

© Коллектив авторов, 2017

Г.Т. СУХИХ<sup>1</sup>, Л.А. АШРАФЯН<sup>2</sup>, Г.Р. БАЙРАМОВА<sup>1</sup>, И.О. БАБКИНА<sup>3</sup>,  
В.Ф. ЧЕРНОВА<sup>1</sup>, А.И. ОСИПЬЯНЦ<sup>3</sup>, А.И. КОРОЛЬКОВА<sup>1</sup>, А.А. ПОЛОЗНИКОВ<sup>3\*</sup>,  
Г.Р. АСФАРОВА<sup>1</sup>, С.М. МУЛЛАБАЕВА<sup>1</sup>, Е.А. КОГАН<sup>4</sup>, Е.Л. МУЙЖНЕК<sup>5</sup>, В.М. ДРУХ<sup>6</sup>, В.И. КИСЕЛЕВ<sup>2</sup>

## МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНА *WIF1* ПРИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЯХ

<sup>1</sup>ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва

<sup>2</sup>ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава России, Москва

<sup>3</sup>Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева Минздрава России, Москва

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

<sup>5</sup>ЗАО «МираксБиоФарма», Москва

<sup>6</sup>ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва

**Цель исследования.** Оценить диагностическую значимость метилирования промоторного участка гена *WIF1* в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии (Cervical intraepithelial neoplasia, CIN).

**Материал и методы.** В исследование включены 62 пациентки в возрасте от 18 до 55 лет, обратившиеся в ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова МЗ РФ в период с февраля по август 2016 г. для обследования. Проводилась жидкостная цитология (ЖЦ), количественное и качественное тестирование на вирус папилломы человека (ВПЧ), гистологическое исследование биоптата шейки матки, расширенная кольпоскопия. Методом бисульфитного секвенирования был исследован уровень промоторного метилирования гена *WIF1* в 62 образцах клеток, взятых из цервикального канала с помощью зонда «Cervix Brush».

**Результаты.** Установлено, что в норме средний уровень метилирования промоторной области гена *WIF1* составляет  $2,3 \pm 5,4\%$ . У женщин с диагнозами LSIL и HSIL наблюдалось статистически значимое по сравнению с нормой ( $p < 0,0001$ ) аномальное гиперметилирование промоторных участков гена *WIF1* со средней частотой  $29,2 \pm 17,2\%$  и  $54,8 \pm 18,7\%$  соответственно.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень метилирования промоторного участка гена *WIF1* достоверно коррелирует со стадией ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки. Таким образом, оценка статуса метилирования гена *WIF1* может рассматриваться как потенциальный диагностический маркер цервикального канцерогенеза, а также прогностический клинический маркер в процессе комплексного лечения онкологических заболеваний шейки матки.

**Ключевые слова:** цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN), Wnt-каскад, ген *WIF1*, ДНК-метилирование, эпигенетическая модификация, бисульфитное секвенирование.

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Для цитирования: Сухих Г.Т., Ашрафян Л.А., Байрамова Г.Р., Бабкина И.О., Чернова В.Ф., Осипьянц А.И., Королькова А.И., Полозников А.А., Асфарова Г.Р., Муллабаева С.М., Коган Е.А., Муйжнек Е.Л., Друх В.М., Киселев В.И.

Метилирование гена *WIF1* при цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях. Акушерство и гинекология. 2017; 5: 114-23.  
<http://dx.doi.org/10.18565/aig.2017.5.114-23>

G.T. SUKHIKH<sup>1</sup>, L.A. ASHRAFYAN<sup>2</sup>, G.R. BAIRAMOVA<sup>1</sup>, I.O. BABKINA<sup>3</sup>,  
V.F. CHERNOVA<sup>1</sup>, A.I. OSIPYANTS<sup>3</sup>, A.I. KOROLKOVA<sup>1</sup>, A.A. POLOZNIKOV<sup>3\*</sup>,  
G.R. ASFAROVA<sup>1</sup>, S.M. MULLABAIEVA<sup>1</sup>, E.A. KOGAN<sup>4</sup>, E.L. MUIZHNEK<sup>5</sup>, V.M. DRUKH<sup>6</sup>, V.I. KISELEV<sup>2</sup>

## WIF-1 GENE METHYLATION IN CERVICAL SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS

<sup>1</sup>Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, Moscow 117997, Ac. Oparina str. 4, Russia

<sup>2</sup>Russian Research Center of Roentgenology and Radiology, Ministry of Health of Russia, Moscow 117485, Profsoyuznaya str. 86, Russia

<sup>3</sup>D. Rogachev Federal Research Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Ministry of Health of Russia, Moscow 117997, GSP-7, Samora Mashela str. 1, Russia

<sup>4</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow 119991, Trubetskaya str. 8-2, Russia

<sup>5</sup>ЗАО «MiraxBioFarma», Moscow 121248, Kutuzov Ave, 12, p. 2, Russia

<sup>6</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow 117198, Miklukho-Maklaya str. 6, Russia

**Objective.** To evaluate the diagnostic value of WIF-1 gene promoter region methylation in the development of cervical intraepithelial neoplasia.

**Subjects and methods.** The investigation included 62 patients aged 18 to 55 years who had come to the Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, in the period February to August 2016 for examination and undergone liquid-based cytology, quantitative and qualitative tests for human papillomavirus (HPV), histological examination of cervical biopsy specimens, and extended colposcopy. Bisulfite sequencing was used to study the level of WIF-1 promoter methylation in 62 samples of cells taken from the cervical canal with a cervix brush.

