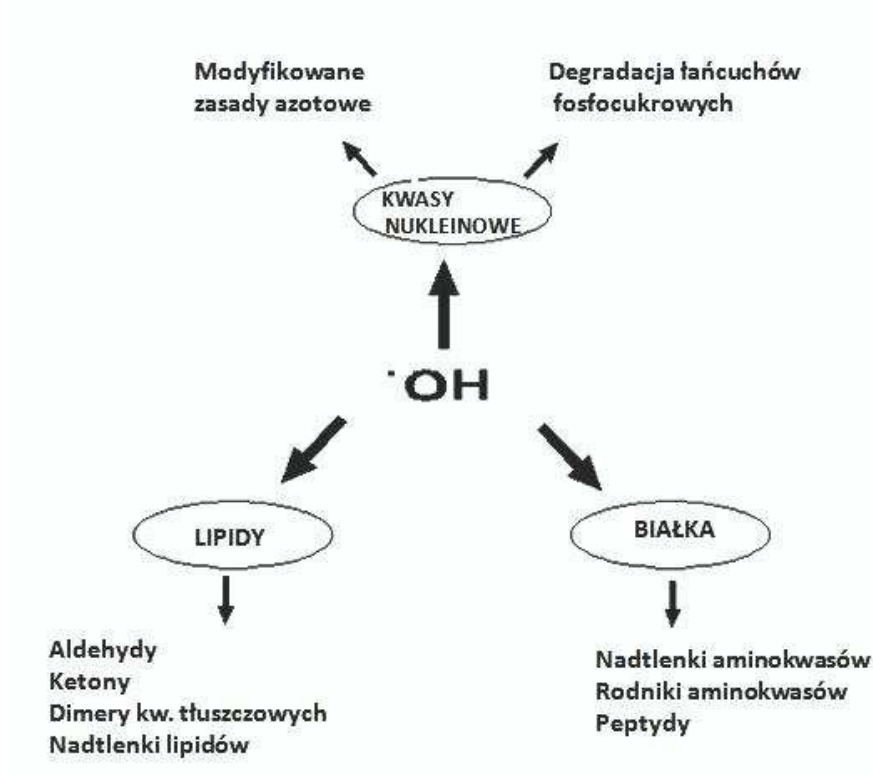
Tabela 7. Choroby, których prawdopodobną przyczyną są rodnikowe uszkodzenia (modyfikacje) DNA.

-
- *alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia*
 - *alkoholizm*
 - *autoimmunologiczne zapalenie naczyń*
 - *choroba Alzheimera*
 - *choroba Parkinsona*
 - *dna moczanowa*
 - *dysplazja oskrzelowo-płucna*
 - *dystrofia mięśniowa*
 - *hemochromatoza*
 - *kłębuszkowe zapalenie nerek*
 - *kontaktowe zapalenie skóry*
 - *lipofuscynoza*
 - *liszaj rumieniowaty układowy*
 - *malaria*
 - *marskość*
 - *miastenia*
 - *miażdżycowe stwardnienie tętnic*
 - *niedokrwistość sierpowatokomórkowa*
 - *nowotwory*
 - *ostra niedokrwistość hemolityczna wskutek zatrucia bobem*
 - *otępienie starcze*
 - *porfiria*
 - *pozasoczewkowy rozrost włóknisty*
 - *przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie błony śluzowej żołądka*
 - *reumatoidalne zapalenie stawów*
 - *rozedma płuc*
 - *starzenie się*
 - *stwardnienie rozsiane*
 - *talasemia (niedokrwistość śródziemnomorska)*
 - *udar*
 - *uszkodzenie z reperfuzji obszaru niedokrwienia (ang. ischemia-reperfusion injury)*
 - *wrzodziejące zapalenie jelita grubego*
 - *zaćma*
 - *zapalenie skórno-mięśniowe*
 - *zapalenie trzustki*
 - *zespół niewydolności oddechowej dorosłych (ang. adult respiratory distress syndrome, ARDS)*
-

Nadtlenek wodoru w warunkach *in vivo* powstaje głównie z $O_2^{\bullet-}$ w mitochondriach. H_2O_2 łatwo dyfunduje przez błony komórkowe i może być przekształcany w rodnik nawet w miejscach odległych od miejsca swego powstania. Rodnik $\bullet OH$ powstaje w komórkach w reakcji Fentona, katalizowanej przez jony metali grup przejściowych, takie jak: Fe^{2+} , Cu^{1+} lub Co^{2+} .



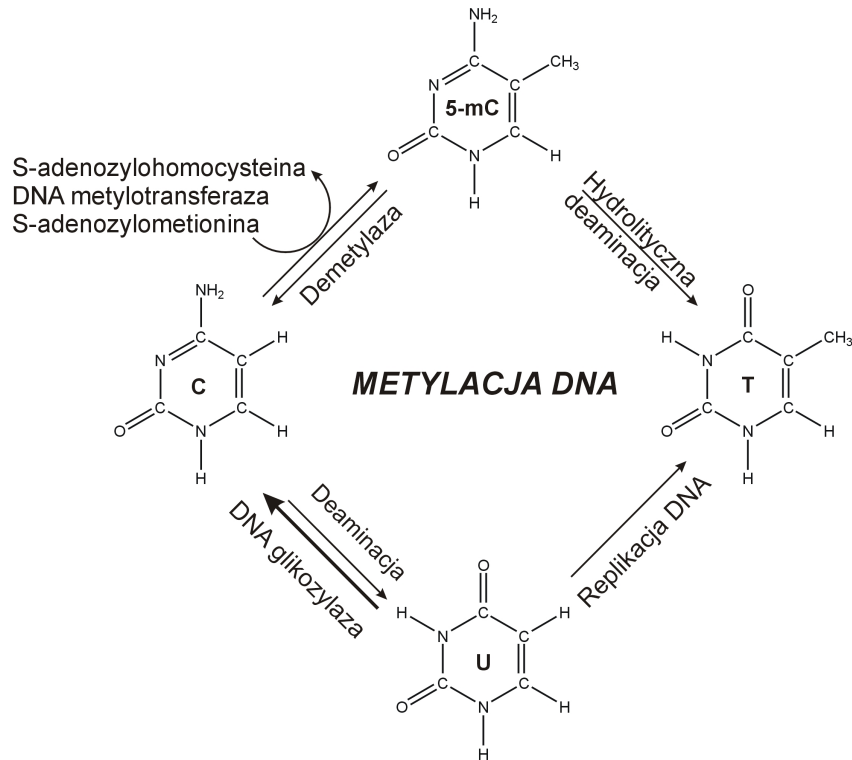
Obecność $O_2^{\bullet-}$ w komórce może prowadzić do generowania bardzo niebezpiecznego dla komórki rodnika $\bullet OH$. Wiele egzogennych czynników przenika do komórek, reaguje z endogennym nadtlenkiem wodoru (H_2O_2) i powoduje powstawanie rodników hydroksylowych. Należą do nich metale ciężkie, takie jak chrom, żelazo i nikiel. Źródłem rodników jest także dym tytoniowy, leki stosowane w terapii, a także promieniowanie jonizujące oraz UV. Z powodu wysokiej reaktywności ROS mogą modyfikować i uszkadzać białka, lipidy, węglowodany i kwasy nukleinowe (Ryc. 24). Rodniki mogą reagować z DNA powodując pęknięcia nici DNA oraz modyfikacje zasad azotowych.



Rycina 24. Reakcje rodnika hydroksylowego z lipidami, białkami i DNA komórkowym prowadzą do licznych zmian struktury i funkcji komórek.

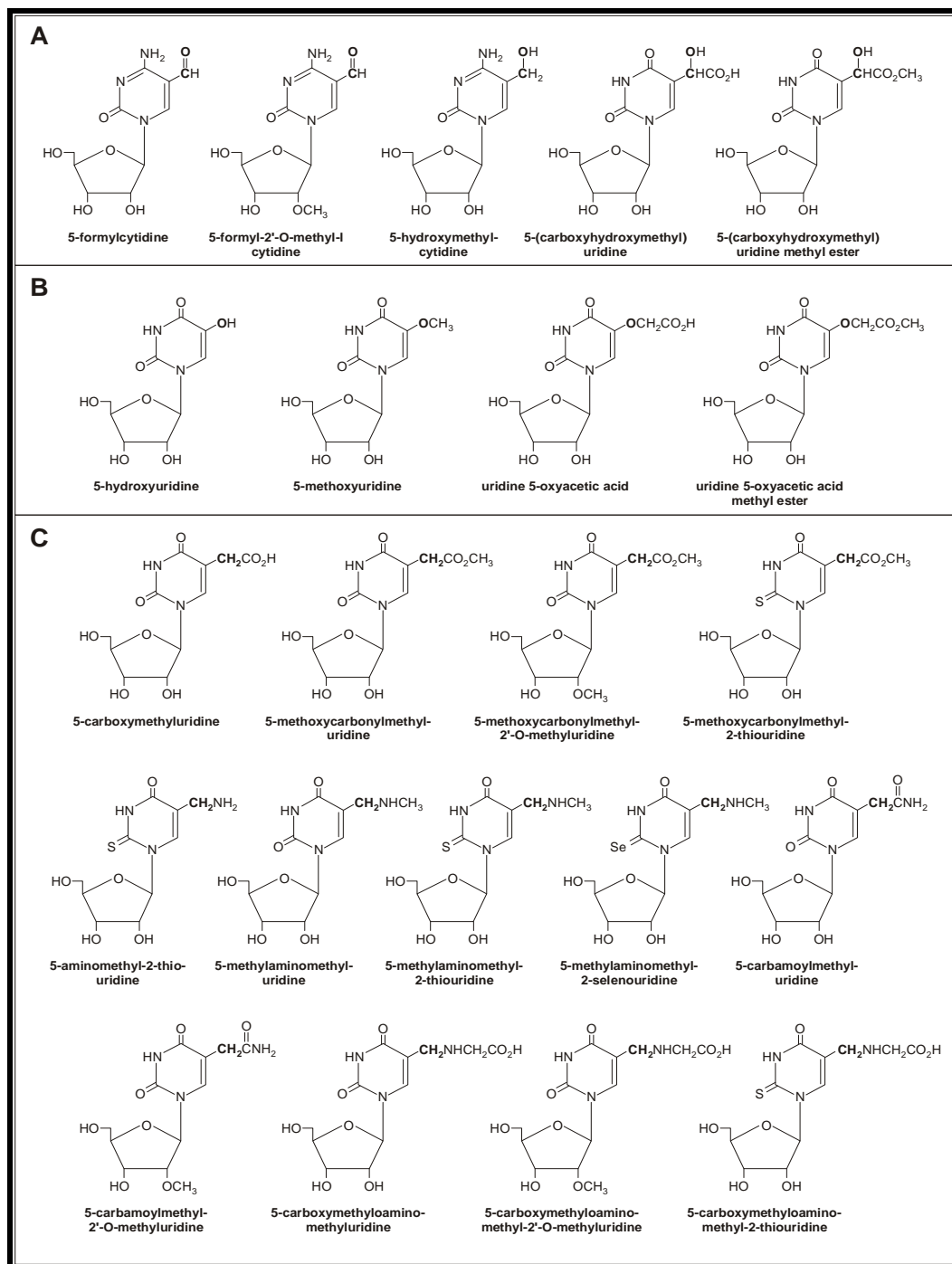
Uważa się, że większa mutagenność 5-metylocytozyny w porównaniu z cytozyną wpływa na wydajności naprawy i tempo spontanicznych deaminacji. Wskutek deaminacji cytozyny powstaje uracyl, który jest łatwo rozpoznawany i naprawiany przez glikozydazę uracylu, natomiast deaminacja 5-metylocytozyny powoduje powstanie tyminy, która naturalnie występuje w DNA, co prowadzi do tranżycji $m^5CG \rightarrow TA$ w miejscach metylacji

[Bestor 2000, Bird 2001, Bird 2002]. m^5C , podobnie jak inne składniki DNA i komórki, ulega modyfikacji (niszczeniu) w wyniku działania rodnika hydroksylowego ($\bullet OH$), jednego z najsilniejszych utleniaczy komórkowych (Ryc. 25, 26 i 27).

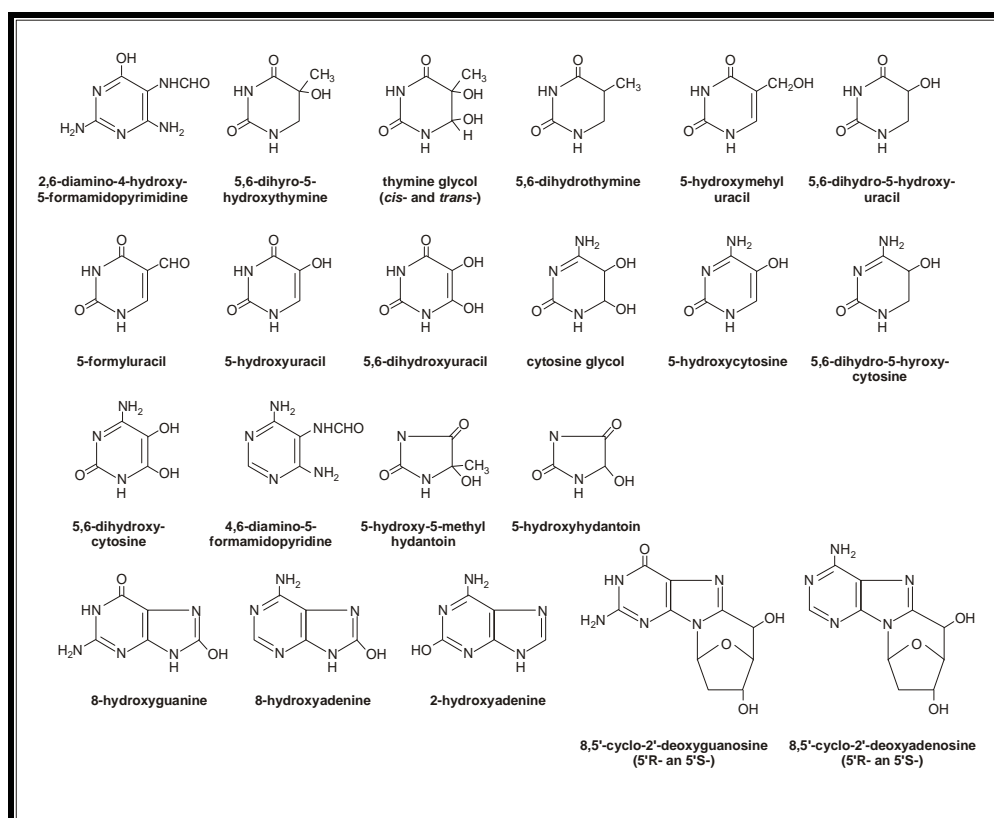


Rycina 25. Produkty reakcji 5-metylocytozyny (m^5C) z rodnikiem hydroksylowym ($\bullet OH$). Produktami reakcji są również tymina i cytozyna [Zukiel 2004].

Można zatem stwierdzić, że modyfikacja m^5C w wyniku działania stresu oksydacyjnego powoduje deaminację lub demetylację, co prowadzi do zmian w programie ekspresji genu. Monitorowanie globalnego poziomu m^5C w komórkowym DNA może zatem dostarczyć informacji o wpływie stresu utleniającego na ekspresję genu.



Rycina 26. Modyfikowane nukleozydy będące produktem reakcji rodnika hydroksylowego RNA [Barciszewski i in. 1999].



Rycina 27. Modyfikowane pochodne zasad heterocyklicznych powstałe w wyniku reakcji DNA z rodnikiem hydroksylowym [Jurgowiak i Oliński 1997].

Niektóre spośród produktów oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych mają właściwości mutagenne. Pokazano, że poziom 8-oksoG i glikolu tyminy, jak i innych zmodyfikowanych zasad, rośnie w komórkach poddanych działaniu promieniowania UV, jonizującego oraz chemicznych mutagenów generujących rodniki tlenowe [Bohr 2002]. Powszechność występowania enzymów usuwających oksydacyjnie uszkodzone zasady z DNA w komórkach *Eukaryota* sugeruje, że mogą one mieć konsekwencje biologiczne.

Jedną z najbardziej znanych i najczęściej badanych modyfikacji jest 8-okso-2'-deoksyguanozyna (8-okso-dG), która w warunkach fizjologicznych jest mało trwała. Powstaje ona w wyniku reakcji rodnika $\cdot\text{OH}$ bądź tlenu singletowego z DNA. Oceniono, że w pojedynczej komórce człowieka może powstawać około 200 uszkodzeń typu 8-oksoG w ciągu dnia. Szacuje się, że poziom 8-oksoG w DNA jest 16-krotnie wyższy w mtDNA w porównaniu z DNA jądrowym, co odpowiada poziomowi uszkodzeń 1:8000 zasad [Oliński i Jurgowiak 1999a, Rehman i in. 1998]. Ten podwyższony poziom uszkodzonych oksydacyjnie zasad i mutacji w mtDNA w porównaniu do jądrowego DNA wynika z kilku przyczyn:

- a. jest efektem lokalizacji mtDNA w pobliżu wewnętrznej błony mitochondrialnej gdzie powstają czynniki utleniające,
- b. braku histonów i białek niehistonowych w mtDNA, które w jądrze komórki wchodzi w skład chromatyny,
- c. w mitochondriach mechanizmy naprawy DNA są mniej aktywne (choć są w nich obecne i aktywne),
- d. w genomie mitochondrialnym brak jest intronów.

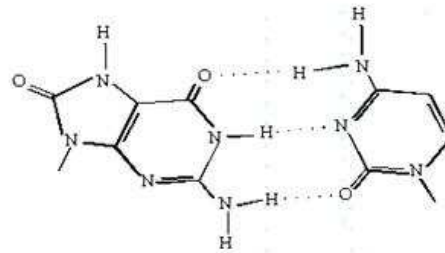
ROS mogą powodować również pęknięcia nici DNA. Adriamycyna i bleomycyna generują ROS i są przyczyną rozpadu DNA w warunkach *in vivo*, w hodowlach komórkowych oraz w izolowanych mitochondriach. W mitochondriach system naprawy DNA jest mniej skuteczny niż w jądrze komórkowym, ale w prawidłowym stanie fizjologicznym poziom oksydacyjnych modyfikacji mtDNA jest niższy niż obserwuje się to w stanach chorobowych związanych z dysfunkcją mitochondriów czy też podczas starzenia się. Jest to wynik częściowej inaktywacji ROS, jak i obecności mechanizmów naprawczych w prawidłowo funkcjonujących mitochondriach, np. w mitochondriach wątroby szczura poziom cząsteczek 8-okso-dG wynosi około 0.8 na 10^5 bp. Niższy poziom 8-okso-dG stwierdzono w nerce świnia (ok. 0.5 na 10^5 bp) i wątrobie (ok. 0.4 na 10^5 bp). Natomiast ilość miejsc z delecją zasad (AP - miejsca apurynowe i apirymidynowe) jest niższa niż 0.2 na 10^5 bp. Organelle ssaków nie mają dostatecznie aktywnych mechanizmów reperacji rekombinacyjnej, ale mogą usuwać uszkodzone zasady. Skuteczne są mechanizmy naprawy zasad (BER). Poziom 8-okso-dG w mtDNA wątroby szczura (Fisher 344) ulega 2-3-krotnemu podwyższeniu u zwierząt starych, tzn. w wieku 24 miesięcy (przy maksymalnym okresie życia wynoszącym 30 miesięcy). Akumulacja oksydacyjnych uszkodzeń mtDNA związana z wiekiem organizmu koreluje z poziomem delecji stwierdzonych w licznych tkankach.

Nadmierna ekspozycja organizmu na działanie egzo- lub endogennych czynników utleniających lub zaburzenia działania systemów obrony przyczyniają się do rozchwiania równowagi utleniająco-redukującej w komórkach i wystąpienia stresu oksydacyjnego, którego konsekwencją jest szybkie tempo mutacji, a w konsekwencji np. choroby nowotworowe czy neurodegeneracyjne (Tab. 7).

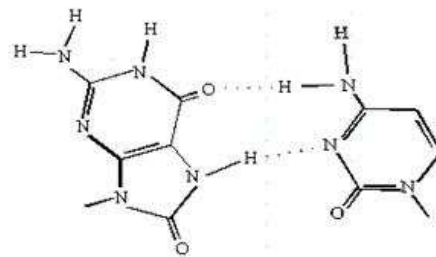
W komórce funkcjonuje wiele mechanizmów ograniczających działanie rodników. Ich neutralizacja odbywa się w wyniku działania:

- a. enzymów, takich jak: katalaza, SOD, peroksydazy glutationowe, które neutralizują ROS i ograniczają reakcję ze składnikami komórkowymi;
- b. białek wiążących jony metali grup przejściowych, do których zaliczamy metalotioneiny, ferrytynę, transferynę, ceruloplazminę oraz albuminę;
- c. drobnocząsteczkowych antyutleniaczy (glutation, askorbinian, tokoferole, retinol, cysteina), które uniemożliwiają udział w reakcji Fentona;
- d. naprawy powstałych uszkodzeń DNA przez enzymy, które usuwają mutagenne produkty reakcji utleniających (np. oksydacyjnie uszkodzone zasady o właściwościach mutagennych).

8-okso-dG może tworzyć stabilne pary zasad, zarówno z cytozyną jak i adeniną. W tym drugim przypadku może to prowadzić do transwersji GC→TA. 8-okso-dG może występować w dwóch formach: *anty* i *syn*. W formie *syn* 8-okso-dG tworzy stabilne pary zasad z adeniną (Ryc. 28). Jeżeli w procesie replikacji DNA naprzeciwko 8-okso-dG włączona zostanie adenina, to po dwóch rundach replikacyjnych pojawi się transwersja G→T. Z wolnymi rodnikami reagują nie tylko zasady wchodzące w skład DNA, ale również trifosfodeoksynukleotydy. 8-oksodGTP jest dobrym substratem dla polimeraz DNA, a błędne parowanie utlenionej guaniny może prowadzić do jej włączenia do DNA naprzeciwko adeniny i do substytucji A→C po trzech rundach replikacyjnych. W badaniach *in vivo* wykazano, że 8-okso-dG w DNA jest odpowiedzialna za 0.7% częstość zamiany guaniny na tyminę podczas procesu replikacji.



8-OH-dG (anti) : dC (anti)
Watson – Crick



8-OH-dG (syn) : dC (anti)
Hoogsteen

Rycina 28. Pary zasad tworzone z udziałem 8-okso-guaniny oraz cytozyny i adeniny.

Mutageny potencjał zmodyfikowanych zasad azotowych znajduje odbicie w możliwości błędnego parowania zasad. Podobne właściwości wykazuje 8-okso-A. Polimerazy bakteryjne wbudowują T naprzeciwko 8-okso-A. Wykazano, że obecność 8-oksoadeniny w DNA może prowadzić do transwersji A→C i tranzycji A→G w genach c-Ha-ras. Badania *in vitro* różnych eukariotycznych i bakteryjnych polimeraz wskazują na mniejszą mutagenność 8-okso-A w stosunku do 8-okso-dG. 2-hydroksyadenina może tworzyć pary ze wszystkimi zasadami DNA oraz indukować transwersje A→T i A→C oraz tranzycje A→G. Wykazano, że 2-OH-dATP (2-hydroksy-2'-deoksyadenozyno-5'-trifosforan, produkt uszkodzenia dATP) jest włączany naprzeciw tyminy lub cytozyny. Prowadzi to do tranzycji CG→TA, czyli typowych dla mutacji spontanicznych. Transfekcja wektora zawierającego 2-OH-A do *E. coli* wykazała, że częstość mutacji indukowanych obecnością tej zmodyfikowanej zasady, jest podobna do wartości zaobserwowanych dla 8-okso-dG i wynosi 0.3 - 0.8%.

Produkty reakcji cytozyny z rodnikiem $\bullet\text{OH}$, 5-OH-cytozyna i 5-OH-uracyl mają właściwości mutagenne. Obecność 5-OH pochodnych cytozyny w DNA może prowadzić do tranzycji C→T i transwersji C→G. Wprowadzenie fragmentu DNA zawierającego 5-OH-cytozynę do plazmidu jest związane z wystąpieniem tranzycji C→T z częstością 2.5%. 5-OH-

dCTP może być wprowadzany do nowo syntetyzowanej nici DNA wobec fragmentu Klenowa pol I naprzeciw guaniny i adeniny. 5-OHU i glikol cytozyny są odpowiedzialne za powstanie tranzykcji C→T, a częstość mutacji wynosi ok. 80% (częstość mutacji indukowanych obecnością 8-oksoG wynosi ok. 1%).

Rodniki tlenowe indukują mutacje w „gorących miejscach” antyonkogenu p53. Kodon 248 genu p53 (CGG) jest miejscem, które najczęściej ulega mutacjom w wielu ludzkich nowotworach. Okazało się, że działanie H₂O₂/FeCl₂ na ludzkie fibroblasty powoduje transwersje G→C w drugiej pozycji i tranzykcje G→A w pozycji trzeciej kodonu CGG. Nie wyjaśniono, jakie modyfikacje prowadzą do takich zmian. Natomiast spektrum mutacji w kodonach 249 (AGG) i 250 (CCC) zdominowane jest transwersjami G→T i C→G, typowymi dla obecności 8-oksoG i 5-OHC.

W przypadku onkogenu *ras* jednym z kodonów najczęściej ulegającym mutacjom, jest kodon 12 (GGC), w którym guanina ulega transwersji do tyminy. Włączenie do wektora plazmidowego części onkogenu zawierającej, w miejscu G1 lub G2 kodonu 12 8-oksoG prowadziło do transwersji G→T. Wynika z tego, że transwersje GC→TA, typowe dla błędnego parowania 8-oksodG, są bardzo często przyczyną mutacji antyonkogenu p53 komórek raka płuc i protoonkogenu *ras* w przypadku raka wątroby człowieka. Należy też podkreślić, że ten sam typ zmian jest typowy dla adduktów DNA z benzopirenem i aflatoksyną B1.

Udział ROS w procesie karcynogenezy potwierdzają badania epidemiologiczne. Wynika z nich, że około 1/3 wszystkich przypadków nowotworów człowieka związana jest z paleniem tytoniu, 1/3 z niewłaściwą dietą, a pozostałe 1/3, z innymi czynnikami, jak czynniki karcynogenne powiązane z wykonywanym zawodem, czynniki środowiskowe, wirusy onkogenne, promieniowanie UV i jonizujące. Okazuje się, że niewłaściwa dieta może być również źródłem ROS. Restrykcja kaloryczna jest natomiast czynnikiem zapobiegającym rozwojowi zmian będących przyczyną karcynogenezy. Ponieważ istnieje bezpośrednia zależność między ilością kalorii w diecie a metabolizmem tlenowym, prawdopodobnie wysokokaloryczna dieta odpowiedzialna jest za generowanie nadmiernych ilości ROS. Również witaminy o właściwościach antyoksydacyjnych zapobiegają karcynogenezie. Nowotwory są też jedną z chorób wieku podeszłego [Jurgowiak i Oliński 1997, Oliński i Jurgowiak 1999a, 1999b, Oliński i in. 2002, Wallace 2002].

5. Materiały i metody

5.1. Materiały

5.1.1. Enzymy

Enzym	Nazwa firmy
MN SPD VPD apyraza nukleaza P1	SIGMA
kinaza polinukleotydowa	USB

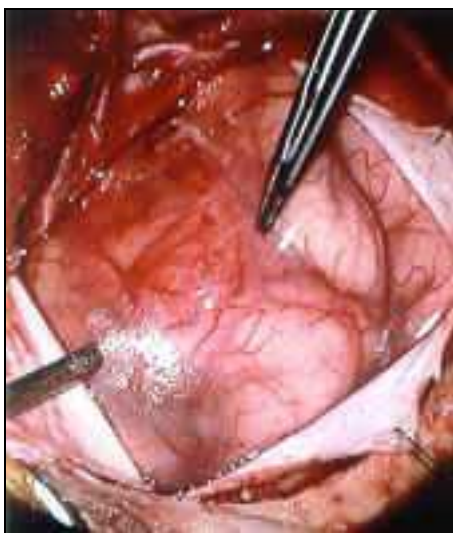
5.1.2. Odczynniki

Odczynnik	Nazwa firmy
bursztynian sodu ATP DTT chlorek magnezu spermidyna octan amonu Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ propanol-1 kwas izomasłowy bicyna siarczan amonu amoniak Tris wodorotlenek sodu etanol	SIGMA
[³² P] ATP	Amersham i ICN
zestaw do izolacji DNA	A&A Biotechnology – Gdynia
płytki z celulozą do chromatografii cienkwarstwowej	MERCK

5.2. Metody

5.2.1. Pozyskiwanie materiału do badań

Materiał tkankowy guzów mózgu był pobierany w czasie ich operacyjnego usuwania w Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (prof. dr hab. med. S. Nowak, Ryc. 29), natomiast krew pacjentów kilkadziesiąt minut przed zabiegiem operacyjnym. Tkankę nowotworową oraz krew do czasu izolacji DNA przechowywano w temperaturze -80°C .

A**B**

Rycina 29. Operacja resekcji guza mózgu. **A** – obraz przed usunięciem guza po otwarciu czaszki i opony twardej, **B** – łoża po usunięciu guza.

5.2.2. Izolacja DNA

Izolacja DNA z tkanki nowotworowej

Do próbki z tkanką nowotworową dodano bufor lizujący zawierający: 10 mM Tris-HCl pH 8.2, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA oraz proteinazę K (1 mg proteinazy K rozpuszczony w 1 ml buforu zawierającego 880 μl H_2O , 100 μl 10% SDS i 20 μl 0.1 M EDTA). Ilość dodanego buforu i proteinazy K zależy od ilości i rodzaju tkanki (tkanka w próbce musi być całkowicie zanurzona w mieszaninie w/w roztworów w proporcjach: 1 ml buforu lizującego /

70 μ l 10% SDS / 170 μ l roztworu proteinyzy K). Całość inkubowano 15 godzin w 37°C z wytrząsaniem. Następnie do roztworu dodano 6M NaCl i wytrząsano przez godzinę (na 1 ml roztworu po izolacji dodaje się 330 μ l 6 M NaCl). Po odwirowaniu DNA wytrącono dwukrotną objętością 96% etanolu. Nić DNA wyławiano bagietką i przemyto 70% etanolem. Wysuszony preparat rozpuszczono w wodzie [Zukiel i in. 2004].

Do otrzymania DNA z bardzo małej ilości (ok. 10-20 μ g) tkanki stosowano „zestaw do izolacji DNA”. Procedurę wyodrębniania DNA przeprowadzono zgodnie z zaleceniem producenta (A&A Biotechnology) z częściową modyfikacją. Podczas lizy do roztworu dodano 2.5 μ l RNazy A (10 mg/ml) i inkubowano w tej samej temperaturze przez 5 godzin. Dodatek RNazy A uwalnia DNA od RNA (jest to istotne przy analizie adduktów oraz prawidłowej ocenie intensywności plamek zawierających [³²P]dT, [³²P]dC i [³²P]m⁵dC). Przy dużej zawartości RNA ocena zawartości oligodeoksynukleotydów jest obciążona błędem.

Izolacja DNA z krwi obwodowej

DNA wyodrębniano z 5 ml krwi obwodowej ludzkiej z dodatkiem EDTA. Komórki krwi poddano lizie w 15 ml zimnego (4°C) buforu lizującego (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA o pH 7.4). Po 30 minutach inkubacji na lodzie z okresowym mieszaniem, materiał odwirowano przy prędkości 3 000 rpm w 4°C przez 10 minut. Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 5 ml buforu lizującego i ponownie odwirowano (3 000 rpm / 4°C / 10 minut). Osad zawieszono w 2.5 ml buforu SE (75 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA o pH 8.0) i dodano 2.5 μ l proteinyzy K o stężeniu 10 μ g/ μ l oraz 25 μ l 20% SDS. Reakcję prowadzono w temperaturze 55°C przez 16 godzin z wytrząsaniem. Następnie dodano 2.5 μ l RNazy A o stężeniu 10 μ g/ μ l i inkubowano w temperaturze 55°C przez 2 godziny, po czym do mieszaniny reakcyjnej dodano 150 μ l 5 M NaCl. Po 15 minutach wytrząsania próbkę wirowano w temperaturze pokojowej przy 14 000 rpm przez 15 minut. Do zebranego supernatantu dodano 2 objętości 96% etanolu. Wytrącony osad przemyto 70% etanolem i osuszono w wirówce próżniowej SpeedVac. DNA rozpuszczono w 200 μ l wody i przechowywano w temperaturze -20°C.

Czystość preparatów DNA analizowano wyznaczając współczynnik A_{260}/A_{280} (absorbancja przy długości fali 260 nm i 280 nm). Jednorodny, wolny od białka preparat DNA charakteryzuje się wartością $A_{260}/A_{280} = 2.0 - 2.1$. Stężenie DNA obliczano poprzez pomiar absorbancji przy 260 nm. Przyjęto, że 1 OD przy A_{260} odpowiada 50 μ g DNA/ml.

