

DNR METILINIMO POKYČIAI PERIFERINIO KRAUJO LEUKOCITUOSE PACIENTAMS, SERGANTIEMS SKRANDŽIO VĖŽIU

Albertas Daukša¹, Antanas Gulbinas¹, Aurelija Kazlauskaitė¹, Johannes Oldenburg²,
Osman El-Maarri²

¹Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Virškinimo sistemos tyrimų institutas,

²Ekspimentinės hematologijos ir transfuziologijos institutas, Bonos universitetas, Vokietija

Raktažodžiai: skrandžio vėžys, metilinimas, leukocitai, navikus slopinantys genai.

Santrauka

Skrandžio vėžys dažniausiai diagnozuojamas pažengusioje ligos stadijoje, dėl ko blogėja išgyvenamumas nuo šios ligos. Neinvazinės ankstyvos diagnostikos priemonės galėtų ženkliai pagerinti gydymo efektyvumą ir išgyvenamumo duomenis. Šiam tikslui mes tyrėme periferinio kraujo leukocitus pacientams, sergantiems skrandžio vėžiu, įvertindami metilinimo pokyčius navikus slopinančiuose genuose: CDKN2A/p16, RARBeta, TNFRSF10C, APC, ACIN1, DAPK1, 3OST2, BCL2 ir CD44. Šis tyrimas parodo, kad DNR metilinimo pokyčių nustatymas periferinio kraujo leukocituose ateietyje galėtų tapti kaip neinvazinės skrandžio vėžio diagnostikos priemonė.

Įvadas

Skrandžio vėžys užima ketvirtą vietą pagal naujai diagnozuotų piktybinių susirgimų atvejų pasaulyje ir sudaro 8% iš visų piktybinių navikų, nustatytų pirmą kartą [1]. Apie 70% naujų skrandžio vėžio atvejų diagnozuojama besivystančiose Rytų Azijos, Rytų ir Centrinės Europos bei Pietų Amerikos šalyse. Daugelyje pasaulio šalių stebimas labai nežymus sergamumo skrandžio vėžiu mažėjimas [2]. Tai dalinai siejama su šviežių šaldytų maisto produktų gausesniu vartojimu, vengiant sūdytų ar konservuotų maisto produktų. Kitas labai svarbus veiksnys, įtakojantis sergamumo skrandžio vėžiu mažėjimą besivystančiose šalyse, yra *Helicobacter pylori* paplitimo sumažėjimas [3, 4]. 2009 metų Lietuvos vėžio registro duomenimis, sergamumas skrandžio vėžiu buvo didžiausias tarp visų virškinimo organų piktybinių navikų ir siekė 26,9 atvejus (32,8 vyrų ir 21,7 moterų) 100000 gyventojų. Mirtingumas nuo šios

ligos taip pat išlieka didžiausias iš visų virškinimo organų navikų – 20,5 (25,9 vyrų ir 15,8 moterų) 100000 gyventojų. Daugiau nei 50% skrandžio vėžio atvejų diagnozuojama vėlyvoje ligos stadijoje, kai radikalus gydymas jau nėra galimas, o skrandžio vėžio sisteminė chemoterapija tampa tik paliatyvine priemone.

Epigenetinės pažaidos navikiniuose audiniuose pripažintos vienu iš pagrindinių molekulinų mechanizmų kancerogenezeje. Dezoksiribonukleininės rūgšties (DNR) metilinimas labiausiai tyrinėjama epigenetikos šaka per pastarąjį dešimtmetį, nes metilinimo pokyčiai audiniuose yra pakankamai specifiniai navikinėms ligoms ir dėl savo stabilumo yra palankūs tyrimams bei specifinių biožymenų paieškai. DNR metilinimas – tai kovalentinis poreplikacinis cheminis DNR modifikavimas, kurio metu metilo grupė (-CH₃) prijungiama prie citozino anglies molekulės pirimidino žiedo 5 pozicijoje ir susidaro metilintas citozinas [5]. Žmonių ir žinduolių ląstelėse dažniausiai metilinamas citozinas esantis prieš guaniną, taip vadinamose CpG salose. Nebūdingas CpG salų metilinimas geno promotoriaus srityje, dar vadinamas hipermetiliniu, lemia genų raiškos slopinimą.