**Results.** The normal mean level of WIF-1 promoter region methylation was  $2.3 \pm 5.4\%$ . The women diagnosed with high- or low-grade squamous intraepithelial lesions were observed to have a more statistically significant than normal value ( $p < 0.0001$ ), abnormal WIF-1 gene promoter region hypermethylation at mean frequencies of  $29.2 \pm 17.2$  and  $54.8 \pm 18.7\%$ , respectively.

**Conclusion.** The findings suggest that the level of WIF-1 gene promoter region methylation significantly correlates with the stage of HPV-associated cervical disease. Thus, evaluation of the WIF-1 gene methylation status may be regarded as a potential diagnostic marker for cervical carcinogenesis and a predictive clinical marker during combination treatment for cervical cancer.

**Keywords:** cervical intraepithelial neoplasia, Wnt-cascade, WIF-1 gene, DNA methylation, epigenetic modification, bisulfite sequencing.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

For citations: Sukhikh G.T., Ashrafyan L.A., Bairamova G.R., Babkina I.O., Chernova V.F., Osipyants A.I., Korolkova A.I., Poloznikov A.A., Asfarova G.R., Mullabaeva S.M., Kogan E.A., Muizhnek E.L., Drukh V.M., Kiselev V.I. Investigation of WIF-1 gene methylation in cervical squamous intraepithelial lesions. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2017; (5): 114-23. (in Russian)

<http://dx.doi.org/10.18565/aig.2017.5.114-23>

В настоящее время в мировом сообществе особое внимание уделяется патологии шейки матки с акцентом на предрак и рак шейки матки. Выявление цервикальных интраэпителиальных неоплазий (CIN) на ранних стадиях развития является глобальной и актуальной проблемой. К лабораторным методам ранней диагностики CIN относятся цитологический метод (ПАП-тест или жидкостная цитология) и молекулярные методы выявления ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) [1]. Вместе с тем, чувствительность цитологического метода недостаточно высока и составляет 60–80% [2]. С недавнего времени наряду с цитологическим методом исследования лидирующую позицию занимает качественное и количественное определение ВПЧ. В современных условиях ВПЧ-тест необходимо проводить ввиду его высокой чувствительности. Исследования А.Л. Blatt и соавт. (2015) показали приоритет сочетанного использования цитологического метода исследования и ВПЧ-тестирования по сравнению с проведением только цитологического или только ВПЧ-тестирования [3, 4]. Как показывает клинический опыт, нередки случаи расхождения результатов цитологического, гистологического, кольпоскопического исследований и ВПЧ-тестирования. Это подчеркивает необходимость поиска новых специфических маркеров, прогнозирующих риск развития и прогрессию CIN.

Малигнизация ВПЧ-инфицированных эпителиальных клеток шейки матки в значительной степени индуцируется синтезом двух онкобелков E6 и E7, кодируемых геномом ВПЧ [5]. Онкогенные белки E6 и E7 инактивируют ключевые белки-регуляторы пролиферативной активности клеток – проапоптотический белок p53 и белок ретинобластомы (pRB) [6]. Установлено, что белок E7 способен

образовывать стабильный комплекс с белком pRB, вызывая его деградацию, что приводит к высвобождению транскрипционного фактора E2F, который стимулирует транскрипцию генов, необходимых для репликации ДНК в S-фазе клеточного цикла. Кроме того, E7 влияет на активность целого ряда других белков-регуляторов клеточного цикла, таких как A- и E-циклины, cdk2-киназа и ингибиторы циклин-зависимой киназы p21 и p27. Онкобелок E6 взаимодействует с белком p53, приводя к его убиквитинированию и последующей деградации в протеасоме. Вследствие этого нарушается процесс апоптоза клеток с встроенной ДНК ВПЧ [7].

Кроме того, опухоль-супрессорный белок p53 является ингибитором Wnt-сигнального пути. Есть данные, что активация этого пролиферативного сигнального каскада играет важную роль при трансформации ВПЧ-инфицированных клеток цервикального эпителия в опухолевые [8].

Важным компонентом Wnt-зависимой сигнальной системы является белок β-катенин, первоначально идентифицированный как регулятор активности белков адгезии – кадгеринов. В норме, в отсутствие Wnt-сигналов, β-катенин не активен благодаря ингибирующему действию мультимерного комплекса, в состав которого, помимо него самого, входят также ферменты киназа-3β гликогенсинтазы (GSK3β) и казеинкиназа 1α (CK1α), опухоль-супрессорный белок APC (adenomatous polyposis coli) и проапоптотический белок аксин [9].

Ключевым механизмом регуляции, который обеспечивает поддержание низкого уровня β-катенина в клетке, является экспрессия и секреция антагонистов Wnt-каскада, которые бывают двух видов: белки, связывающие и блокирующие Wnt-лиганды,

и белки, связывающие и блокирующие Wnt-рецепторы. Ключевым ингибиторным белком первой группы является Wnt-ингибиторный фактор 1 (Wnt Inhibitory Factor-1, *WIF1*) [10].

Показано, что в злокачественных опухолях человека различного происхождения фактор *WIF1* находится в неактивном состоянии. И, напротив, восстановление экспрессии *WIF1* в опухолевых клетках приводит к выраженной опухолевой супрессии, уменьшению подвижности опухолевых клеток и снижению их инвазивного и метастатического потенциала. При этом основным механизмом инактивации фактора *WIF1* является промоторное ДНК-метилирование и, как следствие, эпигенетическое выключение кодирующего его гена, происходящее на ранних этапах онкогенеза [11–15].

