

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Asta Ščesnaitė-Jerdiakova

**PLAUČIŲ IR GALVOS-KAKLO NAVIKŲ DNR METILINIMO
ŽYMENYS**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biologija (01B)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2006 - 2010 metais Botanikos genetikos katedroje, Gamtos mokslų fakultete, Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija - 01B).

Mokslinis konsultantas:

prof. dr. Kirsti Husgafvel-Pursiainen (Suomijos profesinės sveikatos institutas, biomedicinos mokslai, biologija - 01B). 2006 - 2008 m.m.

Disertaciją recenzavo prof. Izolda Pašakinskienė ir prof. Kęstutis Sužiedėlis

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	7
I. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1. DNR metilinimas fiziologiniuose procesuose	13
2. DNR metilinimo pokyčiai vėžinėse ląstelėse	18
3. DNR metilinimas - vėžio žymuo	19
4. Plaučių vėžio epidemiologija ir patogenezė	21
5. Plaučių vėžio molekuliniai patogenezės mechanizmai	22
6. Galvos-kaklo vėžio epidemiologija ir patogenezė	26
7. Galvos-kaklo vėžio molekuliniai patogenezės mechanizmai	28
8. Naviką slopinančių genų <i>p16</i> , <i>p14</i> , <i>RARB</i> , <i>RASSF1</i> , <i>MGMT</i> ir <i>DAPK1</i> charakteristikos	30
9. Naviką slopinančių genų <i>p16</i> , <i>p14</i> , <i>RARB</i> , <i>RASSF1</i> , <i>MGMT</i> ir <i>DAPK1</i> metilinimo pažaidų tyrimai plaučių ir galvos-kaklo navikuose	31
II. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI	35
1. Tiriamųjų grupės	35
2. Tyrimo metodai	40
2.1. DNR paruošimas epigenetinei analizei	40
2.2. DNR metilinimo tyrimai naudojant metilimumi jautrią PGR	43
2.3. DNR metilinimo tyrimai pirosekvenavimo metodu	44
2.4. PGR produkto elektroforezinis įvertinimas	45
2.5. Imunohistocheminė baltymo MGMT raiškos analizė	46
2.6. Statistinė duomenų analizė	47
III. REZULTATAI	48
1. Genų <i>p16</i> , <i>RARB</i> , <i>RASSF1</i> , <i>MGMT</i> ir <i>DAPK1</i> promotoriaus DNR metilinimas plaučių navikuose	48
2. Genų <i>p16</i> , <i>p14</i> , <i>RARB</i> , <i>RASSF1</i> ir <i>MGMT</i> promotoriaus DNR metilinimas galvos-kaklo navikuose	53
3. <i>MGMT</i> geno promotoriaus metilinimas ir MGMT baltymo raiškos	

praradimas seilių liaukų navikuose	58
IV. REZULTATŲ APTARIMAS	62
IŠVADOS	68
LITERATŪROS SĄRAŠAS	69
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	83
PRIEDAS	85
PADĖKA	87

SANTRUMPOS

- 5-aza-dC - 5-aza-2-deoksicitidinas, DNMT inhibitorius
- AK - adenokarcinoma
- ATD - aplinkos tabako dūmai
- CpG - C - citozinas, p - fosfodiesterinė jungtis, G - guaninas
- DAPK1* - nuo kalcio ir kalmodulino priklausoma serino/treonino kinazė, naviką slopinantis genas
- DNMT - DNR metiltransferazė
- DNR - deoksiribonukleorūgštis
- FIOH - Suomijos profesinės sveikatos institutas (angl.k., Finnish Institute of Occupational Health)
- HDAC1/2 - histonų deacetilazės (angl.k., histone deacetylase 1/2)
- IARC - tarptautinė vėžio tyrimų agentūra (angl.k., International Agency for Research on Cancer)
- ICF - sindromas, kurį sukelia mutacijos *Dnmt3* gene, (angl.k., Immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies)
- LOH - heterozigotiškumo praradimas (angl.k., loss of heterozygosity)
- LOI - imprintingo praradimas (angl.k. loss of imprinting)
- MGMT* - O6-metilguanino-DNR metiltransferazė, naviką slopinantis genas
- MSP - metilnimui jautri PGR, (angl.k., methylation specific PCR)
- NSG - naviką slopinantis genas
- NSPK - nesmulkialąstelinė plaučių karcinoma, (angl.k., non-small cell lung cancer)
- p14* - naviką slopinantis genas, koduoja baltymą, slopinantį p53 proteolizę
- p16/INK4α/CDKN2A* - naviką slopinantis genas, CDK4 inhibitorius
- p53* - naviką slopinantis genas
- PGR - polimerazės grandininė reakcija
- PK - plaučių karcinoma
- PLK - plokščialąstelinė plaučių karcinoma
- RBI* - naviką slopinantis genas, koduoja retinoblastomos baltymą

RARB - retinoinės rūgšties receptoriaus β genas (angl.k., Retinoic acid receptor, beta)

RASSF1 - su Ras susijusio domeno 1A šeimos genas (angl.k., Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1)

RNR - ribonukleorūgštis

SAM - S-adenosilmetioninas

SPK - smulkialąstelinė plaučių karcinoma, (angl.k., small cell lung cancer)

IVADAS

Plaučių bei galvos-kaklo navikai - vienos labiausiai paplitusių ir didžiausiu mirtingumu pasižyminčių onkologinių ligų Lietuvoje ir pasaulyje. Pastarąjį dešimtmetį sergamumas Lietuvoje šiomis ligomis nekito; ilgametis mirtingumas taip pat lieka patovus. Sergant šių lokalizacijų vėžiu, prognozės yra prastos, pavyzdžiui, plaučių vėžio ligonių 5 metų išgyvenamumas Lietuvoje siekia apie 9%, Europoje - 10%, pasaulyje - 15% (Dobrovolskienė et al, 2010).

Svarbiausias plaučių ir galvos-kaklo vėžio etiologinis veiksnys yra rūkymas. Tabako sudėtyje esantys kancerogenai ir prokancerogenai (benzo(a)pirenas, policikliniai aromatiniai angliavandeniliai, arilaminai, nitrozoamino ketonas) tiesiogiai sukelia genetines ir epigenetines pažaidas (Hecht, 2003). Epigenetiniai pokyčiai, ypač naviką slopinančių genų (NSG) promotoriaus DNR hipermetilinimas, aptinkami ankstyvose vėžio stadijose, nesergančių rūkančiųjų bronchų ir burnos ertmės epitelyje, skrepliuose. Nustatytos koreliacijos tarp rūkymo intensyvumo, trukmės ir epigenetinių pažaidų kaupimosi (Belinsky, 2004). Manoma, kad tai vieni pirmųjų molekulinų pokyčių, lemiančių vėžio genezę, o kartu - tai diagnostiniai bei prognoziniai vėžio žymenys (Esteller et al, 2001).

Rūkymas kenkia ne tik rūkančiojo sveikatai. Aplinkos tabako dūmuose esantys junginiai, įtraukti į kancerogeninių veiksnių sąrašą, sukelia nerūkančiųjų plaučių vėžį. Apie pasyviai rūkančiųjų plaučių vėžio patogenezės mechanizmus žinoma žymiai mažiau. Dėl nedidelio plaučių karcinomos (PK) dažnio tarp nerūkančiųjų ir informacijos apie pasyvų rūkymą stygiaus, išsamių duomenų apie epigenetinių ar genetinių pažaidų svarbą nerūkančiųjų PK literatūroje nedaug. Norėdami įvertinti epigenetinių pažaidų svarbą su rūkymu (aktyviu ar pasyviu) susijusių navikų patogenezei, DNR metilinimo pažaidas tyrėme naviką slopinančių genų *p16*, *p14*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT*, *DAPK1* promotoriuose plaučių bei galvos-kaklo navikuose.

Tyrimui parinkti genai, kurių promotorių metilinimo pažaidos dažnai nustatomos plaučių ir galvos-kaklo navikuose, o genų koduojami baltymai atlieka svarbų vaidmenį ląstelės ciklo reguliacijos, diferenciacijos, dalijimosi, pažaidų reparacijos bei apoptozės procesuose.

DARBO TIKSLAS

Pagrindinis darbo tikslas - nustatyti plaučių bei galvos-kaklo navikams būdingus DNR metilinimo pakitimus; įvertinti šių epigenetinių žymenų sąsajas su klinikiniais ir demografiniais rodikliais, susieti su ligonių rūkymo įpročiais bei sisteminiu kontaktu su aplikos tabako dūmais.

PAGRINDINIAI TYRIMŲ UŽDAVINIAI

1. Plaučių navikuose ištirti genų *p16*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT*, *DAPK1* promotoriaus DNR metilinimo pakitimus ir įvertinti sąsajas tarp epigenetinių pažaidų dažnio bei demografinių, klinikinių, rūkymo (aktyvaus ar pasyvaus) intensyvumo rodiklių.
2. Galvos-kaklo srities navikų ir onkologine liga nesergančių asmenų burnos epitelio nuograndose ištirti DNR metilinimo pakitimus genuose *p16*, *p14*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT* ir įvertinti sąsajas tarp epigenetinių pažaidų dažnio bei demografinių, klinikinių, rūkymo intensyvumo rodiklių.
3. Seilių liaukų navikuose ir histologiškai nepakitusių seilių liaukų audiniuose ištirti geno *MGMT* promotoriaus DNR hipermetilinimo dažnį ir baltymo MGMT raiškos pakitimus. Įvertinti šių pakitimų sąsajas su demografiniais ir klinikiniais rodikliais bei susieti geno promotoriaus metilinimą su baltymo raiška.

DARBO NAUJUMAS

Šiame darbe nagrinėjama nauja, sparčiai besiplėtojanti mokslo sritis - vėžio epigenetika. Analizuojamas molekulinų pakitimų spektras nesmulkialastelinėse nerūkančiųjų ir rūkančiųjų asmenų plaučių karcinomose, galvos-kaklo srities navikuose. Panašių tyrimų, analizuojančių vėžio genų promotorių metilinimo būklę nerūkančiųjų plaučių karcinomose, pasaulyje nedaug (Kim et al, 2001, Jarmalaite et al, 2003) dėl nedidelio nerūkančių ir sergančių plaučių vėžiu ligonių skaičiaus. Žymiai daugiau tyrimų atlikta rūkančiųjų ir metusių rūkyti plaučių karcinomose (Kim et al, 2001, Belinsky, 2004). Darbe įvertinome genų promotoriaus hipermetilinimo sąsajas su tiesioginiu ar netiesioginiu tabako dūmų poveikiu. Vieni iš nedaugelio parodėme, kad metilinimo pažaidos *p16* geno promotoriuje yra būdingos tik rūkančiųjų arba ATD veiktų plaučių vėžio ligonių navikams.

Molekulinų su patogeneze susijusių pakitimų tyrimų galvos-kaklo karcinomose gausu, tačiau dėl skirtingos anatomicinės navikų lokalizacijos, tyrimų rezultatai įvairūs. Dažnai pateikiami prieštaringi, sunkiai apibendrinami duomenys. Mūsų darbe pavyko atrinkti informatyviausią galvos-kaklo navikų žymenį - *MGMT* geno promotoriaus hipermetilinimą. Taip pat parodėme, kad DNR metilinimo pažaidos atspindi tabako kancerogenų daromą žalą.

Šiame darbe pirmą kartą pateikiami retų seilių liaukų navikų tyrimai pakankamai didelėje mėginių imtyje. Tiriamas *MGMT* geno promotoriaus metilinimas ir analizuojama *MGMT* baltymo raiška homogeniškoje galvos-kaklo navikų kolekcijoje. Literatūroje yra duomenų apie baltymus - seilių liaukų navikų žymenis, tačiau epigenetiniai pakitimai navikuose, o ypač histologiškai nepakitusiųose audiniuose tiriami retai. Dėl nedidelio seilių liaukų vėžio dažnio mūsų krašte molekulinų žymenų analizės Lietuvoje iki šiol atlikta nebuvo. Darbe parodėme, kad *MGMT* baltymo raiška seilių liaukų navikuose koreliuoja su blogai prognozei būdingais klinikiniais rodikliais.

Šiuo darbu siekėme papildyti fundamentalias mokslo žinias apie DNR metilinimo ypatumus plaučių ir galvos-kaklo navikuose. Tyrimai taip pat yra

vertingi praktikoje, kadangi DNR metilinimo žymenys diegiami į molekulinės vėžio diagnostikos sistemas.

DARBO PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Genetinės ir epigenetinės pažaidos naviką slopinančiuose genuose (NSG) yra tiesiogiai susijusios kancerogeniniu aplinkos poveikiu ir įtakoja ligos genezę. Šių pažaidų analizė suteikia informacijos apie onkologinės ligos vystymosi riziką, eigą ar galimą jautrumą gydymui. Naujų biožymenų identifikavimas padeda kurti naujos kartos gydymo strategijas, nukreiptas į konkrečius molekulinis taikinius.

Darbe, naudojant senesnius patikimus (MSP) ir naujus (pirosekvenavimas) molekulinės biologijos tyrimo metodus, plaučių ir galvos-kaklo navikų mėginiuose analizavome DNR metilinimo pažaidas naviką slopinančiuose genuose *p16*, *p14*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT* ir *DAPK1*. DNR metilinimo pažaidų tyrimu siekėme prisidėti prie molekulinų žymenų sistemos, naujos kartos prevencijos ir gydymo strategijos kūrimo, pasitarnausiančios ankstyvai diagnostikai, prognozės vertinimui, tinkamiausio gydymo plano parinkimui. Plaučių ir seilių liaukų navikų tyrimuose nustatėme epigenetinių pažaidų ir baltymo raiškos sąsajas su klinikiniais, demografiniais rodikliais. Parodėme, kad DNR metilinimo pažaidų analizė gali padėti įvertinti vėžio riziką, o baltymo raiškos tyrimas gali pagelbėti prognozuoti ligos eigą.

Epigenetinių pažaidų analizė pasaulyje jau pradėta diegti į įprastines diagnostines sistemas, ypač kuriant neinvazyvius ar mažai invazyvius įvairių lokalizacijų navikų diagnostikos būdus, didelės rizikos asmenų prevencinės patikros programas. Galvos-kaklo mėginių tyrimu parodėme, kad metilinimo pažaidos NSG promotoriuose galima aptikti navikų ir burnos epitelio nuograndose (neinvaziniais metodais paimtoje biologinėje medžiagoje), tyrimas yra informatyvus, o metodo jautrumas pakankamas. Tai galėtų būti papildoma vertinimo priemonė įprastiems diagnostikos metodams.

Šiame darbe atlikti tyrimai praplečia žinias apie epigenetinių pažeidimų svarbą plaučių, galvos-kaklo, seilių liaukų vėžio patogenezei, suteikia naujos informacijos apie nerūkančiųjų plaučių vėžio formavimosi (epi)genetinius ypatumus. Remiantis šiais darbais buvo pradėta epigenetinių žymenų paieška Lietuvių krūties ir prostatos vėžio ligonių biologinėje medžiagoje, o užsienio mokslo centruose įgyta patirtis perkelta diegiant metodikas į laboratoriją Lietuvoje.

GYNIMUI PRISTATOMI TEIGINIAI

1. DNR metilinimo pažeidimas plaučių ir galvos-kaklo navikuose yra ligos ir tabako dūmų poveikio (tiesioginio ir netiesioginio) žymenys.
2. Galvos-kaklo vėžiui būdingi DNR metilinimo žymenys gali būti tiriami ligos pažeisto burnos epitelio nuograndose ir tinka ankstyvam vėžio rizikos nustatymui.
3. Seilių liaukų navikuose geno *MGMT* promotoriaus hipermetilinimas lemia *MGMT* baltymo raiškos praradimą; šis pokytis reikšmingai įtakoja ligos eigą.

DARBO APROBAVIMAS

Darbo tema paskelbtos mokslinės publikacijos, iš kurių viena - žurnale, įtrauktame į Mokslinės informacijos instituto sąrašą (ISI), dvi - kituose recenzuojamuose periodiniuose Lietuvos leidiniuose.

Darbo rezultatai pristatyti mokslo visuomenei 6 tarptautinėse konferencijose Lietuvoje ir užsienyje.

DARBO APIMTIS

Darbą sudaro Santrumpos, Įvadas, Literatūros apžvalga, Tyrimo objektas ir metodai, Rezultatai, Rezultatų aptarimas, Išvados, Mokslinių darbų sąrašas, Literatūros sąrašas ir Priedas.

Darbo apimtis - 87 puslapiai, jame pateikiama 11 paveikslų, 9 lentelės ir 1 priedas.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1. DNR metilinimas fiziologiniuose procesuose

Terminą „epigenetika“ pasiūlė K. Waddington'as 1942 m., norėdamas juo apibrėžti genomo apspręstą ir aplinkos poveikio sąlygotą morfologinių ir funkcinių savybių visumą (Santos et al, 2005, Feinberg et al, 2008). Šiuo metu epigenetika - tai mokslas, tiriantis veiksnius, kurie valdo genų raišką nekeisdami DNR sekos, t.y. veikia „epi“ lygmenyje (virš nukleotidų sekos). Žinomi keli epigenetinės reguliacijos būdai: DNR metilinimas, kovalentinės histonų modifikacijos, su chromatinu sąveikaujantys baltymai, nekoduojančios mikro ir ilgosios nekoduojančios RNR. Visi šie reiškiniai svarbūs genų raiškos valdymui ir galimai tarpusavyje sąveikauja.

DNR metilinimas - tai poreplikacinė DNR modifikacija, kurios metu metilo (-CH₃) grupė kovalentiškai prijungiama prie citozino C⁵ atomo. Šią reakciją katalizuoja DNR metiltransferazės (Dnmt), metilo grupės donoru tarnauja S-adenosil-L-metioninas (SAM), reakcijos metu virstas S-adenozilhomocisteinu. Cheminės reakcijos metu DNR molekulėje atsiranda 5-metilcitozinas, kai kurių autorių vadinamas „penktąja“ azotine baze.

Žinduolių ląstelėse metilinami CpG dinukleotidai. Tai - trumpos palindrominės sekos, susitelkusios į klasterius, dar vadinamus CpG salomis. CpG salos pirmą kartą apibūdintos prieš 25-erius metus (Bird et al, 1986). Visuminės analizės metodais jų žmogaus genome nustatyta apie 29000 (Santos et al, 2005). CpG salų apibūdinimui svarbūs trys kriterijai: didesnis nei 50% CpG dinukleotidų skaičius sekoje; nustatyto ir tikėtino CpG dinukleotidų skaičiaus santykis didesnis už 0,6; sekos ilgis didesnis negu 200 bp (Siegfried et al, 2010). Pastebėta, kad šis apibrėžimas tinka daugeliui įprastai metilnamų kartotinių sekų, todėl ribinis CpG salų ilgis pakeistas į 500 bp. Metilomo (viso genomo metilinimo profilio) nustatymo žinduoliuose tyrimai tęsiami skirtingais metodais ir įvairiuose audiniuose (Siegfried et al, 2010). CpG salos dažnai susiję su RNR transkripcijos pradžios vieta (geno promotoriumi) ir

pirmu egzonu. Dėl metilinto citozino spontaninio deaminavimo į timiną ir neefektyvios pažaidą šalinančios timino DNR glikozilazės sistemos CpG žmogaus genome yra penkis kartus mažiau nei apskaičiuota (Laird et al, 2003). Neištaisyty metilintų citozinių vietose įvyksta transcizija - dažna genetinio polimorfizmo priežastis. Tipiškai žinduoliuose metilinamas citozinas CpG dinukleotiduose. Taip pat metilinimas gali vykti ir 5'-CpNpG-3' (N-bet kuris nukleotidas) ar nesimetrinėse 5'-CpA-3', 5'-CpT-3' sekose, tačiau tai vyksta žymiai rečiau (Costello et al, 2001).

Metilinimo reakcijas katalizuojantys fermentai vadinami DNR metiltransferazėmis (Dnmt). Gyvūnų ląstelėse kol kas identifikuoti šie fermentai: Dnmt1, 2, 3A, 3B, 3L. Bent vieno jų funkcijos netekimas yra letalus pelėms. Dnmt1 ir Dnmt3B yra ypač svarbios normaliam gemalo vystymuisi, o Dnmt3A - postnatalinei raidai. Tačiau pelės, turinčios deleciją tik viename Dnmt alelyje, išgyvena ir būna vaisingos. Iki šiol nustatytos 4 Dnmt1 izoformos (Dnmt1s, 1o, 1b, 1^{AE3-6}) ir netransliuojamas Dnmt1p transkriptas (Lan et al, 2010). Dnmt1 yra itin konservatyvi eukariotuose, afiniška pusiau metilintai DNR, aptinkama replikacinėse šakutėse sąveikaujanti su proliferuojančių ląstelių branduolio antigenu (PCNA). Ji dar vadinama palaikančiąja DNR metiltransferaze. Šis fermentas dalyvauja poreplikacinės pusiau metilintos DNR transkripcinėje inaktyvacijoje. Neseniai suformuluotas modelis, paaiškinantis Dnmt1 sąveikos ir atrankumo pusiau metilintai DNR principus (Law et al, 2010). Dnmt1 raiškos pokyčiai ląstelėms suteikia naujas ypatybes. Raiškos sumažėjimas sukelia globalų genomo hipometilinimą, o raiškos padidėjimas padidina metilintų lokusų skaičių (Lan et al, 2010).

Dnmt3A ir Dnmt3B yra *de novo* metiltransferazės, dalyvaujančios embriogenezės metu kintančios genų raiškos reguliavime, naujai patekusių retrovirusinių sekų inaktyvavime. Dnmt3a dažniau metilina ilgas satelitines sekas pericentromeriniame regione, o Dnmt3b - trumpas satelitines sekas centromerose. Žinomi ir kiti aktyvumo savitumai (Lan et al. 2010). Šių fermentų svarbą organizmui parodo eksperimentai su pelėmis: nokautuotų Dnmt3b pelių embrionai nesivysto, o nokautuotos Dnmt3a pelės neilgai po

gimimo lieka gyvybingos (Lan et al, 2010). Bet kurio šių fermentų pakitusi raiška siejama su vėžio vystymusi. Dnmt3a kartu su Dnmt3L yra atsakingos už daugumos imprintingu valdomų genų metilinimą. Apie Dnmt3L vaidmenį kol kas žinoma mažai. Aiškėja, jog baltymas nepasižymi DNR prisijungiančiu ar metiltransferaziniu aktyvumu, tačiau sąveikaudamas su Dnmt3A ir Dnmt3B, stabilizuoja šiuos fermentus ir skatina jų metiltransferazini aktyvumą (Law et al, 2010, Chedin et al, 2002, Lan et al, 2010). Taip pat Dnmt3L būtinas imprintingu būdu valdomų genų metilinimui embrioninėse ląstelėse (Mulero-Navarro et al, 2008).

Dnmt2 vaidmuo kol kas nežinomas. Baltymas neturi reguliacinio domeno ir pasižymi mažu metiltransferaziniu aktyvumu *in vitro* ir *in vivo* (Lan et al, 2010). Eksperimentai su Dnmt2-/- embrioninėmis kamieninėmis ląstelėmis parodė, jog jos išlaiko normalų DNR metilinimo pobūdį (Okano et al, 1998), o eksperimentai su drozofila parodė, kad Dnmt2 baltymui būdingas citozino ne CpG dinukleotiduose metilinimas (Lan et al, 2010).