5.2.3. Hydroliza enzymatyczna DNA

Do 1 μg DNA (wyodrębnionego z tkanki nowotworowej) rozpuszczonego w buforze zawierającym 20 mM bursztynianu sodu o pH 6 i 10 mM CaCl_2 dodano 0.02 jednostki (U) nukleazy z *Micrococcus* (MN) i 0.001 jednostki fosfodiesterazy ze śledziony (SPD). Całość inkubowano w temperaturze 37°C przez 5 godzin.

5.2.4. Znakowanie (piętnowanie) hydrolizatu DNA

Do znakowania użyto 0.17 μg hydrolizatu DNA zawierającego 3'-monofosforany deoksynukleozydów (dNp). Hydrolizat zliofilizowano i dodano 3 μl roztworu zawierającego: bufor bicynowy o pH 9.8 (20 mM bicyny, 10 mM chlorku magnezu, 10 mM DTT, 1 mM spermidyny), 400 pM ATP, 2 jednostki (U) kinazy polinukleotydowej i 1 μCi [γ - ^{32}P] ATP. Całość inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut. Nadmiar radioaktywnego ATP usuwano dodając 5 mU apyrazy i inkubując w tych samych warunkach przez 30 minut.

5.2.5. Trawienie nukleazą P1

Otrzymane radioaktywne nukleozydo-3',5'-difosforany (^{32}P]Np) hydrolizowano nukleazą P1 celem usunięcia grupy 3'-fosforanowej. W tym celu dodano 0.2 μg nukleazy P1 rozpuszczonej w 0.5 M octanie amonu o pH 4.0 i inkubowano 30 minut w temp. 37°C.

5.2.6. Rozdział chromatograficzny znakowanych dezoksynukleotydów

Rozdział i identyfikację [^{32}P]dN wykonano metodą dwukierunkowej cienkowarstwowej chromatografii na płytkach (10 x 20 cm) pokrytych celulozą (Merck) stosując mieszaninę rozpuszczalników:

- I kierunek (20 cm): kwas izomasłowy/amoniak/woda (66/1/17),
- II kierunek (10 cm): 0.1 M fosforan sodowy (pH 6.8) / siarczan amonu / propanol-1 (100 ml/60 g/1.5 ml).

Na płytkę nakładano po 3 μl hydrolizatu. Po zakończeniu rozdziału płytki wysuszono.

5.2.7. Ocena względnej zawartości m⁵dC

Plamki analizowano (ocena intensywności) przy pomocy urządzenia odwzorowującego PhosphorImager Typhoon (Molecular Dynamics) i programu Image Quant Software. Analizę powtarzano trzykrotnie dla każdego przypadku scharakteryzowanego

histopatologicznie. Uzyskane wartości liczbowe wyrażające intensywność plamek odpowiadających poszczególnym deoksynukleotydom podstawiano do wzoru:

$$R = \frac{m^5 dC}{m^5 dC + dC + dT} \times 100$$

5.2.8. Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Analizowany materiał zgromadzono w bazie danych utworzonej przy pomocy programu Microsoft Excel XP zaimplementowanym na komputerze osobistym. Do analizy wyników wykorzystano metody analizy statystycznej w programie Statistica.

6. Nomenklatura guzów mózgu

W niniejszej pracy stosowałam głównie ogólnie przyjęte w literaturze angielskie i łacińskie nazewnictwo guzów mózgu wg klasyfikacji WHO. Poniższe zestawienie zawiera polskie odpowiedniki międzynarodowych nazw nowotworów OUN („-„ oznacza brak odpowiednika nazwy w danym języku).

Nazwa angielska	Nazwa łacińska	Nazwa polska
Astrocytic tumours	Astrocytoma	Gwiaździaki
Pilocytic astrocytoma, PA	Astrocytoma pilocyticum	Gwiaździak włosowatokomórkowy
Pilomyxoid astrocytoma, PMA	Astrocytoma pilomyxoides	Gwiaździak włosowatośluzakowaty
Subependymal giant cell astrocytoma, SEGA	Astrocytoma gigantocellulare subependymale	Gwiaździak podwyściółkowy olbrzymiokomórkowy
Pleomorphic xanthoastrocytoma, PXA	Astrocytoma pleomorphum	Żółtakogwiaździak pleomorficzny
Diffuse astrocytoma	Astrocytoma diffusum	Gwiaździak rozlany
Fibrillary astrocytoma	Astrocytoma fibrillare	Gwiaździak włókienkowy
Gemistocytic astrocytoma	Astrocytoma gemistocyticum	Gwiaździak tuczno­komórkowy
Protoplasmic astrocytoma	Astrocytoma protoplasmaticum	Gwiaździak protoplazmatyczny
Anaplastic astrocytoma, AA	Astrocytoma anaplasticum	Gwiaździak anaplastyczny
Glioblastoma, GBM	Glioblastoma (multiforme)	Glejak wielopostaciowy
Giant cell glioblastoma	Glioblastoma gigantocellulare	Glejak wielopostaciowy olbrzymiokomórkowy
Gliosarcoma	Gliosarcoma	Glejakomięsak
Gliomatosis cerebri	-	Glejakowatość mózgu
Oligodendroglial tumours	Oligoastrocytoma	Nowotwory gleju skąpowypuszkowego
Oligodendroglioma, O	Oligodendroglioma	Skąpodrzewiak
Anaplastic oligodendroglioma	Oligodendroglioma anaplasticum	Skąpodrzewiak anaplastyczny
Oligoastrocytic tumours	Oligoastrocytoma	Skąpodrzewiaki
Oligoastrocytoma, OA	Oligoastrocytoma	Skąpodrzewiakogwiaździak
Anaplastic oligoastrocytoma	Oligoastrocytoma anaplasticum	Skąpodrzewiakogwiaździak anaplastyczny
Ependymal tumours	Ependymoma	Nowotwory gleju wyściółkowego
Subependymoma	Subependymoma	Podwyściółczak
Myxopapillary ependymoma	Ependymoma myxopapillare	Wyściółczak śluzakowatobrodawkowaty
Ependymoma	Ependymoma	Wyściółczak
Cellular ependymoma	Ependymoma cellulare	Wyściółczak komórkowy
Papillary ependymoma	Ependymoma papillare	Wyściółczak brodawkowaty
Clear cell ependymoma	Ependymoma clarocellulare	Wyściółczak jasnokomórkowy
Tanycytic ependymoma	Ependymoma tanacyticum	Wyściółczak tanacytarny
Anaplastic ependymoma	Ependymoma anaplasticum	Wyściółczak anaplastyczny
Choroid plexus tumours	-	Nowotwory spłotu naczyniówkowego
Choroid plexus papilloma, CPP	Plexus choroideus papilloma	Brodawczak spłotu naczyniówkowego
Atypical choroid plexus papilloma	Plexus choroideus papilloma atypicum	Atypowy brodawczak spłotu naczyniówkowego
Choroid plexus carcinoma	Plexus choroideus	Rak spłotu naczyniówkowego

	carcinoma	
Other neuroepithelial tumours	-	Inne nowotwory pochodzenia neuroepitelialnego
Astroblastoma	Astroblastoma	Gwiaździak zarodkowy
Choroid glioma of the third ventricle	-	Glejak struniakowaty spłotu naczyniówkowego komory III
Angiocentric glioma	Glioma angiocentricum	Glejak angiocentryczny
Neuronal and mixed neuronal-glia tumours	-	Nowotwory neuronalne i mieszane neuronalno-glejowe
Cerebellar dysplastic gangliocytoma (Lhermitte-Duclos)	Gangliocytoma dysplasticum cerebelli (Lhermitte-Duclos)	Dysplastyczny zwojak mózdzku
Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioglioma, DIG	Astrocytoma / ganglioglioma desmoplasticum infantum	Desmoplastyczny gwiaździak / zwojakoglejak wieku dziecięcego
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour, DNT	Tumor dysembryoplasticus neuroepithelialis	Dysembrioplastyczny nowotwór neuroepitelialny
Gangliocytoma	Gangliocytoma	Zwojak
Ganglioglioma	Ganglioglioma	Zwojakoglejak
Anaplastic ganglioglioma	Ganglioglioma anaplasticum	Zwojakoglejak anaplastyczny
Central neurocytoma	Neurocytoma centrale	Nerwiak komórkowy ośrodkowy
Extraventricular neurocytoma	Neurocytoma extraventriculare	Nerwiak komórkowy pozakomorowy
Cerebellar liponeurocytoma	Liponeurocytoma cerebelli	Tłuszczakonerwiak komórkowy mózdzku
Papillary glioneuronal tumour, PGNT	-	Brodawkowaty nowotwór glioneuronalny
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle, RGNT	-	Guz glioneuronalny komory czwartej tworzący rozety
Paraganglioma	Paraganglioma	Przyzwojak
Tumours of the pineal region	-	Nowotwory mięszu szyszynki
Pineocytoma	Pineocytoma	Szyszyniak
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	-	Guz mięszu szyszynki o pośrednim zróżnicowaniu
Pineoblastoma	Pineoblastoma	Szyszyniak zarodkowy
Papillary tumour of the pineal region, PTPR	-	Brodawkowaty guz okolicy szyszynki
Embryonal tumours	-	Nowotwory pochodzenia zarodkowego
Medulloblastoma	Medulloblastoma	Rdzeniak zarodkowy
Desmoplastic/nodular medulloblastoma	Medulloblastoma desmoplasticum / nodulare	Rdzeniak zarodkowy desmoplastyczny / guzkowy
Medulloblastoma with extensive nodularity	-	Rdzeniak zarodkowy o zwiększonej guzkowości
Anaplastic medulloblastoma	Medulloblastoma anaplasticum	Rdzeniak zarodkowy anaplastyczny
Large cell medulloblastoma	-	Rdzeniak zarodkowy olbrzymiokomórkowy
Primitive neuroectodermal tumour, PNET	Tumores neuroectodermales primitivae	Prymitywne nowotwory neuroektodermalne
Neuroblastoma	Neuroblastoma	Nerwiak zarodkowy
Ganglioneuroblastoma	Ganglioneuroblastoma	Nerwiak zwojokomórkowy zarodkowy
Medulloepithelioma	Medulloepithelioma	Nabłoniak rdzeniakowy
Ependymoblastoma	Ependymoblastoma	Wyściółczak zarodkowy
Atypical teratoid/rhabdoid tumour	-	Atypowy guz teratoidny / rabdoidny
TUMOURS OF CRANIAL AND	-	Nowotwory nerwów czaszkowych

PARASPINAL NERVES		i rdzeniowych
Schwannoma (neurilemoma, neurinoma)	Schwannoma (neurilemoma, neurinoma)	Nerwiak osłonkowy
Cellular schwannoma	Schwannoma cellulare	Nerwiak osłonkowy komórkowy
Plexiform schwannoma, PS	Schwannoma plexiforme	Nerwiak osłonkowy splotowaty
Melanotic schwannoma	Schwannoma melanocyticum	Nerwiak osłonkowy barwnikowy
Neurofibroma	Neurofibroma	Nerwiakowłókniak
Plexiform neurofibroma	Neurofibroma plexiforme	Nerwiakowłókniak splotowaty
Perineurinoma	-	-
Perineurinoma, NOS	-	-
Malignant perineurinoma	Perineurinoma malignum	-
Malignant peripheral nerve sheath tumour, MPNST	Neurofibrosarcoma	Złośliwy nowotwór osłonek nerwów obwodowych
Epithelioid MPNST	Neurofibrosarcoma epithelioidale	MPNST nabłonkowopodobny
MPNST with mesenchymal differentiation	Neurofibrosarcoma mesenchymale	MPNST ze zmiennym mezenchymalnym i/lub nabłonkowym zróżnicowaniem
Melanotic MPNST	Neurofibrosarcoma melanocyticum	MPNST barwnikowy
MPNST with glandular differentiation	Neurofibrosarcoma glandulare	MPNST ze zróżnicowaniem gruczolowym
TUMOURS OF THE MENINGES	-	Nowotwory opon
Tumours of meningotheial cells	-	Nowotwory komórek meningoteloidalnych
Meningioma	Meningeoma	Oponiak
Meningothelial meningioma	Meningeoma meningotheiale	Oponiak meningotelialny
Fibrous (fibroblastic) meningioma	Meningeoma fibrosum	Oponiak włóknisty
Transitional (mixed) meningioma	Meningeoma transitionale	Oponiak przejściowy
Psammomatous meningioma	Meningeoma psammomatousum	Oponiak piaszczakowaty
Angiomatous meningioma	Meningeoma angiomatosum	Oponiak naczyńniakowaty
Microcystic meningioma	Meningeoma microcysticum	Oponiak drobnotorbielkowat
Secretory meningioma	-	Oponiak wydzielniczy
Lymphoplasmacyte-rich meningioma, LPM	-	Oponiak z naciekami limfoplazmocytnymi
Metaplastic meningioma	Meningioma metaplasticum	Oponiak metaplastyczny
Chordoid meningioma	Meningeoma choroideum	Oponiak struniakowaty
Clear cell meningioma	Meningeoma clarocellulare	Oponiak jasnokomórkowy
Atypical meningioma	Meningeoma atypicum	Oponiak atypowy
Papillary meningioma	Meningeoma papillare	Oponiakbrodawkowaty
Rhabdoid meningioma, RM	Meningeoma rhabdoideum	Oponiak rabdoidalny
Anaplastic (malignant) meningioma	Meningeoma anaplasticum	Oponiak anaplastyczny
Mesenchymal tumours	-	Nowotwory mezenchymalne nie pochodzące z meningotheilium
Lipoma	Lipoma	Tłuszczak
Angiolipoma	Angiolipoma	Naczyńniakotłuszczakowłókniak
Hibernoma	Hibernoma	Zimowiak
Liposarcoma	Liposarcoma	Tłuszczakomięsak
Solitary fibrous tumour, SFT	-	Pojedynczy guz włóknisty
Fibrosarcoma	Fibrosarcoma	Włókniakomięsak
Malignant fibrous histiocyoma, MFH	-	Złośliwy histiocyoma włóknisty
Leiomyoma	Leiomyoma	Mięśniak gładkokomórkowy
Leiomyosarcoma	Leiomyosarcoma	Mięśniakomięsak

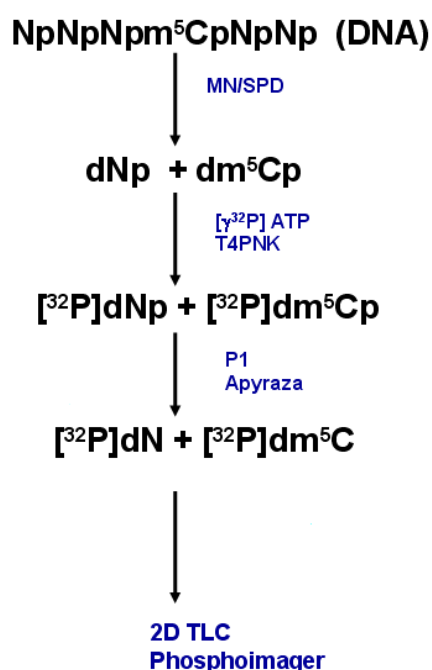
		gładkokomórkowy
Rhabdomyoma	Rhabdomyoma	Mięśniak prążkowanokomórkowy
Rhabdomyosarcoma	Rhabdomyosarcoma	Mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy
Chondroma	Chondroma	Chrzęstniak
Chondrosarcoma	Chondrosarcoma	Chrzęstniakomięsak
Osteoma	Osteoma	Kostniak
Osteosarcoma	Osteosarcoma	Kostniakomięsak
Osteochondroma	Osteochondroma	Kostniakochrzęstniak
Haemangioma	Haemangioma	Naczyniak krwionośny
Epithelioid haemangioendothelioma, EHE	-	Nabłonkowatokomórkowy śródbłoniak z naczyn krwionośnych
Haemangiopericytoma	Haemangiopericytoma	Obłoniak
Anaplastic haemangiopericytoma	Haemangiopericytoma anaplasticum	Obłoniak anaplastyczny
Angiosarcoma	Angiosarcoma	Mięsak naczyniowy
Kaposi sarcoma	Sarcoma Kaposi	Mięsak Kaposiego
Ewing sarcoma (PNET)	Sarcoma Ewing	Mięsak Ewinga
Primary melanocytic lesions	-	Pierwotne zmiany barwnikowe
Diffuse melanocytosis	Melanosis diffusa meningum	Rozlana melanoza opon
Melanocytoma	Melanocytoma	-
Malignant melanoma	Melanoma malignum	Czerniak złośliwy
Meningeal melanomatosis	-	Czerniakowatość opon
Other neoplasms related to the meninges	-	Inne nowotwory związane z oponami
Haemangioblastoma	Haemangioblastoma	Naczyniak krwionośny zarodkowy
LYMPHOMAS AND HAEMATOPOIETIC NEOPLASMS	-	Chłoniaki i nowotwory układu krwiotwórczego
Malignant lymphomas	Lymphoma malignum	Chłoniaki złośliwe
Plasmocytoma	Plasmocytoma	Guz plazmatycznokomórkowy
Granulocytic sarcoma	Sarcoma granulocyticum	Mięsak szpikowy granulocytarny
GERM CELL TUMOURS	-	Nowotwory z pierwotnych komórek rozrodczych
Germinoma	Germinoma	Zarodczak
Embryonal carcinoma	Carcinoma embryonale	Rak zarodkowy
Yolk sac tumour	-	Guz pęcherzyka żółtkowego
Choriocarcinoma	Choriocarcinoma	Nabłoniak kosmówkowy
Teratoma	Teratoma	Potworniak
Mature teratoma	Teratoma maturum	Potworniak dojrzały
Immature teratoma	Teratoma immaturum	Potworniak niedojrzały
Teratoma with malignant transformation	-	Potworniak z przemiana złośliwą
Mixed germ cell tumour	-	Mieszany guz pierwotnych komórek rozrodczych
TUMOURS OF THE SELLAR REGION	-	Nowotwory okolicy siodła tureckiego
Craniopharyngioma	Craniopharyngioma	Czaszkogardlak
Adamantinomatous craniopharyngioma	-	Czaszkogardlak szkliwiakowaty
Papillary craniopharyngioma	Craniopharyngioma papillare	Czaszkogardlak brodawkowaty
Granular cell tumour	-	Guz ziarnistokomórkowy
Pituicytoma	Pituicytoma	Guz ziarnistokomórkowy
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis, SCO	-	-
METASTATIC TUMOURS	Metastases	Guzy przerzutowe

7. Wyniki badań własnych

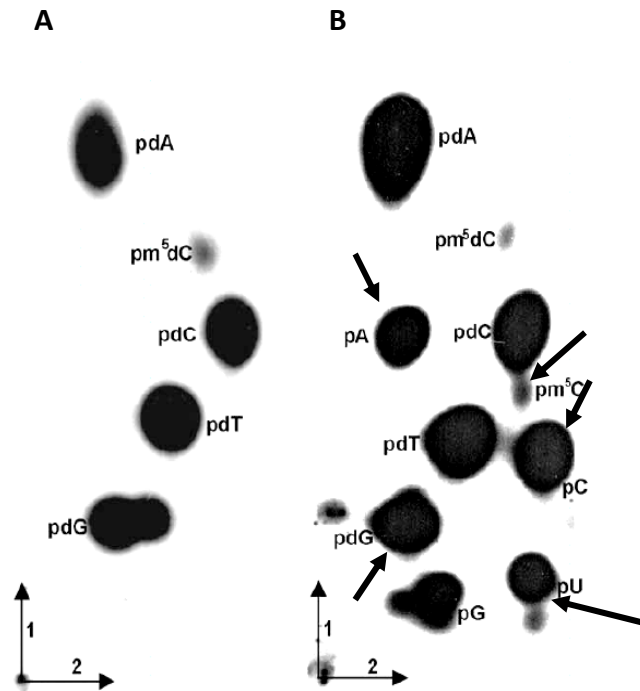
7.1. Analiza hydrolizatu DNA

metodą chromatografii cienkowarstwowej

Do analizy modyfikowanych nukleotydów w DNA wykorzystałam metodę chromatografii cienkowarstwowej (ang. *thin layer chromatography*, TLC). Polega ona na rozdziale nukleotydów otrzymanych po enzymatycznej hydrolizie DNA oraz znakowaniu następczym radioaktywnym fosforem [^{32}P] na płytkach z cienką warstwą celulozy. W odpowiednich warunkach chromatograficznych (system rozpuszczalników) cztery podstawowe deoksynukleotydy (dG, dA, dC, dT) migrują z różną szybkością (R_f). Widoczna jest także plamka odpowiadająca [^{32}P]m⁵dC. Jej lokalizacja na płytce chromatograficznej umożliwia analizę ilościową. Badanie zawartości m⁵dC w DNA prowadzono według schematu (Ryc. 30)



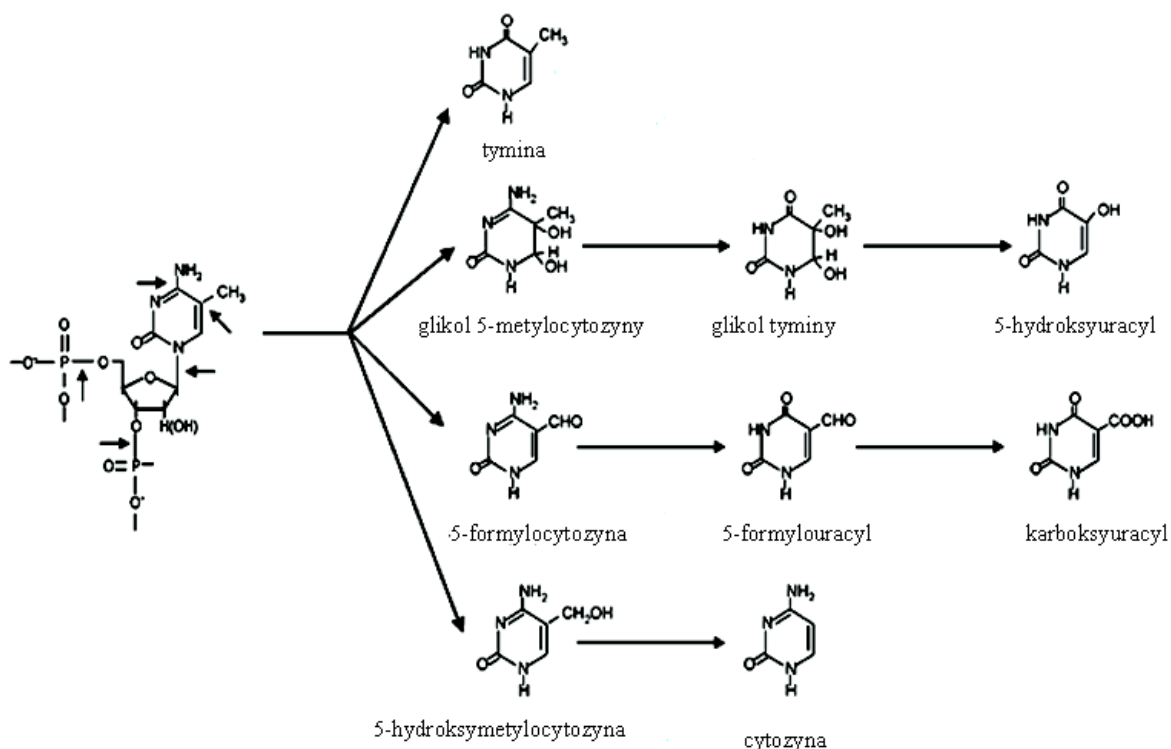
Rycina 30. Schemat hydrolizy DNA do mono 3'-znaczonych mononukleotydów. Składa się z pięciu etapów: a) hydroliza DNA z tkanek nowotworowych i krwi nukleazą z *Micrococcus* (MN) i fosfodiesterazą ze śledziony (SPD) w celu otrzymania 3'-nukleotydów, b) fosforylacja hydrolizatu DNA za pomocą kinazy polinukleotydowej (T4PNK) i [γ - ^{32}P]ATP (znakowanie przy końcu 5') i otrzymanie [^{32}P] Np, c) reakcja z apyrazą - rozkładu nadmiaru ATP, d) hydroliza nukleazą P1 w celu defosforylacji przy końcu 3', e) analiza 5'-monofosforanów deoksynukleozydów na płytkach pokrytych celulozą (TLC) w dwóch kierunkach (Ryc. 31).



Rycina 31. Dwukierunkowa chromatografia (TLC) nukleotydów pochodzących z hydrolizatu DNA znakowanych fosforem [³²P]. Widoczna jest plamka odpowiadająca [³²P] m⁵dC (A – czysty preparat DNA, B – preparat DNA zanieczyszczony RNA, strzałki wskazują rybonukleotydy).

7.2. Określenie względnej zawartości m⁵dC w badanym DNA

5-metylocytozyna, podobnie jak każdy składnik DNA, ulega modyfikacji (uszkodzeniom), głównie rodnikiem hydroksylowym ($\cdot\text{OH}$). Jest to najbardziej reaktywna forma tlenu (ROS) i przyczyna wielu chorób w tym nowotworowych (Tab. 7). Reakcja m⁵dC z $\cdot\text{OH}$ prowadzi do powstania wielu produktów, wśród których szczególną uwagę zwraca tymina i cytozyna, które są stałymi składnikami DNA (Ryc. 32). Efektem końcowym reakcji DNA z rodnikiem hydroksylowym jest globalne obniżenie zawartości m⁵dC (hypometylacja). Poniższa rycina pokazuje, że dla analizy istotna jest nie tylko bezwzględna zawartość m⁵dC, ale również ilość cytozyny i tyminy.



Rycina 32. Produkty reakcji 5-metylocytozyny (m⁵C) z rodnikiem hydroksylowym ($\cdot\text{OH}$). Oprócz wielu modyfikowanych nukleozydów powstają tymina i cytozyna.

W związku z powyższym do obliczania względnej zawartości m⁵dC zaproponowałam następujący wzór:

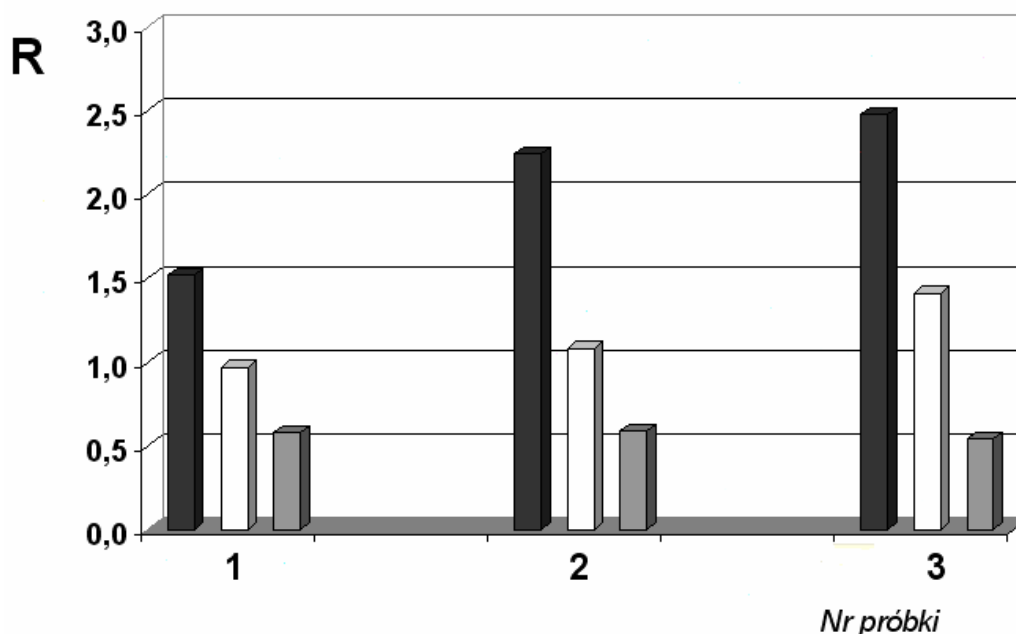
$$R = \frac{m^5dC}{m^5dC + dC + dT} \times 100$$

Uwzględnia on ilość m^5dC oraz podstawowych nukleotydów pirymidynowych obecnych w DNA, powstających również podczas degradacji m^5dC .

7.3. Wpływ sposobu pobierania i przechowywania tkanek na zawartość m^5dC w DNA

Sposób pobierania i przechowywania tkanek ma kluczowe znaczenie dla oceny ilościowej m^5dC . W tym celu porównano względną zawartość m^5dC w DNA wyodrębnionym z tkanek:

- nowotworowych mózgu natychmiast zamrożonych w temp $-20^{\circ}C$ i przechowywanych w temperaturze $-80^{\circ}C$,
- zatopionych i przechowywanych w parafinie,
- przechowywanych przez 3 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie zamrożonych.

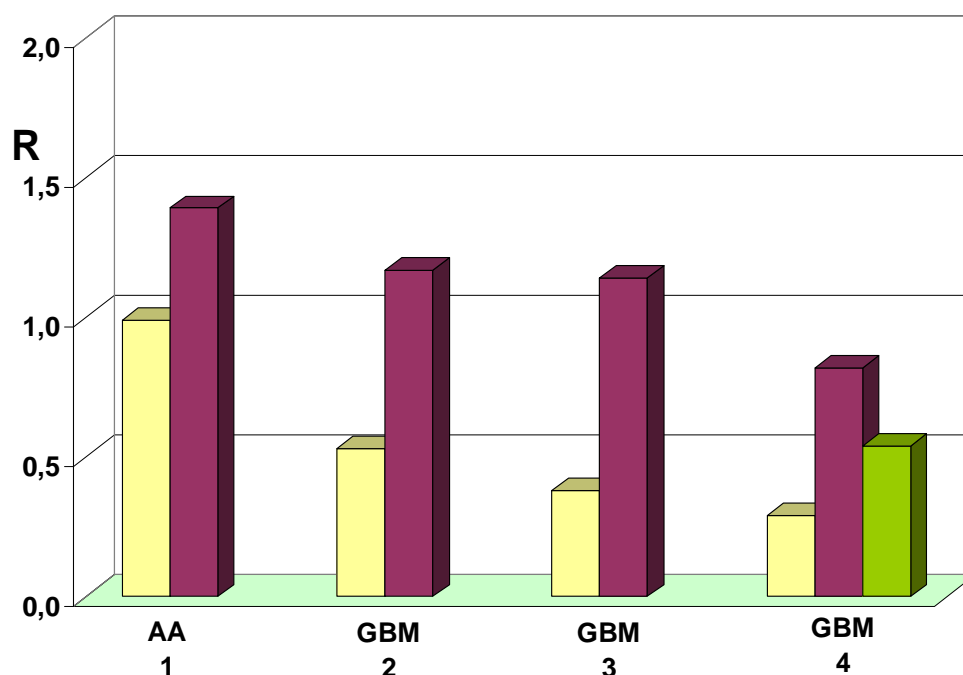


Rycina 33. Wpływ warunków przechowywania tkanki nowotworowej na zawartość m^5dC w DNA. Tkanki po resekcji 3 wybranych guzów (oponiaki) przechowywano w różnych warunkach: zamrożone w $-20^{\circ}C$ (słupki czarne), zatopione w parafinie (słupki białe) oraz w temperaturze pokojowej przez trzy godziny (słupki szare).

W DNA tkanek nowotworowych mózgu przechowywanych w różnych warunkach stwierdzono zróżnicowaną ilość m^5dC (Ryc. 33). Zawartość m^5dC w DNA jest najwyższa w tkance zamrażanej natychmiast po resekcji. Pozostawienie tkanki w temperaturze pokojowej

powoduje, że reakcja utleniania (niszczenia) DNA jest kontynuowana, co manifestuje się wyraźnym obniżeniem zawartości m^5dC . Utrwalenie i zatapianie tkanki nowotworowej w parafinie również nie jest obojętne dla ilościowej zawartości m^5dC w tkance i powoduje jej degradację [Barciszewska 2006, Nathan 2007].

Porównano również zawartość m^5dC w tkance nowotworowej i „prawidłowej” mózgu (z obrzeża obszaru resekcji guza) (Ryc. 34). Zbadano 4 przypadki: dwie kobiety z rozpoznaniem: gwiaździanka anaplastycznego AA (Ryc. 34-1) - 40 lat i glejaka wielopostaciowego GBM (Ryc. 34-4) - 28 lat oraz dwóch mężczyzn z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (Ryc. 34-2) - 54 lata i (Ryc. 34-3) - 66 lat. We wszystkich badanych przypadkach obserwuje się różnicę w poziomie metylacji dla fragmentu tkanki z obrzeża i centralnej części guza (Ryc. 34, 1-3). W czwartym przypadku analizowana część pośrednia również wykazała różnicę (Ryc. 34-4).