Следует отметить, что данный эпигенетический механизм инактивации генов наряду с другими механизмами эпигенетической регуляции (модификации гистонов хроматина, микроРНК) широко распространен и общепризнан как один из основных молекулярных механизмов раннего канцерогенеза. Более того, сегодня практически для всех видов злокачественных новообразований известны характерные эпигенетические нарушения, возникающие на ранних этапах канцерогенеза и имеющие причинное значение. В подавляющем большинстве случаев это реакции аномального промоторного метилирования ДНК и деацетилирования гистонов, которые приводят к подавлению экспрессии генов, обеспечивающих онкопротекторные свойства организма. К таковым относятся опухолевые супрессорные гены, гены ДНК-репарации, гены ферментов детоксикации, гены ядерных (в том числе гормональных) рецепторов, гены клеточной дифференцировки, гены иммунного ответа, а также гены сигнальных белков, подавляющих гиперпролиферацию, патологический ангиогенез, инвазию и метастазирование, то есть базовые механизмы канцерогенеза. Доказано, что при спорадических раках как минимум половина всех инактивированных генов, контролирующих противоопухолевую защиту, являются транскрипционно неактивными вследствие обратимых эпигенетических модификаций, а не в результате необратимых генетических нарушений, как считалось ранее [16, 17].

Важное практическое значение имеет тот факт, что выявленные эпигенетические маркеры служат не только молекулярными мишенями для новых таргетных противоопухолевых препаратов, но одновременно являются основой для создания новых высокоселективных методов молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний. Эпигенетические маркеры все активнее начинают использоваться как инструмент раннего (доклинического) обнаружения и уточнения классификации онкологического заболевания, а также как факторы его клинического прогноза и мониторинга лечения. С их помощью можно оценить агрессивность опухоли (ее инвазивный и метастатический потенциал), а также успешность применения того или иного лекарственного препарата (наличие предсуществующей резистентности, веро-

ятность развития приобретенной резистентности и появления рецидива заболевания) [18].

Все вышесказанное имеет непосредственное отношение к фактору *WIF1*. В настоящее время уже получены данные, свидетельствующие о том, что статус метилирования гена, кодирующего фактор *WIF1*, может рассматриваться как достоверный диагностический онкомаркер, а также прогностический клинический маркер в процессе комплексного лечения онкологических заболеваний [15].

Установлено, что инактивация гена *WIF1* посредством промоторного гиперметилирования – достаточно частое событие при раке груди [11], гепатоцеллюлярной карциноме [19], а также целом ряде других онкопатологий. Подобные исследования проводились и для исследования статуса метилирования гена *WIF1* при раке шейки матки. Результаты данных работ показывают, что при данной онкопатологии наблюдается высокий уровень метилирования промоторной области гена *WIF1*, что приводит к подавлению его экспрессии. При воздействии на культуры опухолевых клеток шейки матки C33A, CaSki, HeLa и SiHa известного деметилирующего агента 5-аза-2'-дезоксцитидина активность гена *WIF1* восстанавливалась [13].

Необходимость использования новых методов комплексной диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний диктуется недостаточной чувствительностью и специфичностью, в ряде случаев, стандартных первичных методов обследования шейки матки, неоднозначностью полученных при таком обследовании результатов, а также необходимостью смещения приоритетов в область профилактики предраковых и раковых заболеваний шейки матки и обнаружения их на как можно более ранних стадиях развития.

Целью настоящего исследования было оценить диагностическую значимость метилирования гена *WIF1* в развитии CIN.

## Материал и методы исследования

В исследование были включены 62 пациентки в возрасте от 18 до 55 лет (средний возраст составил  $35 \pm 1,2$  года), которые обратились в ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова МЗ РФ для обследования и, при необходимости, лечения патологии шейки матки с февраля по август 2016 г. Пациенткам проводился клинический осмотр, жидкостная цитология, ВПЧ-тестирование, гистологическое исследование биоптата шейки матки, расширенная кольпоскопия, исследование метилирования гена *WIF1*. Оценка цитологических мазков проводилась по системе Бетесда (Terminology Bethesda System, TBS, 2014 г.). Согласно системе Бетесда плоскоклеточные интраэпителиальные поражения (SIL) подразделяются на 2 группы: плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени (LSIL), что приравнивается к клиническому диагнозу дисплазии легкой степени (то есть CIN I) и плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени (HSIL) и включает в себя умеренную и тяжелую дисплазию, то есть CIN II-III, а также карциному *in situ* (CIS).

ВПЧ-тестирование проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, позволяющим провести генотипирование и количественное определение двадцати одного типа ВПЧ (HPV КВАНТ-21) – 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, 6, 11.

Окончательная верификация диагноза SIL проводилась на основании гистологического исследования.

Всем пациенткам была проведена расширенная кольпоскопия с применением 3% раствора уксусной кислоты и раствора Люголя. При наличии измененных и/или подозрительных участков шейки матки производилась прицельная биопсия или петлевая электроэксцизия, а при наличии HSIL – конизация шейки матки. По показаниям было произведено выскабливание цервикального канала.

Для выявления метилирования гена *WIFI*, взятые с помощью зонда цервикс-браш (Cervix Brush) образцы клеток из цервикального канала были помещены в пробирку с буфером PBS (натрий-фосфатный буфер), трижды промыты PBS и заморожены при температуре -20° С перед отправкой на исследование.

Реагенты: PBS (натрий-фосфатный буфер) (Cell Signalling Technologies, США), этанол (Sigma-Aldrich, США).

Полученные образцы клеток шейки матки гомогенизировали в гомогенизаторе FastPrep-24 (MPBiomedicals, США) с добавлением матрикса D. Из полученных образцов выделяли ДНК с использованием и по протоколу набора ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System (Promega, США). Концентрацию ДНК определяли флуориметрически с использованием стандартного набора Qubitds DNA HSAssay Kit на флуориметре Qubit 2.0 (Life Technologies, США).

