

lek. med. Piotr Pawlik

**ANALIZA POLIMORFIZMÓW  
GENÓW KODUJĄCYCH ENZYMY  
OBIEGU AKTYWNEGO METYLU  
W NOWOTWORACH ZŁOŚLIWYCH  
JAJNIKA I BŁONY ŚLUZOWEJ TRZONU MACICY**

**PRACA DOKTORSKA**

Promotor: prof. dr hab. Stefan Sajdak

Klinika Ginekologii Operacyjnej  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

POZNAŃ, 2011 r.

## SPIS TREŚCI

<b>SPIS TREŚCI</b> .....	<b>1</b>
<b>SPIS RYCIN</b> .....	<b>3</b>
<b>SPIS TABEL</b> .....	<b>5</b>
<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	<b>7</b>
<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>9</b>
<b>2. CEL PRACY</b> .....	<b>24</b>
<b>3. MATERIAŁ BADAWCZY</b> .....	<b>25</b>
3.1. Grupa badana.....	25
3.2. Grupa kontrolna.....	28
<b>4. METODY</b> .....	<b>29</b>
4.1. Pobieranie i przechowywanie materiału biologicznego.....	29
4.2. Badania molekularne .....	29
4.2.1 Kryteria wyboru genów i ich wariantów polimorficznych .....	30
4.2.2. Izolacja genomowego DNA z krwi obwodowej.....	32
4.2.3. Amplifikacja fragmentów genów.....	32
4.2.4. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) .....	34
4.2.5. Wysokorozdzielcza analiza temperatury topnienia produktów PCR (ang. High – Resolution Melting, HRM) .....	35
4.2.6. Sekwencjonowanie DNA.....	36
4.2.7. Analiza rozkładu wariantów genów na chromosomach .....	36
4.3. Odczynniki i materiały chemiczne.....	37
4.4. Aparatura.....	37
4.6. Analizy statystyczne .....	38
4.6.1. Wiek .....	38
4.6.2. Badania molekularne .....	38
<b>5. WYNIKI</b> .....	<b>40</b>
5.1. Analiza polimorfizmów genów <i>CBS, MTR, MTHFR, MTRR, MTHFD1, TCN2, BHMT, BHMT, BHMT2, BHMT2</i> w grupie chorych na nowotwory złośliwe jajnika.....	40

5.2. Analiza polimorfizmów genów <i>CBS</i> , <i>MTR</i> , <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> , <i>MTHFD1</i> , <i>TCN2</i> , <i>BHMT</i> , <i>BHMT</i> , <i>BHMT2</i> , <i>BHMT2</i> w nowotworach złośliwych błony śluzowej trzonu macicy.....	45
5.3. Związek haplotypów genów <i>BHMT</i> oraz <i>BHMT2</i> z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika i błony śluzowej trzonu macicy.....	50
<b>6. DYSKUSJA .....</b>	<b>53</b>
<b>7. WNIOSKI .....</b>	<b>60</b>
<b>8. ANEKS .....</b>	<b>61</b>
8.1. Analiza polimorfizmu 844ins68 genu <i>CBS</i> .....	61
8.2. Analiza polimorfizmu rs1805087 genu <i>MTR</i> .....	61
8.3. Analiza polimorfizmu rs1801133 genu <i>MTHFR</i> .....	62
8.4. Analiza polimorfizmu rs2236225 genu <i>MTHFD1</i> .....	62
8.5. Analiza polimorfizmu rs1801198 genu <i>TCN2</i> .....	63
8.6. Analiza polimorfizmu rs7356530 genu <i>BHMT</i> .....	63
8.7. Analiza polimorfizmu rs526264 genu <i>BHMT2</i> .....	64
8.8. Analiza polimorfizmu rs1801394 genu <i>MTRR</i> .....	65
8.9. Analiza polimorfizmu rs3733890 genu <i>BHMT</i> .....	67
8.10. Analiza polimorfizmu rs625879 genu <i>BHMT2</i> .....	70
<b>9. PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>72</b>
<b>10. STRESZCZENIE.....</b>	<b>83</b>
<b>11. SUMMARY .....</b>	<b>85</b>

**SPIS RYCIŃ**

Rycina 1. Substrat i produkt procesu metylacji na przykładzie cytozyny [19].....	16
Rycina 2. Proces wyciszenia genu w mechanizmie metylacji wysp CpG regionu promotorowego .....	17
Rycina 3. Zaburzenia metylacji DNA podczas transformacji nowotworowej .....	18
Rycina 4. Cykl obiegu aktywnego metylu [51] .....	21
Rycina 5. Przykładowa mapa sprzężeń między polimorfizmami genu BHMT .....	30
Rycina 6. Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującego (A) i recesywnym (B) wariantów polimorficznych genów <i>CBS, MTR, MTHFR, MTRR, MTHFD1, TCN2, BHMT, BHMT, BHMT2, BHMT2</i> dla nowotworu złośliwego jajnika, 95% CI – przedział ufności .....	43
Rycina 7. Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującego (A) i recesywnym (B) wariantów polimorficznych genów <i>CBS, MTR, MTHFR, MTRR, MTHFD1, TCN2, BHMT, BHMT, BHMT2, BHMT2</i> dla nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy, 95% CI – przedział ufności .....	49
Rycina 8. Związek haplotypów genów BHMT oraz BHMT2 z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika .....	50
Rycina 9. Związek haplotypów genów BHMT oraz BHMT2 z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy .....	51
Rycina 10. Analiza PCR RFLP polimorfizmu 844ins68 genu <i>CBS</i> .....	61
Rycina 11. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs1805087 genu <i>MTR</i> . .....	61
Rycina 12. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs1801133 genu <i>MTHFR</i> . .....	62
Rycina 13. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs2236225 genu <i>MTHFD1</i> . .....	62
Rycina 14. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs1801198 genu <i>TCN2</i> .....	63
Rycina 15. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs7356530 genu <i>BHMT</i> . .....	63
Rycina 16. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs526264 genu <i>BHMT2</i> . .....	64
Rycina 17. Analiza krzywych topnienia polimorfizmu rs1801394 genu <i>MTRR</i> .....	65
Rycina 18. Analiza pików topnienia DNA polimorfizmu rs1801394 genu <i>MTRR</i> .....	66
Rycina 19. Analiza sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu rs1801394 genu <i>MTRR</i> .....	66
Rycina 20. Analiza krzywych topnienia polimorfizmu rs3733890 genu <i>BHMT</i> . .....	67
Rycina 21. Analiza pików topnienia DNA polimorfizmu rs3733890 genu <i>BHMT</i> .....	68
Rycina 22. Analiza sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu rs3733890 genu <i>BHMT</i> .....	69
Rycina 23. Analiza krzywych topnienia polimorfizmu rs625879 genu <i>BHMT2</i> .....	70

Rycina 24. Analiza pików topnienia DNA polimorfizmu rs625879 genu *BHMT2* ..... 71

Rycina 25. Analiza sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu rs625879  
genu *BHMT2* ..... 71

**SPIS TABEL**

Tabela 1. Stopnie zaawansowania klinicznego nowotworu złośliwego jajnika według FIGO [4].....	10
Tabela 2. Czynniki ryzyka nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy [4] ..	12
Tabela 3. Stopnie zaawansowania klinicznego nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy według FIGO 2009 [4] .....	13
Tabela 4. Stopnie zróżnicowania raka gruczołowego [130] .....	15
Tabela 5 A. Podział chorych z nowotworem złośliwym błony śluzowej trzonu macicy uwzględniający rozpoznanie histopatologiczne .....	26
Tabela 5 B. Podział chorych z nowotworem złośliwym błony śluzowej trzonu macicy uwzględniający stopień zaawansowania klinicznego [według FIGO 2009] .	26
Tabela 6 A. Podział chorych z nowotworem złośliwym jajnika uwzględniający rozpoznanie histopatologiczne .....	27
Tabela 6 B. Podział chorych z nowotworem złośliwym jajnika uwzględniający stopień zaawansowania klinicznego według FIGO 2009 .....	28
Tabela 7. Metoda uzyskiwania danych [opr. własne] .....	29
Tabela 8. Szczegółowa charakterystyka 10 polimorfizmów genów wybranych do analiz.....	31
Tabela 9. Charakterystyka starterów do amplifikacji fragmentów genów .....	33
Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentów genów metodą PCR .....	33
Tabela 11. Profil temperaturowo – czasowy metody PCR.....	34
Tabela 12. Szczegóły analizy RFLP .....	34
Tabela 13. Szczegóły analizy HRM.....	35
Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej metody HRM.....	35
Tabela 15. Profil temperaturowo – czasowy metody HRM.....	36
Tabela 16. Porównanie częstości alleli i genotypów u chorych na nowotwory złośliwe jajnika i w grupie kontrolnej.....	41
Tabela 17. Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującym i recesywnym wariantów polimorficznych genów w nowotworach złośliwych jajnika.....	42
Tabela 18. Analiza interakcji pomiędzy polimorfizmami genów <i>CBS, MTR, MTHFR, MTRR, MTHFD1, TCN2, BHMT, BHMT, BHMT2, BHMT2</i> w nowotworach złośliwych jajnika (metoda MDR) .....	44
Tabela. 19. Porównanie częstości alleli i genotypów u chorych na nowotwory złośliwe błony śluzowej trzonu macicy i w grupie kontrolnej .....	46
Tabela 20. Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującego i recesywnym wariantów polimorficznych genów w nowotworach złośliwych błony śluzowej trzonu macicy .....	47
Tabela 21. Analiza interakcji pomiędzy polimorfizmami genów <i>CBS, MTR, MTHFR, MTRR, MTHFD1, TCN2, BHMT, BHMT, BHMT2, BHMT2</i> w nowotworach złośliwych błony śluzowej trzonu macicy (metoda MDR) .....	48

Tabela 22. Związek haplotypów genów BHMT oraz BHMT2 z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika.....	51
Tabela 23. Związek haplotypów genów BHMT oraz BHMT2 z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy .....	52

### WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ATP	- adenozyntrifosforan
BHMT	- metylotransferaza betaino – homocysteinowa
BHMT2	- metylotransferaza betaino – homocysteinowa 2
C	- cytozyna
CBS	- syntaza $\beta$ - cystationiny
CH <sub>3</sub> -DNA	- zmetylowany kwas dezoksyrybonukleinowy
CI	- przedział ufności, <i>ang. confidence interval</i>
CNP	- polimorfizm liczby kopii, <i>ang. copy number polymorphism</i>
CVC	- krzyżowa walidacja zgodności <i>ang. Cross Validation Consistency</i>
DNA	- kwas dezoksyrybonukleinowy
DMG	- dimetyloglicyna
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy
FIGO	- Międzynarodową Federacją Ginekologów i Położników
g	- gram
HCY	- homocysteina
HRM	- wysokorozdzielcza analiza temperatury topnienia produktów PCR, <i>ang. High- Resolution Melting</i>
HW	- prawo Hardy’ego–Weinberga
MAF	- częstość allelu rzadszego, <i>ang. minor allele frequency</i>
MBPs	- białka zdolne do wiązania grup metylowych <i>ang. methyl – CpG binding proteins</i>
MET	- metionina
Min.	- minimum
Max.	- maximum
MDR	- wieloczynnikowa redukcja wymiarów <i>ang. Multifactor Dimensionality Reduction</i>
MTHFD1	- dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianowa 1 = syntetaza 10-formyloctetrahydrofolianowa



## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

---

MTHFR	- reduktaza metylenotetrahydrofolianowa = reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa
MTR	- syntaza metioninowa = metylotransferaza homocysteionowa
MTRR	- reduktaza syntazy metioninowej = reduktaza metylotransferazy homocysteinowej
OR	- iloraz szans, <i>ang. odds ratio</i>
PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy DNA, <i>ang. polymerase chain reaction</i>
RFLP	- analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych, <i>ang. Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rs	- nr polimorfizmu <i>ang. RefSNP accession ID</i>
SAM	- S – adozynometionina
SMM	- S – metylometionina
SAH	- S-adenozylhomocysteina
SNP	- polimorfizm pojedynczego nukleotydu, <i>ang. single nucleotide polymorphism</i>
T	- tymina
TCN2	- transkobalamina 2
THF	- tetrahydrofolian
5,10-CH <sub>2</sub> -THF	- 5,10-metylenotetrahydrofolian
5-CH <sub>3</sub> THF	- 5-metylotetrahydrofolian
TBA	- ważona dokładność badań <i>ang. Testing Balanced Accuracy</i>
3'UTR	- obszar w genie nieulegający translacji, <i>ang. 3' untranslated region</i>

## 1. WSTĘP

Nowotwory złośliwe stanowią istotny problem zdrowotny i ekonomiczny polskiego społeczeństwa. Mając na uwadze prognozy dotyczące tempa starzenia się populacji problem ten będzie narastał. Według prognoz Światowej Organizacji Zdrowia po roku 2010 śmiertelność spowodowana nowotworami złośliwymi będzie większa niż z powodu chorób układu krążenia, a w 2030 roku liczba zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi ma sięgnąć 11,5 miliona osób [2]. Struktura zachorowań w województwie wielkopolskim podobna jest do zachorowań notowanych w innych krajach Europy Zachodniej [1]. Wielkopolska jest regionem wysokiego ryzyka zachorowania na nowotwory złośliwe. Według standaryzowanej zachorowalności na nowotwory złośliwe u kobiet, spośród 16 województw, Wielkopolska zajmuje miejsce 2, natomiast w przypadku standaryzowanych współczynników umieralności, kobiety zajmują miejsce 7. W województwie wielkopolskim z rozpoznaną w przeciągu ostatnich 5 lat chorobą nowotworową żyje ponad 34000 osób. Zakładając tylko jednoprocenowy wzrost liczby nowych rozpoznań nowotworów oraz stopniowe wydłużanie życia pacjentów, które spowodowane jest wczesną diagnostyką i lepszą skutecznością leczenia każdego roku, liczba pacjentów onkologicznych wzrasta o kilka procent.

U kobiet najczęściej rozpoznawanymi nowotworami narządów płciowych w 2008 roku były: nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy – 7,3%, szyjki macicy – 5,0% oraz jajnika – 5,0%. Zachorowalność na wyżej wymienione nowotwory według Krajowego Rejestru Nowotworów wynosiła odpowiednio 14,4%, 11,2% oraz 10,6% [3]. Największy odsetek zgonów z powodu nowotworów złośliwych narządów płciowych kobiety stanowiły: nowotwór złośliwy jajnika – 38,7 %, szyjki macicy – 31,1% oraz błony śluzowej trzonu macicy – 13,4% [4].

Nowotwór złośliwy jajnika jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u kobiet. Stanowi około 1/3 złośliwych nowotworów narządów płciowych kobiety oraz jest jedną z głównych przyczyn zgonów. Polska należy do krajów o wysokiej zachorowalności na nowotwór złośliwy jajnika. Światowe organizacje epidemiologiczne wykazują stały wzrost zachorowalności. Pomimo rozwoju medycyny, udoskonalenia technik chirurgicznych oraz wprowadzenia nowych protokołów leczenia chemicznego odsetek pięcioletnich przeżyć na świecie nie uległ zmianie i wynosi 48,2% [4]. Główną przyczyną takiego stanu rzeczy jest późne rozpoznawanie choroby, ponieważ aż 75% nowotworów złośliwych jajnika rozpoznawanych jest w zaawansowanych stadiach rozwoju klinicznego

(FIGO III i IV) [5, 6, 7, 8, 9]. Przeżywalność kobiet uzależniona jest od kilku czynników: stopnia zaawansowania nowotworu zgodnego z Międzynarodową Federacją Ginekologów i Położników FIGO z roku 2009 – Tabela 1, typu histopatologicznego, wieku pacjentki, a także od zakresu leczenia operacyjnego i leczenia uzupełniającego.

**Tabela 1. Stopnie zaawansowania klinicznego nowotworu złośliwego jajnika według FIGO [4]**

Stopień	Charakterystyka
I	<p><b>Guz ograniczony do jajników (jednego lub obu):</b></p> <p>Ia – guz ograniczony do jednego jajnika; torebka niezmienniona, nie stwierdza się guza na powierzchni jajnika</p> <p>Ib – guz ograniczony do obu jajników; torebka niezmienniona, nie stwierdza się guza na powierzchni jajnika; brak komórek nowotworowych w płynie otrzewnowym lub popłuczynach z jamy otrzewnowej</p> <p>Ic – guz ograniczony do jednego lub obu jajników oraz jedna z następujących cech: pęknięcie torebki, obecność guza na powierzchni jajnika, obecność komórek nowotworowych w płynie otrzewnowym lub popłuczynach z jamy otrzewnowej</p>
II	<p><b>Guz zajmujący jeden lub oba jajniki z naciekaniem tkanek miednicy</b></p> <p>IIa – guz szerzący się na macicę i/lub przerzuty do macicy i/lub jednego lub obu jajowodów; brak komórek nowotworowych w płynie otrzewnowym lub popłuczynach z jamy otrzewnowej</p> <p>IIb – guz naciekający inne narządy miednicy; brak komórek nowotworowych w płynie otrzewnowym lub popłuczynach z jamy otrzewnowej</p> <p>IIc – naciekanie narządów miednicy (IIa lub IIb) z obecnością komórek nowotworowych w płynie otrzewnowym lub popłuczynach z jamy otrzewnowej</p>
III	<p><b>Guz zajmujący jeden lub oba jajniki z mikroskopowo potwierdzonymi przerzutami do otrzewnej, poza miednicę mniejszą, i/lub przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych</b></p> <p>IIIa – mikroskopowe przerzuty do otrzewnej poza miednicę mniejszą</p> <p>IIIb – makroskopowe przerzuty do otrzewnej poza miednicę mniejszą o wielkości &lt; 2cm w największym wymiarze</p> <p>IIIc – przerzuty do otrzewnej poza miednicę mniejszą o wielkości &gt; 2cm w największym wymiarze i/lub przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych</p>
IV	<p><b>Przerzuty odległe (z wyjątkiem przerzutów do otrzewnej)</b></p>

W początkowym okresie choroby nowotworowej jajnika objawy są niespecyficzne i związane głównie z dolegliwościami ze strony układu pokarmowego. Pacjentki uskarżają się na występowanie bólu o małym nasileniu w miednicy mniejszej, uczucia pełności w jamie brzusznej, utratę apetytu oraz powiększenie obwodu brzucha w krótkim czasie. Identyfikacja wczesnych objawów ma istotne znaczenie kliniczne ponieważ pięcioletnie przeżycie we wczesnych stadiach choroby wynosi 70-90% w porównaniu z 20-30% w stadiach zaawansowanych, a znaczny odsetek rozpoznawany jest w momencie

rozprzestrzenienia się procesu nowotworowego w jamie otrzewnej. Objawy ze strony układu moczowego głównie poliuria, spotykane są w zaawansowanych stadiach rozwoju klinicznego w przypadku lokalizacji guza w przedniej części miednicy mniejszej i jego ucisku na pęcherz moczowy. Charakter nasilenia objawów uzależniony jest od ilości płynu wysiękowego w jamie otrzewnej, wielkości mas nowotworowych, ucisku i ewentualnego naciekania sąsiadujących narządów. Stosunkowo rzadkim objawem jest krwawienie z narządów płciowych, które spowodowane jest zwiększonym wydzielaniem estrogenów i androgenów przez guz nowotworowy lub obecności przerzutów nowotworowych w obrębie trzonu i szyjki macicy lub pochwy. Pomimo wprowadzenia nowoczesnych technik diagnostycznych badanie ginekologiczne pozostaje podstawową i powszechną metodą rozpoznania nowotworu złośliwego jajnika we wczesnym stadium zaawansowania klinicznego. Pozwala ono określić ruchomość przydatków w stosunku do sąsiednich narządów, wielkość i spoistość (odróżnienie zmiany litej sugerującej proces złośliwy od zmiany torbielowatej). Diagnostyka biochemiczna w nowotworze złośliwym jajnika oparta jest na oznaczeniu antygenu CA 125, którego ekspresja związana jest głównie z nowotworami wywodzącymi się z tkanki nabłonkowej, a ze względu na dużą czułość (78 - 85,5%) i swoistość (78,3 - 93%) uznawany jest za najlepszy znany marker, innych niż śluzowe raków jajnika [5, 10, 11]. Nie jest jednak markerem idealnym ponieważ w prawie połowie przypadków u kobiet w I stopniu zaawansowania klinicznego, jego wartość mieści się w granicach normy, a znacznie podwyższony poziom obserwowany jest u pacjentek w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej. Również w wielu chorobach i stanach fizjologicznych mogą występować podwyższone wartości antygenu CA 125 w surowicy krwi, co znacznie utrudnia postawienie jednoznacznego rozpoznania. Należą do nich endometrioza, łagodne torbiele jajników, mięśniaki macicy, zapalenie przydatków, miesiączka czy ciąża w I trymestrze. Ponadto znaczny procent chorych na marskość wątroby, nowotwór trzustki wykazuje podwyższony poziom CA 125. W związku z tym marker ten powinien być wykorzystywany w monitorowaniu przebiegu choroby.

Według najnowszego raportu National Comprehensive Cancer Network z roku 2006 po badaniu ginekologicznym i oznaczeniu w surowicy krwi poziomu antygenu CA 125 standardem u kobiet z podejrzeniem zmian patologicznych w obrębie jajników jest wykonanie badania ultrasonograficznego oraz tomografii komputerowej jamy brzusznej i miednicy mniejszej [4, 12]. Na podstawie powyższych metod diagnostycznych nowotworu złośliwego jajnika nie można ostatecznie rozstrzygnąć o złośliwym charakterze, bez uzyskania wyniku histopatologicznego.

Nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy zajmuje 6 miejsce wśród zachorowań na wszystkie nowotwory złośliwe u kobiet na świecie i drugie po nowotworze złośliwym szyjki macicy pośród nowotworów narządów płciowych kobiety [13]. W Polsce w 2008

roku był najczęściej rejestrowanym nowotworem narządów płciowych – 7,3% [3]. Największa liczba zachorowań na ten nowotwór odnotowywana jest w krajach rozwiniętych, dlatego przypuszczalnie wraz z rozwojem gospodarczym i starzeniem się społeczeństwa ilość kobiet chorujących będzie systematycznie wzrastać. Większość zachorowań i zgonów notuje się w starszych grupach wiekowych, gdzie ponad 90% rozpoznań nowotworu występuje po 50 roku życia. Z kolei u kobiet powyżej 70 roku życia obserwowany jest szybki spadek ryzyka zachorowania. Umieralność na nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy pomimo postępu medycyny od ponad 25 lat utrzymuje się we wszystkich grupach wiekowych na stałym poziomie [3].

Czynnikiem predysponującym do rozwoju nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy jest ekspozycja na estrogeny niezrównoważona działaniem progesteronu. Z taką sytuacją mamy do czynienia u kobiet otyłych, z zespołem policystycznych jajników (cykle bezowulacyjne, brak progesteronu w II fazie cyklu), z menopauzą w późnym wieku i wczesnym pojawieniu się pierwszej miesiączki. Również u pacjentek z nowotworem złośliwym piersi leczonych tamoksifenem, który 6-8 razy zwiększa ryzyko rozwoju tego nowotworu. W rodzinach z zespołem Lynch II i MSH6 nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy jest najczęściej występującym nowotworem u kobiet. Czynniki ryzyka nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy wraz z współczynnikiem ryzyka przedstawiono w Tabeli 2 [4].

**Tabela 2. Czynniki ryzyka nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy [4]**

Czynniki wpływające na ryzyko	Współczynnik ryzyka
Starszy wiek	2-3
Miejsce zamieszkania	3-18
Wyższe wykształcenie	1,5-2
Biała rasa	2
Rodność	3
Niepłodność w przeszłości prokreacyjnej	2-3
Nieregularność cykli miesięczkowych	1,5
Późny wiek naturalnej menopauzy	2-3
Wczesny wiek menarche	1,5-2
Długotrwałe stosowanie dużych dawek estrogenów	10-20
Długotrwałe stosowanie złożonych tabletek antykoncepcyjnych	0,3-0,5
Duża skumulowana dawka tamoksyfenu	3-7
Otyłość	2-5

Zespół Stein-Leventhala lub obecność guza wytwarzającego estrogeny	>5
Cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, schorzenia pęcherzyka żółciowego lub tarczycy	1,3-3
Palenie papierosów	0,5

Do czynników zmniejszających ryzyko wystąpienia nowotworu błony śluzowej trzonu macicy zalicza się liczne ciążę, palenie papierosów (szybsze wystąpienie menopauzy), picie alkoholu (poprzez wpływ na wytwarzanie i metabolizm estrogenów) oraz zwiększenie aktywności fizycznej, która zapobiega otyłości.

W 90% pierwszym i podstawowym objawem sugerującym nowotwór jest nieprawidłowe krwawienie, dlatego na ogół jest rozpoznawany we wczesnych stopniach zaawansowania klinicznego głównie FIGO Ia lub Ib. Aktualnie obowiązująca klasyfikacja stopni zaawansowania nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy według FIGO (2009) przedstawia Tabela 3.

**Tabela 3. Stopnie zaawansowania klinicznego nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy według FIGO 2009 [4]**

Stopień	Charakterystyka
<b>I *</b>	<b>Nowotwór ściśle ograniczony do trzonu macicy</b> Ia* – brak nacieku lub głębokość nacieku obejmuje < 50% mięśniówki Ib* – naciek obejmuje ≥ 50% mięśniówki
<b>II</b>	<b>Nowotwór nacieka podścielisko szyjki macicy, ale nie wychodzi poza macicę **</b>
<b>III</b>	<b>Lokalne i/lub miejscowe naciekanie</b> IIIa – rak nacieka surowicówkę macicy i/lub przydatki IIIb – przerzuty do pochwy i/lub przymacic IIIc – przerzuty do węzłów miednicy i/lub węzłów okołoaortalnych IIIc1* - zajęte węzły chłonne miednicy IIIc2* - zajęte węzły chłonne około aortalne z zajętymi lub nie węzłami chłonnymi miednicy
<b>IV</b>	<b>Naciek pęcherza moczowego i/lub śluzówki odbytnicy i/lub odległe przerzuty</b> IVa – naciek pęcherza moczowego i/lub śluzówki odbytnicy IVb – przerzuty odległe, obejmujące przerzuty do narządów jamy brzusznej i/lub węzłów chłonnych pachwinowych

Dodatni wynik cytologii otrzewnowej nie zmienia klasyfikacji, powinien być jednak odnotowany.

\* stopnie zróżnicowania histologicznego G1, G2, G3

\*\*naciekanie jedynie gruczołów szyjkowych powinno być klasyfikowane jako stopień I

Badania kliniczno - patologiczne, immunohistochemiczne i molekularno - genetyczne pozwoliły na wyodrębnienie dwóch odmiennych pod względem patogenezy typów nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy. Typ I stanowiący 80% przypadków – rak estrogenozależny, którego rozwój poprzedza najczęściej rozrost atypowy endometrium, a tkanka nowotworowa charakteryzuje się ekspresją dla receptorów estrogenowych i progesteronowych [13, 14, 15]. Ten typ raka dotyczy głównie kobiet w okresie około i pomenopauzalnym charakteryzujących się specyficznym fenotypem najczęściej otyłych z nadciśnieniem tętniczym oraz towarzyszącą cukrzycą typu II. W tej grupie pacjentek ocena materiału tkankowego uzyskanego po zabiegu chirurgicznym wykazuje mutacje w genach K-ras, inaktywację genu supresorowego PTEN oraz niestabilność mikrosatelitarną, spowodowaną metylacją promotora genu MLH1. Typ estrogenozależny diagnozowany jest najczęściej w I stadium zaawansowania klinicznego, jego rokowanie jest dobre, a 5-letnie przeżycie wynosi prawie 90%. Leczenie polega na leczeniu operacyjnym oraz w zależności od stopnia zaawansowania, zastosowania radioterapii. W przypadku pojawienia się nawrotu leczeniem z wyboru jest podawanie gestagenów.

Typ II nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy jest rzadszy i stanowi około 10%. Charakteryzuje się większą agresywnością i w przeciwieństwie do typu I nie wykazuje ekspresji dla receptorów estrogenowych i progesteronowych. Rozwijają się na podłożu atroficznej błony śluzowej trzonu macicy niezależnie od nadmiernej stymulacji przez estrogeny i dotyczy głównie kobiet w okresie pomenopauzalnym. Rozpoznawany jest w późniejszych stopniach zaawansowania dlatego też charakteryzuje się gorszym rokowaniem. Ten typ związany jest przede wszystkim z mutacją w obrębie genu p53. Obserwowana jest również amplifikacja genu HER2/neu oraz inaktywacja genu p16 [13, 16]. Ten typ nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy wymaga leczenia operacyjnego oraz uzupełniającego z zastosowaniem chemioterapii.