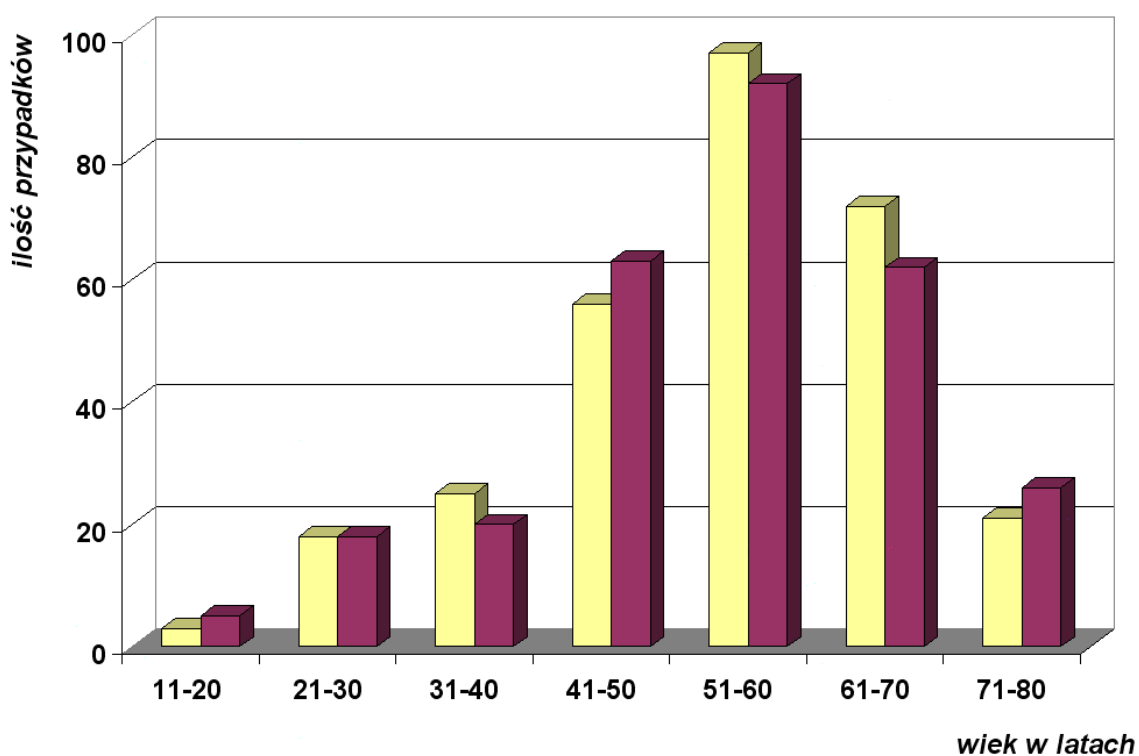
Rycina 34. Zawartość m^5dC w tkance nowotworowej oraz kontrolnej (z obrzeża obszaru resekcji) dla pacjentów z gwiaździakiem anaplastycznym (AA) oraz z glejakiem wielopostaciowym (GBM). Tkanka z obrzeża – kolor fioletowy, tkanka nowotworowa – kolor żółty, tkanka pomiędzy środkiem a obrzeżem - kolor zielony.

Ewidentne obniżenie poziomu m^5dC w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką z obrzeża świadczy nie tylko o potencjale „informacyjnym” tego nukleotydu, ale jest także wskazówką odnośnie złośliwości fragmentu usuniętego guza, co ma istotne znaczenie dla diagnostyki i badań porównawczych.

7.4. Charakterystyka materiału pobranego do badań (tkanki nowotworowe guzów mózgu)

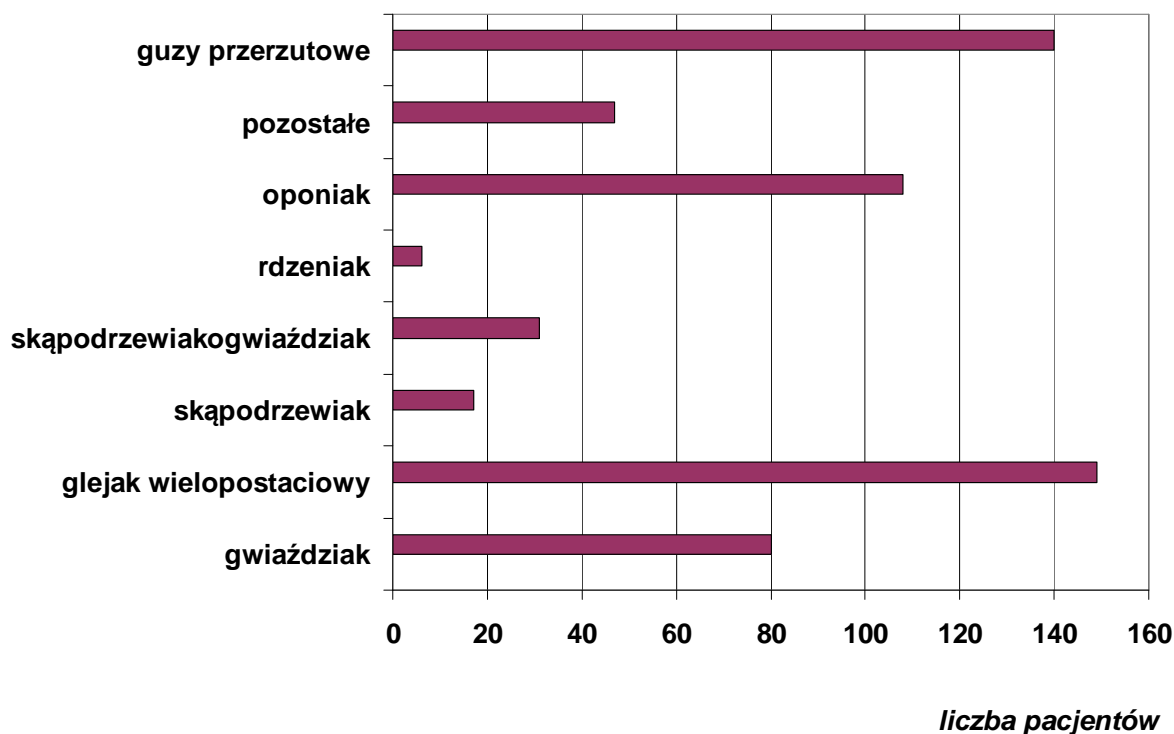
Głównym celem moich badań była analiza molekularna guzów mózgu. Analizowałam DNA pochodzący z wycinków guzów mózgu pobranych od 578 pacjentów operowanych z powodu nowotworu mózgu w Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2003 - 2009. Materiał pobierano na sali operacyjnej podczas zabiegu chirurgicznego. Uzyskane fragmenty tkanek umieszczano w probówkach natychmiast zamrożonych w temperaturze -20°C i przechowywanych w temperaturze -80°C .

Wśród 578 pacjentów były 292 kobiety (50.5%) i 286 mężczyzn (49.5%). Wiek pacjentów wahał się w przedziale od 11 do 81 lat (średnia wieku wynosiła 53.38 ± 13.19 lat). Największą grupę stanowiły osoby w przedziale wiekowym 41-70 r.ż., przy czym szczyt zachorowań przypadał na 51-60 r.ż. (Ryc. 35).



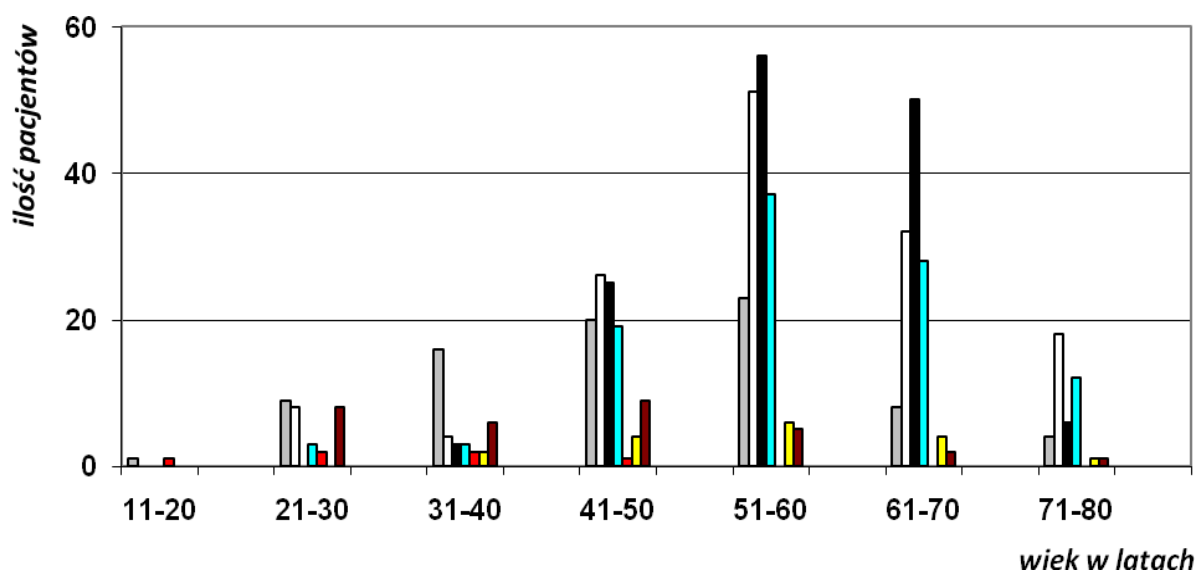
Rycina 35. Ilość zachorowań w zależności od wieku (grupy wiekowej). Kolor: żółty - kobiety, fioletowy - mężczyźni.

Typ histopatologiczny nowotworów oceniono według Klasyfikacji WHO [Louis i in. 2007a] na podstawie materiału uzyskanego podczas zabiegu operacyjnego. W Tabeli 8 i na Ryc. 36 zamieszczono typy histopatologiczne guzów, które były analizowane w badaniach.



Rycina 36. Liczba pacjentów w poszczególnych grupach histopatologicznych guzów mózgu.

Wśród badanych osób największe grupy stanowili pacjenci z guzami przerzutowymi i glejakiem wielopostaciowym. Większość guzów przerzutowych miała swoje ognisko pierwotne w płucach. Guzy przerzutowe z płuc charakteryzują się największą częstością występowania i śmiertelnością wśród nowotworów złośliwych. W badanym materiale chorzy z glejakami wielopostaciowymi stanowili drugą co do liczebności grupę pacjentów. Duże grupy stanowiły również gwiaździaki, oponiaki i skąpodrzewiakogwiaździaki. Ilość pozostałych rodzajów guzów nie przekraczała 20 pacjentów/rodzaj. Podobnie kształtują się dane epidemiologiczne w innych doniesieniach [Igun 2001, Ogungbo i in. 2002].

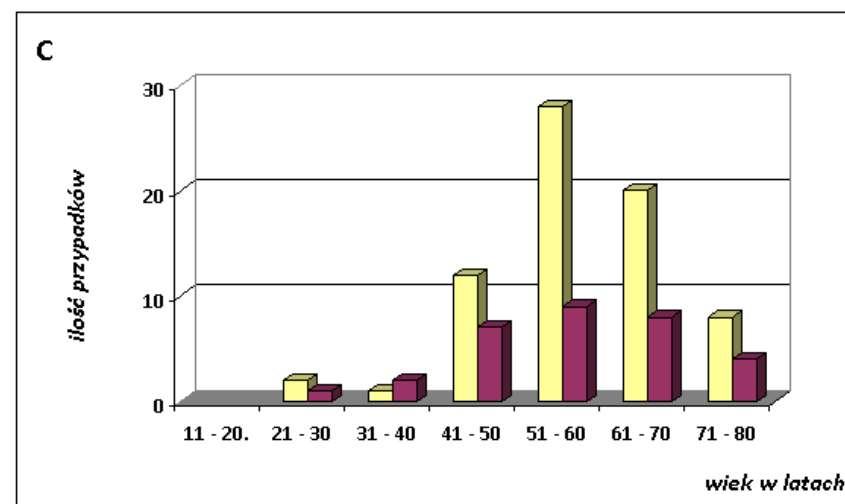
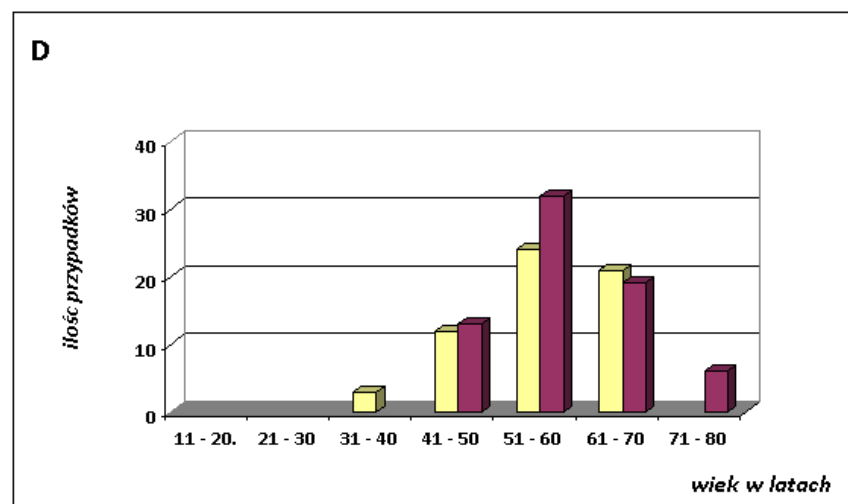
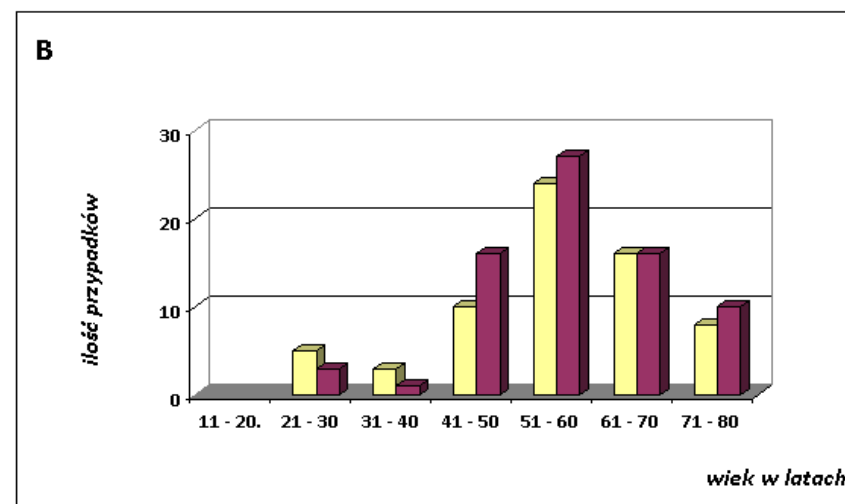
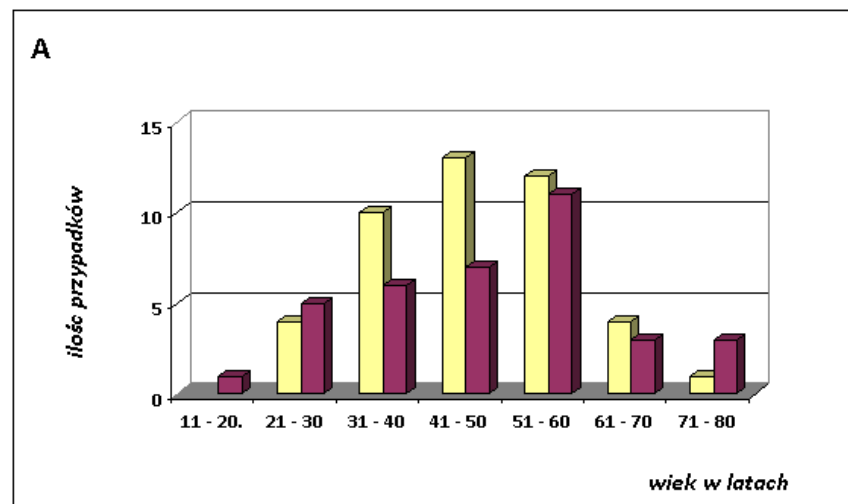


Rycina 38. Ilość poszczególnych typów nowotworów w poszczególnych grupach wiekowych: ■ - gwiazdzaki, ■ - glejaki wielopostaciowe, ■ - guzy przerzutowe, ■ - oponiaki, ■ - rdzeniaki, ■ - skąpodrzewiaki, ■ - skąpodrzewiakogwiazdzaki.

Analiza typów histopatologicznych guzów mózgu wykazała zmienność częstości ich występowania w różnych grupach wiekowych. Ilościowy udział guzów przerzutowych i glejaków wielopostaciowych wzrastał wraz z wiekiem pacjentów. W przedziale wiekowym 41-70 r.ż. wystąpiły w dużej ilości guzy przerzutowe - najwięcej w 50-70 r.ż. (Ryc. 38 i 39-4.), glejaki wielopostaciowe - maksimum w przedziale 50-60 r.ż. (Ryc. 38 i 39-2.) oraz oponiaki - najwięcej w przedziale 40-70 r.ż. (Ryc. 38 i 39-3), natomiast w grupie pacjentów 20-40 r.ż. ich występowanie było znikome. W przypadku guzów przerzutowych i glejaków wielopostaciowych zachorowalność kobiet i mężczyzn była podobna, natomiast w gwiazdzakach i oponiakach obserwowano przewagę kobiet (Ryc. 39).

Tabela 8. Ilość analizowanych guzów mózgu wg klasyfikacji WHO (2007). I – IV stopień złośliwości guza, K – kobiety, M – mężczyźni.

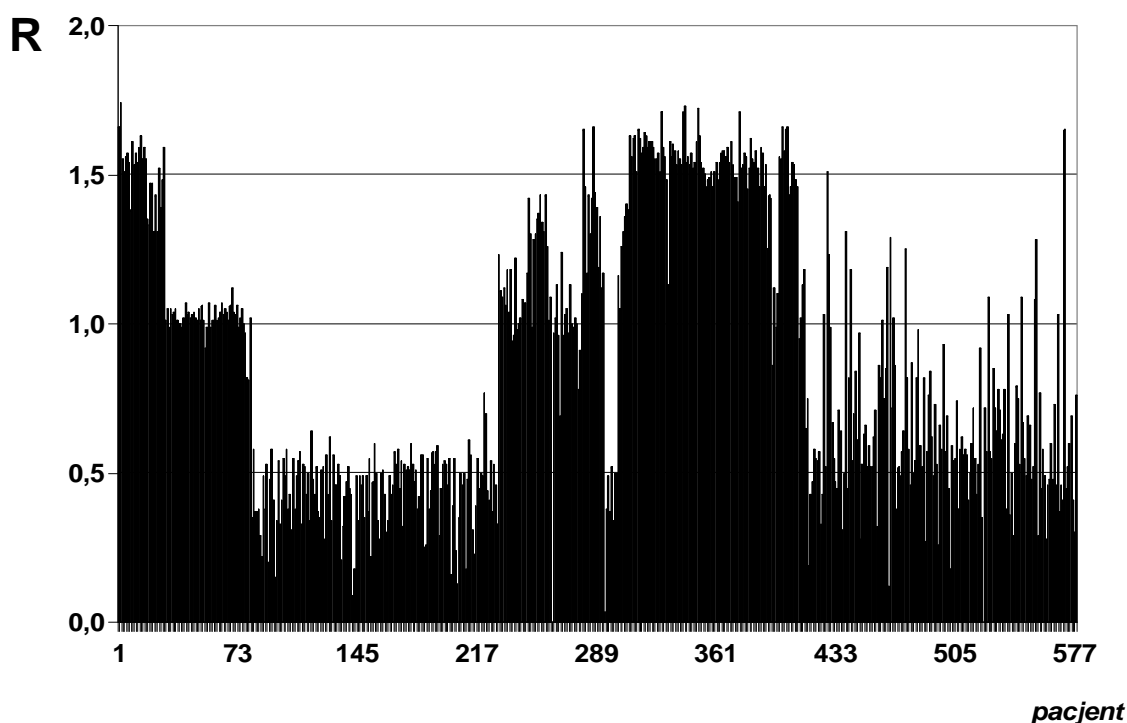
	I	II	II/III	III	III/IV	IV	K	M
Astrocytic tumours								
Pilocytic astrocytoma	4						1	3
Diffuse astrocytoma		23	1				16	8
Anaplastic astrocytoma				50	2		27	25
Glioblastoma						139	66	73
Glioma anaplasticum				3			1	2
Giant cell glioblastoma						5	4	1
Gliosarcoma						1		1
Gliomatosis cerebri						1		1
Oligodendroglial tumours								
Oligodendroglioma		9	1	1			8	3
Anaplastic oligodendroglioma				6			3	3
Oligoastrocytic tumours								
Oligoastrocytoma	1	11	3	5	1		8	13
Anaplastic oligoastrocytoma				10			5	5
Ependymal tumours								
Subependymoma	3						1	2
Ependymoma	1	3					1	3
Anaplastic ependymoma				1				1
Neuronal and mixed neuronal-glial tumours								
Ganglioglioma		2					1	1
Anaplastic ganglioglioma				1			1	
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	2						1	1
Central neurocytoma	1	2					1	2
Pineal Tumours								
Pineoblastoma						1		1
Embryonal tumours								
Medulloblastoma						6	1	5
Tumours of the cranial and paraspinal nerves								
Schwannoma	7						4	3
Meningeal tumours								
Meningioma	43						27	16
Angiomatous meningioma	11						7	4
Fibrous meningioma	22						17	5
Psammomatous meningioma	4						4	
Transitional meningioma	12						9	3
Atypical meningioma		5					3	2
Malignant meningioma				5			4	1
Haemangioblastoma	3						2	1
Haemangioma	1							1
Haemangiopericytoma				2				2
Lymphomas and hematopoietic neoplasms								
Malignant lymphomas						9	3	6
Plasmacytoma		1						1
Metastatic tumours						140	60	80
Unclassified tumours			1	1		7	6	7



Rycina 39. Występowanie guzów mózgu w zależności od wieku i płci w badanej grupie chorych (kolor: żółty – kobiety, fioletowy – mężczyźni) A – gwiazdziaki, B – glejak wielopostaciowy, C – oponiaki, D – guzy przerzutowe.

7.5. Zawartość m^5dC w DNA wyizolowanym z tkanek guzów mózgu

Analizowałam względną zawartość m^5dC w DNA z tkanek guzów mózgu 578 pacjentów operowanych w Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii UM w Poznaniu. Wyodrębniłam DNA z tkanek guzów w warunkach zapewniających zachowanie integralności cząsteczek, a następnie określiłam zawartość m^5dC metodą TLC na celulozie z wykorzystaniem urządzenia odwzorowującego (Ryc. 40). Rozpoznanie histopatologiczne dla badanych guzów oraz wartość R podane są w Tabeli I (Załącznik).



Rycina 40. Analiza zawartości m^5dC (R) w DNA komórek nowotworowych pacjentów z guzem mózgu (numeracja pacjentów odpowiada numeracji w Tab. I).

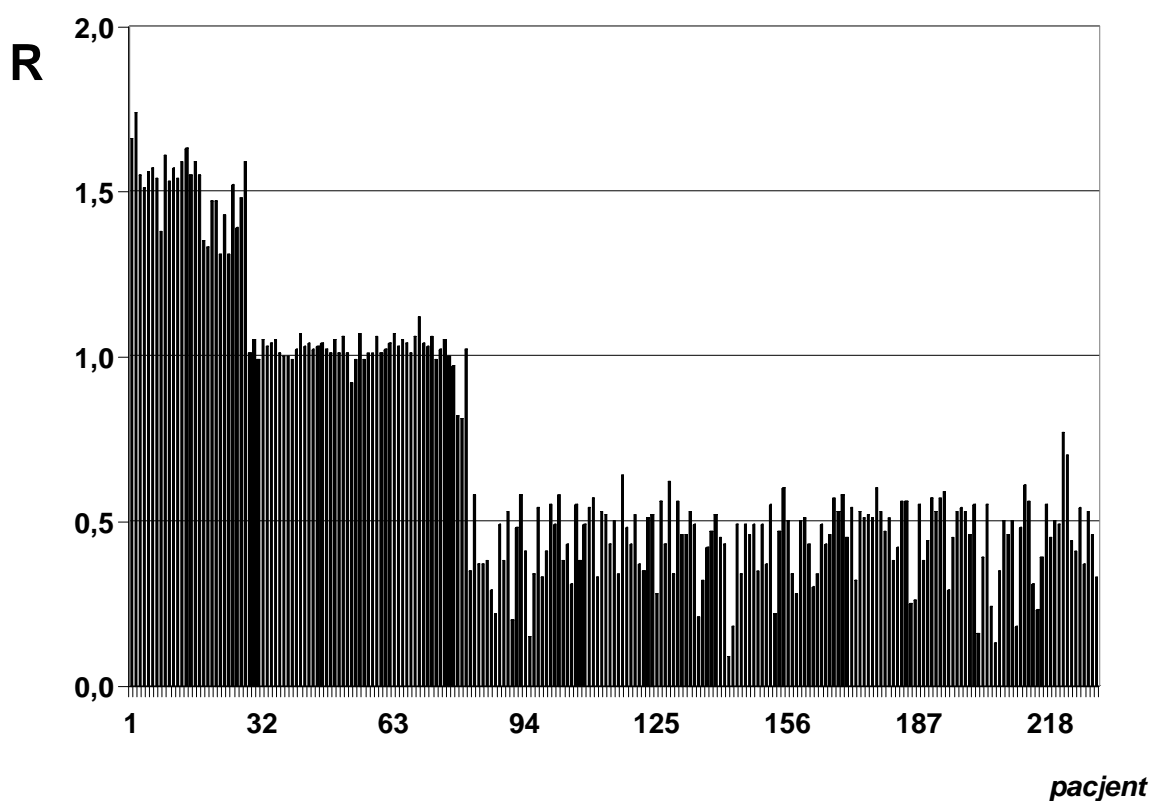
Zawartość m^5dC w DNA (R) jest bardzo zróżnicowana dla poszczególnych pacjentów i badanych nowotworów mózgu (Ryc. 40).

Guzy mózgu 578 pacjentów, dla których badałam zawartość m^5dC w DNA, należą do 5 głównych grup:

1. nowotwory pochodzenia neuroepitelialnego,
2. ostoniaki nerwowe ośrodkowe,
3. oponiaki,

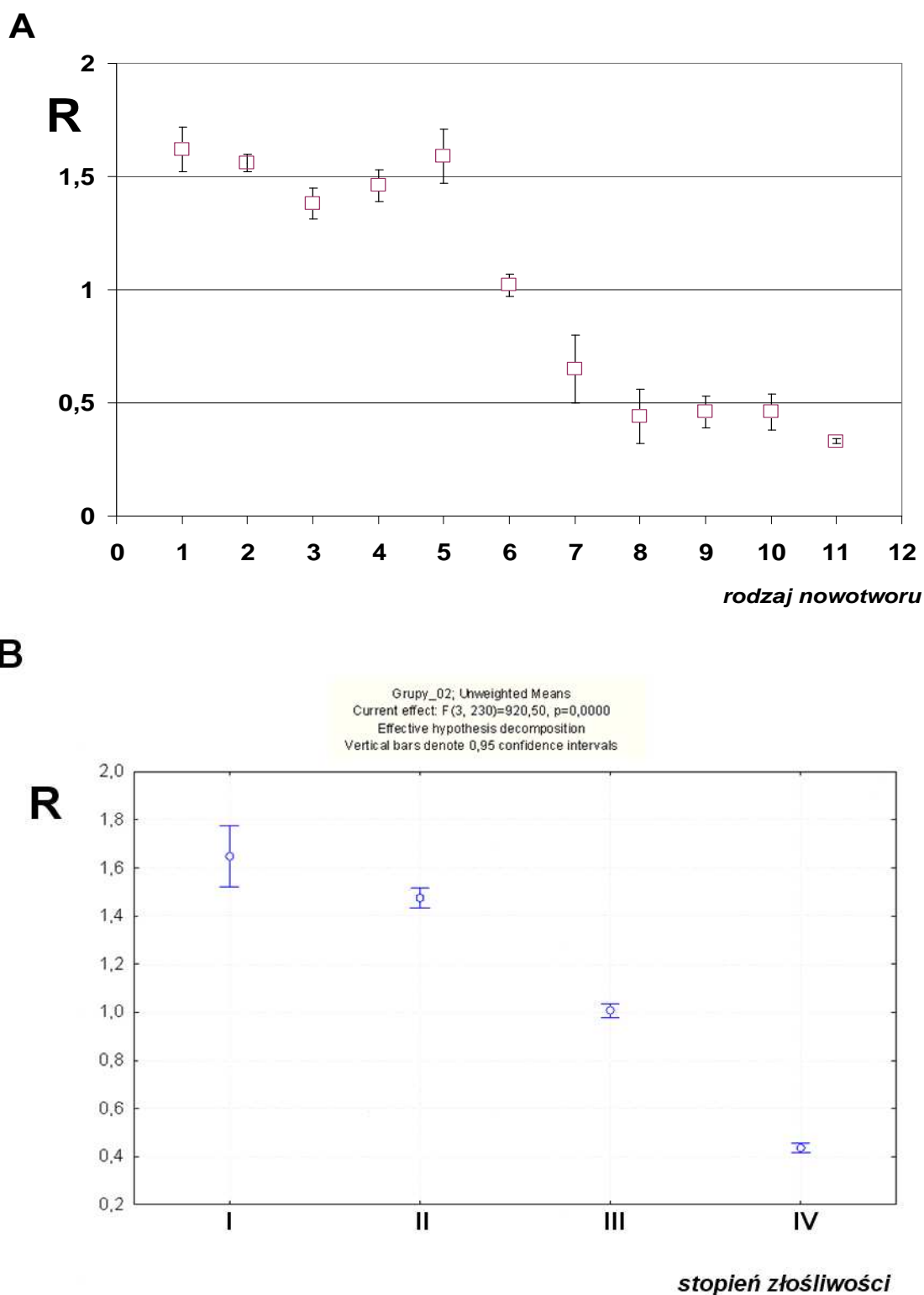
4. chłoniaki i nowotwory układu krwiotwórczego,
5. guzy przerzutowe,
6. guzy niesklasyfikowane.

Rycina 41 przedstawia zawartość m^5dC w DNA wyizolowanym z tkanki nowotworowej guzów szeregu astrocytarnego. W analizowanych przypadkach zauważono zróżnicowaną zawartość m^5dC . W badanym materiale największą grupę stanowił glejak wielopostaciowy (n=139) i gwiaździak anaplastyczny (n=52), pozostałe występowały rzadziej: gwiaździak włosowatokomórkowy (n=4), włókienkowy (n=20), gemistocytarny (n=3) i protoplazmatyczny (n=1), glejak wielopostaciowy olbrzymiokomórkowy (n=5), glejakomięsak (n=1) oraz glejakowatość mózgu (n=1).

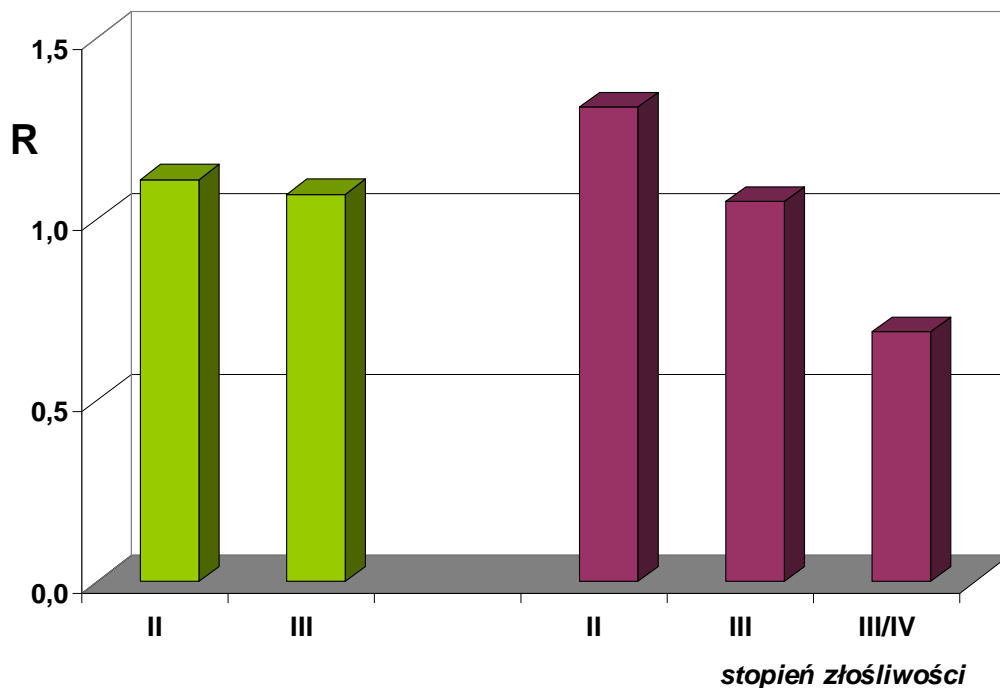


Rycina 41. Analiza zawartości m^5dC (R) w DNA wyizolowanym z komórek nowotworowych szeregu astrocytarnego (numeracja pacjentów odpowiada numeracji w Tab. I).

W tej grupie pacjentów zawartość m^5dC (R) w DNA guzów mieści się w przedziale 0 – 1.75. Dla guzów o stopniu złośliwości WHO I i II wartości R leżą w przedziale 1.3 - 1.75, dla WHO III R wynosi ok. 1.0, natomiast poziom 0 - 0.5 osiągają guzy o złośliwości WHO IV (Ryc. 41). Można zatem powiedzieć, że zawartość m^5dC w guzach mózgu szeregu astrocytarnego maleje wraz ze wzrostem stopnia złośliwości guza (Ryc. 42).