Ląstelės piktybėjime gali dalyvauti visi fermentai. Jų ekspresijos lygis įvairių lokalizacijų navikuose yra skirtingas. Lieka išsiaiškinti, koku mastu kiekvienas jų reikšmingas.

DNR metilinimas yra plačiai paplitęs reiškinys. Bakterijose DNR metilinimas saugo nuo tarprūšinio genų pernešimo. Žemesniuose gyvūnuose, pvz., *Caenorhabditis elegans*, metilinto citozino net neaptinkama, neidentifikuoti reakcijas katalizuojantys fermentai ir juos koduojantys genai. Vaisinė muselė *Drosophila melanogaster* turi Dnmt fermentą, metilinamos CpG ir CpT sekos, tačiau genomui būdingas žemas metilinimo lygis (Bird et al, 2002).

Žinduoliuose DNR metilinimo prasmė aiškesnė. Kryptingi metilinimo pokyčiai prasideda ankstyvose žinduolių vystymosi stadijose, kuomet nusistovi rūšiai būdingas metilinimo profilis. Oocituose metilinimo lygis yra mažesnis negu spermatozoiduose, tačiau šis skirtumas tarp gametų „ištrinamas“ blastocistos formavimosi metu vykstant genomo hipometilinimui. Implantacijos metu atsiranda naujas metilinimo profilis po Dnmt3A ir Dnmt3B

katalizuotos *de novo* metilinimo bangos. Būtent embriono ląstelėse nustatytas DNR metilinimo praradimo (demetilinimo) mechanizmas (Tahiliani et al, 2009). S. Kriaucionis parodė, kad pelės smegenų ląstelėse apie 40% citozino yra 5-hidroksimetilcitozino būsenoje (Kriaucionis et al, 2009) ir tai yra pradinis DNR demetilinimo etapas, kurį vykdo TET šeimos fermentai (Tahiliani et al, 2009), atsakingi už metilcitozino oksidaciją ir jo vartimą 5-hidroksimetilcitozinu. Suaugusiame organizme metilinimo profilis ir metilintų vietų kiekis yra pastovus, jis pasižymi savitumu ląstelių tipui ir audiniams, kinta žmogui senstant ar vystantis įvairioms ligoms, įskaitant vėžį (Costello et al, 2001).

DNR metilinimas dalyvauja aktyvios ar inertiškos chromatinio būsenos formavime bei palaikyme. Savaiame DNR metilinimas neužtikrina neaktyvaus chromatinio (Rountree et al, 2001). Inaktyvacijai reikalingas histonų deacetilinimas (HDAC1/2), metilintos DNR sąveika su transkripcijos slopintojais (RP58, DMAP1), prie metil-CpG prisijungiančiais baltymais (MBD2/3). Dalyvaujant gausybei baltymų, vyksta chromatinio pertvarkymas, kuris ir apsprendžia aktyvumo būklę.

DNR metilinimas reguliaciniuose geno elementuose, pvz., promotoriuose, slopina jų veiklą. Literatūroje aprašyti (Prokhortchouk et al, 2002, Deaton et al, 2011) galimi mechanizmai. Pirmiausia, citozino metilinimas gali tiesiogiai trukdyti transkripcijos veiksniams, pvz., Ap-2, c-Myc/Myn, CREB, E2F, ir kt. prisijungti prie promotoriaus. Antra, prie metilintų CpG prisijungiantys baltymai ar jų kompleksai, pvz., MeCP1, 2, MBD1, 2, 3, 4 ir kt. pritraukia histonų deacetilazes ar kitus baltymus ir netiesiogiai trikdo transkripcijos veiksnių jungimąsi.

Normaliose ląstelėse daugumos „namų ūkio“ genų promotoriai yra nemetilinti nepriklausomai nuo to, ar vyksta jų raiška. Išimtis - moters X chromosomos ir imprintingo būdu valdomi genai. „Namų ūkio“ genų CpG salos, esančios ne promotorinėse sekose yra metilinamos, taip apsisaugant nuo kriptinės transkripcijos iniciacijos. Vėžinėse ląstelėse - atvirkščiai:

koduojančios geno dalies CpG salos yra nemetilintos, o promotorių salos - hipermetilintos. Tokiu būdu inaktyvuojami naviką slopinantys genai.

DNR hipermetilinimas yra reikšmingas genomo integralumo palaikymui. Taip slopinama parazitinių DNR sekų transkripcija. Demetilinimas aktyvuoja virusinių sekų, retrotranspozonų ir transpozicijai reikalingų sekų raiškai svarbius promotorius. Tai, savo ruožtu, sukelia insercinę mutagenę, kartotinių sekų rekombinaciją, dereguliaciją ir prisideda prie vėžinės transformacijos proceso (Strathdee et al, 2002).

DNR metilinimas dalyvauja genų dozės kompensavimo mechanizmuose moters ląstelėse (X chromosomos inaktyvavime) ir genų imprintingo palaikyme (Bird, 2002). Abejais atvejais genų raiška vyksta nuo vieno alelio. X chromosoma inaktyvuojama nekoduojančia RNR, nuskaityta nuo *Xist* geno. Neaktyvioje X chromosomoje visos CpG salos yra metilintos, DNR asocijavusi su įvairiais baltymais ir yra inertiška. Aktyvi X chromosoma apsaugoma nuo šio proceso metilinant *Xist* geno promotorių. Imprintingo valdomi genai yra neįprastai turtingi CpG salomis ir susitelkę į klasterius. Jų monoalelinė raiška valdoma skirtingu metilinimo pobūdžiu reguliacinėse DMR (angl.k., differentially methylated region) sekose (Reik et al, 2001). Delecijos šiose sekose sukelia imprintingo praradimą. Monoaleline raiška pasižymi genų pažaidos ypač akivaizdžios. Žmogaus Prader-Willi ir Angelman sindromams būdingas protinis ir fizinis atsilikimas, elgesio sutrikimai, o Beckwith-Wiedemann sindromui - polinkis vėžiui ankstyvame amžiuje.

Aptarti DNR metilinimo lygio (hipo- ir hiper- metilinimas), profilio (NSG promotoriai, judrūs genomo elementai, imprintingas) ir spektro (CpG ir ne CpG sekų metilinimas) skirtumai pabrėžia šio proceso sudėtingumą ir svarbą. Metilinimo lygio ir profilio pokyčiai pažeidžia genomo integralumą, sukelia daugybinius organizmo vystymosi sutrikimus ir skatina ląstelių piktybėjimą.

2. DNR metilinimo pokyčiai vėžinėse ląstelėse

Vėžinėms ląstelėms būdingas lokalus genų promotorių hipermetilinimas ir globalus genomo hipometilinimas. Istoriskai pirmiausia buvo nustatytas hipometilinimo reiškinys, kai *in vitro* eksperimentais pastebėtas 5'-aza-2'-deoksicitidinu veiktų ląstelių linijų polinkis metastazuoti (Feinberg et al, 2004). Vėliau parodyta, kad pelėms, kurių ląstelėse sumažėjęs Dnmt1 baltymo lygis, genomo metilinimo lygis taip pat mažas, o pelėms vystėsi T ląstelių limfomos (Gaudet et al, 2003). Žmogaus vėžinėse ląstelėse nustatytos demetilintos onkogenų, pvz., *HRAS*, *cMYC*, promotorių CpG sekos. Demetilinant aktyvinams *BCL2* onkogenas lėtinės limfoidinės leukemijos atveju, *ABCBI(MDR1)* - mieloidinės leukemijos, *S100A4* - gaubtinės žarnos adenokarcinomos, *SNCG (BCSG1)* - krūties ir kiaušidžių, *CCND2* - skrandžio karcinomos atvejais (Lind, 2005). Hipometilinti onkogenai *CLDN4*, *LCN2*, *YWHAS (14-3-3σ)*, *TFF2*, *MSLN* ir *PSCA* nustatyti kasos karcinomose, o *ELK1*, *RRAS*, *RHOB*, *RND1 (RHO6)* ir *MSX2* - skrandžio karcinomose. Analogiškai aktyvuojama ir mobilių genomo elementų, pvz., LINE, retrovirusų raiška. Sužadinama jų transpozicija, kartotinių sekų rekombinacija. Genomo nestabilumą taip pat didina chromosomų pericentromerinio chromatino demetilimas, - padidėja chromosomų lūžumo tikimybė ir vyksta netipiška rekombinacija (translokacijos) (Rountree et al, 2001). Šis efektas stebimas naviko ląstelėse veikiant 5'-aza-2'-deoksicitidinu ar ICF sindromo atveju, kai dėl įgimtų *Dnmt3b* mutacijų nevyksta centromerinio chromatino *de novo* metilinimas (Scarano et al, 2005).

NSG raiškos slopinimas dėl promotoriaus hipermetilinimo įtakoja daugelį ląstelės funkcionavimui būtinų procesų. NSG, kurių promotorių CpG salos hipermetilinimos, sąrašas ilgas. Svarbiausi ir labiausiai tyrinėti pateikti 1 lentelėje. Naviko ląstelėse dažnai hipermetilinami ląstelės ciklą valdantys genai. Tai skatina nevaldomą vėžinių ląstelių dalijimąsi, ląstelės išvengia kontrolės taškų ir kaupia DNR pažaidas (Belinsky, 2004). Metilinant DNR reparacijos genų promotorius, pvz., *MGMT*, sutrinka alkilinančių junginių

sukeltų DNR aduktų šalinimas, pažeidžiamas genomo integralumas. Ląstelių nekontroliuojamai proliferacijai palankūs apoptozės išvengimo mechanizmai. Slopinant *RASSF1* raišką, nevyksta RAS signalinio kelio aktyvuojama apoptozė, o slopinant *DAPK1* - γ -interferono ir TNF- α aktyvuojama apoptozė (Belinsky, 2004). *MYOD* ir *PAX* promotorių metilinimas būdingas blogos diferenciacijos navikams, linkusiems metastazuoti. Adhezijos slopinimas prisideda prie vėžio ląstelių plitimo į gretimus audinius ir yra siejamas su ląstelių tarpusavio ir tarpląstelinio matrikso sąveikos pokyčiais (Rountree et al, 2001).

1 lentelė. Naviką slopinantys genai, dažnai hipermetilinami įvairiuose navikuose (Rountree et al, 2001, Costello et al, 2001). Paryškinti darbe tirti genai.

Funkcijos	Genai
Ląstelės ciklo kontrolė	<i>RBI, CDKN2A (p16), CDKN2B, CDKN2A (p14), TP73, CDKN1B, SFN</i>
DNR pažaidų reparacija	<i>MLH1, MGMT, GSTP1, BRCA1</i>
Apoptozė	<i>DAPK1, CASP8</i>
Signalų perdavimas	<i>ESR1, AR, PGR, EDNRB, RASSF1, PTEN</i>
Diferenciacija	<i>MYOD1, PAX6, RARB, WT1</i>
Adhezija	<i>CDH1, SERPINB5, VHL, APC, STK11, TIMP3</i>
Replikacinis senėjimas	<i>TERT</i>
Transkripcija	<i>VHL, HIC1, BRCA1</i>
Angiogenezė	<i>THBS1</i>

3. DNR metilinimas - vėžio žymuo

Informatyvių epigenetinių vėžio žymenų, tinkamų ankstyvai diagnostikai ir ligos eigos stebėjimui, atranka - vienas iš svarbių molekulinės vėžio biologijos tikslų. Padidintos rizikos asmenų nustatymui, ankstyvai vėžio diagnozei, diagnozės patikslinimui tinkamiausi žymenys, kurių pakitimai stebimi ankstyvose naviko vystymosi stadijose bei yra specifiški naviko tipui. Plaučių vėžio atveju iš epigenetinių žymenų tinkamiausias yra genų *p16* ir *MGMT* hipermetilinimas. DNR metilinimo pakitimai *p16* promotoriuje

aptinkami sveikų, intensyviai rūkančių asmenų, buvusių rūkalių tabako pažeistame bronchų epitelyje, taip pat šios pažaidos dažnos plaučių navikuose. Net 3-ejus metus iki kliniškai nustatomo plaučių vėžio ar diagnozės metu iš seilių/skreplių išskirtoje DNR yra aptinkamos ir *MGMT* geno promotoriaus metilinimo pažaidos (Palmisano et al, 2000).

Epigenetiniai žymenys tinka ne tik ankstyvai diagnostikai. Progresuojančiame navike nustatomi pakitimai gali būti naudojami kaip prognostiniai žymenys. Jie koreliuoja su klinikine ligos eiga ir gali prognozuoti ligos agresyvumą (Lee et al, 2008, Brock et al, 2008). Neseniai pradėtos naudoti CpG salų daugybinio metilinimo (angl.k., CIMP, CpG island methylator phenotype), metilotipo (angl.k., methylotype), DNR metilinimo profilio (angl.k., DNA methylation signature) sąvokos, kurios apibūdina metilinimo būklę daugelio ar kelių vėžio genų CpG salose (Esteller et al, 2005). Manoma, kad individualus metilinimo profilis atspindi klinikinius, histopatologinius ligos rodiklius, o 3-4 NSG metilinimo būklės analizė gali būti 100% informatyvi (Esteller et al, 2005). Literatūroje aprašomos metilinimo profilio koreliacijos su naviko atsinaujinimo galimybe stemplės, galvos-kaklo, burnos ertmės, kiaušidžių vėžio ligoniams (Brock et al, 2003, Maruyama et al, 2001, Ogi et al, 2002, Wei et al, 2002). Kai kurių autorių nuomone (Brock et al, 2008), metilinimo profilis yra tinkamesnis išgyvenimo, ligos atsinaujinimo rodiklis negu įprasti klinikiniai blogos prognozės rodikliai, pvz., stadija, ligonių amžius.

Kita epigenetinių žymenų taikymo sritis - jautrumo gydymui įvertinimas. Metilinimo būklės nustatymas genuose, kurių veikla svarbi jautrumui vaistams, teikia informacijos apie koduojamų baltymų aktyvumą. Pvz., vėžio gydymui alkilinančiais junginiais svarbi *MGMT* promotoriaus metilinimo būklė. Gliomose hipermetilintas *MGMT* genas koreliuoja su jautrumu chemoterapijai, geresne išgyvenimo tikimybe, ilgesniu laikotarpiu iki ligos progresavimo (Esteller et al, 2005). Krūties, gimdos, prostatos navikų nejautrumas hormoniniam gydymui atsiranda dėl promotorių hipermetilinimo estrogenų, progesterono ir androgenų receptorių genuose (Esteller et al, 2005). Taip pat

ikinavikiniai pakitimai ir navikai tampa nejautrūs retinoidams dėl promotoriaus metilinimo retinoidų atsako genuose, pvz., *RARB2*, ir retinolį sujungiančio baltymo gene *CRBPI*.

DNR metilinimo žymenų patrauklumą, paieškos ir diegimo praktikoje sėkmę lemia keli veiksniai. DNR metilinimo pokyčiai yra charakteringi vėžio ląstelėms, tad gali būti naudojami diagnozei ir navikų klasifikacijai (Mulero-Navarro et al, 2008). Epigenetiniams pokyčiams analizuoti pasitelkiami nesudėtingi, aukšto specifiškumo ir jautrumo metodai, pvz., MSP. Be to, tyrimų populiarumą lemia DNR pagausinimo galimybė, leidžianti aptikti negausius pakitimus. Dėl DNR stabilumo, metilinimo pažaidas įmanoma analizuoti iš įvairios biologinės medžiagos išskirtoje DNR (kūno skysčių, audinių, audinių nuoplovų ar nuograndų, parafinintų mėginių).

DNR metilinimo žymenys - tai naujos kartos molekuliniai vėžio žymenys, galintys padėti identifikuoti ir klasifikuoti navikus, prognozuoti ligos eigą ir terapinį atsaką. Taip pat DNR metilinimo tyrimai naudingi prevencinėms programoms, siekiant vėžį diagnozuoti ankstyvose stadijose.

4. Plaučių vėžio epidemiologija ir patogenezė

Plaučių vėžys - viena labiausiai paplitusių ir didžiausią mirtingumą sukeliančių onkologinių ligų. 2010 m. Lietuvoje diagnozuoti 1278 nauji ligos atvejai (plaučiai, bronchai, trachėja), o sergamumas ir mirtingumas nekinta daugelį metų (Lietuvos vėžio registras, preliminarūs 2010 m. duomenys). Liga dažniausiai diagnozuojama vėlyvos stadijos. Lietuvos vėžio registro duomenimis 2010 m. ~ 20% (16,8% vyrų ir 23,7% moterų) plaučių vėžys nustatytas ankstyvoje (I-II) stadijoje ir net ~ 65% (66,6% vyrų ir 62,5% moterų) - vėlyvoje (III-IV) stadijoje. Nors įprastus plaučių vėžio diagnostinius metodus (rentgenografija, bronchoskopija) papildė naujos kartos tyrimų technologijos (kompiuterinė tomografija, spiralinė kompiuterinė tomografija, skreplių citologinis tyrimas), esminio sergamumo ir mirštamumo sumažėjimo nesulaukiame.

Plaučių vėžio vystymasis - daugiapriežastinis ir daugiaetapis procesas. Pagrindiniai plaučių vėžio rizikos veiksniai yra tabako rūkymas, netiesioginis poveikis rūkalais, oro taršalai, profesiniai veiksniai, plaučių parenchimos randiniai procesai, obstrukcinės plaučių ligos (John et al, 2000). Taip pat reikšmingas individualus jautrumas tam tikriems kancerogenams. Nustatytos koreliacijos tarp rizikos sirgti plaučių vėžiu ir genetinių polimorfizmų DNR reparacijos ir detoksifikacijos fermentų, citochromų P450, glutationo s-transferazės, nikotinacilcholino receptoriaus subvienetų genų *CHRNA3*, *CHRNA5*, *CHRNA4*, geno *PSMA* ir kai kurių kitų genų sekose (Amos et al, 2008, Hung et al, 2008). Neseniai nustatytas su tabako kancerogenų metabolizmu nesusijusių genų polimorfizmas, paaiškinantis 2,5 karto didesnę riziką susirgti plaučių vėžiu (Sato et al, 2007). Manoma, kad 6q23-25 regiono *SASH1*, *LATS1*, *IGF2R*, *PARK2* ir *TCF21* genų polimorfizmo analizė galėtų būti įtraukta į prevencines programas paveldimam plaučių vėžio polinkiui nustatyti.

Tabako dūmuose esantys kancerogenai, kurių priskaičiuojama virš 69, sukelia visų histologinių tipų plaučių karcinomas. Su rūkymu labiausiai siejama plokščialąstelinė plaučių karcinoma (PLK), plaučių adenokarcinoma (AK) dažnesnė tarp nerūkančiųjų, moterų bei jaunų asmenų (IARC monographs, vol.83, 2004). Pasaulinės sveikatos organizacijos siūlymu plaučių vėžys skirstomas į smulkialąstelinį (SPK; angl.k., small cell lung cancer, SCLC) ir nesulkialąstelinį (NSPK; angl.k., non-small cell lung cancer, NSCLC). Šie du tipai ryškiai skiriasi molekuliniais pokyčiais visuma, apsprendžiančia klinikinę ligos eigą, atsaką į gydymą bei išgyvenamumą.

5. Plaučių vėžio molekuliniai patogenezės mechanizmai

Pastarųjų dešimtmečių tyrimai atskleidė plaučių kancerogenezei būdingą genetinių ir epigenetinių pokyčių gausą, sąlygojančią ląstelių savireguliacijos, augimo kontrolės pažeidimus. Plaučių navikams būdingos ląstelės ciklo valdymo, augimo signalų perdavimo, apoptozės ir kitų mechanizmų pažeidos.

Procesų sutrikimą lemia genetiniai ir epigenetiniai pokyčiai, kartais vertinami kaip molekuliniai plaučių vėžio žymenys.

Plaučių karcinomose ypač dažnos p16-ciklinoD1-CDK4-RB atsako kelio pažaidos (Kohno et al, 1999). Dažniausiai pažeidžiamas tik vienas šio kelio genas. Genas *p16* (*CDKN2A*, lokusas 9p21) koduoja baltymą, slopinantį ląstelės proliferaciją - specifinį nuo ciklinų priklausomų kinazių 4 ir 6 slopiklį. Plaučių navikuose genas *p16* pažeidžiamas homozigotinėmis delecijomis (20 - 30%) ar heterozigotiškumo praradimu (angl.k., loss of heterozygosity, LOH, 10%) (Lamy et al, 2002). Šios pažaidos būdingos vėlyvoms vėžio stadijoms. Taip pat genas inaktyvuojamas dėl promotoriaus sekų hipermetilavimo. Promotoriaus hipermetilavimas ypač siejamas su aktyviu ar pasyviu tabako vartojimu. Antai, sveikų, nerūkančių asmenų skreplių, bronchų lavažo ląstelėse *p16* hipermetilavimo pakitimai nenustatomi, o rūkančiųjų mėginiuose pažaidų dažnis siekia 5 - 20% (Lamy et al, 2002, Cirrincione et al, 2006). Pažaidos *p16* gene patikimai koreliuoja su rūkymo trukme ir intensyvumu (Jarmalaite et al, 2003, Kim et al, 2001). Pakitimai rūkančiųjų skrepliuose rodo padidintą plaučių vėžio riziką, numato ligos vystymosi galimybę trejus metus iki klinikos. Vertinant geno pažaidų dažnius įvairiuose NSPK histologiniuose tipuose, *p16* hipermetilavimas patikimai dažniau aptinkamas PLK negu AK. Taip pat nustatomos koreliacijos tarp geno *p16* hipermetilavimo navikuose ir ligos atsinaujinimo, trumpesnio pooperacinio išgyvenamumo (Toyooka et al, 2004). *p16* hipermetilavimo pažaidos nustatomos mikrometastazėse (Brock et al, 2008) ir gali tarnauti ligos progresavimo žymeniu. Kartu su *p16* neretai hipermetilinami ir kitų genų promotoriai, pvz., *CDH13*, *APC* ar *RASSF1*. Jų vienalaikės pažaidos siejamos su padidinta ligos atsinaujinimo tikimybe (Brock et al, 2008).

Genas *RBI* (lokusas 13q14.2) koduoja vieną svarbiausių ląstelės dalijimosi ciklo kontrolės baltymų - retinoblastomos baltymą. Plaučių navikuose nustatomos šio geno taškinės, *nonsense* mutacijos, delecijos, lokuso heterozigotiškumo praradimas, mRNR brendimo klaidos. Dėl jų pakinta baltymo savybės. Mutacijos *RBI* geną inaktyvuoja 15-30% NSPK, o SPK šio

geno mutacijų dažnis siekia net 90% (Wikman et al, 2006). I - II stadijų NSPK ligoniams sumažėjusi RB raiška siejama su bloga prognoze (Forgacs et al, 2001). Papildomai RB atsako kelias sutrikdomas dėl ciklinų D1, E ir CDK4 pakitimų. Ciklino D1 raiškos padidėjimą siūloma įtraukti į aukštos rizikos asmenų nustatymo programas. Šis pakitimas koreliuoja su rūkymo įpročiais ir trumpesniu išgyvenimo laikotarpiu sergant NSPK. Tyrimai rodo, kad ciklino E padidinta raiška yra nepalankios prognozės žymuo NSPK (Fukuse et al, 2000). Nuo ciklinų priklausomos kinazės 4 geno *CDK4* amplifikacija reta plaučių navikuose, tačiau imunohistocheminiai tyrimai rodo padidėjusią *CDK4* raišką 23% plaučių vėžio atvejų (Wikman et al, 2005). *CDK4* pažaidų klinikinė reikšmė dar tiriama.