Przeżywalność kobiet, u których rozpoznano nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy, podobnie jak w nowotworze złośliwym jajnika, uzależniona jest od stopnia zaawansowania klinicznego, stopnia zróżnicowania histologicznego oraz obecności receptorów estrogenowych i progesteronowych. Stopnie zróżnicowania raka gruczołowego endometrium przedstawiono w Tabeli 4.

**Tabela 4. Stopnie zróżnicowania raka gruczołowego [130]**

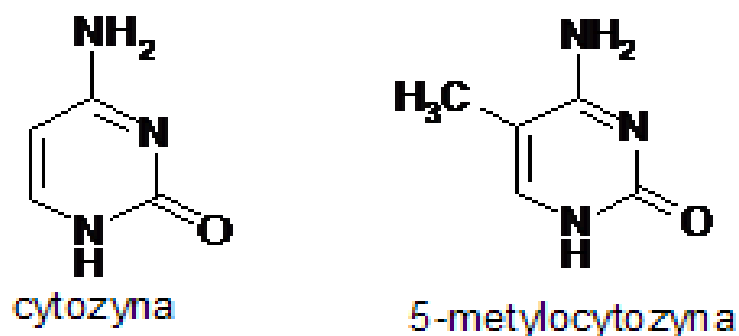
<b>G1</b>	5% lub mniej komórek nienabłonkowych lub komórek utkania raka litego
<b>G2</b>	6 – 50% komórek nienabłonkowych lub komórek utkania raka litego
<b>G3</b>	więcej niż 50 %komórek nienabłonkowych lub komórek utkania raka litego

Nowotwory złośliwe narządów płciowych kobiet stanowią istotny i narastający problem zdrowotny. Prowadzone na całym świecie badania wielośrodkowe mają na celu poszukiwanie nowych czynników prognostycznych, rokowniczych, a przede wszystkim patogenetycznych procesu karcinogenezy.

Nowotworzenie jest złożonym i wieloetapowym procesem zależnym od wielu czynników, polegającym na przekształceniu komórki prawidłowej w nowotworową. Transformacja nowotworowa może być wynikiem mutacji prowadzących do zmian w DNA komórki, a tym samym zmian w funkcjonowaniu określonych genów i kodowanych przez nie produktów białkowych istotnych dla rozwoju nowotworu, takich jak geny supresorowe czy onkogeny. W procesie transformacji nowotworowej istotne znaczenie mają również zmiany w samej regulacji transkrypcji i translacji genów [17]. Ostatnio wiele uwagi poświęca się zmianom epigenetycznym, które odpowiadają za regulację ekspresji genów bez wpływu na sekwencję nukleotydów. Są to zjawiska odwracalne pod wpływem działania substancji chemicznych. Wyróżnia się dwa podstawowe procesy epigenetyczne: modyfikacje ekspresji genu poprzez metylację DNA oraz przebudowę chromatyny polegającą na zmianach w obrębie białek histonowych [17, 18].

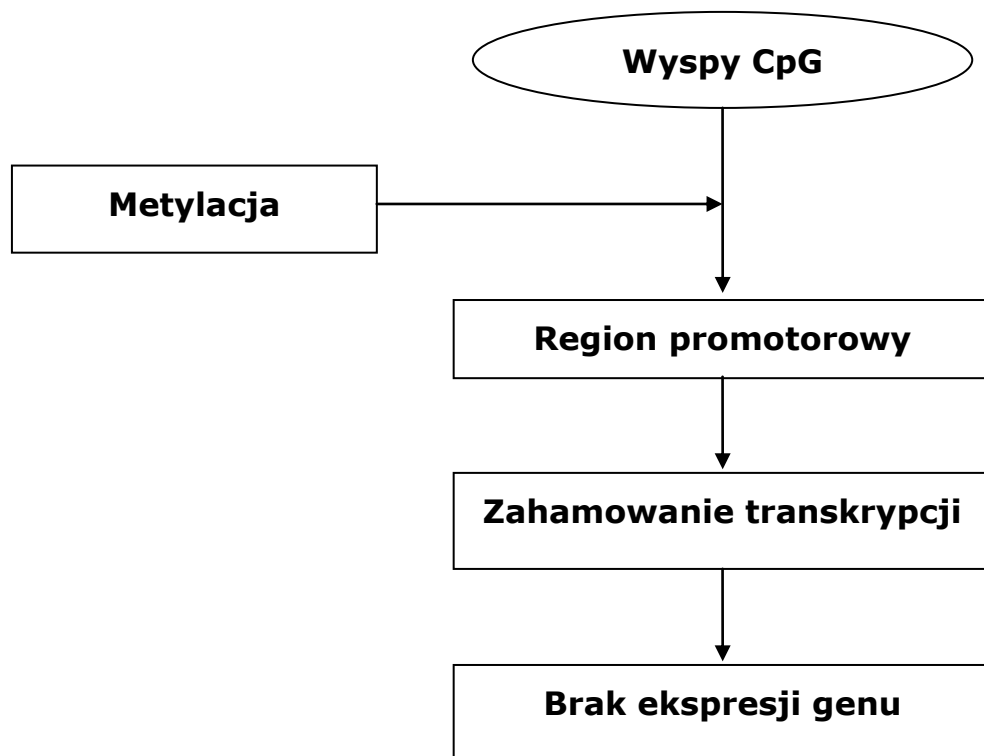
Proces metylacji DNA jest niezbędny do prawidłowego rozwoju komórek i zachodzi podczas różnicowania się komórek, inaktywacji chromosomu X, piętnowania genomowego, programowanej śmierci komórki oraz kontroli cyklu komórkowego. Proces metylacji jest to enzymatyczna, poreplikacyjna, endogenna modyfikacja DNA polegająca na kowalencyjnym przyłączeniu grup metylowych (-CH<sub>3</sub>) do zasad azotowych nukleotydów [19]. W procesie tym uczestniczą enzymy przenoszące grupy metylowe – metylotransferazy. Najczęściej w wyniku procesu metylacji powstaje 5-metylocytozyna co przedstawiono na Rycinie 1.





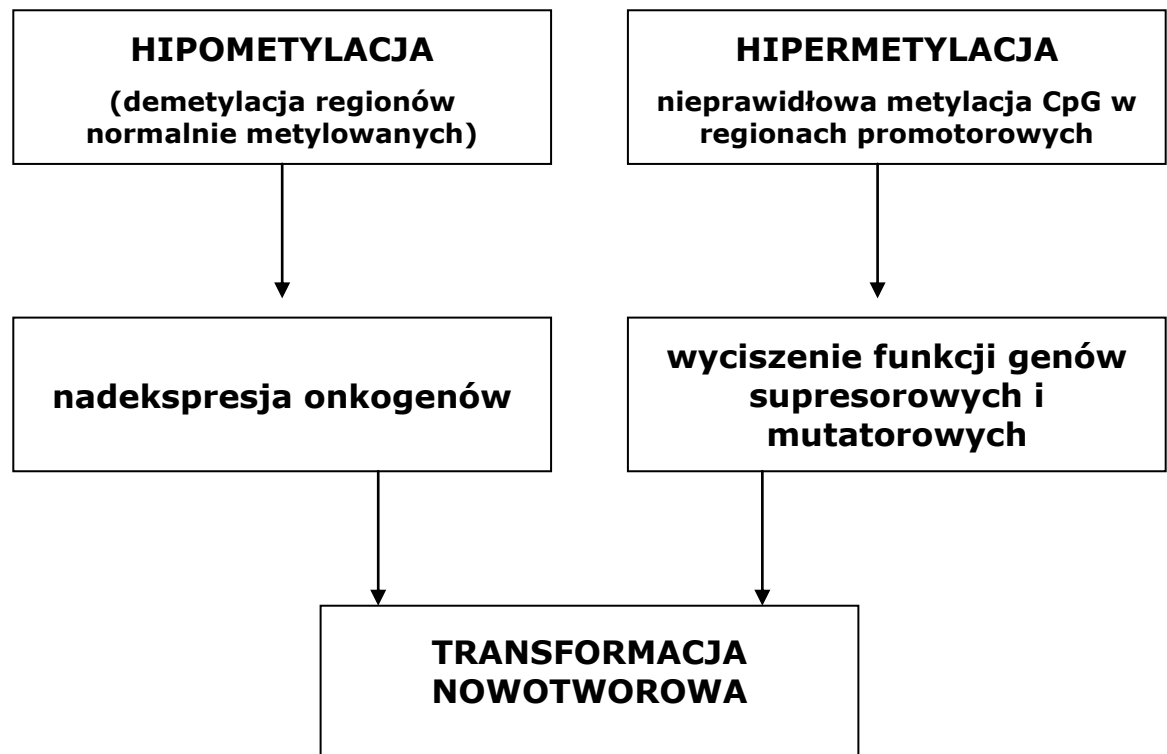
**Rycina 1. Substrat i produkt procesu metylacji na przykładzie cytozyny [19]**

Krótkie odcinki DNA (1000 – 1500 pz) bogate w dinukleotydy CpG (cytozyna + guanina) tworzą tzw. wyspy CpG. Poziom ekspresji danego genu jest ściśle skorelowany z poziomem metylacji właśnie wysp CpG, szczególnie w regionie promotorowym. Około połowa ludzkich genomów zawiera wyspy CpG: są to tzw. *housekeeping genes* (niezbędne do funkcjonowania komórki) i specyficzne tkankowe geny stanowiące około 40% wszystkich tkankowych genów [19, 20]. Skutkiem obecności zmetylowanych dwunukleotydów CpG na końcu 5' w regionach promotorowych jest zahamowanie transkrypcji, brak ekspresji odpowiadających im genów oraz utrata funkcji odpowiednich produktów tych genów. Zjawisko to opisywane jest jako wyciszenie genu w procesie metylacji i przedstawione zostało na Rycinie 2. W ludzkim genomie około 70% dwunukleotydów CpG ma grupę metylowa przyłączoną do cytozyny [18]. Ułatwia to zmianę struktury chromatyny genów powodując ich niedostępność dla komórkowych układów transkrypcyjnych [17, 19]. Z kolei brak metylacji w regionie promotorowym jest warunkiem wstępnym dla kontrolowanej i aktywnej transkrypcji genów [19].



**Rycina 2. Proces wyciszenia genu w mechanizmie metylacji wysp CpG regionu promotorowego [17]**

Pojawienie się nieprawidłowości w przebiegu metylacji DNA może prowadzić do rozwoju choroby nowotworowej. Podczas procesu karcinogeny mogą występować dwa główne zaburzenia tego procesu. Z jednej strony zmniejszenie metylacji DNA (hipometylacja) regionów normalnie zmetylowanych, a drugiej nieprawidłowa metylacja (hipermetylacja) wysp CpG, które w prawidłowym genomie nie ulegają metylacji [17]. Zaburzenia metylacji DNA podczas transformacji nowotworowej przedstawia Rycina 3.



**Rycina 3. Zaburzenia metylacji DNA podczas transformacji nowotworowej [17]**

Hipometylacja regionów promotorowych onkogenów prowadzi do ich nadekspresji, co skutkuje nadmierną i niekontrolowaną proliferacją komórkową [17]. Onkogeny są uszkodzonymi protoonkogenami, których mutacje (punktowe, translokacje czy amplifikacje) prowadzą do nadmiernej aktywności mitotycznej, niezależnej od docierających do komórki sygnałów zewnątrzkomórkowych. Jest to podstawowa cecha komórek nowotworowych, których prawidłowe produkty ograniczają tempo podziałów komórkowych i zapobiegają przekazywaniu błędów genetycznych komórkom potomnym. Należą do nich geny, np. p16, p15, GSTP1, p53, APC czy BRCA1. Geny supresorowe tworzą tak zwane punkty restrykcyjne cyklu komórkowego, w których wykrywają uszkodzenia DNA. Powoduje to natychmiastowe zatrzymanie cyklu komórkowego przed wejściem w fazę S, w której dochodzi do syntezy DNA, i uruchomienia procesów naprawczych. W przypadku niewielkich błędów DNA geny supresorowe powodują wydłużenie fazy G1, w której komórka przygotowuje się do procesu replikacji i umożliwiają naprawę materiału genetycznego. Odpowiadają za to geny mutatorowe, których produkty białkowe są zdolne do rozpoznawania, naprawy lub usunięcia uszkodzonego fragmentu nici kwasu deoksyrybonukleinowego. W przypadku zbyt dużych błędów DNA geny

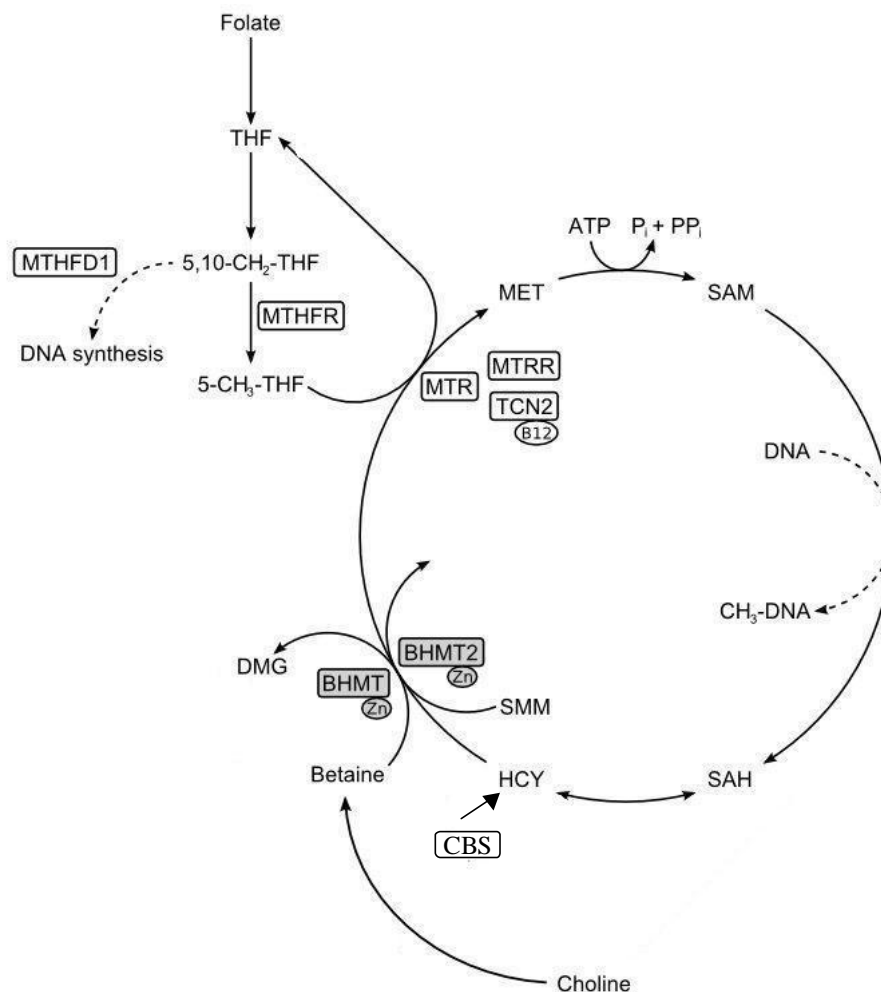
supresorowe uruchamiają proces apoptozy komórki. Istotnym zagadnieniem jest fakt, iż ujawnienie fenotypu nowotworowego wymaga inaktywacji obu alleli genów supresorowych, gdyż wykazują one recesywny efekt działania. To znaczy, że jeden prawidłowy allel genu supresorowego wystarczy do utrzymania jego prawidłowej funkcji, o czym mówi teoria Knudsona. Dla przykładu hipermetylacja genu supresorowego p16 (inhibitor kinazy cyklozależnej) przyczynia się do nowotworowej proliferacji komórek w nowotworach złośliwych prawie wszystkich narządów – w guzach piersi, mózgu, pęcherza moczowego, jelita grubego, płuc, jajników, macicy i w chłoniakach. W literaturze opisywane są 2 prawdopodobne mechanizmy hamowania transkrypcji przez zmetylowane geny. Pierwszy z nich wymaga obecności tzw. czynników transkrypcyjnych metylowrażliwych, które są zdolne do wiązania się tylko z niezmetylowanymi promotorami genów, co uruchamia transkrypcję. Nie wiążą się one natomiast z promotorami genów, w których występują zmetylowane grupy CpG [17, 21]. Drugi mechanizm dotyczy białek zdolnych do wiązania grup metylowych, zwanych MBPs (*ang. metyl – CpG – binding proteins*). Związanie tych białek ze zmetylowanym promotorem genu prowadzi do uaktywnienia procesu deacetylacji histonów, co w rezultacie prowadzi do kondensacji chromatyny i ograniczenia procesu transkrypcji [17, 21, 22].

Hipermetylacja przyczynia się również do zwiększenia występowania mutacji punktowych wysp CpG C > T, ponieważ 5-metylo-cytosyna jest bardziej skłonna do deaminacji w tyminę niż cytosyna niezmetylowana [17]. Również zjawisko naciekania nowotworowego ma związek z hipermetylacją. Hipermetylacja genów kodujących cząsteczki adhezyjne, takie jak CDH1 (E – kadheryny) zwiększa tendencję do naciekania okolicznych tkanek przez nowotwory złośliwe pochodzenia nabłonkowego [17].

Określone zmiany epigenetyczne mogą być specyficzne dla określonych typów nowotworów. Do tej pory w badaniach nad nowotworami złośliwymi narządów rodnych wykazano wiele genów o zaburzonej metylacji. U kobiet z nowotworem złośliwym jajnika częściej niż u kobiet zdrowych występuje epigenetyczna inaktywacja genów supresorowych NERGR1, LSAMP, OPCML, MINT 25, DCR1 czy BRCA1 [23, 24, 25]. Zmiany epigenetyczne genu BRCA1, oprócz opisywanych mutacji [26], występują również w nowotworach piersi i jelita grubego [27]. W nowotworze złośliwym szyjki macicy opisano zaburzenia metylacji w genach p16, DAPK, MGMT, E – kadheryna czy RAR –  $\beta$  [28, 29], a w nowotworze złośliwym błony śluzowej trzonu macicy genu hMLH1 [27]. Hipermetylacja genu MLH1, a także APC, MGMT, PTEN i RASSF1A jest częstsza w typie I niż w typie II nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy. Inne nowotwory w których opisywane są zaburzenia zjawisk epigenetycznych to rak jelita grubego, płuc, stercza i glejak wielopostaciowy [17].

Zjawiska epigenetyczne, pomimo że są trudne do jednoznacznego zdefiniowania i nie ma pewności co do ich mechanizmów mają potencjalnie duże znaczenie kliniczne [17]. Zaburzenia metylacji mogą stać się markerami biologicznymi przydatnymi zarówno dla wykrycia początkowych faz rozwoju nowotworu, oceny jego agresywności, określenia typu guza [17], a przede wszystkim dokładnej oceny ryzyka wystąpienia określonego nowotworu w przyszłości [17, 30, 31]. Ponadto ze względu na odwracalność procesów epigenetycznych można by traktować je jako cele terapeutyczne [18].

Przyczynami nieprawidłowego procesu metylacji są zaburzenia metabolizmu związków, które są donorami grup metylowych do procesu metylacji DNA. Chodzi tu o nieprawidłową lub zmniejszoną aktywność enzymów obiegu aktywnego metylu, która jest związana z występowaniem określonych wariantów polimorficznych genów kodujących te enzymy (*ang. single nucleotide polymorphism, SNP*). Istotą obiegu aktywnego metylu jest pozyskiwanie S – adenozyometioniny (SAM), która jest głównym donorem grup metylowych do procesu metylacji. Substratami do omawianego cyklu reakcji są dostarczane z pożywieniem - kwas foliowy, cholina i S – metylometionina (SMM, witamina U). Niedobór tych substancji może stanowić kolejną przyczynę zaburzeń procesu metylacji DNA. Kofaktorami reakcji w obiegu aktywnego metylu są witamina B12 i cynk. Cykl obiegu aktywnego metylu przedstawia Rycina 4.



**Rycina 4. Cykl obiegu aktywnego metylu [51]**

- |  |   |
|--|---|
| <b>THF</b> (tetrahydrofolian);   | <b>5,10-CH<sub>2</sub>-THF</b> (5,10-metylenotetrahydrofolian);   |
| <b>5-CH<sub>3</sub>THF</b> (5-metylotetrahydrofolian);   | <b>MET</b> (metionina);   |
| <b>SAM</b> (S-adenozylometionina);   | <b>SAH</b> (S-adenozylhomocysteina);  |
| <b>HCY</b> (homocysteina);   | <b>DMG (dimetyloglicyna);</b>   |
| <b>SMM</b> (S-metylomietionina = witamina U);  | <b>MTHFD1</b> (dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianowa 1 = syntetaza 10-formylo-tetrahydrofolianowa); |
| <b>MTHFR</b> (reduktaza metylenotetrahydrofolianowa = reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa); | <b>MTR</b> (syntetaza metioninowa = metylotransferaza homocysteionowa);                                 |
| <b>MTRR</b> (reduktaza syntazy metioninowej = reduktaza metylotransferazy homocysteinowej);        | <b>TCN2</b> (transkobalamina 2);  |
| <b>BHMT</b> (metylotransferaza betaino – homocysteinowa);  | <b>BHMT2</b> (metylotransferaza betaino – homocysteinowa 2);  |
| <b>CBS</b> (syntetaza β- cystationiny);  | <b>ATP</b> (adenozynotrifosforan);  |
| <b>DNA</b> (kwas dezoksyrybonukleinowy),   | <b>CH<sub>3</sub>-DNA</b> (zmetylowane DNA)   |

Kluczowymi enzymami obiegu aktywnego metylu są: MTHFR (reduktaza metylenotetrahydrofolianowa), MTHFD1 (dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianowa 1), MTR (syntaza metioninowa), MTRR (reduktaza syntazy metioninowej), TCN2 (transkobalamina 2), BHMT (metylotransferaza betaino – homocysteinowa), BHMT2 (metylotransferaza betaino – homocysteinowa 2) oraz CBS (syntaza  $\beta$  - cystationiny).

MTHFR katalizuje konwersję 5,10 metylenotetrahydrofolianu do 5-metylenotetrahydrofolianu, kosubstratu w procesie remetylacji homocysteiny do metioniny. Najczęściej badany polimorfizm genu MTHFR jest polimorfizm rs1801113 (677C>T). Jest to polimorfizm funkcjonalny, czyli wpływający na funkcję kodowanego białka. Nosicielstwo genotypu TT wiąże się z występowaniem termolabilnego wariantu białka MTHFR o obniżonej aktywności do około 30 %, a genotypu CT do 60 % aktywności w porównaniu do genotypu CC [26, 32, 33, 34]. Obniżona aktywność tego enzymu skutkuje zaburzeniem metylacji DNA oraz hiperhomocysteinemią, która jest uznanym czynnikiem ryzyka chorób serowo – naczyniowych, chorób neurodegeneracyjnych, migreny, zagrożenia poronieniem oraz niektórych nowotworów [35, 36, 37, 38, 39, 40]. Do tej pory wykazano związek opisywanego polimorfizmu z ryzykiem zachorowania na nowotwór jelita grubego, prostaty, przełyku, szyjki macicy, piersi, jajnika i błony śluzowej trzonu macicy [41, 42, 43, 44].

MTHFD1 jest enzymem katalizującym reakcję konwersji 5,10-dimetylotetrahydrofolianu do 10-formylotetrahydrofolianu oraz jego pochodnych. Produkty te są substratami do syntezy zasad nukleotydowych i biosyntezy DNA. Nie pojawiły się do tej pory publikacje potwierdzające związek polimorfizmów tego genu z procesem karcinogenezy, ale wykazano związek ze zwiększonym ryzykiem odklejenia łożyska w ciąży, poronień oraz wystąpienia wad cewy nerwowej [45].

MTR katalizuje reakcję konwersji homocysteiny i tetrahydrofolianu do metioniny przy udziale witaminy B<sub>12</sub>. Zaburzenia aktywności tego enzymu mogą prowadzić do niedokrwistości megaloblastycznej, hiperhomocysteinemii oraz zwiększonego ryzyka zachorowania na chłoniaki [46]. MTRR z kolei jest niezbędny do prawidłowego działania MTR, ponieważ katalizuje reakcję reaktywacji tego enzymu [46]. Wykazano, że obniżona aktywność tego enzymu, uwarunkowana wariantami polimorficznymi genu MTR, ma związek ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, raka piersi i dróg moczowych [47, 48].

BHMT jest enzymem zależnym od cynku i katalizuje jedną z dwóch głównych reakcji remetylacji homocysteiny, gdzie grupa metylowa pozyskiwana jest z utlenowanej formy cholin – betainy. Wykazano, że BHMT jest odpowiedzialny za więcej niż połowa reakcji remetylacji homocysteiny [49]. Alternatywną reakcją remetylacji homocysteiny

katalizuje metalloenzym BHMT2, w której donorem grupy metylowej jest SMM, zwany witaminą U. Badania wariantów polimorficznych genu BHMT prowadzone były do tej pory głównie nad nowotworem złośliwym szyjki macicy i piersi. Wykazano, że osoby posiadające genotyp GG uwarunkowany polimorfizmem rs3733890 mają półkrotnie zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwór złośliwy szyjki macicy. Gen BHMT2 jest najmniej poznany z całej grupy genów kodujących enzymy obiegu aktywnego metylu. Jak dotąd znaleziono ponad 30 różnych wariantów polimorficznych tego genu, ale niewiele wiadomo o ich funkcjonalności. Do tej pory nie stwierdzono związku polimorfizmów genu BHMT2 z nowotworami złośliwymi, ale wykazano, że genotyp warunkowany jego polimorfizmem jest czynnikiem ochronnym przed rozwojem rozszczepu wargi i podniebienia w populacji polskiej [50].

Zaburzenia procesu metylacji związane z nieprawidłowym procesem obiegu aktywnego metylu są jedną z głównych przyczyn karcinogenezy. Dlatego też analiza polimorfizmów genów kodujących enzymy obiegu aktywnego metylu u chorych na nowotwory złośliwe jajnika i błony śluzowej trzonu macicy wydaje się być konieczna do określenia genetycznych czynników ryzyka rozwoju tych nowotworów, a także przebiegu i oceny rokowania. Uzyskane wyniki pozwoliłyby na poznanie mechanizmów molekularnych zachodzących we wczesnych okresach nowotworu i stworzyłyby perspektywy dla lepszej diagnostyki tych nowotworów oraz nowych strategii terapeutycznych.



### **2. CEL PRACY**

Celem pracy jest analiza związku 10 wybranych polimorfizmów genów kodujących enzymy obiegu aktywnego metylu: - CBS (844ins68), MTR (rs1805087), MTHFR (rs1801133), MTRR (rs1801394), MTHFD1 (rs2236225), TCN2 (rs1801198), BHMT (rs7356530), BHMT (rs3733890), BHMT2 (rs526264), BHMT2 (rs625879) z ryzykiem zachorowania na nowotwory złośliwe jajnika i błony śluzowej trzonu macicy w grupie kobiet należących do populacji polskiej.

### **3. MATERIAŁ BADAWCZY**

#### **3.1. Grupa badana**

Badaniami została objęta grupa 136 pacjentek z potwierdzonym histopatologicznie nowotworem złośliwym jajnika oraz grupa 86 pacjentek z potwierdzonym histopatologicznie nowotworem złośliwym błony śluzowej trzonu macicy diagnozowanych i leczonych w Klinice Ginekologii Operacyjnej i Klinice Onkologii Ginekologicznej Katedry Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2009 - 2011.

Badania histopatologiczne wykonywane były w Zakładzie Patomorfologii Ginekologiczno - Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu.

Badania molekularne zostały wykonane w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr 193/10).

Pacjentki z nowotworem złośliwym błony śluzowej trzonu macicy ( $n = 86$ , średnia wieku  $63,20 \pm 9,94$  lat<sup>1</sup>) zakwalifikowano do 10 grup uwzględniając rozpoznanie histopatologiczne nowotworu: Adenocarcinoma serosum endometrii ( $n=1$ ), Adenocarcinoma endometrioides endometrii ( $n=56$ ), Adenocarcinoma clarocellulare ( $n=4$ ), Adenocarcinoma clarocellulare partim endometrioides endometrii ( $n=4$ ), Carcinoma undifferentiatum endometrii ( $n=7$ ), Carcinoma solidum undifferentiatum endometrii ( $n=5$ ), Carcinoma solidum undifferentiatum partim adenocarcinoma endometrii ( $n=6$ ), Adenocarcinoma endometrioides partim papillare endometrii ( $n=3$ ).