150 нг полученной ДНК подвергали бисульфитной конверсии (переводу неметилированных остатков цитозина в тимин при сохранении метилированных остатков цитозина в неизменном виде) с использованием набора innuCONVERT Bisulfite Basic Kit (Analytik Jena, Германия). Концентрацию конвертированной ДНК определяли фотометрически в планшете  $\mu$ -drop (BMGLabtech, Германия) с использованием мультидетектора CLARIOstar (BMGLabtech, Германия).

20 нг бисульфит-конвертированной ДНК отбирали для последующей «тачдаун» ПЦР-амплификации с использованием полимеразной смеси GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega, США) и праймеров, позволяющих амплифицировать участок промотора гена *WIFI* от -554 до -140 нуклеотидов до старт-кодона [20] и содержащих, помимо комплементарной последовательности, универсальную последовательность M13 на 5'-конце, которая позволяет существенно повысить длину прочтения последовательности при проведении секвенирования:

**WIFI-M13F**

5'- gttttcccagtcacgacGAGTGATGTTTTAGGGGTTT -3'

**WIFI-M13R**

5'- ggaacagctatgacatgCCTAAATACCAAAAAACCTAC -3'

Наличие и размер (длину) ПЦР-продуктов определяли посредством электрофореза в 2,5% агарозном геле с маркерами молекулярного веса 100 bp MolecularRuler (Bio-Rad, США). Полученные ПЦР-продукты выделяли из геля с использованием набора innuPRE-PDOUBLEpureKit (Analytik Jena, Германия).

Секвенирование проводилось в центре коллективного пользования «ГЕНОМ» на базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по стандартному протоколу с использованием прямых праймеров и набора реактивов ABIPRISM BigDye Terminatorv. 3.1. Анализ продуктов реакции проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием универсальных праймеров M13:

**M13F**

5'- GTTTTCCAGTCACGAC -3'

**M13R**

5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3'

Статистический анализ результатов секвенирования проводили с использованием программного обеспечения DNA Sequencing Analysis Software версии 5.1 (Applied Biosystems, США) и QUMA: quantification tool for methylation analysis [21]. Уровень ДНК-метилирования оценивали качественно (наличие/отсутствие). Определяли долю метилированных сайтов (уровень метилирования) в промоторной области гена *WIFI* для каждого пациента, а затем рассчитывали среднее арифметическое значение данного показателя (M), а также величину стандартного отклонения в каждой группе пациентов (SD). Полученные значения выражали как  $M \pm SD$ . Значимость отличий между группами определялась по критерию Стьюдента при пороговом значении  $p < 0,05$ . Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 10.0.

**Результаты и обсуждение**

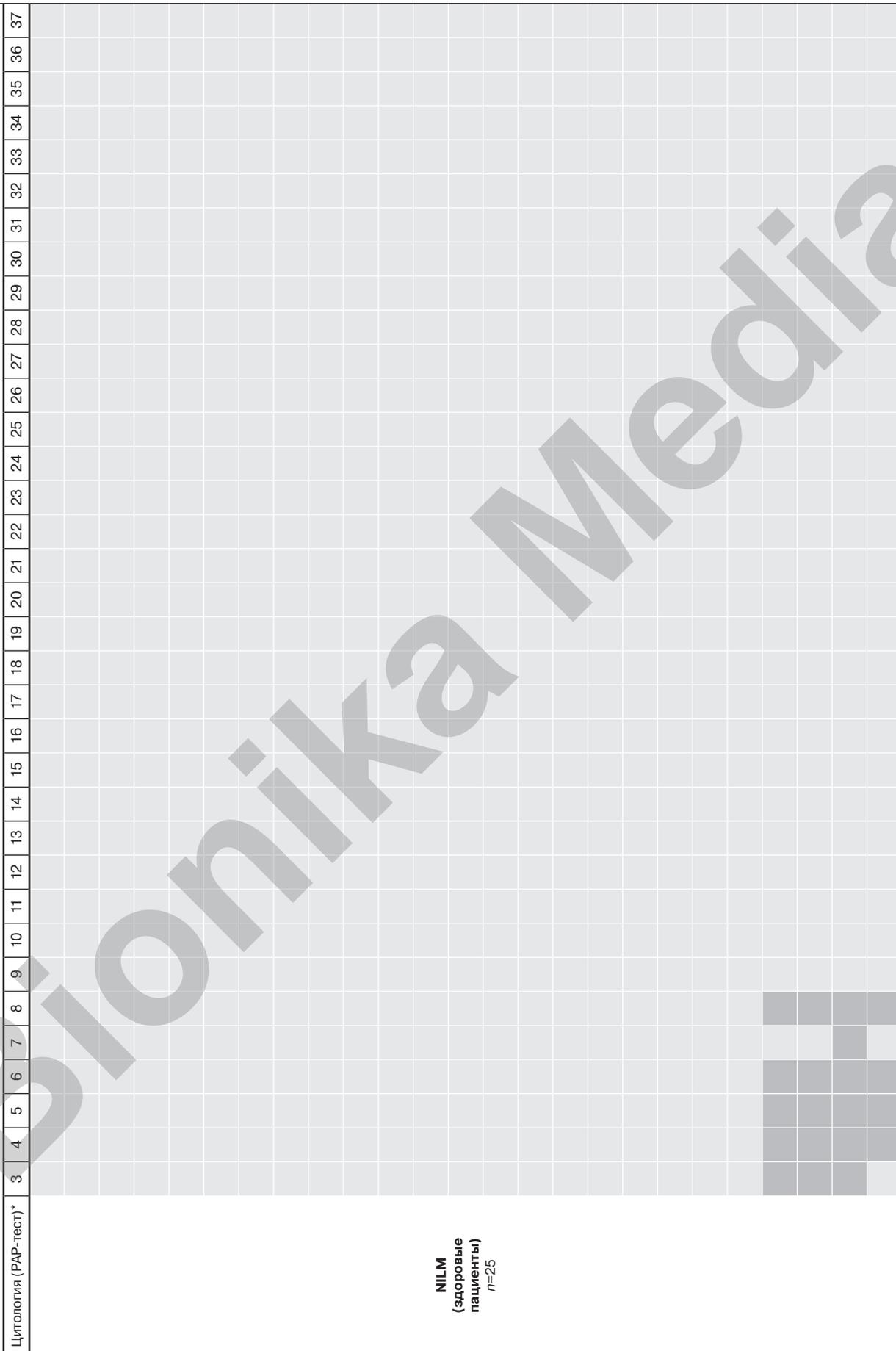
На основании проведенных исследований пациентки были разделены на 3 группы: 1-я группа – с верифицированным диагнозом LSIL ( $n=19$ ); 2-я группа – пациентки с HSIL ( $n=18$ ). Третью контрольную группу составили 25 здоровых женщин, у которых по данным цитологического исследования атипические клетки не выявлены (NILM); тест на ВПЧ – отрицательный; при проведении расширенной кольпоскопии изменений эпителия шейки матки не выявлено.