Genas *TP53* (lokusas 17p13.1) koduoja daugelio ląstelės atsako kelių reguliatorių, priešvėžinį baltymą p53. Mutacijos dažniausiai vyksta evoliuciškai konservatyviose geno sekose, kurios koduoja jungimosi prie DNR domeną (5 - 8 egzonuose). *TP53* sekoje nustatyti „karštieji taškai“ (157, 158, 245, 249, 273 kodonai). Juose mutacijos vyksta itin dažnai. Skirtinguose histologiniuose PK tipuose nustatomas nevienodas *TP53* pažaidų dažnis. Mutacijos parodytos ~ 90% SPK ir ~ 50% NSPK atvejų, bei dažniau aptinkamos PLK nei AD (Wang et al, 2005). Netipiškas p53 baltymas atsiranda dėl *missens*, *nonsense* mutacijų. Ypač dažnos kelių nukleotidų insercijos ar delecijos. Pakitęs baltymas pasižymi neefektyviu jungimusi prie DNR. Ląstelės su mutantiniu baltymu išvengia apoptozės, jose sutrinka reparacijos mechanizmai, jos nekontroliuojamai auga, dalijasi ir kaupia genetines pažaidas. Parodyta *TP53* mutacijų sąsaja su rūkymu, šio įpročio trukme ir intensyvumu (Husgafvel-Pursiainen et al, 2000). Rūkančių NSPK būdingas specifinis mutacijų spektras (G:C → T:A transversijos), kurią lemia tabako kancerogeno B(a)P sukelti DNR aduktai (Sun et al, 2007). Plaučių navikuose *TP53* mutacijos yra vėlyvos stadijos, blogos diferenciacijos požymis, o sąsajos su klinicine plaučių vėžio eiga esti nevienareikšmės. Parodytas ryšys tarp *TP53* mutacijų ir atsparumo chemoterapijai, radioterapijai, blogesnio išgyvenamumo (Wang et al, 2005, Toloza, 2006). Su blogomis

prognozėmis siejamos geno *missens* ir sutrumpėjusį baltymą lemiančios *TP53* mutacijos.

Epidermio augimo veiksnio receptoriaus geno (*EGFR*, angl.k., epidermal growth factor receptor) (lokusas 7p12.3 - p12.1) padidinta raiška NSPK nustatoma 43-89% dažniu, retais atvejais SPK (Panani et al, 2006). Geno mutacijos būdingos adenokarcinomoms (81%), nerūkančiųjų (67%), moterų (70%) NSPK. Taip pat geno pažaidos paplitusios azijos šalių populiacijose (Rosell et al, 2009). Mutacijos būdingos ankstyvų stadijų NSPK, aptinkamos ir nepakitusiųose, navikų pakraščiuose audiniuose, kuomet identiškos egzistuoja navike (Herbst et al, 2008). Būdingiausios *EGFR* mutacijos, lemiančios nuolat aktyvų baltymą ir signalų perdavimą - tai delecijos 19 egzono konservatyvioje LREA sekoje (delE746-A750) ir *missense* mutacija 21 egzone (L858R). Parodyta, kad padidinta *EGFR* ir/ar jo ligandų (EGF, TGF α , amfiregulinas) raiška koreliuoja su bloga naviko ląstelių diferenciacija, didesniu proliferatyvumu, vėlesne ligos stadija, metastazių rizika ir trumpesniu išgyvenamumu (Toloza, 2006). Skirtingai nuo mutacijų, geno kopijų skaičiaus pokyčiai, manoma, yra vėlyvi ir koreliuoja su metastazių atsiradimu.

Kito augimo veiksnio receptoriaus *ERBB2* (*HER2*) padidinta raiška stebima 20-30% NSPK (daugiausia AK). Retais atvejais raiška pakinta ir SPK. Geno (lokusas 17q11.2-q12) amplifikacijos ypač retos, insercijos tipo mutacijos vyksta 20 egzone ir sąlygoja baltymo tirozino kinazės domeno pokyčius (Sato et al, 2007). *ERBB2* mutacijos labiau būdingos Rytų Azijos gyventojams, moterims, nerūkantiems asmenims sergantiems plaučių vėžiu. Padidinta *ERBB2* raiška siejama su atsparumu chemoterapijai, naviko metastazavimu, trumpesniu išgyvenamumu (Duarte et al, 2006). Pakitimai gene būdingi vyresnio amžiaus ligonių navikams (Toloza, 2006, Fischer et al, 2004). Kito *ERBB2* šeimos geno, *ERBB3*, raiškos perviršis nustatomas 20% PK, koreliuoja su bloga klinicine eiga.

RAS šeimos genai *HRAS*, *KRAS* ir *NRAS* koduoja baltymus, perduodančius augimo veiksnio (*EGFR*, *HER2* ir kt.) signalus ląstelės viduje. Mutacijos dažniausiai padidina šio baltymo aktyvumą ir yra dažnos plaučių karcinomose.

KRAS geno (12p12.1) mutacijos dažniausiai vyksta 12 kodone, ir pakeičia gliciną į cisteiną ar valiną (Mitsuuchi et al, 2002, Sekido et al, 2003). Mutavęs *KRAS* būdingas AK, didžiųjų ląstelių karcinomoms, retai nustatomas PLK ir SPK. Taip pat mutacijos nustatomos dažniau vyrų bei rūkančiųjų navikuose (Brambilla et al, 2009). Šis žymuo būdingas vėlyvų stadijų plaučių navikams (Toloza, 2006). Tabako dūmų kancerogenai (B(a)P, NNK), sukeldami DNR aduktus, skatina G→T pakaitų susidarymą, todėl mutacijos būdingesnės rūkančiųjų AK. Pakitimų dažnio sąsajų su rūkymo intensyvumu ar trukme nepastebėta (Forgacs et al, 2001). Nustatytas ryšys tarp nuolat aktyvaus RAS baltymo atsparumo gydymui EGFR tirozino kinazių inhibitoriais, trumpesnio išgyvenamumo (Sun et al, 2007). Tyrimai rodo, kad *KRAS* mutacijos yra blogos prognozės žymuo sergant NSPK. Prognozė ypač bloga, kuomet kartu nustatomas mutacijos genuose *ERBB2* ir *TP53* (Duarte et al, 2006).

Epigenetinių pakitimų įvairiuose genuose reikšmė plaučių kancerogenei plačiau aptariama 9 poskyryje.

6. Galvos-kaklo vėžio epidemiologija ir patogenezė

Galvos-kaklo navikai užima šestą vietą tarp dažniausiai diagnozuojamų onkologinių susirgimų pasaulyje ir sudaro apie 6% visų vėžio atvejų (Argiris et al, 2008). Tai heterogeniškos kilmės navikai, apimantys skirtingas anatomiškai ir funkciškai susijusių organų (kvėpavimo, virškinimo, klausos) sistemas. Navikai yra kilę iš epitelio ląstelių ir dauguma jų yra plokščialąstelinės galvos-kaklo karcinomos (Argiris et al, 2008). Pagal pasaulinės sveikatos organizacijos klasifikaciją galvos-kaklo navikams priklauso nosies ir prienosinių ančių, nosiaryklės, burninės ir gerklinės ryklės dalių, gerklų, trachėjos, burnos ertmės, seilių liaukų, odontogeniniai, ausų mikštųjų audinių, paraganglioninės sistemos navikai (Barnes et al, 2005). Lietuvos vėžio registras pateikia mažai kintančius pastarųjų dviejų dešimtmečių galvos-kaklo vėžio (lūpos, burnos ertmė, ryklė, nosies ertmė, vidinė ausis, gerklos) sergamumo ir mirštamumo rodiklius. 2010 m. Lietuvoje diagnozuoti 558 nauji

ligos atvejai, ~ 44% (43% vyrų ir 45% moterų) galvos-kaklo vėžys nustatytas ankstyvoje (I-II) stadijoje ir ~ 56% (57% vyrų ir 55% moterų) - vėlyvoje (III-IV) stadijoje (Lietuvos vėžio registras, preliminarūs 2010 m. duomenys). Dėl besimptomės ir beskausmės vystymosi eigos, išgyvenamumas esant uždelstai diagnozei yra menkas.

Galvos-kaklo lokalizacijos navikų etiologija yra sudėtinga, kompleksinė ir nepakankamai ištirta. Vėžio patogenezėi yra svarbūs daugelis, nevienodos reikšmės veiksniai. Ilgalaikis rūkymas ir alkoholio vartojimas - pagrindiniai rizikos veiksniai, manoma, atsakingi už 75% - 85% visų atvejų (Syrjanen et al, 2005). Literatūroje aptariamas sinergistinis jų veikimas (Salaspuro et al, 2004). Rūkančių asmenų rizikos laipsnis susirgti ryklės, gerklų vėžiu priklauso nuo surūkytų cigarečių skaičiaus, rūkymo trukmės, dažnio ir pakmečių (Hashibe et al, 2007). Nerūkantiems, dažnai vartojantiems alkoholi asmenims, vėžio rizika išauga du kartus (Hashibe et al, 2007). Skirtingai nuo kitų galvos-kaklo navikų, seilių liaukų navikai, nesiejami su tabako ar alkoholio vartojimu (Barnes et al, 2005).

Biologinių veiksniai įtakoja galvos-kaklo navikų patogenezę. Epšteino-Baro virusas aptinkamas nosiaryklės, liežuvio, ryklės, gerklų, seilių liaukų navikuose (Yoshizaki et al, 2011, Zheng et al, 2010), o onkogeniniai žmogaus papilomos viruso (ŽPV) 16, 18 tipai - burnos ertmės, gerklų, nosiaryklės navikuose (Syrjanen et al, 2005, Lo et al, 2010, Zheng et al, 2010). Chromas, nikelis, asbestas, cemento dulkės reikšmingi paausinių seilių liaukų navikų atsiradimui (Barnes et al, 2005). Taip pat svarbūs jonizuojanti ir UV spinduliuotė bei medienos dulkės (Barnes et al, 2005). Polimorfizmas genuose, atsakinguose už reparacijos (*MGMT*, *XRCC1*, *XRCC2*), ląstelės ciklo kontrolės (ciklino D1, *TP53*), ksenobiotikų metabolizmo (*CYP2A6*), ląstelių ir audinių vystymosi (*CDH1*), kraujagyslių susidarymo ir uždegiminio atsako (*CCR2*) procesus modifikuoja polinkį susirgti galvos-kaklo vėžiu, taip pat išgyvenimo ir atkryčio tikimybę (Hopkins et al, 2008, Zheng et al, 2010, Chien et al, 2011, Chen et al, 2011).

7. Galvos-kaklo vėžio molekuliniai patogenezės mechanizmai

Vienu dažniausių pakitimų plokščialąstelinėse galvos-kaklo karcinomose (angl.k., HNSCC - head and neck squamous cell carcinoma) vyksta 9p lokuse. Heterozigotiškumo praradimas šiame lokuse nustatomas išvešėjusiame epitelyje ir net 70 - 80% ankstyvų stadijų galvos-kaklo navikuose (Perez-Ordenez et al, 2006). Lokusas koduoja geną *p16*. Sumažėjusi geno *p16* raiška burnos ertmės ir kituose galvos-kaklo karcinomose būna dėl homozigotinės delecijos ar promotoriaus hipermetilinimo, kur kas rečiau dėl taškinių mutacijų (Yoshizaki et al, 2011, Perez-Ordenez et al, 2006, Calmon et al, 2007). Seilių liaukų navikuose sumažėjusi *p16* raiška aptinkama nedažnai (12%), retais atvejais įvyksta geno mutacijos (Jaehne et al, 2005, Guo et al, 2007). Dažniausiai genas inaktyvuojamas dėl promotoriaus hipermetilinimo, o blogos diferenciacijos seilių liaukų navikams būdingos homozigotinės delecijos (Guo et al, 2007). *p16*-ciklinoD1-CDK4-RB atsako kelias galvos-kaklo navikuose sutrikdomas pažeidžiant ciklino D1 geną. Aptinkamos vienuoliktos chromosomos, 11q13 srities amplifikacijos, kur lokalizuotas šis genas. Jos yra siejamos su bloga ligos eiga. Padidinta ciklino D1 raiška aptinkama apie 30 - 60% visų galvos-kaklo vėžio atvejų (Perez-Ordenez et al, 2006, Argiris et al, 2008). Tyrimai rodo, kad seilių liaukų karcinomose vyksta RB1 raiškos praradimas, dažnai dėl promotoriaus hipermetilinimo, ir koreliuoja su bloga prognoze (Kishi et al, 2005).

Ankstyviems molekuliniais pokyčiams galvos-kaklo karcinomose priskiriamas telomerazės raiškos padidėjimas. Dėl nuolat aktyvios telomerazės, ląstelės tampa nemirtingomis. Net iki 100% dažniu raiškos padidėjimas aptinkamas ikivėžniuose dariniuose, pirminėse karcinomose ar išplitusiuose navikuose (Argiris et al, 2008). Heterozigotiškumo praradimas 17 chromosomos trumpajame petyje ir geno *TP53* taškinės mutacijos aptinkamos apie pusę visų galvos-kaklo plokščialąstelinės karcinomos atvejų. Manoma, kad dauguma jų vyksta išvešėjusio epitelio ląstelėms kintant į karcinomą. Mutacijos *TP53* gene koreliuoja su trumpesniu pooperaciniu išgyvenamumu

galvos-kaklo vėžio ligoniams (Argiris et al, 2008). Seilių liaukų navikuose mutacijos retos, dažniausiai vyksta 7-8 egzone (Jaehne et al, 2005). Plokščialąstelinėse galvos-kaklo karcinomose dažnos delecijos 3 chromosomos ilgajame petyje (Field et al, 1995), kur lokalizuoti *FHIT* (3p14), *RASSF1* (3p21) genai. *RASSF1* genas šiuose navikuose dar inaktyvuojamas hipermetilinant promotorių (Dong et al, 2003). Taip pat hipermetilinamas šalia esančio geno *RARB* promotorius, o metilinimo pažaidos koreliuoja su tam tikru histologiniu seilių liaukų naviko tipu (seilių liaukų latakėlių karcinoma), blogesne diferenciacija, mažesniu naviko dydžiu bei blogu 3 ir 5 metų išgyvenamumu (Lee et al, 2008).

Galvos-kaklo navikams plisti svarbūs *DAPK1*, *ADAM23* ir kiti genai. Genas *ADAM23* yra svarbus ląstelių tarpusavio ir užląstelinio matrikso sąveikoms. Epigenetinės pažaidos jame būdingos vėlyvų stadijų gerklų navikams (Calmon et al, 2007), o pažaidos *DAPK1* gene aptinkamos lokaliai į limfmazgius išplitusiuose ryklės navikuose (Calmon et al, 2007, Hasegawa et al, 2002).

Galvos-kaklo blogos prognozės navikuose, taip pat naviko pakraščių histologiškai nepakitusiose ląstelėse ypač danai nustatoma padidėjusi *EGFR* raiška (Argiris et al, 2008, Glazer et al, 2009). Ji taip pat būdinga seilių liaukų navikams. Kai kurių autorių nuomone, *EGFR* raiškos pokytis seilių liaukų navikuose yra nepriklausomas blogos išgyvenimo tikimybės žymuo (Ettl et al, 2008). Šiuo metu *EGFR* raiškos pakitimai tapo patogiu ir populiariu molekulinio taikiniu gydymo strategijų kūrimui. Kuriami ir išbandomi vis nauji *EGFR* inhibitoriai ir jų deriniai kartu su vaistais, pvz., derinys su *cetuximab* atsinaujinančio ir metastazuojančio galvos-kaklo vėžio gydymui (Argiris et al, 2008).

Apie blogą ligos eigą galvos-kaklo vėžio ligoniams gali informuoti ir *MGMT* baltymo raiškos praradimas. Šis pokytis nustatomas ikinavikiniuose pakitimuose ir navikuose 15 ir 52% dažniu (Rodriguez et al, 2007). *MGMT* geno promotoriaus hipermetilinimas aptinkamas šalia naviko esančiuose audiniuose ir laikomas ankstyvu molekulinio pokyčiu galvos-kaklo audinių

kancerogenezės procese. Sumažėjusi baltymo raiška stebima blogos diferenciacijos, didesnio dydžio navikuose ir, manoma, atspindi vėžio progresiją, bet ne riziką (Szaumkessel et al, 2012).

Seilių liaukų karcinomose nustatoma vis daugiau molekulinų pokyčių, tinkamų ligos eigos prognozavimui. Pavyzdžiui, sumažėjus Maspin ir c-kit baltymų raiškai naviko ląstelės pasižymi aukštu proliferatyvumu, bloga diferenciacija. Baltymų raiškos praradimas siejamas su naviko plitimu į sritinius limfmazgius ir bloga prognoze (Schwarz et al, 2008, Ettl et al, 2008). Kituose tyrimuose nustatoma sumažėjusi p27 raiška, kuri koreliuoja su 5 ir 15 kartų blogesne beprogresine ir bendra išgyvenimo tikimybe (Okabe et al, 2001). Padidėjusi geminino geno ekspresija patikimai koreliuoja su trumpesniu bendru ir be atkryčio išgyvenimo dažniais (Yamazaki et al, 2010). Ateityje, šie imunohistocheminiai ir (epi)genetiniai žymenys galeėtų padėti seilių liaukų vėžiu sergančių asmenų prognozės įvertinimui.

Plačiau epigenetinių pakitimų įvairiuose genuose reikšmė galvos-kaklo kancerogenezei aptariama 9 poskyryje.

8. Naviką slopinančių genų *p16*, *p14*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT* ir *DAPK1* charakteristikos

Tyrimui pasirinkti genai, kurių koduojami baltymai reguliuoja svarbius ląstelinius procesus. Plaučių ir galvos-kaklo kancerogenezės metu šių genų raiška neretai slopinama dėl promotoriaus hipermetilinimo.

p16 ir *p14* - tai du INK4 α lokuso (9p21 lokusas) genai. *p16* produktas yra nuo ciklinų priklausančios kinazės (Cdk) inhibitorius, dalyvauja p16/ciklino D1/Cdk4,6/Rb ląstelės reguliaciniame kelyje. p14 baltymas sąveikauja su MDM2, slopina jo unibikvitinligazinį aktyvumą, atlikdamas p53 stabilizatoriaus ir pagausintojo ląstelėje vaidmenį. Šių genų raiškos ir aktyvumo pokyčiai yra reikšmingi ląstelės ciklo reguliacijai.

RARB genas (3p24 lokusas) koduoja retinoinės rūgšties receptorių β (angl.k., Retinoic acid receptor, beta). RAR superšeimos α , β ir γ receptoriai

yra skirtingais organizmo vystymosi etapais ekspresuojami transkripcijos faktoriai, kurie jungiasi prie genų - taikinių promotorinių elementų. Epitelio ląstelių augimo reguliacijai ir kancerogenezei svarbiausias yra *RARB* (Xu et al, 1997).

RASSF1 genas (angl.k., Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1) yra trečiojoje chromosomoje, 3p21.3 srityje. *RASSF1* baltymas, būdamas mitozės inhibitoriumi, valdo tikslią ląstelės ciklo eigą. Baltymo kiekio sumažėjimas yra būdingas vėžinėms ląstelėms ir pagreitina ląstelės ciklo eigą. Padidintas baltymo kiekis stabdo ląstelės ciklą, sukelia pokyčius transkripcijos, citoskeleto organizacijos, signalų perdavimo, ląstelių adhezijos, migracijos procesuose.

MGMT (O^6 -metilguanino DNR metiltransferazė, angl.k., O^6 -methylguanine DNA methyltransferase) genas (10q26 lokusas) koduoja DNR reparacijos baltymą, kuris šalina alkilinančių junginių sukeltus aduktus. Nepašalintos nuo guanino metilo grupės replikacijos metu sudaro poras su timinu, o jų vietose įvyksta G:C→A:T mutacijos. Nepašalintos etilo grupės formuoja sąryšas su priešais esančiu citozinu ir blokuoja DNR replikaciją. Taigi, ląstelės gebėjimas reparuoti alkilinio pažaidas tiesiogiai priklauso nuo *MGMT* molekulių skaičiaus.

DAPK1 (angl.k., death-associated protein kinase 1, 9q34.1 lokusas) koduoja nuo kalcio ir kalmodulino priklausomą serino/treonino kinazę. Baltymas dalyvauja γ -interferono, nekrozės faktoriaus α , Fas, TGF β , keramidų ir ląstelių atsiskyrimo nuo užląstelinio matrikso sukeltuose apoptozės procesuose. *DAPK1* slopina naviko augimą ir plitimą sukeldama ląstelių žūtį.

9. Naviką slopinančių genų *p16*, *p14*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT* ir *DAPK1* metilinimo pažaidų tyrimai plaučių ir galvos-kaklo navikuose

Geno *p16* raiška slopinama priešvėžiniuose ir vėžiniuose plaučių ir galvos-kaklo audiniuose (Seike et al, 2000, Esteller et al, 2001). Nustatyta glaudi sąsaja tarp *p16* hipermetilinimo ir intensyvaus rūkymo. Metilinimas

dažniau aptinkamas rūkančiųjų nei nerūkančiųjų plaučių navikuose ir koreliuoja su rūkymo intensyvumu, trukme, bei laikotarpiu, kada mesta rūkyti (Andujar et al, 2010, Kim et al, 2001). Plaučių karcinomose parodyta asbesto įtaka *p16* metilinimui. Net 12-48% darbe veiktų asbestu pacientų navikuose nustatomas *p16* metilinimas (Kim et al, 2001, Jarmalaite et al, 2003, Andujar et al, 2010), tačiau dažniau asbesto poveikis siejamas su kitomis *p16* geno pažaidomis, pvz., delecijomis. *p16* promotoriaus metilinimas plokščialąstelinėse galvos-kaklo karcinomose taip pat koreliuoja su rūkymu, jaunesniu amžiumi, kada pradėta rūkyti (Hasegawa et al, 2002). Kartu nustatytas *p16* ir *p14* genų hipermetilinimas galvos-kaklo navikuose siejamas su blogesniais klinikiniais požymiais (naviko dydžiu, išplitimu į limfmazgius, aukštesne klinicine stadija) (Ishida et al, 2005, Weber et al, 2003, Calmon et al, 2007). Seilių liaukų karcinomose *p16* promotoriaus hipermetilinimas nustatomas 34% atvejų, tačiau metilinimo pažaidų koreliacijos su klinikiniais rodikliais neaptinkamos (Guo et al, 2007).

RARB hipermetilinimas nesmulkialąstelinėse plaučių karcinomose įvairių autorių duomenimis siekia 26-43% (Tomizawa et al, 2004, Virmani et al, 2000, Zochbauer-Muller et al, 2001). Pažaidos nustatomos ir histologiškai nepakitusiose plaučių ląstelėse (Hanabata et al, 2004, Zochbauer-Muller et al, 2001). Parodyta, kad hipermetilinimo pakitimai patikimai dažniau vyksta blogos diferenciacijos navikuose (Žemaitis et al, 2005). Analizuojant pažaidų dažnius pagal rūkymo įpročius, literatūroje pateikiami skirtingi duomenys. Vieni autoriai nustato sumažėjusią *RARB2* mRNR ekspresiją daug rūkančių žmonių plaučiuose (Zochbauer-Muller et al, 2002). Metilinimo pažaidos taip pat dažniau aptinkamos aktyviai rūkančiųjų negu nerūkančiųjų navikuose (31 - 41% vs 10 - 33%) (Tomizawa et al, 2004, Zochbauer-Muller et al, 2001). Kiti tyrėjai koreliacijų su rūkymu ar rūkymo intensyvumu nenustato (Žemaitis et al, 2005). Galvos-kaklo navikuose pažaidos *RARB* gene randamos 39 - 75% dažniu (Youssef et al, 2004, Steinmann et al, 2009). Apie 56% pažaidų aptinkama įvairiose plokščialąstelinės karcinomos ląstelių linijose ir net iki 53% leukoplakijose (Youssef et al, 2004).