Określano również stopień zaawansowania nowotworu zgodnie z Międzynarodową Federacją Ginekologów i Położników (FIGO) z 2009 r., której zasady zostały przedstawione we Wstępie. Szczegółowa charakterystyka kliniczna chorych na nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy została przedstawiona w tabeli 5 A i 5 B.

---

<sup>1</sup> wartość średnia z odchyleniem standardowym

**Tabela 5 A. Podział chorych z nowotworem złośliwym błony śluzowej trzonu macicy uwzględniający rozpoznanie histopatologiczne**

<b>Rozpoznanie histopatologiczne</b>	<b>n = 86</b>
Adenocarcinoma serosum endometrii	1 (1,16%)
Adenocarcinoma endometrioides endometrii	56 (65,12%)
Adenocarcinoma clarocellulare	4 (4,65%)
Adenocarcinoma clarocellulare partim endometrioides endometrii	4 (4,65%)
Carcinoma undifferentiatum endometrii	7 (8,14%)
Carcinoma solidum undifferentiatum endometrii	5 (5,81%)
Carcinoma solidum undifferentiatum partim adenocarcinoma endometrii	6 (6,98%)
Adenocarcinoma endometrioides partim papillare endometrii	3 (3,49%)

n – liczba chorych, w nawiasach podano odsetek chorych w danej grupie

**Tabela 5 B. Podział chorych z nowotworem złośliwym błony śluzowej trzonu macicy uwzględniający stopień zaawansowania klinicznego [według FIGO 2009]**

<b>Stopień zaawansowania klinicznego zgodny z FIGO</b>	<b>n = 86</b>
<b>I</b>	44 (51,16%)
<b>II</b>	34 (39,54%)
<b>III</b>	8 (9,30%)
<b>IV</b>	0 (0%)

n – liczba chorych, w nawiasach podano odsetek chorych w danej grupie

Pacjentki z nowotworem złośliwym jajnika (n = 136, średnia wieku 56,90 ± 10,44 lat) zakwalifikowano do 9 grup uwzględniając rozpoznanie histopatologiczne nowotworu: Adenocarcinoma serosum (n=51), Adenocarcinoma (n=37), Adenocarcinoma clarocellulare (n=16), Carcinoma solidum adenoides partim mucocellulare (n=1), Carcinoma solidum (n=17), Adenocarcinoma clarocellulare (n=4), Cystadenocarcinoma papillare solidum (n=8), Cystadenocarcinoma papillare probabilliter endometroides (n=1), Adenofibroma malignisans (n=1). Określano również stopień zaawansowania nowotworu zgodnie z Międzynarodową Federacją Ginekologów i Położników (FIGO) z 2009 r., której zasady zostały przedstawione we Wstępie. Szczegółowa charakterystyka kliniczna chorych na nowotwór złośliwy jajnika została przedstawiona w tabeli 6 A i 6 B.

**Tabela 6 A. Podział chorych z nowotworem złośliwym jajnika uwzględniający rozpoznanie histopatologiczne**

Rozpoznanie histopatologiczne	n = 136
Adenocarcinoma serosum	51 (37,5%)
Adenocarcinoma	37 (27,2%)
Adenocarcinoma clarocellulare	16 (11,3%)
Carcinoma solidum adenoides partim mucocellulare	1 (0,7%)
Carcinoma solidum	17 (12,5%)
Adenocarcinoma clarocellulare	4 (2,9%)
Cystadenocarcinoma papillare solidum	8 (5,9%)
Cystadenocarcinoma papillare probabilliter endometroides	1 (0,7%)
Adenofibroma malignisans	1 (0,7%)

n – liczba chorych, w nawiasach podano odsetek chorych w danej grupie

**Tabela 6 B. Podział chorych z nowotworem złośliwym jajnika uwzględniający stopień zaawansowania klinicznego według FIGO 2009**

Stopień zaawansowania klinicznego zgodny z FIGO	n = 136
<b>I</b>	38 (27,94%)
<b>II</b>	28 (20,59%)
<b>III</b>	44 (32,35%)
<b>IV</b>	26 ( 19,12%)

n – liczba chorych, w nawiasach podano odsetek chorych w danej grupie

### **3.2. Grupa kontrolna**

Grupę kontrolną do badań genetycznych stanowiły pacjentki (n = 161, średnia wieku  $55,6 \pm 9,00$  lat) diagnozowane w Klinice Ginekologii Operacyjnej Katedry Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2009 – 2011, u których po badaniu ginekologicznym i ultrasonograficznym wykluczono zmiany mogące sugerować proces złośliwy.

## **4. METODY**

### **4.1. Pobieranie i przechowywanie materiału biologicznego**

Krew pobierano z żyły odłokciowej w ilości 5 ml (1 probówka 5 ml z EDTA). Do czasu oznaczeń materiał przechowywano w temperaturze – 20 °C.

### **4.2. Badania molekularne**

W Tabeli 7 przedstawiono schematycznie kolejne kroki procedury badań molekularnych.

**Tabela 7. Metoda uzyskiwania danych [opr. własne]**

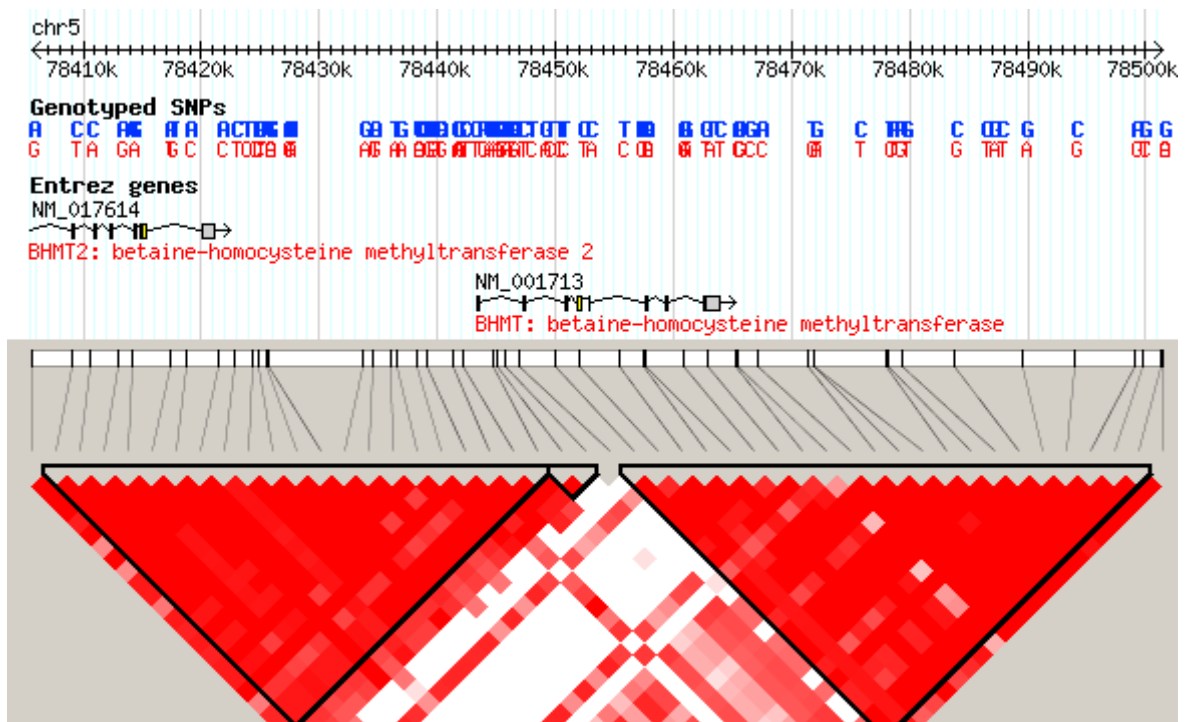


**4.2.1 Kryteria wyboru genów i ich wariantów polimorficznych**

W wyborze 10 polimorfizmów (Tabela 8) pojedynczego nukleotydu (SNP) 10 genów kandydackich kodujących obieg aktywnego metylu (*CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2*) kierowano się następującymi kryteriami:

- a) udowodniony związek z ryzykiem zachorowania kobiet na nowotwór złośliwy jajnika oraz nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy,
- b) położenie w lub w pobliżu rejonów kodujących (eksonów) oraz regionów regulatorowych danego genu,
- c) funkcjonalność polimorfizmu tzn. wpływ na poziom ekspresji genu lub funkcjonalność kodowanego białka,
- d) częstość allelu rzadszego (ang. minor allele frequency, MAF) nie mniejsza niż 0,2 (20%) w populacji kaukaskiej,
- e) wyniki analizy map sprzężeń zamieszczonych na stronie Międzynarodowego Projektu HapMap, które pozwalają identyfikować geny wykazujące związek z daną chorobą poprzez analizę niewielkiej liczby SNP'ów (Rycina 5).

W mapach sprzężeń wykorzystywana jest metoda oparta na sprzężeniach między polimorfizmami (ang. Linkage disequilibrium LD-approach).



**Rycina 5. Przykładowa mapa sprzężeń między polimorfizmami genu BHMT**

## METODY

**Tabela 8. Szczegółowa charakterystyka 10 polimorfizmów genów wybranych do analiz**

Gen	Kodowane białko	Numer polimorfizmu	Lokalizacja	Funkcja polimorfizmu <sup>1</sup>	Allele <sup>2</sup>	MAF <sup>3</sup>
<b>CBS</b>	Syntaza beta-cystationiny	844ins68	chr21:43356264	Intron genu	W/I <sup>4</sup>	0,07
<b>MTR</b>	Metylotransferaza homocysteinowa	rs1805087	chr1:11778965	Asp919Gly	C/t	0,167
<b>MTHFR</b>	Reduktaza metylenotetrahydrofolianu	rs1801133	chr1:11778965	Ala222Val	C/t	0,242
<b>MTRR</b>	Reduktaza syntazy metioninowej	rs1801394	chr5:7923973	Met22Ile	A/g	0,448
<b>MTHFD1</b>	Dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianu	rs2236225	chr14:63978598	Arg653Gln	C/t	0,458
<b>TCN2</b>	Transkobalamina 2	rs1801198	ch22: 29341610	Arg259Pro	C/g	0,45
<b>BHMT</b>	Metylotransferaza betaino-homocysteinowa	rs7356530	chr5:78400908	Promotor genu	A/g	0,421
<b>BHMT</b>	Metylotransferaza betaino-homocysteinowa	rs3733890	chr5:78457715	Gln239Arg	a/G	0,283
<b>BHMT2</b>	Metylotransferaza betaino-homocysteinowa 2	rs526264	chr5:78414166	Intron genu	a/T	0,425
<b>BHMT2</b>	Metylotransferaza betaino-homocysteinowa 2	rs625879	chr5:78381689	Intron genu	G/t	0,425

1 według bazy danych Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP), NCBI

2 małą literą oznaczono allel rzadszy w grupie kontrolnej

3 częstość allelu rzadszego w grupie kontrolnej (MAF, minor allele frequency)

4 W - allel bez insercji; I - allel z insercją,



### 4.2.2. Izolacja genomowego DNA z krwi obwodowej

DNA genomowe wyizolowano ze świeżej lub mrożonej krwi obwodowej. Krew pobierano do strzykawki – probówek z EDTA. Izolację przeprowadzono stosując metodę wysalania lub korzystając z zestawu AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit firmy Axygen (izolacja genomowego DNA z małych ilości krwi obwodowej do 100  $\mu$ l). Procedura izolacji DNA metodą wysalania:

- Do 2,5 ml krwi dodano 7,5 ml buforu do lizy i inkubowano na lodzie przez 60 min., wielokrotnie mieszając.
- We wcześniej schłodzonej wirówce (4°C) mieszaninę odwirowano przez 15 min. przy 4000 obr./min., supernatant usunięto, a do pozostałego osadu dodano 2,5 ml roztworu do lizy, po czym ponownie zwirowano przez 15 min przy 3000 obr./min. Procedurę powtarzano, w zależności od jakości krwi, 4 – 5 razy.
- Pozostały osad zawieszono w 1,25 ml buforu SE, następnie dodano 124  $\mu$ l SDS oraz 6,25  $\mu$ l roztworu proteiny K, dokładnie wymieszano i inkubowano przez 16 h w temp. 55°C.
- Po inkubacji dodano 0,375 ml NaCl i wirowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. przy 3000 obr./min.
- Supernatant ostrożnie przeniesiono do nowej probówki, dodano 0,375 ml NaCl i wirowano w 20°C przez 15 min. przy 3000 obr./min., procedurę powtórzono dwukrotnie.
- Supernatant przeniesiono do nowej probówki i wytrącono DNA dwiema objętościami 96% etanolu. Wytrącony DNA przeniesiono do probówki typu eppendorf i dwukrotnie przemyto 500  $\mu$ l 70% etanolu. Po wysuszeniu osad rozpuszczono w 500  $\mu$ l jałowej wody dejonizowanej (mQ).
- Jakość i stężenia DNA zostało ocenione elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym.

### 4.2.3. Amplifikacja fragmentów genów

Wybrane fragmenty obejmujące warianty polimorficzne badanych genów były amplifikowane przy użyciu metody PCR wykorzystującej reakcję łańcuchową polimerazy DNA (ang. polymerase chain reaction). Cykl reakcji obejmuje następujące etapy:

- 1) denaturacji dwuniciowego DNA w temp. 95°C,
- 2) 2) przyłączania startera (annealing), 3) polimeryzacji (syntezy DNA) w 72°C.

Sekwencje starterów do amplifikacji fragmentów genów zostały zaprojektowane w programie PRIMER3. Sekwencje starterów służących do amplifikacji w/w genów, długości

amplifikowanych fragmentów oraz temperatury przyłączania starterów, które ustalono poprzez wykonanie PCR w gradience temperatur (45 - 68°C), przedstawiono w Tabeli 9 .

Reakcje amplifikacji fragmentów genomowego DNA metodą PCR prowadzono w objętości 15 µl. Skład mieszaniny reakcyjnej zamieszczono w Tabeli 10. Reakcje były prowadzone zgodnie z profilem temperaturowo – czasowym podanym w Tabeli 11 .

**Tabela 9. Charakterystyka starterów do amplifikacji fragmentów genów**

Gen	Numer polimorfizmu	Startery do amplifikacji PCR (5' – 3')	Temperatura przyłączania startera (°C)	Długość produktów PCR (pz)
<i>CBS</i>	844ins68	F: GGGTTTCTCATCCTGCCTCT R: TCGTCCCCCAGTCTACTTTG	64,2	470
<i>MTR</i>	rs1805087	F: TTGGTGAAGGGAGAAGAAATG R: CTGAAGAATGGGGGTCTGTG	60	583
<i>MTHFR</i>	rs1801133	F: AGGCTGTGCTGTGCTGTTG R: CGCTGTGCAAGTTCTGGAC	67	477
<i>MTHFD1</i>	rs2236225	F: TTCTTCTCATTCTTCCTCACACC R: TCTGCTCCAAATCCTGCTTC	66	416
<i>TCN2</i>	rs1801198	F: GCATTACAGGTGGGAAAGAGAC R: CCAGGGATCTCCATTTACTGTC	67,2	525
<i>BHMT</i>	rs7356530	F: GCTTACCACAAGTCAAATGACG R: GGAAGTACGCAAATAGCCATC	64,5	549
<i>BHMT2</i>	rs526264	F: TGGCAAAGACAGGGAGTAGC R: CAGCTTCTTCAACGTGCTCA	66	576

**Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentów genów metodą PCR**

Skład mieszaniny	Stężenie wyjściowe	Objętość
bufor (zawiera 20mM MgCl <sub>2</sub> )	10X	1,5 µl
dNTPs	10 mM	0,2 µl
starter przedni (F)	25 pmol/µl	0,3 µl
starter tylny (R)	25 pmol/µl	0,3 µl
polimeraza <sup>1</sup>	5 µg/µl	0,15 µl
woda mQ	---	11,55 µl
matryca	5 µg/µl	1 µl
objętość końcowa		15 µl

<sup>1</sup>DreamTaq Green DNA firmy Fermentas lub KAPATaq firmy KAPABiosystems

**Tabela 11. Profil temperaturowo – czasowy metody PCR**

95°C 5 minut	94°C 30 sekund	temp. przyłączania starterów (°C) 30 sekund	72°C 30 sekund	72°C 5 minut
ilość cykli: 35				

Po zakończeniu amplifikacji badanych fragmentów, otrzymane produkty reakcji były rozdzielane elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w buforze 1 x TBE przy napięciu 170 V. Analizę rozdzielonych fragmentów przeprowadzono w świetle UV w obecności wzorca wielkości.

**4.2.4. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (*ang. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*)**

Amplifikację odpowiednich fragmentów analizowanych genów wykonano zgodnie z opisem zawartym w podrozdziale 4.2.3 Trawienie prowadzono w objętości końcowej 20 µl stosując następujący skład mieszaniny reakcyjnej:

produkt reakcji PCR	5 µl
bufor 10x	2 µl
enzym (10 U/µl)	0,1 µl
woda mQ	12,9 µl
-----	
objętość końcowa 20 µl	

Reakcję prowadzono w temp. 37°C. Wyjątek stanowił enzym Tail, dla którego temperatura inkubacji wynosiła 65°C. Następnie DNA frakcjonowano w 2 % żelu agarozowym. Szczegółowe dane dotyczące prowadzonych reakcji RFLP – stosowane enzymy oraz długości fragmentów restrykcyjnych przedstawiono w Tabeli 12 .

**Tabela 12. Szczegóły analizy RFLP**

Gen	Numer polimorfizmu	Enzym restrykcyjny	Allele <sup>1</sup>	Długości fragmentów restrykcyjnych (pz)	
				Genotyp [1][1] <sup>2</sup>	Genotyp[2][2] <sup>2</sup>
<i>CBS</i>	844ins68	-	W/ins	470	538
<i>MTR</i>	rs1805087	HaeIII	A/g	583	381, 202
<i>MTHFR</i>	rs1801133	Hinfl	C/t	425, 52	260, 165, 52
<i>MTHFD1</i>	rs2236225	MspI	C/t	255, 161	416
<i>TCN2</i>	rs1801198	MvaI	C/g	363, 118, 24, 17, 3	481, 24, 17, 3
<i>BHMT</i>	rs7356530	NIaIII	A/g	316, 233	316, 121, 112
<i>BHMT2</i>	rs526264	MboI	a/G	---	---

<sup>1</sup>allel rzadszy oznaczony małą literą; <sup>2</sup>[1], allel 1; [2], allel 2

Dane w Tabeli 12 uzyskano ze zdjęć z analizy PCR-RFLP znajdujących się na Rycinach 10-16 (w Aneksie, rozdział 8.1.-8.7).

#### 4.2.5. Wysokorozdzielcza analiza temperatury topnienia produktów PCR (*ang. High – Resolution Melting, HRM*)

Genotypowanie polimorfizmów: genu MTRR, genu BHMT oraz genu BHMT2 przeprowadzono z pomocą krzywej topnienia dwuniciowych fragmentów DNA z wykorzystaniem zestawu Hot FirePol EvaGreen HRM Mix firmy Solis BioDyne. Szczegóły analizy HRM, skład mieszaniny reakcyjnej, protokół temperaturowo – czasowy zamieszczono w Tabelach 13, 14, 15. Dane w tych tabelach uzyskano na podstawie wykresów analizy krzywych topnienia znajdujących się na Rycinach 17-25 (w Aneksie, rozdział 8.8.-8.10.).

**Tabela 13. Szczegóły analizy HRM**

Gen	Numer polimorfizmu	Startery do amplifikacji PCR (5' – 3')	Temperatura przyłączenia startera (°C)	Długość produktów PCR (pz)	Przedział temp. topnienia (°C)
<i>MTRR</i>	rs1801394	F: CCCCATTTTTTCAGTTTCACTGT R: CACTTCCCAACCAAATTCTTC	53	228	76 - 85
<i>BHMT</i>	rs3733890	F: GTTCTGGTGCATCCCTAAGT R: TTGCAGTCAGGAGTGTGGTA	65	190	80 - 89
<i>BHMT2</i>	rs625879	F: TTCTCCCTTTGTCCAGCAAC R: TTGAATCTGAGGAGGCCAGA	66	136	78 - 88

**Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej metody HRM**

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Objętość (µl)
<b>woda mQ</b>	-	6,84
<b>master Mix</b>	5X	2,00
<b>starter przedni (F)</b>	25 pmol/µl	0,08
<b>starter tylny (R)</b>	25 pmol/µl	0,08
<b>matryca</b>	5 µg/ µl	1,00

**Tabela 15. Profil temperaturowo – czasowy metody HRM**

Temperatura	Czas	Ilość pomiarów
<b>Pre - inkubacja</b>		
95°C	15 minut	---
Amplifikacja		
95°C	10 sekund	x 50 cykli
temp. zależy od starterów	10 sekund	
72°C	15 sekund	
<b>Topnienie produktu amplifikacji</b>		
95°C	60 sekund	---
40°C	60 sekund	---
78°C	---	25/°C
90°C	---	25/°C
<b>Chłodzenie</b>		
40°C	10 sekund	---

Obecność poszukiwanych polimorfizmów potwierdzono wykonując sekwencjonowanie zamplifikowanych fragmentów genów dla prób wzorcowych.

#### **4.2.6. Sekwencjonowanie DNA**

Wykonanie sekwencjonowania DNA zlecono komercyjnie Instytutowi Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie na kapilarnym sekwenatorze ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, USA) z zestawem ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA).

#### **4.2.7. Analiza rozkładu wariantów genów na chromosomach**

Analiza rozkładu wariantów genów na chromosomach czyli badanie rozkładu haplotypów zostało wykonane przy użyciu programu Unphased wersja 3.1.5 (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/UNPHASED.shtml>). Analizowano wszystkie kombinacje testowanych polimorfizmów w układach 2-, 3- i 4-markerowych. Dla wyeliminowania wpływu brakujących genotypów na wynik analiz zastosowano opcję „uncertain haplotype”. Haplotypy z częstością poniżej 0,01 nie były analizowane.

Testowano globalny (ang. *global p-values*) wpływ badanych polimorfizmów na ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe jajnika oraz nowotwory złośliwe błony śluzowej trzonu macicy. Istotność statystyczną wyników oszacowano za pomocą testu 1000 permutacji. Za wartości istotne statystycznie przyjmowano  $p < 0,00464$ . Ze względu na negatywny wynik przeprowadzonych testów nie wykonano analiz poszczególnych haplotypów. Analizie haplotypów poddano polimorfizmy genów *BHMT2* (rs526264 i rs625879) oraz *BHMT* (rs7356530 i rs3733890). Geny te są zlokalizowane na chromosomie 5 w pozycji odpowiednio chr5:78365583-78385273 oraz chr5:78407604-78428112 (Rycina 5). Dla pozostałych genów nie wykonano analizy haplotypów, ponieważ dla każdego z nich analizowano tylko po jednym polimorfizmie. Analiza interakcji między wariantami nukleotydowymi tych genów została przeprowadzona przy użyciu analizy MDR.

### 4.3. Odczynniki i materiały chemiczne

Agaroz (Prona , EU), alkohol etylowy (Polmos, Polska), bromek etydyny (Sigma, USA), bufor do lizy pH 7,4 (155mM NH<sub>4</sub>Cl; 10mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8,0), bufor SE (75 mM NaCl, 9 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8,0), chlorek amonu (Sigma, USA), chlorek sodu (POCh, Polska), dNTPs mix (10nM) (Fermentas, Litwa), EDTA (Sigma, USA), SDS (Koch-Light Laboratories, Niemcy), enzymy: proteinaza K20mg/ml (Fermentas, Litwa), polimeraza DNA DreamTaq Green (Fermentas, Litwa), polimeraza KAPATaq (KAPABiosystem, RPA), enzymy restrykcyjne: HaeIII, MboI, MspI, HinfI, MvaI, NlaIII (Fermentas, Litwa), startery do PCR (Oligo, Polska), TBE 10 x (labnet, Polska), zestawy: EZ-10 Spin Column DNA, Gel Extraction Kit (BioBasic Inc, USA), Hot FirePolEvaGreen HRM Mix (Solis BioDyne, Estonia).

### 4.4. Aparatura

Aparat do elektroforezy agarozowej (Labnet, Polska), aparat do elektroforezy agarozowej (Max fill Bio com, USA), CFX96 RealTime System (Biorad, Polska), ciepłarka Robbins Scientific 100 (SyngenBiotech, Polska), mieszadło wirowe Magnetic stirrer MSH – 300 (Biosan, USA), mini wirówka klasyczna (Eppendorf, Austria), strzykawko – probówki z EDTA i heparyną sodową, termocykler DNA C100 Thermal Cycler (Biorad, USA), termocykler DNA Multigene (Labnet, Polska), term blok HB – 1 (Wealtec, USA), termomixer (Eppendorf, Austria), tipsy jednorazowe, waga laboratoryjna (RadWag, Polska), wirówka wielozadaniowa z chłodzeniem 5804R (Eppendorf, Austria), zasilacz do

elektroforezy 250EX (Life Technologies, USA), zestaw pipet automatycznych jedno- i wielokanałowych (Eppendorf, Austria).

### 4.5. Oprogramowanie komputerowe oraz biologiczne bazy danych

- GraphPad In Stad 3.0.1
- Genome tester 1.3
- Finch TV 1.4
- Microsoft Exel 2009
- Microsoft Word 2009
- Statistica (StatSoft, Polska)
- Printer3 input
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – National Center for Biotechnology Information (PubMed, OMIM, SNP, Blast)
- <http://genome.ucsc.edu> – UCSC Genome Biotransformatics (genome Browser, Blat)
- <http://www.ensembl.org> – Ensembl Genome Browser
- <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov> – International HapMap Project
- <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html> - internetowa baza danych enzymów restrykcyjnych
- <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards> - GeneCards Homepage
- <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2> -Webcutter 2.0, program analizujący miejsca restrykcyjne
- <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> - Institute of Human Genetics, TU Monachium , Niemcy

### 4.6. Analizy statystyczne

#### 4.6.1. Wiek

Wiek grup badanych przedstawiono w postaci wartości średnich z odchyleniem standardowym ( $X \pm SD$ ) oraz mediany z wartościami minimum i maximum (min-max).

#### 4.6.2. Badania molekularne

Do obliczeń statystycznych wykorzystano program GraphPad InStat. Analiza statystyczna uzyskanych wyników polegała na porównaniu częstości alleli oraz genotypów pomiędzy grupą chorych na nowotwór złośliwy jajnika i grupą kontrolną oraz nowotwór

złośliwy błony śluzowej trzonu macicy i grupą kontrolną (test  $\chi^2$  oraz test Fisher'a), a także do obliczeń ilorazu szans (OR) przy uwzględnieniu odpowiednich przedziałów ufności (95%CI). Iloraz szans został policzony dla modelu recesywnego (nn vs Nn + NN) oraz dominującego (nn + Nn vs NN), gdzie „n” oznacza allel rzadszy. Wartość OR = 1 świadczy o braku związku danego polimorfizmu z badanym nowotworem, OR > 1 oznacza zwiększone ryzyko zachorowania (pozytywna asocjacja), natomiast OR < 1 zmniejszone ryzyko choroby (negatywna asocjacja). Związek danych polimorfizmów z nowotworem złośliwym jajnika i błony śluzowej trzonu macicy został także sprawdzony przy pomocy testu Cochran-Armitage trend test.

Wszystkie wyniki przyjęto za istotne statystycznie przy wartościach  $p < 0,05$ . Moc próby była liczona przy użyciu nieskorygowanego testu  $\chi^2$  (program Power and Sample Size Calculation Program wersja 2.1.31). Za istotną statystycznie uznawana była moc próby na poziomie  $\geq 80\%$ . Zgodność z prawem Hardy'ego–Weinberga w grupie chorych oraz w grupie kontrolnej sprawdzono testem  $\chi^2$ . Próby, dla których uzyskano niejednoznaczne wyniki analiz molekularnych, zostały wykluczone z obliczeń statystycznych.