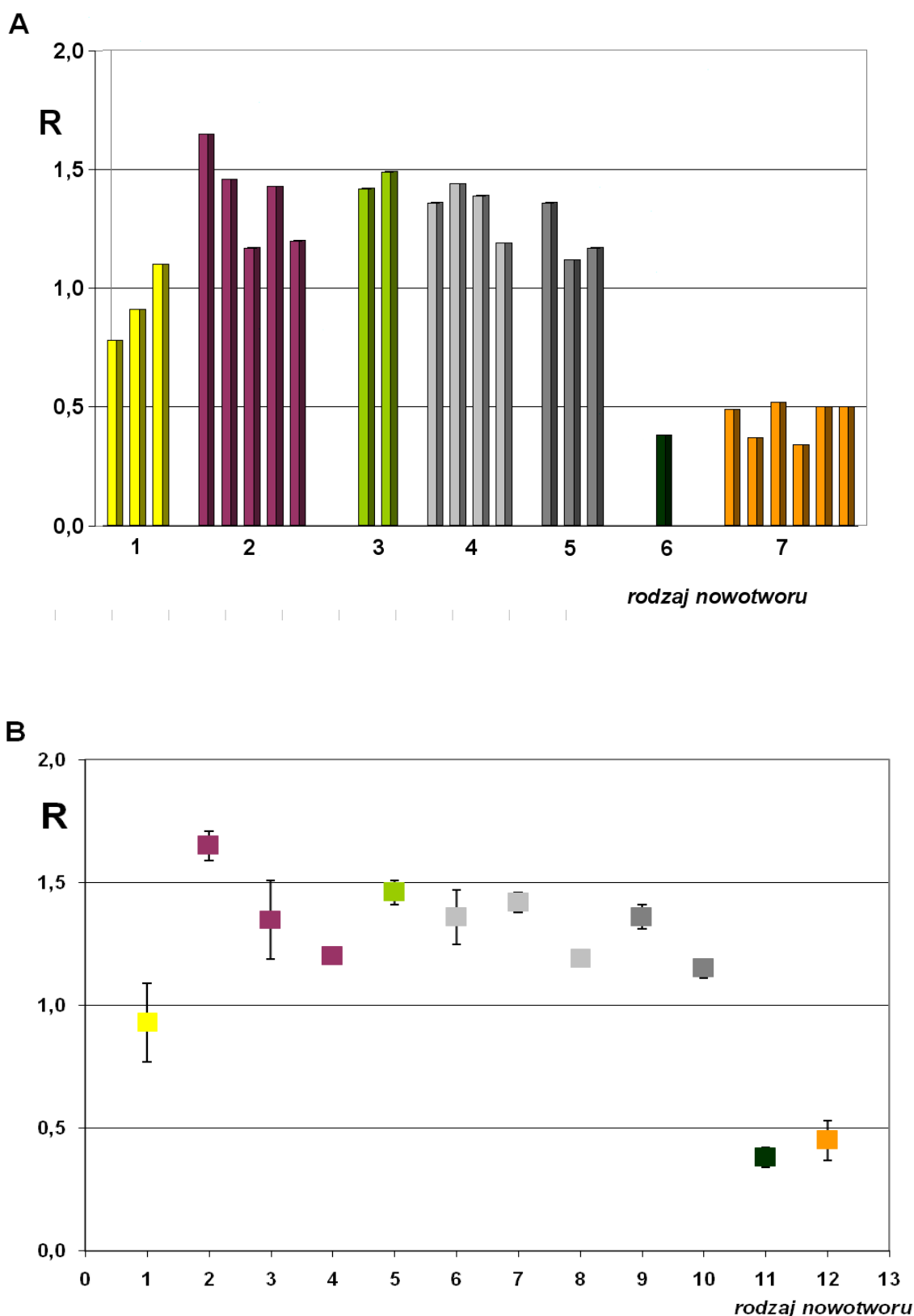


Rycina 42. Średnia wartość R (m^5dC) w DNA: **A** - dla guzów szeregu astrocytarnego: 1 – astrocytoma pilocyticum I (1.62 ± 0.13), 2 – astrocytoma fibryllare II (1.56 ± 0.04), 3 – astrocytoma fibryllare partim protoplasmaticum et gemistocyticum II (1.38 ± 0.07), 4 – astrocytoma gemistocyticum II (1.46 ± 0.07), 5 – astrocytoma protoplasmaticum II (1.59 ± 0.12), 6 – astrocytoma anaplasticum III (1.02 ± 0.05), 7 – glioma anaplasticum III (0.65 ± 0.15), 8 – glioblastoma multiforme IV (0.44 ± 0.12), 9 – glioblastoma multiforme gigantocellulare IV (0.46 ± 0.07), 10 – gliosarcoma IV (0.46 ± 0.08), 11 – gliomatosis cerebri IV (0.33 ± 0.01). **B** - Średnia wartość m^5dC w DNA (R) komórek nowotworowych szeregu astrocytarnego o stopniu złośliwości: I – 1.62 ± 0.13 , II – 1.49 ± 0.06 , III – 1.02 ± 0.03 , IV – 0.44 ± 0.02 .



Rycina 44. Zawartość m^5dC w DNA (R) tkanek skąpodrzewiaków o różnym stopniu złośliwości (słupki żółte; II – 1.11 ± 0.10 , III – 1.07 ± 0.07) i skąpodrzewiakogwiaździaków (słupki fioletowe; II – 1.31 ± 0.13 , III – 1.05 ± 0.09 , IV – 0.69 ± 0.06) - zależność od.

Zawartość m^5dC w DNA (R) w innych guzach pochodzenia neuroepitelialnego przedstawiona jest na Ryc. 45 i w Tabeli 9. Rycina 45-B przedstawia średnie wartości R dla poszczególnych guzów w zależności od stopnia złośliwości.



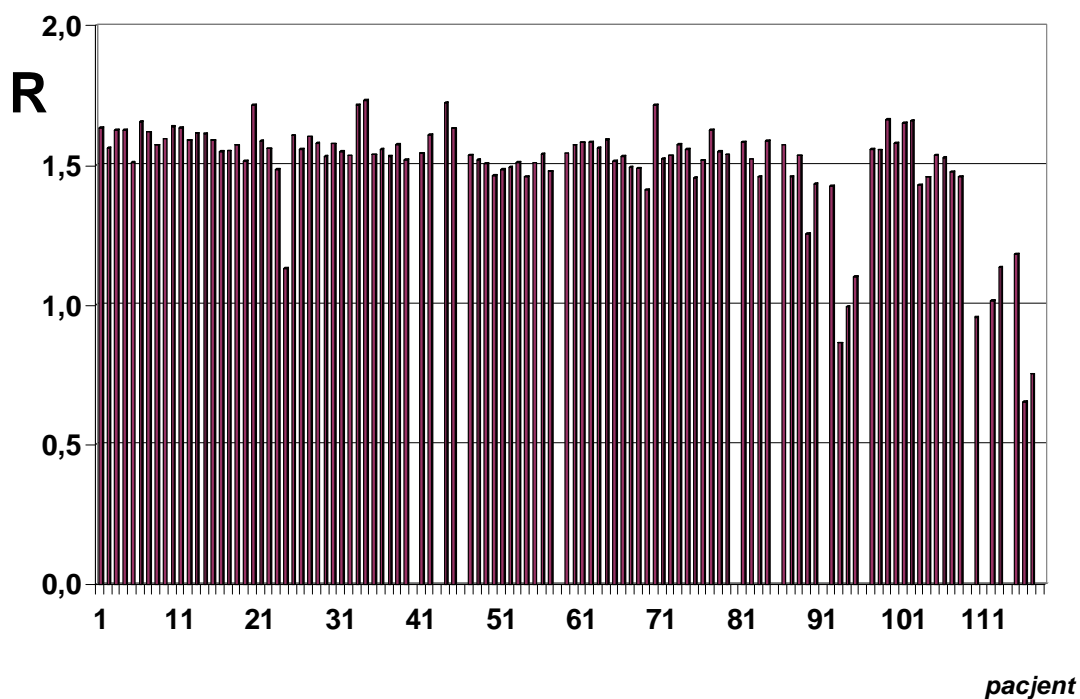
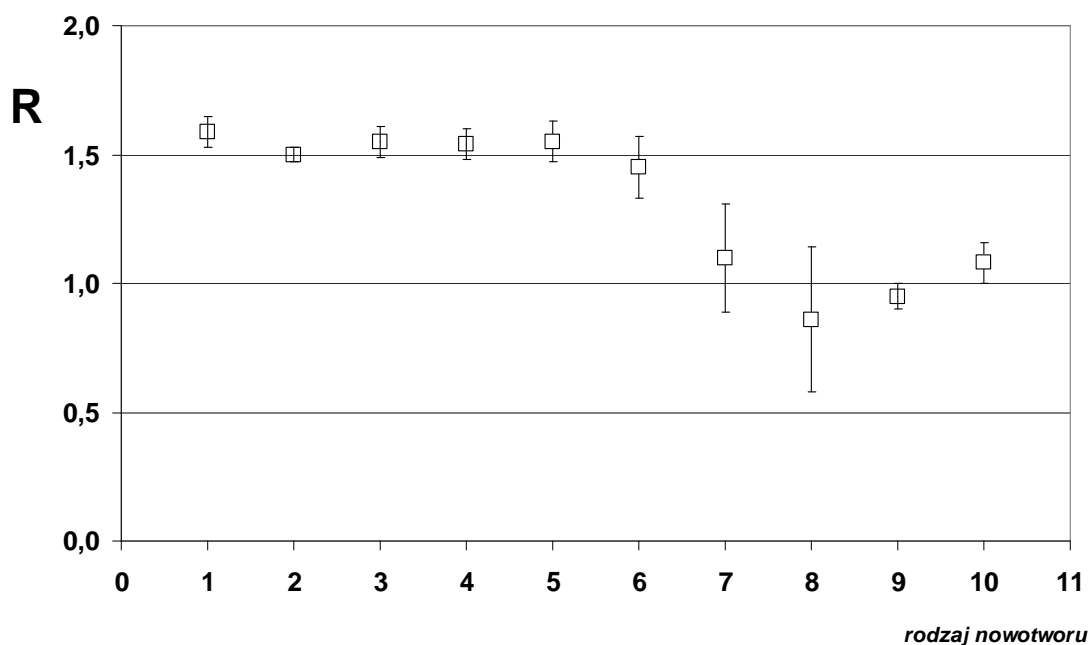
Rycina 45. A - Zawartość m^5dC w DNA (R) wyizolowanego z tkanek nowotworowych: 1 – podwyściółczak ($n=3$), 2 – wyściółczak ($n=5$), 3 – dysembrioplastyczny nowotwór neuroepitelialny ($n=2$), 4 – zwojakoglejak ($n=4$), 5 – nerwiak komórkowy ośrodkowy ($n=3$), 6 – szyszyniak zarodkowy ($n=1$), 7 – rdzeniak ($n=6$); **B** – średnia wartość m^5dC w DNA (R) tkanek nowotworowych pacjentów opisanych w Tab. 9 i na Ryc. A.: 1 – podwyściółczak (I), 2 – wyściółczak (I), 3 – wyściółczak (II), 4 – wyściółczak (III), 5 – dysembrioplastyczny nowotwór neuroepitelialny, 6 – zwojakoglejak (I), 7 – zwojakoglejak (II), 8 – zwojakoglejak (III), 9 – nerwiak komórkowy ośrodkowy (I), 10 – nerwiak komórkowy ośrodkowy (II), 11 – szyszyniak zarodkowy (IV), 12 – rdzeniak zarodkowy (IV).

Tabela 9. Charakterystyka analizowanych guzów pochodzenia neuroepitelialnego (Ryc. 45).

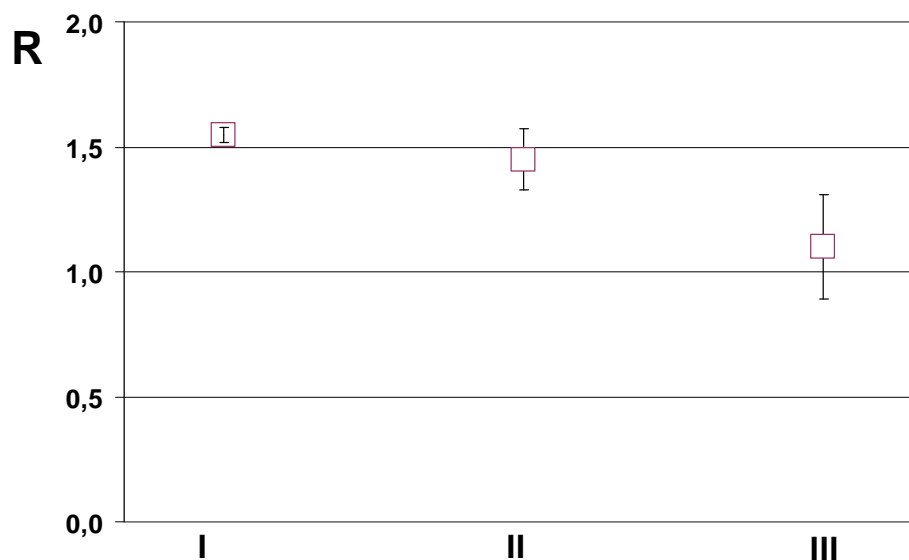
Typ nowotworu	m ⁵ dC [%]	SD	Stopień złośliwości	Płeć	Wiek
Podwyściółczak	0.78	0.12	I	M	49
Podwyściółczak	0.91	0.19	I	M	56
Podwyściółczak	1.10	0.15	I	K	66
Wyściółczak	1.65	0.06	I	M	43
Wyściółczak	1.46	0.18	II	M	11
Wyściółczak	1.17	0.15	II	M	31
Wyściółczak	1.43	0.16	II	K	36
Wyściółczak anaplastyczny	1.20	0.03	III	M	40
Nowotwór dysembrioplastyczny	1.42	0.06	I	M	19
Nowotwór dysembrioplastyczny	1.49	0.04	I	K	29
Zwojakoglejak	1.36	0.11	I	K	48
Zwojakoglejak	1.44	0.05	II	K	21
Zwojakoglejak	1.39	0.04	II	M	33
Zwojakoglejak anaplastyczny	1.19	0.03	III	K	32
Nerwiak komórkowy ośrodkowy	1.36	0.05	I	M	45
Nerwiak komórkowy ośrodkowy	1.12	0.04	II	K	22
Nerwiak komórkowy ośrodkowy	1.17	0.04	II	M	25
Szyszyniak zarodkowy	0.38	0.04	IV	M	28
Rdzeniak zarodkowy	0.49	0.06	IV	K	18
Rdzeniak zarodkowy	0.37	0.04	IV	M	28
Rdzeniak zarodkowy	0.52	0.11	IV	M	30
Rdzeniak zarodkowy	0.34	0.08	IV	M	39
Rdzeniak zarodkowy	0.50	0.10	IV	M	40
Rdzeniak zarodkowy	0.50	0.07	IV	M	42

Dla wyściółczaków (Ryc. 45 B - 2,3,4), zwojogolejaków (Ryc. 45 B - 6,7,8) i nerwiaka komórkowego ośrodkowego widoczna jest zależność od stopnia złośliwości guza. Większość badanych guzów wykazuje zawartość m⁵dC (R) w przedziale od 1 do 1.5 dla złośliwości guza I i II. Szyszyniak zarodkowy (Ryc. 45 B – 11) i rdzeniak zarodkowy (Ryc. 45 B – 12) o IV stopniu złośliwości cechują się prawie trzykrotnie mniejszą zawartością m⁵dC.

Jedną z analizowanych grup o dużej liczebności stanowiły oponiaki. Są to zazwyczaj łagodne (WHO I) nowotwory ośrodkowego układu nerwowego umiejscowione w oponach mózgowo-rdzeniowych mózgowia lub rdzenia kręgowego. Oponiaki są zróżnicowane histologicznie, co znalazło odzwierciedlenie również w badanej grupie pacjentów: oponiak meningotelialny (n=44), naczyńniakowaty (n=11), włóknisty (n=22), piaszczakowaty (n=4), atypowy (n=5), złośliwy (n=5) oraz przejściowy (n=11). Do tej grupy należą także naczyńniak krwionośny (n=1), obłoniak (n=2) oraz naczyńniak krwionośny zarodkowy (n=3) (Ryc. 46).

A**B**

Rycina 46. A - Zawartość m^5dC w DNA (R) wyizolowanym z tkanek nowotworowych oponiaków (dotyczy pacjentów w Tab. I oznaczonych numerami 308-409). B - Zawartość m^5dC w DNA (R) tkanek nowotworowych oponiaków : 1 - oponiak meningotelialny I, 2 - naczyniakowaty I, 3 - włóknisty I, 4 - piaszczakowaty I, 5 - przejściowy II, 6 - atypowy II, 7 - złośliwy III, 8 - naczyniak krwionośny zarodkowy I, 9 - naczyniak I, 10 - obłoniak III.

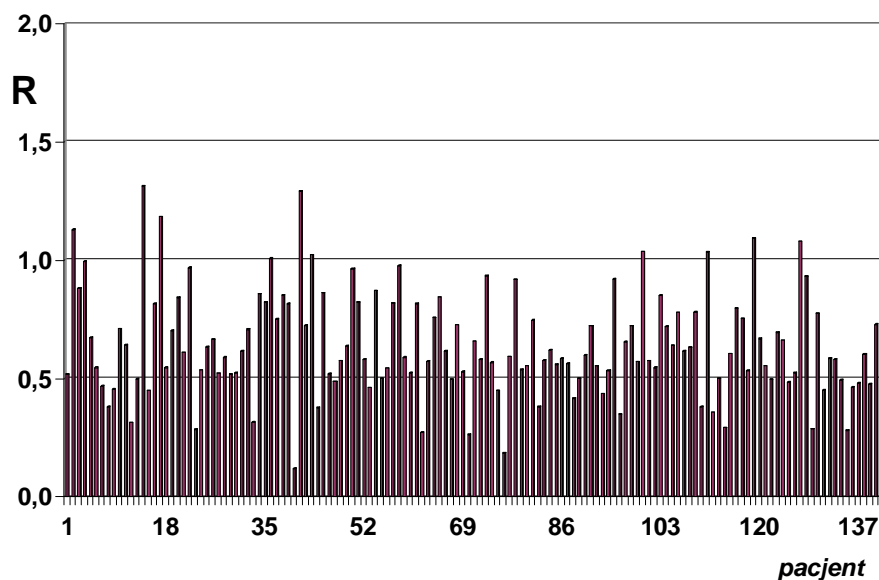


Rycina 47. Średnia zawartość m^5dC w DNA tkanek oponiaków dla stopni złośliwości: I, II, III.

Zawartość m^5dC w oponiakach utrzymuje się na stałym poziomie (Ryc. 46, 47). Guzy o stopniu złośliwości I wykazują podobną zawartość m^5dC . Oponiaki atypowe o stopniu złośliwości II wykazują nieznaczny rozrzut zawartości m^5dC . Nowotwory stopnia III mają najmniejszy poziom m^5dC . W 6 przypadkach badanych naczyniaków średnia zawartość m^5dC w DNA (R) była niższa od zawartości m^5dC w oponiakach.

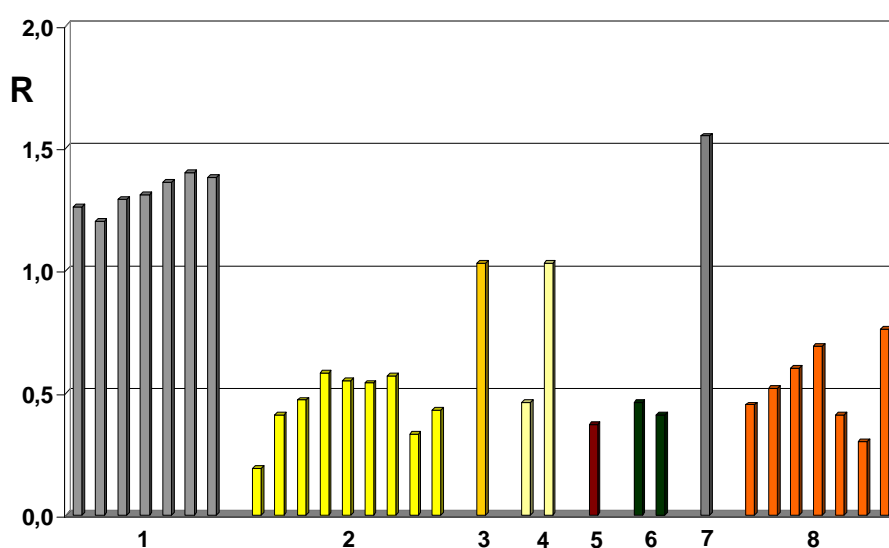
Najczęściej rozpoznawanymi guzami śródczaszkowymi u dorosłych są przerzuty do mózgu. Pochodzą one głównie z raka płuc, raka piersi, czerniaka złośliwego, raka nerki i gruczolaka jelita grubego. Ponad 80% przerzutowych guzów mózgu stwierdza się po rozpoznaniu nowotworu pierwotnego. Około 5 – 20 % z nich przerzut do mózgu może stanowić pierwszą manifestację choroby nowotworowej.

W niniejszej pracy analizowałam DNA 140 pacjentów z przerzutowymi guzami mózgu. Najwięcej było nowotworów z ogniskiem pierwotnym w płucach (56 przypadków). Pozostałe źródła przerzutowania to: czerniak (7 przypadków), gruczoł sutkowy (6 przypadków), narządy rodne (8 przypadków), jelito grube (6 przypadków), nerka (2 przypadki), prostata, krtań, przełyk i język (po 1 przypadku). W pozostałych przypadkach nie udało się określić ogniska pierwotnego. Poziom m^5dC w DNA (R) wydaje się być wyższy niż ten obserwowany w GBM oraz nieco niższy niż w AA.



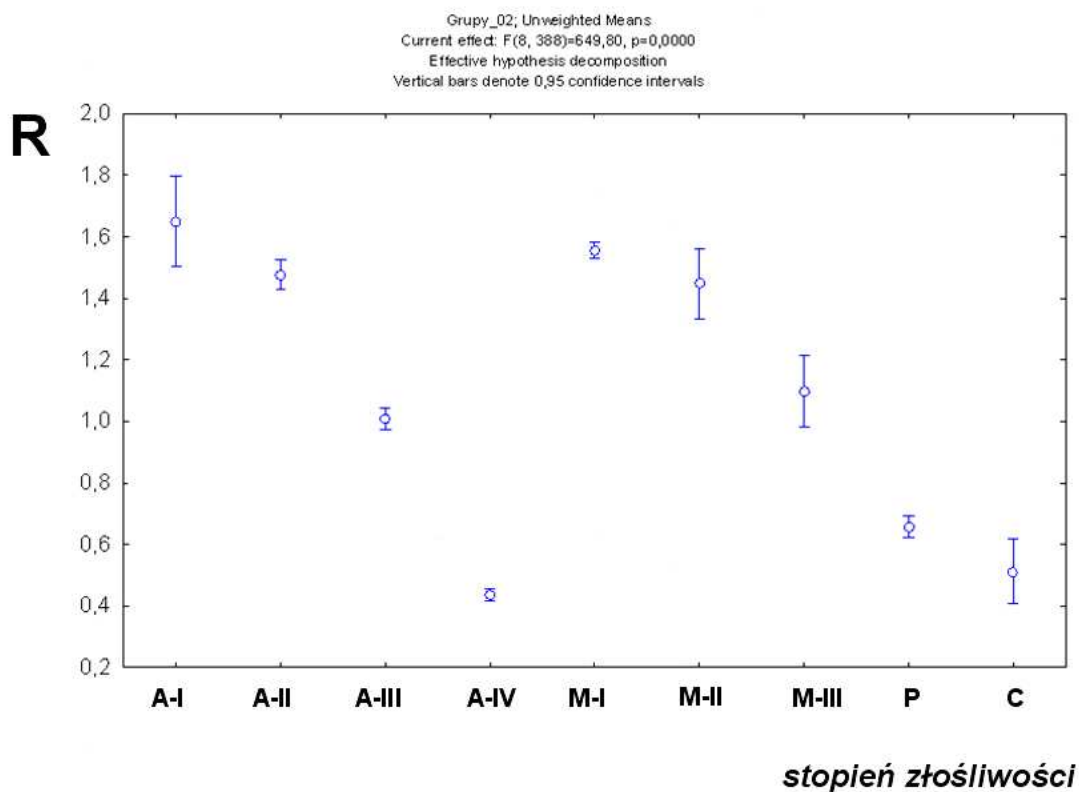
Rycina 48. Zawartość m^5dC w DNA (R) wyizolowanym z tkanek nowotworowych guzów przerzutowych (pacjenci w Tab. I: 426-565).

Inne pojedyncze przypadki guzów mózgu przedstawiono na Ryc. 49. Zawartość m^5dC dla tych nowotworów jest zróżnicowana. W przypadku nerwiaka ośłonkowego o złośliwości I zawartość m^5dC sytuuje się w granicach od 1.2 do 1.4, natomiast dla guzów IV stopnia złośliwości, chłoniaka złośliwego (*lymphoma malignum*) i nowotworu określonego jedynie jako złośliwy (*neoplasma malignum*), wartość R jest niższa niż 1.



Rycina 49. Zawartość m^5dC w DNA wyizolowanym z tkanek nowotworowych pozostałych guzów : 1 – nerwiak ośłonkowy, 2 – chłoniak złośliwy, 3 – szpiczak mnogiej, 4 – glejak, 5 – gruczolak, 6 – naczyniak tętniczo-żylny, 7 – gradówka, 8 – nowotwór złośliwy.

Zamieszczona poniżej rycina przedstawia zestawienie wyników analizy statystycznej dla guzów szeregu astrocytarnego, oponiaków oraz dwóch rodzajów guzów przerzutowych (Ryc. 50). W przypadku guzów pierwotnych zawartość m^5dC maleje wraz ze wzrostem stopnia złośliwości guza. Wartości R dla guzów przerzutowych są zbliżone do tych dla stopnia złośliwości III-IV w guzach pierwotnych.



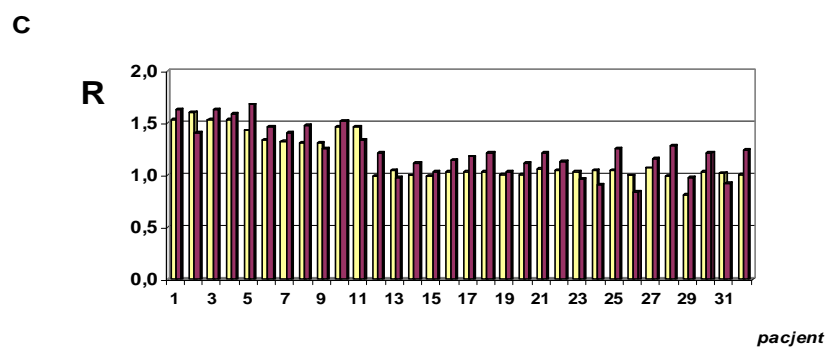
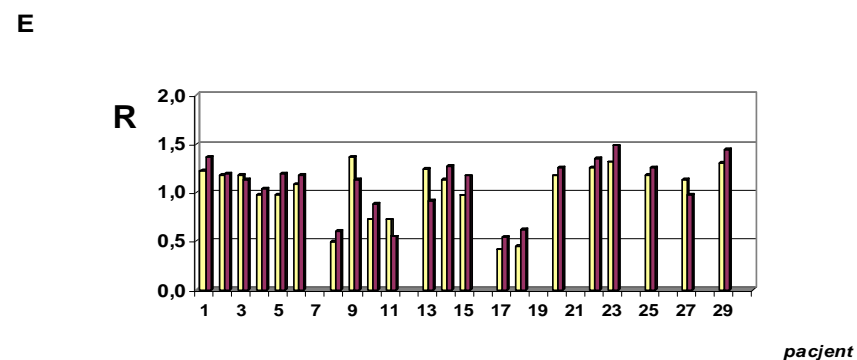
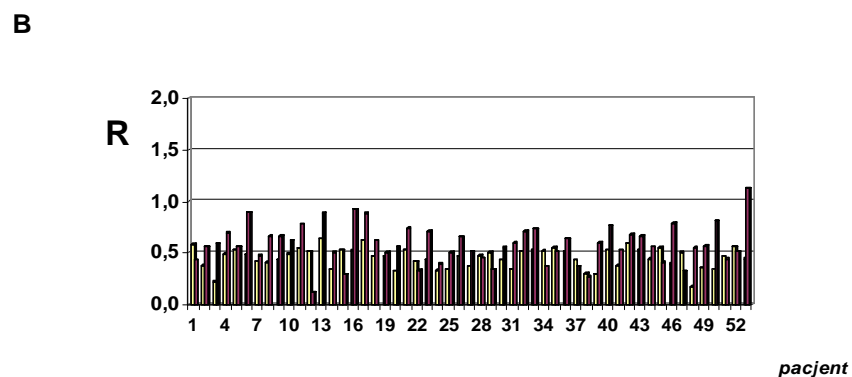
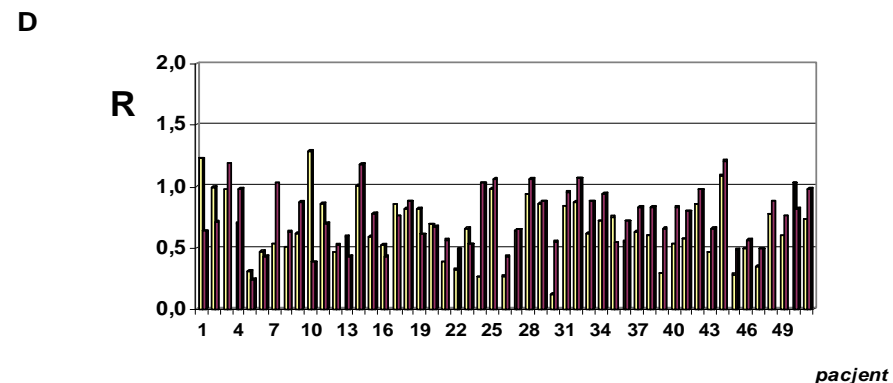
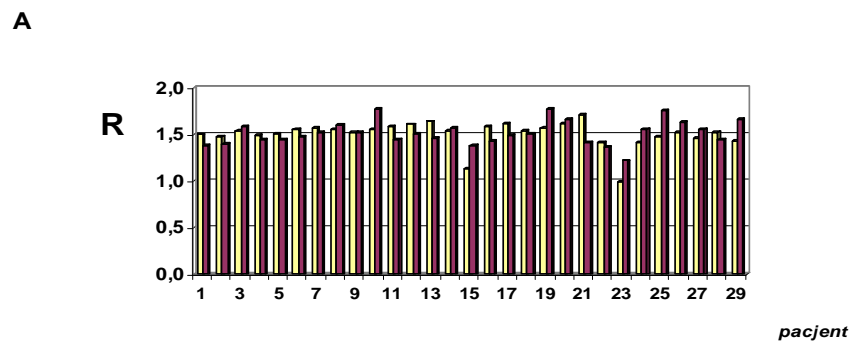
Rycina 50. Średnia zawartość m^5dC (R) w DNA: astrocytoma WHO I (A-I), astrocytoma WHO II (A-II), astrocytoma WHO III (A-III), glioblastoma WHO IV (A-IV), meningeoma WHO I (M-I), meningeoma WHO II (M-II), meningeoma WHO III (M-III), przerzut z płuca (P), przerzut czerniaka (C).