Piktybinių navikų atveju metilinimo pakitimai atsiranda ne tik kaip izoliuotas fenomenas navikiniuose audiniuose, bet pasireiškia kitose organų sistemose, įskaitant imuninę. Tai patvirtina tyrimai, kuriuose vertintas metilinimas pasikartojančiose DNR sekose ir nustatytas metilinimo pokyčių ryšys su piktybinių navikų rizika [6, 7]. Didėjantis susidomėjimas metilinimo pokyčiais leukocituose piktybinių susirgimų atveju yra svarbus ne tik specifinių žymenų paieškai, bet ir siekiant suprasti sisteminis kancerogeninio proceso mechanizmus ir jų atsaką į aplinkos veiksnis.

Darbo tikslas – nustatyti navikus slopinančių genų promotoriaus regiono metilinimo pokyčius periferinio kraujo leukocituose skrandžio vėžiu sergantiems pacientams.

Tyrimo medžiaga ir metodas

Pacientams, kuriems 2007–2008 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninėje Kauno klinikos (LSMU KK) buvo diagnozuotas skrandžio vėžys ir atlikta skrandžio rezekcija, sutikus dalyvauti tyrime, atlikti periferinio kraujo genetiniai tyrimai. Tyrime dalyvavo 24 skrandžio vėžiu sergantys pacientai. Vėžio diagnozė visiems pacientams patvirtinta histologinio tyrimo metu. Prieš planuojamą vėžio operacinį gydymą nei vienam pacientui nebuvo taikyta chemoterapija ar spindulinis gydymas bei abiejų kombinacija.

Kontrolinę grupę sudarė pacientai, operuoti LSMU KK chirurgijos klinikoje dėl kirkšnies (n=12) ar pirminės pilvo sienos išvaržų (n=8), tulžies akmenligės, be aktyvaus tulžies pūslės uždegimo (n=29). Kontrolinės grupės pacientai neturėjo kitos gretutinės patologijos. Tyrimui atlikti gautas Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas BE-2-17.

DNR mėginiai. Pacientams operacijos dieną, prieš atliekant chirurginius veiksmus, iš dilbio paviršinių venų buvo paimamas 4,5 ml periferinio kraujo bandinys. DNR išskyrimas atliktas panaudojus komercinį rinkinį „Qiagen DNeasy Blood & Tissue“ (Qiagen, Hilden, Vokietija).

Tiriamieji DNR regionai. Metilinimo tyrimui buvo pasirinkta įvairiuose kancerogenezės mechanizmuose - tokiose kaip ląstelių dalijimosi ciklo reguliacijoje, citokinų signalo perdavime, ląstelių komunikacijoje, apoptozėje dalyvaujantys genai bei kurie yra priskiriami navikus slopinančių genų grupei: CKN2A/p16, APC, 3OST2, DAPK1, ACIN1, Bcl-2, CD44, RARBeta, TNFRSF10C [8].

DNR modifikavimas natrio bisulfitu, metilinimui specifinė polimerazės grandininė reakcija (MS-PGR) ir metilinimo analizė pagal SIRPH metodą. DNR (200 ng genomines DNR) modifikavimui natrio bisulfitu naudotas komercinis rinkinys *EpiTect Bisulfite kit* (Qiagen, Hilden, Vokietija) pagal gamintojo instrukciją. MS-PGR reakcijos sąlygos ir pradmenys, apimantys tiriamuosius DNR regionus, buvo naudoti kaip aprašyta ankščiau [9]. Metilinimo vertinimas pasirinktuose CpG dinukleotiduose vertintas pagal SIRPH metodą, paremtu pradmenų pratešimu

vienu nukleotidu ir metilinimo kiekybiniu įvertinimu jonų porų atvirktinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos būdu. SIRPH metilinimo analizėje naudoti pradmenys, reakcijos sąlygos detaliai aprašyti ankščiau atliktame mūsų tyrime [9].

Statistinė duomenų analizė. Statistinė duomenų analizė atlikta naudojantis SPSS v. 17.0.0 (Chicago, Illinois, JAV). Apskaičiuotos kintamųjų procentinės reikšmės, vidurkiai, standartinis nuokrypis (SN). Kadangi kintamieji netenkino normalinio skirstinio prielaidų, skirtumams tarp dviejų nepriklausomų grupių nustatyti taikytas *Mann-Whitney* testas. Ryšys tarp dviejų kokybinių dydžių vertintas naudojant chi kvadrato (χ^2) kriterijų. Metilinimo lygmens įtaka atvejo-kontrolės būklei įvertinti naudota logistinė regresinė analizė. Klaidos tikimybė $p < 0,05$ laikyta ribine statistiniam reikšmingumui įvertinti.