W celu sprawdzenia kooperatywnego udziału wybranych genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2* w ryzyku zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika oraz nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy przeprowadzono analizę interakcji między wybranymi polimorfizmami z wykorzystaniem metody MDR (ang. *Genetic Model-free Multifactor Dimensionality Reduction analysis*, MDR version 2.0 beta 5). Szczegółowy opis metody MDR jest dostępny na stronie internetowej <http://chgr.mc.vanderbilt.edu/ritchie/lab/method.php?method=mdr>. Wynik analizy MDR jest opisywany przez dwie wartości Testing Balanced Accuracy (TBA) oraz Cross Validation Consistency (CVC). TBA jest wartością wskazującą na ile precyzyjnie analiza MDR jest w stanie przewidzieć status chory / kontrola na podstawie analizy genotypów testowanych polimorfizmów. Przedział wartości dla TBA wynosi 0,5 - 1, gdzie 1 oznacza, że na podstawie genotypów na 100% można określić czy dana osoba jest w grupie ryzyka czy też jest osobą zdrową. Wartości TBA > 0,55 uznaje się za statystycznie znaczące. CVC to wartość wskazująca ile razy dany 2-, 3- i 4-polimorficzny model został wybrany jako najlepszy model przewidujący status chory / kontrola po podziale analizowanych danych na 10 grup i przeprowadzeniu analizy MDR w każdej z nich. Wartości CVC powyżej 5 / 10 uważa się za statystycznie znaczące. Istotność statystyczną otrzymanych wyników sprawdzono z wykorzystaniem testu 1000 permutacji przy użyciu programu MDR permutation testing module 0.4.9 alpha. Wynik analizy został uznany za istotny statystycznie dla wartości  $p < 0,05$ .



## 5. WYNIKI

### 5.1. Analiza polimorfizmów genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* w grupie chorych na nowotwory złośliwe jajnika

Rozkład genotypów analizowanych polimorfizmów był zgodny z prawem Hardy-Weinberga (HW) zarówno w grupie chorych z nowotworami złośliwymi jajnika jak i w grupie kontrolnej ( $p > 0,05$ ).

W Tabeli 16 zestawiono częstości występowania alleli i genotypów u chorych na nowotwory złośliwe jajnika i porównano je z częstościami osób z grupy kontrolnej. Otrzymane wartości sprawdzono testem trendu Cochrańa-Armitage'a. Porównanie częstości alleli oraz genotypów dla polimorfizmów genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* nie wykazało różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą chorych z nowotworami złośliwymi jajnika, a grupą kontrolną (Tabela 16).

Oceniano również wpływ poszczególnych wariantów polimorficznych na występowanie nowotworu złośliwego. Wykorzystano w tym celu wielkość zwaną ilorazem szans. Iloraz szans (OR) określa wielkość i kierunek zależności pomiędzy występowaniem konkretnego narażenia na chorobę a wystąpieniem tej choroby. Wartość  $OR = 1$  wskazuje na brak takiej statystycznej zależności,  $OR > 1$  wskazuje na istnienie szkodliwego wpływu danej ekspozycji,  $OR < 1$  sugeruje działanie ograniczające danej ekspozycji na prawdopodobieństwo wystąpienia choroby. W prezentowanych badaniach wartości OR określają charakter zależności pomiędzy występowaniem konkretnego polimorfizmu a stwierdzeniem nowotworu. Dla właściwej oceny zależności konieczne jest uwzględnienie przedziału ufności wskaźnika OR.

Analiza ilorazu szans, przy założeniu zarówno modelu dominującego oraz recesywnego, nie wykazała związku tych wariantów genowych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworów złośliwych jajnika (Tabela 17). Zobrazowano to również na Rycine 6. Widoczne jest, że dla żadnego polimorfizmu nie występuje przypadek, w którym wartość przedziału ufności (CI) nie obejmowałaby wartości neutralnej. Stąd też nie można stwierdzić związku pomiędzy wystąpieniem konkretnych polimorfizmów a występowaniem nowotworu złośliwego jajnika. Dotyczy to zarówno modelu dominującego jak i recesywnego.

## WYNIKI

**Tabela 16. Porównanie częstości alleli i genotypów u chorych na nowotwory złośliwe jajnika i w grupie kontrolnej**

Gen	Nr polimorfizmu	Genotypy	CHORZY liczba/częstość genotypu	KONTROLE liczba/częstość genotypu	p	Test trendu Cochran- Armitage- p	Allele	CHORZY liczba/częstość allelu	KONTROLE liczba/częstość allelu	p
<i>BHMT</i>	rs3733890	GG AG AA	54 / 0,38 66 / 0,49 16 / 0,12	72 / 0,45 74 / 0,46 15 / 0,09	0,618	0,326	G A	174 / 1,28 98 / 0,72	218 / 1,35 104 / 0,66	0,385
<i>BHMT</i>	rs7356530	AA AG GG	52 / 0,38 67 / 0,49 17 / 0,13	59 / 0,37 73 / 0,46 28 / 0,16	0,484	0,430	A G	171 / 0,63 101 / 0,37	180 / 0,60 120 / 0,40	0,429
<i>BHMT2</i>	rs526264	TT AT AA	52 / 0,39 62 / 0,46 20 / 0,15	58 / 0,36 73 / 0,46 28 / 0,16	0,808	0,543	T A	166 / 0,62 102 / 0,38	178 / 0,59 122 / 0,41	0,536
<i>BHMT2</i>	rs625879	GG GT TT	51 / 0,36 63 / 0,46 22 / 0,16	60 / 0,37 71 / 0,44 30 / 0,19	0,845	0,746	G T	165 / 1,21 85 / 0,63	191 / 1,87 101 / 0,63	0,9575
<i>CBS</i>	844ins68	11 12 22	117 / 0,86 19 / 0,14 0 / 0,00	140 / 0,87 20 / 0,12 1 / 0,01	0,611	0,941	1 2	253 / 0,93 19 / 0,07	279 / 0,93 21 / 0,07	0,942
<i>MTHFD1</i>	rs2236225	CC CT TT	33 / 0,24 72 / 0,53 30 / 0,22	38 / 0,24 85 / 0,54 36 / 0,23	0,993	0,904	C T	138 / 0,51 132 / 0,49	151 / 0,50 149 / 0,50	0,907
<i>MTHFR</i>	rs1801133	CC CT TT	67 / 0,50 55 / 0,41 13 / 0,10	63 / 0,40 79 / 0,50 18 / 0,10	0,209	0,123	C T	189 / 0,70 81 / 0,30	190 / 0,63 110 / 0,37	0,127
<i>MTR</i>	rs1805087	AA AG GG	80 / 0,59 53 / 0,39 3 / 0,02	105 / 0,65 47 / 0,30 9 / 0,05	0,097	0,650	A G	213 / 0,78 59 / 0,22	243 / 0,81 57 / 0,19	0,653
<i>MTRR</i>	rs1801394	AA AG GG	47 / 0,35 68 / 0,51 19 / 0,14	62 / 0,39 68 / 0,43 29 / 0,19	0,363	0,986	A G	162 / 0,60 106 / 0,40	182 / 0,61 118 / 0,39	0,986
<i>TCN2</i>	rs1801198	CC CG GG	50 / 0,37 58 / 0,43 26 / 0,19	47 / 0,30 77 / 0,48 35 / 0,22	0,372	0,222	C G	158 / 0,59 110 / 0,41	163 / 0,54 137 / 0,46	0,208

**Tabela 17. Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującym i recesywnym wariantów polimorficznych genów w nowotworach złośliwych jajnika**

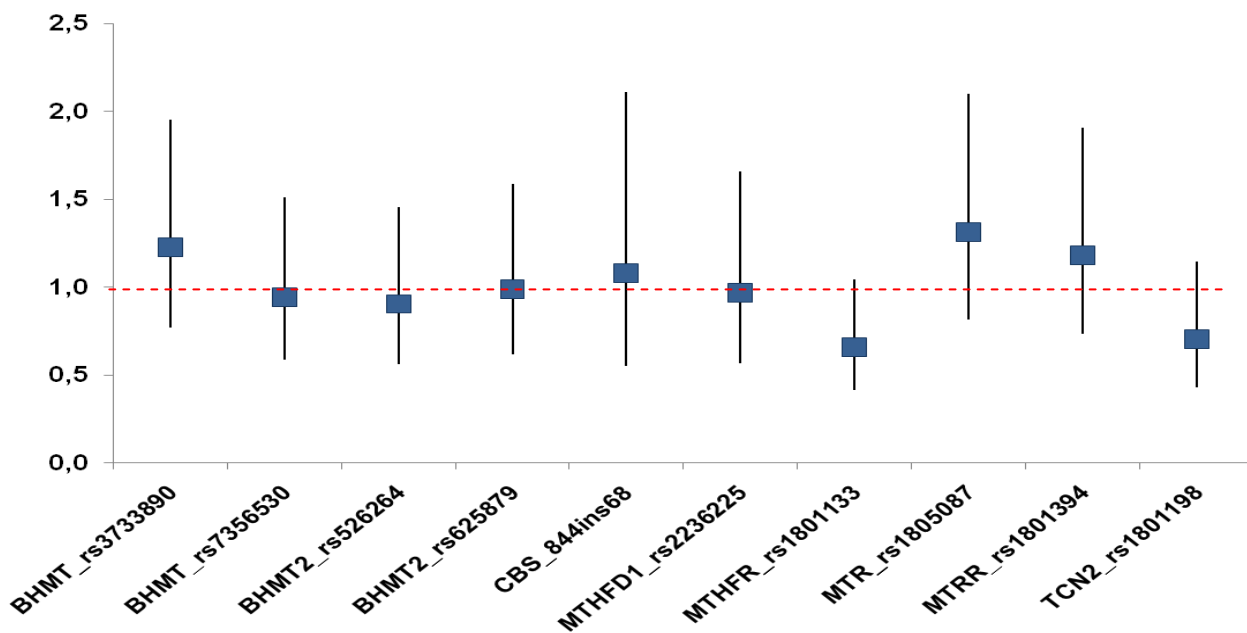
Gen	Nr polimorfizmu	Liczba genotypów		Model dominujący <sup>1</sup>		Model recesywny <sup>2</sup>	
		CHORZY	KONTROLE	Iloraz szans OR (95%CI)	p	Iloraz szans OR (95%CI)	p
<i>BHMT</i>	rs3733890	16 / 66 / 54	15 / 74 / 72	1,228 (0,7730 - 1,952)	0,3836	1,298 (0,6162 - 2,733)	0,4918
<i>BHMT</i>	rs7356530	52 / 67 / 17	59 / 73 / 28	0,944 (0,589 - 1,513)	0,810	0,674 (0,351 - 1,292)	0,233
<i>BHMT2</i>	rs526264	52 / 62 / 20	58 / 73 / 28	0,906 (0,564 - 1,455)	0,682	0,821 (0,439 - 1,536)	0,536
<i>BHMT2</i>	rs625879	51 / 63 / 22	60 / 71 / 30	0,9901 (0,6176 - 1,587)	0,9670	0,8427 (0,4602 - 1,543)	0,5788
<i>CBS</i>	844ins68	117 / 19 / 0	140 / 20 / 1	1,083 (0,555 - 2,110)	0,816	0,392 (0,0158 - 9,707)	0,542
<i>MTHFD1</i>	rs2236225	33 / 72 / 30	38 / 85 / 36	0,971 (0,568 - 1,659)	0,913	0,976 (0,563 - 1,692)	0,932
<i>MTHFR</i>	rs1801133	67 / 55 / 13	63 / 79 / 18	0,660 (0,415 - 1,047)	0,077	0,841 (0,396 - 1,786)	0,651
<i>MTR</i>	rs1805087	80 / 53 / 3	105 / 47 / 9	1,313 (0,819 - 2,102)	0,257	0,381 (0,101 - 1,437)	0,140
<i>MTRR</i>	rs1801394	47 / 68 / 19	62 / 68 / 29	1,183 (0,734 - 1,906)	0,489	0,741 (0,394 - 1,392)	0,350
<i>TCN2</i>	rs1801198	50 / 58 / 26	47 / 77 / 35	0,705 (0,433 - 1,149)	0,160	0,853 (0,483 - 1,507)	0,584

<sup>1</sup> nn + nN vs NN

<sup>2</sup> nn vs nN + NN

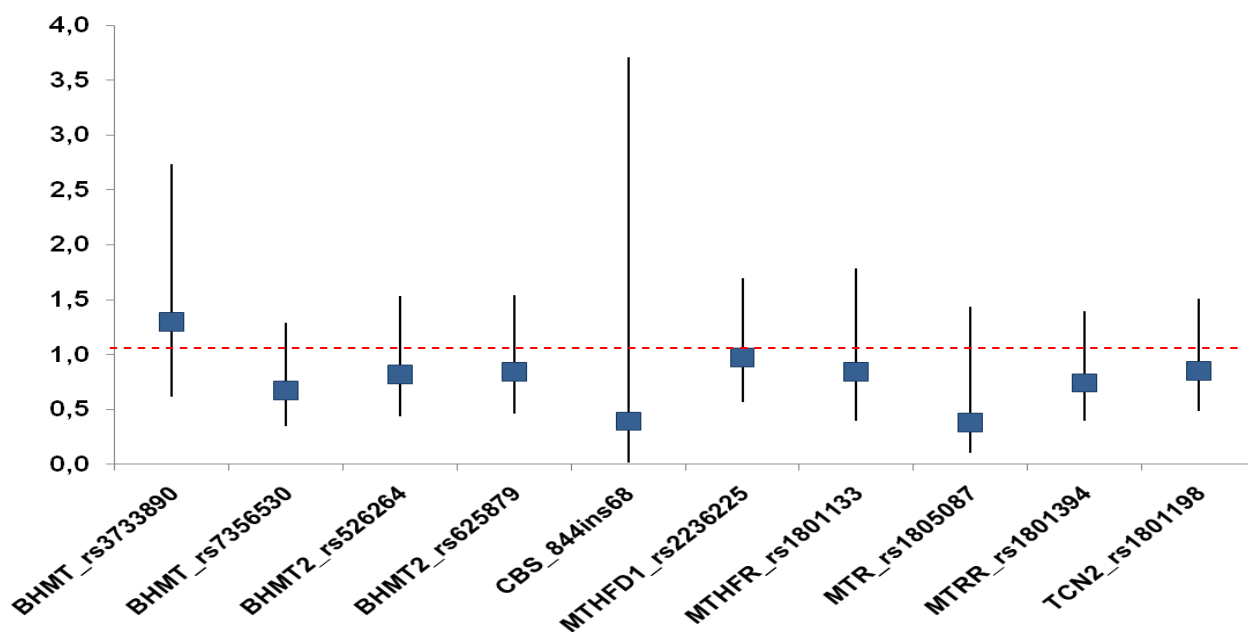
## A. Model dominujący

OR (95%CI)



## B. Model recesywny

OR (95%CI)



Rycina 6. Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującego (A) i recesywnym (B) wariantów polimorficznych genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* dla nowotworu złośliwego jajnika, 95% CI – przedział ufności

Analiza interakcji pomiędzy poszczególnymi polimorfizmami przeprowadzona za pomocą metody MDR nie wykazała kooperatywnego udziału tych wariantów genowych w etiologii nowotworu złośliwego jajnika. Żaden z najlepszych 2-, 3- oraz 4-polimorficznych modeli wybranych przez program nie wykazywał statystycznie istotnego związku ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na nowotwory złośliwe jajnika (otrzymane wartości  $p > 0,05$ ), a wskaźniki TBA nie przekraczały wartości granicznej 0,55, od której uznaje się model za interesujący statystycznie (Tabela 18).

**Tabela 18. Analiza interakcji pomiędzy polimorfizmami genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* w nowotworach złośliwych jajnika (metoda MDR)**

Gen_numer polimorfizmu	Testing Balanced Accuracy <sup>1</sup>	Cross Validation Consistency <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>
<b><i>MTRR_rs1801394</i>, <i>TCN2_rs1801198</i></b>	<b>0,518</b>	<b>90%</b>	<b>0,727</b>
<b><i>MTRR_rs1801394</i>, <i>MTHFD1_rs2236225</i>, <i>TCN2_rs1801198</i></b>	<b>0,509</b>	<b>90%</b>	<b>0,786</b>
<b><i>BHMT_rs625879</i>, <i>MTRR_rs1801394</i>, <i>MTHFD1_rs2236225</i>, <i>TCN2_rs1801198</i></b>	<b>0,536</b>	<b>70%</b>	<b>0,564</b>

<sup>1</sup>Testing Balanced Accuracy (TBA), wartość wskazująca na ile precyzyjnie analiza MDR jest w stanie przewidzieć status chory / kontrola na podstawie analizy genotypów testowanych polimorfizmów; przedział wartości dla TBA 0,5 - 1, gdzie 1 oznacza, że na podstawie genotypów na 100% można określić czy dana osoba jest chorym na nowotwór złośliwy jajnika czy też zdrową kontrolą; wartości TBA > 0,55 uznaje się za statystycznie interesujące

<sup>2</sup>Cross Validation Consistency (CVC), wartość wskazująca ile razy dany 2-, 3- i 4-polimorficzny model został wybrany jako najlepszy model przewidujący status chory / kontrola po podziale analizowanych danych na 10 grup i przeprowadzeniu analizy MDR w każdej z nich; wartości CVC powyżej 5 / 10 uważa się za znaczące;

<sup>3</sup>wartość p na podstawie testu 1000 permutacji

## 5.2. Analiza polimorfizmów genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* w nowotworach złośliwych błony śluzowej trzonu macicy

Rozkład genotypów analizowanych polimorfizmów był zgodny z prawem Hardy-Weinberga (HW) zarówno w grupie chorych z nowotworami złośliwymi błony śluzowej trzonu macicy oraz w grupie kontrolnej ( $p > 0,05$ ).

Porównanie częstości alleli oraz genotypów dla polimorfizmów genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* nie wykazało różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą chorych z nowotworami złośliwymi błony śluzowej trzonu macicy, a grupą kontrolną (Tabela 19).

Także analiza ilorazu szans (OR), przy założeniu zarówno modelu dominującego jak i recesywnego, nie wykazała związku tych wariantów genowych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworów złośliwych błony śluzowej trzonu macicy (Tabela 20, Rycina 7).

Analiza interakcji pomiędzy poszczególnymi polimorfizmami przeprowadzona za pomocą metody MDR nie wykazała kooperatywnego udziału tych wariantów genowych w etiologii nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy. Żaden z najlepszych 2-, 3- oraz 4-polimorficznych modeli wybranych przez program nie wykazywał statystycznie istotnego związku ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na nowotwory złośliwe błony śluzowej trzonu macicy (Tabela 21) (otrzymane wartości  $p > 0,05$ ).

## WYNIKI

**Tabela. 19. Porównanie częstości alleli i genotypów u chorych na nowotwory złośliwe błony śluzowej trzonu macicy i w grupie kontrolnej**

Gen	Nr polimorfizmu	Genotypy	CHORZY liczba/częstość genotypu	KONTROLE liczba/częstość genotypu	p	Test trendu Cochran- Armitage - p	Allele	CHORZY liczba/częstość allelu	KONTROLE liczba/częstość allelu	p
<b>BHMT</b>	rs3733890	GG	39 / 0,45	72 / 0,45	0,942	0,952	G A	116 / 1,35 56 / 0,65	218 / 1,35 104 / 0,65	0,953
		AG	38 / 0,44	74 / 0,46						
		AA	9 / 0,10	15 / 0,09						
<b>BHMT</b>	rs7356530	AA	36 / 0,42	59 / 0,69	0,745	0,516	A G	108 / 0,63 64 / 0,37	180 / 0,60 120 / 0,40	0,429
		AG	36 / 0,42	73 / 0,85						
		GG	14 / 0,16	28 / 0,33						
<b>BHMT2</b>	rs526264	TT	36 / 0,42	58 / 0,36	0,682	0,564	T A	107 / 0,62 65 / 0,38	178 / 0,59 122 / 0,41	0,536
		AT	35 / 0,41	73 / 0,46						
		AA	15 / 0,17	28 / 0,18						
<b>BHMT2</b>	rs625879	GG	38 / 0,44	60 / 0,37	0,570	0,339	G T	62 / 0,72 110 / 1,28	131 / 0,81 191 / 1,19	0,363
		GT	34 / 0,40	71 / 0,44						
		TT	14 / 0,16	30 / 0,19						
<b>CBS</b>	844ins68	11	73 / 0,85	140 / 0,87	0,648	0,0062	1 2	159 / 0,92 13 / 0,08	279 / 0,93 21 / 0,07	0,942
		12	13 / 0,15	20 / 0,12						
		22	0 / 0,00	1 / 0,01						
<b>MTHFD1</b>	rs2236225	CC	26 / 0,30	38 / 0,24	0,294	0,126	C T	99 / 0,58 73 / 0,42	151 / 0,50 149 / 0,50	0,907
		CT	47 / 0,55	85 / 0,53						
		TT	13 / 0,15	36 / 0,22						
<b>MTHFR</b>	rs1801133	CC	44 / 0,51	63 / 0,39	0,133	0,045	C T	125 / 0,73 47 / 0,27	190 / 0,63 110 / 0,37	0,127
		CT	37 / 0,43	79 / 0,49						
		TT	5 / 0,06	18 / 0,11						
<b>MTR</b>	rs1805087	AA	55 / 0,65	105 / 0,65	0,738	0,842	A G	137 / 0,81 33 / 0,19	243 / 0,81 57 / 0,19	0,653
		AG	27 / 0,32	47 / 0,29						
		GG	3 / 0,04	9 / 0,06						
<b>MTRR</b>	rs1801394	AA	25 / 0,30	62 / 0,39	0,251	0,423	A G	95 / 0,57 73 / 0,43	182 / 0,61 118 / 0,39	0,986
		AG	45 / 0,54	68 / 0,43						
		GG	14 / 0,17	29 / 0,18						
<b>TCN2</b>	rs1801198	CC	30 / 0,35	47 / 0,29	0,651	0,362	C G	100 / 0,58 72 / 0,42	163 / 0,54 137 / 0,46	0,208
		CG	40 / 0,47	77 / 0,48						
		GG	16 / 0,19	35 / 0,22						

**Tabela 20. Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującego i recesywnym wariantów polimorficznych genów w nowotworach złośliwych błony śluzowej trzonu macicy**

Gen	Nr polimorfizmu	Liczba genotypów		Model dominujący <sup>1</sup>		Model recesywny <sup>2</sup>	
		CHORZY	KONTROLE	Iloraz szans OR (95%CI)	p	Iloraz szans OR (95%CI)	p
<b>BHMT</b>	<b>rs3733890</b>	9 / 38 / 39	15 / 74 / 72	1,138 (0,4759 - 2,720)	0,7716	0,9749 (0,5760 - 1,650)	0,9247
<b>BHMT</b>	<b>rs7356530</b>	36 / 36 / 14	59 / 73 / 28	0,811 (0,475 - 1,386)	0,444	0,917 (0,454 - 1,852)	0,808
<b>BHMT2</b>	<b>rs526264</b>	36 / 35 / 15	58 / 73 / 28	0,798 (0,466 - 1,364)	0,408	0,988 (0,496 - 1,972)	0,974
<b>BHMT2</b>	<b>rs625879</b>	38 / 34 / 14	60 / 71 / 30	0,7504 (0,4407 - 1,278)	0,2897	0,8491 (0,4230 - 1,704)	0,6450
<b>CBS</b>	<b>844ins68</b>	73 / 13 / 0	140 / 20 / 1	1,187 (0,562 - 2,507)	0,652	0,619 (0,025 - 15,357)	1,000
<b>MTHFD1</b>	<b>rs2236225</b>	26 / 47 / 13	38 / 85 / 36	0,725 (0,403 - 1,304)	0,282	0,608 (0,303 - 1,222)	0,160
<b>MTHFR</b>	<b>rs1801133</b>	44 / 37 / 5	63 / 79 / 18	0,620 (0,365 - 1,052)	0,081	0,487 (0,174 - 1,361)	0,163
<b>MTR</b>	<b>rs1805087</b>	55 / 27 / 3	105 / 47 / 9	1,023 (0,560 - 1,774)	0,936	0,618 (0,163 - 2,346)	0,552
<b>MTRR</b>	<b>rs1801394</b>	25 / 45 / 14	62 / 68 / 29	1,508 (0,856 - 2,657)	0,153	0,897 (0,445 - 1,807)	0,760
<b>TCN2</b>	<b>rs1801198</b>	30 / 40 / 16	47 / 77 / 35	0,783 (0,448 - 1,370)	0,392	0,810 (0,418 - 1,567)	0,531

<sup>1</sup> nn+nN vs NN

<sup>2</sup> nn vs nN + NN



**Tabela 21. Analiza interakcji pomiędzy polimorfizmami genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* w nowotworach złośliwych błony śluzowej trzonu macicy (metoda MDR)**

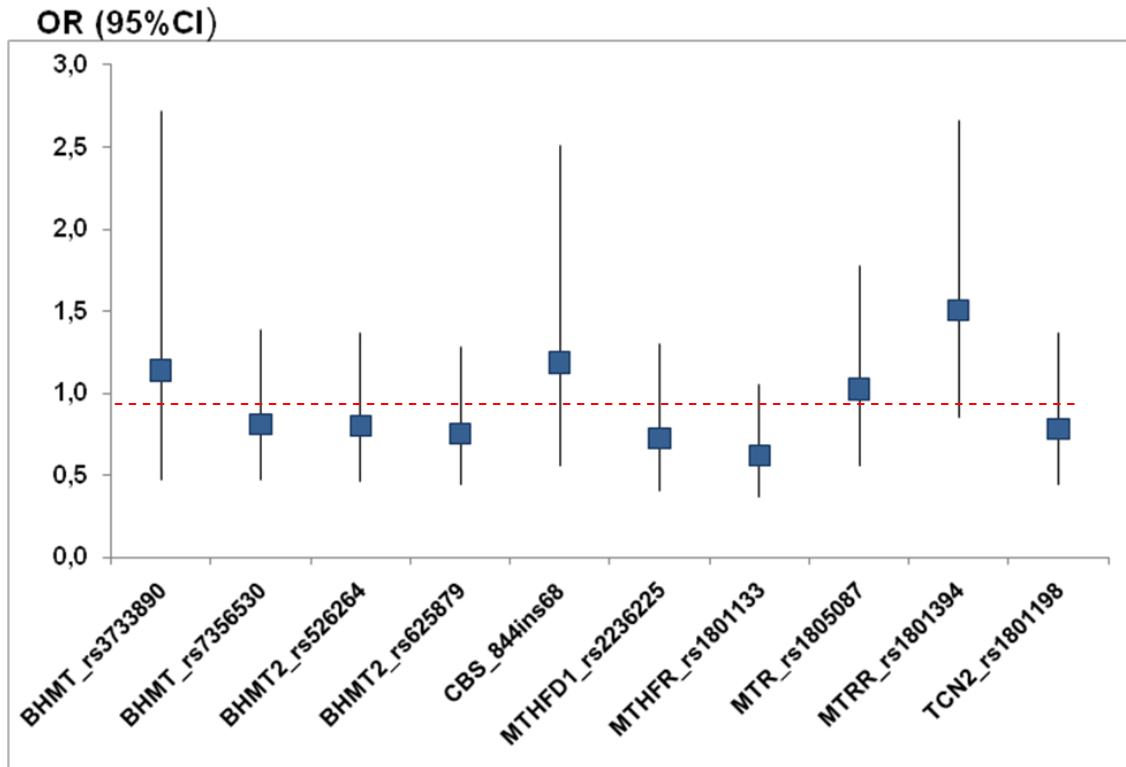
Gen_numer polimorfizmu	Testing Balanced Accuracy <sup>1</sup>	Cross Validation Consistency <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>
<i>MTRR_rs1801394</i> , <i>MTHFD1_rs2236225</i>	<b>0,463</b>	<b>30%</b>	<b>0,981</b>
<i>MTRR_rs1801394</i> , <i>MTHFD1_rs2236225</i> , <i>TCN2_rs1801198</i>	<b>0,518</b>	<b>50%</b>	<b>0,731</b>
<i>BHMT_rs3733890</i> , <i>MTRR_rs1801394</i> , <i>MTHFD1_rs2236225</i> , <i>TCN2_rs1801198</i>	<b>0,461</b>	<b>50%</b>	<b>0,985</b>

<sup>1</sup>Testing Balanced Accuracy (TBA), wartość wskazująca na ile precyzyjnie analiza MDR jest w stanie przewidzieć status chory / kontrola na podstawie analizy genotypów testowanych polimorfizmów; przedział wartości dla TBA 0,5 - 1, gdzie 1 oznacza, że na podstawie genotypów na 100% można określić czy dana osoba jest chorym na nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy czy też zdrową kontrolą; wartości TBA > 0,55 uznaje się za statystycznie interesujące