7.6. Analiza całkowitej zawartości m⁵dC w DNA z tkanek i krwi obwodowej pacjentów z guzami mózgu

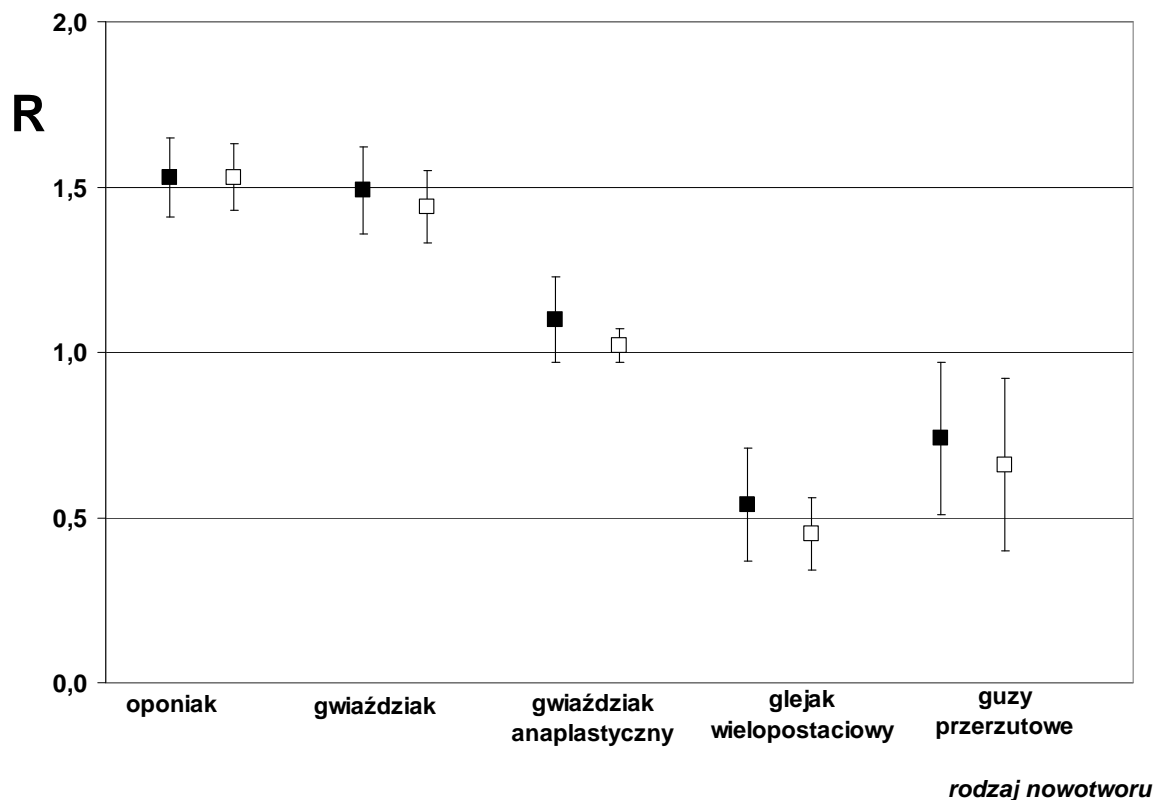
Analizowałam względną zawartość m⁵dC w DNA wyodrębnionym z komórek nowotworowych mózgu oraz krwi obwodowej u 186 pacjentów z guzami mózgu (Tab. II). Badano następujące rodzaje guzów mózgu:

- oponiaki – 29 przypadków (23 kobiety, K i 6 mężczyzn, M),
- gwiaździaki – 32 przypadki (18 K, 14 M),
- skąpodrzewiaki – 6 przypadków (3 K, 3 M),
- glejaki mieszane – 3 przypadki (1 K, 2 M),
- glejaki wielopostaciowe – 53 przypadki (24 K, 29 M),
- guzy przerzutowe – 51 przypadków (18 K, 33 M),
- inne – 12 przypadków (glejaki niesklasyfikowane – 3 M, zwojakoglejak – 1 K, nowotwór złośliwy – 2 M, nerwiak komórkowy ośrodkowy – 1 M, nerwiak osłonkowy – 2 K, naczyniak krwionośny zarodkowy – 1 K, obłoniak – 1 M, wyściółczak – 1 M).

Poziom metylacji cytozyny w DNA w tkance nowotworowej i z krwi obwodowej u 186 pacjentów jest zbieżny, chociaż nie identyczny (Tab. II). W niektórych przypadkach obserwowane są znaczne różnice, co może być wynikiem nałożenia się obrazu innych chorób, które również mają wpływ na zawartość m⁵dC (Ryc. 51) [Barciszewska i in. 2007b, Smolarek i in. 2010]. Widoczna jest zależność między złośliwością guzów mózgu a poziomem m⁵dC (R) we krwi, tak samo jak dla tkanek nowotworowych. Zatem monitorowanie zmian epigenetycznych w DNA izolowanym z krwi obwodowej pacjentów daje szansę na szybsze i łatwiejsze diagnozowanie guzów mózgu [Holland 2000].



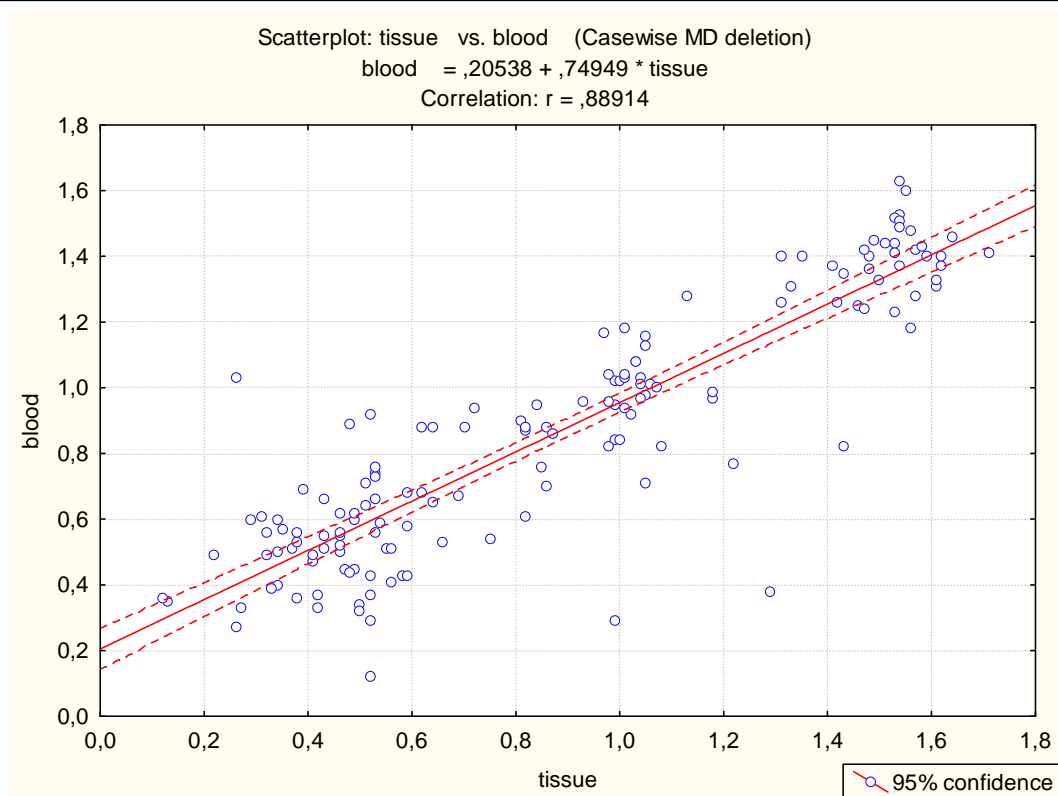
Rycina 51. Zawartość m^5dC w DNA tkanek nowotworowych (ciemne słupki) i krwi (jasne słupki) dla pacjentów z A – oponiakami (Tab. II: 1-29), B – glejakami wielopostaciowymi (Tab. II: 74-127), C – gwiaździami (Tab. II: 30-60), D – guzami przerzutowymi (Tab. II: 128-178), E – pozostałe: 1-6 – skąpodrzewiak (Tab. II: 62-67), 8-14 – skąpodrzewiakogwiaździak (Tab. II: 68-73), 16,17 - nowotwór złośliwy (Tab. II: 179-180), 18 - nerwiak komórkowy ośrodkowy (Tab. II: 181), 19,20 - nerwiak osłonkowy (Tab. II: 182-183), 21 - naczynek krwionośny zarodkowy (Tab. II: 184), 22 – obłoniak (Tab. II: 185), 23 - wyściółczak anaplastyczny (Tab. II: 186).



Rycina 52. Zawartość m^5dC (R) w DNA komórek nowotworowych oraz z krwi obwodowej dla grupy pacjentów z guzami mózgu (krew - ciemne kwadraty, tkanka - jasne kwadraty).

Porównanie poziomu m^5dC w DNA wyizolowanym z guzów oraz krwi pacjentów pokazuje, że ilość tego epigenetycznego znacznika jest bardzo podobna w obu próbkach tego samego pacjenta. Ponadto wykazuje spadek zawartości m^5dC ze wzrostem złośliwości nowotworu. Widać również, że guzy przerzutowe pod względem wartości R sytuują się pomiędzy GBM a AA na krzywej złośliwości guzów (Ryc. 52).

Analiza korelacji wykazała jednoznaczną zależność pomiędzy zawartością m^5C (R) w DNA komórek guza i DNA izolowanym z komórek krwi obwodowej u operowanych pacjentów (Ryc. 53).



Rycina 53. Wykres pokazujący wynik analizy korelacji pomiędzy zawartością m^5dC (R) w DNA komórek guza i DNA izolowanym z komórek krwi obwodowej u pacjentów z guzami mózgu; $r=0.88914$, $p < 0.05$.

8. Dyskusja

DNA człowieka zawiera 4 podstawowe zasady: adeninę, guaninę, cytozynę i tyminę zaangażowane w kodowanie informacji genetycznej. Ich modyfikacja czy uszkodzenie prowadzi do mutacji. Mogą one być wykrywane w pojedynczych genach za pomocą różnych technik, opierając się na znajomości struktury pierwszorzędowej DNA (sekwencji nukleotydów). W tych analizach nie uwzględnia się jednak faktu, że DNA komórek eukariotycznych, w tym człowieka, zawiera znaczny ułamek 5-metylocytozyny, która oprócz funkcji kodowania informacji genetycznej ($m^5C \equiv G$) jest również ważnym elementem epigenetycznej regulacji ekspresji genów. Od niedawna obserwuje się wzrost zainteresowania znacznikami epigenetycznymi, gdyż okazało się, że w przypadku wielu typów nowotworów, hipo- lub hipermetylacja DNA są najczęściej i najwcześniej występującymi zmianami molekularnymi. Metylacja DNA wpływa na oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi i polimerazami DNA szczególnie w rejonach promotorowych, co prowadzi do obniżonej ekspresji swoistej dla danego etapu rozwoju organizmu oraz tkanki. Każda zmiana poziomu metylacji powoduje zaburzenia w transkrypcji oraz syntezie białka. Metylacja jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju komórek, a zaburzenie tego procesu powoduje selektywną proliferację, której wynikiem jest rozwój nowotworu.

Faktem powszechnie znanym jest zróżnicowany poziom metylacji DNA (m^5C) w komórkach nowotworowych i normalnych. m^5C występuje w genomie głównie w dinukleotydach CpG, ale nie tylko. Metylacja genów supresorowych nowotworów w rejonie końca 5' powoduje ich wyciszenie, a w konsekwencji brak odpowiednich białek supresorowych np. BRCA1 lub p53. Prowadzi to bezpośrednio do nowotworzenia [Zukiel i in. 2004]. Z drugiej strony metylacja części kodującej genów może aktywować proces transkrypcji i syntezy białka niezbędnego na danym etapie rozwoju komórki. Wskazuje to wyraźnie, że metylacja DNA, będąca markerem epigenetycznym, znajduje się w centrum regulacji ekspresji genów. Precyzyjne zrozumienie tego procesu wymaga znajomości wzoru i poziomu metylacji wielu genów. Takie próby podejmowane są przy pomocy wielu metod, m.in. zastosowania mikromacierzy. Ich wynikiem są długie listy genów ulegających aktywacji w zależności od poziomu metylacji. Oczywiście jest, że na obecnym etapie rozwoju tej technologii nie uda się uzyskać pełnej odpowiedzi na stawiane pytania badawcze.

Wydaje się, że potencjalnie każdy zmodyfikowany nukleozyd może być wykorzystany w badaniach różnych stanów chorobowych i patologicznych jako chemiczny znacznik

(marker). Problem polega na dostępności metody analizy ilościowej danego związku w materiale biologicznym oraz konkretnej możliwości jej zastosowania w laboratorium diagnostycznym. Niektóre zmodyfikowane nukleozydy charakteryzują się bardzo swoistymi właściwościami i mogłyby być podstawą oceny ich obecności i poziomu w komórce, np. zasada Y (wyozyrna), występująca w tRNA specyficznym dla fenyloalaniny (z roślin, drożdży i człowieka), jest jedynym związkiem fluoryzującym wśród składników kwasów rybonukleinowych, a siarkowe pochodne zasad kwasów nukleinowych charakteryzują się dodatkową absorpcją światła ultrafioletowego w rejonie 320 nm. Mimo tych unikalnych właściwości, nukleozydy te nie mogą być wykorzystane w diagnostyce ze względu na nakładanie się widm emisji ich fluorescencji z widmami innych składników komórkowych oraz ze względu na niską czułość metody.

Poznanie sekwencji nukleotydowej genów człowieka, a także innych *Eukaryota*, wskazało jednoznacznie na kluczowe znaczenie mechanizmów epigenetycznych w regulacji ekspresji genów [Robertson i Jones 2000]. Zrozumienie funkcjonowania niekodujących białka kwasów rybonukleinowych (ncRNA), poznanie logiki modyfikacji histonów stanowiących „drugi kod genetyczny”, a przede wszystkim odgadnięcie reguł działania i zakresu występowania w DNA piątego nukleotydu jakim jest 5-metylocytozyna stało się potrzebą ery pogenomowej. Ten obszar wiedzy nazwano metylomem, a aktywność badawczą w tym zakresie „metylonauką”. Właśnie poznanie metylomu należy obecnie do najbardziej gorącego tematu badawczego ostatnich lat. Upatruje się w nim prostego klucza do zrozumienia prawidłowego funkcjonowania komórki, a także jej patologii.

5-metylocytozyna (m^5C) w DNA zajmuje szczególne miejsce w funkcjonowaniu dekodowania informacji zawartej w genach. Tworzy parę zasad typu Watsona-Cricka z guanozyną w sposób identyczny jak cytozyna, ale obecność grupy metylowej przy węglu 5. czyni ten związek wyjątkowym. Zakres i lokalizacja tej modyfikacji mają kluczowe znaczenie dla ekspresji genów.

m^5C podobnie jak inne składniki DNA oraz pozostałe elementy maszyny komórkowej są celem ataku endogennych i egzogennych czynników modyfikujących oraz stresu komórkowego. O ile produkty modyfikacji lub niszczenia czterech podstawowych zasad DNA oraz niektóre pochodne m^5C ulegają naprawie przy pomocy enzymów naprawczych, to cytozyna lub tymina powstające w wyniku deaminacji lub demetylacji m^5C , jako prawidłowe składniki DNA, nie są „widoczne” dla mechanizmów naprawy DNA. Taka sytuacja może być przyczyną występowania wielu mutacji, a także deregulacji ekspresji

polegającej na aktywacji transkrypcji wyciszonych genów. Widać zatem, że potencjał regulacyjny m⁵C jest nie tylko kluczowy dla funkcjonowania komórki, ale stanowi cel badawczy w biologii molekularnej i komórkowej oraz znacznik diagnostyczny w medycynie molekularnej i klinicznej. Nie jest zatem zadziwiające, że olbrzymie zainteresowanie badawcze skierowane jest na metody jakościowe i ilościowe określania zawartości m⁵C w DNA na poziomie całego genomu, jak i poszczególnych genów. Zadanie to jest nie tyle trudne, co niemożliwe na obecnym etapie rozwoju technik analitycznych, ale na pewno jest wyzwaniem.

Zawartość m⁵dC w DNA na poziomie genomu można analizować stosując techniki wysokosprawnej chromatografii kolumnowej (HPLC), elektroforezy kapilarnej i inne. Czynnikiem limitującym i decydującym o stosowaniu tych technologii jest dostępność materiału biologicznego, co w przypadku badań klinicznych jest czynnikiem decydującym o ich nieprzydatności. Metody te muszą charakteryzować się dużą czułością z uwagi na materiał z jakiego izolowany jest DNA, a także wysoką specyficznością, aby odróżnić metylację występującą w komórkach nowotworowych od metylacji w komórkach zdrowych. Żadna z metod nie jest uniwersalna, a przy wyborze należy zwrócić uwagę na typ, ilość i jakość materiału biologicznego. Prawidłowy wybór metody powinien minimalizować ryzyko skażenia próbki i zapewnić powtarzalność wyników. Oznaczenie występowania m⁵dC w poszczególnych genach jest możliwe tylko w sposób pośredni poprzez wykorzystanie jej oporności na deaminację przy pomocy tiosiarczynu sodowego w przeciwieństwie do cytozyny. Jest to metoda wysoce specyficzna, chociaż wydłużenie czasu reakcji prowadzi do deaminacji DNA, a z kolei zbyt krótki jej czas wpływa na zaniżenie wyniku względem stanu faktycznego. Obecnie znanych jest wiele modyfikacji tej podstawowej reakcji, które w połączeniu z łańcuchową reakcją polimerazy (PCR) dają nowe wyniki i ukazują nowe mechanizmy wpływu metylacji DNA na funkcjonowanie komórki.

Ostatnie osiągnięcia w szybkim sekwencjonowaniu genomów (ang. *the next generation sequencing*) w połączeniu z reakcją z tiosiarczynem oraz technologią mikromacierzy DNA wyraźnie powiększyły naszą wiedzę o metylacji DNA, ale wykorzystanie tej wiedzy i technik w diagnostyce klinicznej nie należy jeszcze do codziennej praktyki. Istnieje potrzeba rozwijania nowych lub adaptacja już istniejących metod i technik do uzyskania nowych informacji mających znaczenie diagnostyczne.

Celem moich badań było opracowanie metody analizy metylacji DNA do diagnozy molekularnej guzów mózgu. Taka metoda powinna mieć duży potencjał diagnostyczny. Obiektem moich badań były tkanki nowotworowe mózgu. Ta właśnie okoliczność, ograniczająca dostępność materiału badawczego, zdeterminowała moje myślenie, rozumowanie i praktyczne działanie. Problem sprowadzony został do określenia zawartości m^5dC w DNA w minimalnej ilości tkanki nowotworowej, niekiedy w ilościach śladowych.

Wykorzystując własne przygotowanie chemiczne zastosowałam metodę analizy składu nukleotydowego kwasów nukleinowych po uprzednim znakowaniu fosforem [^{32}P] z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej na celulozie. Mimo, że m^5dC w DNA człowieka stanowi tylko 1% wszystkich nukleotydów w DNA, radioaktywna plamka odpowiadająca m^5dC jest dobrze widoczna dla urządzenia odwzorowującego (Phosphoimager). Metoda ta nie daje możliwości względnego ilościowego określenia m^5dC w DNA. Nowość i istota mojego podejścia polega na następujących przesłankach:

1. Proces nowotworzenia jest skutkiem zachwiania równowagi redukcyjno-utleniającej komórki, co w rezultacie prowadzi do utlenienia (niszczenie) DNA.
2. m^5dC w DNA, jak inne jego składniki, jest celem działania reaktywnych czynników endo- i egzogennych (np. ROS).
3. Utlenienie rodnikowe prowadzi do modyfikacji zasad w DNA, a także do deaminacji i demetylacji m^5dC .
4. Znakowanie następcze [^{32}P] umożliwia analizę składu nukleotydowego DNA w nawet śladowych (minimalnych) ilościach materiału biologicznego (tkanki, krew etc.).

Uwzględniając te założenia zaproponowałam obliczanie zawartości m^5dC w DNA uwzględniające nie tylko m^5dC , ale również znane produkty rozpadu tego nukleotydu (dC i dT). Ta zależność dobrze opisuje zmiany ilościowe w całkowitej zawartości pirymidyn w DNA, zachodzące w komórkach nowotworowych.

Tak opracowaną metodę analizy m^5dC wykorzystałam do:

1. analizy jakości DNA badanego materiału,
2. analizy m^5dC w DNA z tkanek guzów mózgu,
3. analizy m^5dC w DNA z krwi obwodowej pacjentów z guzami mózgu,

Określenie poziomu m⁵dC w DNA może być również dobrym sposobem oceny jakości (ang. *quality control*) preparatu. Jest to problem pomijany i niezauważany w praktyce laboratoryjnej, gdyż DNA uznawany jest za stabilny kwas nukleinowy.

Wpływ przechowywania preparatów biologicznych ma kluczowe znaczenie dla integralności materiału. Od ponad 30 lat wiadomo, że 8-oxo-deoxyG powstaje w DNA w wyniku rodnikowego ([•]OH) utleniania guanozyny [Oliński i in. 2007]. Znany jest również enzym naprawiający to uszkodzenie. Proces utlenienia (niszczenia) DNA jest zauważalny również podczas przechowywania materiału (Ryc. 33). Pokazałam, że zachodzi on w czasie zatapiania tkanek w parafinie [Barciszewska i in. 2006]. Ta obserwacja została potwierdzona później przez innych badaczy [Nathan 2007].

Analizowałam m⁵dC w DNA z tkanki nowotworowej 578 pacjentów operowanych w Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii UM w Poznaniu (Tab. I). Zawartość tego nukleotydu jest wyraźnie zróżnicowana (Ryc. 40). Zaobserwowałam liniową zależność między złośliwością guzów (WHO I – IV) a zawartością m⁵dC w szeregu astrocytarnym (Ryc. 42). Współczynnik R dla guzów mózgu o złośliwości I wynosi 1.62±0.13, dla stopnia II wynosi 1.49±0.06, dla III – 1.02±0.03, a dla glejaka wielopostaciowego IV – 0.44±0.02. W przypadku oponiaków również widoczna jest zależność od stopnia złośliwości, lecz nie tak drastyczna jak dla szeregu astrocytarnego (Ryc. 47 i 50). Guzy przerzutowe mają wartość R w granicach od 0.10 do 1.00. Zależy to prawdopodobnie od lokalizacji guza pierwotnego. Analiza wszystkich badanych przypadków (zarówno tych, dla których było wiele danych, jak i tych pojedynczych) pozwala stwierdzić, że im guz posiada wyższy stopień złośliwości, tym zawartość m⁵dC jest mniejsza.

Analizie poddano zawartość m⁵dC w DNA z komórek nowotworowych mózgu oraz krwi obwodowej u 186 pacjentów operowanych z powodu guzów mózgu. W tej grupie rozpoznano głównie 4 rodzaje guzów mózgu: oponiaki, guzy szeregu astrocytarnego, glejaki wielopostaciowe, guzy przerzutowe oraz pojedyncze przypadki innych guzów (Tab. II). W DNA tkanek nowotworowych mózgu oraz krwi stwierdzono zróżnicowaną ilość m⁵dC. Znalezione zależności między ilością tego nukleotydu a rodzajem nowotworu w DNA. Okazało się, że poziom tego chemicznego (epigenetycznego) znacznika dla DNA z krwi i tkanki nowotworowej jest silnie skorelowany (Ryc. 53). Porównanie poziomu m⁵dC w DNA komórek guza oraz krwi dla tego samego pacjenta wskazuje, że monitorowanie zmian epigenetycznych w DNA krwi byłoby znacznie szybsze i łatwiejsze w diagnozowaniu guzów mózgu.

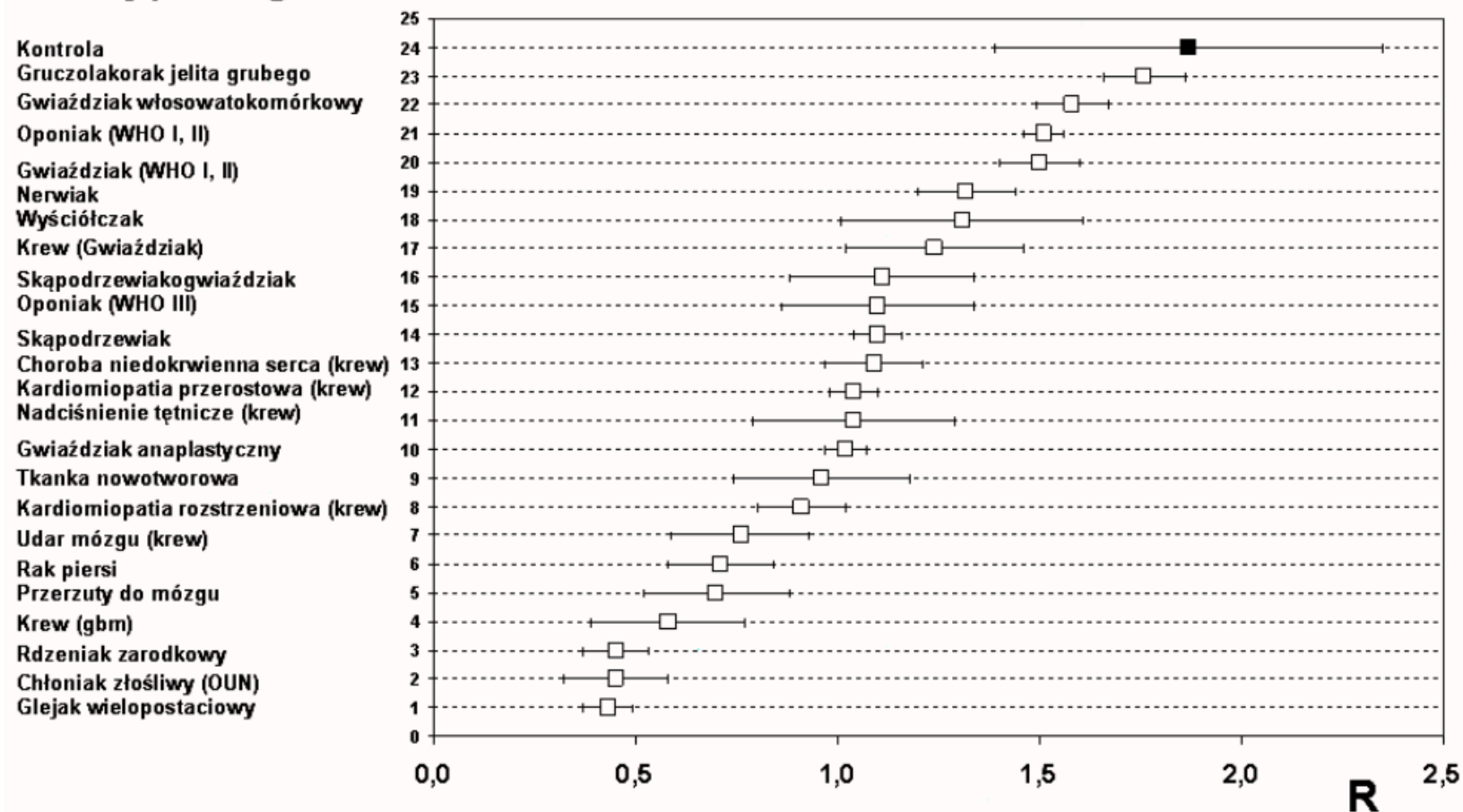
Mając dostęp do innych tkanek nowotworowych oraz krwi postanowiłam zbadać czy powyższe zależności są domeną tylko guzów mózgu [Barciszewska i in. 2007b]. Badałam także zawartość m^5dC w starzejących się komórkach fibroblastów i stwierdziłam, że zawartość m^5dC maleje z wiekiem komórek [Barciszewska i in. 2007a]. Podobną zależność obserwowałam przy analizie m^5dC w DNA z krwi seniorów. Interesującym i nieoczekiwanym rezultatem były różnice w poziomie m^5dC w DNA u chorych z nadciśnieniem tętniczym, gdzie zawartość m^5dC u ludzi z nadciśnieniem jest mniejsza niż w grupie kontrolnej [Smolarek i in. 2010]. Zestawienie wartości R dla różnych chorób wyraźnie wskazuje na możliwość konstrukcji diagramu, który może być wykorzystany w diagnostyce klinicznej (Ryc. 54).

Podsumowując można stwierdzić, że opracowana metoda dostarcza informacji odnośnie zawartości względnej m^5dC w DNA w stosunku do pozostałych nukleozydów pirymidynowych. Ilość m^5dC w DNA wyrażana jest współczynnikiem R. Z dotychczasowych analiz różnych tkanek i krwi wynika, że jego wartość wynosi od 0.1 do 2.0, a w niektórych przypadkach nawet więcej.

Daje to możliwość wyprowadzenia następujących wniosków ogólnych:

1. Wszystkie dotychczas analizowane choroby, a w szczególności guzy mózgu, charakteryzują się obniżeniem m^5dC w DNA.
2. Obniżenie poziomu m^5dC jest proporcjonalne do stopnia złośliwości czy stopnia zaawansowania choroby i wyraźnie zróżnicowane.
3. Złośliwe guzy mózgu (WHO IV, głównie GBM) charakteryzują się najmniejszym poziomem metylacji (największa hipometylacja).
4. Spadek poziomu m^5dC dotyczy również krwi obwodowej chorych i jest silnie skorelowany z tkanką nowotworową.
5. Diagram przedstawiający R w poszczególnych jednostkach chorobowych pozwala wstępnie zdiagnozować potencjalną chorobę (Ryc. 54).
6. Pacjenci, u których poziom m^5dC (R) jest wyraźnie niższy niż 1.5, powinni zostać pilnie diagnozowani w celu wykluczenia chorób nowotworowych lub innych zmian patologicznych w organizmie.

Rodzaj patologii



Rycina 54. Poziom m^5dC (R) w krwi obwodowej (przerzuty do mózgu, choroba niedokrwienna serca, kardiomiopatia przerostowa, nadciśnienie tętnicze, kardiomiopatia rozstrzeniowa, udar mózgu) i tkankach (gruczołak jelita grubego, gwiaździatek włosowatokomórkowy, oponiaki, gwiaździateki, skąpodrzewiak, skąpodrzewiakogwiaździatek, AA, GBM, guzy piersi, przerzuty do mózgu, chłoniak złośliwy, wyściółczak, nerwiak) pacjentów z różnymi jednostkami chorobowymi w porównaniu grupą kontrolną (krew pacjentów zdrowych).

9. Wnioski

Opracowałam metodę oceny poziomu m⁵dC i wykazałam jej przydatność w diagnostyce klinicznej analizując zróżnicowaną metylację DNA u osób z nowotworami mózgu. Analiza m⁵dC (jednego z markerów epigenetycznych) wydaje się być dobrą metodą oceny i przewidywania rozwoju nowotworu mózgu, stąd powinna stać się dobrym narzędziem w diagnostyce klinicznej. Metoda ta została przetestowana na przykładzie kilkuset tkanek nowotworowych.

1. Wykazałam zależność zawartości m⁵dC (R) od stopnia złośliwości w guzach mózgu zarówno w tkance nowotworowej, jak i we krwi pacjentów.
2. Zauważyłam demetylację (hypometylację) m⁵dC w DNA z tkanek zatapianych w parafinie oraz przechowywanych w temperaturze pokojowej. Oznacza to utlenienie składników komórkowych i w konsekwencji ograniczoną wartość takich tkanek do badań molekularnych.

Na podstawie otrzymanych wyników wykazałam, że nieprawidłowa metylacja w DNA może być sygnałem agresywności nowotworu. Jest więc szansa, że procesy epigenetyczne można wykorzystać jako markery biologiczne do wykrywania i rozpoznawania nowotworów w najwcześniejszym stadium oraz innych chorób, w tym układu sercowo-naczyniowego.

Uzyskane wyniki zostały częściowo zawarte w publikacjach:

1. **Barciszewska A-M**, Gawrońska I, Żukiel R, Nowak S, Barciszewska MZ.
The application of qualitative analysis of DNA bulky adducts in the diagnosis of brain tumours.
Polish J Chem 77, 1607-1614, 2003.
2. Żukiel R, Nowak S, **Barciszewska A-M**, Gawronska I, Keith G, Barciszewska MZ.
A simple epigenetic method for the diagnosis and classification of brain tumors.
Mol Cancer Res 2, 196-202, 2004.
3. Żukiel R, Nowak S, **Barciszewska A-M**, Gawrońska I, Barciszewska M.
Nowa metoda klasyfikacji nowotworów mózgu.
Współ Onkol 8 (3) (Suppl. 1), 2004.

4. **Barciszewska A-M**, Żukiel R, Nowak S, Gawronska I, Keith G, Barciszewska MZ.
A simple epigenetic method for the diagnosis of brain tumors.
Eur J Biochem 271 (Suppl 1), 13-14, 2004.
5. Nowak S, Żukiel R, **Barciszewska A-M**, Barciszewski J.
The diagnosis and therapy of brain tumors.
Folia Neuropathol 43, 193-196, 2005.
6. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R, Gawrońska I, Barciszewska MZ.
Analiza całkowitej zawartości 5-metylocytozyny w DNA z tkanek i krwi pacjentów z guzami mózgu.
Neuroskop 7, 39-43, 2005.
7. **Barciszewska A-M**, Murawa D, Gawrońska I, Murawa P, Nowak S, Barciszewska M.
Analiza metylacji DNA w guzach piersi i jelita grubego.
Nowotwory. J Oncol 56 (Suppl. 4), 174, 2006.
8. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R.
Zastosowanie 5-metylocytozyny w diagnostyce guzów mózgu.
Nowotwory. J Oncol 56 (Suppl. 4), 176, 2006.
9. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R, Gawrońska I, Barciszewska MZ.
Wpływ przechowywania tkanki nowotworowej na zawartość 5-metylocytozyny w DNA guzów mózgu.
Neuroskop 8, 160-162, 2006.
10. Barciszewska MZ, **Barciszewska A-M**, Rattan SIS.
TLC-based detection of methylated cytosine: application to aging epigenetics.
Biogerontology 8, 673-678, 2007.
11. **Barciszewska A-M**, Murawa D, Gawronska I, Murawa P, Nowak S, Barciszewska MZ.
Analysis of 5-methylcytosine in DNA of breast and colon cancer tissues.
IUBMB Life 59, 1-6, 2007.
12. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R, Gawrońska I, Barciszewska MZ.
Swoista metylacja cytozyny w DNA jako znacznik złośliwości guzów mózgu u człowieka.
Neurol Neurochir Pol 42 (2) (Suppl. 2), 118-122, 2008.
13. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Gawronska I, Barciszewska MZ.
Diagnosis of brain tumors through global specific DNA methylation analysis.
W: Erdmann VA, Reifenberger G, Barciszewski J (Eds.)
„Therapeutic Ribonucleic Acids in Brain Tumors”, Springer, 141-156, 2009.
14. Smolarek I, Wyszko E, **Barciszewska A-M**, Nowak S, Jabłeczka A, Gawrońska I, Barciszewska MZ.
Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension.
Med Sci Monit 16(3), CR149-155, 2010.