Rezultatai

Tiriamoji ir kontrolinė grupės pagal amžių ir lytį statistškai reikšmingai nesiskyrė. Pacientų, sergančių skrandžio vėžiu, amžiaus vidurkis $60,1 \pm 11,9$ metai, kontrolinės grupės - $59,9 \pm 14,8$ metai ($p=0,962$). Tiriamąją grupę sudarė 30 moterų ir 19 vyrų, kontrolinę grupę – 11 moterų ir 13 vyrų ($\chi^2=1,6$, $df=1$, $p=0,213$).

Navikus slopinančių genų promotoriaus regionuose kiekybiniu būdu (%) metilinimas įvertintas viename CpG dinukleotide APC, Bcl-2, DAPK1, TNFRSF10C, CD44 ge-

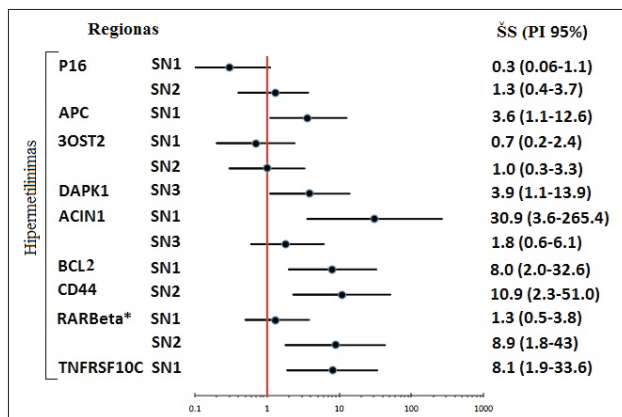
1 lentelė. Periferinio kraujo leukocitų DNR metilinimo įvertinimas. p^* reikšmė – Mann-Whitney testas; SN – standartinis nuokrypis

Tiriamasis regionas	CpG pozicija	Kontrolinė grupė (n=49)		Skrandžio vėžys (n=24)		p^* reikšmė
		Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	
CDKN2A/p16	SN-1	5,14	1,02	5,23	1,34	0,38
	SN-2	24,24	5,66	29,05	15,81	0,49
APC	SN-1	5,35	,96	7,32	2,32	<0,001
3OST2	SN-1	10,96	2,86	10,88	2,52	1,00
	SN-2	21,00	6,30	20,74	3,56	0,71
DAPK1	SN-3	11,93	3,01	14,19	3,77	0,01
ACIN1	SN-1	8,85	,50	12,26	1,58	<0,001
	SN-3	16,39	2,68	16,27	1,02	0,14
Bcl-2	SN-1	3,66	1,45	5,94	2,64	<0,001
CD44	SN-2	3,33	,41	4,23	1,08	<0,001
RARBeta	SN-1	7,59	4,49	7,24	1,69	0,39
	SN-2	5,38	4,09	6,63	1,71	0,27
TNFRSF10C	SN-1	4,92	3,59	5,27	,40	<0,001

nuose ir po du CpG dinukleotidus CDKNA2/p16, 3OST2, ACIN1 and RARBeta genuose. Gauti tiriamosios grupės metilinimo rezultatai palyginti su kontrolinės grupės metilinimo rezultatais (1 lentelė).

Gautuose rezultatuose matyti, jog šešiuose (APC, DAPK-1, ACIN-1, Bcl-2, CD44, TNFRSF10C) iš devynių tirtų genų promotorių regionų metilinimo reikšmės buvo neženkliai, tačiau statistiškai reikšmingai didesnės skrandžio vėžiu sergančių pacientų grupėje. Pažymėtina, jog ACIN1 geno promotoriaus regione buvo tirti du CpG dinukleotidai, tačiau viename iš jų (SN-3) metilinimo reikšmės reikšmingai nesiskyrė.