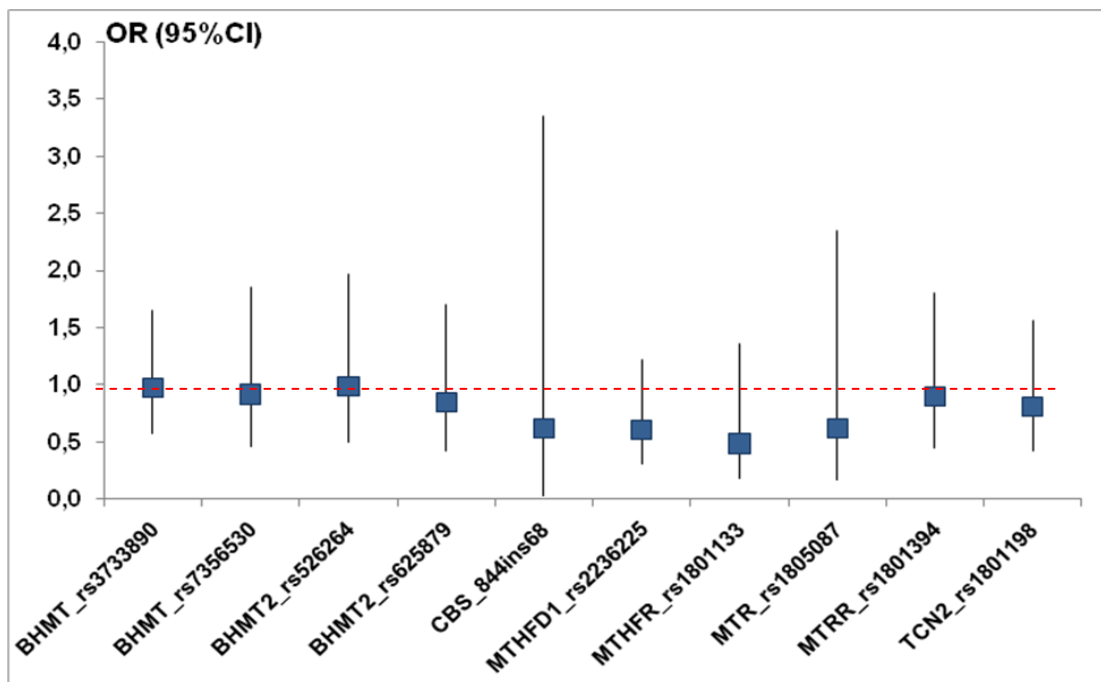
<sup>2</sup>Cross Validation Consistency (CVC), wartość wskazująca ile razy dany 2-, 3- i 4-polimorficzny model został wybrany jako najlepszy model przewidujący status chory / kontrola po podziale analizowanych danych na 10 grup i przeprowadzeniu analizy MDR w każdej z nich; wartości CVC powyżej 5 / 10 (50%) uważa się za znaczące;

<sup>3</sup>wartość p na podstawie testu 1000 permutacji

#### A. Model dominujący



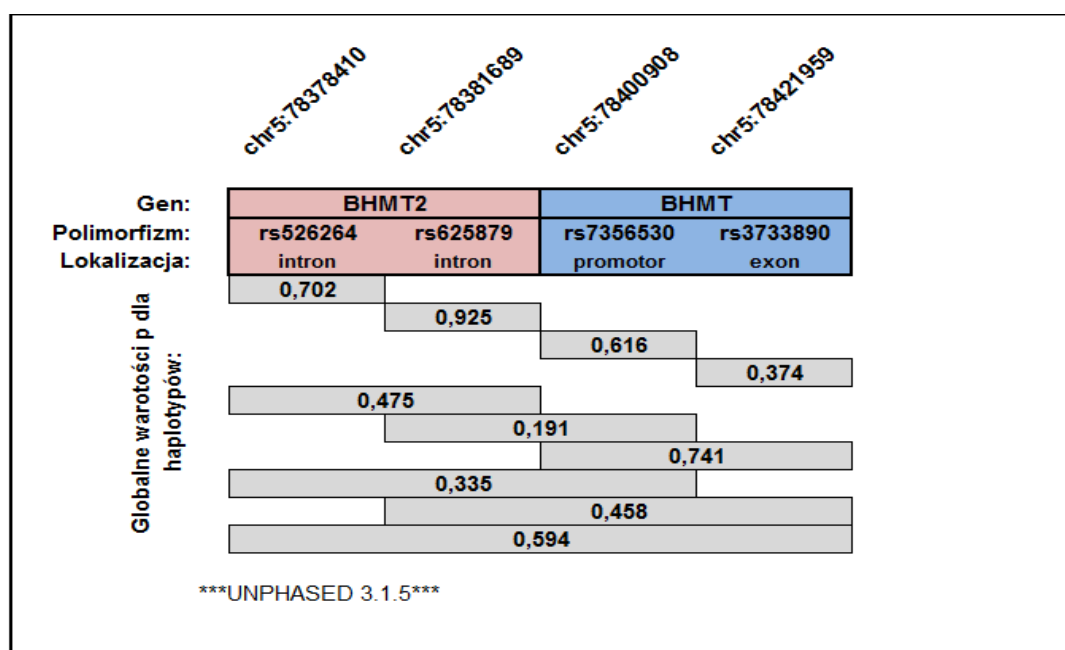
### B. Model recesywny



Rycina 7. Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującego (A) i recesywnym (B) wariantów polimorficznych genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* dla nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy, 95% CI – przedział ufności

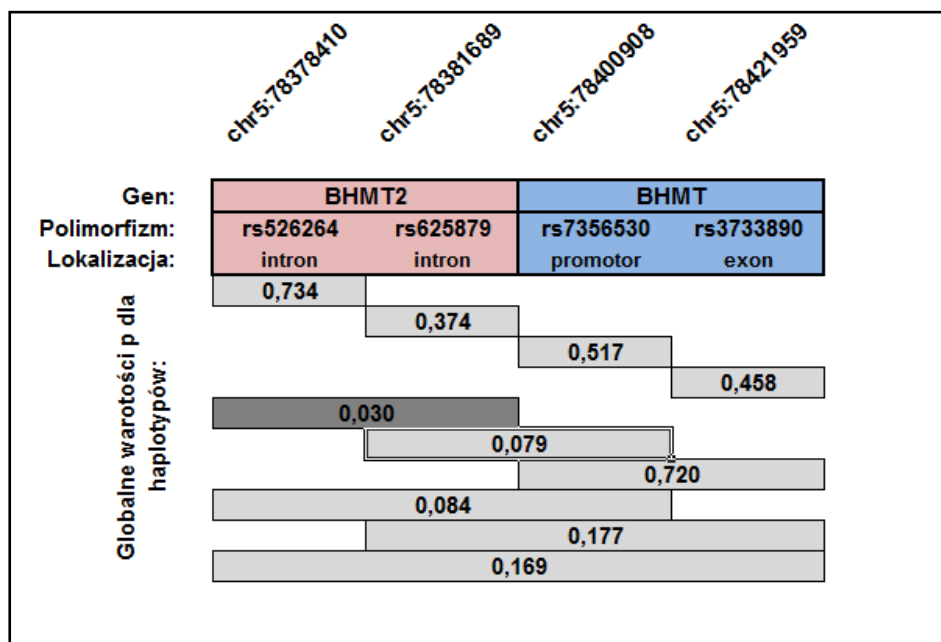
### 5.3. Związek haplotypów genów *BHMT* oraz *BHMT2* z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika i błony śluzowej trzonu macicy.

Badanie rozkładu poszczególnych haplotypów dla polimorfizmów genów *BHMT* (rs7356530 i rs3733890) i *BHMT2* (rs526264 i rs625879) nie wykazało związku z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika (Tabela 22, Rycina 8) oraz błony śluzowej trzonu macicy (Tabela 23, Rycina 9). Wartości p dla poszczególnych haplotypów po teście 1000 permutacji nie były istotne statystycznie ( $p > 0,00464$ ). W przypadku nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy haplotypem dającym wynik najbliższy istotności statystycznej był haplotyp składający się z polimorfizmów genu *BHMT2* (rs526264 i rs625879). Globalna wartość p wynosiła 0,03. W nowotworze złośliwym jajnika haplotypem dającym wynik najbliższy istotności statystycznej był haplotyp składający się z polimorfizmów genu *BHMT2* (rs625879) i genu *BHMT* (rs7356530), a globalna wartość p wyniosła 0,191.



Wartość istotna statystycznie po teście 1000 permutacji  $p < 0,00464$

**Rycina 8. Związek haplotypów genów *BHMT* oraz *BHMT2* z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika**



Wartość istotna statystycznie po teście 1000 permutacji  $p < 0,00464$

**Rycina 9. Związek haplotypów genów BHMT oraz BHMT2 z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy**

**Tabela 22. Związek haplotypów genów BHMT oraz BHMT2 z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika**

Układ polimorfizmów	$\chi^2$	Globalna wartość p
<b>okno 1-marker</b>		
rs526264	0,147	0,702
rs625879	0,009	0,925
rs7356530	0,251	0,616
rs3733890	0,791	0,374
<b>okno 2-marker</b>		
rs526264, rs625879	1,488	0,475
rs526264, rs7356530	2,033	0,362
rs526264, rs3733890	1,273	0,736
rs625879, rs7356530	3,311	0,191
rs625879, rs3733890	1,395	0,707
rs7356530, rs3733890	1,249	0,741
<b>okno 3-marker</b>		
rs526264, rs625879, rs7356530	3,391	0,335
rs526264, rs625879, rs3733890	2,056	0,725
rs526264, rs7356530, rs3733890	2,932	0,569
rs625879, rs7356530, rs3733890	3,636	0,458
<b>okno 4-marker</b>		
rs526264 rs625879 rs7356530 rs3733890	3,694	0,594

Wartość istotna statystycznie po teście 1000 permutacji  $p < 0,00464$

**Tabela 23. Związek haplotypów genów BHMT oraz BHMT2 z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy**

Układ polimorfizmów	$\chi^2$	Globalna wartość p
<b>okno 1-marker</b>		
rs526264	0,116	0,734
rs625879	0,791	0,374
rs7356530	0,419	0,517
rs3733890	0,552	0,458
<b>okno 2-marker</b>		
rs526264, rs625879	6,984	0,030
rs526264, rs7356530	3,174	0,205
rs526264, rs3733890	1,468	0,690
rs625879, rs7356530	5,076	0,079
rs625879, rs3733890	1,848	0,605
rs7356530, rs3733890	1,339	0,720
<b>okno 3-marker</b>		
rs526264, rs625879, rs7356530	4,960	0,084
rs526264, rs625879, rs3733890	8,345	0,080
rs526264, rs7356530, rs3733890	2,717	0,606
rs625879, rs7356530, rs3733890	6,319	0,177
<b>okno 4-marker</b>		
rs526264 rs625879 rs7356530 rs3733890	6,429	0,169

Wartość istotna statystycznie po teście 1000 permutacji  $p < 0,00464$

## 6. DYSKUSJA

W pracy analizowano 10 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) 8 genów kandydackich kodujących białka obiegu aktywnego metylu w odniesieniu do ryzyka zachorowania na nowotwory złośliwe jajnika oraz błony śluzowej trzonu macicy w grupie kobiet należącej do populacji polskiej. Analizy statystyczne uzyskanych wyników nie wykazały ich związku z występowaniem tych nowotworów, zarówno w odniesieniu do analiz pojedynczego polimorfizmu, jak i kooperatywnego udziału różnych wariantów genowych w etiologii nowotworów złośliwych jajnika i błony śluzowej trzonu macicy.

### **Polimorfizm 844ins68 genu syntazy $\beta$ -cystationiny (CBS) i polimorfizm rs1801198 genu transkobalaminy 2 (TCN2)**

Nie znaleziono danych dotyczących związku polimorfizmu 844ins68 genu CBS oraz polimorfizmu rs1801198 genu TCN2 z ryzykiem zachorowania na nowotwory złośliwe narządów rodnych, w tym raka jajnika i błony śluzowej trzonu macicy. Według danych literaturowych [52, 53, 54] wykazano związek polimorfizmu 844ins68 genu CBS z ryzykiem zachorowaniem na raka płuc oraz ryzykiem rozwoju upośledzenia umysłowego i zespołu Downa. Omawiany wariant polimorficzny uznawany jest za czynnik ochronny w schizofrenii i andrenoleukodystrofii [52, 55 56].

Mimo braku związku polimorfizmu 844ins68 genu CBS z występowaniem nowotworów złośliwych jajnika i błony śluzowej trzonu macicy w badaniach własnych, kontynuacja badań nad tym polimorfizmem jest uzasadniona, gdyż może on być polimorfizmem funkcjonalnym, tzn. wpływającym na proces transkrypcji i translacji, a tym samym na jakość i aktywność kodowanego białka. Ciekawym z punktu widzenia epigenetyki jest fakt, że pomimo formowania prawidłowego transkryptu – syntazy  $\beta$ -cystationiny, insercja 68 par zasad może powodować zachwianie równowagi czynników transkrypcyjnych, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszonej aktywności kodowanego enzymu. Zmniejszona aktywność syntazy  $\beta$ -cystationiny prowadzi do zwiększenia poziomu homocysteiny w osoczu, a wiadomo że hiperhomocysteinemia jest czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy, zakrzepicy, wad cewy nerwowej czy osteoporozy [52, 57]. Wpływ hiperhomocysteinemii na rozwój chorób nowotworowych może wynikać między innymi z indukcji stresu oksydacyjnego [58].

Badania Ott i wsp. [59] wykazały związek polimorfizmu 844ins68 genu CBS z zachorowaniem na nowotwory złośliwe górnego odcinka przewodu pokarmowego, zwłaszcza w powiązaniu z polimorfizmem A25756G genu MTR, który został omówiony poniżej. Należy podkreślić, że istnieją różnice populacyjne w wynikach badań dotyczących omawianego polimorfizmu. Dotyczy to głównie zakrzepicy żył głębokich kończyn dolnych. W badaniach

Grossmann i wsp. oraz Ayala i wsp. [60, 61] wykazano, że obecność polimorfizmu 844ins68 genu *CBS* jest czynnikiem ochronnym, natomiast w większości innych publikacji autorzy wykazują, że jest to czynnik ryzyka zakrzepicy [62, 63, 64].

Do tej pory wykazano związek polimorfizmu rs1801198 genu *TCN2* z rakiem jelita grubego. W badaniach Hazra i wsp. [65] stwierdzono, że fenotyp Arg/Arg tego polimorfizmu wiąże się z hipermetylacją wysp CpG regionów promotorowych genów w raku jelita grubego. A jak wiadomo hipermetylacja genów supresorowych, powodująca utratę ich funkcji, odgrywa kluczową rolę w procesie transformacji nowotworowej [66].

Badany polimorfizm był również analizowany w kontekście ryzyka wystąpienia poronień samoistnych. Zetterberg i wsp. [67] wykazali, że genotyp Arg/Arg tego polimorfizmu występuje znacznie częściej u kobiet z poronieniami samoistnymi w porównaniu z grupą kontrolną i stanowi czynnik ryzyka poronień.

W związku z wpływem polimorfizmu rs1801198 genu *TCN2* na fenotyp metylatora wysp CpG (ang. CpG island methylator phenotype – CIMP) [66] i udowodnionym związkiem z rakiem jelita grubego wydaje się być prawdopodobne, że omawiany polimorfizm jest również czynnikiem ryzyka innych nowotworów, w tym nowotworów złośliwych jajnika i błony śluzowej trzonu macicy. Proces hipermetylacji jest zjawiskiem uniwersalnym, dlatego też badania tego polimorfizmu w grupach chorych na nowotwory złośliwe jajnika i błony śluzowej trzonu macicy w różnych populacjach jest konieczne.

### **Polimorfizm rs1801133 genu reduktazy metylenotetrahydrofolianu (MTHFR)**

W badaniach własnych nie wykazano związku polimorfizmu rs1801133 genu *MTHFR* z ryzykiem występowania nowotworu złośliwego jajnika i błony śluzowej trzonu macicy. Gen *MTHFR* jest najczęściej badanym genem cyklu obiegu aktywnego metylu. Polimorfizm rs1801133 jest polimorfizmem funkcjonalnym, związanym z powstawaniem termolabilnego białka *MTHFR* o obniżonej aktywności – u nosicieli genotypu TT do około 30% oraz do 60% u nosicieli genotypu heterozygotycznego CT [68,69]. Obniżona aktywność reduktazy metylenotetrahydrofolianu odgrywa istotne znaczenie w transformacji nowotworowej. Wiąże się z niskim stężeniem folianów oraz wysokim stężeniem homocysteiny w surowicy, co zaburza proces metylacji DNA [70, 71, 72]. Omawiany polimorfizm jest czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworu złośliwego jajnika potwierdzonym w wielu badaniach [73, 43]. W cyklu prac Jakubowskiej i wsp. [26, 43] wykazano wpływ tego polimorfizmu na zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika i piersi u kobiet będących nosicielkami mutacji genu *BRCA1*.

Podobne wyniki uzyskał w swoich badaniach Gershoni-Baruch i wsp. [73]. Wykazał on związek pomiędzy polimorfizmem rs1801133 a ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika. Z kolei inny polimorfizm *MTHFR* rs1801131 (1298 A > C) zmniejsza ryzyko

zachorowania na nowotwór złośliwy piersi i może potencjalnie zmniejszać ryzyko rozwoju raka jajnika u kobiet z predyspozycjami dziedzicznymi.

Należy dodać, że nie wszystkie publikowane prace potwierdzają związek tego polimorfizmu z podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka jajnika. W pracy Terry i wsp. [74] przeprowadzonej na populacji amerykańskiej (New England Case Control Study, Nurses Health Study, Mayo Clinic Ovarian Cancer Case Control) nie wykazano związku badanych polimorfizmów rs1801133 oraz rs1801131 genu MTHFR z ryzykiem zachorowania na raka jajnika. Podobne wyniki uzyskał Kelemen i wsp. [74,75] analizując 16 polimorfizmów genu MTHFR.

Dane dotyczące polimorfizmu rs1801133 genu MTHFR i nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy są sprzeczne i wykazują różnice populacyjne, które mogą wynikać z istnienia różnic w częstości alleli [70, 76, 77]. Przykładowo w populacji kaukaskiej genotyp TT wynosi 10 - 13%, a heterozygota CT 50% [70]. Wang-Hong Xu i wsp. [76] wykazali brak związku omawianego polimorfizmu z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy w populacji chińskiej. Podobne wyniki opisał Paynter i wsp. [78] w populacji amerykańskiej. Z kolei Esteller i wsp. [79] wykazali, że nosicielstwo allelu T zarówno w postaci homo i heterozygotycznej polimorfizmu rs1801133 genu MTHFR zwiększone ryzyko zachorowania na ten nowotwór w populacji hiszpańskiej. Omawiany polimorfizm jest analizowany w kontekście zachorowania na inne nowotwory narządów płciowych kobiet. Piyathilake i wsp. [80,81,82] wykazali trzykrotnie zwiększone ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy u homozygot TT w porównaniu do homozygot CC. Wyniki te nie potwierdziły się w badaniach na populacji polskiej i koreańskiej.

Brak związku polimorfizmu rs1801133 genu MTHFR z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika w badaniach własnych może wynikać ze stosunkowo małej liczby chorych.

Polimorfizm rs1801133 genu MTHFR niewątpliwie wiąże się z ryzykiem występowania nowotworów złośliwych oraz powikłań położniczych. Jest on uznanym czynnikiem ryzyka występowania heterogennej grupy nowotworów złośliwych - raków płaskonabłonkowych głowy i szyi [HNSCC, *ang. head and neck squamous cell carcinoma*], przetyku, płuc, żołądka, jelita grubego, chłoniaków nieziarnicznych, ostrej białaczki limfo blastycznej, oponiaków i glejaków [83-93]. Wpływ wariantów genowych (allel T) polimorfizmu rs1801133 na aktywność reduktazy metylenotetrahydrofolianu i tym samym na poziom folianów w surowicy uzasadnia znaczenie suplementacji kwasu foliowego w profilaktyce chorób nowotworowych [70, 72 94-98]. Wykazano, że powikłania położnicze spowodowane są zmianami zakrzepowymi w naczyniach krążenia maciczno-łożyskowego, do których zaliczyć można ciężką postać preeklampsji, przedwczesne oddzielenie łożyska, ograniczenie wewnątrzmacicznego



wzrastania płodu, poronienia nawracające czy obumarcie płodu w II trymestrze ciąży ściśle wiążą się z zaburzoną aktywnością reduktazy metylenotetrahydrofolianu [68].

### **Polimorfizm rs1805087 genu metylotransferazy homocysteinowej (MTR) i polimorfizmu rs1801394 reduktazy syntazy metioninowej (MTRR)**

W moich badaniach nie wykazano związku polimorfizmów rs1805087 genu metylotransferazy homocysteinowej (MTR) i polimorfizmu rs1801394 genu reduktazy syntazy metioninowej (MTRR) z ryzykiem zachorowania na nowotwory złośliwe jajnika oraz błony śluzowej trzonu macicy. Dostępne dane literaturowe opisujące badania nad wyżej wymienionymi polimorfizmami w nowotworach złośliwych narządów płciowych kobiet dotyczą jajnika oraz szyjki macicy [99] i nie wykazują związku z zachorowaniem. W pracy Kotsopoulos i wsp. [75] nie stwierdzono dodatkowo aby suplementacja kwasu foliowego i metioniny zmniejszała ryzyko zachorowania na raka jajnika. Z kolei Webb i wsp. [100] analizowali warianty polimorficzne genu MTRR i MTR i wykazali, że stosowanie kwasu foliowego, witaminy B6 lub metioniny zmniejsza ryzyko zachorowania na raka jajnika, ale tylko u kobiet palących papierosy oraz spożywających alkohol. Nie znalazłem prac dotyczących wpływu tych polimorfizmów na ryzyko zachorowania na raka endometrium.

Wariant genu 919Gly genu MTR, podobnie jak omawiany powyżej polimorfizm rs1801133 genu MTHFR, jest uznanym czynnikiem ryzyka raków płaskonabłonkowych głowy i szyi, piersi u kobiet w wieku pomenopauzalnym [99] oraz raka jelita grubego. Ponadto zwiększa ryzyko zachorowania na nowotwory płaskonabłonkowe u osób nadużywających alkohol, rozwoju siatkówczaka, gammopatii monoklonalnych, szczególnie szpiczaka mnogiego, a także chłoniaków nieziarnicznych [83, 101-106].

Polimorfizm rs1801394 genu MTRR wiąże się z czterokrotnie zmniejszoną aktywnością reduktazy syntazy metioninowej, przez to zmniejsza dostępność S-adenozylometioniny (SAM) i może skutkować niekontrolowaną hipometylacją DNA. Wykazano jego związek z ryzykiem zachorowania na oponiaka i raka piersi [107, 108]. Ponadto nosicielstwo dwóch alleli G istotnie zwiększa ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego u osób palących papierosy. W przypadku raka gruczołu krokowego, trzustki oraz szyjki macicy takiego związku nie wykazano [99, 109, 110].

### **Polimorfizm rs7356530 i rs3733890 genu metylotransferazy betaino-homocysteinowej (BHMT) oraz polimorfizm rs526264 i rs625879 genu metylotransferazy betaino-homocysteinowej 2 (BHMT2)**

W mojej pracy nie wykazano związku wybranych czterech polimorfizmów genów BHMT i BHMT2 z ryzykiem zachorowania na nowotwory złośliwe jajnika i błony śluzowej trzonu macicy.

Gen BHMT2 należy do mało poznanych genów kodujących enzymy obiegu aktywnego metylu. Niewiele wiadomo o funkcjonalności jego polimorfizmów, dlatego też analizowane

polimorfizmy zostały wybrane metodą LD approach, która oparta jest na zasadzie sprzężeń pomiędzy polimorfizmami. To znaczy, że niektóre polimorfizmy, nawet jeśli nie są funkcjonalne (omawiane zlokalizowane są w intronach genów), są sprzężone i dziedziczą się zawsze razem z polimorfizmami funkcjonalnymi. Nie znalazłem danych literaturowych dotyczących wpływu omawianych polimorfizmów rs526264 i rs625879 genu BHMT2 na ryzyko zachorowania na raka jajnika i błony śluzowej trzonu macicy. Opublikowane dane dotyczą raka szyjki macicy. W pracy Myka i wsp. [51] badano związek omawianych polimorfizmów tego genu z rakiem szyjki macicy w populacji polskiej i związku takiego nie wykazano [80]. Gen BHMT2 i jego polimorfizmy badano również w endometriozie. W pracy Szczepańska i wsp. [111] nie wykazano związku omawianych wariantów polimorficznych z tą chorobą na populacji polskiej.

Metylotransferaza betaino-homocysteinowa (BHMT) katalizuje jedną z ważniejszych reakcji konwersji cyklu aktywnego metylu mianowicie remetylację homocysteiny. Odpowiada za transfer grupy metylowej z betainy do homocysteiny. Jest odpowiedzialna za ponad połowę reakcji remetylacji homocysteiny [112]. Funkcjonalność polimorfizmu rs3733890 tego genu została scharakteryzowana przez Li i wsp. [113]. Z ich badań wynika, że analizowany wariant polimorficzny cechuje się niższą stałą  $K_m$  (stała Michaelisa) do homocysteiny i betainy. Oznacza to, że powinowactwo do substratu enzymu kodowanego przez gen zawierający ten wariant polimorficzny jest większe niż wariantu „dzikiego”, przez co jego wydajność może być znacznie zwiększona. Polimorfizm rs3733890 genu BHMT jest jedynym z powyżej omawianych wariantów, którego nosicielstwo związane jest ze zmniejszonym ryzykiem zachorowań na niektóre nowotwory. Może mieć to związek z omówioną wcześniej zwiększoną aktywnością kodowanego enzymu, co skutkuje przeciwdziałaniem hiperhomocysteinemii i zwiększeniem dostępności grup metylowych do procesu metylacji DNA. W pracy Myka i wsp. [51] wykazano, że obecność allelu A w układzie hetero lub homozygotycznym polimorfizmu rs3733890 genu BHMT zmniejsza o połowę ryzyko zachorowania na nowotwór złośliwy szyjki macicy.

W badaniach nad rakiem piersi widoczne są różnice populacyjne, a dane dotyczące tych samych populacji są często sprzeczne. W pracy populacyjnej Xu i wsp. [114] nie wykazano związku omawianego polimorfizmu z ryzykiem zachorowania na raka piersi w populacji amerykańskiej. Natomiast rok później w pracy tego samego autora wykazano, że homozygotyczność AA stanowi czynnik ochronny przed zachorowaniem na raka piersi ( $OR=0,64$ ) [115].

Badaniami potwierdzającymi prawdopodobną ochronną rolę omawianego wariantu polimorficznego w transformacji nowotworowej stanowi analiza Hazra i wsp. [116] dotycząca nowotworu jelita grubego. Nie znaleziono związku tego polimorfizmu oraz rs526264 z ryzykiem pojawienia się nowotworu złośliwego jajnika i błony śluzowej trzonu macicy.

### **Polimorfizm rs2236225 genu dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianu (*MTHFD1*)**

*MTHFD1* jest enzymem katalizującym reakcję konwersji 5,10-dimetylotetrahydrofolianu do 10-formylotetrahydrofolianu oraz jego pochodnych. Produkty te są substratami do reakcji biosyntezy *de novo* zasad nukleotydowych, które następnie są wykorzystywane do biosyntezy DNA. Najczęściej badanym polimorfizmem genu *MTHFD1* jest wariant polimorficzny powodujący zamianę argininę w glutaminę w pozycji 653 [117, 118]. W mojej pracy analizowałem właśnie ten polimorfizm i nie wykazałem, aby jego obecność miała związek z występowaniem nowotworów złośliwych jajnika lub błony śluzowej trzonu macicy w populacji kobiet z Wielkopolski. W dostępnych danych literaturowych wykazano wpływ polimorfizmu genu *MTHFD1* na pojawienie się wad rozwojowych cewy nerwowej u dzieci [117, 119-121], utraty ciąży w III trymestrze [117, 122].

Omawiany polimorfizm związany jest również z procesem karcinogenezy. Wykazano, że jest on czynnikiem ryzyka wystąpienia najczęstszych nowotworów złośliwych. Stevens i wsp. [117, 123] wykazali zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwór złośliwy piersi u kobiet w wieku pomenopauzalnym, które były nosicielkami allelu T w postaci homo i heterozygotycznej. Podobne wyniki uzyskano w pracy Li Sy i wsp. [117, 124]. Omawiany wariant polimorficzny genu *MTHFD1* był związany z pojawieniem się nowotworów płaskonabłonkowych głowy i szyi u osób nadużywających alkoholu oraz palących papierosy [129], podobnie jak omawiany powyżej polimorfizm genu *MTHFR*. Biorąc pod uwagę, że palenie papierosów jest czynnikiem karcinogennym można również uznać niedobór kwasu foliowego w diecie jako czynnik ryzyka transformacji nowotworowej.