При тестировании на ВПЧ у пациенток 1-й группы в 26,3% случаев выявлялся 16-й тип, у 15,8% пациенток – 18-й тип, у 21% женщин – 33-й тип, другие типы ВПЧ – у 31,6%, сочетание 2 и более типов ВПЧ – в 26,3% случаев.

При тестировании на ВПЧ у пациенток 2-й группы наиболее часто выявлялся 16-й тип (44,4%), 18-й тип – у 33,3% пациенток, другие типы ВПЧ – у 22,2% пациенток, сочетание 2 и более типов вирусов – в 33,3% случаев.

Результаты секвенирования полученных образцов ДНК представлены на рис. 1.

Рис. 1. Участок метилирования промотора гена WIF-1



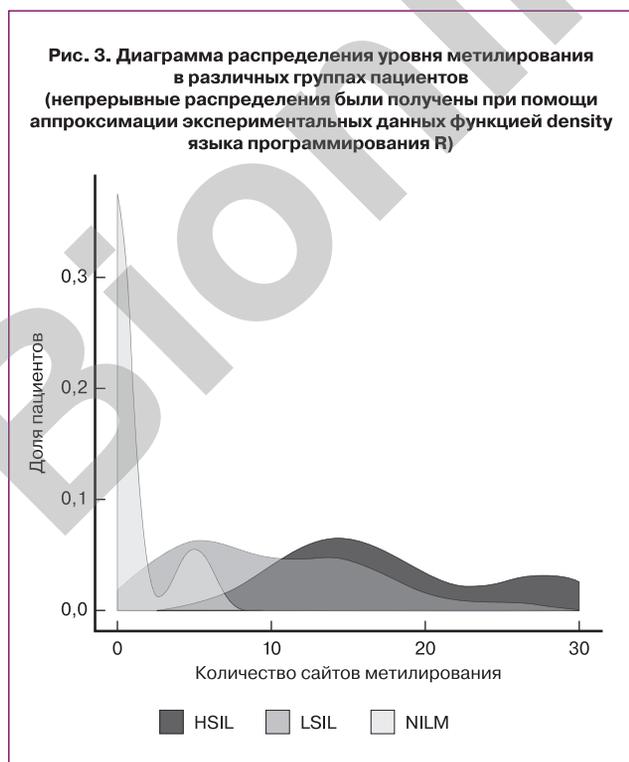
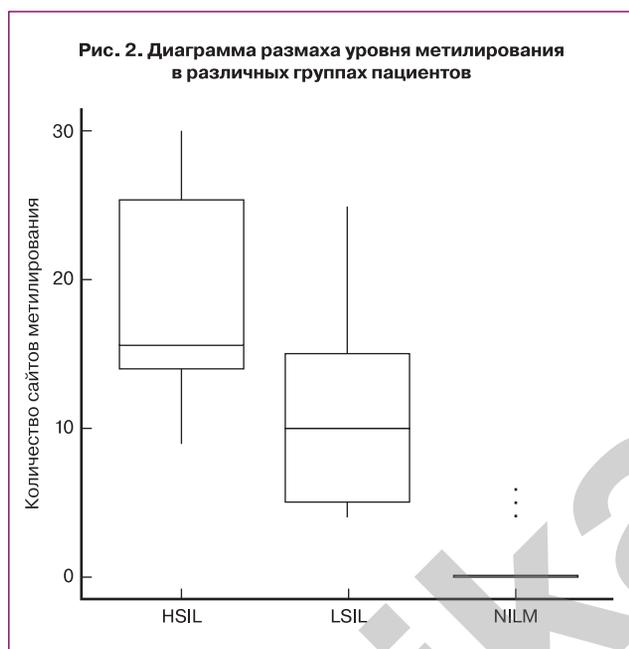




Как видно из представленных данных, в образцах ДНК здоровых пациентов метилирование промоторной области гена *WIFI* обнаружено только у 4 пациентов из 25, при этом средний уровень метилирования составил  $2,3 \pm 5,4\%$ .