Toliau atlikome logistinę regresinę analizę, įvertinant aukščiau aprašytų pokyčių sąsajas su skrandžio vėžiu. Šiam tikslui kontrolinės grupės metilinimo reikšmės buvo suskirstytos į tris grupes – terciles. Tokiu būdu buvo sudaryti trys santykinio metilinimo lygmenys (aukštas, vidutinis ir žemas). Žemiausia tercilė nustatyta referentine, vertinant santykinį metilinimo lygmenį navikus slopinančių genų promotorių regionuose. Aukštą metilinimo lygmenį vertinome kaip atitinkamo tiriamojo CpG dinukleotido hipermetilinimą. Navikus slopinančių genų promotoriaus regiono hipermetilinimo sąsajos su skrandžio vėžiu nustatytos šešiuose iš devynių tirtų genų (1 pav.), t.y. APC (ŠS= 3,6, PI 95% 1,1-12,6), DAPK-1 (ŠS= 3,9, PI 95% 1,1-13,9), ACIN1 SN1 (ŠS= 30,9, PI 95% 3,6-265,4), Bcl-2 (ŠS= 8, PI 95% 2-32,6), CD44 (ŠS= 10,9, PI 95% 2,3-51), TNFRSF10C (ŠS= 8,1, PI 95% 1,9-33,6). Analizuojant RARBeta geno promotoriaus metilinimą, nustatėme, kad vidutinis metilinimo lygmuo SN2 tiriamajame nukleotide susijęs su skrandžio vėžiu (ŠS= 8,9, PI 95% 1,8-43).



1 pav. Hipermetilinimo navikus slopinančių genų promotoriaus regione sąsajos su skrandžio vėžiu Forrest skalėje. ŠS- šansų santykis; PI – pasikliautinis intervalas

Rezultatų aptarimas

Šiame tyrime nagrinėjome periferinio kraujo leukocitų DNR, kad nustatytume, ar metilinimo pokyčiai navikus slopinančių genų promotoriaus regionuose gali būti siejami su skrandžio vėžiu. Mes nustatėme reikšmingus metilinimo skirtumus APC, DAPK-1, ACIN1, Bcl-2, CD44, TNFRSF10C genuose skrandžio vėžiu sergantiems pacientams ir šias sąsajas patvirtinome logistinės regresijos analizės metu. Ligi šiol tikrai keli atvejo-kontrolės tyrimai atlikti nagrinėjant skrandžio vėžio riziką vertinant DNR metilinimo pokyčius periferinio kraujo leukocituose. Vienas jų - lenkų atvejo-kontrolės tyrimas, kuriuo buvo nustatyta, kad hipometilinimas LINE-1 ir Alu pasikartojančiose DNR sekose susijęs su padidėjusia skrandžio vėžio rizika [10]. Tyrimų, kuriuose būtų nagrinėjamas navikus slopinančių genų promotorių metilinimas periferinio kraujo leukocituose skrandžio vėžio atveju, iki šiol nėra. Taip pat nedaug tyrimų yra publikuoti, kuriuose minėti metilinimo pokyčiai nagrinėjami periferinio kraujo leukocituose kitų lokalizacijų piktybinių navikų atvejais [9,11-14]. Pastarieji tyrimai patvirtina leukocitų DNR potencialą biožymenų paieškai. Martin Widschwendter su bendraautorais nustatė genus, kuriuose metilinimo pokyčiai gali tarnauti kaip surogatiniai biožymenys diagnozuojant krūties vėžį [12]. Metilinimo profiliavimo tyrimuose leukocitų DNR buvo nustatyti specifiniai CpG salų regionai, kurie leidžia atskirti plaučių smulkių ląstelių karcinoma [15] ar kasos vėžiu sergančius pacientus [16] nuo sveikų asmenų. Savo ankstesniame tyrime nagrinėdami metilinimo pokyčius leukocituose nustatėme genus, kurių hipermetilinimas susijęs su kasos vėžiu [9]. Visgi yra publikuotų tyrimų, kurių rezultatai vertinant metilinimo pokyčius periferinio kraujo leukocituose prieštarauja vieni kitiems. Nustatyta IGF II geno metilinimo reikšmė gaubtinės žarnos vėžio rizikai periferinio kraujo leukocituose [17] nebuvo patvirtinta kitame didesnės apimties tyrime [14]. Apibendrinant šiuos tyrimus, galima teigti, kad turimi duomenys yra vis dar labai riboti, ir sisteminis ar nešališkas genų atrankos metodas nebuvo naudojamas.