Inne nowotwory, dla których wykazano związek badanego polimorfizmu, to rak żołądka [117, 125], płuc w populacji chińskiej [117, 124] oraz ostrej białaczce limfoblastycznej [117, 126]. W opublikowanych danych dotyczących nowotworów narządów płciowych kobiet nie ma danych dotyczących raka jajnika i błony śluzowej trzonu macicy. Natomiast są dane dotyczące raka szyjki macicy nie wykazują związku omawianego polimorfizmu z tym nowotworem w populacji polskiej [80]. Oprócz chorób nowotworowych omawiany polimorfizm jest analizowany w chorobach neurologicznych i neuropsychiatrycznych. W pracy Kempisty i wsp. [117, 127] wykazano powiązanie badanego wariantu polimorficznego z schizofrenią oraz zwiększonym ryzykiem migren u mężczyzn będących nosicielami allelu A. W pracy Dorszewska i wsp. [128] wykazano, że nosicielstwo dwóch alleli A ma wpływ na zwiększone ryzyko wystąpienia choroby Parkinsona i Alzheimerza.

Przedstawione powyżej dane literaturowe pokazują, że niektóre z wybranych w niniejszej pracy polimorfizmów genów obiegu aktywnego metylu zostały analizowane w nowotworach złośliwych jajnika czy błony śluzowej trzonu macicy w grupie chorych z

populacji polskiej po raz pierwszy. Uzasadnia to uznanie tematyki mojej pracy jako zasadnej. Wyniki analiz będących przedmiotem niniejszej pracy – brak związku polimorfizmów genów obiegu aktywnego metylu *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT* oraz *BHMT2* z ryzykiem zachorowania na nowotwory złośliwe jajnika i błony śluzowej trzonu macicy mają istotne znaczenie w badaniach nad ustaleniem genetycznego podłoża tych chorób. Kontynuowanie badań nad genami obiegu aktywnego metylu, zwłaszcza w połączeniu z oceną stopnia metylacji w tkance nowotworowej, jest nowym kierunkiem w ustaleniu istoty transformacji nowotworowej i niewątpliwie wyzwaniem dla genetyków i lekarzy. Wynika to z faktu, że badania wielośrodkowe, przeprowadzane na dużych grupach chorych mają największą wartość w ujęciu analiz genetycznych.

Należałoby również zwrócić uwagę na czynniki mogące wpływać na wykazany w mojej pracy brak związku analizowanych polimorfizmów genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT* oraz *BHMT2* z częstością występowania nowotworów złośliwych jajnika oraz błony śluzowej trzonu macicy w populacji polskiej. Uzyskane wyniki mogą wynikać również z:

- zbyt małej liczebności grupy chorych z nowotwór złośliwy jajnika i błony śluzowej trzonu macicy oraz grupy kontrolnej, aby możliwe było wykazanie wszystkich istotnych statycznie różnic w częstościach poszczególnych alleli oraz genotypów badanych wariantów genowych
- zbyt małej liczby analizowanych polimorfizmów, aby możliwa była pełna analiza udziału wariantów nukleotydowych danych genów w etiologii badanych nowotworów
- wpływu zjawiska różnorodności genetycznej występującego między populacjami, które polega na tym, że w każdej populacji mogą istnieć inne geny lub loci wykazujące związek z ryzykiem wystąpienia nowotworu złośliwego jajnika i błony śluzowej trzonu macicy (ang. *genetic heterogeneity*), lub też różne warianty polimorficzne danego genu kandydackiego (ang. *allelic heterogeneity*)
- obecności innych rodzajów polimorfizmów niż pojedynczego nukleotydu – polimorfizmy liczby kopii (ang. *copy number variation*, CNV), insercje czy też delecje
- możliwości wystąpienia epistatycznych interakcji między genami czy polimorfizmami
- wyboru polimorfizmów o częstości allelu rzadszego  $MAF \geq 0,2$  (20%) w populacji kaukaskiej zgodnie z zasadą „częsta choroba – powszechny allel”; rzadkie allele (< 1%) również mogą być związane z podatnością na nowotwory badane w pracy
- obecnością zjawisk epigenetycznych, czyli dziedziczności zmian ekspresji genów niezależnych od sekwencji DNA (opartej głównie na metylacji DNA i posttranslacyjnej modyfikacji histonów) i ich związku z czynnikami środowiskowymi, np. niedobór kwasu foliowego w diecie.

## 7. WNIOSKI

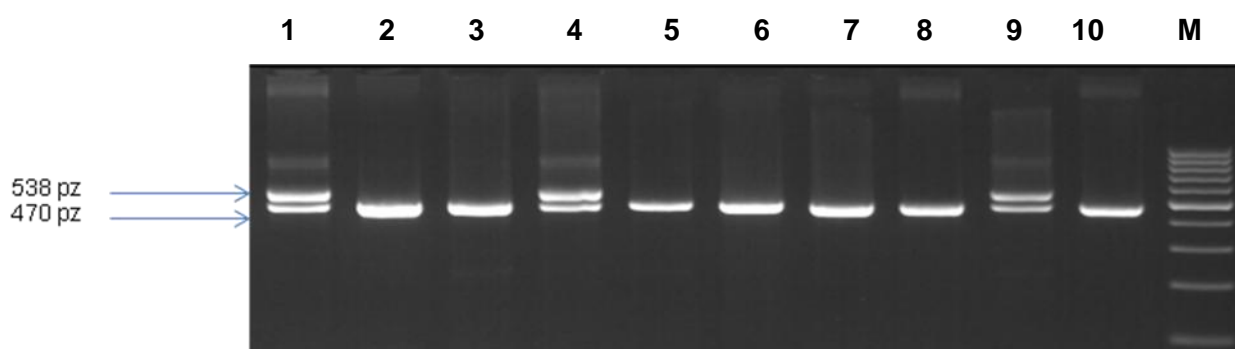
Zagadnienie identyfikacji zjawisk towarzyszących występowaniu nowotworów złośliwych jest jednym z głównych celów badań związanych ze zrozumieniem genetycznego podłoża tych chorób i z ich diagnostyką. Jednym z kierunków badań prowadzonych na świecie jest ocena polimorfizmów genów w aspekcie nowotworów złośliwych. Prezentowana praca związana jest z tym kierunkiem.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań, sformułować można następująco:

1. Polimorfizmy genów kodujących enzymy obiegu aktywnego metylu: *CBS* (844ins68), *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133), *MTRR* (rs1801394), *MTHFD1* (rs2236225), *TCN2* (rs1801198), *BHMT* (rs7356530), *BHMT* (rs3733890), *BHMT2* (rs526264), *BHMT2* (rs625879) nie wykazują związku z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika w grupie badanej. Polimorfizmy te nie wykazują także kooperatywnego udziału w etiologii nowotworu złośliwego jajnika.
2. Polimorfizmy genów kodujących enzymy obiegu aktywnego metylu: *CBS* (844ins68), *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133), *MTRR* (rs1801394), *MTHFD1* (rs2236225), *TCN2* (rs1801198), *BHMT* (rs7356530), *BHMT* (rs3733890), *BHMT2* (rs526264), *BHMT2* (rs625879) nie wykazują związku z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy błony śluzowej trzonu macicy w grupie badanej. Polimorfizmy te nie wykazują także kooperatywnego udziału w etiologii nowotworu złośliwego błony śluzowej trzonu macicy.

## 8. ANEKS

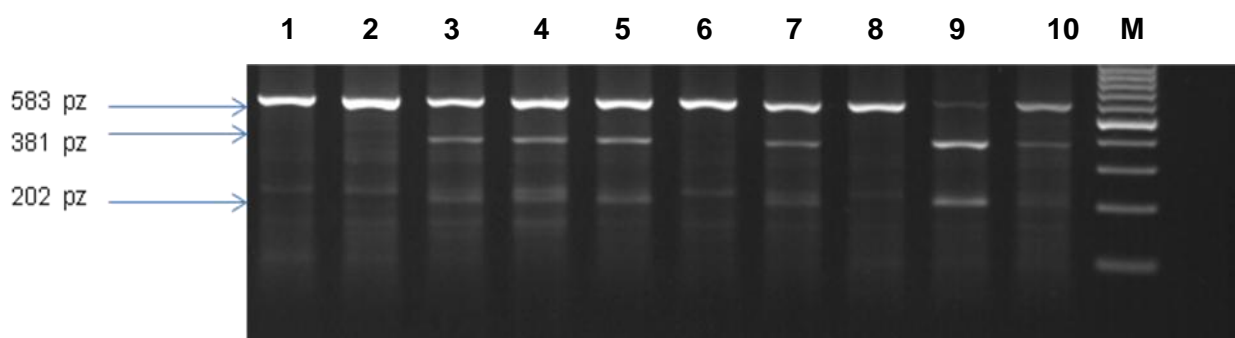
### 8.1. Analiza polimorfizmu 844ins68 genu *CBS*



**Rycina 10. Analiza PCR RFLP polimorfizmu 844ins68 genu *CBS*.**

Allel z insercją (I) – 538 pz, allel bez insercji (ID) – 470 pz. Ścieżki: 1, 4, 9 – heterozygoty ID, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 – homozygoty DD, M – wzorzec wielkości.

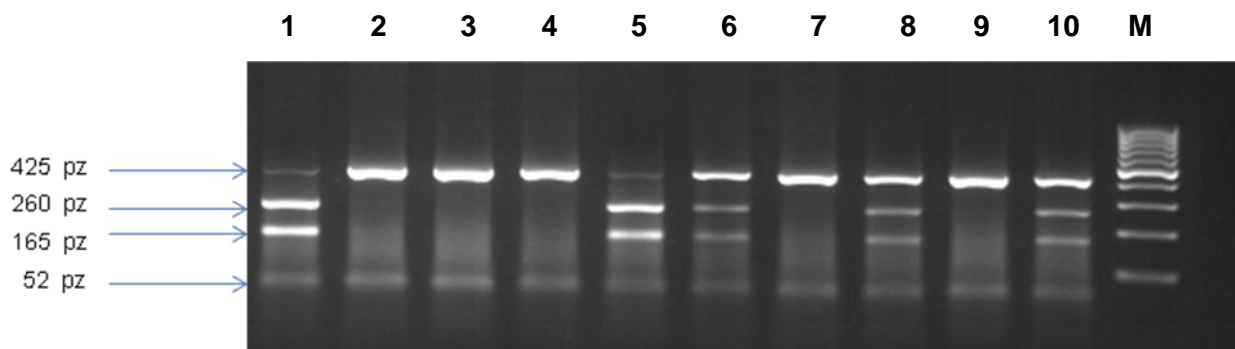
### 8.2. Analiza polimorfizmu rs1805087 genu *MTR*



**Rycina 11. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs1805087 genu *MTR*.**

Polimorfizm rs1805087 genu *MTR* (A/G) powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *HaeIII*. Allel A: 583 pz, allel G 381 + 202 pz. Ścieżka: 1, 2, 6, 8 – homozygota AA, 3, 4, 5, 7, 10 – heterozygota AG, 9 – homozygota GG, M – wzorzec wielkości.

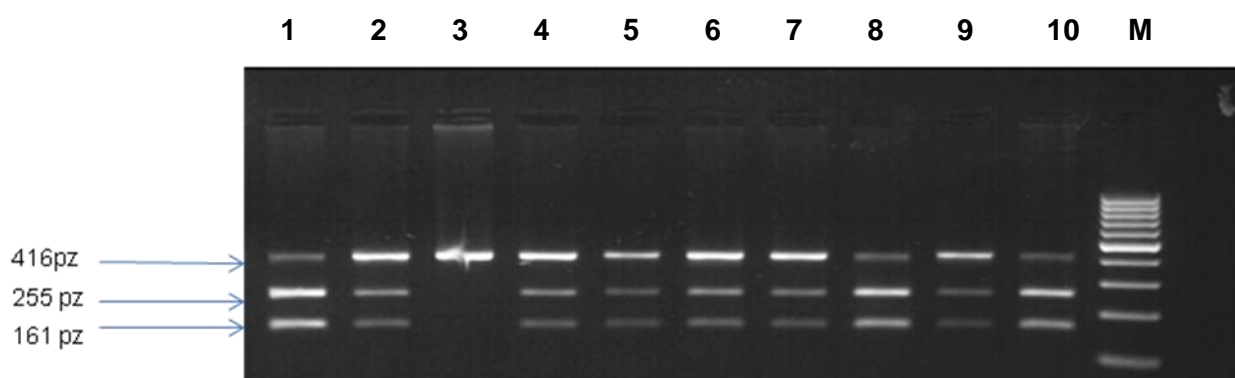
### 8.3. Analiza polimorfizmu rs1801133 genu *MTHFR*



**Rycina 12. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs1801133 genu *MTHFR*.**

Polimorfizm rs1801133 genu *MTHFR* (C/T) powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *HinfI*. Allel C: 425 + 52 pz, allel T: 260 + 165 + 52 pz. Ścieżka: 1, 5 – homozygota TT, 2, 3, 4, 7, 9 – homozygota CC, 6, 8, 10 – heterozygota CT, M – wzorzec wielkości.

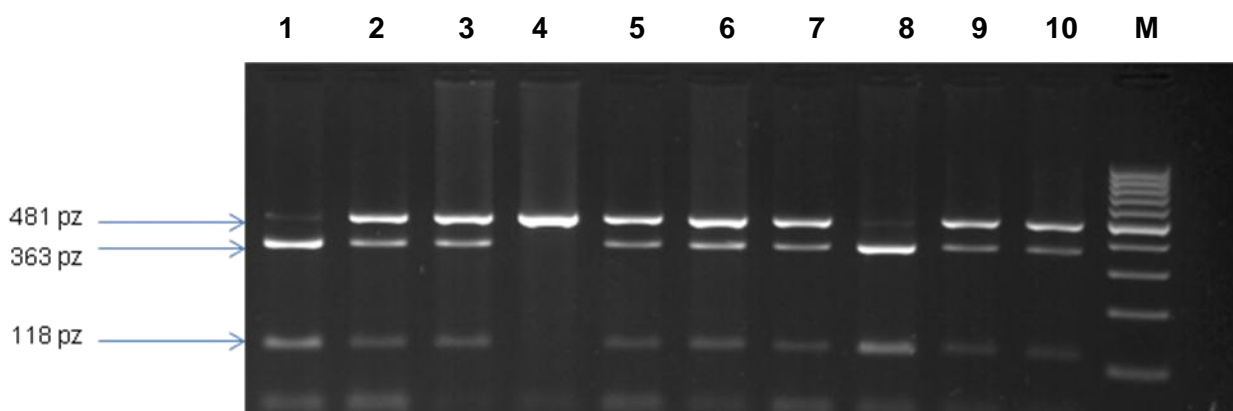
### 8.4. Analiza polimorfizmu rs2236225 genu *MTFHD1*



**Rycina 13. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs2236225 genu *MTFHD1*.**

Polimorfizm rs2236225 genu *MTFHD1* (C/T) powoduje zniesienie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *MspI*. Allel C: 255 + 161 pz, allel T: 416 pz. Ścieżka: 3 – homozygota TT, 1, 8, 10 – homozygota CC, 2, 4, 5, 6, 7, 9 – heterozygota CT, M – wzorzec wielkości.

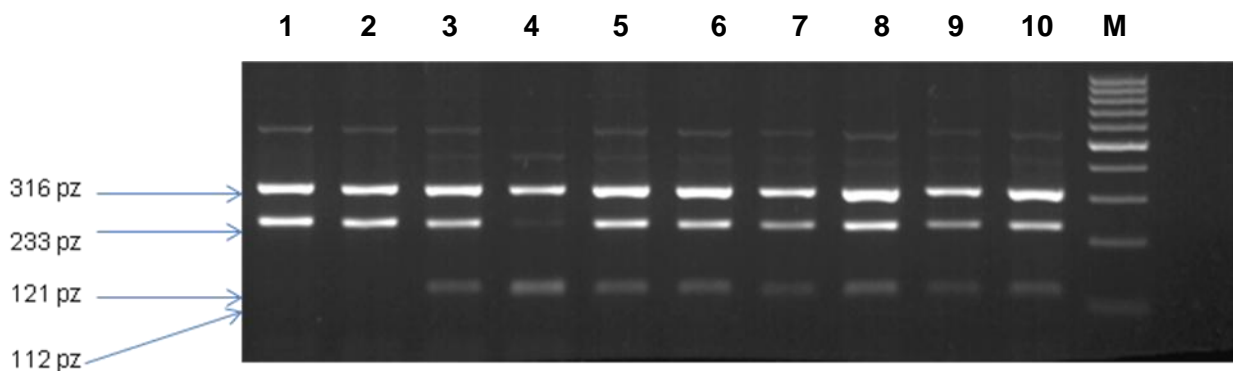
### 8.5. Analiza polimorfizmu rs1801198 genu *TCN2*



**Rycina 14. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs1801198 genu *TCN2*.**

Polimorfizm rs1801198 genu *TCN2* (C/G) powoduje zniesienie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *Mva*I. Allel C: 363 + 118 pz, allel G: 481 pz. Ścieżka: 1, 8 – homozygota CC, 4 – homozygota GG, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 – heterozygota CG, M – wzorec wielkości.

### 8.6. Analiza polimorfizmu rs7356530 genu *BHMT*

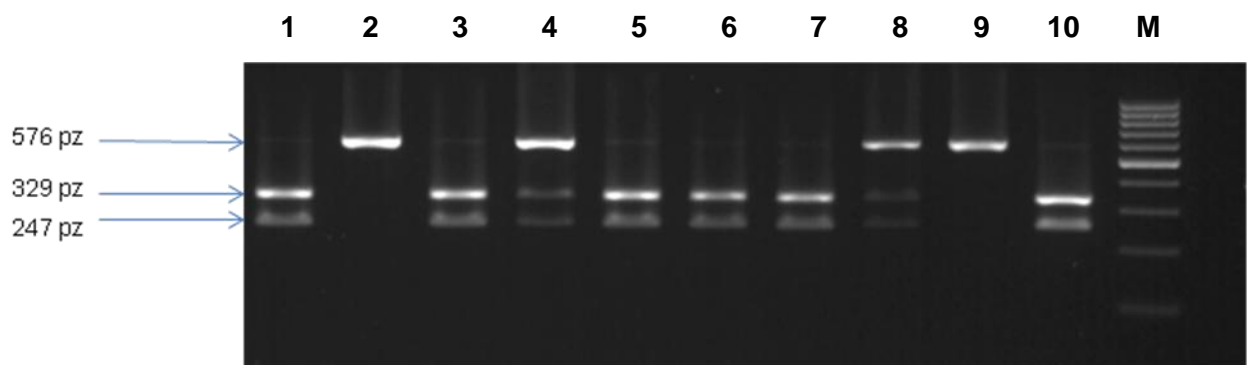


**Rycina 15. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs7356530 genu *BHMT*.**

Polimorfizm rs7356530 genu *BHMT* powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *NIa*III. Allel A: 316 + 233 pz, allel G: 316 + 121 + 112 pz. Ścieżka: 1, 2 – homozygota AA, 4 – homozygota GG, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – heterozygota AG

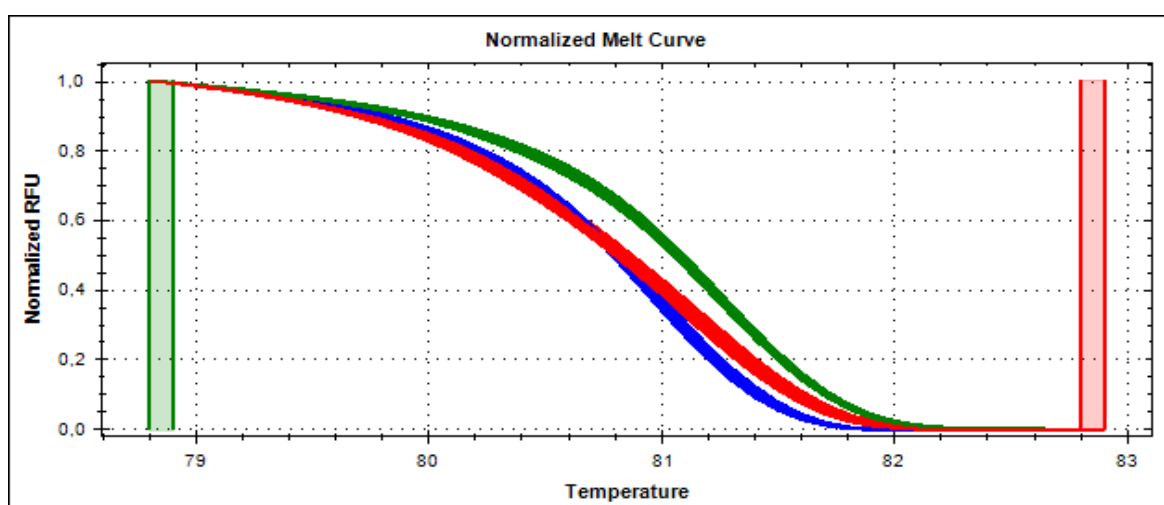
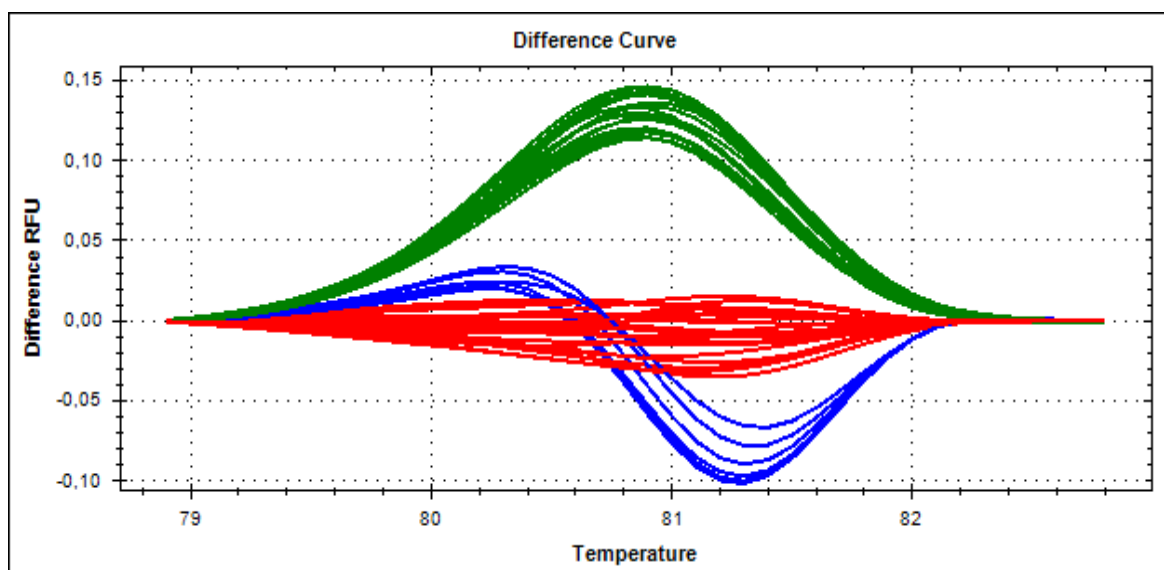


### 8.7. Analiza polimorfizmu rs526264 genu *BHMT2*



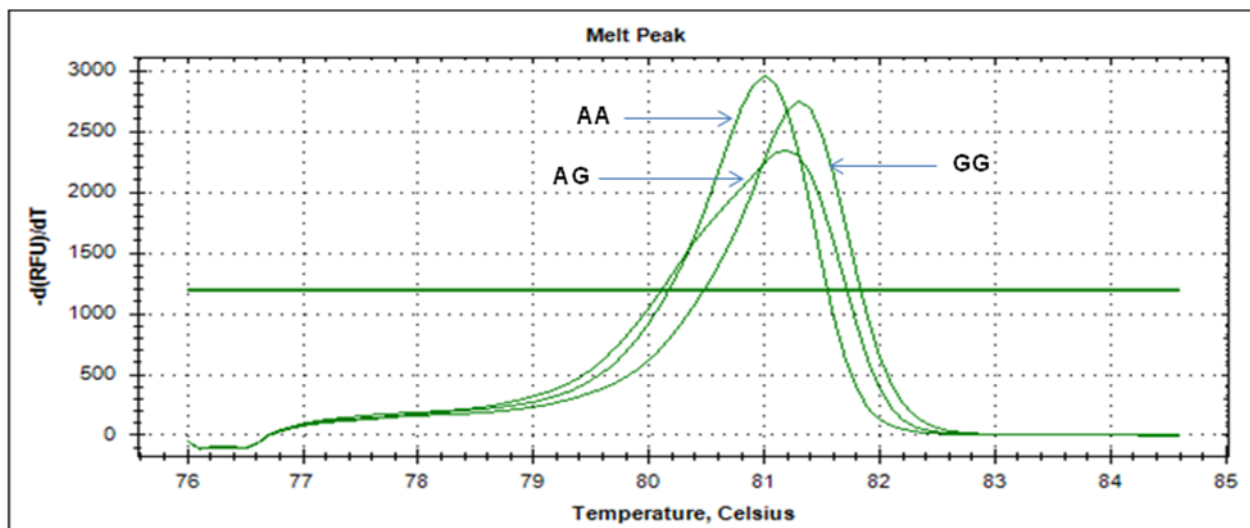
**Rycina 16. Analiza PCR RFLP polimorfizmu rs526264 genu *BHMT2*.**

Polimorfizm rs526264 genu *BHMT2* (A/T) powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu *MboI*. Allel A: 576 pz, allel T: 329 + 247 pz. Ścieżka: 2, 9 – homozygota AA, 1, 3, 5, 6, 7, 10 – homozygota TT, 4, 8 – heterozygota AT, M – wzorzec wielkości.

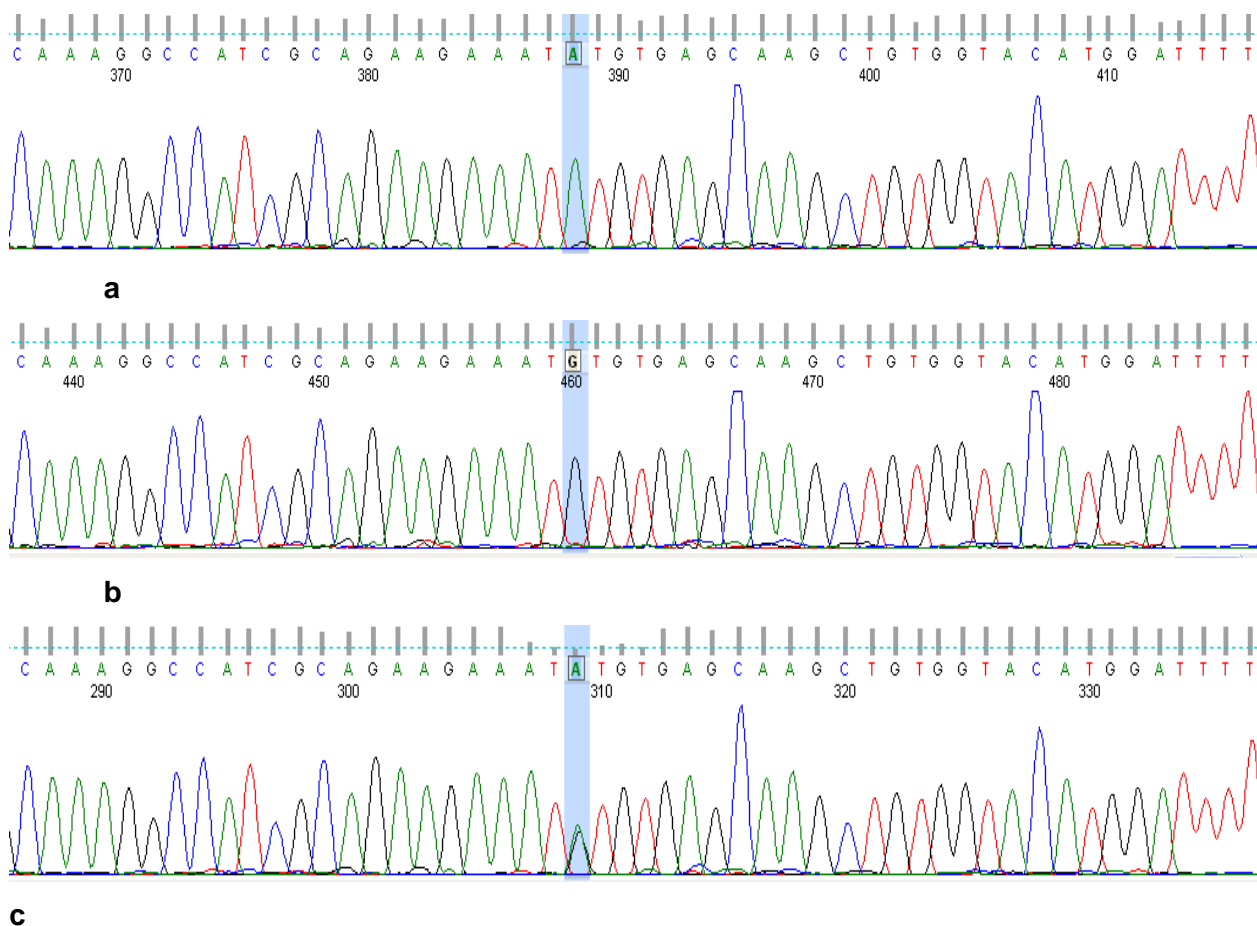
8.8. Analiza polimorfizmu rs1801394 genu *MTRR*

**Rycina 17. Analiza krzywych topnienia polimorfizmu rs1801394 genu *MTRR*.**

Dwie możliwości graficznego przedstawienia analizy.  
Kolorem zielonym oznaczono homozygoty GG,  
niebieskim homozygoty AA,  
czerwonym heterozygoty AG.