Pagrindinis geno *RASSF1* inaktyvavimo būdas - promotoriaus hipermetilinimas. Plaučių karcinomose geno mutacijos vyksta retai (Zochbauer-Muller et al, 2001). Literatūroje nurodoma, kad dažniausiai visišką geno „išjungimą“ lemia vieno alelio delecija, o kito alelio - hipermetilinimas (Li et al, 2003). Tyrimai rodo, jog epigenetinės pažaidos gene yra dukart dažnesnės SPK nei NSPK ir būdingos metastazavusiam plaučių vėžiui (Žemaitis et al, 2005). *RASSF1* geno raiškos praradimas plaučių karcinomose koreliuoja su naviko progresija, bloga diferenciacija ir plitimu (Dammann et al, 2003, Honorio et al, 2003). Ištyrus *RASSF1* metilinimo sąsajas su rūkymo įpročiais, nustatytas ryšys su amžiumi, nuo kada pradėta rūkyti (<19±8 metų) (Kim et al, 2003). Nerasta koreliacijų su kitais rūkymo rodikliais (trukme, pakmečiais) (Choi et al, 2005, Kim et al, 2003, Marsit et al, 2005) bei klinikinėmis-patologinėmis savybėmis (Endoh et al, 2003, Choi et al, 2005). Galvos-kaklo karcinomose *RASSF1* hipermetilinimo dažnis siekia 20 - 42% (Righini et al, 2007, Li et al, 2005). Seilių liaukų vėžio atvejais, *RASSF1* metilinimas koreliuoja su histologiniu tipu (adenoidinės cistinės karcinomos ir karcinomose ekspleomorfinės adenomos); o kartu vykstantis *RASSF1* ir *RARB* metilinimas sietinas su histologiniu tipu (karcinoma ex pleomorfinė adenoma), bloga naviko diferenciacija ir blogesne išgyvenimo tikimybe (Lee et al, 2008).

Navikuose *MGMT* raiška slopinama išskirtinai dėl geno promotoriaus hipermetilinimo. Literatūroje nurodoma tik viena geno mutacija (Esteller et al, 2004). Dėl sumažėjusios geno raiškos alkilavimo pažaidų šalinimas tampa ne toks efektyvus, todėl *MGMT* raiškos pokyčiai yra susiję su *TP53* ir *K-ras* mutacijomis. Jų ryšys parodytas plaučių, galvos, kepenų, virškinamojo trakto karcinomų tyrimuose (Nakamura et al, 2001, Esteller et al, 2000, Jacinto et al, 2007). Galvos-kaklo karcinomose *MGMT* metilinimo pažaidos yra vienos dažniausių, plaučių navikuose jos retesnės. Galvos-kaklo navikuose nustatytas ryšys tarp *MGMT* promotoriaus hipermetilinimo ir naviko vystymosi, plitimo į sritinius limfmazgius, blogo ligonių išgyvenamumo (Kato et al, 2006, Paluszczak et al, 2011, Taioli et al, 2009). Literatūroje pateikiama daug duomenų apie *MGMT* hipermetilinimo įtaką gydymo alkilinančiais preparatais

(ypač sergant glioma, limfoma) efektyvumui (Paz et al, 2004, Esteller et al, 2000, Esteller et al, 2002).

Hipermetilintas *DAPK1* promotorius nustatomas daugelyje vėžinių susirgimų. Nesmulkiąstelinėse plaučių karcinomose metilinimo pažaidos randamos 20% - 40% (Tang et al, 2000, Kim et al, 2001), o galvos-kaklo karcinomose - 67 - 76% dažniu (Steinmann et al, 2009, Paluszczak et al, 2011). Koreliacijų su rūkymo faktu neaptinkama (Liu et al, 2007). Pažaidos *DAPK1* gene koreliuoja su nepalankiais klinikiniais rodikliais: plaučių navikuose - metastazavimu, blogesniu išgyvenamumu, o galvos-kaklo karcinomose - plitimu į limfmazgius, vėlesne stadija (Niklinska et al, 2009, Calmon et al, 2007).

II. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

1. Tiriamųjų grupės

Rūkančiųjų ir nerūkančiųjų plaučių vėžio tyrimo mėginiai. Tirti 212 pacientų (kaukazoidų), kuriems 1988 m. rugpjūčio - 1997 m. spalio mėn. buvo atlikta plaučių skilties pašalinimo operacija. Tiriamųjų mėginiai buvo pagrinde surinkti Suomijoje ir Švedijoje kaip Europinio plaučių vėžio biožymenų tyrimo dalis (Husgafvel-Pursiainen et al, 2000, Boffetta et al, 1998). Tyrimui buvo gauti atitinkamų šalių bioetikos leidimai. Visais atvejais nustatytas pirminis nesmulkialąstelinis plaučių vėžys. Atvejai suskirstyti į histologinius tipus: adenokarcinomos (n=103), plokščialąstelinės karcinomos (n=79), kitų histologinių tipų navikai (n=30). Pastarąją grupę sudarė didžiųjų ląstelių karcinomos (n=12), karcinoidai (n=9) ir mišrios histologijos navikai (n=9). Vidutinis ligonių amžius buvo 63 metai (mediana - 66 metai, nuo 18 iki 92 metų). Tiriamąją grupę sudarė 83 moterys ir 129 vyrai. Išsamūs klinikiniai ir demografiniai rodikliai pateikti 2 lentelėje.

Dalyviai užpildė išsamų klausimyną apie rūkymo įpročius ar buvusį poveikį tabako dūmais namuose ar darbe. Dalyvių įtraukimas į tyrimą kontroliuotas atsižvelgiant į poveikį kitais aplinkos kancerogenais, mitybos ypatumus, šeiminių polinkį. Ligoniai suskirstyti į grupes, atsižvelgiant į rūkymo įpročius: rūkantys (n=165; esami ir buvę rūkaliai) ir nerūkantys (n=47; turėję aplinkos tabako dūmų (ATD) poveikį ir neturėję poveikio). Visi rūkantieji rūkė cigaretes. Esamų rūkalių grupei (n=109) priskirti asmenys, rūkę ≤ 1 metus iki vėžio diagnozės. Buvusių rūkalių grupei (n=56) priskirti asmenys, metę rūkyti >1 metus iki diagnozės. Kumuliacinis rūkymo intensyvumas išreikštas pakmečiais (angl.k., pack-year), apskaičiuotas pagal formulę: per dieną surūkomų pakelių skaičius padaugintas iš rūkymo trukmės metais. Niekada nerūkiusių asmenų grupei (n=47) priklausė asmenys, kurie per gyvenimą surūkė ≤ 400 cigarečių. Šioje grupėje dalis ligonių (n=33) buvo pasyviai rūkantys, nes sistemingai (≥ 1 metus iki diagnozės nustatymo) kontaktavo su

ATD namuose ar darbe. Kiti (n=9) - pastovaus kontakto su ATD neturėjo. Nerūkančiųjų grupėje 5 asmenys informacijos apie ATD poveikį nedeklaravo.

2 lentelė. Rūkančių ir nerūkančių ligonių, sergančių plaučių vėžiu, klinikiniai, demografiniai ir rizikos veiksnių rodikliai.

Požymiai	Visi atvejai, n (%)	Nerūkantys, n (%)	Rūkantys, n (%)
Amžius, metai, vidurkis (SEM)	63,5±0,7	63,0±2,0	63,7±0,7
Lytis			
Moterys	83 (39,2)	34 (72,3)	49 (29,7)
Vyrai	129 (60,8)	13 (27,7)	116 (70,3)
Histologinis tipas			
Adenokarcinoma	103 (48,6)	31 (66,0)	72 (43,6)
Plokščialąstelinė karcinoma	79 (37,3)	4 (8,5)	75 (45,5)
Kita	30 (14,1)	12 (25,5)	18 (10,9)
Stadija			
I-II	71 (67,0)	-	69 (66,3)
III-IV	35 (33,0)	-	35 (33,7)
ATD poveikis*			
nėra	-	9 (21,4)	-
yra	-	33 (78,6)	-
Mutacija TP53 gene			
nėra	133(62,7)	44 (93,6)	89 (53,9)
yra	79 (37,3)	3 (6,4)	76 (46,1)
Viso	212	47	165

*Informacijos apie aplinkos tabako dūmų poveikį nedeklaravo 5 asmenys.

Galvos-kaklo vėžio tyrimo mėginiai. Galvos-kaklo navikų epigenetinių pakitimų tyrime tirti 42 Lietuvos asmenys, 2006 m. kovo-lapkričio mėn. kreipęsi į Vilniaus universiteto Onkologijos instituto gydytojus. Visi asmenys raštiškai patvirtino sutikimą dalyvauti tyrime, protokolas patvirtintas Lietuvos bioetikos komiteto. Tiriamųjų grupę sudarė 31 galvos-kaklo vėžiu sergantis asmuo ir 11 asmenų, kuriems nenustatyta onkologinė galvos-kaklo srities liga. Ligoniams galvos-kaklo vėžys diagnozuotas remiantis histologine analize. Vėžio atvejai suskirstyti į histologinius tipus, iš kurių plokščialąstelinis galvos-kaklo vėžys - vyraujantis (n=19). Tiriamųjų ligonių daugumą sudarė vyrai (n=28), navikai dažniausiai lokalizuoti gerklose ir ryklėje (n=14). Vidutinis ligonių amžius buvo 61 metai (mediana - 61 metai, nuo 39 iki 82 metų).

Informacija apie dalyvių rūkymo ir alkoholio vartojimo įpročius gauti iš užpildytos anketos. Pagrindiniai klinikiniai, demografiniai ir rizikos veiksnių rodikliai pateikti 3 lentelėje.

Infekuotumo žmogaus papilomos virusu tyrimą atliko dr. Ž.Gudlevičienė VU Onkologijos institute. Epigenetinei analizei DNR buvo išskirta iš navikų arba nesergančių onkologine liga asmenų burnos epitelio nuograndų.

3 lentelė. Galvos-kaklo vėžiu sergančių ligonių ir nesergančių onkologine liga asmenų klinikiniai, demografiniai rodikliai ir rizikos veiksniai.

Požymiai	Onkologiniai ligoniai, n (%)	Onkologine liga nesergantys asmenys, n (%)
Amžius, metai		
<60	14 (45)	8 (72)
≥60	17 (55)	3 (27)
Lytis		
Moterys	3 (10)	7 (64)
Vyrai	28 (90)	4 (36)
Rūkymo įpročiai		
Rūkantys	27 (87)	3 (27)
Nerūkantys	4 (13)	5 (45)
ŽPV		
Teigiamas	12 (39)	1 (9)
Neigiamas	19 (61)	10 (91)
Stadija		
I-II	12 (39)	-
III-IV	19 (61)	-
Lokalizacija		
Galvos-kaklo srities oda	5 (16)	-
Gerklės, gerklinė ryklės dalis	14 (45)	-
Kita	12 (39)	-
Viso	31	11

Seilių liaukų vėžio tyrimo mėginiai. Tirti 287 pacientų mėginiai, kurie buvo surinkti Universitetinės Erlangen ligoninės Ausų, nosies, gerklės ligų skyriuje, Nurnberg ligoninės Ausų, nosies, gerklės ligų ir veido - žandikaulių chirurgijos skyriuje ir Regensburgo universitetinės ligoninės Ausų, nosies, gerklės ligų skyriuje 1988 m. vasario mėn. - 2008 m. liepos mėn. Tyrimui

gautas tyrejo institucijos bioetikos komiteto leidimas. Tiriami buvo formaline fiksuoti parafine impregnuoti 287 seilių liaukų karcinomų ir 70 seilių liaukų audinių mėginiai, histologine analize patvirtinti kaip nepakitę. Atvejai suskirstyti į histologinius tipus, kuriuos papildomai sugrupavome į 6 grupes pagal navikams būdingą klinikinę eigą. Vidutinis ligonių amžius buvo 60 metų (mediana - 63 metai, nuo 11 iki 98 metų). Tiriamąją grupę sudarė 149 moterys ir 140 vyrai. Ligonų išgyvenamumo mediana 41 mėnuo (ribos 0-298 mėnesiai). Išsamūs demografiniai, klinikiniai ir ligos eigos duomenys pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Seilių liaukų vėžiu sergančių ligonių demografiniai, klinikiniai ir ligos eigos duomenys.

Požymiai	Atvejai, n (%)
Amžius (metai)	
<60	131 (45,8)
≥60	155 (54,2)
Lytis	
Moterys	150 (52,4)
Vyrai	136 (47,6)
Lokalizacija	
Paausinės seilių liaukos	200 (69,9)
Pažandinės seilių liaukos	42 (14,7)
Mažosios seilių liaukos	43 (15,0)
Poliežuvinės seilių liaukos	1 (0,4)
Histologinis tipas	
Acinusų ląstelių karcinoma	41 (15,3)
Adenoidinė cistinė karcinoma	46 (17,2)
Mukoepidermoidinė karcinoma	42 (15,7)
Plokščialąstelinė karcinoma, adenokarcinoma (nepatikslinta), seilių liaukų latakėlių karcinoma	101 (37,7)
Piktybinė mioepitelioma, piktybinis mišrus navikas	21 (7,8)
Bazalinių ląstelių adenokarcinoma, epitelinė - mioepitelinė karcinoma, polimorfinė, geros diferenciacijos adenokarcinoma	17 (6,3)
Stadija	
I	66 (23,3)
II	62 (21,9)

III	62 (21,9)
IV	93 (32,9)
Naviko diferenciacija	
Gera	88 (30,9)
Vidutinė	68 (23,8)
Bloga	129 (45,3)
pT	
1	76 (31,9)
2	94 (39,5)
3	68 (28,6)
Tolimosios metastazės	
nėra	258 (91,8)
yra	23 (8,2)
Išplitimas į sritinius limfmazgius	
nėra	190 (70,4)
yra	80 (29,6)
Mirtis	
nėra	178 (62,2)
yra	108 (37,8)
Viso	287

Kontroliniai mėginiai. Tyrimuose naudota kontrolinė DNR, turinti žinomą metilinimo profilį. Tai - žmogaus placentos DNR (angl.k., deoxyribonucleic acid from human placenta, Millipore), sveikų donorų leukocitų DNR (KL), iš ATCC (American Type Culture Collection) gautų ląstelių linijų T24, H157 ir DLD1 DNR. T24 (ATCC Nr.HTB-4) yra žmogaus šlapimo pūslės karcinomos ląstelių linija, H157 (ATCC Nr.CRL-5802) - žmogaus nesmulkiąstelinio plaučių vėžio ląstelių linija, DLD1 – žmogaus gaubtinės žarnos vėžio ląstelių linija. Šių kontrolinių mėginių metilinimo profiliai pateikti 5 lentelėje. Teigiama kontrole tyrimuose naudota *in vitro* metilinta (naudojant E.coli metiltransferazę SssI; New England Biolabs) sveikų donorų DNR ir *in vitro* metilinta žmogaus placentos DNR (angl.k., CpGenome universal methylated DNA, Sigma) (KM).

5 lentelė. Tiriamų genų promotorių hipermetilinimo profiliai kontroliniuose mėginiuose.

Kontrolinis mėginys	Genai					
	<i>p16</i>	<i>p14</i>	<i>RARB</i>	<i>RASSF1</i>	<i>MGMT</i>	<i>DAPK1</i>
KL	U	U	U	U	U	U
KM	M/MU	M/MU	M/MU	M/MU	M/MU	M/MU
T24	M	U	MU	M	U	U
H157	U	U	U	M	MU	U
DLD1	M	MU	M	M	MU	U

KL - sveikų donorų leukocitų DNR, KM - *in vitro* metilintos sveikų donorų leukocitų ir žmogaus placentos DNR, T24 - žmogaus šlapimo pūslės karcinomos ląstelių linijos DNR, H157 - žmogaus nesmulkiąstelinio plaučių vėžio ląstelių linijos DNR, DLD1 - žmogaus gaubtinės žarnos vėžio ląstelių linijos DNR. M - nustatytas tik metilintas MSP produktas, U - nustatytas tik nemetilintas MSP produktas, MU - nustatyti metilintas ir nemetilintas MSP produktai, M/MU - nustatyti tik metilintas arba metilintas ir nemetilintas MSP produktai.

2. Tyrimo metodai

Tyrimai atlikti Vilniaus universiteto (VU) Gamtos mokslų fakulteto Botanikos ir genetikos katedros Ekologinės genetikos laboratorijoje, Suomijos profesinės sveikatos instituto biologinių mechanizmų tyrimų ir prevencijos laboratorijoje (angl.k., Finnish Institute of Occupational Health, Department of Biological mechanisms and prevention of work - related diseases) bei Erlangen-Nurnberg universiteto patologijos instituto eksperimentinės vėžio patologijos laboratorijoje (angl.k., University of Erlangen-Nurnberg, Department of Experimental tumour pathology).

2.1. DNR paruošimas epigenetinei analizei

DNR skyrimas. Skiriant DNR iš plaučių navikų mėginių, taikytas organinių tirpiklių metodas. Mėginiai buvo impregnuoti parafine arba šaldyti. Skiriant DNR iš šaldytų plaučių navikų, mėginio ląstelės lizuojamos 500 µl lizės buferiu (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5% Tween tirpalas), 2 val 55°C inkubuojama termopurtyklėje 500 rpm. Įpilama 25 µl 20mg/ml proteinazės K (Fermentas), inkubuojama 16 val 55°C termopurtyklėje 500

rpm. DNR atskiriama 500 µl fenolio/chloroformo/izoamilalkoholio mišiniu (25:24:1) purtant 10 min. Centrifuguojama 10 min 14000 rpm, supernatantas atskiriamas. Etapas pakartojamas. Etapas pakartojamas su 500 µl chloroformo. DNR precipituojama mišinyje iš 40 µl 5 M NH₄Ac, 1 ml šalto (-20°C) 96% etanolio ir 2,5 µl glikogeno. Laikoma 2 val -20°C temperatūroje. DNR nusodinama centrifuguojant 25 min 14000 rpm +4°C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas. DNR praplaunama 500 µl 70% -20°C temperatūros etanolio, supurtoma, centrifuguojama 25 min 14000 rpm +4°C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas. Etanolio likučiai išgarinami. DNR ištirpinama 50 µl vandens.

Skiriant DNR iš parafine impregnuotų audinių, papildomai atliekamas parafino pašalinimas ksilolu. Ant mėginio pilama 1 ml ksilolo, inkubuojama 10 min 55°C termopurtyklėje. Centrifuguojama 10 min 13000 rpm, supernatantas pašalinamas. Etapas pakartojamas. Įpilama 1 ml 96% etanolio, inkubuojama 10 min 55°C termopurtyklėje. Centrifuguojama 10 min 13000 rpm, supernatantas pašalinamas. Etapas pakartojamas. Etanolio likučiai išgarinami. Toliau DNR skyrimas tęsiamas kaip ir skiriant DNR iš šaldytų audinių.

Skiriant DNR iš burnos epitelio ir navikinio audinio nuograndų naudotas „SORPOclean TM Genomic DNA Extraction Module“ rinkinys, taikytas gamintojo parengtas protokolas. DNR skyrimą atliko dr. Ž.Gudlevičienė VU Onkologijos institute, Kancerogenezės ir navikų patofiziologijos laboratorijoje.

Seilių liaukų navikų ir nenavikinių audinių DNR buvo skiriama, naudojant Macherey-Nagel NucleoSpin® tissue rinkinį vadovaujantis gamintojo pateiktu protokolu.

DNR koncentracijos matavimas, švarumo įvertinimas. DNR koncentracija nustatoma biofotometru matuojant 260 nm bangos ilgio šviesos sugertį. Mėginio švarumui įvertinti kontroliuojami A260/280, A260/230, 320 parodymai.

DNR modifikacija bisulfitu. Epigenetines pažaidas tyrėme metodais, pagrįstais DNR modifikacija bisulfitu, kurios metu nemetilintas citozinas paverčiamas uracilu (PGR metu virstantis timinu). Metilintas citozinas lieka

nepakitęs. Sukuriami metilintos ir nemetilintos sekų skirtumai, aptinkami PGR principu paremta metodika. Plaučių navikų tyrime DNR modifikavimui bisulfitu naudojome Wizard DNA Clean-up System rinkinį (Promega), taikėme gamintojo protokolą. Trumpai pateikiami pagrindiniai etapai. Modifikacijai naudojama 0,72 µg DNR, pradinis tūris 18 µl. DNR denatūruojama 2µl 3M NaOH, inkubuojama 15 min 37°C termopurtyklėje. Įpilama 208 µl 2,3 M Na metabisulfito (Sigma) pH 5,0 ir 12 µl 10 mM hidrochinono, supurtoma, centrifuguojama. Mėginys inkubuojamas termostate 16 val 50°C temperatūroje. DNR nudruskinimui naudojamos kolonėlės. Mėginys sumaišomas su 1 ml DNR valymo buferio, įpilamas į valymo kolonėlę vakuumo sistemoje. Esant 100-150 Hg mm slėgiui, DNR susikaupia kolonėlese. Praplauinama 2 ml 80% izopropanolio. Visiškai izopropanolio pašalinimui kolonėlės centrifuguojamos 2 min x 10000 rpm. DNR eliuuojama 40 µl 70°C temperatūros vandeniu, inkubuojama 1 min kambario temperatūroje, centrifuguojama 1min 10000rpm. Įpilama 4,5 µl 3 M NaOH, inkubuojama 15 min 37°C temperatūroje. Tirpalas neutralizuojamas 28 µl 5 M NH₄Ac. DNR precipituojama įpylus 200 µl 96% etanolio ir 1 µl glikogeno (Fermentas) ir laikant 3val -20°C temperatūroje. Centrifuguojama 25 min 13000 rpm, supernatantas pašalinamas. Įpilama 100 µl 70% etanolio, supurtoma, centrifuguojama, 30 min laikoma -20°C temperatūroje. Centrifuguojama 25 min 13000 rpm, supernatantas pašalinamas. Etanolis išgarinamas. DNR ištirpinama 40 µl vandens.

Galvos-kaklo vėžio tyrime epitelio nuograndų DNR buvo modifikuojama naudojant jau minėtą Promega rinkinį. Reagentai, ir etapai nesiskiria nuo ankščiau pateiktų, tačiau čia naudojama 0,5 - 0,8 µg DNR, pradinis tūris 50 µl. Pirmoji DNR denatūracija atliekama 5,5 µl 3 M NaOH tirpalu, modifikuojama 520 µl 2,3 M Na metabisulfito ir 30 µl 10 mM hidrochinono mišiniu. Galutinis tūris - 40 µl.

Seilių liaukų navikų tyrime naudotas CpGenome DNA modification kit (Chemicon) rinkinys. DNR modifikavimui naudojama 0,25 µg DNR. Etapai atlikti naudojant gamintojo pateiktą protokolą. Galutinis tūris - 60 µl.