Remiantis mūsų ir kitų tyrėjų duomenimis, negalima atsakyti į vieną svarbiausių klausimų - ar metilinimo pokyčiai periferinio kraujo leukocituose yra navikinio susirgimo priežastis ar pasekmė? Pastaraisiais metais vienas iš pasiūlytų mechanizmų galėtų būti: laisvai cirkuliuojančias kraujyje navikinės DNR grandines leukocitai prisijungia prie ekstraceliulinio paviršiaus. Tokią hipotezę palaiko tyrimas, kuriame nustatytas leukocitų ekstraceliuliniame paviršiuje rastų DNR fragmentų metilinimo profilis, kuris atitinka pirminio naviko metilinimo profilį [18]. Mes taip pat negalime pilnai atmesti galimybes, kad mūsų tyrime nustatyti

metilinimo pokyčiai nėra pasekmė mums nežinomo poveikio ar aplinkybių, pvz., nediagnozuotos lėtinės ligos. Todėl ateities tyrimai turėtų daugiau dėmesio skirti nustatant mechanizmus, dėl kurių atsiranda DNR metilinimo pokyčiai leukocituose pacientams, sergantiems kitų lokalizacijų piktybiniais navikais.

Interpretuojant mūsų tyrimo rezultatus taip pat svarbu atmesti laisvai cirkuliuojančių navikinių ląstelių ar laisvos navikinių ląstelių DNR įtaką, kuri teoriškai galėjo daryti įtaką metilinimo tyrimo rezultatams [19]. Periferinio kraujo mėginiai, naudoti šiame tyrime, buvo paimami prieš taikant operacinį skrandžio vėžio gydymą. Taip pat svarbu pažymėti, kad daugumoje atvejų (n=19) nebuvo nustatyta atokiųjų metastazių prieš chirurginį gydymą ir jo laikotarpį. Tačiau verta pažymėti, kad net ir esant atokiosioms metastazėms, vidutiniškai navikinių ląstelių periferinio kraujo bandinyje gali būti apie 24 iš 4.5 milijonų leukocitų (7.5 ml periferinio kraujo tūryje) (17). Todėl galimybė, kad laisvai cirkuliuojančios navikinės ląstelės turėjo įtaką mūsų tyrimo rezultatams, gali būti visiškai pašalinta. Be to, kraujas buvo centrifuguojamas prieš DNR išskyrimą ir buvo izoliuojamos kraujo ląstelės turinčios branduolius. Todėl laisvo plazminio DNR įtaka nėra galima.

Apibendrinant verta paminėti kelis svarbius veiksnius, ribojančius mūsų atlikto tyrimo duomenis. Pirma, mes ištyrėme nuo vieno iki dviejų CpG dinukleotidų kiekvienam genui. Nuo to gali priklausyti galutinis rezultatas vertinant metilinimo pokyčių sąsajas su skrandžio vėžiu. Pavyzdžiui, mūsų tyrime ACIN1 geno CpG dinukleotido SN-1 metilimas buvo susijęs su skrandžio vėžiu, kitas SN-3 - nebuvo. Todėl visų genų promotorių regionai turi būti tiriami didesne apimtimi, t.y. apimant daugiau CpG salų. Antra, mes negalėjome nustatyti galimus mechanizmus, įtakojančius metilinimo skirtumus tarp atvejo ir kontrolės, tokius kaip galimus genetinius veiksnius, gyvenimo būdą, mitybą, leukocitų subpopuliacijas. Trečia, tiriamos grupės atvejų skaičius yra mažokas. Didesnės apimties tyrimas neabejotinai būtinas, kad patvirtintų gautus rezultatus.

Išvados

1. Metilinimo pokyčiai navikus slopinančių genų promotoriaus regione gali būti nustatomi DNR, išskirtos iš periferinio kraujo leukocitų pacientų, sergančių skrandžio vėžiu.

2. Reikalingi didesnės apimties perspektyviniai tyrimai, įvertinantys DNR metilinimo pokyčių periferinio kraujo leukocituose biologinę, klinikinę ir epidemiologinę reikšmę.