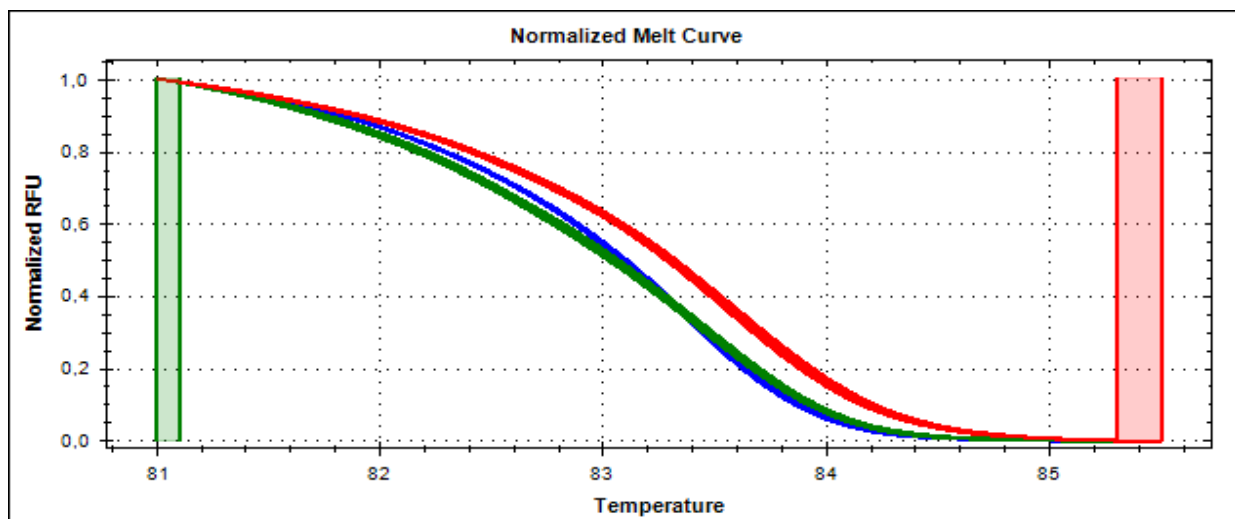
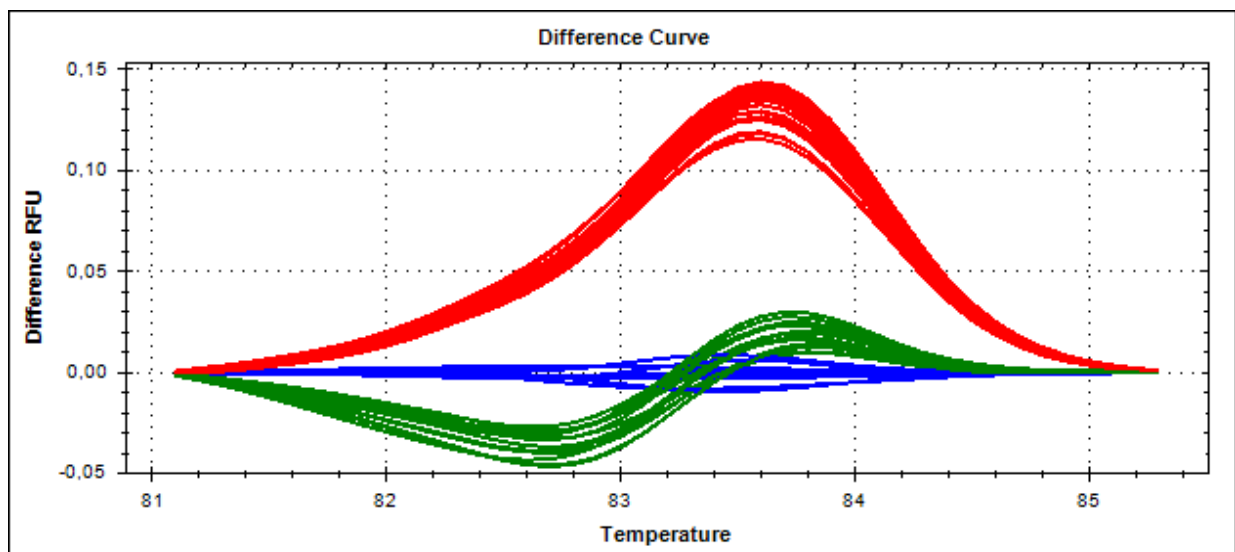
Rycina 18. Analiza pików topnienia DNA polimorfizmu rs1801394 genu *MTRR*



Rycina 19. Analiza sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu rs1801394 genu *MTRR*

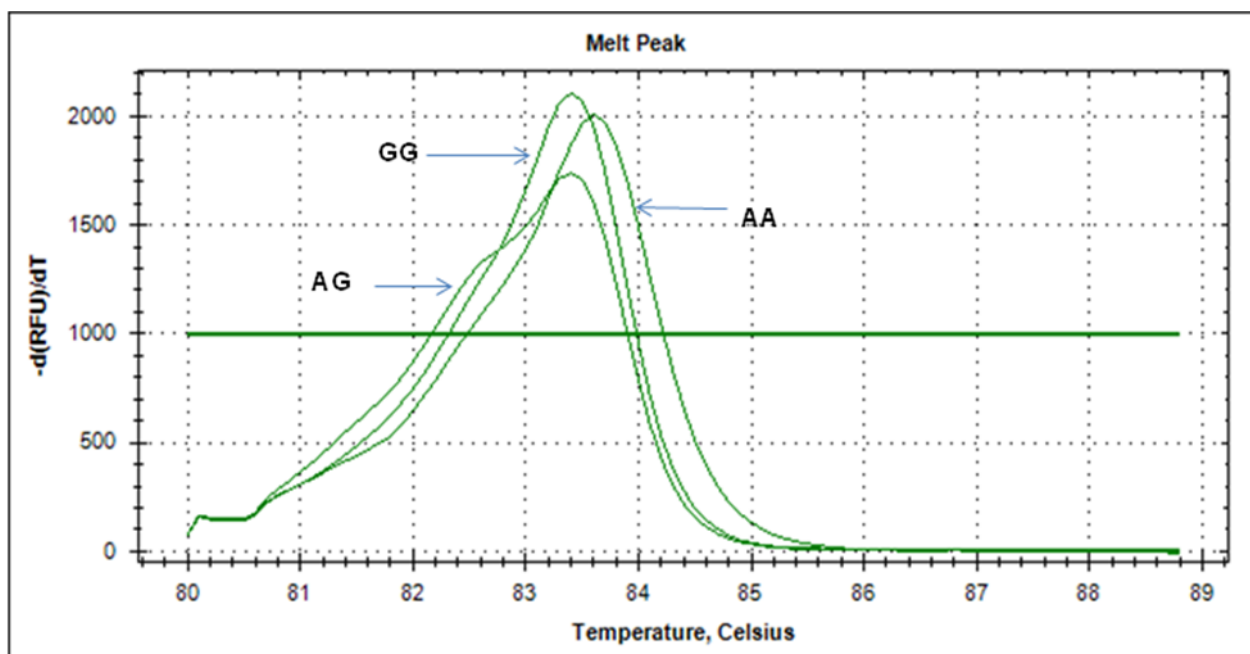
a) homozygota AA, b) homozygota GG, c) heterozygota AG

### 8.9. Analiza polimorfizmu rs3733890 genu *BHMT*

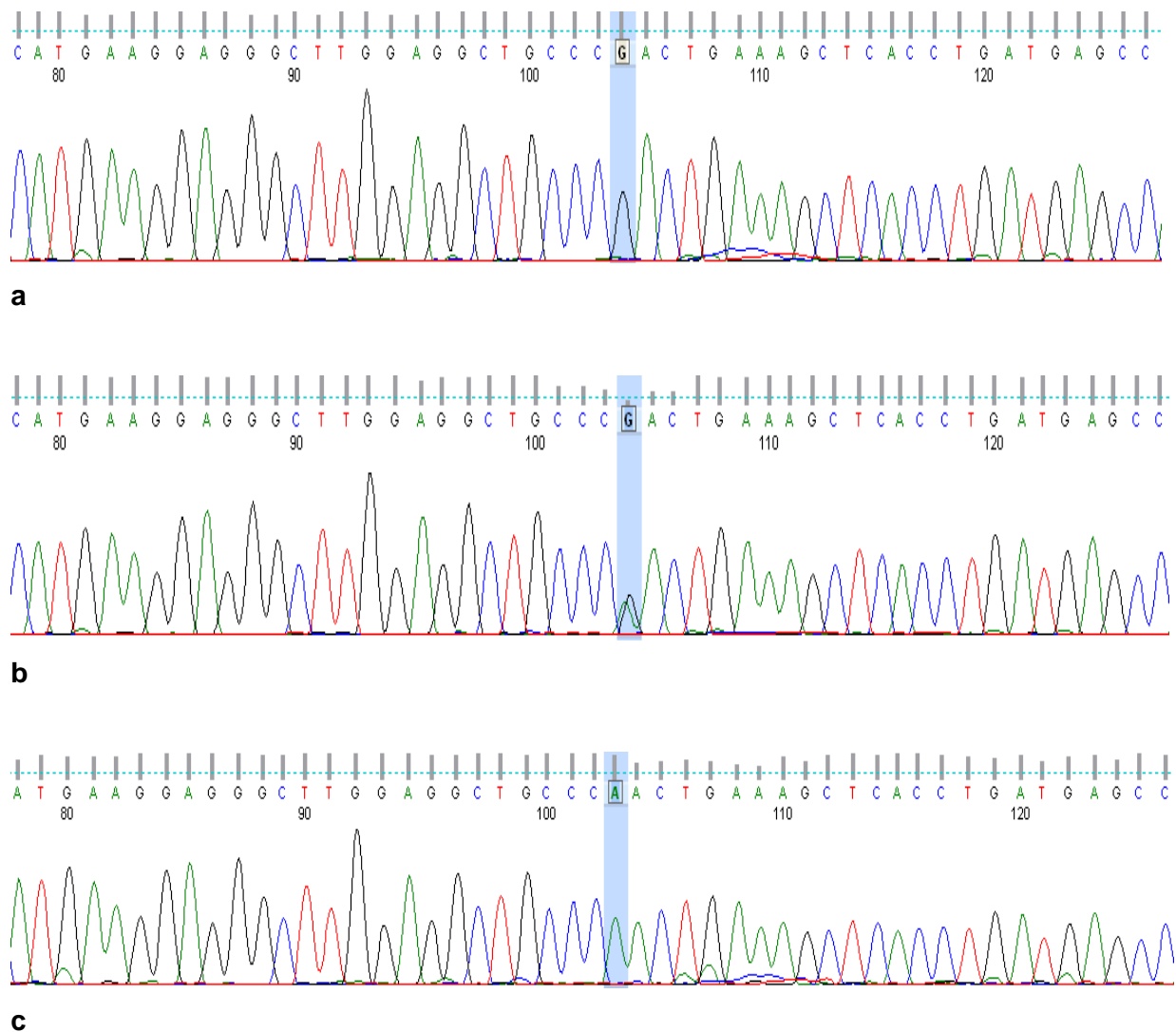


**Rycina 20. Analiza krzywych topnienia polimorfizmu rs3733890 genu *BHMT*.**

Dwie możliwości graficznego przedstawienia analizy.  
Kolorem zielonym oznaczono heterozygoty AG,  
niebieskim homozygoty AA ,  
czerwonym homozygoty GG.



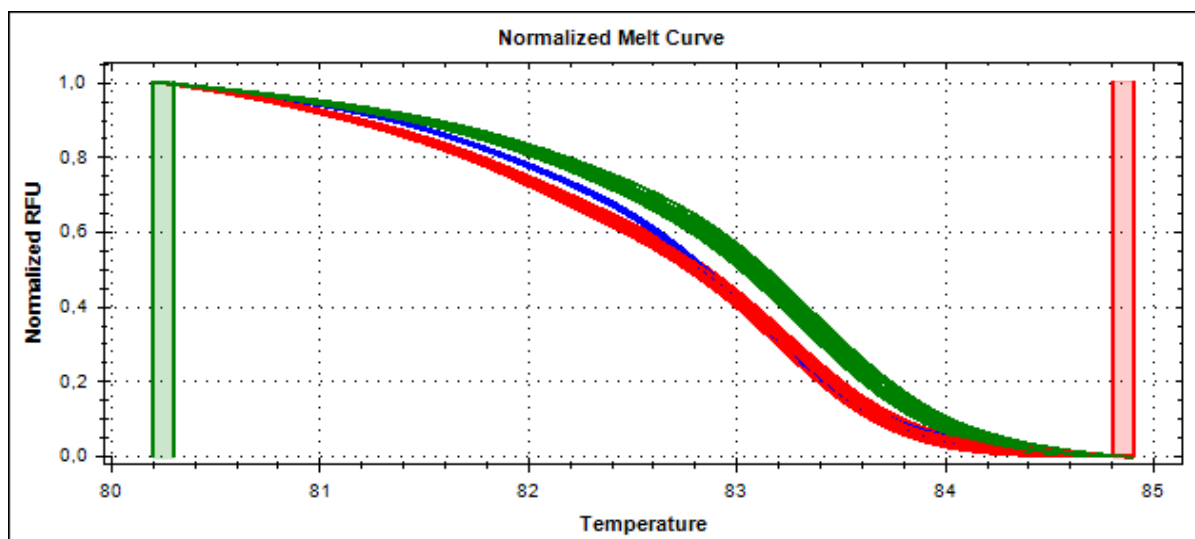
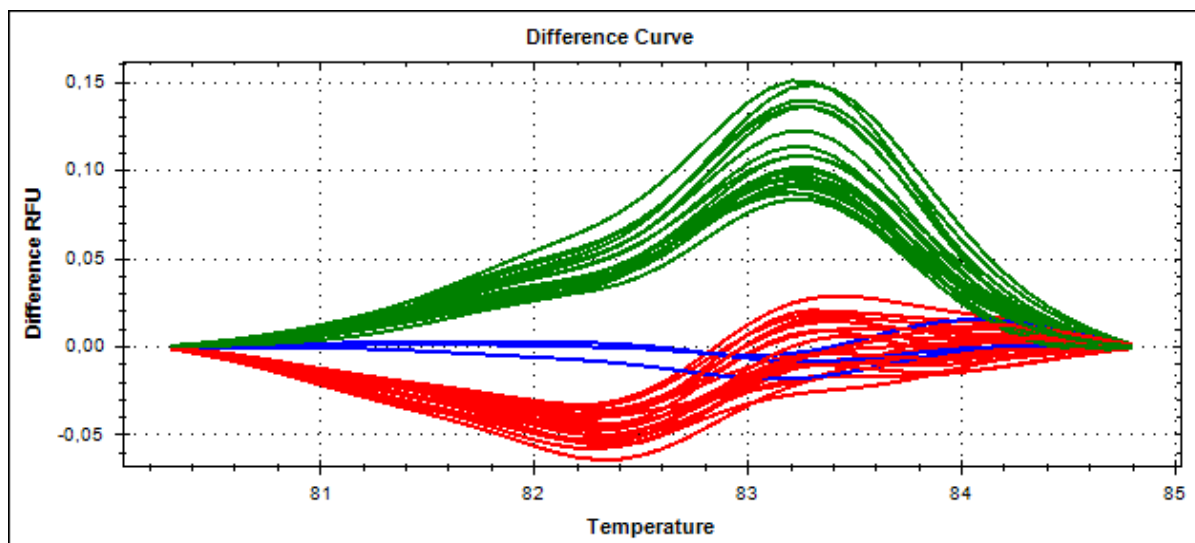
Rycina 21. Analiza pików topnienia DNA polimorfizmu rs3733890 genu *BHMT*



**Rycina 22. Analiza sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu rs3733890 genu *BHMT***

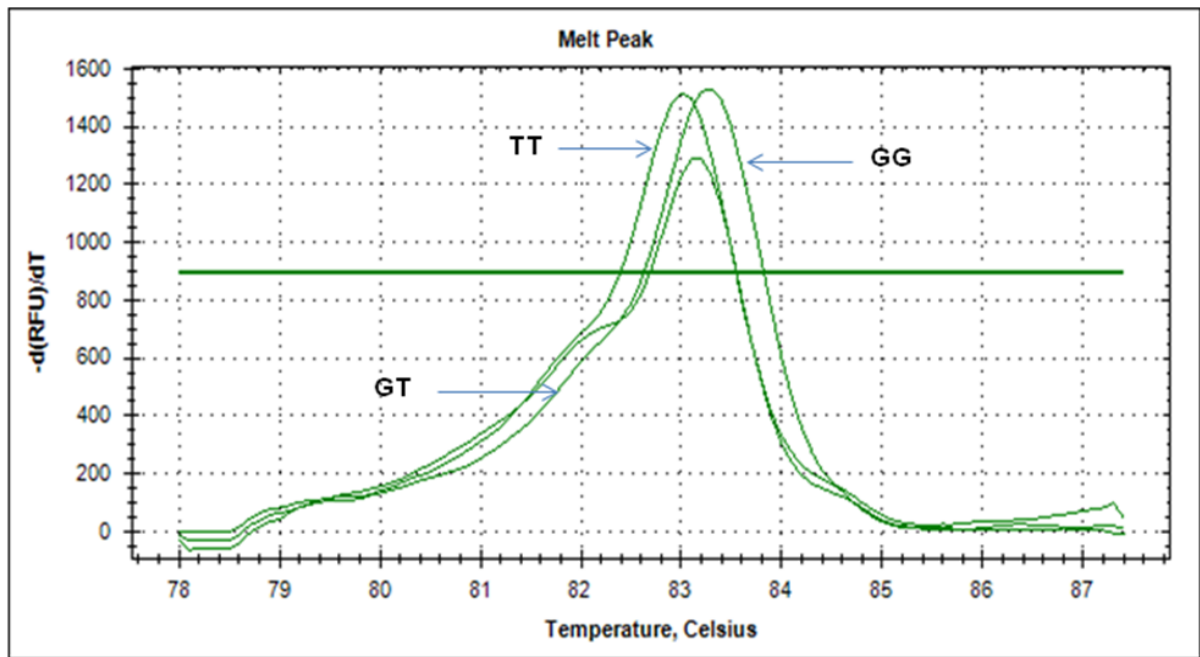
- a) homozygota GG,
- b) heterozygota AG,
- c) homozygota AA.

### 8.10. Analiza polimorfizmu rs625879 genu *BHMT2*

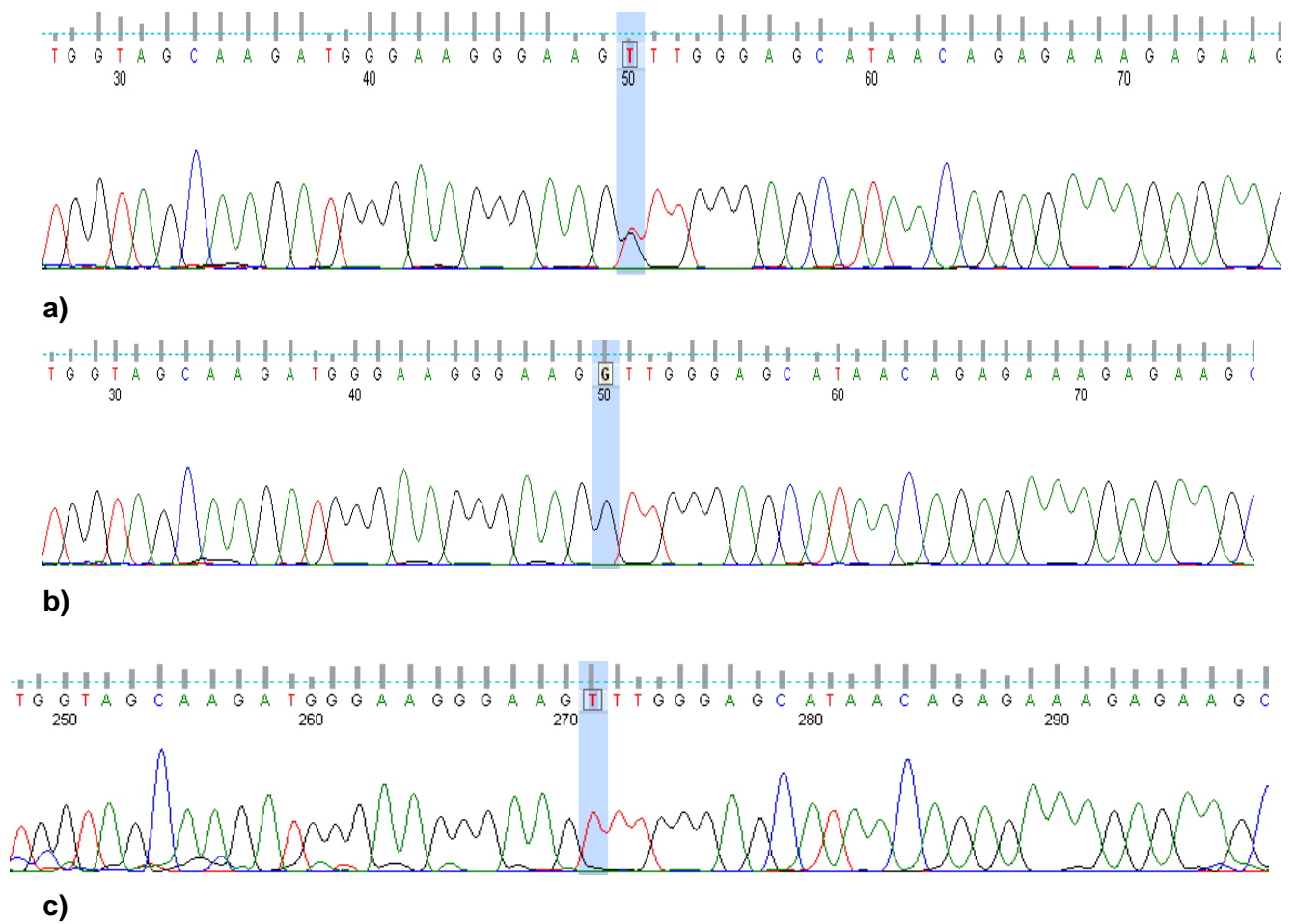


**Rycina 23. Analiza krzywych topnienia polimorfizmu rs625879 genu *BHMT2***

Dwie możliwości graficznego przedstawienia analizy.  
Kolorem zielonym oznaczono homozygoty GG,  
niebieskim homozygoty TT,  
czerwonym heterozygoty GT.



Rycina 24. Analiza pików topnienia DNA polimorfizmu rs625879 genu *BHMT2*



Rycina 25. Analiza sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu rs625879 genu *BHMT2*

a) heterozygota GT, b) homozygota GG, c) homozygota TT.



## 9. PIŚMIENICTWO

- [1] Dyzman - Sroka A., Nowotwory złośliwe w Wielkopolsce w 2008 roku, Wielkopolskie Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Biuletyn nr.7, Poznań 2010
- [2] World Health Statistics 2007, <http://www.who.int/whosis/whostat2007>
- [3] Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W., Nowotwory złośliwe w Polsce w 2008 roku, Centrum Onkologii Instytut im. im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2010
- [4] Markowska J., Ginekologia Onkologiczna pod redakcją Janiny Markowskiej wydawnictwo medyczne Urban&Partner Wrocław 2006
- [5] Grzybowski W., Beta J., Fritz A., Durczyński A., Bidziński M., Grabiec M., Jakimiuk A.J., Wartość predykcyjna stężenia CA 125 w diagnostyce raka jajnika u kobiet przed i po menopauzie, Ginekol Pol. 2010,81, 511-515
- [6] Hoskins W.J., [Prospective on ovarian cancer: why prevent?](#), J Cell Biochem Suppl. 1995; 23:189-99. Review
- [7] Chu C.S., Rubin S.C., [Screening for ovarian cancer in the general population](#), Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2006 Apr; 20(2): 307-20. Epub 2005 Dec 20. Review
- [8] Wolfe C.D., Tilling K., Raju K.S., [Management and survival of ovarian cancer patients in south east England](#), Eur J Cancer. 1997 Oct;33(11):1835-40
- [9] Patridge G., Philips J., Menck H., [et al.], The National Cancer Data Base Report on Ovarian Cancer Treatment in United States Hospitals, Cancer. 1996, 78, 2236-2246
- [10] Bast R.Jr., Knapp R., Use of the CA 125 antigen in diagnosis and monitoring of ovarian carcinoma, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1985, 19, 354-356
- [11] Fishman D., The present and future of biomarkers for early detection of epithelial ovarian carcinoma, In: Prognostic factors in epithelial ovarian carcinoma. Ed. Bosze P. CME J Gynecol Oncol. 1999, Chapter 13, 4, 1, 33-6
- [12] NCCN Practice Guidelines in Oncology – v. 1. 2006
- [13] Grosman-Dziewiszek P., Dziegiel P., Zabel M., Zaburzenia ekspresji genów w raku endometrium jako cel terapii, Ginekol. Pol. 2011, 82, 276-280
- [14] Amant F., Moerman P., Neven P., Timmerman D., Van Limbergen E., Vergote I., [Endometrial cancer](#). Lancet. 2005 Aug 6-12;366(9484):491-505. Review.
- [15] Kaźmierczak W., Rak endometrium – aspekty hormonalne, Ginekologia Praktyczna. 2004, 12, 13-16

- [16] Zorn K.K., Bonome T., Gangi L., Chandramouli G.V., Awtrey C.S., Gardner G.J., Barrett J.C., Boyd J., Birrer M.J., [Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer](#), Clin Cancer Res. 2005 Sep 15;11(18):6422-30
- [17] Jabłońska J., Jesionek-Kupnicka D., Zmiany epigenetyczne w nowotworach. Onkol.Pol. 2004, 7, 4:181-185
- [18] Fabianowska-Majewska K., Rola metylacji DNA w procesie kancerogenezy, Acta Haematologica Polonica, 2000, 31 Nr 4
- [19] Łukasik M., Karmalska J., Szutowski M.M., Łukaszewicz J., Wpływ metylacji DNA na funkcjonowanie genomu, Biul. Wydz. Farm. WUM, 2009, 2, 13 – 18
- [20] Sulewska A., Niklinska W., Kozłowski M., Minarowski L., et al., Folia Histochemica et Cytobiologica, Białystok 2007; 45 (4): 315-325
- [21] Hendrich B., Bird A., 10.Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation, Curr Top Microbiol Immunol. 2000;249:55-74. Review
- [22] Geiman T.M., Robertson K.D., [Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together?](#), J Cell Biochem. 2002;87(2):117-25. Review.
- [23] Mei F.C., Young T.W., Liu J, Cheng X., RAS-mediated epigenetic inactivation of OPCML in oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells, FASEB J. 2006 Mar; 20(3):497-9. Epub 2005 Dec 29
- [24] Teodoridis J.M., Hall J., Marsh S., Kannall H.D., Smyth C., Curto J., Siddiqui N., Gabra H., McLeod, Strathdee G., Brown R., CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer, Cancer Res. 2005 Oct 1;65(19):8961-7
- [25] Bystydzieński Z., Gos M., Gawrychowski K., Bidziński M., Badanie inaktywacji genu OPCML w materiale pochodzącym z raka jajnika, Przegląd Menopauzalny 2006; 6: 347–351
- [26] Magnowski P., et al., Polimorfizm MTHFR 677C>T nie wpływa na ryzyko rozwoju raka jajnika u nosicielek mutacji BRCA1 z Wielkopolski, Ginekol Pol. 2010, 81, 506-510
- [27] Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B., Herman J.G., A gene hypermethylation profile of human cancer Cancer, Res. 2001 Apr 15;61(8):3225-9.
- [28] Virmani A.K., Muller C., Rathi A., Zochbauer-Mueller S., Mathis M., Gazdar A.F., [Aberrant methylation during cervical carcinogenesis](#), Clin Cancer Res. 2001 Mar;7(3):584-9
- [29] Dong S.M., Kim H.S., Rha S.H., Sidransky D., [Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix](#), Clin Cancer Res. 2001 Jul;7(7):1982-6