2.2. DNR metilinimo tyrimai naudojant metilinimui jautrią PGR

Metilinimui jautri PGR. Metilinimui jautri PGR arba MSP (angl.k., methylation specific polymerase chain reaction) - tai PGR principu pagrįstas aukšto jautrumo ir specifiškumo metodas, aptinkantis vieną hipermetilintą DNR molekulę tarp 1000 nemetilintų (Herman et al, 1996). MSP atliekama pagausinant tiriamą seką pradmenų poromis, besijungiačiais tik su modifikuota DNR bei atrankiai besijungiančiais su metilinta (Mp/ap pradmenys - M reakcija) ar nemetilinta (Up/ap pradmenys - U reakcija) DNR seka geno promotoriuje ir pirmame egzone. Tyrimuose naudotos pradmenų sekos (priedas, 1 lentelė) parinktos iš publikacijų (Herman et al, 1996, Esteller et al, 2000, Virmani et al, 2000, Burbee et al, 2001, Esteller et al, 1999, Katzenellenborg et al, 1999). MSP reakcijų mišinio sudėtis, jų kiekiai bei optimalios DNR pagausinimo sąlygos nurodyti priede, 2 lentelėje. Šiuo metodu tirti plaučių ir galvos-kaklo navikų bei galvos-kaklo vėžiu nesergančių asmenų burnos ertmės nuograndų DNR.

MSP rezultatų įvertinimas. Mėginys laikomas metilintu, jei produktas nustatomas reakcijose su metilinta ir nemetilintą seką pagausinančiomis pradmenų poromis. Nustačius produktą tik reakcijoje su nemetilintą seką pagausinančiais pradmenimis, mėginys laikomas nemetilintu.

Bisulfitinio virsmo kokybė tikrinama atliekant PGR su pradmenimis pagausinančiais nemodifikuotą DNR seką (laukinio tipo/WT pradmenys). Pilnos modifikacijos atveju, reakcija WT pradmenimis nevyksta. MSP M ir U reakcijų atrankumas įvertinamas atliekant nemodifikuotos DNR pagausinimą ir naudojant teigiamą ir neigiamą kontroles. Reakcijos tarša kontroliuojama kiekvieno bandymo metu į reakcijos mišinį vietoj DNR įnešant H₂O.

2.3. DNR metilinimo tyrimai pirosekvenavimo metodu

Pirosekvenavimas. Pirosekvenavimui naudojama bisulfitu modifikuota DNR. PGR reakcija renkama pagal 6 lentelėje pateiktą schemą. Reakcijos komponentai ir pagausinimo režimas parinkti remiantis gamintojo rekomendacijomis, pateikti 6 lentelėje. Reakcijai naudoti komerciniai (Biotage AB) *MGMT* pradmenys, amplifikuojantys geno promotoriaus seką +17-39 pozicijoje. Šiuo metodu tirti seilių liaukų navikų ir histologiškai nepakitusių seilių liaukų audinių mėginiai.

PGR produktai (104 bp) analizuojami automatine elektroforeze. Vėliau PGR produktas paruošiamas pirosekvenavimui. Kiekvienam mėginiui ruošiamas mišinys iš 5 µl sefarožės (BiotageAB) ir 40 µl rišamojo buferio (angl.k., binding buffer). 24 šulinėlių plokštelėje į šį mišinį įpilama 20 µl PGR produkto ir purtoma 10 min termopurtyklėje 14000 rpm. Kitas mišinys iš 19,2 µl prijungimo buferio (angl.k., annealing buffer) ir 0,8 µl sekvenavimo pradmens (galutinė koncentracija vienam mėginiui 0,3 µM), įpilamas į kiekvieną šulinėlį sekvenavimo plokštelėje. Įjungus vakuumą, nešantysis filtras nukreipiamas į sefarožės-rišamojo buferio - PGR produkto mišinį. Filtras praplaunamas 70% etanoliu, denatūracijos ir plovimo buferiais ir vandeniu. Išjungus vakuumą, sefarožės - DNR dalelės atpalaiduojamos ant sekvenavimo plokštelės. Mėginiai inkubuojami 2 min 80°C temperatūroje ant kaitinimo bloko. Į sekvenavimo bloką įpilami PyroGold reagentai (NTP, fermentų mišinys, substratas) pagal programinės įrangos PyroQ-CpG 1.0.10 (Biotage AB) nurodymus. Bandymas atliekamas PyroMarkQ 24 (Biotage AB) prietaisu. Gauti rezultatai analizuojami PyroQ-CpG 1.0.10 programine įranga.

6 lentelė. PGR mišinio komponentai, reagentų kiekiai vienai reakcijai (A) ir PGR režimas (B).

A		B	
Komponentai	Reakcijos mišinys	Etapas	PGR režimas
Distiliuotas H ₂ O	-	Polimerazės aktyvacija	95°C, 15 min
10x PGR Buferis	1X	Grandinių išskyrimas	95°C, 20 s
25 mM MgCl ₂	1,5 mM	Pradmenų prijungimas	53°C, 20 s
dNTP mišinys	0,4 mM	Produkto ilginimas	72°C, 20 s
Pradmenys p+ap	0,5 μM+0,5 μM	Galutinis ilginimo etapas	72°C, 5 min
Polimerazė	0.8 U	Saugojimas	4°C, ∞
Mod. DNR	8-10 ng		
Reakcijos tūris	25 μl		

Pirosekvenavimo rezultatų įvertinimas. Metilinimo lygis kiekviename iš 5 tirtų CpG įvertintas C/T santykiu (%). Vidutinis metilinimo lygis apskaičiuotas išvedus vidurkį iš 5 CpG įvertinimų. Mėginys laikytas metilintu, jei nustatytas vidutinis metilinimo lygis $\geq 10\%$.

2.4. PGR produkto elektroforezinis įvertinimas

Elektroforezė nedematūruojančiame poliakrilamido (PAA) gelyje. MSP reakcijos produktai analizuojami 7,5% poliakrilamido gelyje. Poliakrilamidas: 6,9 g akrilamidas, 0,33 g N,N'-metilbisakrilamidas ir 100 ml 1x TAE buferis. 50x TAE: 121 g TRIS-HCl (Tris-hidrochloridas), 28,5 ml ledinė acto rūgštis, 25 ml 0,5 M EDTA (pH8) ir distiliuotas vanduo iki 500 ml. 7,5% poliakrilamido gelis: 10 ml PAA, 40 μl 10% amonio persulfatas ir 12 μl TEMED. Gelis formuojamas vertikaliame rėmelyje tarp dviejų stiklo plokščių įdedant šukutes. Polimerizacijos laikas - 40 min. Elektroforezė vykdoma omniPAGEmini aparate, užpildytame 1x TAE buferiu. Ilgio žymeniu naudojamas pUC (sudaro 26, 34, 67, 110, 111, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501 bp ilgio fragmentai, Fermentas). Į šulinėlius užnešama po 12 μl PGR produkto, sumaišyto su 2 μl nešančiojo dažo. Frakcionuojama 45 min 110 V elektros srovės lauke. DNR išryškinama gelį 5 min inkubuojant 100 ml H₂O ir

7 μ l 10 mg/ml etidžio bromido tirpale. Gelis praplaunamas vandeniu, fotografuojamas ir dokumentuojamas programine įranga GelCapture v4.25 (DNR Bio-Imaging Systems).

Automatinė elektroforezė Qiaxcel prietaisu. Vykdamas tyrimus Vokietijos Friedrich-Aleksander Erlangen-Nurnberg universitete, PGR produktai analizuoti automatinės elektroforezės būdu. Naudojamas QIAxcel DNA High Resolution Kit rinkinys. Į pirmos mėgintuvėlių eilutės visus šulinėlius įnešama po 15 μ l lygiavimo žymens (angl.k., alignment marker). Į kitos mėgintuvėlių eilutės šulinėlius įnešama po 15 μ l PGR produkto. Eilutės dedamos į automatinį mėginių ėmiklį joms skirtose pozicijose. Elektroforezė atliekama Qiaxcel Biocalculator programine įranga, AM320mtd metodu.

2.5. Imunohistocheminė baltymo MGMT raiškos analizė

Baltymo MGMT raiškos analizė atlikta 287 seilių liaukų navikų ir 70 histologiškai nepakitusių seilių liaukų audinių mėginiuose. Šis tyrimas atliktas kartu su Friedrich-Aleksander Erlangen-Nurnberg universiteto patologijos laboratorijos darbuotojais. Iš parafininių audinių blokų buvo sukonstruoti audinių mikrogardelių (mėginio skersmuo 2 mm, storis 3 μ m) blokai. Baltymų raiška analizuota viename mikrogardelės pjūvyje. Norint išsiaiškinti galimai heterogenišką MGMT baltymo raišką navike, atsitiktinai parinkti ir išanalizuoti 10 viso naviko pjūvių. Baltymui aptikti naudoti pirminiai pelių monokloniniai antikūnai SPM287 (Abcam) ir antriniai antikūnai Envision+ (Dako), kurių reaktyvumas kontroliuotas naudojant histologiškai normalių seilių liaukų ir kitų lokalizacijų audinių pjūvius. Imunohistochemijos reakcijas (MGMT baltymo raišką branduolyje) vertino trys patologai (S.Schwarz, A.Hartmann, M.Mueller). Baltymo raiškos praradimas nustatytas, jei mėginyje nusidažė <30% ląstelių, o raiška įvertinta teigiamai, jei nusidažė \geq 30% ląstelių.

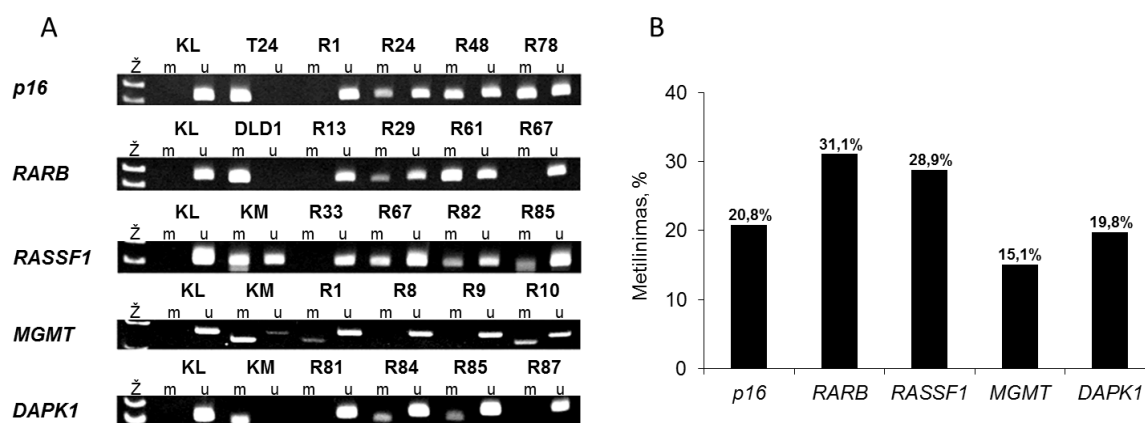
2.6. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta *Excel*, *Graphpad Instat v3.0.6*, *SPSS v18.0.0* ir *SAS/STAT v9.2* programinėmis įrangomis. MSP radiniams apibūdinti naudotos charakteristikos: dažnis (%), metilinimo indeksas (MI, metilintų genų skaičius/ tirtų genų skaičius), bendras hipermetilinimo dažnis (≥ 1 geno promotoriaus hipermetilinimas). Pirosekvenavimo radiniams apibūdinti naudoti: dažnis (%) ir vidutinis metilinimo lygis (5 CpG metilinimo lygio įvertinimų vidurkis, %). Hipotezės apie vidurkių lygybę tikrinimui testiniams požymiams naudotas Stjudento *t* kriterijus. Kokybinių požymių nepriklausomumui ar homogeniškumui tikrinti taikytas tikslusis chi kvadrato kriterijus. Dvireikšmių požymių dažnių vertinimui naudotas tikslusis *Fischer* arba *Mantel-Haensel* testas, įvertintas šansų santykis ir 95% pasikliautinieji intervalai. Logistinės regresijos metodu nustatyta požymių įtaka binominių įvykių pasirodymo tikimybėms. Gyvenimo trukmei įvertinti naudotas *Kaplan-Meier* metodas, skirtumai tarp grupių įvertinti log rank testu. Mirties dėl ligos santykinei rizikai prognozuoti taikyta *Cox* proporcijų rizikų regresijos analizė. Skaičiavimai yra statistiškai patikimi, jei $p < 0,05$.

III. REZULTATAI

1. Genų *p16*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT* ir *DAPK1* promotoriaus DNR metilinimas plaučių navikuose

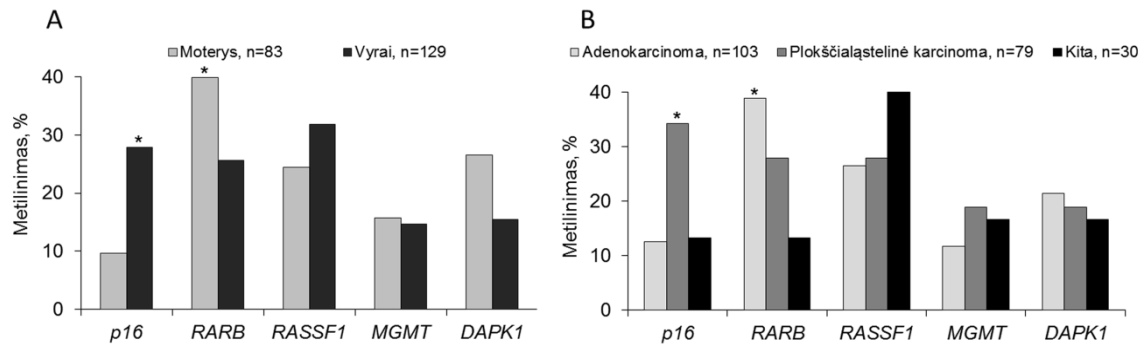
Hipermetilinimo dažniai ir sąsajos su klinikiniais bei demografiniais rodikliais. MSP metodu ištyrus genų *p16*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT* ir *DAPK1* hipermetilinimą 212 plaučių navikuose, epigenetinės pažaidos ≥ 1 geno promotoriuje nustatytos net 70,8% (150/212) atvejų. Metilinimo indeksas buvo lygus 0,23. Plaučių karcinomose nustatyti šie genų hipermetilinimo dažniai: *p16* - 20,8%, *RARB* - 31,1%, *RASSF1* - 28,9%, *MGMT* - 15,1% ir *DAPK1* - 19,8% (1 paveikslas, 7 lentelė). Sveikų (n=3) ir vėžiu sergančių (n=10) asmenų leukocitų DNR nebuvo metilintas nė vienas geno promotorius.



1 paveikslas. Elektroforezės poliakrilamido gelyje nuotrauka tiriant promotoriaus hipermetilinimą (A). Genų promotorių hipermetilinimo dažniai plaučių karcinomose (B). Ž - molekulinės masės žymuo, KL - sveikų donorų leukocitų DNR, T24 - žmogaus šlapimo pūslės karcinomos ląstelių linijos DNR, KM - *in vitro* metilinta leukocitų DNR, R - plaučių karcinomų mėginiai.

Geno *p16* promotoriaus hipermetilinimas buvo dažnesnis vyrų plaučių karcinomose negu moterų (27,9% vs 9,6%; $p=0,002$; 2 paveikslas), o *RARB* metilinimo pažaidos dominavo moterų navikuose (39,8% vs 25,6%; $p=0,044$). Taip pat *DAPK1* metilinimo pažaidų dažnis didesnis nustatytas moterų grupėje

($p=0,076$). Daugiaveiksneje analizėje įvertinus ligonių amžių, histologinį tipą, *TP53* mutacijų būklę ir rūkymo įpročius, tik *p16* promotoriaus hipermetilinimo ryšys su lytimi išliko statistiškai patikimas ($p=0,018$).



2 paveikslas. Hipermetilinimo dažniai pagal ligonių lytį (A) ir naviko histologinį tipą (B). * - statistiškai patikimi skirtumai.

Vertinant pažaidų dažnį pagal histologinį naviko tipą, *p16* geno promotoriaus hipermetilinimas dažniausiai vyko plokščialąstelinėse plaučių karcinomose (27/79; 34,2%; $p=0,001$; 2 paveikslas; 7 lentelė). Adenokarcinomose, didžiųjų ląstelių karcinomose ir mišriuose navikuose *p16* hipermetilinimas vyko retai, o karcinoiduose ($n=9$) pažaidų nenustatėme (0%). *RARB* metilinimo pažaidos žymiai rečiau vyko kitų lokalizacijų navikuose negu adenokarcinomose (13,3% vs 38,8%; $p=0,012$). Mišriuose navikuose pažaidų šiame gene nenustatėme ($n=9$; 0%). Daugiaveiksneje analizėje abi koreliacijos su histologiniu naviko tipu išliko statistiškai patikimos (*p16* - $p=0,025$; *RARB* - $p=0,006$).

Statistiškai patikimų koreliacijų tarp klinikinių, demografinių rodiklių (ligonių amžiaus, ligos stadijos) ir kitų genų promotoriaus hipermetilinimo nenustatėme.

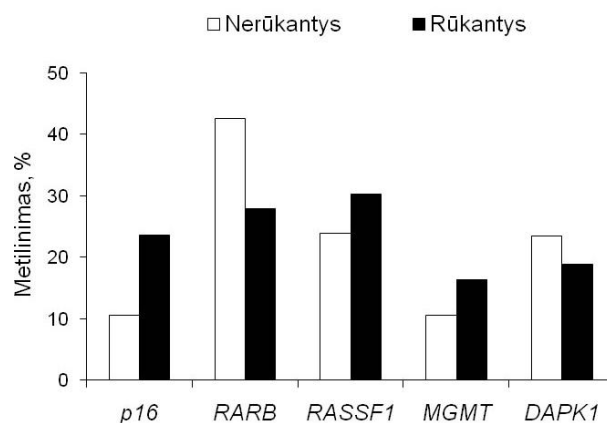
7 lentelė. Genų promotoriaus DNR hipermetilinimo dažniai plaučių karcinomose.

Požymiai	Viso, n (%)	<i>p16</i> , n (%)	<i>RARB</i> , n (%)	<i>RASSF1</i> , n (%)	<i>MGMT</i> , n (%)	<i>DAPK1</i> , n (%)
Lytis						
Moterys	83	8 (9,6)	33 (39,8)	20 (24,4) ¹	13 (15,7)	22 (26,5)
Vyrai	129	36 (27,9)	33 (25,6)	41 (31,8)	19 (14,7)	20 (15,5)
p reikšmė		0,002	0,044	0,318	1,000	0,076
Histologinis tipas						
Adenokarcinoma	103	13 (12,6)	40 (38,8)	27 (26,5) ¹	12 (11,7)	22 (21,4)
Plokščialąstelinė karcinoma	79	27 (34,2)	22 (27,9)	22 (27,9)	15 (18,9)	15 (18,9)
Kita	30	4 (13,3)	4 (13,3)	12 (40,0)	5 (16,7)	5 (16,7)
p reikšmės: ²		0,001	0,163	0,967	0,243	0,839
³		1,000	0,012	0,232	0,654	0,782
Rūkymo įpročiai						
Nerūkantys	47	5 (10,6)	20 (42,6)	11 (23,9) ¹	5 (10,6)	11 (23,4)
Rūkantys	165	39 (23,6)	46 (27,9)	50 (30,3)	27 (16,4)	31 (18,8)
p reikšmė		0,073	0,086	0,514	0,471	0,609
Mutacija <i>TP53</i> gene						
nėra	133	21 (15,8)	42 (31,6)	33 (25,0) ¹	15 (11,3)	26 (19,6)
yra	79	23 (29,1)	24 (30,4)	28 (35,4)	17 (21,5)	16 (20,3)
p reikšmė		0,034	0,980	0,145	0,072	1,000
Viso, n (%)	212	44 (20,8)	66 (31,1)	61 (28,9)	32 (15,1)	42 (19,8)

¹ - vienu atveju hipermetilinimo duomenų nėra, ² - plokščialąstelinė karcinoma vs adenokarcinoma, ³ - kitos lokalizacijos navikai vs adenokarcinoma.

Sąsajos su rūkymo įpročiais. Įvertinus genų hipermetilinimo dažnius pagal ligonių rūkymo įpročius nustatėme, kad epigenetiniai pakitimai tirtų genų promotoriuose yra dažnesni rūkančiųjų grupėje (3 paveikslas), o MI vertės yra artimos (0,23 rūkančiųjų ir 0,22 nerūkančiųjų grupėje). Stebėjome dažnesnes *p16* epigenetines pažaidas rūkančiųjų navikuose ($p=0,073$; OR 2,59; 95%CI 0,93-8,97). Rūkančiųjų grupėje šis genas dažniausiai buvo hipermetilintas buvusių rūkalių subgrupėje palyginus su esamų rūkalių navikais (OR 2,27; 95%CI 1,02-5,08; $p=0,044$; 4 paveikslas), ir žymiai skyrėsi nuo nerūkančiųjų grupės (OR 4,25; 95%CI 1,36-16,06; $p=0,009$). Priešingai, *RARB* hipermetilinimas vyko dažniau nerūkančiųjų plaučių karcinomose negu rūkančiųjų (42,6% vs 27,9%), tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas (OR 0,52; 95%CI 0,25-1,09; $p=0,086$).

Patikimų koreliacijų tarp epigenetinių pakitimų dažnio ir rūkymo intensyvumo, įvertinto pakmečiais ar surūkytų cigarečių per dieną skaičiumi, amžiaus, nuo kada pradėta rūkyti, nenustatėme.

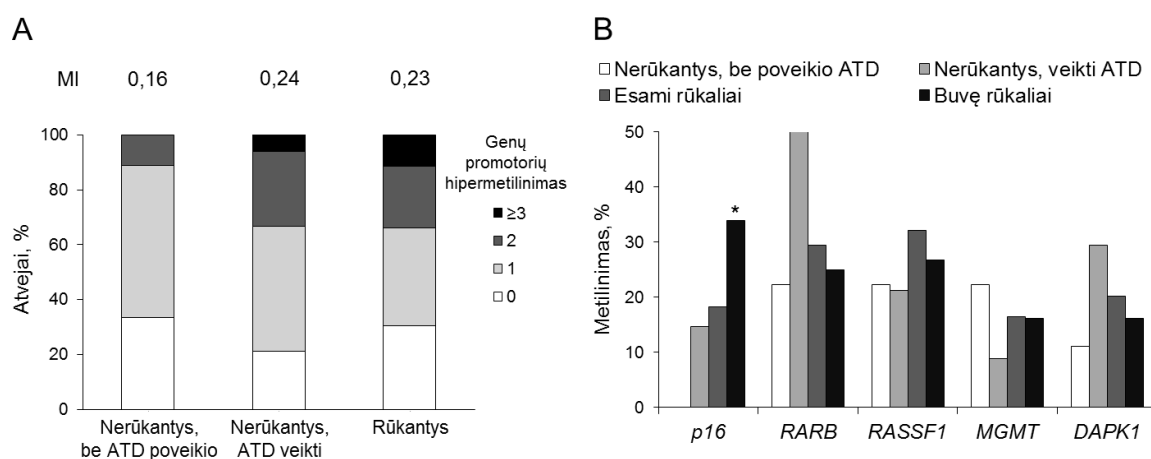


3 paveikslas. Genų promotorių hipermetilinimo dažniai skirtingose pagal rūkymo įpročius plaučių vėžio ligonių grupėse.