Следует отметить, что у всех женщин с подтвержденным диагнозом LSIL и HSIL наблюдалось статистически значимое по сравнению с нормой ( $p < 0,0001$ ), аномальное гиперметилирование промоторных участков гена *WIFI* со средней частотой соответственно  $29,2 \pm 17,2\%$  и  $54,8 \pm 18,7\%$ .

Кроме того, для сравнения уровня метилирования в группах NILM, LSIL и HSIL была построена диаграм-



ма размаха (рис. 2). Достоверность различий определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

Для всех исследованных групп уровень метилирования промоторной области гена *WIFI* статистически значимо отличался (для NILM и LSIL  $p = 1,57 \times 10^{-7}$ , для NILM и HSIL  $p = 1,22 \times 10^{-8}$ , для LSIL и HSIL  $p = 4,36 \times 10^{-3}$ ).

Стоит отметить, что распределение пациентов по количеству сайтов метилирования во всех группах существенно отличалось от нормального (рис. 3). При этом распределения были бимодальными, что может свидетельствовать о наличии нескольких подгрупп (с разной степенью риска прогрессии заболевания) в каждой группе. Для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение дополнительных ретроспективных исследований.

W.F. Van Der Meide и соавт. (2011) показали, что существует выраженная достоверная корреляция между уровнем метилирования промоторной области гена *WIFI* и возникновением CIN ( $p < 0,01$ ) [13, 22].

Другими авторами несколькими годами позже было установлено, что определение частоты метилирования генов *PAX1* и *SOX1* в качестве биомаркера цервикального канцерогенеза позволяет добиться достаточно высокой чувствительности диагностики CIN – 86% [23].

Можно предположить, что изменение экспрессии транскрипционных факторов, вовлеченных в процессы дифференцировки и регуляции стволовых клеток, является одним из ключевых факторов развития злокачественных новообразований в гормон-зависимых тканях репродуктивной системы.

К числу таких белков – транскрипционных факторов, вовлеченных в регуляцию пролиферативных эмбриональных каскадов, относится и фактор *WIFI*. Есть все основания считать, что уровень метилирования кодирующего данный белок гена достоверно коррелирует со стадией прогрессии CIN.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости разработки современных схем комбинированной терапии с использованием препаратов, направленных на деметилирование гена *WIFI* [20]. Так, в многочисленных экспериментальных исследованиях достоверно установлено, что к таким веществам, в частности, относятся флавоноид эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) и индольные соединения: индол-3-карбинол (I3C) и его физиологический метаболит – 3,3'-дииндоллилметан (DIM). Показано, что EGCG способен снижать активность ДНК-метилтрансферазы, что приводит к деметилированию и, таким образом, реактивации генов в опухолевых клетках [24]. Z. Gao и соавт. (2009) установили, что EGCG эффективно деметилирует и реактивирует экспрессию эпигенетически «молчащего» гена *WIFI* [21]. Эти данные могут свидетельствовать об эффективности применения EGCG и I3C в терапии заболеваний, ассоциированных с аномальным гиперметилированием генов, и в частности гена *WIFI*.

## Выводы

1) В норме метилирование промоторной области гена *WIFI* не наблюдается или выражено слабо.

Появление сайтов метилирования данного гена в норме может свидетельствовать о начальных стадиях формирования диспластического процесса в эпителии шейки матки.

2) У женщин с диагнозом LSIL и HSIL наблюдается аномальное гиперметилирование промоторных участков гена *WIFI*. При этом уровень метилирования промоторного участка гена *WIFI* статистически достоверно коррелирует со степенью тяжести CIN.

3) Оценка статуса метилирования гена *WIFI* может рассматриваться как потенциальный диагностический и прогностический маркер в комплексной диагностике CIN различной степени тяжести.

4) Необходима разработка современных схем комбинированной терапии с использованием препаратов, обладающих эпигенетической активностью (ингибиторов ДНК-метилтрансфераз), восстанавливающих активность гена *WIFI*.