Wyniki badań zostały przedstawione w formie ustnych komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych, w tym na *XIII European Congress of Neurosurgery EANS* i *XIV World Congress of Neurological Surgery of the WFNS* (pozycja 5 i 10):

1. **Barciszewska A-M**, Żukiel R, Nowak S.
A New Method for the Diagnosis and Classification of Brain Tumours.
The 4th International Congress of Medical Students and Young Doctors
Poznań, 18-20 Maja 2004
2. **Barciszewska A-M**, Żukiel R, Nowak S.
A Simple Epigenetic Method for the Diagnosis and Classification of Brain Tumours.
The 11th International Student Congress of Medical Sciences
Groningen, Holandia, 9-12 Czerwca 2004
3. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R.
Chemical markers of the neoplastic process.
16th European Students' Conference
Berlin, Niemcy, 19-23 Października 2005
4. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R.
Wykorzystanie analizy zawartości 5-metylocytozyny w diagnostyce guzów mózgu.
VIII Wielkopolskie Dni Neurochirurgii
Poznań, 21-22 Kwietnia 2006
5. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R, Gawrońska I, Barciszewska M.
Global cytosine methylation level in the diagnosis and treatment of brain tumors.
XIII European Congress of Neurosurgery EANS
Glasgow, Wielka Brytania, 2-7 Września 2007
6. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R, Gawrońska I, Barciszewska M.
Swoista metylacja cytozyny w DNA jako znacznik złośliwości guzów mózgu u człowieka.
XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurochirurgów
Szczyrk, 20-23 Września 2007
7. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Gawrońska I, Barciszewska M.
Genomic DNA methylation analysis in human brain gliomas.
Brain Tumor 2008
Berlin, Niemcy, 4-5 Grudnia 2008
8. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Gawrońska I, Barciszewska M.
Analiza całkowitej metylacji DNA w guzach glejowych u człowieka.
I Sympozjum Sekcji Neuroonkologii Polskiego Towarzystwa Neurochirurgów
Kazimierz Dolny, 11-12 Grudnia 2008
9. **Barciszewska A-M**, Nowak S.
Epigenetic analysis of aged cells.
XXIII Sympozjum Poznań-Halle "Aging and Regeneration"
Poznań, 15-17 Maja 2009

10. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Wyszko E, Barciszewska M.
New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells.
XIV World Congress of Neurological Surgery of the WFNS
Boston, MA, USA, 30 Sierpnia – 4 Września 2009
11. **Barciszewska A-M**, Nowak S, Wyszko E, Barciszewska M.
Wpływ temozolomidu na epigenetyczną kontrolę ekspresji genów w komórkach
glejaków.
XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurochirurgów
Mikołajki, 17-20 Września 2009
12. **Barciszewska A-M**, Nowak S.
Zmiany epigenetyczne w guzach mózgu.
Poznańskie Dni Neurochirurgii i Neuroradiologii
Poznań, 23-24 Października 2009

10. Załączniki

Tabela I. Zestawienie wyników analizy m⁵C u 578 pacjentów z guzem mózgu.

L.p	Rozpoznanie histopatologiczne	Stopień WHO	Płeć	Wiek pacjenta	Inicjały pacjenta	R (tkanka)	SD
1	<i>astrocytoma pilocyticum</i>	I	K	21	RL	1.66	0.20
2	<i>astrocytoma pilocyticum</i>	I	M	22	TP	1.74	0.09
3	<i>astrocytoma pilocyticum</i>	I	M	66	MJ	1.55	0.02
4	<i>astrocytoma pilocyticum</i>	I	M	53	MJ	1.51	0.11
5	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	M	25	OK	1.56	0.08
6	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	M	25	OK	1.57	0.16
7	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	M	26	JR	1.54	0.11
8	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	M	30	KR	1.47	0.13
9	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	M	32	SzT	1.61	0.02
10	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	M	32	KM	1.53	0.09
11	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	K	35	SL	1.57	0.04
12	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	K	35	SB	1.54	0.06
13	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	K	40	PS	1.59	0.10
14	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	K	42	PH	1.63	0.09
15	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	M	50	SM	1.55	0.10
16	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	K	53	KA	1.59	0.07
17	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	K	54	DJ	1.55	0.06
18	<i>astrocytoma fibrillare partim gemistocyticum</i>	II	K	29	ZS	1.35	0.16
19	<i>astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum et gemistocyticum</i>	II	K	29	BK	1.33	0.01
20	<i>astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum et gemistocyticum</i>	II	K	34	ŁA	1.47	0.08
21	<i>astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum et gemistocyticum</i>	II	K	41	SM	1.47	0.06
22	<i>astrocytoma fibrillare partim gemistocyticum</i>	II	K	42	WJ	1.31	0.07
23	<i>astrocytoma fibrillare recidivans partim gemistocyticum in AA vertens</i>	II/III	K	48	BD	1.43	0.11
24	<i>astrocyticum fibrillare partim protoplasmaticum</i>	II	M	51	NL	1.31	0.15
25	<i>astrocytoma gemistocyticum</i>	II	K	46	GE	1.52	0.05
26	<i>astrocytoma gemistocyticum</i>	II	K	49	KE	1.39	0.04
27	<i>astrocytoma gemistocyticum</i>	II	K	51	SD	1.48	0.10
28	<i>astrocytoma protoplasmaticum</i>	II	K	37	KA	1.59	0.12
29	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	19	IM	1.01	0.05
30	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	24	SzS	1.05	0.04
31	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	30	PM	0.99	0.09
32	<i>astrocytoma anaplasticum partim granulocellulare</i>	III	M	30	NG	1.05	0.04
33	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	32	SA	1.03	0.07
34	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	34	DE	1.04	0.10
35	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	35	PH	1.05	0.03
36	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	36	WD	1.01	0.09
37	<i>astrocytoma anaplasticum recidivans</i>	III	M	37	JSt	1.00	0.08
38	<i>astrocytoma anaplasticum recidivans</i>	III	M	39	NP	1.00	0.04

39	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	40	LD	0.99	0.05
40	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	41	SzA	1.02	0.06
41	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	43	PJ	1.07	0.08
42	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	44	PS	1.03	0.09
43	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	44	MW	1.04	0.03
44	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	45	TE	1.02	0.10
45	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	46	KB	1.03	0.13
46	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	48	GE	1.04	0.06
47	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	48	TP	1.02	0.08
48	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	49	WF	1.01	0.07
49	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	49	ŚM	1.05	0.07
50	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	49	KM	1.01	0.07
51	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	49	CW	1.06	0.13
52	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	49	PH	1.01	0.15
53	<i>astrocytoma anaplasticum in GBM vertens</i>	III	M	50	JA	0.92	0.14
54	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	51	KW	0.99	0.07
55	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	51	JJ	1.07	0.15
56	<i>astrocytoma anaplasticum recidivans</i>	III	K	52	WA	0.99	0.07
57	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	53	BZ	1.01	0.09
58	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	54	NL	1.01	0.03
59	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	54	BK	1.06	0.16
60	<i>astrocytoma anaplasticum, radionecrosis</i>	III	K	55	SD	1.01	0.05
61	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	56	CJ	1.02	0.06
62	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	56	BC	1.04	0.01
63	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	56	KM	1.07	0.15
64	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	57	CzJ	1.03	0.03
65	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	59	WK	1.05	0.09
66	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	59	KZ	1.04	0.04
67	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	59	ŚSt	1.01	0.02
68	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	60	NJ	1.06	0.05
69	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	64	SI	1.12	0.05
70	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	67	MZ	1.04	0.00
71	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	67	RH	1.03	0.05
72	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	67	MB	1.06	0.14
73	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	68	PE	0.99	0.05
74	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	70	KW	1.02	0.05
75	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	73	GA	1.05	0.06
76	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	74	BE	1.00	0.04
77	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	75	KW	0.97	0.10
78	<i>astrocytoma anaplasticum/gbm</i>	III/IV	K	76	DJ	0.82	0.11
79	<i>astrocytoma anaplasticum recidivans in GBM tendens</i>	III/IV	K	56	WD	0.81	0.08
80	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	48	KJ	1.02	0.06
81	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	21	DR	0.35	0.06
82	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	22	WP	0.58	0.04
83	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	24	Mł	0.37	0.08
84	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	26	KA	0.37	0.08
85	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	28	DM	0.38	0.05
86	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	28	DM	0.29	0.03
87	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	29	KA	0.22	0.07

88	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	30	AŁ	0.49	0.06
89	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	34	ZE	0.38	0.08
90	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	35	NI	0.53	0.02
91	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	37	PM	0.20	0.08
92	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	39	KK	0.48	0.09
93	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	41	SzA	0.58	0.03
94	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	42	KD	0.41	0.06
95	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	42	AE	0.15	0.01
96	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	42	PE	0.34	0.07
97	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	43	BSt	0.54	0.08
98	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	K	45	AB	0.33	0.07
99	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	45	RK	0.41	0.04
100	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	46	PSt	0.55	0.05
101	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	46	DB	0.49	0.04
102	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	46	MA	0.58	0.10
103	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	46	MW	0.38	0.05
104	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	46	WG	0.43	0.05
105	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	46	BB	0.31	0.17
106	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	47	MJ	0.55	0.08
107	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	47	GA	0.38	0.05
108	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	47	KSt	0.49	0.12
109	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	48	WD	0.54	0.07
110	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	48	JB	0.57	0.01
111	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	48	DL	0.33	0.18
112	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	48	RW	0.53	0.15
113	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	48	PP	0.52	0.05
114	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	49	SM	0.43	0.03
115	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	49	ND	0.50	0.04
116	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	49	CW	0.34	0.08
117	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	49	OA	0.64	0.07
118	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	50	KZ	0.48	0.09
119	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	51	BJ	0.43	0.04
120	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	51	PE	0.52	0.08
121	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	51	ND	0.37	0.07
122	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	51	ND	0.35	0.03
123	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	52	OE	0.51	0.09
124	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	K	52	GG	0.52	0.05
125	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	52	PM	0.28	0.09
126	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	52	ZU	0.56	0.03
127	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	53	KA	0.62	0.02
128	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	53	BK	0.43	0.05
129	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	53	ML	0.34	0.02
130	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	53	KM	0.56	0.06
131	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	54	ŚM	0.46	0.07
132	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	K	54	PB	0.32	0.06
133	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	54	SM	0.46	0.06
134	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	54	SM	0.53	0.09
135	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	54	SM	0.49	0.05
136	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	54	KL	0.21	0.06
137	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	54	WJ	0.42	0.07

138	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	54	PT	0.47	0.08
139	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	54	ŚM	0.52	0.07
140	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	54	KE	0.45	0.07
141	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	54	LZ	0.43	0.07
142	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	55	GH	0.09	0.03
143	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	55	KJ	0.18	0.03
144	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	55	FA	0.49	0.05
145	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	55	DM	0.34	0.07
146	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	56	JM	0.49	0.06
147	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	56	PA	0.46	0.07
148	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	56	KW	0.49	0.02
149	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	K	56	GJ	0.35	0.09
150	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	57	MJ	0.49	0.03
151	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	57	SzT	0.37	0.19
152	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	57	MR	0.55	0.05
153	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	57	FH	0.22	0.06
154	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	57	RD	0.47	0.12
155	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	57	KA	0.60	0.08
156	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	57	KA	0.50	0.15
157	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	58	GB	0.34	0.07
158	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	58	LP	0.50	0.09
159	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	58	FK	0.28	0.01
160	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	59	WB	0.51	0.03
161	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	59	BL	0.43	0.07
162	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	59	JT	0.30	0.16
163	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	60	GZ	0.34	0.08
164	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	60	RJ	0.49	0.09
165	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	60	JM	0.43	0.19
166	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	60	BW	0.46	0.09
167	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	60	RJ	0.57	0.09
168	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	60	WJ	0.53	0.02
169	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	60	GSt	0.58	0.16
170	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	61	CW	0.45	0.08
171	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	61	JJ	0.54	0.10
172	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	62	BJ	0.32	0.08
173	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	62	WJ	0.53	0.06
174	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	62	SH	0.51	0.13
175	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	63	KSt	0.52	0.01
176	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	63	KA	0.51	0.06
177	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	63	WK	0.60	0.11
178	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	64	DSt	0.53	0.05
179	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	64	TCz	0.47	0.05
180	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	65	OB	0.51	0.06
181	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	65	AM	0.38	0.02
182	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	K	65	TCz	0.42	0.07
183	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	66	GJ	0.56	0.08
184	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	66	ŚOD	0.56	0.03
185	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	66	PJ	0.25	0.02
186	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	66	WM	0.26	0.08
187	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	66	HJ	0.55	0.05

188	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	66	KJ	0.38	0.06
189	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	67	KJ	0.44	0.12
190	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	67	FB	0.57	0.05
191	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	67	MJ	0.53	0.06
192	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	67	KK	0.57	0.07
193	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	67	ZW	0.59	0.01
194	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	67	MZ	0.29	0.07
195	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	68	DZ	0.53	0.02
196	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	68	BZ	0.45	0.07
197	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	69	LD	0.54	0.07
198	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	69	CE	0.53	0.08
199	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	69	WA	0.46	0.13
200	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	69	RW	0.56	0.02
201	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	70	SZ	0.16	0.02
202	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	71	KJ	0.39	0.09
203	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	71	ChE	0.55	0.09
204	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	71	TZ	0.24	0.05
205	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	71	KJ	0.13	0.05
206	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	71	BSt	0.35	0.07
207	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	71	SJ	0.50	0.02
208	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	71	LŁ	0.46	0.02
209	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	72	BL	0.50	0.08
210	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	72	KJ	0.18	0.06
211	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	K	74	NH	0.48	0.05
212	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	75	BW	0.61	0.16
213	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	75	BM	0.56	0.05
214	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	75	AH	0.31	0.13
215	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	75	SzM	0.23	0.09
216	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	76	ChW	0.39	0.06
217	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	76	PL	0.55	0.02
218	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	77	WF	0.45	0.05
219	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	81	WSK	0.50	0.08
220	<i>glioma anaplasticum recidivans partim granulocellulare</i>	III	M	45	MJ	0.49	0.10
221	<i>glioma anaplasticum</i>	III	K	66	BT	0.77	0.02
222	<i>glioma anaplasticum</i>	III	M	60	LL	0.70	0.02
223	<i>glioblastoma multiforme recidivans, giant cell gbm</i>	IV	K	45	HI	0.44	0.09
224	<i>giant cell glioblastoma</i>	IV	M	46	GL	0.41	0.08
225	<i>giant cell glioblastoma</i>	IV	K	58	ŁB	0.54	0.08
226	<i>giant cell glioblastoma</i>	IV	K	61	KH	0.37	0.07
227	<i>giant cell glioblastoma</i>	IV	K	67	ŻL	0.53	0.06
228	<i>gliosarcoma</i>	IV	M	75	KZ	0.46	0.08
229	<i>gliomatosis cerebri</i>	IV	M	56	WE	0.33	0.01
230	<i>oligodendroglioma</i>	II	K	34	JG	1.23	0.08
231	<i>oligodendroglioma</i>	II	K	52	TK	1.11	0.07
232	<i>oligodendroglioma recidivans</i>	II	K	52	TK	1.09	0.07
233	<i>oligodendroglioma</i>	II	K	71	JH	1.12	0.07
234	<i>oligodendroglioma</i>	II/III	K	46	FJ	1.06	0.06
235	<i>oligodendroglioma</i>	III	K	53	CZ	1.18	0.05

236	<i>oligodendroglioma isomorphum recidivans</i>	II	M	44	ChP	1.04	0.03
237	<i>oligodendroglioma isomorphum</i>	II	K	58	ST	1.18	0.10
238	<i>oligodendroglioma isomorphum</i>	II	M	59	BZ	0.94	0.15
239	<i>oligodendroglioma isomorphum</i>	II	K	67	MB	0.96	0.13
240	<i>oligodendroglioma isomorphum</i>	II	M	67	WK	1.22	0.16
241	<i>oligodendroglioma anaplasticum recidivans</i>	III	M	31	CzP	0.98	0.08
242	<i>oligodendroglioma anaplasticum</i>	III	K	47	KU	1.00	0.05
243	<i>oligodendroglioma anaplasticum</i>	III	M	48	PR	1.02	0.01
244	<i>oligodendroglioma anaplasticum recidivans</i>	III	M	57	EB	1.08	0.01
245	<i>oligodendroglioma anaplasticum</i>	III	K	64	ST	0.98	0.09
246	<i>oligodendroglioma anaplasticum</i>	III	K	64	ST	1.07	0.04
247	<i>oligoastrocytoma isomorphum</i>	II	K	49	LG	1.17	0.08
248	<i>oligoastrocytoma</i>	I	M	52	ŚK	1.42	0.09
249	<i>oligoastrocytoma</i>	II	K	24	DM	1.30	0.09
250	<i>oligoastrocytoma</i>	II	M	28	RK	1.13	0.12
251	<i>oligoastrocytoma</i>	II	M	29	ŁL	1.28	0.07
252	<i>oligoastrocytoma</i>	II	K	35	KR	1.30	0.06
253	<i>oligoastrocytoma</i>	II	K	36	ŻB	1.35	0.06
254	<i>oligoastrocytoma</i>	II	M	37	RD	1.37	0.05
255	<i>oligoastrocytoma</i>	II	M	38	PK	1.43	0.09
256	<i>oligoastrocytoma</i>	II	K	44	AJ	1.34	0.04
257	<i>oligoastrocytoma</i>	II	M	48	CR	1.31	0.04
258	<i>oligoastrocytoma</i>	II	M	50	SA	1.43	0.14
259	<i>oligoastrocytoma</i>	II/III	M	23	MSz	1.26	0.06
260	<i>oligoastrocytoma</i>	II/III	M	38	BT	1.01	0.06
261	<i>glioma mixtum</i>	II/III	M	64	WE	1.09	0.06
262	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	K	27	BI	0.99	0.07
263	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	M	28	RF	0.97	0.07
264	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	M	31	DR	1.02	0.06
265	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	K	55	AD	1.13	0.17
266	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	K	58	RL	0.96	0.09
267	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III/IV	M	55	CzT	0.69	0.09
268	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	K	22	KN	1.24	0.04
269	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	M	28	ŁL	0.96	0.09
270	<i>oligoastrocytoma anaplasticum recidivans</i>	III	M	43	RK	1.03	0.08
271	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	K	45	WM	1.05	0.03
272	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	M	47	ZM	0.97	0.08
273	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	M	48	ZP	1.13	0.06
274	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	M	50	PR	1.00	0.08
275	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	K	52	CH	0.99	0.06
276	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	K	66	BT	1.02	0.03
277	<i>oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	K	71	FJ	1.00	0.07
278	<i>subependymoma</i>	I	M	49	RSt	0.78	0.11
279	<i>subependymoma</i>	I	M	56	BW	0.91	0.01
280	<i>subependymoma</i>	I	K	66	GCz	1.10	0.08
281	<i>ependymoma</i>	I	M	43	WJ	1.65	0.06
282	<i>ependymoma</i>	II	M	11	CM	1.46	0.07
283	<i>ependymoma</i>	II	M	31	SM	1.17	0.01
284	<i>ependymoma</i>	II	K	36	RE	1.43	0.06
285	<i>ependymoma anaplasticum</i>	III	M	40	CT	1.20	0.03

286	<i>dysembryoplastyczny nowotwór neuroepithelial</i>	I	M	19	JW	1.42	0.11
287	<i>dysembryoplastyczny nowotwór neuroepithelial</i>	I	K	29	WJ	1.49	0.12
288	<i>ganglioglioma</i>	II	K	21	SzS	1.44	0.06
289	<i>ganglioglioma</i>	II	M	33	SzM	1.39	0.07
290	<i>ganglioglioma anaplasticum</i>	III	K	32	GA	1.19	0.03
291	<i>neurocytoma</i>	I	M	45	TH	1.36	0.05
292	<i>neurocytoma</i>	II	K	22	ŚM	1.12	0.05
293	<i>neurocytoma centrale</i>	II	M	25	KŁ	1.17	0.04
294	<i>pineoblastoma</i>	IV	M	28	JA	0.38	0.04
295	<i>meduloblastoma</i>	IV	K	18	SI	0.49	0.15
296	<i>meduloblastoma</i>	IV	M	28	CD	0.37	0.04
297	<i>meduloblastoma</i>	IV	M	30	SSt	0.52	0.08
298	<i>meduloblastoma</i>	IV	M	39	RJ	0.34	0.09
299	<i>meduloblastoma</i>	IV	M	40	RJ	0.50	0.04
300	<i>meduloblastoma</i>	IV	M	42	RJ	0.50	0.16
301	<i>neurinoma Antoni A</i>	I	M	16	KJ	1.26	0.07
302	<i>neurinoma Antoni A</i>	I	M	19	GW	1.20	0.08
303	<i>neurinoma</i>	I	K	29	KM	1.26	0.06
304	<i>neurinoma</i>	I	K	31	TM	1.31	0.14
305	<i>neurinoma</i>	I	K	37	KH	1.36	0.07
306	<i>neurinoma</i>	I	M	41	KJ	1.40	0.06
307	<i>neurinoma</i>	I	K	48	KE	1.38	0.10
308	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	M	27	BS	1.63	0.02
309	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	28	KA	1.56	0.13
310	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	M	38	SP	1.62	0.07
311	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	44	GK	1.63	0.09
312	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	45	JM	1.51	0.05
313	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	47	SzI	1.65	0.03
314	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	47	BA	1.62	0.07
315	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	48	ND	1.57	0.09
316	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	M	48	BW	1.59	0.16
317	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	48	MH	1.64	0.04
318	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	49	SJ	1.63	0.09
319	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	M	49	FL	1.59	0.08
320	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	M	49	ChZ	1.61	0.09
321	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	51	EK	1.61	0.01
322	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	51	PG	1.59	0.18
323	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	M	52	MW	1.55	0.04
324	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	52	LT	1.55	0.09
325	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	52	KM	1.57	0.07
326	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	M	54	AJ	1.51	0.10
327	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	55	KJ	1.71	0.01
328	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	M	56	WH	1.59	0.11
329	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	M	56	SCz	1.56	0.01
330	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	57	DH	1.48	0.07
331	<i>meningeoma meningoeliale (granica z mózgiem nacieczona)</i>	I	K	57	FA	1.13	0.04
332	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	58	SA	1.61	0.04
333	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	M	59	KW	1.56	0.03
334	<i>meningeoma meningoeliale</i>	I	K	60	SzM	1.60	0.04

335	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	K	60	GH	1.58	0.04
336	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	M	63	GE	1.53	0.07
337	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	K	63	CM	1.58	0.04
338	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	M	63	MB	1.55	0.05
339	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	K	65	ZK	1.53	0.06
340	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	K	66	RT	1.71	0.06
341	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	K	66	CzH	1.73	0.03
342	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	K	66	MW	1.54	0.10
343	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	M	67	GW	1.56	0.05
344	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	K	73	KR	1.53	0.09
345	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	K	73	SDJA	1.57	0.07
346	<i>meningeoma meningotheliale</i>	I	K	75	MSt	1.52	0.10
347	<i>meningeoma meningotheliale partim cellulare</i>	I	M	34	AJ	1.54	0.03
348	<i>meningeoma meningotheliale partim cellulare</i>	I	M	56	MR	1.61	0.04
349	<i>meningeoma meningotheliomatosum</i>	I	K	52	MM	1.72	0.07
350	<i>meningioma meningotheliomatosum</i>	I	M	60	RP	1.63	0.03
351	<i>meningeoma angiomasum et microcysticum</i>	I	M	49	ŻA	1.54	0.11
352	<i>meningeoma angiomasum</i>	I	K	49	GG	1.52	0.03
353	<i>meningeoma angiomasum</i>	I	M	51	KSt	1.50	0.05
354	<i>meningeoma angiomasum</i>	I	K	57	HSt	1.46	0.09
355	<i>meningeoma angiomasum</i>	I	K	60	SzI	1.48	0.06
356	<i>meningeoma angiomasum</i>	I	M	61	CzJ	1.49	0.06
357	<i>meningeoma angiomasum</i>	I	K	63	MA	1.51	0.06
358	<i>meningeoma angiomasum</i>	I	K	66	BH	1.46	0.09
359	<i>meningeoma angiomasum</i>	I	K	66	MB	1.51	0.09
360	<i>meningeoma angiomasum</i>	I	K	67	SzR	1.54	0.09
361	<i>meningeoma angiomasum</i>	I	M	69	ME	1.48	0.08
362	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	41	DA	1.54	0.03
363	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	M	46	BW	1.57	0.12
364	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	M	47	WSt	1.58	0.11
365	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	51	AJ	1.58	0.05
366	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	55	KT	1.56	0.06
367	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	55	FB	1.59	0.06
368	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	55	DA	1.54	0.12
369	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	58	UE	1.61	0.07
370	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	59	BK	1.53	0.07
371	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	59	DB	1.49	0.02
372	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	59	NH	1.49	0.08
373	<i>meningeoma fibrosum partim psammomatosum (naciek opony)</i>	I	K	61	GI	1.41	0.02
374	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	M	63	KT	1.71	0.05
375	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	64	KE	1.52	0.11
376	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	66	BM	1.53	0.12
377	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	66	CE	1.57	0.07
378	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	67	NM	1.56	0.07
379	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	69	KK	1.45	0.09
380	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	70	DH	1.52	0.06
381	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	M	71	GW	1.62	0.07
382	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	M	72	KJ	1.55	0.00

383	<i>meningeoma fibrosum</i>	I	K	77	BF	1.54	0.11
384	<i>meningeoma psammomatosum</i>	I	K	51	WM	1.58	0.04
385	<i>meningeoma psammomatosum</i>	I	K	55	PH	1.52	0.09
386	<i>meningeoma psammomatosum</i>	I	K	55	BMH	1.46	0.07
387	<i>meningeoma psammomatosum</i>	I	K	80	MB	1.59	0.05
388	<i>meningeoma atypicum</i>	II	K	29	KM	1.57	0.06
389	<i>meningeoma atypicum</i>	II	K	54	GD	1.46	0.04
390	<i>meningeoma atypicum</i>	II	M	65	GCz	1.53	0.01
391	<i>meningeoma atypicum</i>	II	K	66	MD	1.25	0.07
392	<i>meningeoma atypicum</i>	II	M	77	SM	1.43	0.09
393	<i>meningeoma malignum</i>	III	K	43	AB	1.42	0.05
394	<i>meningeoma malignum</i>	III	M	50	BW	0.86	0.08
395	<i>meningeoma malignum</i>	III	K	63	SU	1.12	0.10
396	<i>meningeoma malignum</i>	III	K	73	KA	0.99	0.06
397	<i>meningeoma malignum</i>	III	K	74	NM	1.10	0.02
398	<i>meningeoma transitionale</i>	I	K	40	KG	1.56	0.08
399	<i>meningeoma transitionale</i>	I	K	41	MD	1.55	0.09
400	<i>meningeoma transitionale</i>	I	K	46	ML	1.66	0.11
401	<i>meningeoma transitionale</i>	I	M	51	PH	1.58	0.14
402	<i>meningeoma transitionale</i>	I	K	53	MB	1.65	0.05
403	<i>meningeoma transitionale recidivans</i>	I	K	54	WE	1.66	0.08
404	<i>meningeoma meningothele partim transitionale partim angiomasum</i>	I	M	62	KSt	1.43	0.09
405	<i>meningeoma meningothele partim transitionale</i>	I	K	56	BSt	1.46	0.05
406	<i>meningeoma meningothele transitionale</i>	I/II	K	67	GI	1.54	0.12
407	<i>meningeoma transitionale partim psammomatosum</i>	I	K	69	MK	1.53	0.06
408	<i>meningeoma transitionale</i>	I	K	71	KM	1.48	0.18
409	<i>meningeoma meningothele partim metaplasticum (xanthomasum) et psammomatosum</i>	I	M	71	NE	1.46	0.06
410	<i>haemangioma</i>	I	M	43	TJ	0.95	0.05
411	<i>haemangiopericytoma</i>	III	M	43	KW	1.02	0.10
412	<i>haemangiopericytoma</i>	III	M	45	ZM	1.13	0.01
413	<i>haemangioblastoma</i>	I	K	34	JP	1.18	0.15
414	<i>haemangioblastoma</i>	I	M	38	WA	0.65	0.11
415	<i>haemangioblastoma</i>	I	K	46	PB	0.75	0.11
416	<i>lymphoma malignum</i>	IV	M	41	BP	0.19	0.04
417	<i>lymphoma malignum</i>	IV	M	51	PSt	0.43	0.08
418	<i>lymphoma malignum</i>	IV	M	59	BH	0.47	0.05
419	<i>lymphoma malignum</i>	IV	M	63	WM	0.58	0.03
420	<i>lymphoma malignum</i>	IV	K	64	AE	0.55	0.05
421	<i>lymphoma malignum</i>	IV	M	67	HJ	0.54	0.03
422	<i>lymphoma malignum</i>	IV	K	67	BH	0.57	0.05
423	<i>lymphoma malignum</i>	IV	M	72	KA	0.33	0.17
424	<i>lymphoma malignum</i>	IV	K	74	KW	0.43	0.03
425	<i>plasmocytoma</i>	IV	M	67	NH	1.03	0.05
426	<i>metastasis melanomatis (skóra)</i>		M	51	LH	0.52	0.08
427	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (jajnik)</i>		K	50	WZ	1.13	0.06
428	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (jajnik)</i>	G2	K	52	FJ	0.88	0.18

429	<i>metastasis - adenocarcinoma (jajnik)</i>	G1	K	61	SI	0.99	0.15
430	<i>metastasis carcinomatosa (narząd rodny)</i>		K	62	CB	0.67	0.16
431	<i>metastasis - adenocarcinoma (narząd rodny)</i>	G2	K	56	JA	0.55	0.06
432	<i>metastasis - adenocarcinoma</i>		K	64	PB	0.47	0.02
433	<i>metastasis carcinomatosa adenogenes (endometrium)</i>		K	63	HM	0.45	0.09
434	<i>metastasis carcinomatosa (jądro)</i>		M	52	BM	0.71	0.02
435	<i>metastasis - adenocarcinoma (prostata)</i>	G1	M	46	BE	0.64	0.03
436	<i>metastasis - adenocarcinoma tabulare (jelito grube)</i>	G3	M	51	SzSt	0.31	0.06
437	<i>metastasis - adenocarcinoma partim papillae (odbytnica)</i>		M	60	RZ	0.50	0.10
438	<i>metastasis - carcinoma planoepitheliale (krtani)</i>	G3	M	64	AJ	1.31	0.13
439	<i>metastasis carcinomatosa adenogenes (przełyk)</i>	G3	M	63	HA	0.45	0.05
440	<i>metastasis - ca planopitheliale (język)</i>		M	55	KB	0.82	0.09
441	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (gonady)</i>	G1	K	55	MJ	1.18	0.17
442	<i>metastasis carcinomatosa - ca ductale (piers)</i>		K	50	TD	0.54	0.07
443	<i>metastasis - adenocarcinoma partim papillare (piers)</i>	G2	K	51	MS	0.70	0.20
444	<i>metastasis carcinomatosa (piers)</i>		K	53	BSt	0.84	0.04
445	<i>metastasis - adenocarcinoma partim papillare (piers)</i>		K	55	KI	0.61	0.07
446	<i>metastasis carcinomatosa (piers)</i>		K	58	MT	0.97	0.03
447	<i>metastasis carcinomatosa (piers)</i>		K	67	SzW	0.28	0.09
448	<i>metastasis - ca clarocellulare (nerka)</i>	G1	M	56	RJ	0.53	0.08
449	<i>metastasis carcinomatosa solidum (płuco)</i>		M	64	AW	0.63	0.06
450	<i>metastasis - ca anaplasticum microcellulare (płuco)</i>		K	40	MB	0.59	0.08
451	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	46	OA	0.66	0.15
452	<i>metastasis - ca solidum adenogenes (płuco)</i>		M	48	CW	0.52	0.07
453	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		K	48	RH	0.59	0.05
454	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		K	48	KA	0.52	0.05
455	<i>metastasis carcinomatosa solidum (płuco)</i>		K	49	ZB	0.71	0.02
456	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		K	49	WG	0.32	0.02
457	<i>metastasis - adenocarcinoma tabulare (jelito grube)</i>	G2	M	49	WJ	0.86	0.07
458	<i>metastasis carcinomatosa solidum adenogenes</i>		M	50	ML	0.41	0.05
459	<i>metastasis - ca microcellulare anaplasticum (płuco)</i>		M	50	RJ	0.82	0.15
460	<i>metastasis - adenocarcinoma partim papillare (jelito grube)</i>		M	51	KM	1.01	0.09
461	<i>metastasis - ca solidum male differentiatum partim necroticans (płuco)</i>	G3	M	51	ŁK	0.75	0.05
462	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>	G3	M	52	SA	0.43	0.03
463	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>	G3	M	52	CJ	0.85	0.04
464	<i>metastasis - adenocarcinoma tubulare papillare (jelito grube)</i>	G2	M	53	BW	0.82	0.09
465	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		K	54	BH	1.03	0.03
466	<i>metastasis carcinomatosa solidum adenogenes (płuco)</i>	G3	K	54	FE	0.12	0.01