Pasyvaus rūkymo poveikis. Nagrinėdami epigenetines pažaidas nerūkančių ligonių, pateikusių duomenis apie pasyvaus rūkymo ypatumus, navikuose ($n=42$), nustatėme įdomių koreliacijų. Nerūkiusių, bet aplinkos tabako dūmais (ATD) veiktų ligonių navikuose nustatytas metilinimo indeksas (0,24) buvo artimas rūkančių ligonių navikų MI (0,23) ir žymiai aukštesnis už

nerūkiusių, neturėjusių ATD poveikio navikuose nustatytą MI (0,16; 4 paveikslas). Taip pat, rūkančių ir nerūkančių, ATD veiktų ligonių navikuose nustatėme daugiau promotoriaus hipermetiliniu pažeistų genų (4 paveikslas).

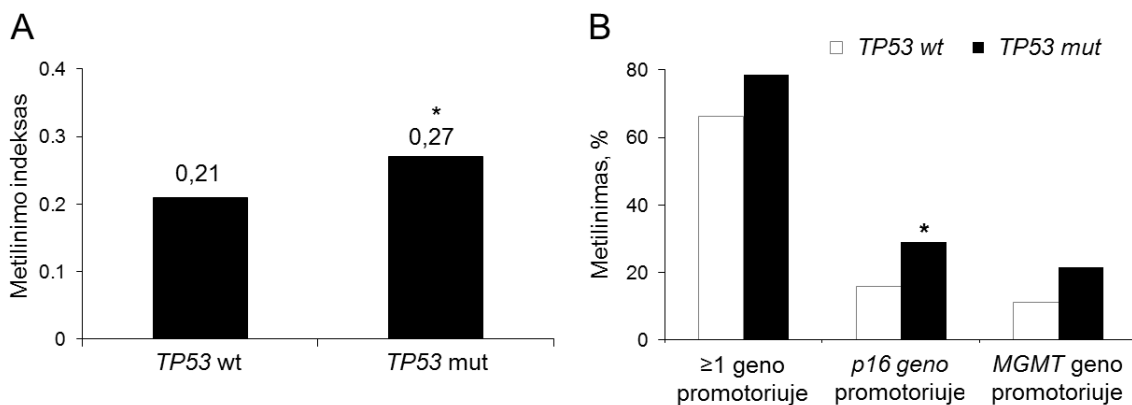
Fišerio testas parodė statistiškai patikimus *p16* hipermetilinio skirtumus: didžiausią pažaidų dažnio skirtumą stebėjome metusių rūkyti ir nerūkančių be ATD poveikio ligonių navikuose (33,9% vs 0%; $p=0,069$; 4 paveikslas). Nerūkančiųjų grupės navikuose buvo dažnos *RARB* geno pažaidos. Hipermetilinis vyko dukart dažniau turėjusių ATD poveikį negu neturėjusių poveikio asmenų plaučių karcinomose (48,5% vs 22,2%; OR 3,21; 95%CI 0,51-36,15). Taip pat *DAPK1* promotoriaus hipermetilinis dažniau vyko turėjusių ATD poveikį nerūkančių ligonių plaučių karcinomose (30,3% vs 11,1%; OR 3,39 95%; CI 0,36-169,53).



4 paveikslas. Metilimo indeksas ir genų promotorių hipermetilinis naviką slopinančiuose genuose nerūkančių (ATD veiktų ir neveiktų) ir rūkančių ligonių navikuose (A). Genų promotorių hipermetilinis dažniai skirtingose pagal rūkymo įpročius ir poveikį aplinkos tabako dūmais plaučių vėžiu sergančių ligonių navikuose (B). ATD - aplinkos tabako dūmai, * - statistiškai patikimi skirtumai.

Sąsajos su mutacijomis gene *TP53*. *TP53* mutacijų būklė pirminėse plaučių karcinomose ištirta ankščiau (Husgafvel-Pursiainen et al, 1999, Husgafvel-Pursiainen et al, 2000). Nustatyti šie mutacijų dažniai: 46,1%

(76/165) rūkančiųjų ir 6,4% (3/47) nerūkančiųjų navikuose. Metilinimo indeksas buvo žymiai aukštesnis navikuose, kuriuose nustatyta *TP53* geno mutacija negu navikuose be mutacijos (0,27 vs 0,21; $p=0,018$; 5 paveikslas). Plaučių karcinomose, turinčiose *TP53* mutaciją, dažniau buvo metilintų ≥ 1 geno promotorių (OR 1,86; 95%CI 0,94-3,80; $p=0,078$; 5 paveikslas). Dažnesnis genų *p16* ir *MGMT* hipermetilinimas stebėtas *TP53* mutaciją turinčiuose navikuose nei navikuose, turinčiuose nepažeistą *TP53* geną ($p=0,034$ ir $p=0,072$, atitinkamai). Daugiaveiksniėje analizėje atsižvelgus į ligonių amžių, lytį, histologinį tipą ir rūkymo įpročius, *TP53* mutacijų ir hipermetilinimo ≥ 1 geno promotoriuje koreliacija buvo statistiškai reikšminga ($p=0,027$).

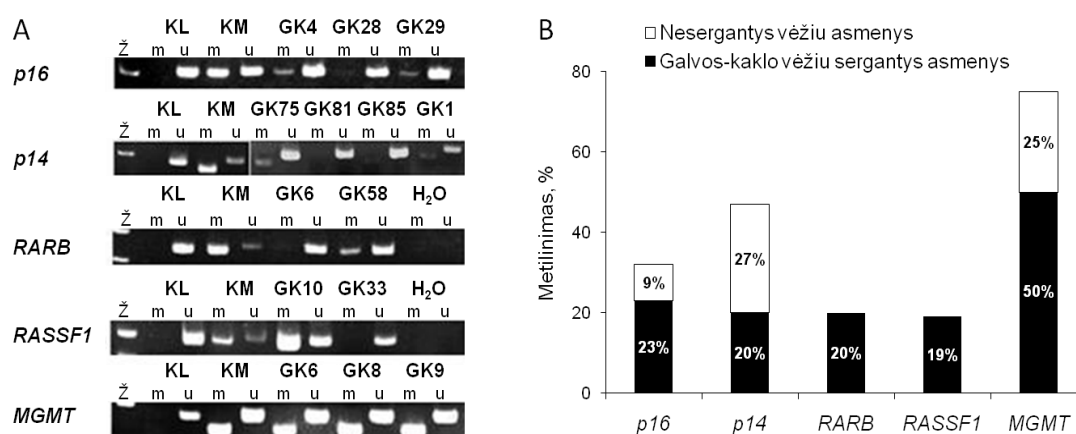


5 paveikslas. Metilinimo indeksas mutaciją *TP53* gene turinčiuose (*TP53* mut) ir neturinčiuose (*TP53* wt) plaučių navikuose (A). Metilinimo dažniai ≥ 1 geno promotoriuje ir *p16*, *MGMT* genų promotoriuose (B). * - statistiškai patikimi skirtumai.

2. Genų *p16*, *p14*, *RARB*, *RASSF1* ir *MGMT* promotoriaus DNR metilinimas galvos-kaklo navikuose

Hipermetilinimo dažniai ir sąsajos su klinikiniais bei demografiniais rodikliais. MSP metodu ištyrus genų *p16*, *p14*, *RARB*, *RASSF1* ir *MGMT* hipermetilinimą 31 galvos-kaklo karcinomų, nustatyti šie NSG hipermetilinimo dažniai: *p16* - 23%, *p14* - 20%, *RARB* - 20%, *RASSF1* - 19%, *MGMT* - 50% (6

paveikslas). DNR metilinimo pažaidos ≥ 1 geno promotoriuje vyko 71% (22/31) navikų (8 lentelė). Išanalizavus vėžiu nesergančių asmenų burnos epitelio mėginius (n=11), nustatyti 5 hipermetilinimo atvejai (6 paveikslas). *p16* hipermetilinimas nustatytas leukoplakijos (lot. *leucoplakia linguae*) atveju, hipermetilintas *MGMT* promotorius aptiktas sveiko rūkančio asmens mėginyje. *p14* hipermetilinimas nustatytas 3 atvejais: vienas asmuo - rūkantysis, kiti du rūkymo įpročių nedeklaravo.

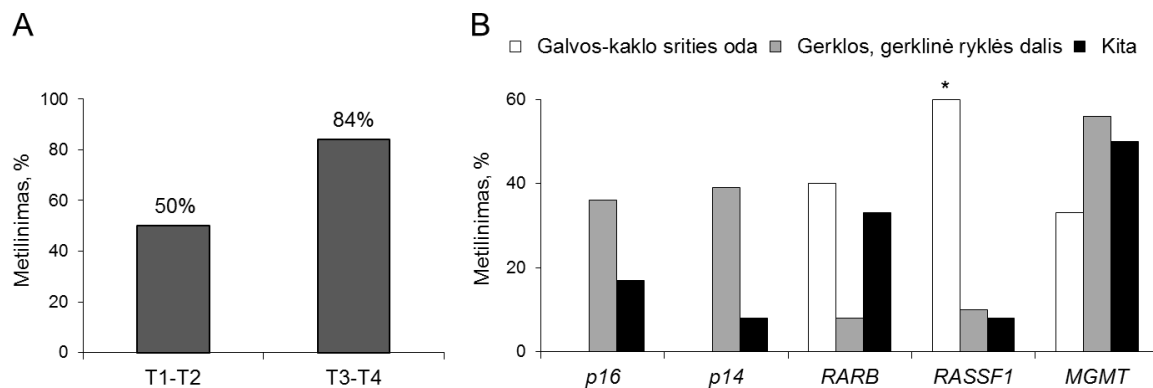


6 paveikslas. Elektroforezės poliakrilamido gelyje nuotrauka tiriant promotoriaus hipermetilinimą galvos-kaklo mėginiuose (A). Bendri hipermetilinimo dažniai nesergančių vėžiu asmenų burnos ertmės nuograndose ir galvos-kaklo karcinomose (B). Ž - ilgio žymuo, KL - sveikų donorų leukocitų DNR, KM - *in vitro* metilinta leukocitų DNR, GK - nesergančių vėžiu asmenų burnos epitelio ir galvos-kaklo navikų nuograndų DNR.

Statistiškai patikimų genų promotorių hipermetilinimo skirtumų ŽPV teigiamuose ir ŽPV neigiamuose navikuose nenustatėme. *RASSF1* geno hipermetilinimas dažniau vyko ŽPV teigiamuose navikuose (27% vs 8%). Taip pat šioje grupėje nežymiai dažniau buvo hipermetilintas ≥ 1 geno promotorius (69% vs 62%).

Analizuodami ≥ 1 geno promotoriaus hipermetilinimo dažnį įvairiose klinikinėse - demografinėse tiriamųjų grupėse, nustatėme didesnius dažnius vėlyvų stadijų (T3-T4) navikuose palyginus su ankstyvomis stadijomis (T1-T2)

(84% vs 50%; $p=0,056$; 7 paveikslas). Vėlyvų stadijų navikuose dominavo pažaidos genų *p16*, *p14* ir *MGMT* promotoriuose.



7 paveikslas. Hipermetilavimo dažniai ≥ 1 geno promotoriuje ankstyvų (T1-T2) ir vėlyvų (T3-T4) stadijų galvos-kaklo navikuose (A). Genų promotoriaus hipermetilavimo dažniai skirtingų lokalizacijų galvos-kaklo navikuose (B). * - statistiškai patikimi skirtumai.

Epigenetinių pakitimų profilis skyrėsi įvairių lokalizacijų galvos-kaklo navikuose (8 lentelė; 7 paveikslas). *RASSF1* geno promotoriaus hipermetilavimas dažniau vyko galvos-kaklo srities odos navikuose negu gerklų ir gerklinės ryklės dalies karcinomose ($p=0,08$) ar kitų lokalizacijų (burninė ryklės dalis, liežuvis, sinusai) navikuose ($p=0,05$). Genų *p16* ir *p14* hipermetilavimo nenustatėme odos karcinomose, tačiau jos buvo dažnos gerklų ir gerklinės ryklės dalies karcinomose.

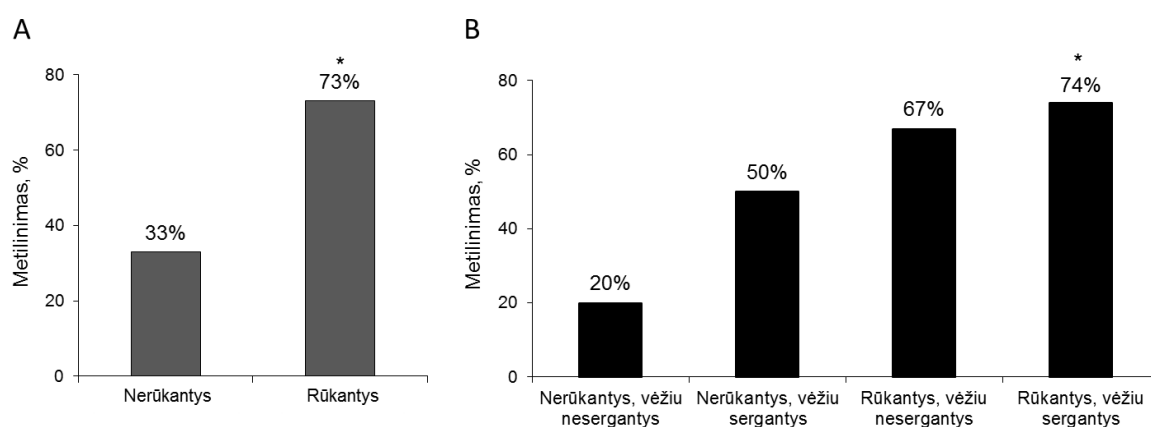
Stebėjome ≥ 1 geno promotoriaus hipermetilavimo dažnių skirtumus demografinėse grupėse. ≥ 1 geno hipermetilavimas ir konkrečių NSG hipermetilavimas vyko dažniau vyresnio amžiaus (≥ 60 metų) asmenų mėginuose. Taip pat epigenetiniai pakitimai buvo dažnesni vyrų negu moterų grupėje. Paminėtina, jog daugumą moterų grupės sudarė nesergantys onkologine liga (7/10; 70%), nerūkantys (4/9; 44%) asmenys.

8 lentelė. Genų promotoriaus DNR hipermetilinimo dažniai galvos-kaklo navikų ir onkologine liga nesergančių asmenų burnos epitelio nuograndose.

Požymiai	Viso, n	p16, %	p14, %	RARB, %	RASSF1, %	MGMT, %	≥1 geno promotoriaus hipermetilinimas, %
Amžius, metai							
<60	22	18	19	25	12	44	59
≥60	20	20	25	11	17	50	70
Lytis							
Moterys	10	0	20	13	14	50	40
Vyrai	32	25	23	20	14	44	72
Galvos-kaklo vėžys							
Nėra	11	9	27	0	0	25	45
Yra	31	23	20	20	19	50	71
Naviko lokalizacija							
Galvos-kaklo srities oda	5	0	0	40	60	33	60
Gerklės, gerklinė ryklės dalis	14	36	39	8	10	56	79
Kita	12	17	8	33	8* ¹	50	67
Rūkymo įpročiai							
Nerūkantys	9	11	11	22	14	50	33
Rūkantys	30	23	21	18	15	47	73*
Stadija							
I-II	12	8	0	27	27	33	50
III-IV	19	32	32	21	13	58	84* ²
ŽPV							
Nėra	29	21	21	20	8	50	62
Yra	13	15	23	15	27	38	69

* - statistiškai patikimi skirtumai ($p \leq 0,05$, Fišerio tikslusis testas), *¹ - patikimas skirtumas palyginus su odos navikais, *² - ribinis patikimumas ($p=0,056$).

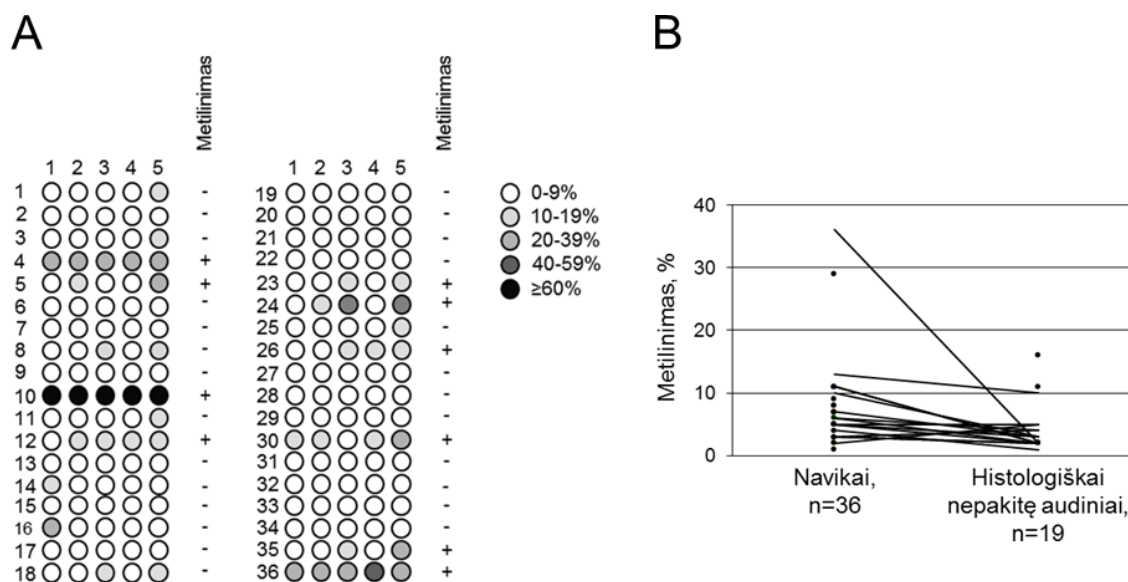
Sąsajos su rūkymo įpročiais. Iš 42 į tyrimą įtrauktų asmenų, 30 buvo aktyviai rūkantys, 9 - nerūkantys asmenys, likę 3 - rūkymo įpročių nedeklaravo. Analizuojant visus tiriamuosius pagal rūkymo įpročius, nustatytas ≥ 1 geno promotoriaus hipermetilinimo dažnis daugiau nei du kartus buvo didesnis rūkančiųjų negu nerūkančiųjų grupėje (galvos-kaklo vėžio atvejai ir nesergantys onkologine liga asmenys) (73% vs 33%; $p=0,047$; 8 paveikslas). Rūkančiųjų mėginiuose genų *p16* ir *p14* promotorių hipermetilinimas buvo dukart dažnesnis palyginus su nerūkančiaisiais. Hipermetilinimo nebuvo nustatyta nerūkančiųjų grupėje, išskyrus leukoplakijos atvejį - hipermetilintas buvo geno *p16* promotorius. ≥ 1 geno promotoriaus hipermetilinimo dažnis rūkančiųjų, nesergančių vėžiu, biomėginiuose buvo didesnis negu nerūkančių, sergančių ar nesergančių onkologine liga, mėginiuose (8 paveikslas). Statistiškai reikšmingus skirtumus ($p<0,05$) nustatėme tarp rūkančių, vėžiu sergančių ir nerūkančių, nesergančių vėžiu grupių.



8 paveikslas. ≥ 1 geno promotoriaus hipermetilinimo dažniai rūkančių ir nerūkančių asmenų mėginiuose (A). ≥ 1 geno promotoriaus hipermetilinimo dažniai rūkančių ir nerūkančių, sergančių ir nesergančių galvos-kaklo vėžiu asmenų grupėse (B). * - statistiškai patikimi skirtumai.

3. *MGMT* geno promotoriaus metilinimas ir *MGMT* baltymo raiškos praradimas seilių liaukų navikuose

Hipermetilinimo dažniai ir sąsajos su klinikiniais bei demografiniais rodikliais. Pirosekvenavimo metodu epigenetines *MGMT* promotoriaus pažaidas tyrėme 36 navikų ir 19 histologiškai nepakitusių seilių liaukų mėginiuose (15 poros). Promotoriaus hipermetilinimas (tirtų 5 CpG metilinimo vidurkis $\geq 10\%$) nustatytas 27,8% (10/36) navikų (9 paveikslas) ir 15,8% (3/19) nepakitusių seilių liaukų audinių mėginiuose. Histologiškai nepakitusiuose seilių liaukų audiniuose pažaidos nustatytos tik tuomet, jei jos aptiktos naviko DNR. Vidutinis metilinimo lygis seilių liaukų navikuose buvo aukštesnis negu histologiškai nepakitusiuose audiniuose (2-35% vs 1-10%; 9 paveikslas).

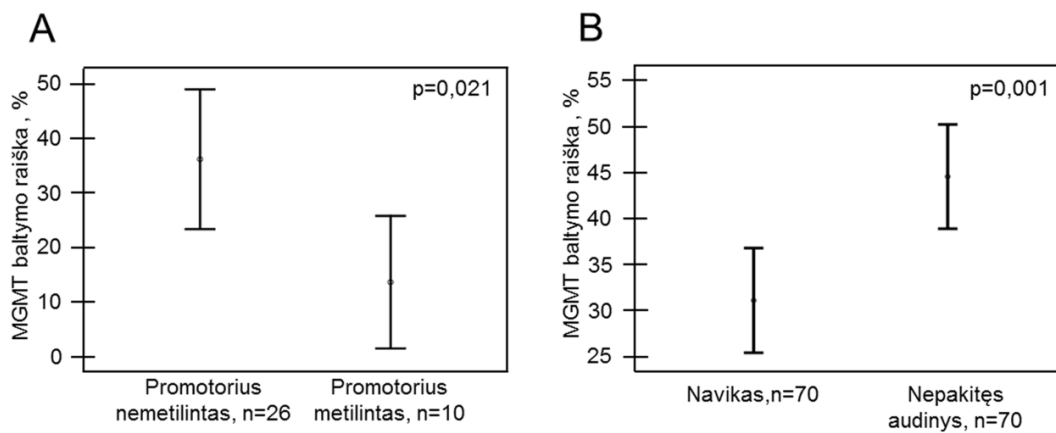


9 paveikslas. *MGMT* geno promotoriaus 5 CpG dinukleotidų hipermetilinimo profilis seilių liaukų navikuose (A). Vienas apskritimas atitinka 1 CpG. Kiekvienos CpG hipermetilinimo būklė mėginyje išreikšta %. Mėginys hipermetilintas (+), jei tirtų CpG metilinimo vidurkis $\geq 10\%$. Vidutinis metilinimo lygis seilių liaukų navikuose ir histologiškai nepakitusiuose audiniuose (B). Audinių poros žymimos tiesėmis, pavieniai mėginiai - taškais.

Metilinimo lygio koreliacijų su demografiniais, klinikiniais ir patologiniais rodikliais nenustatėme, galimai dėl mažo mėginių skaičiaus.

Tačiau *MGMT* promotoriaus hipermetilinimas patikimai koreliavo su *MGMT* baltymo raiškos praradimu ($p=0,021$; 10 paveikslas).

MGMT baltymo raiškos tyrimai. Imunohistochemijos audinių mikrogardelėse metodu ištyrus 287 seilių liaukų navikus, baltymo raiškos praradimas nustatytas 112 (39,0%) atvejų. Analizuodami navikų - nepakitusių audinių mėginių poras ($n=70$), baltymo raiškos praradimą žymiai dažniau nustatėme navikuose ($p=0,001$; 10 paveikslas).



10 paveikslas. *MGMT* geno promotoriaus hipermetilinimo ir *MGMT* baltymo raiškos praradimo ryšys seilių liaukų navikuose (A). *MGMT* baltymo raiškos praradimo ryšys navikuose ir nepakitusių seilių liaukų audiniuose (B).