Literatūra

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J.Clin.* 2011; 61:69-90.
- Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E, Malvezzi M, La VC. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int.J.Cancer* 2009; 125:666-673.
- Kawakami E, Machado RS, Ogata SK, Langner M. Decrease in prevalence of *Helicobacter pylori* infection during a 10-year period in Brazilian children. *Arq Gastroenterol.* 2008; 45:147-151.
- Tkachenko MA, Zhannat NZ, Erman LV, Blashenkova EL, Isachenko SV, Isachenko OB, Graham DY, Malaty HM. Dramatic changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection during childhood: a 10-year follow-up study in Russia. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2007; 45:428-432.
- Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J.Clin.* 2010; 60:376-392.
- Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, Kelsey KT. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2007; 16:108-114.
- Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D, Garcia-Closas R, Chanock S, Tardon A, Serra C, Carrato A, Dosemeci M, Garcia-Closas M, Esteller M, Fraga M, Rothman N, Malats N. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol.* 2008; 9:359-366.
- Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, Guignard JC, Jacquemot-Perbal MC, Labarussias M, Leberre V, Malo A, Morel-Pair C, Mossafa H, Potier JC, Texier G, Viguie F, Yau CW-S, Zasadzinski A, Dessen P. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41:D920-D924.
- Dauksa A, Gulbinas A, Barauskas G, Pundzius J, Oldenburg J, El-Maarri O. Whole blood DNA aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma shows association with the course of the disease: a pilot study. *PLoS.One.* 2012; 7:e37509.
- Hou L, Wang H, Sartori S, Gawron A, Lissowska J, Bollati V, Tarantini L, Zhang FF, Zatonski W, Chow WH, Baccarelli A. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. *Int.J.Cancer* 2010; 127:1866-1874.
- Iwamoto T, Yamamoto N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation. *Breast Cancer Res.Treat.* 2011; 129:69-77.
- Widschwendter M, Apostolidou S, Raum E, Rothenbacher D, Fiegl H, Menon U, Stegmaier C, Jacobs IJ, Brenner H. Epigenotyping in peripheral blood cell DNA and breast cancer risk: a proof of principle study. *PLoS.One.* 2008; 3:e2656.
- Pedersen KS, Bamlet WR, Oberg AL, de AM, Matsumoto ME, Tang H, Thibodeau SN, Petersen GM, Wang L. Leukocyte DNA methylation signature differentiates pancreatic cancer patients

- from healthy controls. *PLoS.One.* 2011; 6:e18223.
14. Kaaks R, Stattin P, Villar S, Poetsch AR, Dossus L, Nieters A, Riboli E, Palmqvist R, Hallmans G, Plass C, Friesen MD. Insulin-like growth factor-II methylation status in lymphocyte DNA and colon cancer risk in the Northern Sweden Health and Disease cohort. *Cancer Res.* 2009; 69:5400-5405.
 15. Wang L, Aakre JA, Jiang R, Marks RS, Wu Y, Chen J, Thibodeau SN, Pankratz VS, Yang P. Methylation markers for small cell lung cancer in peripheral blood leukocyte DNA. *J.Thorac. Oncol.* 2010; 5:778-785.
 16. Pedersen KS, Bamlet WR, Oberg AL, de AM, Matsumoto ME, Tang H, Thibodeau SN, Petersen GM, Wang L. Leukocyte DNA methylation signature differentiates pancreatic cancer patients from healthy controls. *PLoS.One.* 2011; 6:e18223.
 17. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Powe NR, Feinberg AP. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003; 299:1753-1755.
 18. Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Vlassov VV, Laktionov PP. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br.J.Cancer* 2006; 94:1492-1495.
 19. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy

subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin.Cancer Res.* 2004; 10:6897-6904.

PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTE DNA ABERRANT METHYLATION IN GASTRIC CANCER PATIENTS

A. Daukša, A. Gulbinas, A. Kazlauskaitė, J. Oldenburg, O. El-Maarri

Key words: gastric cancer, methylation, leukocyte, tumor suppressor gene

Summary

Gastric cancers are usually diagnosed at an advanced stage in the progression of the disease, thus reducing the survival chances of the patients. Non-invasive early detection would greatly enhance therapy and survival rates. For this aim, we investigated tumor suppressor genes CDKN2A/p16, RARBeta, TNFRSF10C, APC, ACIN1, DAPK1, 3OST2, BCL2 and CD44 for methylation changes in peripheral blood leukocytes of gastric cancer patients. This study shows that methylation changes in peripheral blood leukocyte DNA could provide a promising method for the early detection of gastric cancer. However, larger studies are essential to explore the clinical usefulness of a peripheral blood leukocyte DNA methylation based tests for non-invasive early detection of gastric cancer.

Correspondence to: albertas.dauksa@gmail.com

Gauta 2013-03-11