## Литература/References

- Zaravinos A., Mamas I.N., Sourvinos G., Spandidos D.A. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int. J. Biol. Markers*. 2009; 24(4): 215-22.
- Коган Е.А., Файзуллина Н.М., Ли Ц., Демур Т.А., Жарков Н.В., Козаченко А.В., Байрамова Г.Р., Чернова В.Ф., Прилепская В.Н. Ранняя диагностика ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки у женщин до 30 лет и старше. *Акушерство и гинекология*. 2015; 9: 62-7. [Kogan E.A., Faizullina N.M., Li Ts., Demura T.A., Zharkov N.V., Kozachenko A.V., Chernova V.F., Bairamova G.R., Prilepskaya V.N. Early diagnosis of HPV-associated disease of the cervix uteri in women aged less than 30 years or older. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2015; (9): 62-7. (in Russian)]
- Blatt A.J., Kennedy R., Luff R.D., Austin R.M., Rabin D.S. Comparison of cervical cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices. *Cancer Cytopathol*. 2015; 123(5): 282-8. doi: 10.1002/cncy.21544.
- Байрамова Г.Р., Файзуллин Л.З., Королькова А.И., Полозников А.А., Киселев В.И. Скрининг рака шейки матки: что нового в мировой практике? *Акушерство и гинекология*. 2016; 7: 17-21. <http://dx.doi.org/10.18565/aig.2016.7.17-21> [Bairamova G.R., Faizullin L.Z., Korolkova A.I., Poloznikov A.A., Kiselev V.I. Cervical cancer screening: What is new in global practice? *Akusherstvo i ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2016; (7): 17-21. (in Russian) <http://dx.doi.org/10.18565/aig.2016.7.17-21>]
- Киселев В.И. Молекулярные механизмы патогенеза гиперпластических и диспластических заболеваний репродуктивной системы и пути их фармакологической коррекции. В кн.: Прилепская В.Н., ред. Патология шейки матки и генитальные инфекции. М.: МЕДпресс-информ; 2008: 53-60. [Kiselev V.I. Molecular mechanisms of pathogenesis of hyperplastic and dysplastic diseases of the reproductive system and ways of their pharmacological correction. In: Prilepskaya V.N., ed. *Cervical pathology and genital infections*. Moscow: MEDpress-inform; 2008: 53-60. (in Russian)]
- Boyer S.N., Wazer D.E., Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*. 1996; 56(20): 4620-4.
- Thomas M., Pim D., Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 1999; 18(53): 7690-700. doi: 10.1038/sj.onc.1202953.
- Uren A., Fallen S., Yuan H., Usubütün A., Küçükali T., Schlegel R. et al. Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression. *Cancer Res*. 2005; 65(14): 6199-206. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0455.
- Curtin J.C., Lorenzi M.V. Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells. *Oncotarget*. 2010; 1(7): 552-66. doi: 10.18632/oncotarget.101016.
- Hsieh J.C., Kodjabachian L., Rebbert M.L., Rattner A., Smallwood P.M., Samos C.H. et al. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*. 1999; 398(6726): 431-6. doi: 10.1038/18899.
- Ai L., Tao Q., Zhong S., Fields C.R., Kim W.-J., Lee M.W. et al. Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2006; 27: 1341-8. doi:10.1093/carcin/bgi379.
- Yee D.S., Tang Y., Li X., Liu Z., Guo Y., Ghaffar S. et al. The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition. *Mol. Cancer*. 2010; 9: 162. doi: 10.1186/1476-4598-9-162.
- Delmas A.L., Riggs B.M., Pardo C.E., Dyer L.M., Darst R.P., Izumchenko E.G. et al. WIF1 is a frequent target for epigenetic silencing in squamous cell carcinoma of the cervix. *Carcinogenesis*. 2011; 32: 1625-33. doi:10.1093/carcin/bgr193.
- Ramachandran I., Thavathiru E., Ramalingam S., Natarajan G., Mills W.K., Benbrook D.M. et al. Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Oncogene*. 2012; 31(22): 2725-37. doi: 10.1038/ncr.2011.455.
- Urakami S., Shiina H., Enokida H., Hirata H., Kawamoto K., Kawakami T. et al. Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin. Cancer Res*. 2006; 12(23): 6989-97. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1194.
- Issa J.P. Cancer prevention: epigenetics steps up to the plate. *Cancer Prev. Res. (Phila)* 2008; 1(4): 219-22. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0029.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med*. 2008; 358(11): 1148-59. doi: 10.1056/NEJMra072067.
- Laird P.W. Cancer epigenetics. *Hum. Mol. Genet*. 2005; 14(Spec No): R65-76. doi: 10.1093/hmg/ddi113.
- Deng Y., Yu B., Cheng Q., Jin J., You H., Ke R. et al. Epigenetic silencing of WIF-1 in hepatocellular carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2010; 136(8): 1161-7. doi: 10.1007/s00432-010-0763-5.
- Gao Z., Xu Z., Hung M.-S., Lin Y.-C., Wang T., Gong M. et al. Promoter demethylation of WIF-1 by epigallocatechin-3-gallate in lung cancer cells. *Anticancer Res*. 2009; 29(6): 2025-30.
- Kumaki Y., Oda M., Okano M. QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic. Acids Res*. 2008; 36: W170-5. doi:10.1093/nar/gkn294.
- Van Der Meide W.F., Snellenberg S., Meijer C.J.L.M., Baalbergen A., Helmerhorst T.J.M., Van Der Sluis W.B. et al. Promoter methylation analysis of WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix. *Gynecol. Oncol*. 2011; 123(1): 116-22. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.06.015.
- Kan Y.-Y., Liou Y.-L., Wang H.-J., Chen C.-Y., Sung L.-C., Chang C.-F. et al. PAX1 Methylation as a Potential Biomarker for Cervical Cancer Screening. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2014; 24: 928-34. doi:10.1097/IGC.000000000000155.
- Kato K., Long N.K., Makita H., Toida M., Yamashita T., Hatakeyama D. et al. Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Br. J. Cancer*. 2008; 99: 647-54. doi:10.1038/sj.bjc.6604521.