Nustatytos baltymo raiškos koreliacijos su histologiniu navikų tipu, diferenciacijos laipsniu, išplitimu į sritinius limfmazgius (9 lentelė). Išanalizavę baltymo raiškos pakitimus pagal demografinius rodiklius, nustatėme reikšmingas koreliacijas su pacientų amžiumi ir lytimi (9 lentelė). Nenustatėme statistiškai patikimų baltymo raiškos koreliacijų su naviko lokalizacija, stadija, naviko dydžiu, tolimosiomis metastazėmis.

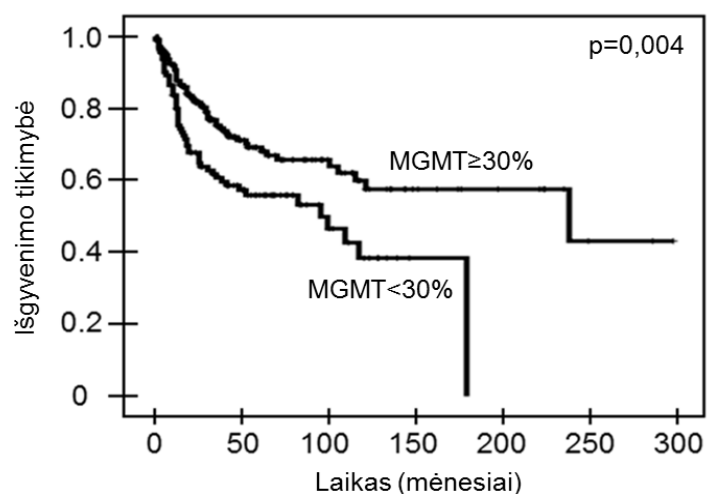
9 lentelė. MGMT baltymo raiška pagal klinikinius ir demografinius rodiklius.

Požymiai	Viso n	MGMT raiškos praradimas, n (%)	p reikšmė
Amžius (metai)	286		
MGMT raiškos praradimas	112	64,5	0,007
MGMT raiška	174	57,6	
Lytis	286		0,046
Moterys		50/150 (33,3)	
Vyrai		61/136 (44,9)	
Lokalizacija	286		SN
Paausinės seilių liaukos		82/200 (41,0)	
Pažandinės seilių liaukos		13/42 (31,0)	
Mažosios seilių liaukos		16/43 (37,2)	
Poliežuvinės seilių liaukos		0/1 (0)	
Histologinis tipas	268		0,002
Acinusų ląstelių karcinoma		8/41 (19,5)	
Adenoidinė cistinė karcinoma		11/46 (23,9)	
Mukoepidermoidinė karcinoma		15/42 (35,7)	
Plokščialąstelinė karcinoma, adenokarcinoma (nepatikslinta), seilių liaukų latakėlių karcinoma		52/101 (51,5)	
Piktybinė mioepitelioma, piktybinis mišrus navikas		10/21 (47,6)	
Bazalinių ląstelių adenokarcinoma, epitelinė-mioepitelinė karcinoma, polimorfinė, geros diferenciacijos adenokarcinoma		6/17 (35,3)	
Stadija	283		SN
I		19/66 (28,8)	
II		22/62 (35,5)	
III		26/62 (41,9)	
IV		44/93 (47,3)	
Naviko diferenciacija	285		<0,001
Gera		21/88 (18,9)	
Vidutinė		25/68 (22,5)	
Bloga		65/129 (58,6)	
pT	238		SN
1		24/76 (31,6)	
2		41/94 (43,6)	
3		27/68 (39,7)	
Tolimosios metastazės	281		SN
Nėra		104/258 (40,3)	

Yra		6/23 (26,1)	
Išplitimas į sritinius limfmazgius	270		<0,001
Nėra		61/190 (32,1)	
Yra		46/80 (57,5)	
Mirtis	286		0,012
Nėra		59/178 (33,1)	
Yra		52/108 (48,1)	

SN - statistiškai nereikšminga.

Pacientams, kurių navikuose nustatėme MGMT baltymo raiškos praradimą, grėsi bloga išgyvenimo prognozė (11 paveikslas). 5 metų išgyvenamumas šioje grupėje buvo 55,9%, o pacientams, kurių navikuose MGMT raiška vyko, išgyvenimo tikimybė buvo 69,9%. Rodikliai ypač skyrėsi prognozuojant 10 metų ligos eigą: išgyvenimo tikimybė minėtose grupėse buvo 38,0% ir 59,9%, atitinkamai. Praėjus 10 metų nuo diagnozės net 52/108 (48,1%) pacientai, kurių navikuose MGMT baltymo raiška nevyko ir 59/178 (33,1%) pacientai, kurių navikuose nustatyta MGMT baltymo raiška, mirė nuo seilių liaukų vėžio ($p=0,004$). Nors net 1,7 karto didesnė mirties rizika buvo pacientams, kurių navikuose MGMT raiška prarasta, daugiaveiksneje analizėje MGMT baltymo raiškos praradimas nebuvo patikimu nepriklausomu prognoziniu žymeniu.



11 paveikslas. Išgyvenimo prognozė seilių liaukų vėžio ligoniams, kurių navikuose nustatytas MGMT baltymo raiškos praradimas ($MGMT < 30\%$) arba MGMT baltymo raiška ($MGMT \geq 30\%$).

IV. REZULTATŲ APITARIMAS

Siekdami giliau išanalizuoti vieno iš svarbiausių kvėpavimo-virškinimo organų vėžio sukėlėjo, tabako rūkymo, reikšmę epigenetinių pakitimų atsiradimui, plaučių ir galvos-kaklo navikuose tyrėme DNR metilinimo pažaidas. Viso ištirta 212 plaučių, 31 galvos-kaklo ir 36 seilių liaukų navikų bei 11 galvos-kaklo ir 19 seilių liaukų nenavikinių audinių. Darbe analizavome DNR hipermetilinimo pakitimus genuose *p16*, *p14*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT* ir *DAPK*, atsakinguose už darnios ląstelės veiklos palaikymo mechanizmus: ląstelės ciklo valdymą, signalų perdavimą, dalijimąsi, reparaciją, apoptozę.

Tirdami DNR metilinimo pažaidas plaučių ir galvos-kaklo karcinomose, nustatėme, kad epigenetiniai pakitimai yra dažni abiejų lokalizacijų navikuose. ≥ 1 geno promotoriaus hipermetilinimas vyko net 70% atvejų. Aukštus hipermetilinimo dažnius plaučių (79-92%) ir galvos-kaklo (42-100%) navikuose nustato ir kiti tyrėjai (Cirrincione et al, 2005, Ulivi et al, 2006, Steinmann et al, 2009, Calmon et al, 2007, Kishi et al, 2005, Paluszczak et al, 2011). Analizuojant epigenetines pažaidas individualių genų promotoriuose plaučių karcinomose, išskirtinai dažnai hipermetilintų promotorių nebuvo. Tačiau galvos-kaklo navikuose nustatėme ypač dažnus *MGMT* geno promotoriaus metilinimo pakitimus. Pažaidos kituose genuose vyko dukart rečiau. Tai taip pat atitinka literatūros duomenis (Steinmann et al, 2009, Paluszczaki et al, 2011). Detalesnio įvairių genų DNR metilinimo dažnių palyginimo mūsų tirtuose plaučių ir galvos-kaklo navikuose vengėme, nes tirtos nevienodos imties grupės, skyrėsi mėginio paėmimo metodai (operacinė medžiaga, navikų nuograndos), tiriamoji medžiaga (šviežiai šaldyti, parafine impregnuoti audinių mėginiai) bei tyrimo metodų jautrumas ir vertinimas (kokybinis, kiekybinis).

Darbe aiškinomės rūkymo sukeltų molekulinį pakitimų įtaką vėžio vystymuisi. Tabako dūmai - tai cheminis rizikos faktorius, kuriame esti daug kancerogenų ir prokancerogenų, pvz., benzo(a)pirenas, policikliniai

aromatiniai angliavandeniliai, arilaminai, tabakui specifiniai nitrozoamino ketonai ir kiti. Nuolatinis poveikis šiomis medžiagomis sukelia (epi)genetines DNR pažeidas.

Tyrėme DNR hipermetilinimo pakitimus rūkančiųjų ir nerūkančiųjų pirminių plaučių karcinomų ir galvos-kaklo mėginių DNR. Rūkančiųjų plaučių karcinomose hipermetilinimą geno *p16* promotoriuje nustatėme dažniau negu nerūkančiųjų. Rūkančiųjų tarpe *p16* pažeidos dominavo buvusių rūkalių mėginiuose. Šie rezultatai sutampa su literatūros duomenimis (Belinsky et al, 1998, Kim et al, 2001, Toyooka et al, 2004), taip pat atitinka anksčiau publikuotus mūsų mokslinės grupės rezultatus, kur skelbėme aukštą *p16* geno pažeidų dažnį buvusių rūkalių plaučių karcinomose (Jarmalaite et al, 2003).

Plaučių navikų tyrime, aktyviai rūkančiųjų ligonių grupėje nenustatėme patikimų koreliacijų tarp hipermetilinimo ir rūkymo rodiklių, pvz., trukmės, intensyvumo, pakmečių ar amžiaus, nuo kada pradėta ir mesta rūkyti. Tokios sąsajos ne kartą buvo parodytos plaučių (Kim et al, 2001, Jin et al, 2010, Vineis et al, 2005) ir galvos-kaklo vėžio atvejais (Hasegawa et al, 2002).

Galvos-kaklo navikų tyrime taip pat nustatėme ryšį tarp tabako rūkymo ir *p16* hipermetilinimo. Nerūkančių, sergančių vėžiu naviko nuograndose nenustatėme šio geno pažeidų, o rūkančiųjų mėginiuose hipermetilinimo dažnis siekė 26%. Bendri hipermetilinimo dažniai rūkančių (sergančių ar nesergančių onkologine liga) asmenų mėginiuose taip pat buvo didesni negu nerūkančių. Rūkančių, nesergančių vėžiu mėginiuose aptikti hipermetilinti genų *p14* ir *MGMT* promotoriai. Panašūs rezultatai jau publikuoti (Rosas et al, 2001): nustatytas *CDKN2* lokuso (*p16*) ir *MGMT* hipermetilinimas sveikų rūkančių asmenų seilių DNR. Skirtingai nuo mūsų rezultatų, pažeidų nerūkančiųjų medžiagoje tyrėjai nerado. Taip pat viename tyrime *MGMT* raiška įvertinta nepapakitusiose burnos gleivinės ląstelėse, displazijose ir anksybose plokščialąstelinėse burnos ertmės karcinomose (Rodriguez et al, 2007). Šiame tyrime *MGMT* raiškos praradimas dominavo karcinomose, ypač rūkančiųjų. Aukšti hipermetilinimo dažniai nustatyti kitame galvos-kaklo vėžio

ligonių ir histologiškai nepakitusių audinių tyrime (Paluszczak et al, 2011). Čia visi tiriamieji buvo alkoholio vartotojai ir/arba rūkantys asmenys.

Vieningos nuomonės apie epigenetinių pažaidų svarbą su tabako vartojimu susijusių navikų vystymuisi nėra. Vienose studijose rūkančių plaučių karcinomose nustatomi aukštesni NSG hipermetilinimo dažniai ir metilinimo indeksas palyginus su nerūkančiasiais (Toyooka et al, 2003, Toyooka et al, 2006, Liu et al, 2007). Kitose publikacijose skebiami priešingi rezultatai minėtiems (Pulling et al, 2003, Divine et al, 2005) arba nurodoma, jog hipermetilinimo dažnių skirtumų nėra. Nevienareikšmių nuomonių galima tikėtis dėl nevienodo tiriamųjų rūkymo intensyvumo ar tikslios, sistemos informacijos apie aplinkos tabako dūmų (ATD) poveikį nerūkantiems trūkumo.

Mūsų tyrime nerūkančiųjų, plaučių vėžiu sergančiųjų grupė turėjo išsamius duomenis apie ATD poveikį namuose ar darbe (Boffetta et al, 1998, Husgafvel-Pursiainen et al, 2000). Išanalizavę ATD įtaką epigenetinių pažaidų plaučių karcinomose formavimuisi, stebėjome aiškius skirtumus. Nerūkančių ligonių be ATD poveikio navikams buvo būdingas *p16* metilinimo pažaidų nebuvimas ir žemas metilinimo indeksas. Priešingai, turėjusių ATD poveikį ligonių navikuose nustatėme panašią metilinimo indekso vertę kaip rūkančiųjų navikuose. *p16* hipermetilinimą aptikome išskirtinai tik veiktų tabako kancerogenais (rūkančiųjų ir nerūkančiųjų) ligonių navikuose ir parodėme, kad rūkančiųjų (aktyviai ar pasyviai) ir nerūkančiųjų molekuliniai plaučių navikų patogenezės mechanizmai *p16* geno atžvilgiu skiriasi. Analogiškai, *RARB* geno pažaidos vyko dukart dažniau turėjusių ATD poveikį negu neturėjusių poveikio plaučių karcinomose. Manome, kad šie epigenetiniai pakitimai galėtų atspindėti kancerogeninį ATD poveikį.

Metilinimo pažaidos yra informatyvūs su tabako vartojimu susijusių navikų žymenys. Tabako dūmuose esantys kancerogenai pažeidžia svarbų p16-ciklinasD1-CDK4-RB kontrolės taško mechanizmą. Metilinimo pakitimai gene *p16* nustatomi iš skreplių, plazmos, plaučių nuobrūžų išskirtoje DNR rūkančių, bet nesergančių vėžiu, mėginiuose (Belinsky et al, 2006, Baryshnikova et al,

2008, Cirincione et al, 2006, Destro et al, 2004, Kersting et al, 2000). Daugelio autorių nuomone (Belinsky et al, 2006, Baryshnikova et al, 2008, Kersting et al, 2000), *p16* promotoriaus hipermetilinimo tyrimas galėtų būti tinkamas ankstyvam plaučių vėžio rizikos įvertinimui, nes pažaidos nustatomos kelis metus iki klinikinio onkologinės ligos pasireiškimo. Mūsų tyrime *p16* metilinimo pažaidas aptikome tik rūkančiųjų ar ATD veiktų ligonių plaučių navikuose ir rūkančiųjų galvos-kaklo navikuose. Nerūkančiųjų (aktyviai ar pasyviai) plaučių ir galvos-kaklo navikuose pažaidų nenustatėme. Taigi, parodėme, kad hipermetilinimas naviką slopinančių genų promotoriuose atspindi ir rūkymo, ir ATD poveikio žalą.

Plaučių karcinomose atlikta *TP53* analizė (Husgafvel-Pursiainen et al, 1999, Husgafvel-Pursiainen et al, 2000) rodo, kad *TP53* mutacijos vyksta žymiai dažniau rūkančiųjų navikuose negu nerūkančiųjų. Pastarojoje grupėje ATD poveikis net du kartus padidino *TP53* mutacijų riziką veiktiems asmenims palyginus su neveiktais. Stebėjome *TP53* mutacijų ir metilinimo pažaidų genuose *p16* ir *MGMT* koreliacijas. DNR reparacijos baltymo, atsakingo už alkilo grupių pašalinimą nuo O-6-guanino, nutildymas padidina genetinį ląstelių nestabilumą. Tai plaučių navikuose skatina *TP53* mutacijų, ypač G:C → A:T pakaitų atsiradimą (Wu et al, 2008). Šio tipo mutacijos dominuoja nerūkančiųjų karcinomose (Husgafvel-Pursiainen et al, 2000) ir galimai parodo ATD poveikį genetinio ląstelės stabilumo praradimui.

Epigenetines pažaidas tyrėme galvos-kaklo navikuose, kurių patogenetiniams procesams svarbus yra ne tik rūkymas, bet ir žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcija. Nenustatėme ryšio tarp promotoriaus hipermetilinimo ir ŽPV infekcijos. Galbūt ŽPV infekcija inicijuoja genetinius, o ne epigenetinius pokyčius, šia hipotezę vertėtų išsiaiškinti. Literatūroje duomenų apie šią sąsają mažai, pateiktos koreliacijos su mažiau žinomais, naujais genais (*IRX1*, *EBF3*, *SLC5A8*, *SEPT9*, Bennet et al, 2010) arba parodytos net neigiamos sąsajos (Dong et al, 2003).

Įvertinome epigenetinių pažeidimų sąsajas su klinikiniais ir demografiniais rodikliais. Kai kurių genų promotorių hipermetilinimas plaučių karcinomose koreliavo su pacientų lytimi ir naviko histologiniu tipu. Geno *p16* hipermetilinimas vyravo plokščialąstelinėse karcinomose ir vyrų navikuose, o pažeidimas *RARB* promotoriuje buvo dažnesnis adenokarcinomose ir moterų navikuose. Paminėtina tai, jog karcinoiduose ir mišriuose navikuose metilinimo pažeidimų *p16* ir *RARB* genuose, atitinkamai, neaptikome. Duomenys sutampa su kitų autorių rezultatais: *p16* hipermetilinimas vyksta 24-56% plokščialąstelių karcinomų ir žymiai rečiau kitų histologinių tipų navikuose (Grote et al, 2005, Kim et al, 2001). Epigenetiniai pakitimai *RARB* promotoriuje dažnesni moterų, dažniausiai nerūkančiųjų, plaučių adenokarcinomose (Toyooka et al, 2003, Grote et al, 2005).

Epigenetinių pakitimų profilis skyrėsi įvairių lokalizacijų galvos-kaklo navikuose. *RASSF1* metilinimas dažniau vyko odos navikuose palyginus su gerklų ir gerklinės ryklės dalies ar kitais galvos-kaklo srities navikais. Genų *p16* ir *p14* hipermetilinimo nenustatėme odos karcinomose, tačiau jos buvo dažnos gerklų ir gerklinės ryklės dalies karcinomose. Galvos-kaklo vėžio ligoniams parodytos genų *p16* ir *p14* promotorių hipermetilinimo sąsajos su navikų dydžiu, išplitimu į limfmagius, aukštesne klinikine stadija, bloga diferenciacija (Ishida et al, 2005, Weber et al, 2003, Steinmann et al, 2009). Taip pat bendras hipermetilinimo dažnis dažnai nustatomas didesnis pažengusios klinikinės stadijos ir blogos diferenciacijos navikuose (Steinmann et al, 2009). Mūsų tyrime *CDKN2* lokuso (kartu genų *p16* ir *p14*) hipermetilinimas nustatytas trijuose vėlyvos stadijos navikuose. Taip pat ≥ 1 geno promotoriaus hipermetilinimas kur kas dažniau vyko vėlyvų stadijų karcinomose.

Seilių liaukų vėžys nesiejamas su tabako rūkymu, tačiau priklauso galvos-kaklo navikams. Dėl šios priežasties seilių liaukų karcinomose tikėtinos panašios epigenetinės pažeidimos, kurios nustatomos kituose galvos-kaklo srities navikuose. Viena jų, – tai *MGMT* geno promotoriaus DNR hipermetilinimas.

MGMT geno raiškos praradimas metilinant promotoriaus sekas laikomas dominuojančiu raiškos slopinimo mechanizmu įvairiuose navikuose (Esteller et al, 2004). Hipermetilinimo lygis promotoriuje ar gretimose sekose papildomai reguliuoja raiškai, o skirtingų CpG sekų hipermetilinimas turi nevienodą poveikį (Illingworth et al, 2009). Jautriu pirosekvenavimo metodu seilių liaukų mėginiuose nustatėme net nedidelius hipermetilinimo lygio skirtumus. Navikuose geno promotoriaus metilinimo lygis siekė 27,8% ir buvo didesnis už histologiškai nepakitusiuose audiniuose nustatytąjį. Parodėme, jog *MGMT* geno promotoriaus hipermetilinimas yra svarbus baltymo raiškos slopinimui. Literatūroje ši koreliacija paskelbta skrandžio, krūties, prostatos, storžarnės, smegenų, galvos-kaklo karcinomose (Bae et al, 2002, Esteller et al, 1999, Sharma et al, 2010, Zuo et al, 2004). Seilių liaukų karcinomų tyrime šio ryšio nenustatyta (Williams et al, 2006). Taip pat kiekybiniu MSP metodu ištyrus 78 seilių liaukų karcinomas, *MGMT* metilinimo pažaidų nebuvo aptikta (Durr et al, 2010). Nesutapimą su mūsų rezultatais galėtume paaiškinti tuo, kad Durr grupės darbe metilinimo pakitimai tirti gretimoje mūsų tiriamai sekai (+17-39 promotoriaus pozicija) promotoriaus sekoje.

Literatūroje daugėja informacijos apie hipermetilinimo *MGMT* geno promotoriuje ir *MGMT* baltymo raiškos praradimo svarbą prognozuojant gliomomis, limfomomis sergančių ir gydomų alkilinančiais chemoterapiniais vaistais ligonių išgyvenimo galimybes. Ligoniams, kurių navikuose *MGMT* geno promotorius yra hipermetilintas, o *MGMT* baltymo raiška nevyksta, yra būdinga geresnė išgyvenimo prognozė. Dėl alkilinimo pažaidų reparacijos, kurią atlieka *MGMT*, nesant *MGMT* geno promotoriaus hipermetilinimo ir esant *MGMT* baltymo raiškai, išgyvenimo prognozės ligoniams yra blogesnės. Kadangi seilių liaukų vėžio ligoniai negydomi alkilinančiais chemoterapiniais vaistais, atsako į gydymą priklausomybės nuo *MGMT* geno promotoriaus hipermetilinimo ir *MGMT* baltymo raiškos būklės, stebėti negalėjome. Tačiau mūsų nustatytos sąsajos su klinikiniais blogos prognozės rodikliais rodo, kad *MGMT* baltymo raiškos praradimas dėl promotoriaus hipermetilinimo yra informatyvus prognozinis seilių liaukų navikų žymuo.

IŠVADOS

1. Plaučių navikuose (n=212) genų *p16*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT*, *DAPK1* promotoriaus DNR hipermetilinimo dažniai yra nuo 15 iki 31%; informatyviausi epigenetiniai žymenys yra genų *p16*, *RARB* ir *RASSF1* hipermetilinimas. Geno *p16* promotoriaus hipermetilinimo tikimybė yra didesnė vyrų nei moterų plaučių karcinomose (p=0,018); plokščialąstelinėse plaučių karcinomose nei adenokarcinomose (p=0,025); DNR metilinimo pažaidos siejasi su mutacijomis *TP53* gene (p=0,027). Geno *p16* hipermetilinimas atspindi tabako dūmų poveikį ir aptinkamas tik rūkančiųjų ar sistemingai aplinkos tabako dūmais veiktų asmenų plaučių navikuose.

2. Galvos-kaklo navikų (n=31) nuograndose genų *p16*, *p14*, *RARB*, *RASSF1*, *MGMT* promotoriaus DNR hipermetilinimo dažniai yra nuo 19 iki 50%; informatyviausias epigenetinis žymuo - geno *MGMT* hipermetilinimas. Geno *p16* hipermetilinimas aptinkamas tik rūkančiųjų burnos epitelio nuograndose, o ≥ 1 geno hipermetilinimo tikimybė yra didesnė rūkančiųjų negu nerūkančių asmenų mėginiuose (p=0,047).