467	<i>metastasis - adenocarcinoma (płuco)</i>	G3	K	54	FM	1.29	0.25
468	<i>metastasis - ca solidum partim large cell ca (płuco)</i>	G3	M	54	PI	0.72	0.01
469	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	55	KB	1.02	0.12
470	<i>metastasis - adenocarcinoma partim papillare (płuco)</i>	G2	M	55	OSt	0.86	0.04
471	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>	G3	M	55	WA	0.38	0.06
472	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		K	56	AH	0.72	0.04
473	<i>metastasis - adenocarcinoma (płuco)</i>		M	56	ŁJ	0.52	0.08
474	<i>metastasis carcinomatosa solidum partim adenogeneses (płuco)</i>		M	56	GL	0.49	0.07
475	<i>metastasis carcinomatosa solidum adenogenes (płuco)</i>		M	57	MW	0.57	0.07
476	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (płuco)</i>	G2	M	57	FJ	0.64	0.04
477	<i>metastasis carcinomatosa microcellulare (płuco)</i>		M	57	KE	0.96	0.04
478	<i>metastasis neoplasmatis (płuco)</i>		K	57	MR	0.82	0.03
479	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	58	MM	0.58	0.08
480	<i>metastasis carcinomatosa microcellulare (płuco)</i>		M	58	ISt	0.46	0.05
481	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (płuco)</i>	G2	M	58	PP	0.87	0.06
482	<i>metastasis carcinomatose adenoca (płuco)</i>	G3	K	59	PT	0.50	0.07
483	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (płuco)</i>		K	59	ST	0.54	0.04
484	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	59	BD	0.82	0.09
485	<i>metastasis - adenocarcinoma partim papillare (płuco)</i>		M	60	ZB	0.98	0.03
486	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	60	PZ	0.59	0.06
487	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	61	MM	0.52	0.10
488	<i>metastasis - ca solidum partim large cell carcinoma (płuco)</i>		M	61	RM	0.82	0.11
489	<i>metastasis - adenocarcinoma (płuco)</i>	G3	K	62	KSt	0.27	0.09
490	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>	G3	K	62	PA	0.36	0.12
491	<i>metastasis carcinomatosa partim papillare (płuco)</i>		M	62	SM	0.57	0.05
492	<i>metastasis carcinomatosa solidum adenogenes (płuco)</i>	G3	M	63	LH	0.76	0.12
493	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (płuco)</i>	G2	M	64	DW	0.84	0.09
494	<i>metastasis carcinomatosa mirocellulare anaplasticum (płuco)</i>		M	64	SzH	0.62	0.05
495	<i>metastasis - adenocarcinoma (płuco)</i>	G3	K	65	RK	0.49	0.05
496	<i>metastasis non differentiatum/large cell ca (płuco)</i>		M	65	DSt	0.73	0.04
497	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	65	KW	0.69	0.08
498	<i>metastasis carcinomatosa solidum (płuco)</i>		K	66	PE	0.53	0.07
499	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		K	66	WW	0.52	0.07
500	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		K	66	BA	0.26	0.12
501	<i>metastasis carcinomatosa solidum adenogenes (płuco)</i>	G3	M	66	GJ	0.66	0.13
502	<i>metastasis carcinomatosa solidum adenogenes (płuco)</i>		M	67	DR	0.58	0.04
503	<i>metastasis adenoca papillare (płuco)</i>	G1	M	69	CzL	0.93	0.10
504	<i>metastasis carcinomatosa solidum adenogenes (płuco)</i>		M	70	BJ	0.57	0.06
505	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	73	UW	0.69	0.05

506	<i>metastasis melanomatis</i>	IV	K	32	ZA	0.45	0.03
507	<i>metastasis melanomatis</i>		K	39	ZI	0.18	0.01
508	<i>metastasis melanomatis amelanocyticum</i>	IV	M	44	SzM	0.55	0.05
509	<i>metastasis melanomatis</i>	IV	M	54	KH	0.57	0.05
510	<i>metastasis melanomatis</i>		K	55	PM	0.57	0.05
511	<i>metastasis melanomatis</i>		M	63	KM	0.75	0.09
512	<i>metastasis - adenocarcinoma partim papillare</i>		K	44	GG	0.54	0.09
513	<i>metastasis carcinomatosa - ca embryonale</i>		M	46	DG	0.74	0.09
514	<i>metastasis carcinomatosa - ca adenogenes</i>		K	46	RG	0.38	0.04
515	<i>metastasis carcinomatosa adenogenes</i>		K	47	TD	0.58	0.08
516	<i>metastasis carcinomatosa</i>		K	48	KE	0.62	0.07
517	<i>metastasis carcinomatosa solidum adenogenes</i>		K	48	SB	0.56	0.08
518	<i>metastasis carcinomatosa - ca solidum</i>		K	48	LA	0.58	0.03
519	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	49	LA	0.52	0.08
520	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	49	SW	0.62	0.07
521	<i>metastasis carcinomatosa – ca solidum</i>		M	50	JJ	0.56	0.09
522	<i>metastasis carcinomatosa - ca adenogenes</i>		M	50	SL	0.50	0.08
523	<i>metastasis adenoca papillare</i>		M	50	GR	0.60	0.03
524	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	51	PA	0.72	0.04
525	<i>metastasis carcinomatosa</i>	G3	K	52	KG	0.54	0.06
526	<i>metastasis carcinomatosa</i>		K	52	RB	0.55	0.05
527	<i>metastasis carcinomatosa - ca planopitheliale</i>		K	54	WE	0.53	0.09
528	<i>metastasis carcinomatosa</i>		K	54	PE	0.92	0.04
529	<i>metastasis verisimiliter thyreogenes</i>		K	54	ZG	0.35	0.05
530	<i>metastasis carcinomatosa adenoca</i>		M	54	JH	0.72	0.06
531	<i>metastasis carcinomatosa</i>		K	55	WM	0.55	0.07
532	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	56	TZ	0.71	0.05
533	<i>metastasis adenocarcinoma partim papillare</i>	G2	K	56	MT	0.85	0.09
534	<i>metastasis carcinomatosa solidum male differentiatum</i>		M	56	KB	0.64	0.09
535	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	57	NM	0.78	0.09
536	<i>metastasis - adenocarcinoma clarocellulare</i>		M	58	RS	0.61	0.12
537	<i>metastasis planoepitheliale akeratodes</i>	G3	M	59	SzE	0.63	0.07
538	<i>metastasis adenoca papillare</i>	G2	K	60	KM	0.78	0.05
539	<i>metastasis - adenocarcinoma partim papillare</i>		K	60	MH	0.38	0.07
540	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare</i>	G2	K	61	PM	1.03	0.11
541	<i>metastasis carcinomatosa solidum</i>		K	62	LA	0.50	0.08
542	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	62	RZ	0.29	0.08
543	<i>metastasis carcinomatosa solidum male differentiatum</i>	G3	M	62	KJ	0.60	0.06
544	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	62	PM	0.79	0.07
545	<i>metastasis carcinomatosa planopitheliale</i>		M	64	WH	0.53	0.04
546	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare</i>		M	64	SM	1.09	0.02
547	<i>metastasis - adenocarcinoma partim papillare</i>		M	65	KK	0.67	0.08
548	<i>metastasis carcinomatosa solidum</i>		M	65	PM	0.55	0.07
549	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	65	HJ	0.49	0.07
550	<i>metastasis carcinomatosa - ca solidum</i>		M	65	PM	0.55	0.07
551	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare</i>		M	66	PM	0.48	0.04
552	<i>metastasis - carcinoma planoepitheliale</i>		M	66	SF	0.66	0.09

553	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (jelito grube)</i>		K	67	BJ	1.08	0.14
554	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare</i>		M	67	MZ	0.93	0.11
555	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	67	DZ	0.29	0.07
556	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare</i>	G2	K	68	GG	0.77	0.08
557	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare</i>		K	68	HA	0.45	0.11
558	<i>metastasis carcinomatosa</i>		K	68	NU	0.58	0.03
559	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare</i>		K	68	KM	0.49	0.07
560	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	69	ZW	0.28	0.03
561	<i>metastasis - adenocarcinoma partim solidum</i>	G3	M	71	NJ	0.46	0.09
562	<i>metastasis carcinomatosa planoepitheliale</i>		M	72	GJ	0.48	0.07
563	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	72	SE	0.60	0.05
564	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	73	LT	0.48	0.03
565	<i>metastasis neoplasmatis - neoplasma malignum fusocellulare</i>		M	77	KB	0.73	0.06
566	<i>glioma</i>	II/III	M	64	PW	0.46	0.08
567	<i>glioma malignum</i>	III	M	59	EE	1.03	0.07
568	<i>adenoma chromophobe</i>		M	76	BB	0.37	0.06
569	<i>angioma arteriovenosum</i>		K	15	SA	0.46	0.11
570	<i>angioma arteriovenosum</i>		K	15	KM	0.41	0.06
571	<i>xanthogranuloma</i>		K	67	DK	1.55	0.03
572	<i>neoplasma malignum</i>	IV	M	49	TZ	0.45	0.09
573	<i>neoplasma malignum</i>	IV	K	50	GD	0.52	0.06
574	<i>neoplasma malignum</i>	IV	M	52	LZ	0.60	0.05
575	<i>neoplasma malignum</i>	IV	K	53	NA	0.69	0.04
576	<i>neoplasma malignum</i>	IV	M	53	KL	0.41	0.11
577	<i>neoplasma malignum</i>	IV	K	73	NK	0.30	0.07
578	<i>neoplasma malignum</i>	IV	M	57	PW	0.76	0.05

Tabela II. Zestawienie wyników analizy m^5C u 186 pacjentów z guzem mózgu, u których przeprowadzono również oznaczenie m^5C w DNA z krwi obwodowej.

L.p.	Rozpoznanie histopatologiczne	Stopień WHO	Płeć	Wiek pacjenta	Pacjent	R (tkanka)	R (krew)
1	<i>meningioma angiomasum</i>	I	K	51	KSt	1.50	1.38
2	<i>meningioma angiomasum</i>	I	K	60	SzI	1.48	1.40
3	<i>meningioma angiomasum</i>	I	K	67	SzR	1.54	1.59
4	<i>meningioma angiomasum</i>	I	M	61	CzJ	1.49	1.45
5	<i>meningioma angiomasum</i>	I	K	67	MB	1.51	1.44
6	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	28	KA	1.56	1.48
7	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	52	KM	1.57	1.52
8	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	52	LT	1.55	1.60
9	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	65	ZK	1.53	1.52
10	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	M	66	GW	1.56	1.78
11	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	51	PG	1.59	1.45
12	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	58	SA	1.61	1.51
13	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	48	MH	1.64	1.46
14	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	67	GI	1.54	1.57
15	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	58	FA	1.13	1.38
16	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	64	CM	1.58	1.43
17	<i>meningioma meningotheliale</i>	I	K	47	BA	1.62	1.49
18	<i>meningioma fibrosum</i>	I	K	55	FB	1.54	1.51
19	<i>meningioma fibrosum</i>	I	K	66	CE	1.57	1.78
20	<i>meningioma fibrosum</i>	I	M	71	GW	1.62	1.67
21	<i>meningioma fibrosum</i>	I	M	63	KT	1.71	1.41
22	<i>meningioma fibrosum partim psammomasum</i>	I	K	62	GI	1.41	1.37
23	<i>meningioma malignum</i>	III	K	73	KA	0.99	1.22
24	<i>meningioma malignum</i>	III	K	43	AB	1.42	1.56
25	<i>meningioma transitionale</i>	I	K	71	KM	1.48	1.76
26	<i>meningioma transitionale partim psammomasum</i>	I	K	69	MK	1.53	1.63
27	<i>meningioma atypicum</i>	II	K	54	GD	1.46	1.55
28	<i>meningioma atypicum</i>	II	M	65	GCz	1.53	1.44
29	<i>meningioma atypicum</i>	II	M	77	SM	1.43	1.66
30	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	M	26	JR	1.54	1.63
31	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	M	32	SzT	1.61	1.41
32	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	M	32	KM	1.53	1.63
33	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	K	35	SzB	1.54	1.59
34	<i>astrocytoma fibrillare</i>	II	K	48	BD	1.43	1.68
35	<i>astrocytoma fibrillare partim gemistocyticum</i>	II	K	29	ZS	1.34	1.46
36	<i>astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum et gemistocyticum</i>	II	K	29	BK	1.33	1.41
37	<i>astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum et gemistocyticum</i>	II	K	42	WJ	1.31	1.48
38	<i>astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum</i>	II	M	51	NL	1.31	1.26
39	<i>astrocytoma fibrillare diffusum partim microcysticum</i>	II	K	34	łA	1.47	1.52
40	<i>astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum</i>	II	K	41	SM	1.47	1.34

	<i>et gemistocyticum</i>						
41	<i>astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum diffusum</i>	II	K	26	UU	1.54	1.63
41	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	30	PM	0.99	1.21
42	<i>astrocytoma anaplasticum recidivans</i>	III	K	35	PH	1.05	0.98
43	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	37	JSt	1.00	1.12
44	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	40	LD	0.99	1.04
45	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	44	PS	1.03	1.15
46	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	45	KB	1.03	1.18
47	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	48	GE	1.04	1.21
48	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	49	KM	1.01	1.03
49	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	53	BZ	1.01	1.12
50	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	54	BK	1.06	1.21
51	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	73	GA	1.05	1.13
52	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	56	BC	1.04	0.97
53	<i>astrocytoma anaplasticum partim granulocellulare</i>	III	M	30	NG	1.05	0.91
54	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	24	SzS	1.05	1.26
55	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	39	NP	1.00	0.84
56	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	51	JJ	1.07	1.16
57	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	68	PE	0.99	1.29
58	<i>astrocytoma anaplasticum recidivans in GBM tendens</i>	III/IV	K	56	WD	0.81	0.98
59	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	K	34	DE	1.04	1.21
60	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M		KJ	1.02	0.92
61	<i>astrocytoma anaplasticum</i>	III	M	59	ŚSt	1.01	1.24
62	<i>oligodendroglioma isomorphum</i>	II	M	67	WK	1.22	1.37
63	<i>oligodendroglioma isomorphum</i>	II	K	58	ST	1.18	1.20
64	<i>oligodendroglioma</i>	III	K	53	CZ	1.18	1.13
65	<i>oligodendroglioma anapl recidivans</i>	III	K	63	ST	0.98	1.04
66	<i>oligodendroglioma anaplasticum recidivans</i>	III	M	31	CzP	0.98	1.20
67	<i>oligodendroglioma anaplasticum recidivans</i>	III	M	57	EB	1.08	1.18
68	<i>glioma mixtum oligoastrocytoma anaplasticum</i>	III	M	47	ZM	0.97	1.17
69	<i>glioma anaplasticum recidivans partim granulocellulare</i>	III	M	45	MJ	0.49	0.60
70	<i>ganglioglioma</i>	I	K	48	ME	1.36	1.13
71	<i>glioma anaplasticum (ew. brzeg GBM)</i>	III	M	60	LL	0.72	0.88
72	<i>glioma mixtum oligoastrocytoma anaplasticum</i>		K	22	KN	1.24	0.92
73	<i>glioma mixtum oligoastrocytoma anaplasticum</i>		M	48	ZP	1.13	1.27
74	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	22	WP	0.58	0.43
75	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	28	DM	0.38	0.56
76	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	29	KA	0.22	0.59
77	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	30	AŁ	0.49	0.69
78	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	35	NI	0.53	0.56
79	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	39	KK	0.48	0.89
80	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	45	RK	0.42	0.47
81	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	46	GL	0.41	0.66
82	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	46	WG	0.43	0.66
83	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	47	KSt	0.49	0.62

84	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	48	WD	0.54	0.78
85	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	48	PP	0.51	0.12
86	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	49	OA	0.64	0.88
87	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	49	CW	0.34	0.50
88	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	51	PE	0.53	0.29
89	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	K	52	GG	0.52	0.92
90	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	53	KA	0.62	0.88
91	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	54	ŚM	0.46	0.62
92	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	54	SM	0.46	0.50
93	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	K	54	PB	0.32	0.56
94	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	54	SM	0.53	0.74
95	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	54	WJ	0.42	0.33
96	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	54	LZ	0.43	0.71
97	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	54	ML	0.33	0.39
98	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	55	DM	0.34	0.50
99	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	56	PA	0.46	0.65
100	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	57	SzT	0.37	0.51
101	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	57	RD	0.47	0.45
102	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	58	LP	0.5	0.34
103	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	59	BL	0.43	0.55
104	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	60	GZ	0.34	0.60
105	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	62	SH	0.51	0.71
106	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	62	WJ	0.53	0.73
107	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	64	DSt	0.52	0.37
108	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	65	HJ	0.55	0.51
109	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	65	OB	0.51	0.64
110	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	K	65	TCz	0.43	0.37
111	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	66	PJ	0.30	0.27
112	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	67	MZ	0.29	0.60
113	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	67	MJ	0.53	0.76
114	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	66	KJ	0.38	0.53
115	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	67	ZW	0.59	0.68
116	<i>glioblastoma multiforme recidivans</i>	IV	M	68	DZ	0.53	0.66
117	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	69	WA	0.44	0.56
118	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	69	RW	0.55	0.41
119	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	71	KJ	0.39	0.79
120	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	71	SJ	0.5	0.32
121	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	71	SZ	0.17	0.55
122	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	71	BSt	0.35	0.57
123	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	75	AH	0.34	0.81
124	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	K	74	NH	0.46	0.44
125	<i>glioblastoma multiforme</i>	IV	M	75	B M	0.56	0.51
126	<i>glioma anaplasticum (brzeg GBM)</i>	III	K	60	BT	0.72	0.55
127	<i>giant cell glioblastoma recidivans</i>		K	45	HI	0.44	1.13
128	<i>metastasis carcinomatosa (jajnik)</i>	G2	K	52	FJ	1.23	0.64
129	<i>metastasis carcinomatosa (jajnik)</i>		K	61	SI	0.99	0.71
130	<i>metastasis carcinomatosa (pierś)</i>		K	58	MT	0.97	1.19
131	<i>metastasis adenoca partim papillare (pierś)</i>	G2	K	51	MS	0.7	0.98

132	<i>metastasis - adenocarcinoma tubulare (jelito grube)</i>	G3	M	51	SzSt	0.31	0.24
133	<i>metastasis - adenocarcinoma partim papillare (płuco)</i>	G3	K	64	PB	0.47	0.43
134	<i>metastasis carcinomatosa (nerka)</i>		M	56	RJ	0.53	1.03
135	<i>metastasis carcinomatosa (odbytnica)</i>		M	60	RZ	0.50	0.63
136	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	50	RJ	0.62	0.87
137	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>	G3	K	54	FM	1.29	0.38
138	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	49	WJ	0.86	0.70
139	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	58	ISt	0.46	0.52
140	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	60	PZ	0.59	0.43
141	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	51	KM	1.01	1.18
142	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		K	48	RH	0.59	0.78
143	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	61	MM	0.52	0.43
144	<i>metastasis - ca solidum (płuco)</i>	G3	M	52	CJ	0.85	0.76
145	<i>metastasis - ca microcellulare anaplasticum (płuco)</i>		M	50	RW	0.82	0.88
146	<i>metastasis - ca solidum partim large cell carcinoma (płuco)</i>		M	61	RM	0.82	0.61
147	<i>metastasis - ca solidum verisimiliter adenogenes (płuco)</i>		M	73	UW	0.69	0.67
148	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		M	55	WA	0.38	0.56
149	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		K	49	WG	0.32	0.49
150	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>	G3	M	66	GJ	0.66	0.53
151	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>		K	66	BA	0.26	1.03
152	<i>metastasis carcinomatosa (płuco)</i>	G3	M	60	ZB	0.98	1.06
153	<i>metastasis - adenocarcinoma (płuco)</i>	G3	K	62	KSt	0.27	0.43
154	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (płuco)</i>	G2	M	57	FJ	0.64	0.65
155	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (płuco)</i>	G1	M	69	CzL	0.93	1.06
156	<i>metastasis - adenocarcinoma tubulae (jelito grube)</i>	G2	M	49	WJ	0.86	0.88
157	<i>metastasis - ca solidum adenogenes (płuco)</i>	G3	K	54	FE	0.12	0.55
158	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (płuco)</i>	G2	M	64	DW	0.84	0.95
159	<i>metastasis - adenocarcinoma papillare (płuco)</i>	G2	M	58	PP	0.87	1.07
160	<i>metastasis - ca microcellulare anaplasticum (płuco)</i>		M	64	SzH	0.62	0.88
161	<i>metastasis - ca solidum partim large cell ca (płuco)</i>	G3	M	54	PI	0.72	0.94
162	<i>metastasis - ca solidum male differentiatum partim necroticans (płuco)</i>	G3	M	51	łK	0.75	0.54
163	<i>metastasis carcinomatosa</i>		K	52	RB	0.55	0.72
164	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	59	SzE	0.63	0.83
165	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	72	SE	0.60	0.83
166	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	63	RZ	0.29	0.66
167	<i>metastasis carcinomatosa</i>		M	64	WH	0.53	0.83
168	<i>metastasis melanomatis</i>		K	55	PM	0.57	0.80
169	<i>metastasis adenoca partim papillare</i>	G2	K	56	MT	0.85	0.97
170	<i>metastasis adenoca partim solidum</i>	G3	M	71	NJ	0.46	0.66
171	<i>metastasis</i>		K	54	BH	1.09	1.21
172	<i>metastasis - ca planoepitheliale</i>	G3	M	69	ŻW	0.28	0.48
173	<i>metastasis - ca microcellulare</i>		M	65	HJ	0.49	0.56
174	<i>metastasis verisimiliter thyreogenes</i>		K	54	ŻG	0.35	0.49
175	<i>metastasis - adenoca papillare</i>	G2	K	68	GG	0.77	0.88

176	<i>metastasis – ca solidum male differentiatum</i>		M	62	KJ	0.6	0.76
177	<i>metastasis – adenoca papillare</i>		K	61	PU	1.03	0.82
178	<i>metastasis neoplasmatis –neoplasma malignum fusocellulare verisimiliter melanoma malignum</i>		M	77	KB	0.73	0.98
179	<i>neoplasma malignum</i>	IV	M	53	KL	0.41	0.54
180	<i>neoplasma malignum</i>	IV	M	49	TZ	0.45	0.62
181	<i>neurocytoma centrale</i>		M	25	KŁ	1.17	1.26
182	<i>neurinoma</i>	I	K	29	KM	1.26	1.35
183	<i>neurinoma (schwannoma)</i>		K	32	TM	1.31	1.48
184	<i>haemangioblastoma</i>	I	K	34	JP	1.18	1.26
185	<i>haemangiopericytoma</i>	III	M	45	ZM	1.13	0.98
186	<i>ependymoma anaplasticum</i>	III	M	40	CT	1.30	1.44

11. Literatura

- Ahmadian A, Ehn M, Hober S (2006) Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 363:83-94
- Al-Ali F, Hendon AJ, Liepman MK i in (2005) Oligodendroglioma metastatic to bone marrow. *Am J Neuroradiol* 26:2410-2414
- Allen JC, Epstein F (1982) Medulloblastoma and other primary malignant tumors of the CNS. *J Neurosurg* 57:446-451
- Antequera F, Bird A (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11995-11999
- Araujo FD, Croteau S, Slack AD i in (2001) The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus. *J Biol Chem* 276:6930-6936
- Attwood JT, Yung RL, Richardson BC (2002) DNA methylation and the regulation of the gene transcription. *Cell Mol Life Sci* 59:241-257
- Baeza N, Weller M, Yonekawa Y i in (2003) PTEN methylation and expression in glioblastomas. *Acta Neuropathol* 106:479-485
- Barciszewska A-M, Murawa D, Gawronska I i in (2007b) Analysis of 5-methylcytosine in DNA of breast and colon cancer tissues. *IUBMB Life* 59:1-6
- Barciszewska A-M, Nowak S, Żukiel R i in (2006) Wpływ przechowywania tkanki nowotworowej na zawartość 5-metylocytozyny w DNA guzów mózgu. *Neuroskop* 8:160-162
- Barciszewska MZ, Barciszewska AM, Rattan SI (2007a) TLC-based detection of methylated cytosine: application to aging epigenetics. *Biogerontology* 8:673-8
- Barciszewski J, Barciszewska MZ, Siboska G i in (1999) Some unusual nucleic acid bases are products of hydroxyl radical oxidation of DNA and RNA. *Mol Biol Rep* 26:231-238
- Barker FG, Chang SM, Larson DA i in (2001) Age and radiation response in glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 49:1288-1298
- Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Davis FG i in (2004) Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J Clin Oncol* 22:2865-2872
- Bartosz G (1995) *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa
- Bauman GS, Ino Y, Ueki K i in (2000) Allelic loss of chromosome 1p and radiotherapy plus chemotherapy in patients with oligodendrogliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48:825-830
- Baylin SB, Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16:168-174
- Beard C, Li E, Jaenisch R (1995) Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* 9:2325-2334
- Beckmann MJ, Prayson RA (1997) A clinicopathologic study of 30 cases of oligoastrocytoma including p53 immunohistochemistry. *Pathology* 29:159-164
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF i in (2003) Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361:323-331

-
- Beier V, Mund C, Hoheisel JD (2007) Monitoring methylation changes in cancer. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 104:1-11
- Beigel JA, Rorke LB, Packer RJ i in (1989) Isochromosome 17 q in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Genes Chrom Cancer* 1:139-147
- Bennett-Baker PE, Wilkowski J, Burke DT (2003) Age-associated activation of epigenetically repressed genes in the mouse. *Genetics* 165:2055–2062
- Berger MS, Edwards MS, LaMasters D i in (1983) Pediatric brain stem tumors: radiographic. pathological. and clinical correlations. *Neurosurgery* 12:298-302
- Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9:2395-2402
- Bezjak A, Adam J, Barton R i in (2002) Symptom response after palliative radiotherapy for patients with brain metastases. *Eur J Cancer* 38:487-496
- Bezjak A, Adam J, Panzarella T i in (2001) Radiotherapy for brain metastases: defining palliative response. *Radiother Oncol* 61:71-76
- Biernat W (1999) Molekularne podłoże procesu progresji złośliwości glejaków rozlanych ośrodkowego układu nerwowego. *Onkol Pol* 2:113-119
- Bird A (2001) Molecular biology. Methylation talk between histones and DNA. *Science* 294:2113-2115
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Gen Develop* 16:6-21
- Bird AP (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321:209-213
- Bird AP (1987) CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet* 3:342-347
- Bird AP, Taggart MH, Smith BA (1979) Methylated and unmethylated DNA compartments in the sea urchin genome. *Cell* 17:889-901
- Bjornsson HAT, Fallin MD, Feinberg AP (2004) An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet* 20:350-358
- Bohr VA (2002) Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA. and some changes with aging in mammalian cells. *Free Rad Biol Med* 32:804-812
- Borgelt B, Gelber R, Kramer S i in (1980) The palliation of brain metastases: final results of the first two studies by the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6:1-9
- Brandes A, Fiorentino MV (1998) Treatment of high-grade gliomas in the elderly. *Oncology* 55:1-6
- Brat DJ, Van Meir EG (2001) Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF a new world of angiogenesis research. *Am J Pathol* 3:789-796
- Bredburry J (2003) Human epigenome project – up and running. *PloS Biology* 1:316-319
- Brena RM, Huang TH, Plass C (2006) Quantitative assessment of DNA methylation: Potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings. *J Mol Med* 84:365-377
- Brenner C, Deplus R, Didelot C i in (2005) Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J* 24:336-346

- Brown PD, Brown CA, Pollock BE i in (2008) Stereotactic radiosurgery for patients with "radioresistant" brain metastases. *Neurosurgery* 62:790-801
- Byrne TN, Piepmeier JM, Yoshida D (1996) Imaging and Clinical Features of Gliomas. W: Tindall GT, Cooper PR, Barrow DL (Red.) *The Practice of Neurosurgery*. Williams & Wilkins, Baltimore, 637-647
- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC i in (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90:1473-1479
- Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S i in (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the reexpression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21:103-107
- Cavaliere R, Lopes MB, Schiff D (2005) Low-grade gliomas: an update on pathology and therapy. *Lancet Neurol* 4:760-770
- CBTRUS (2005) Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 1998-2002. Published by the Central Brain Tumor Registry of the United States
- CBTRUS (2007-2008) Primary Brain Tumors in the United States Statistical Report 2000-2004. Central Brain Tumor Registry of the United States
- Cedar H, Solage A, Glaser G et al (1979) Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI. *Nucleic Acids Res* 6:2125-2132
- Cervoni L, Celli P, Salvati M (1998) Long-term survival in a patient with supratentorial glioblastoma: clinical considerations. *Ital J Neurol Sci* 4:221-224
- Chandler KL, Prados MD, Malec M i in (1993) Long-term survival in patients with glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 5:716-720
- Chang EL, Lo S (2003) Diagnosis and management of central nervous system metastases from breast cancer. *Oncologist* 8:398-410
- Chang S, Theodosopoulos P, Sneed P (2001) Multidisciplinary management of adult anaplastic astrocytomas. *Semin Rad Oncol* 2:163-169
- Chen MY, Lonser RR, Morrison PF i in (1999) Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion. cannula size. infusate concentration. and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg* 90:315-320
- Chow JC, Brown CJ (2003) Forming facultative heterochromatin: silencing of an X chromosome in mammalian females. *Cell Mol Life Sci* 60:2586-2603
- Cimatti M, Salvati M, Caroli E i in (2004) Extremely delayed cerebral metastasis from renal carcinoma: report of four cases and critical analysis of the literature. *Tumori* 90:342-344
- Cokgor I, Friedman AH, Friedman HS (1998) Paediatric update. Gliomas. *Eur J Cancer* 34:1910-1918
- Colot V, Rossignol JL (1999) Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 21:402-411
- Cooney CA (1993) Are somatic cells inherently deficient in methylation metabolism? A proposed mechanism for methylation loss. senescence and aging. *Growth Dev Aging* 57:261-273
- Cross SH, Charlton JA, Nan X i in (1994) Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nat Genet* 6:236-244

-
- Crowley RW, Pouratian N, Sheehan JS (2006) Gamma knife surgery for glioblastoma multiforme. *Neurosurg Focus* 20:E17
- Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R (2001) Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol* 153:773-784
- Curradi M, Izzo A, Badaracco G i in (2002) Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol* 22:3157-3173
- Cushing H, Eisenhardt L (1938) Meningiomas: their classification, regional behavior, life history and surgical end results. Charles C. Thomas, Springfield
- D'Alessio AC, Szyf M (2006) Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem. Cell Biol* 84:463-476
- Daizo Y, Behin A, Hoang-Xuan K i in (2003) Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361:323-331
- Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Chodkiewicz JP i in (1988) Dysembryoplastic neuroepithelial tumor: a surgically curable tumor of young patients within intractable partial seizures. *Neurosurgery* 23:545-556
- Davies CS (2002) Methylation-sensitive restriction fingerprinting. *Methods Mol Biol* 200:43-51
- De Witte O, Lefranc F, Levivier M i in (2000) FDG-PET as a prognostic factor in high-grade astrocytoma. *J Neurooncol* 49:157-163
- Delattre JY, Krol G, Thaler HT i in (1988) Distribution of brain metastases. *Arch Neurol* 45:741-744
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M i in (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Rad Biol Med* 32:1102-1115
- Dziubińska M, Basiak M, Konopka M i in (2006) Rola obrazowania perfuzji w tomografii komputerowej w diagnostyce glejaków ośrodkowego układu nerwowego. *Neurol Neurochir Pol* 40:51-56
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K i in (2000) MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 28:E32
- Eden S, Hashimshony T, Keshet I i in (1998) DNA methylation models histone acetylation. *Nature* 394:842
- Efird J, Friedman G, Sidney S i in (2004) The risk for malignant primary adult-onset glioma in a large, multiethnic, managed-care cohort: cigarette smoking and other lifestyle behaviors. *J Neurooncol* 68:57-69
- Ehrich M, Nelson MR, Stanssens P i in (2005) Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15785-15790
- Ehrlich M (2002a) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21:5400-5413
- Ehrlich M (2002b) DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J Nutr* 132:2424S-2429S