- [30] Burri N., Shaw P., Bouzourene H., Sordat I., Sordat B., Gillet M., Schorderet D., Bosman F.T., Chaubert P., [Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer](#), Lab Invest. 2001 Feb;81(2):217-29
- [31] Costello J.F., Frühwald M.C., Smiraglia D.J., Rush L.J., Robertson G.P., Gao X., Wright F.A., Feramisco J.D., Peltomäki P., Lang J.C., Schuller D.E., Yu L., Bloomfield C.D., Caligiuri M.A., Yates A., Nishikawa R., Su Huang H., Petrelli N.J., Zhang X., O'Dorisio M.S., Held W.A., Cavenee W.K., Plass C., [Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns](#), Nat Genet. 2000 Feb;24(2):132-8
- [32] Guenther B.D., Sheppard C.A., Tran P., Rozen R., Matthews R.G., Ludwig M.L., The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from Escherichia coli suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia, Nat Struct Biol. 1999 Apr;6(4):359-65
- [33] Kurzawińska G., Polimorfizm genów warunkujących trombofilię wrodzoną w grupie kobiet z poronieniami w I trymestrze ciąży, Rozprawa doktorska. Pracownia Biologii Molekularnej w Klinice Perinatologii i Chorób Kobiety UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2008
- [34] de Bustros A., Nelkin B.D., Silverman A., Ehrlich G., Poiesz B., Baylin S.B., [The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia](#), Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Aug;85(15):5693-7
- [35] Kraczkowska S., Suchocka Z., Pachecka J., Podwyższone stężenie homocysteiny we krwi jak owskażnik zagrożenia zdrowia, Biul. Wydz. Farm. AMW, 2005, 3
- [36] Chen P., Poddar R., Tipa E.V., Dibello P.M., Moravec C.D., Robinson K., Green R., Kruger W.D., Garrow T.A., Jacobsen D.W., Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease, Adv Enzyme Regul. 1999;39:93-109
- [37] Irizarry M.C., Gurol M.E., Raju S., Diaz-Arrastia R., Locascio J.J., Tennis M., Hyman B.T., Growdon J.H., Greenberg S.M., Bottiglieri T., [Association of homocysteine with plasma amyloid beta protein in aging and neurodegenerative disease](#), Neurology. 2005 Nov 8;65(9):1402-8
- [38] Rosenquist T.H., Ratashak S.A., Selhub J., Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid, Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 24;93(26):15227-32
- [39] Akoglu B., Milovic V., Caspary W.F., Faust D., [Hyperproliferation of homocysteine-treated colon cancer cells is reversed by folate and 5-methyltetrahydrofolate](#), Eur J Nutr. 2004 Apr;43(2):93-9. Epub 2004 Jan 6
- [40] Rady P.L., Szucs S., Grady J., Hudnall S.D., Kellner L.H., Nitowsky H., Tyring S.K., Matalon R.K., [Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase \(MTHFR\)](#)

- and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet.* 2002 Jan 15;107(2):162-8
- [41] Ma J., Stampfer M.J., Christensen B., Giovannucci E., Hunter D.J., Chen J., Willett W.C., Selhub J., Hennekens C.H., Gravel R., Rozen R., A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Sep;8(9):825-9
- [42] Song C., Xing D., Tan W., Wei Q., Lin D., [Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population](#), *Cancer Res.* 2001 Apr 15; 61(8):3272-5
- [43] Jakubowska A., Gronwald J., Menkiszak J., Górski B., Huzarski T., Byrski T., Edler L., Lubiński J., Scott R.J., Hamann U., [Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms modify BRCA1-associated breast and ovarian cancer risks](#), *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Sep;104(3):299-308. Epub 2006 Oct 25
- [44] Esteller M., Garcia A., Martinez-Palones J.M., Xercavins J., Reventos J. [Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 \(C4887 CYP1A1\) and methylenetetrahydrofolate reductase \(MTHFR\) genes and endometrial cancer susceptibility](#), *Carcinogenesis.* 1997 Dec;18(12):2307-11
- [45] Parle-McDermott A., Pangilinan F., Mills J.L., Signore C.C., Molloy A.M., Cotter A., Conley M., Cox C., Kirke P.N., Scott J.M., Brody L.C., [A polymorphism in the MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss](#), *Mol Hum Reprod.* 2005 Jul;11(7):477-80
- [46] Olteanu H., [Munson T.](#), [Banerjee R.](#), Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase, *Biochemistry.* 2002 Nov 12;41(45):13378-85
- [47] Bethke L., Webb E., Murray A., Schoemaker M., Feychting M., Lönn S., Ahlbom A., Malmer B., Henriksson R., Auvinen A., Kiuru A., Salminen T., Johansen C., Christensen H.C., Muir K., McKinney P., Hepworth S., Dimitropoulou P., Lophatananon A., Swerdlow A., Houlston R., [Functional polymorphisms in folate metabolism genes influence the risk of meningioma and glioma](#), *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 May: 17(5):1195-202
- [48] Suzuki T., Matsuo K., Hirose K., Hiraki A., Kawase T., Watanabe M., Yamashita T., Iwata H., Tajima K., [One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer](#), *Carcinogenesis.* 2008 Feb;29(2):356-62. Epub 2008 Jan 3
- [49] Finkelstein J.D., Martin J.J., Harris B.J., [Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cystine](#), *J Biol Chem.* 1988 Aug 25;263(24):11750-4

- [50] Mostowska A., Hozyasz K.K., Biedziak B., Misiak J., Jagodzinski P.P., [Polymorphisms located in the region containing BHMT and BHMT2 genes as maternal protective factors for orofacial clefts](#), *Eur J Oral Sci.* 2010 Aug;118(4):325-32
- [51] Myka M., praca magisterska, Analiza polimorfizmów genów kodujących enzymy obiegu aktywnego metylu u kobiet z rakiem szyjki macicy, Wydział Biologii UAM Poznań 2010
- [60] Grossmann R., Schwender S., Geisen U., Schambeck C., Merati G., Walter U.. CBS 844ins68, MTHFR TT677 and EPCR 4031ins23 genotypes in patients with deep-vein thrombosis. *Thromb Res.* 2002 Jul 15;107(1-2):13-5
- [61] Ayala C., García R., Cruz E., Prieto K., Bermúdez M., Homocysteine levels and polymorphisms of MTHFR and CBS genes in Colombian patients with superficial and deep venous thrombosis]. *Biomedica.* 2010 Apr-Jun;30(2):259-67
- [62] Gąsiorowska D., Korzeniowska K., Jabłeczka A., Homocysteina, *Farmacja Współczesna* 2008; 1: 169-175
- [63] Domagała T.B., Rodzinna hiperhomocysteinemia a miażdżyca tętnic. Kraków: Medycyna Praktyczna; 2002: 9-29
- [64] Skoczyńska A., Homocysteina – czynnik aterogenny. W: *Patogeneza miażdżycy.* Wrocław: Elsevier Urban & Partner Sp. z.o.o.; 2006: 55-60
- [65] Hazra A, Fuchs CS, Kawasaki T, Kirkner GJ, Hunter DJ, Ogino S. Germline polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and DNA methylation in colorectal cancer. *Cancer Causes Control.* 2010; 21:331-345
- [66] Krakowczyk Ł., Strzelczyk J.K., Epigenetyczna modyfikacja ekspresji genów w rozwoju raka jelita grubego *Współczesna Onkologia* (2007) vol. 11; 6 (289–294)
- [67] Zetterberg H., Regland B., Palmér M., Rymo L., Zafiropoulos A., Arvanitis D.A., Spandidos D.A., Blennow K., The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion. *Hum Reprod.* 2002 Dec;17(12):3033-6
- [68] Kurzawińska G., et al. Genetycznie uwarunkowane zmiany w aktywności reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) a występowanie poronień nawracających *Ginekol Pol.* 2009, 80, 762-767
- [69] Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.J., den Heijer M., Kluijtmans L.A., van den Heuvel L.P., et al., A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995 May;10(1):111-3
- [70] Czeczot H., Kwas foliowy w fizjologii i patologii, *Postępy Hig Med. Dosw.* (online), 2008; 62: 405-419
- [71] Jacques R.F., Bostom A.G., Williams R.R., Ellison R.C., Eckfeldt J.H., Rosenberg I.H., Selhub J., Rozen R.: Relation between folate status, a common mutation in

methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, 1996; 93: 7–9

- [72] Verhoef P., Kok T.J., Kuliymans L.A.: The 667C/T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene associations with plasma total homocysteine levels and risk of coronary atherosclerotic disease, *Atherosclerosis*, 1997; 132: 105–112
- [73] Gershoni-Baruch R., Dagan E., Israeli D., Kasinetz L., Kadouri E., Friedman E., Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women. *Eur J Cancer*. 2000; 36:2313-2316
- [74] Terry K.L., Tworoger S.S., Goode E.L., Gates M.A., Titus-Ernstoff L., Kelemen L.E., Sellers T.A., Hankinson S.E., Cramer D.W., MTHFR polymorphisms in relation to ovarian cancer risk. *Gynecol Oncol*. 2010 Nov;119(2):319-24
- [75] Kelemen L.E., Sellers T.A., Schildkraut J.M., Cunningham J.M., Vierkant R.A., Pankratz V.S., Fredericksen Z.S., Gadre M.K., Rider D.N., Liebow M., Goode E.L., Genetic variation in the one-carbon transfer pathway and ovarian cancer risk. *Cancer Res*. 2008 Apr 1;68(7):2498-506
- [76] Xu W.H., Shrubsole M.J., Xiang Y.B., Cai Q., Zhao G.M., Ruan Z.X., Cheng J.R., Zheng W., Shu X.O., Dietary folate intake, MTHFR genetic polymorphisms, and the risk of endometrial cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Feb;16(2):281-7. Erratum in: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Mar;17(3):743
- [77] Gudnason V., Stansbie D., Scott J., Bowron A., Nicaud V., Humphries S.: C677 T (Thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentrations in different European populations. *Atherosclerosis*, 1998; 136: 347–354
- [78] Paynter R.A., Hankinson S.E., Hunter D.J., De Vivo I., No association between MTHFR 677 C->T or 1298 A->C polymorphisms and endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Jun;13(6):1088-9
- [79] Esteller M., Garcia A., Martinez-Palones J.M., Xercavins J., Reventos J., Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 1997 Dec; 18(12):2307-11
- [80] Mostowska A., Myka M., Lianeri M., Roszak A., Jagodziński P.P., Folate and choline metabolism gene variants and development of uterine cervical carcinoma. *Clin Biochem*. 2011 Jun;44(8-9):596-600. Epub 2011 Feb 22
- [81] Piyathilake C.J., Macaluso M., Johanning G.L., Whiteside M., Heimburger D.C., Giuliano A., Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res*. 2000 May-Jun;20(3A):1751-7

- [82] Kang S., Kim J.W., Kang G.H., Park N.H., Song Y.S., Kang S.B., Lee H.P., Polymorphism in folate- and methionine-metabolizing enzyme and aberrant CpG island hypermethylation in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2005 Jan;96(1):173-80
- [83] Skibola C.F, Forrest M.S., Coppedé F., et al., Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2004;104:2155-2162
- [84] Bethke L., Webb E., Murray A., et al. Functional polymorphisms in folate metabolism genes influence the risk of meningioma and glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:1195-1202
- [85] Neumann A.S., Lyons H.J., Shen H., et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Int J Cancer.* 2005; 115:131-136
- [86] Liu Y.X., Wang B., Wan M.H., Tang W.F., Huang F.K., Li C., Meta-analysis of the Relationship between the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Genetic Polymorphism, Folate Intake and Esophageal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011; 12:247-252
- [87] Arslan S., Karadayi S., Yildirim M.E., Ozdemir O., Akkurt I., The association between methylene-tetrahydrofolate reductase gene polymorphism and lung cancer risk. *Mol Biol Rep.* 2011; 38:991-996
- [88] Maruti S.S., Ulrich C.M., Jupe E.R., White E., MTHFR C677T and postmenopausal breast cancer risk by intakes of one-carbon metabolism nutrients: a nested case-control study. *Breast Cancer Res.* 2009; 11:R91
- [89] Lacasaña-Navarro M., Galván-Portillo M., Chen J., López-Cervantes M., López-Carrillo L., Methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism and gastric cancer susceptibility in Mexico. *Eur J Cancer.* 2006; 42:528-533
- [90] Iacopetta B., Heyworth J., Girschik J., Grieu F., Clayforth C., Fritschi L., The MTHFR C677T and DeltaDNMT3B C-149T polymorphisms confer different risks for right- and left-sided colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2009; 125:84-90
- [91] Sood S., Das R., Trehan A., et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: association with risk for pediatric acute lymphoblastic leukemia in north Indians. *Leuk Lymphoma.* 2010;51:928-932
- [92] Kim Y.I., Role of the MTHFR polymorphisms in cancer risk modification and treatment. *Future Oncol.* 2009 May;5(4):523-42
- [93] Hubner R.A., Houlston R.S., Folate and colorectal cancer prevention. *Br J Cancer.* 2009 Jan 27;100(2):233-9. Epub 2008 Dec 16. Review
- [94] Bailey L.B., Gregory J.F. III: Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J. Nutr.,* 1999; 129: 919–922

- [95] Chango A., Boisson F., Barbe F., The effect of 677C/T nad 1289 A/C mutation on plasma homocysteine nad 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Br. J. Nutr.*, 2000; 83: 593–596
- [96] Domagała B., Czachór R., Twardowska M., Rybak M., Szczeklik A., Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, familial hyperhomocysteinemia and atherothrombosis. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 2000; 32: 342–346
- [97] Pawlak A.L., Strauss E.: Polimorfi zm genu reduktazy metylenetetrahydrofolianowej (MTHFR) a występowanie chorób związanych z hiperhomocysteinemią. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2001; 55: 233–256
- [98] van der Put N.M., Gabreels F., Stevens E.M., Smeitink J.A., Trijbels F.J., Eskes T.K., van den Heuvel L.P., Blom H.J.: A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am. J. Hum. Genet.*, 1998; 62: 1044–1051
- [99] Tong S.Y, Lee J.M., Song E.S., Lee K.B., Kim M.K., Yun Y.M., Lee J.K., Son S.K., Lee J.P., Kim J.H., Hur S.Y., Kwon Y.I., [The effects of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase \(MTHFR\), methionine synthase \(MTR\), and methionine synthase reductase \(MTRR\) on the risk of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Korean women.](#) *Cancer Causes Control.* 2010 Jan;21(1):23-30. Epub 2009 Sep 17
- [100] Webb P.M., Ibiebele T.I., Hughes M.C., Beesley J., van der Pols J.C., Chen X., Nagle C.M., Bain C.J., Chenevix-Trench G., [Folate and related micronutrients, folate-metabolising genes and risk of ovarian cancer.](#) *Eur J Clin Nutr.* 2011 Jun 1
- [101] Zhang Z., Shi Q., Liu Z., Sturgis E.M., Spitz M.R., Wei Q., Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14:1188-1193
- [102] Ma E., Iwasaki M., Junko, et al. Dietary intake of folate, vitamin B6, and vitamin B12, genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women. *BMC Cancer.* 2009; 9:122
- [103] Matsuo K., Ito H., Wakai K., et al. One-carbon metabolism related gene polymorphisms interact with alcohol drinking to influence the risk of colorectal cancer in Japan. *Carcinogenesis.* 2005; 26:2164-2171
- [104] de Lima E.L., da Silva V.C., da Silva H.D., et al. MTR polymorphic variant A2756G and retinoblastoma risk in Brazilian children. *Pediatr Blood Cancer.* 2010; 54:904-908
- [105] Lima C.S., Ortega M.M., Ozelo M.C., et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR), methionine synthase reductase



- (MTRR), and thymidylate synthase (TYMS) in multiple myeloma risk. *Leuk Res.* 2008;32:401-405
- [106] Matsuo K., Suzuki R., Hamajima N., Ogura M., Kagami Y., Taji H., Kondoh E., Maeda S., Asakura S., Kaba S., Nakamura S., Seto M., Morishima Y., Tajima K., Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood.* 2001 May 15;97(10):3205-9
- [107] Bethke L., Webb E., Murray A., Schoemaker M., Feychting M., Lönn S., Ahlbom A., Malmer B., Henriksson R., Auvinen A., Kiuru A., Salminen T., Johansen C., Christensen H.C., Muir K., McKinney P., Hepworth S., Dimitropoulou P., Lophatananon A., Swerdlow A., Houlston R., Functional polymorphisms in folate metabolism genes influence the risk of meningioma and glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 May;17(5):1195-202
- [108] Suzuki T., Matsuo K., Hirose K., Hiraki A., Kawase T., Watanabe M., Yamashita T., Iwata H., Tajima K., One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Carcinogenesis.* 2008 Feb;29(2):356-62. Epub 2008 Jan 3
- [109] Collin S.M., Metcalfe C., Zuccolo L., Lewis S.J., Chen L., Cox A., Davis M., Lane J.A., Donovan J., Smith G.D., Neal D.E., Hamdy F.C., Gudmundsson J., Sulem .P, Rafnar T., Benediktsdottir K.R., Eeles RA, Guy M., Kote-Jarai Z.; UK Genetic Prostate Cancer Study Group, Morrison J., Al Olama A.A., Stefansson K., Easton D.F., Martin R.M., Association of folate-pathway gene polymorphisms with the risk of prostate cancer: a population-based nested case-control study, systematic review, and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Sep; 18(9):2528-39. Epub 2009 Aug 25. Review. Erratum in: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Sep; 19(9):2416
- [110] Suzuki T., Matsuo K., Sawaki A., Mizuno N., Hiraki A., Kawase T., Watanabe M., Nakamura T., Yamao K., Tajima K., Tanaka H., Alcohol drinking and one-carbon metabolism-related gene polymorphisms on pancreatic cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Oct; 17(10):2742-7
- [111] Mostowska A., Hozyasz K.K., Biedziak B., Misiak J., Jagodzinski P.P., Polymorphisms located in the region containing BHMT and BHMT2 genes as maternal protective factors for orofacial clefts. *Eur J Oral Sci.* 2010 Aug;118(4):325-32
- [112] Finkelstein J.D., Martin J.J., Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem.* 1984 Aug 10; 259(15):9508-13
- [113] Li F., Feng Q., Lee C., Wang S., Pelleymounter L.L., Moon I., Eckloff B.W., Wieben E.D., Schaid D.J., Yee V., Weinshilboum R.M., Human betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and BHMT2: common gene sequence variation and functional characterization. *Mol Genet Metab.* 2008 Jul;94(3):326-35. Epub 2008 May 23

- [114] Xu X., Gammon M.D., Zeisel S.H., Lee Y.L., Wetmur J.G., Teitelbaum S.L., Bradshaw P.T., Neugut A.I., Santella R.M., Chen J, Choline metabolism and risk of breast cancer in a population-based study. *FASEB J.* 2008 Jun;22(6):2045-52. Epub 2008 Jan 29
- [115] Xu X., Gammon M.D., Zeisel S.H., Bradshaw P.T., Wetmur J.G., Teitelbaum S.L., Neugut A.I., Santella R.M., Chen J., High intakes of choline and betaine reduce breast cancer mortality in a population-based study. *FASEB J.* 2009 Nov;23(11):4022-8. Epub 2009 Jul 27
- [116] Hazra A., Wu K., Kraft P., Fuchs C.S., Giovannucci E.L., Hunter D.J., Twenty-four non-synonymous polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway and risk of colorectal adenoma in the Nurses' Health Study. *Carcinogenesis* 2007;28:1510-1519
- [117] Krajcinovic M., MTHFD1 gene: role in disease susceptibility and pharmacogenetics *Pharmacogenomics.* 2008 Jul;9(7):829-32
- [118] Hol F.A., van der Put N.M., Geurds M.P., et al.: Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. *Clin. Genet.*2(53),119–125 (1998)
- [119] De Marco P., Merello E., Calevo M.G., et al.: Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk. *J. Hum. Genet.* 2(51),98–103 (2006).
- [120] Brody L.C., Conley M., Cox C., et al.: A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the Birth Defects Research Group. *Am. J. Hum. Genet.* 5(71),1207–1215
- [121] Parle-McDermott A., Kirke P.N., Mills J.L., et al.: Confirmation of R653Q polymorphisms of the trifunctional C1-synthase enzymes as a maternal risk for neural tube defects in the Irish population. *Eur. J. Hum. Genet.*14(6),768–772 (2006)
- [122] Parle-McDermott A., Pangilinan F., Mills J.L., et al.: A polymorphism in the *MTHFD1* gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. *Mol. Hum. Reprod.*7(11),477–480 (2005)
- [123] Stevens V L., McCullough M.L., Pavluck A.L., et al.: Association of polymorphisms in one-carbon metabolism genes and postmenopausal breast cancer incidence *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*16(6),1140–1147 (2007)
- [124] Li S.Y., Rong M., Iacopetta B.: Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in human breast cancer. *Oncol. Rep.*1(15),221–225 (2006)

- [125] Wang L., Ke Q., Chen W., et al.: Polymorphisms of *MTHFD*, plasma homocysteine levels, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Clin. Cancer Res.* 8(13),2526–2532 (2007)
- [126] Krajcinovic, Lemieux-Blanchard, Chiasson S., et al.: Role of polymorphisms in *MTHFR* and *MTHFD1* genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 1(4),66–72 (2004)
- [127] Kempisty B., Sikora J., Lianeri M., et al.: *MTHFD* 1958G>A and *MTR* 2756A>G polymorphisms are associated with bipolar disorder and schizophrenia. *Psychiatr. Genet.* 3(17),177–181 (2007)
- [128] Dorszewska J., Florczak J., Rozycka A., Kempisty B., Jaroszevska-Kolecka J., Chojnacka K., Trzeciak W.H., Kozubski W., Oxidative DNA damage and level of thiols as related to polymorphisms of *MTHFR*, *MTR*, *MTHFD1* in Alzheimer's and Parkinson's diseases *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2007;67(2):113-29
- [129] Silva L.M., Silva J.N., Galbiatti A.,L, et al. Head and neck carconogenesis: impact of *MTHFD1* G1958A polymorphism. *Rev Assoc Med Bras*. 2011;57:194-199
- [130] DiSaia P. J., Creasman W.T., *Ginekologia onkologiczna*, wydanie piąte, Wydawnictwo Czelej Sp. z o.o. 1999.

## 10. STRESZCZENIE

Nowotwory złośliwe jajnika i błony śluzowej trzonu macicy są jednymi z najczęstszych nowotworów złośliwych u kobiet. Istotną rolę w patogenezie tych nowotworów odgrywają czynniki genetyczne. Identyfikacja polimorfizmów genów predysponujących do wystąpienia tych nowotworów jest konieczna dla ustalenia ich podłoża genetycznego. Genami kandydackimi dla nowotworów złośliwych jajnika i błony śluzowej trzonu macicy są geny obiegu aktywnego metylu związane z procesami metylacji DNA. Hipo- i hipermetylacja to procesy epigenetyczne związane z regulującą ekspresji genów. Zaburzenia procesu metylacji mogą prowadzić do transformacji nowotworowej.

Celem pracy jest analiza związku 10 wybranych polimorfizmów genów kodujących enzymy obiegu aktywnego metylu: *CBS* (844ins68), *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133), *MTRR* (rs1801394), *MTHFD1* (rs2236225), *TCN2* (rs1801198), *BHMT* (rs7356530), *BHMT* (rs3733890), *BHMT2* (rs526264), *BHMT2* (rs625879) z ryzykiem zachorowania na nowotwory złośliwe jajnika i błony śluzowej trzonu macicy w grupie kobiet należącej do populacji polskiej.

Badaniami została objęta grupa 136 pacjentek z potwierdzonym histopatologicznie nowotworem złośliwym jajnika oraz grupa 86 pacjentek potwierdzonym histopatologicznie nowotworem złośliwym błony śluzowej trzonu macicy. Grupę kontrolną stanowiło 160 zdrowych kobiet.

Amplifikację fragmentów genów z badanymi polimorfizmami przeprowadzono przy użyciu metody PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy DNA), a genotypowanie polimorfizmów metodą RFLP (analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych) lub HRM (wysokorozdzielcza analiza temperatury topnienia produktów PCR).

Wyniki przeprowadzonych badań są następujące:

1. Porównanie częstości alleli oraz genotypów polimorfizmów genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* nie wykazało istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą chorych z nowotworami złośliwymi jajnika oraz błony śluzowej trzonu macicy a grupą kontrolną.
2. Analiza ilorazu szans oraz interakcji pomiędzy poszczególnymi polimorfizmami genów *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* nie wykazała

związku tych wariantów genowych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworów złośliwych jajnika i błony śluzowej trzonu macicy.

3. Badanie rozkładu poszczególnych haplotypów dla polimorfizmów genów *BHMT* (rs7356530 i rs3733890) i *BHMT2* (rs526264 i rs625879) nie wykazało związku z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika oraz błony śluzowej trzonu macicy.

Na podstawie przeprowadzonych badań i analiz sformułowano następujące wnioski:

Polimorfizmy genów kodujących enzymy obiegu aktywnego metylu: *CBS* (844ins68), *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133), *MTRR* (rs1801394), *MTHFD1* (rs2236225), *TCN2* (rs1801198), *BHMT* (rs7356530), *BHMT* (rs3733890), *BHMT2* (rs526264), *BHMT2* (rs625879) nie wykazują związku z ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy jajnika i błony śluzowej trzonu macicy w grupie badanej. Polimorfizmy te nie wykazują także kooperatywnego udziału w etiologii tych nowotworów.

### 11. SUMMARY

Ovarian and endometrial cancer are the most common malignancies in women. Genetic factors may play an important role in the pathogenesis of these tumors. Candidate genes for ovarian and endometrial cancer are activated by methyl cycle and associated with the processes of DNA methylation. Hypo- and hypermethylation are epigenetic processes that regulate gene expression. Abnormalities in the methylation process can lead to neoplastic transformation. Identification of candidate genes is necessary to establish the genetic background of this disease.

To evaluate the association between selected 10 polymorphisms of genes methyl cycle: *CBS* (844ins68), *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133), *MTRR* (rs1801394), *MTHFD1* (rs2236225), *TCN2* (rs1801198), *BHMT* (rs7356530), *BHMT* (rs3733890), *BHMT2* (rs526264), *BHMT2* (rs625879) and the risk of developing ovarian and endometrial cancer in women belonging to the Polish population.

The analysis of selected polymorphisms was conducted in the group of 136 patients with ovarian cancer and 86 patients with endometrial cancer. Control group contain 160 healthy women.

The amplification of DNA fragments containing selected polymorphisms was performed using polymerase chain reaction (PCR). The genotyping of selected polymorphisms was conducted using RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) or HRM (High - Resolution Melting) analyses.

Results of research carried out are as follows:

1. Comparison of allele frequencies and genotypes of polymorphisms of genes *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* showed no statistically significant differences between the group of patients with ovarian and endometrial cancer and the control group.

2. Analysis of odds ratios and interaction between polymorphisms of genes *CBS*, *MTR*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *TCN2*, *BHMT*, *BHMT*, *BHMT2*, *BHMT2* showed no relationship of these genetic variants with increased risk of ovarian and endometrial cancer.

3. Study the distribution of individual haplotypes for BHMT gene polymorphisms (rs7356530 and rs3733890) and BHMT2 (rs526264 and rs625879) showed no relation to the risk of developing ovarian cancer and endometrial cancer.

Based on research and analysis carried and the following conclusions were stated:  
Polymorphisms genes: CBS (844ins68), MTR (rs1805087), MTHFR (rs1801133), MTRR (rs1801394), MTHFD1 (rs2236225), TCN2 (rs1801198), BHMT (rs7356530), BHMT (rs3733890), BHMT2 (rs526264), BHMT2 (rs625879) show no relation to the risk of developing ovarian and endometrial cancer in the study group. These polymorphisms do not show the cooperative participation in the etiology of these tumors.