3. Seilių liaukų navikuose (n=36) geno *MGMT* promotoriaus hipermetilinimo dažnis yra didesnis negu histologiškai nepakitusiuose seilių liaukų audiniuose (n=19) ir atitinkamai yra 28% ir 16%. Navikuose epigenetinės pažaidos geno *MGMT* promotoriuje koreliuoja su *MGMT* baltymo raiškos praradimu (p=0,021); šis pokytis yra būdingas blogos prognozės (blogos diferenciacijos, išplitusiems į sritinius limfmazgius, tam tikrų histologinių tipų) seilių liaukų navikams.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Amos ChI, Wu X, Broderick P, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet.* 2008;40(5):616–22.

Andrew P. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(2):143-53.

Andujar P, Wang J, Descatha A, et al. p16INK4A inactivation mechanisms in non-small-cell lung cancer patients occupationally exposed to asbestos. *Lung Cancer.* 2010;67(1):23-30.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, et al. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008;371(9625):1695-709.

Bae SI, Lee HS, Kim SH, et al. Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. *Br J Cancer.* 2002;86(12):1888-92.

Baryshnikova E, Destro A, Infante MV, et al. Molecular alterations in spontaneous sputum of cancer-free heavy smokers: results from a large screening program. *Clin Cancer Res.* 2008;14(6):1913-9.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, et al. World health organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005.

Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res.* 2006;66(6):3338-44.

Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11891-6.

Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(9):707-17.

Bennett KL, Lee W, Lamarre E, et al. HPV status-independent association of alcohol and tobacco exposure or prior radiation therapy with promoter

methylation of FUSSEL18, EBF3, IRX1, and SEPT9, but not SLC5A8, in head and neck squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(4):319-26.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16(1):6-21.

Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986;321(6067):209-13.

Boffetta P, Agudo A, Ahrens W, et al. Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(19):1440-50.

Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J*. 2009;33(6):1485-97.

Brock MV, Gou MG, Akiyama Y, et al. Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003;9(8):2912-9.

Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1118-28.

Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(9):691-9.

Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;173(1):31-7.

Chedin F, Lieber MR, Hsieh CL. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16916-21.

Chen MK, Yeh KT, Chiou HL, et al. CCR2-64I gene polymorphism increase susceptibility to oral cancer. *Oral Oncol*. 2011;47(7):577-82.

Chien MH, Chou LS, Chung TT, et al. Effects of E-cadherin (CDH1) gene promoter polymorphisms on the risk and clinicopathologic development of oral cancer. *Head Neck*. 2012;34(3):405-11.

Choi N, Son DS, Song I, et al. RASSF1A is not appropriate as an early detection marker or a prognostic marker for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2005;115(4):575-81.

Cirincione R, Lintas C, Conte D, et al. Methylation profile in tumor and sputum samples of lung cancer patients detected by spiral computed tomography: a nested case-control study. *Int J Cancer*. 2006;118(5):1248-53.

Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet*. 2001;38(5):285-303.

Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, et al. Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol Histopathol*. 2003;18(2):665-77.

Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011;25(10):1010-22.

Destro A, Bianchi P, Alloisio M, et al. K-ras and p16(INK4A)alterations in sputum of NSCLC patients and in heavy asymptomatic chronic smokers. *Lung Cancer*. 2004;44(1):23-32.

Divine KK, Pulling LC, Marron-Terada PG, et al. Multiplicity of abnormal promoter methylation in lung adenocarcinomas from smokers and never smokers. *Int J Cancer*. 2005;114(3):400-5.

Dobrovolskienė N, Characiejus D. Plaučių vėžio imunoterapija. *Medicinos teorija ir praktika*. 2010;16(1):91–6.

Dong SM, Sun DI, Benoit NE, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(10 Pt 1):3635-40.

Duarte RL, Paschoal ME. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. *J Bras Pneumol*. 2006;32(1):56-65.

Durr ML, Mydlarz WK, Shao C, et al. Quantitative methylation profiles for multiple tumor suppressor gene promoters in salivary gland tumors. *PLoS One*. 2010;5(5):e10828.

Endoh H, Yatabe Y, Shimizu S, et al. RASSF1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Int J Cancer*. 2003;106(1):45-51.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001;61(8):3225-9.

Esteller M, Gaidano G, Goodman SN, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(1):26-32.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000;343(19):1350-4.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999;59(4):793-7.

Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene.* 2004;23(1):1-8.

Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2000;60(9):2368-71.

Esteller M, Tortola S, Toyota M, et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* 2000;60(1):129-33.

Esteller M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J Pathol.* 2005;205(2):172-80.

Ettl T, Schwarz S, Kleinsasser N, et al. Overexpression of EGFR and absence of C-KIT expression correlate with poor prognosis in salivary gland carcinomas. *Histopathology.* 2008;53(5):567-77.

Feinberg AP. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA.* 2008;299(11):1345-50.

Field K. The role of oncogenes and tumour-suppressor genes in the aetiology of oral, head and neck squamous cell carcinoma. *J R Soc Med.* 1995;88(1):35P-39P.

Fischer JR, Lahm H. Validation of molecular and immunological factors with predictive importance in lung cancer. *Lung Cancer.* 2004;45 Suppl 2:S151-61.

Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Olah E, et al. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathol Oncol Res.* 2001;7(1):6-13.

Fukuse T, Hirata T, Naiki H, et al. Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2000;60(2):242-4.

Gaudet F, Hodgson JG, Eden A et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science.* 2003;300(5618):489-92.

Glazer CA, Chang SS, Ha PK, et al. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):440-6.

Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, et al. Aberrant promoter methylation of p16(INK4a), RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int J Cancer.* 2005;116(5):720-5.

Guo XL, Sun SZ, Wang WX, et al. Alterations of p16INK4a tumour suppressor gene in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(4):350-3.

Hanabata T, Tsukuda K, Toyooka S, et al. DNA methylation of multiple genes and clinicopathological relationship of non-small cell lung cancers. *Oncol Rep.* 2004;12(1):177-80.

Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, et al. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene.* 2002;21(27):4231-6.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(10):777-89.

Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):733-44.

Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1367-80.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9821-6.

Honorio S, Agathangelou A, Schuermann M, et al. Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast cancer patients. *Oncogene*. 2003;22(1):147-50.

Hopkins J, Cescon DW, Tse D, et al. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(3):490-9.

Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*. 2008;452(7187):633-7.

Husgafvel-Pursiainen K, Boffetta P, Kannio A, et al. p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res*. 2000;60(11):2906-11.

Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Kannio A, et al. Lung cancer and past occupational exposure to asbestos. Role of p53 and K-ras mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20(4):667-74.

Illingworth RS, Bird AP. CpG islands-'a rough guide'. *FEBS Lett*. 2009;583:1713-20.

International Agency for Research on Cancer. (2004) Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Lyon, 83.

Ishida E, Nakamura M, Ikuta M, et al. Promotor hypermethylation of p14ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2005;41(6):614-22.

Yamazaki M, Fujii S, Murata Y, et al. High expression level of geminin predicts a poor clinical outcome in salivary gland carcinomas. *Histopathology*. 2010;56(7):883-92.

Yoshizaki T, Ito M, Murono S, et al. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2012;39(2):137-44.

Youssef EM, Lotan D, Issa JP, et al. Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2004;10(5):1733-42.

Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(8):1155-60.

Jaehne M, Roeser K, Jaekel T, et al. Clinical and immunohistologic typing of salivary duct carcinoma: a report of 50 cases. *Cancer*. 2005;103(12):2526-33.

Jarmalaite S, Kannio A, Anttila S, et al. Aberrant p16 promoter methylation in smokers and former smokers with nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2003;106(6):913-8.

Jin Y, Xu H, Zhang C, et al. Combined effects of cigarette smoking, gene polymorphisms and methylations of tumor suppressor genes on non small cell lung cancer: a hospital-based case-control study in China. *BMC Cancer*. 2010;10:422.

John T.M, Robinett F.D. Lung cancer: building hope through comprehensive prevention. *Cancer*. 2000;89(11 Suppl):2377-86.

Kato K, Hara A, Kuno T, et al. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006;132(11):735-43.

Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood*. 1999;93(12):4347-53.

Kersting M, Friedl C, Kraus A, et al. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol*. 2000;18(18):3221-9.

Kim DH, Kim JS, Ji YI, et al. Hypermethylation of RASSF1A promoter is associated with the age at starting smoking and a poor prognosis in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2003;63(13):3743-6.

Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, et al. p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2001;61(8):3419-24.

Kishi M, Nakamura M, Nishimine M, et al. Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol.* 2005;41(2):161-9.

Kohno T, Yokota J. How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis? *Carcinogenesis.* 1999;20(8):1403-10.

Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science.* 2009;324:929-30.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(4):253-66.

Lamy A, Sesboue R, Bourguignon J, et al. Aberrant methylation of the CDKN2a/p16INK4a gene promoter region in preinvasive bronchial lesions: a prospective study in high-risk patients without invasive cancer. *Int J Cancer.* 2002;100(2):189-93.

Lan J, Hua S, He X, et al. DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2010;42(4):243-52.

Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* 2010;11(3):204-20.

Lee ES, Issa JP, Roberts DB, et al. Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. *Clin Cancer Res.* 2008;14(9):2664-72.

Li J, El-Naggar A, Mao L. Promoter methylation of p16INK4a, RASSF1A, and DAPK is frequent in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cancer.* 2005;104(4):771-6.

Li J, Zhang Z, Dai Z, et al. RASSF1A promoter methylation and Kras2 mutations in non small cell lung cancer. *Neoplasia*. 2003;5(4):362-6.

Lietuvos Vėžio registras. http://www.is.lt/cancer_reg/

Lind GE. DNA methylation in cancer development. Lessons learned from tumors of the testis and the large bowel. Doctor philosophiae thesis. 2005; University of Oslo.

Liu Y, Gao W, Siegfried JM, et al. Promoter methylation of RASSF1A and DAPK and mutations of K-ras, p53, and EGFR in lung tumors from smokers and never-smokers. *BMC Cancer*. 2007;7:74.

Lo EJ, Bell D, Woo JS, et al. Human papillomavirus and WHO type I nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 2010;120(10):1990-7.

Marsit CJ, Kim DH, Liu M, et al. Hypermethylation of RASSF1A and BLU tumor suppressor genes in non-small cell lung cancer: implications for tobacco smoking during adolescence. *Int J Cancer*. 2005;114(2):219-23.

Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res*. 2001;61(24):8659-63.

Mitsuuchi Y, Testa JR. Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet*. 2002;115(3):183-8.

Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;68(1):1-11.

Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, et al. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*. 2001;22(10):1715-9.

Niklinska W, Naumnik W, Sulewska A, et al. Prognostic significance of DAPK and RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47(2):275-80.

Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002;8(10):3164-71.

Okabe M, Inagaki H, Murase T, et al. Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. *Mod Pathol.* 2001;14(10):1008-14.

Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* 1998;19(3):219-20.

Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* 2000;60(21):5954-8.

Paluszczak J, Misiak P, Wierzbicka M, et al. Frequent hypermethylation of DAPK, RARbeta, MGMT, RASSF1A and FHIT in laryngeal squamous cell carcinomas and adjacent normal mucosa. *Oral Oncol.* 2011;47(2):104-7.

Panani AD, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett.* 2006;239(1):1-9.

Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res.* 2004;10(15):4933-8.

Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol.* 2006;59(5):445-53.

Prokhortchouk E, Hendrich B. Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs? *Oncogene.* 2002;21(35):5394-9.

Pulling LC, Divine KK, Klinge DM, et al. Promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: more common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression. *Cancer Res.* 2003;63(16):4842-8.

Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001;293(5532):1089-93.

Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF, et al. Tumor-Specific Methylation in Saliva: A Promising Biomarker for Early Detection of Head and Neck Cancer Recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007;13(4):1179-85.

Rodriguez MJ, Acha A, Ruesga MT, et al. Loss of expression of DNA repair enzyme MGMT in oral leukoplakia and early oral squamous cell carcinoma. A prognostic tool? *Cancer Lett.* 2007;245(1-2):263-8.

Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 2001;61(3):939-42.

Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(10):958-67.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, et al. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene.* 2001;20(24):3156-65.

Salaspuro V, Salaspuro M. Synergistic effect of alcohol drinking and smoking on in vivo acetaldehyde concentration in saliva. *Int J Cancer.* 2004;111(4):480-3.

Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(10):1531-41.

Sato M, Shames DS, Gazdar AF, et al. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;2(4):327-43.

Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, et al. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol.* 2005;204(1):21-35.

Schwarz S, Ettl T, Kleinsasser N, et al. Loss of Masp1 expression is a negative prognostic factor in common salivary gland tumors. *Oral Oncol.* 2008;44(6):563-70.

Seike M, Gemma A, Hosoya Y, et al. Increase in the frequency of p16INK4 gene inactivation by hypermethylation in lung cancer during the process of metastasis and its relation to the status of p53. *Clin Cancer Res.* 2000;6(11):4307-13.

Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med.* 2003;54:73-87.

Sharma G, Mirza S, Parshad R, et al. Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci.* 2010;87(3-4):83-91.

Siegfried Z, Simon I. DNA methylation and gene expression. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2(3):362-71.

Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S59-66.

Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, et al. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2009;22(6):1519-26.

Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med.* 2002;4(4):1-17.

Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(10):778-90.

Szaumkessel M, Gawecki W, Szyfter K. Head and Neck Cancer. DNA Repair Capacity and the Risk of Head and Neck Cancer. InTech, 2012. <http://www.intechopen.com/books/head-and-neck-cancer>. Žiūrēta 20120516, 18:45 val.

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009;324:930-5.

Taioli E, Ragin C, Wang XH, et al. Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. *BMC Cancer.* 2009;9:354.

Tang X, Khuri FR, Lee JJ, et al. Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(18):1511-6.

Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO, et al. Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2003;103(2):153-60.

Toyooka S, Suzuki M, Maruyama R, et al. The relationship between aberrant methylation and survival in non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer*. 2004;91(4):771-4.

Tolosa EM. Gene therapy for lung cancer. *Thorac Surg Clin*. 2006;16(4):397-419, vii.

Tomizawa Y, Iijima H, Nomoto T, et al. Clinicopathological significance of aberrant methylation of RARbeta2 at 3p24, RASSF1A at 3p21.3, and FHIT at 3p14.2 in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004;46(3):305-12.

Ulivi P, Zoli W, Calistri D, et al. p16INK4A and CDH13 hypermethylation in tumor and serum of non-small cell lung cancer patients. *J Cell Physiol*. 2006;206(3):611-5.

Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis*. 2005;26(11):1846-55.

Virmani AK, Rathi A, Zöchbauer-Müller S, et al. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(16):1303-7.

Wang YC, Lin RK, Tan YH, et al. Wild-type p53 overexpression and its correlation with MDM2 and p14ARF alterations: an alternative pathway to non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(1):154-64.

Weber A, Wittekind C, Tannapfel A. Genetic and epigenetic alterations of 9p21 gene products in benign and malignant tumors of the head and neck. *Pathol Res Pract*. 2003;199(6):391-7.

Wei SH, Chen CM, Strathdee G, et al. Methylation microarray analysis of late-stage ovarian carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers. *Clin Cancer Res*. 2002;8(7):2246-52.

Wikman H, Kettunen E. Regulation of the G1/S phase of the cell cycle and alterations in the RB pathway in human lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6(4):515-30.

Wikman H, Nymark P, Vayrynen A, et al. CDK4 is a probable target gene in a novel amplicon at 12q13.3-q14.1 in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;42(2):193-9.

Williams MD, Chakravarti N, Kies MS, et al. Implications of methylation patterns of cancer genes in salivary gland tumors. *Clin Cancer Res*. 2006;12(24):7353-8.

Wu JY, Wang J, Lai JC, et al. Association of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation with p53 mutation occurrence in non-small cell lung cancer with different histology, gender, and smoking status. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(11):3272-7.

Xu XC, Sozzi G, Lee JS, et al. Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(9):624-9.

Zheng Y, Xia P, Zheng HC, et al. The screening of viral risk factors in tongue and pharyngolaryngeal squamous carcinoma. *Anticancer Res*. 2010;30(4):1233-8.

Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*. 2001;61(1):249-55.

Zochbauer-Muller S, Gazdar AF, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:681-708.

Zuo C, Ai L, Ratliff P, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(6):967-75.

Žemaitis M, Rieger N, Fischer JR, et al. Naviką slopinančių metilintų genų dažnis plaučių vėžiu sergančiųjų kraujo serume bei jų ryšys su klinikinėmis plaučių vėžio charakteristikomis. *Medicina*. 2005;T.41,Nr.2.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

DISERTACIJOS TEMA

ISI sąrašo žurnalai

1. **Scesnaite A**, Jarmalaite S, Mutanen P, Anttila S, Nyberg F, Benhamou S, Boffetta P, Husgafvel-Pursiainen K. Similar DNA methylation pattern in lung tumours from smokers and never-smokers with second-hand tobacco smoke exposure. *Mutagenesis*. 2012 Jan 4.

Kiti referuojami leidiniai

2. **Ščėsnaitė A**, Gudlevičienė Ž, Jarmalaitė S. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes in tumour cells from patients with head and neck cancer. *Biologija*. 2008;54:161-166.

3. **Ščėsnaitė A**, Jarmalaitė S. Molekuliniai plaučių vėžio žymenys. *Medicinos teorija ir praktika*. 2011;17:98–104.

KITOS PUBLIKACIJOS

ISI sąrašo žurnalai

1. Jarmalaite S, Andrekute R, **Scesnaite A**, Suziedelis K, Husgafvel-Pursiainen K, Jankevicius F. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes and response to interleukin-2 treatment in bladder cancer: a pilot study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136:847-854.

Kiti referuojami leidiniai

2. Laurinavičienė A, Petroška D, Tverkuvienė J, Daniūnaitė K, **Ščėsnaitė A**, Jarmalaitė S. Frequent aberrant expression of p53 protein in gliomas but not in capillary hemangioblastomas and pheochromocytomas. *Acta Medica Lituanica*. 2009;16:130–138.

3. Tverkuvienė J, Laurinavičienė A, Daniūnaitė K, **Ščėsnaitė A**, Jarmalaitė S. Frequent aberrant DNA methylation of CDKN2A locus in capillary hemangioblastomas, pheochromocytomas and gliomas. *Acta Medica Lituanica*. 2011;18:4–11.

SKAITYTI PRANEŠIMAI

1. „Naviką slopinančių genų promotoriaus hipermetilinimas galvos ir kaklo navikų ląstelėse“, Lietuvos biochemikų draugijos konferencija, Lietuva, 2008.
2. „Significance of tumor suppressor gene hypermethylation in head-neck tumours“, 2-oji kasmetinė COST BM0703 „Vėžys ir genomio integralumo valdymas“ konferencija, Švedija, 2009.
3. „Significance of tumor suppressor gene hypermethylation in head-neck tumours“, konferencija „Molekulinė patologija diagnozei ir gydymui“, Lietuva, 2010.

KONFERENCIJŲ TEZĖS

1. Jarmalaite S, Scesnaite A, Nyberg F, Benhamou S, Boffetta P, Husgafvel-Pursiainen K. “Aberrant promoter methylation in lung cancer from never-smokers with and without tobacco smoke exposure”, 5-oji kasmetinė AARC tarptautinė konferencija, JAV, 2006.
2. Scesnaite A, Jarmalaite S, Holmila R, Suitiala T, Husgafvel-Pursiainen K. “Smoking induced gene hypermethylation in non-small cell lung cancer”, 38-oji kasmetinė Europos aplinkos mutagenų draugijos konferencija, Kroatija, 2008.
3. Scesnaite A, Jarmalaite S, Schwarz S, Schneider-Stock R. “Prognostic value of tumor suppressor gene inactivation in salivary gland carcinomas”. Tarptautinė COST projekto mokykla, Jungtinė karalystė, 2010.
4. Scesnaite A, Jarmalaite S, Nyberg F, Benhamou S, Boffetta P, and Husgafvel-Pursiainen K. “Smoking induced gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer”. COST BM0703 „Vėžys ir genomio integralumo valdymas“ konferencija, Italija, 2010.

PRIEDAS

1 lentelė. MSP pradmenų porų sekos, pradmenų prijungimo temperatūra ir pagausinto produkto dydis.

Genas	Pradmens pav.	Pradmenų sekos (5'→3')	Pradmenų prijungimo temperatūra	MSP programos ciklų skaičius	MSP produkto dydis (bp)
<i>p16</i>	1Mp	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	64	36	150
	1Map	GACCCCGAACCGCGACCGTAA			
	1Up	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT			
	1Uap	CAACCCCAAACCACAACCATAA			
	2Mp	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	63	36	234
	2Map	CCACCTAAATCGACCTCCGACCG			
	2Up	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT			
	2Uap	CCACCTAAATCAACCTCCAACCA			
<i>p14 1β</i>	Mp	GTGTAAAGGGCGGCGTAGC	66	35	122
	Map	AAAACCCTCACTCGCGACGA			
	Up	TTTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT			
	Uap	CACAAAACCCTCACTACAACAA			
<i>RARB</i>	Mp	TCGAGAACGCGAGCGATTTCG	60	38	146
	Map	GACCAATCCAACCGAAACGA			
	Up	TTGAGAATGTGAGTGATTTGA	61		
	Uap	AACCAATCCAACCAAAACAA			
<i>RASSF1</i>	Mp	GGGTTTTGCGAGAGCGCG	61	39	169
	Map	GCTAACAAACGCGAACCG			
	Up	GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG	63		
	Uap	CACTAACAAACACAAACCAAAC			
<i>MGMT</i>	Mp	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC	61	37	81
	Map	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG			
	Up	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT	62,8		
	Uap	AACTCCACACTCTTCCAAAACAAAACA			

DAPKI	Mp	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	66	37	98
	Map	CCCTCCCAAACGCCGA			
	Up	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	106		
	Uap	CAAATCCCTCCCAAACACCAA			

2 lentelė. MSP reakcijos mišinio komponentai ir reagentų kiekiai vienai reakcijai (A). MSP reakcijos režimas (B).

A		B	
Komponentai	Reakcijos mišinys	Etapas	PGR režimas
Distiliuotas H ₂ O	-	Polimerazės aktyvacija	95°C, 10 min
10x PGR Buferis	1X	Grandinių išskyrimas	95°C, 45 s
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	Pradmenų prijungimas	Temperatūra savita (priedas, 1 lentelė), 45 s
dNTP mišinys	0,4 mM	Produkto ilginimas	72°C, 45 s
Pradmenys	1 μM+1 μM	Galutinis ilginimo etapas	72°C, 8 min
Mp+Map/Up+Uap			
DMSO	10 μl/ml	Saugojimas	4°C, ∞
Polimerazė	1,25 U		
Modifikuota DNR	25-36 ng		
Reakcijos tūris	50 μl		

ciklų sk. savitas
(priedas,
1 lentelė)

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovei prof. S.Jarmalaitei už gerą, kryptingą vadovavimą, pagalbą įsisavinant molekulinis metodus, dalykinę ir moralinę paramą, svarbius patarimus, pastabas ruošiant publikacijas ir šį darbą. Dėkoju mokslinei konsultantei prof. K.Husgafvel-Pursiainen ir prof. R.Schneider-Stock už suteiktas galimybes dirbti užsienio mokslo centruose, tirti dideles retų onkologinių susirgimų mėginių kolekcijas, vertingas mokslines diskusijas, kritines pastabas, skatinimą norėti, galėti ir siekti daugiau, žvelgti giliau, praktinę pagalbą.

Dėkoju visam Botanikos ir genetikos katedros kolektyvui už malonų bendravimą, pagalbą sprendžiant įvairius klausimus, patarimus. Dėkoju ekologinės genetikos laboratorijos kolektyvui už studentiškas mokslines diskusijas, praktinę pagalbą.

Dėkoju savo tėvams ir savo šeimai už kantrybę, tikėjimą, moralinį palaikymą.