Поступила 06.12.2016

Принята в печать 23.12.2016

Received 06.12.2016

Accepted 23.12.2016

**Сведения об авторах:**

*Сухих Геннадий Тихонович*, д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (495) 438-18-66. E-mail: g\_sukhikh@oparina4.ru  
*Ашрафян Лев Андреевич*, д.м.н., заслуженный врач РФ, профессор, руководитель лаборатории комбинированных методов лечения гинекологических заболеваний ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава России. Адрес: 117485, Россия, Москва, Профсоюзная ул., д. 86. Телефон: 8 (985) 740-27-45  
*Байрамова Гюльдана Рауфовна*, д.м.н., зав. по клинической работе научно-поликлинического отделения отделом по клинической работе ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (495) 438-18-66. E-mail: g\_bairamova@oparina4.ru  
*Бабкина Ирина Олеговна*, лаборант-исследователь лаборатории инфекционной иммунологии ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1. Телефон: 8 (495) 287-65-70, доб. 5509. E-mail: iobabkina@gmail.com  
*Чернова Виктория Федоровна*, аспирант поликлинического отделения ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (495) 438-18-66. E-mail: v\_chernova@oparina4.ru  
*Осипьянт Андрей Игоревич*, научный сотрудник лаборатории биохимии и энзимологии ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1. Телефон: 8 (903) 294-74-14. E-mail: osssip@gmail.com  
*Королькова Анна Игоревна*, аспирант I года обучения ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (915) 322-08-79. E-mail: zaikinaai@icloud.com  
*Полозников Андрей Александрович*, к.х.н., зав. лабораторией биохимии и энзимологии ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1. Телефон: 8 (495) 287-65-70, доб. 5509. E-mail: andrey.poloznikov@gmail.com  
*Асфарова Гунай Раисовна*, аспирант I года обучения ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (926) 262-11-13. E-mail: gunyt@mail.ru  
*Муллбаева Светлана Мининхаевна*, зав. лабораторией по сбору и хранению биоматериалов ФГБУ НЦАГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (915) 322-08-79. E-mail: s\_mullabaeva@oparina4.ru  
*Коган Евгения Александровна*, д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Адрес: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2. Телефон: 8 (499) 248-01-81. E-mail: expedition@mma.ru  
*Муызхнек Екатерина Леонидовна*, к.б.н., директор по науке, ЗАО «МираксБиоФарма». Адрес: 121248, Россия, Москва, Кутузовский пр-т, д. 12, стр. 2. Телефон: 8 (495) 721-20-58. E-mail: MuyzhnekEL@ilmixgroup.ru  
*Друх Вадим Михайлович*, к.м.н., руководитель научных проектов Института медико-биологических проблем ФГАОУ ВО РУДН. Адрес: 117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. Телефон: 8 (495) 721-20-58. E-mail: druhvm@gmail.com  
*Киселев Всеволод Иванович*, д.б.н., профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник Научно-исследовательского отдела раннего канцерогенеза, профилактики, диагностики и комплексного лечения онкологических заболеваний женских репродуктивных органов ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава России. Адрес: 117485, Россия, Москва, Профсоюзная ул., д. 86. Телефон: 8 (985) 776-31-16. E-mail: vkis10@mail.ru

**About the authors:**

*Sukhikh Gennady Tikhonovich*, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +74954381866. E-mail: g\_sukhikh@oparina4.ru  
*Ashrafyan Lev Andreevich*, Doctor of Medical Sciences, Honored Doctor of the Russian Federation, Professor, Head of the Laboratory of Combined Methods for the Treatment of Gynecological Diseases of the Russian Research Center of Roentgenology and Radiology, Ministry of Health of Russia. 117485, Russia, Moscow, Profsoyuznaya str. 86. Tel.: +79857402745  
*Bayramova Gyuлдana Raufovna*, doctor of medical sciences, head of the clinical work of the scientific and polyclinic department of the Clinical Department, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +74954381866. E-mail: g\_bairamova@oparina4.ru  
*Babkina Irina Olegovna*: laboratory assistant-researcher of the laboratory of infectious immunology, D. Rogachev Federal Research Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, GSP-7, Samora Mashela str. 1. Tel.: +74952876570, ext. 5509. E-mail: iobabkina@gmail.com  
*Chernova Viktoria Fedorovna*, post-graduate student of the polyclinic department, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +74954381866. E-mail: v\_chernova@oparina4.ru  
*Osipyants Andrey Igorevich*, researcher, Laboratory of Biochemistry and Enzymology, D. Rogachev Federal Research Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, GSP-7, Samora Mashela str. 1. Tel.: +79032947414. E-mail: osssip@gmail.com  
*Korolkova Anna Igorevna*, post-graduate student of the 1 year of training, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +79153220879. E-mail: zaikinaai@icloud.com  
*Poloznikov Andrey Aleksandrovich*, Candidate of Chemical Sciences, Head of the Laboratory of Biochemistry and Enzymology, D. Rogachev Federal Research Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, GSP-7, Samora Mashela str. 1. Tel.: +74952876570, ext. 5509. E-mail: andrey.poloznikov@gmail.com  
*Asfarova Gunay Raisovna*, Post-graduate student of the 1 year of training, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +79262621113. E-mail: gunyt@mail.ru  
*Mullabaeva Svetlana Mininhaevna*, the head of the laboratory for the collection and storage of biomaterials, Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str. 4. Tel.: +79153220879. E-mail: s\_mullabaeva@oparina4.ru  
*Kogan Evgenia Aleksandrovna*, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician A.I. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia. 119991, Russia, Moscow, Trubetskaya str. 8-2. Tel.: +74992480181. E-mail: expedition@mma.ru  
*Mouyzhnek Ekaterina Leonidovna*, Candidate of Biological Sciences, Director for Science, ZAO "MiraxBioFarma". 121248, Russia, Moscow, Kutuzov Ave, 12, p. 2. Tel.: +74957212058. E-mail: MuyzhnekEL@ilmixgroup.ru  
*Druh Vadim Mikhailovich*, Candidate of Medical Sciences, Head of Scientific Projects, Institute of Biomedical Problems, Peoples' Friendship University of Russia. 117198, Russia, Moscow, Miklukho-Maklaya str. 6. Tel.: +74957212058. E-mail: druhvm@gmail.com  
*Kiselev Vsevolod Ivanovich*, Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member. RAS, Chief Scientific Officer of the Research Department of Early Carcinogenesis, Prevention, Diagnosis and Comprehensive Treatment of Oncological Diseases of Female Reproductive Organs, Russian Research Center of Roentgenology and Radiology, Ministry of Health of Russia. 117485, Russia, Moscow, Profsoyuznaya str. 86. Tel.: +79857763116. E-mail: vkis10@mail.ru