-
- Ehrlich M (2003) Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J Cell Biochem* 88:899-910
- Ehrlich M, Jiang G, Fiala E i in (2002) Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene* 21:6694-6702
- Engelhard HH (2002) Current diagnosis and treatment of oligodendroglioma. *Neurosurg Focus* 12:1-7
- Engelhard HH, Stelea A, Mundt A (2003) Oligodendroglioma and Anaplastic Oligodendroglioma: Clinical features, treatment, and prognosis. *Surg Neurol* 60:443-456
- Engelhard HH, Stelea A, Ochran J (2002) Oligodendroglioma: pathology and molecular biology. *Surg Neurol* 58:111-117
- Erdmann VA, Barciszewski J, Reifenberger G (Red.) (2009) Therapeutic Ribonucleic Acids in Brain Tumors. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB i in (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61:3225-3229
- Ferlay J, Bray F, Pisani P i in (2004) GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 2.0. IARC CancerBase No. 5., IARC Press, Lyon
URL: http://www_depdb.iarc.fr/globocan2002.htm
- Fife KM, Colman MH, Stevens GN i in (2004) Determinants of outcome in melanoma patients with cerebral metastases. *J Clin Oncol* 22:1293-300
- Fijuth J, Gliński B, Krajewski R i in (2004) Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego. http://www.puo.pl/pdf/nowotworyukladu_nerwowego.pdf
- Fischle W, Wang Y, Allis CD (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15:172-183
- Fitzgerald LF (2000) Familial brainstem glioma. Case report. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 102:106-108
- Fitzpatrick DR, Wilson CB (2003) Methylation and demethylation in the regulation of genes. cells. and responses in the immune system. *Clin Immunol* 109:37-45
- Fountaine T, Lind CRP, Law AJJ (2006) Primary glioblastomas and anaplastic astrocytoma in a glioma family. *J Clini Neurosci* 13:497-501
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF i in (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10604-10609
- Fraga MF, Esteller M (2002) DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 33:632, 634, 636-49.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS i in (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1827-1831
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A i in (2000) DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 24:88-91
- Gabryel T, Szymaś J (1991) Patologia układu nerwowego. W: Groniowski J. Kruś S (Red.). Podstawy patomorfologii, PZWL Warszawa, 782

- Galm O, Rountree MR, Bachman KE i in (2002) Enzymatic regional methylation assay: a novel method to quantify regional CpG methylation density. *Genome Res* 12:153-157
- Gelber RD, Larson M, Borgelt BB i in (1981) Equivalence of radiation schedules for the palliative treatment of brain metastases in patients with favorable prognosis. *Cancer* 48:1749-1753
- Gerrard GE, Prestwich RJ, Edwards A i in (2003) Investigating the palliative efficacy of whole-brain radiotherapy for patients with multiple-brain metastases and poor prognostic features. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 15:422-428
- Gilbert N, Boyle S, Sutherland H i in (2003) Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *EMBO J* 22:5540-5550
- Giles GG (1995) The epidemiology of central nervous system tumours; trends and risk factors. *J Clin Neurosci* 2:191-205
- Gitan RS, Shi H, Chen CM i in (2002) Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res* 12: 158-64
- Głuszak A, Wyszko E, Szymański M i in (2008) Udział metylotransferaz DNA w procesie nowotworzenia. *Na pograniczu chemii i biologii* 20:149-224
- Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74:481-514
- Gowher H, Leismann O, Jeltsch A (2000) DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *EMBO J* 19:6918-6923
- Greenberg MS (2006) *Handbook of Neurosurgery*. Thieme Medical Publishers, New York
- Grewal SIS, Moazed D (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301:798-802
- Grief J, Horovitz M, Marmor S (1998) Pleuropulmonar metastasis in from intracranial glioblastoma. *Lung Cancer* 20:135-137
- Gromova ES, Khoroshaev AV (2003) Prokaryotic DNA methyltransferases: the structure and the mechanism of interaction with DNA. *Mol Biol (Mosk)* 37:300-314
- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A (2001) Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 29:E65-5
- Hajkova P, Erhardt S, Lane N i in (2002) Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 117:15-23
- Halatsch ME, Schmidt U, Behnke-Mursch J i in (2006) Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treat Rev* 32:74-89
- Hamlat A, Saikali S, Chaperon J i in (2005) Oligodendroglioma: clinical study and survival analysis correlated with chromosomal anomalies. *Neurosurg Focus* 19:E15
- Harrigan M (2003) Angiogenesis Factors In the Central Nervous System. *Neurosurgery* 53:639-661
- Healey PJ, Davis CL (1998) Transmission of tumors by transplantation. *Lancet* 325:2-3
- Henderson RD (2000) Head trauma and brain tumours revisited. *J Clin Neurosci* 7:262-264

- Hendrich B, Bird A (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18:6538-6547
- Henson JW, Gaviani P, Gonzalez RG (2005) MRI in treatment of adult gliomas. *Lancet Oncol* 6:167-175
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S i in (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9821-9826
- Herman JG, Merlo A, Mao L i in (1995) Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55:4525-4530
- Herman JG, Umar A, Polyak K i in (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6870-6875
- Hermanek P, Sobin LH (Red.) (1987) TNM-Classification of Malignant Tumours. 4th edition. Springer, Berlin-Heidelberg-New York
- Ho SM, Tang WY (2007) Techniques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: an emphasis on fetal-based adult diseases. *Reprod Toxicol* 23:267-282
- Holland EC (2000) Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proc Natl Acad Sci USA* 12:6242-6244
- Hoskin PJ (2003) Case selection in the management of cerebral metastases. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 15:420-421
- Howell CY, Bestor TH, Ding F i in (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104:829-838
- Hsieh CL (2000) Dynamics of DNA methylation pattern. *Curr Opin Genet Dev* 10:224-228
- Huang PH, Mukasa A, Bonavia R i in (2007) Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12867-12872
- Hulshof MC, Koot RW, Schimmel FC i in (2001) Prognostic factors in glioblastoma multiforme. 10 years experience of a single institution. *Strahlenther Onkol* 6:283-290
- Hung MS, Karthikeyan N, Huang B i in (1999) Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11940-11945
- Huo WY, Zhang Y (2002) A study of prognostic factors and therapy of intracranial glioma. *International Congress Series* 1247:311-315
- Igun GO (2001) Diagnosis and management of brain tumours at Jos University Teaching Hospital. *Nigeria East Afr Med J* 78:148-151
- Issa JP (2000) CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 249:101-118
- Jackson-Grusby L, Beard C, Possemat R i in (2001) Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* 27:31-39
- Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet Suppl* 33:245-254

- Jähner D, Stuhlmann H, Stewart CL i in (1982) De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* 298:623-628
- Jinkins JR, da Costa Leite C (1998) *Neurodiagnostic Imaging*. Lippincott-Raven Publ, Philadelphia, New York
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415-428
- Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:163-167
- Jost JP, Fremont M, Siegmann M, Hofsteenge J (1997) The RNA moiety of chick embryo 5-methylcytosine-DNA glycosylase targets DNA demethylation. *Nucleic Acids Res* 25, 4545-4550.
- Jurgowiak M, Oliński R (1997) Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA związane z rozwojem stanów patologicznych i starzeniem się. *Post Biochem* 43:30-40
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M i in (1992) Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 6:705-714
- Karimi M, Johansson S, Ekstrom TJ (2006) Using LUMA: a Luminometric-based assay for global DNA-methylation. *Epigenetics* 145-148
- Kasprzak KS, Jaruga P, Zastawny TH i in (1997) Oxidative DNA base damage and its repair in kidneys and livers of nickel (II)-treated male F344 rats. *Carcinogenesis* 18:271-274
- Keohane AM, O'Neill LP, Belyaev ND i in (1996) X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol* 180:618-630
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW i in (2002) The WHO Classification of Tumors of the Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol* 3:215-225
- Kleihues P, Soylemezoglu F, Schäuble B i in (1995) Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* 15:211-21
- Klimasauskas S, Kumar S, Roberts RJ i in (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* 76:357-369
- Koike K, Matsuyama T, Ebisuzaki T (2008) Epigenetics: application of virtual image restriction landmark genomic scanning (Vi-RLGS). *FEBS J* 275:1608-1616
- Kraus JA, Wenghoefer M, Schmidt MC i in (2000) Long-term survival of glioblastoma multiforme: importance of histopathological reevaluation. *J Neurol* 247:455-6
- Krex D, Klink B, Hartmann C i in (2007) Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130:2596-2606
- Kumar S, Cheng X, Klimasauskas S i in (1994) The DNA (cytosine-5)methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 22:1-10
- Kuratsu JI, Ushio Y (1996) Epidemiological study of primary intracranial tumors: a regional survey in Kumamoto Prefecture in the southern part of Japan. *J Neurosurg* 84:946-950
- Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR i in (2001) A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95:190-198
- Lander ES, Linton LM, Birren B i in (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:2551-2569

- Lauster R, Trautner TA, Nouer-Weidner M (1989) Cytosine-specific type II DNA methyltransferases. A conserved enzyme core with variable target-recognizing domains. *J Mol Biol* 206:305-312
- Laws ER, Parney IF, Huang W i in (2003) Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg* 99:467-473
- Le Bihan D, Mangin JF, Poupon C i in (2001) Diffusion tensor imaging: concepts and applications. *J Magn Reson Imaging* 13:534-546
- Le Jeune N, Dubois F, Bin V i in (2006) Evaluation of imatinib mesylate effects on glioblastoma aggressiveness with SPECT radiotracer ^{99m}Tc-(v)-DMSA. *Eur J Cancer* 42:1004-1013
- Lee J, Inoue K, Ono R i in (2002) Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 129:1807-1817
- Lewis PD (1995) Classification of gliomas. *Current Diag Pathol* 2:175-180
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3:662-673
- Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366:362-365
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926
- Lin CL, Lieu AS, Lee KS i in (2003) The conditional probabilities of survival in patients with anaplastic astrocytoma or glioblastoma multiforme. *Surg Neurol* 60:402-406
- Louis DN (2006) Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Patol Mech* 1:97-117
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD i in (2007b) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-109
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD i in (Red.) (2007a) WHO Classification of tumours of the central nervous system. IARC, Lyon
- Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG (2002) Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell* 2:125-128
- Luczak MW, Jagodzinski PP (2006) The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 44:143-154
- Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408:538-540
- Majchrzak H, Ładziński P, Majchrzak K i in (2005) Technika chirurgiczna operacji głąkówek pnia mózgu. *Neurol Neurochir Pol* 39:69-74
- Makino K, Nakamura H, Kino T i in (2006) Rising incidence of primary central nervous system lymphoma in Kumamoto. *Japan Surg Neurol* 66:503-506
- Malmer B, Henriksson R, Grönberg H (2003) Familial brain tumours-genetics or environment? A nationwide cohort study of cancer risk in spouses and first-degree relatives of brain tumour patients. *Int J Cancer* 106:260-263

-
- Margot JB, Ehrenhofer-Murray AE, Leonhardt H (2003) Interactions within mammalian DNA methyltransferase family. *BMC Mol Biol* 4:7
- McChlery SM, Clarke SC (2003) The use of hydrolysis and hairpin probes in real-time PCR. *Mol Biotechnol* 25:267-274
- McKinley BP, Michalek AM, Fenstermaker RA i in (2000) The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *J Neurosurg* 93:932-939
- McLendon RE, Halperin EC (2003) Is the long-term survival of patients with intracranial glioblastoma multiforme overstated? *Cancer* 98:1745-1748
- Melnikov AA, Gartenhaus RB, Levenson AS i in (2005) MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 33:e93
- Mineo JF, Quintin-Roue I, Lucas B i in (2002) Glioblastomas: clinical study and search for prognostic factors. *Neurochirurgie* 6:500-509
- Minn H (2005) PET and SPECT in low-grade glioma. *Europ J Radiol* 56:171-178
- Mitchelln P, Ellison DW, Mendelew D (2005) Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics. *Lancet Neurol* 4:413-422
- Mori Y, Kondziolka D, Flickinger JC i in (1998) Stereotactic radiosurgery for cerebral metastatic melanoma: factors affecting local disease control and survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42:581-589
- Morita EK, Rosenblum MK, Bilsky MH i in (1996) Long- term survivors of glioblastoma multiforme: clinical and molecular characteristics. *J Neurooncol* 27:259-266
- Mossakowski MJ, Liberski PP (1997) *Guzy układu nerwowego*. Ossolineum, Wrocław
- Motorin Y, Lyko F, Helm M (2010) 5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions. *Nucleic Acids Res* March 38:1415-1430
- Mukerji N, Wallace D, Mitra D (2006) Audit of the change in the on-call practices in neuroradiology and factors affecting it. *BMC Medical Imaging* 6:1-5
- Nadkarni TD, Menon RK, Desai KI i in (2005) Cerebellar oligodendroglioma in a young adult. *J Clin Neuroscien* 12:837-838
- Nakao M (2001) Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278:25-31
- Nan X, Bird A (2001) The biological functions of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 and its implication in Rett syndrome. *Brain Dev* 23:S32-S37
- Nan X, Cross S, Bird A (1998) Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. *Novartis Found Symp* 214:6-16
- Narayana A, Chang J, Thakur S i in (2007) Use of MR spectroscopy and functional imaging in the treatment planning of gliomas. *Br J Radiol* 80:347-354
- Nathan B (2007) Tissue issues. *Nature* 448: 959-962
- Ng WH, Lim TCC, Tan KK (2006) Disseminated spread of recurrent oligodendroglioma (WHO Grade II). *J Clin Neurosci* 13:602-607
- Nieder C, Grosu AL, Molls M (2000) A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat Rev* 26:397-409

- Nomiya T, Nemoto K, Kumabe T i in (2007) Prognostic significance of surgery and radiation therapy in cases of anaplastic astrocytoma: retrospective analysis of 170 cases. *J Neurosurg* 106:575-581
- Nupponen NN, Joensuu H (2006) Molecular pathology of gliomas. *Curr Diag Pathol* 12:394-402
- Nutt CL, Mani DR, Betensky RA i in (2003) Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 63:1602-1607
- Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M i in (2006) Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagn* 8:209-17
- Ogungbo BI, Najim AD, Mendelow AD i in (2002) Epidemiology of adult brain tumours in Great Britain and Ireland. *Br J Neurosurg* 16:140-145
- Ohgaki H (2005) Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 25:1-7
- Ohgaki H, Kleihues P (2005a) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109:93-108
- Ohgaki H, Kleihues P (2005b) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:479-489
- Okano M, Xie S, Li E (1998) Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 26:2536-2540
- Oliński R, Gackowski D, Foksiński M i in (2002) Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Rad Biol Med* 33:192-200
- Oliński R, Jurgowiak M (1996) Reaktywne formy tlenu - uniwersalny czynnik patogeny? W: Barciszewski J, Łastowski K, Twardowski T (Red.) *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie*. Wydawnictwo Sorus, Poznań, 373-400
- Oliński R, Jurgowiak M (1999a) Oksydacyjne uszkodzenia DNA (8-oksodG) - biomarkerem niektórych chorób człowieka. *Kosmos* 48:329-338
- Oliński R, Jurgowiak M (1999b) Rola reaktywnych form tlenu w procesach mutagenyzy i karcynogenezy. *Post Biochem* 45:50-58
- Oliński R, Siomek A, Rozalski R i in (2007) Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol* 54:11-26
- Olivi A, Grossman SA, Tatter S i in (2003) Dose escalation of carmustine in surgically implanted polymers in patients with recurrent malignant glioma: a New Approaches to Brain Tumor Therapy CNS Consortium trial. *J Clin Oncol* 21:1845-1849
- Oswald J, Engemann S, Lane N i in (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10:475-478
- Pacholska J, Myga M, Goździcka-Józefiak A (2004) Metylacja DNA i jej wpływ na ekspresję genów. W: Koroniak H, Barciszewski J, *Na pograniczu chemii i biologii*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań

- Panning B, Jaenisch R (1996) DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev* 10:1991-2002
- Paprzycki W, Stajgis M, Guzikowska-Ruszkowska I i in (2000) Badanie MR w guzach tylnego dołu czaszki. *Neuroskop* 2:17-44
- Patchell RA (1997) Brain metastases. W: Black PM, Loeffler J (Red.) *Cancer of the nervous system*. Blackwell Science, Cambridge (MA), 653-663
- Patchell RA (2003) The management of brain metastases. *Cancer Treat Rev* 29:533-40
- Patchell RA, Tibbs PA, Walsh JW i in (1990) A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *N Engl J Med* 322:494-500
- Pauleit D, Floeth F, Hamacher K i in (2005) O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl) -L-tyrosine PET combined with MRI improves the diagnostic assessment of cerebral gliomas. *Brain* 128:678-687
- Pennisi E (2001) Behind the scenes of gene expression. *Science* 293:1064-1067
- Peris-Bonet R, Martinez-Garcia C, Latour B i in (2006) Childhood central nervous system tumours - incidence and survival in Europe (1978-1997): Report from Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* 42:2064-2080
- Phuphanich S, Ferrall S, Greenberg H (1993) Long-term survival in malignant glioma. prognostic factors. *J Fla Med Asso* 3:181-184
- Plitta B, Giel-Pietraszuk M, Barciszewski J (2008) Inhibicja metylotransferazy 1 - cel w terapii chorób nowotworowych. *Na pograniczu biologii i chemii* 20:25-250
- Plunkett RJ, Lis A, Barone TA i in (1999) Hormonal effects on glioblastoma multiforme in the nude rat model. *J Neurosurg* 90:1072-1077
- Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE i in (1998) Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 392:559
- Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC i in (1999) Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 43:985-991
- Puzzilli F, Ruggeri A, Mastronardi L i in (1998) Long-term survival in cerebral glioblastoma. Case report and critical review of the literature. *Tumori* 84:69-74
- Quan AL, Videtic GM, Suh JH (2004) Brain metastases in small cell lung cancer. *Oncology (Williston Park)* 18:961-972
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N et al (1999) DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6107-6112
- Razin A, Cedar H (1977) Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:2725-2728
- Razin A, Riggs AD (1980) DNA methylation and gene function. *Science* 210:604-610
- Reeben M, Prydz H (1994) An improved method for detection of 5-methylcytosine by PCR-based genomic sequencing. *Biotechniques* 16:416-417
- Rehman A, Collis C.S, Yang M (1998) The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem Biophys Res Commun* 246:293-298
- Reik W, Dean W (2001) DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* 22:2838-2843

- Reis RM, Herva R, Brandner S i in (2001) Second primary glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:208-215
- Robertson AK, Geiman TM, Sankpal UT i in (2004) Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and Dnmt3a in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 322:110-118
- Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6:597-610
- Robertson KD, Jones PA (2000) DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 21:461-467
- Robertson KD, Wolffe AP (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 1:11-19
- Rolle K, Nowak S, Wyszko E i in (2010) Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi). *Cancer Biol Ther* 9:396-406
- Ross B, Russel RW, Wiles CM (1985) *Neurology*. Year Book Med Publ, Chicago, 94
- Rothberg PG, Ponnuru S, Baker D i in (1997) A deletion polymorphism due to Alu-Alu recombination in intron 2 of the retinoblastoma gene: association with human gliomas. *Mol Carcinog* 19:69-73
- Rousseaux S, Faure AK, Caron C i in (2004) Organisation nucleaire du spermatozoide. *Gynecol Obstet Fertil* 32:785-791
- Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD (1996) *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sabel M, Reifenberger J, Weber RG i in (2001) Long-term survival of a patient with giant cell glioblastoma. Case report. *J Neurosurg* 4:605-611
- Sampson JH, Carter JH Jr, Friedman AH i in (1998) Demographics, prognosis, and therapy in 702 patients with brain metastases from malignant melanoma. *J Neurosurg* 88:11-20
- Saraf-Lavi E, Bowen B.C, Pattany P.M i in (2003) Proton MR spectroscopy of gliomatosis cerebri: case report of elevated myoinositol with normal choline levels. *Am J Neuroradiol* 24:946-951
- Sassaman DM, Dombroski BA, Moran JV i in (1997) Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* 16:37-43
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1412-1417
- Schmidt MC, Antweiler S, Urban N i in (2002) Impact of genotyp and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 4:321-328
- Schouten LJ, Rutten J, Huveneers HA i in (2002) Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer* 94:2698-2705
- Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM i in (1998) Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. *Can J Neurol Sci* 3:197-201
- Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PMA i in (1999) Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A populationbased study. *Ann Neurol* 46:183-188

- Selker RG, Shapiro WR, Burger P i in (2002) The brain tumor cooperative group NIH trial 87-01: a randomized comparison of surgery. external radiotherapy. and carmustine versus surgery. interstitial radiotherapy boost. external radiation therapy. and carmustine. *Neurosurgery* 51:343-357
- Senger D, Cairncross JG, Forsyth PAJ (2003) Long-term survivors of glioblastoma: statistical aberration or important unrecognized molecular subtype? *Cancer J* 9:214-221
- Seock-Im SA, Gomez-Manzano C, Fueyo J i in (1999) Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res* 59:895-900
- Seung SK, Sneed PK, McDermott MW i in (1998) Gamma knife radiosurgery for malignant melanoma brain metastases. *Cancer J Sci Am* 4:103-109
- Shapiro WR (1983) Intracranial neoplasms. W: Rosenberg RN (Red.) *The Clinical Neurosciences*. Churchill Livingstone, New York, 1:233
- Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR i in (1994) Mixed oligoastrocytomas: a survival and prognostic factor analysis. *Neurosurgery* 34:577-582
- Sheehan JP, Sun MH, Kondziolka D i in (2003) Radiosurgery in patients with renal cell carcinoma metastasis to the brain: long-term outcomes and prognostic factors influencing survival and local tumor control. *J Neurosurg* 98: 42-349
- Shinojima N, Kochi M, Hamada J i in (2004) The influence of sex and the presence of giant cells on postoperative long-term survival in adult patients with supratentorial glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 2:219-226
- Shrieve DC, Alexander E, Black PM i in (1999) Treatment of patients with primary glioblastoma multiforme with standard postoperative radiotherapy and radiosurgical boost: prognostic factors and long-term outcome. *J Neurosurg* 1:72-77
- Shrieve DC, Alexander E, Wen PY i in (1995) Comparison of stereotactic radiosurgery and brachytherapy in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme clinical study. *Neurosurgery* 36:275-284
- Singal R, Ginder GD (1999) DNA methylation. *Blood* 93:4059-4070
- Singh PB, Georgatos SD (2002) HP1: Facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol* 140:10-16
- Smith JS, Cha S, Mayo MC i in (2005) Serial diffusion-weighted magnetic resonance imaging in cases of glioma: distinguishing tumor recurrence from postresection injury. *J Neurosurg* 103:428-438
- Smolarek I, Wyszko E, Barciszewska A-M i in (2010) Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension. *Med Sci Monit* 16: CR149-155
- Sneed PK (2002) Metastatic brain tumors. W: Prados MD (Red.) *Brain cancer*. Hamilton (Ontario), BC Decker 375-390
- Sneed PK, Prados MD, McDermott MW i in (1995) Large effect of age on the survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and brachytherapy boost. Clinical study. *Neurosurgery* 36:898-904
- Stupp R, Gander M, Leyvraz S i in (2001) Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *Lancet Oncol* 2:552-560

-
- Stupp R, Reni M, Gatta G i in (2007) Anaplastic astrocytoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 63:72-80
- Stupp R, Van den Bent MJ, Hegi ME (2005) Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5:198-206
- Sulewska A, Niklinska W, Kozlowski M i in (2007) Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. *Folia Histochem Cytobiol* 45:315-324
- Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA (2004) DNA demethylation and cancer: therapeutic implications. *Cancer Lett* 211:133-143
- Tanaka K, Okamoto A (2007) Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorg Med Chem Lett* 17:1912-1915
- Taveras JM (1996) *Neuroradiology*. Williams and Wilkins, Baltimore
- Tindall GT, Cooper PR, Barrow DL (1996) *The Practice of Neurosurgery*. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore
- Ting AH, Jair KW, Suzuki H i in (2004) Mammalian DNA methyltransferase 1. *Cell Cycle* 3:1024-1026
- Tsatas D, Kanagasundaram V, Kayel A i in (2002) EGF receptor modifies cellular responses to hyaluronan in glioblastoma cell lines. *J Clin Neurosci* 9:282-288
- Tweedie S, Charlton J, Clark V i in (1997) Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol Cell Biol* 17:1469-1475
- Tweedie S, Ng HH, Barlow AL i in (1999) Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat Genet* 23:389-390
- Utsuki S, Oka H, Suzuki S i in (2006) Pathological and clinical features of cystic and noncystic glioblastomas. *Brain Tumor Pathol* 23:29-34
- Van der Wiel HJ (1960) Inheretence of glioma. The genetics aspects of cerebral glioma and its relation to status dysraphicus. Elsevier Publ Comp, Amsterdam, Princeton
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD (2010) Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60:166-93
- Venter JC, Adams MD, Myers EW i in (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351
- Vertosick FT, Selker RG (1992) Long-term survival after the diagnosis of malignant glioma: a series of 22 patients surviving more than 4 years after diagnosis. *Surg Neurol* 5:359-363
- Vire E, Brenner C, Deplus R i in (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439:871-874
- Walker DG, Pamphlett R (1999) Prolonged survival and pulmonary metastasis after local cure of glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 6:67-68
- Wallace S (2002) Biological consequences of free radical damaged DNA bases. *Free Rad Biol Med* 33:1-14
- Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH (1998) Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 20:116-117
- Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M (1980) Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* 8:4777-4790

- Weiner HL (1995) The role of growth factor receptors in central nervous system development and neoplasia topic review. *Neurosurgery* 37:179-194
- Wesseling P, Ruiters DJ, Burger PC (1997) Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *J Neurooncol* 32:253-265
- Westphal M, Hilt DC, Bortey E i in (2003) A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neurooncol* 5:79-88
- Whitmore RG, Krejza J, Kapoor GS i in (2007) Prediction of oligodendroglial tumor subtype and grade using perfusion weighted magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 107:600-609
- Willems PWA, van der Sprenkel JW, Tulleken CAF i in (2006) Neuronavigation and surgery of intracerebral tumours. *J Neurol* 253:1123-1136
- Wilson CB (1990) Glioblastoma: the past, the present, and the future. *Clin Neurosurg* 38:32-48
- cyt wg Schiffbauer H, Neuronavigation in Brain Tumor Surgery. Clinical Beta-Phase of the Oulu Neuronavigator Center (2000) Oulu University Library.
<http://herkules oulu.fi/isbn9514252543/html/index.html>
- Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W (2008) Nowotwory złośliwe w Polsce w 2006 roku. Centrum Onkologii Instytut Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa
- Wrensch M, Minn Y, Chew T i in (2002) Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol* 4:278-299
- Wroński M, Arbit E (1999) Resection of brain metastases from colorectal carcinoma in 73 patients. *Cancer* 85:1677-1685
- Wroński M, Arbit E, McCormick B (1997) Surgical treatment of 70 patients with brain metastases from breast carcinoma. *Cancer* 80:1746-1754
- Wroński M, Arbit E, Russo P i in (1996) Surgical resection of brain metastases from renal cell carcinoma in 50 patients. *Urology* 47:187-193
- Wu JC, Santi DV (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J Biol Chem* 262:4778-4786
- Wutz A, Jaenisch R (2000) A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell* 5:695-705
- Wyszko E, Rolle K, Nowak S i in (2008) A multivariate analysis of patients with brain tumors treated with ATN-RNA. *Acta Pol Pharm* 65:677-84
- Xiong Z, Laird PW (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 25:2532-2534
- Yamashita J, Handa H, Iwaki K i in (1980) Recurrence of intracranial meningiomas with special reference to radiotherapy. *Surg Neurol* 14:33-40
- Yoder JA, Soman NS, Verdine GL i in (1997) DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* 270:385-395
- Yokoi K, Kamiya N, Matsuguma H i in (1999) Detection of brain metastasis in potentially operable non-small cell lung cancer: a comparison of CT and MRI. *Chest* 115:714-719
- Yoshikawa K, Kajiwara K, Morioka J i in (2006) Improvement of functional outcome after radical surgery in glioblastoma patients: the efficacy of a navigation-guided fence-post procedure and neurophysiological monitoring. *J Neurooncol* 78:91-97

-
- Yung WK (2000) Temozolomide in malignant gliomas. *Semin Oncol* 27:27-34
- Yung WK, Albright RE, Olson J i in (2000) A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer* 83:588-593
- Zagzag D, Friedlander DR, Margolis B i in (2000) Molecular events implicated in brain tumor angiogenesis and invasion. *Pediatr Neurosurg* 33:49-55
- Zeschnigk M, Böhringer S, Price EA i in (2004) A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Res* 32:e125
- Zhu B, Zheng Y, Angliker H i in (2000) 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res* 28:4157–4165
- Zhu B, Benjamin D, Zheng Y i in (2001) Overexpression of 5-methylcytosine DNA glycosylase in human embryonic kidney cells EcR293 demethylates the promoter of a hormone-regulated reporter gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5031-5036
- Żukiel R, Nowak S (2002) Guzy nowotworowe mózgu w aspekcie wzmożonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego. W: Koroniak H, Barciszewski J (Red.) *Na pograniczu chemii i biologii*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 5:265-287
- Zukiel R, Nowak S, Barciszewska A-M i in (2004) A simple epigenetic method for the diagnosis and classification of brain tumors. *Mol Can Res* 2:196-202
- Zukiel R, Nowak S, Wyszko E i in (2006) Suppression of human brain tumor with interference RNA specific for tenascin-C. *Cancer Biol Ther* 5:1002-1007

12. Streszczenie

Metylacja cytozyny (m^5C) w DNA jest jednym z elementów epigenetycznego mechanizmu kontroli ekspresji genów w komórkach eukariotycznych. 5-metylocytozyna ulega modyfikacji, głównie w wyniku reakcji wolnorodnikowych, czego efektem jest globalne obniżenie m^5C w DNA (hypometylacja). Konsekwencją tego jest zmiana ekspresji genów będących przyczyną nowotworzenia. Zatem analiza całkowitej zawartości m^5C ma duży potencjał diagnostyczny.

Celem badań była analiza poziomu metylacji DNA w tkance nowotworowej mózgu oraz uzyskanie skutecznej metody prognostycznej o wysokim stopniu ufności.

Badałam zawartość 5-metylocytozyny w DNA z tkanek nowotworowych 578 pacjentów operowanych z powodu guza mózgu w Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wyodrębniony DNA poddano hydrolizie, a otrzymane nukleotydy znakowano radioaktywnym fosforem-32. Mieszaninę nukleotydów rozdzielano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Chromatogramy były oceniane za pomocą Phosphoimagera, a ilość m^5C przedstawiana jako stosunek (R) intensywności plamek $[m^5dC \text{ do } m^5dC+dC+dT]*100$.

Analiza uzyskanych wyników wskazuje na wyraźną zależność między złośliwością guzów pierwotnych a poziomem m^5dC , która pozwala na ocenę stopnia złośliwości nowotworu mózgu i porównanie z wynikiem histopatologicznym. Poziom m^5dC w guzach przerzutowych jest zróżnicowany i wydaje się zależeć od pochodzenia nowotworu. Ponadto stwierdzono istotną korelację pomiędzy zawartością m^5dC (R) w DNA krwi obwodowej i tkanek nowotworowych. Na obecnym etapie badań można jednoznacznie stwierdzić, że metoda analizy całkowitej zawartości m^5dC po uszkodzeniu rodnikiem tlenowym ma duży potencjał diagnostyczny i celowe jest jej dalsze rozwijanie.

13. Abstract

Human brain tumours still remain to be a diagnostic and therapeutic challenge for modern medicine. Despite many advanced tools and drugs their detection is too late and the treatment uneffective. We describe a new, simple and reliable method for diagnosis of brain tumours. It is based on thin layer chromatography quantitative determination of 5-methylcytosine (m^5C) in relation to its some damage products of DNA from tumour tissue and blood from brain tumour patients. Currently there are many evidences that oxidative stress through reactive oxygen species (ROS) play an important role in the etiology and progression of a number of human diseases. m^5C along with other basic components of DNA are the targets for ROS what results in the appearance of modified nucleic acid bases. Therefore the analysis of global m^5C amount in DNA, can put a new light on neoplasia.

In addition to the four major nucleosides, 5-methylcytosine has been found in metazoan DNA. This specific DNA methylation is catalysed by different DNA methyltransferases which use S-adenosylmethionine as the substrate. Although the pattern of DNA methylation is stable over cell divisions, it can be edited either by *de novo* methylation or by demethylation. It makes DNA methylation a unique way to encode information and control cellular differentiation and development processes. So, DNA methylation is a central mechanism in epigenetic inheritance. Modified bases along with basic components of DNA are the targets for DNA oxidative damage processes which result in the appearance of new derivatives. They are targets for ROS, which are formed within cells as by-products of normal cellular metabolism. The amount of m^5dC in the genomic DNA can be measured by a wide range of methods designed to yield quantitative and qualitative information on genomic DNA methylation.

DNA was isolated from different cells with a commercial kit and digested with spleen phosphodiesterase II and micrococcal nuclease. DNA digest was labelled with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Separation and identification of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{m}^5\text{dC}$ from other nucleotides was performed with two dimensional cellulose thin layer chromatography. Analysis was made on phosphoimager with Image Quant Software. The amount of m^5dC was calculated as spot intensities ratio of $[\text{m}^5\text{dC}/(\text{m}^5\text{dC}+\text{dC}+\text{dT})] \times 100$ and expressed as R coefficient which gives a quantitative measurement. We have applied this method to the samples taken from brain tumour tissues, part of them combined with blood samples from the same patients.

The R value decreases as the malignancy of brain tumour increases, so it could be a good diagnostic marker not only for brain tumours but also differentiate low and high grade gliomas. Therefore DNA methylation pattern might be a useful tool to give primary diagnosis of brain tumour or could be a marker for early detection of relapse of disease, especially because the R values for the same patients are similar in their blood and brain tumour tissues. The method described is simple, reliable and easy to apply, using a limited amount of the starting material.