

DOI: 10.17650/2222-1468-2022-12-4-61-70



Метилирование опухолеассоциированных генов при плоскоклеточном раке головы и шеи

С. В. Куревлев¹, Л. В. Цховребова¹, А. В. Агаджанян¹, Т. Х. Фатхудинов¹, К. Б. Гордон^{1,2}, М. М. Азова¹

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

²Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249036 Обнинск, ул. Королева, 4

Контакты: Лейла Вахтанговна Цховребова tskhovrebova-lv@rudn.ru

Введение. Злокачественные новообразования органов головы и шеи представляют собой гетерогенную группу злокачественных опухолей различной этиологии, молекулярные механизмы возникновения которых остаются не до конца изученными.

Цель исследования – изучение статуса метилирования промоторной области ряда опухолеассоциированных генов (*RASSF1A*, *RASSF2*, *RASSF5*, *CDO1*, *MEST* и *WIF1*) у больных плоскоклеточным раком головы и шеи.

Материалы и методы. Количественная оценка уровня метилирования генов проводилась с использованием метода бисульфитной конверсии и метил-чувствительного анализа кривых плавления с высоким разрешением. В исследование были включены 25 пациентов (21 мужчина и 4 женщины) с плоскоклеточным раком головы и шеи.

Результаты. Выявлены достоверные различия в уровнях метилирования ДНК в генах *CDO1* и *WIF1* в опухолевых и нормальных тканях во всех группах и подгруппах пациентов (рак гортани и другие виды рака, ороговевающий и неороговевающий плоскоклеточный рак головы и шеи, первичная и рецидивная опухоли, курящие и некурящие). Также установлено, что уровень метилирования в гене *CDO1* в опухолевой ткани выше в подгруппах пациентов с опухолями Т4 и Т3 по сравнению с пациентами с опухолями Т2.

Заключение. Повышение уровня метилирования генов *CDO1* и *WIF1* и, следовательно, изменение их экспрессии входят в число молекулярных механизмов развития плоскоклеточного рака головы и шеи и могут быть рассмотрены в качестве прогностических и диагностических маркеров данной патологии.

Ключевые слова: метилирование ДНК, опухолеассоциированные гены, плоскоклеточный рак головы и шеи

Для цитирования: Куревлев С. В., Цховребова Л. В., Агаджанян А. В. и др. Метилирование опухолеассоциированных генов при плоскоклеточном раке головы и шеи. Опухоли головы и шеи 2022;12(4):61–70. DOI: 10.17650/2222-1468-2022-12-4-61-70

Methylation of the tumor associated genes in head and neck squamous cell carcinoma

S. V. Kurevlev¹, L. V. Tskhovrebova¹, A. V. Aghajanyan¹, T. Kh. Fatkhudinov¹, K. B. Gordon^{1,2}, M. M. Azova¹

¹Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

²A. F. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia; 4 Koroleva St., Obninsk 249036, Russia

Contacts: Leila Vakhtangovna Tskhovrebova tskhovrebova-lv@rudn.ru

Introduction. Head and neck cancer is a heterogenous group of malignant tumors of different etiologies, molecular mechanisms of which are still insufficiently studied.

Aim. Investigation of DNA methylation status of some tumor associated genes (*RASSF1A*, *RASSF2*, *RASSF5*, *CDO1*, *MEST* and *WIF1*) in patients with head and neck squamous cell carcinoma.

Materials and methods. The DNA methylation level of normal and tumor tissues was analyzed using bisulfite conversion and methylation-sensitive high-resolution melting in 25 patients (21 men and 4 women) diagnosed with neck squamous cell carcinoma.

Results. There were significant differences in levels of DNA methylation between tumor and normal tissues in the *CDO1* and *WIF1* genes in all groups and subgroups of patients (larynx and other cancers, squamous cell carcinoma keratinizing and non-keratinizing, primary and recurrent tumor, smokers and non-smokers). The methylation level in the *CDO1* gene in tumor tissue was significantly increased in the T4 and T3 stage subgroups compared to T2.

Conclusion. The increased level of methylation of the *CDO1* and *WIF1* genes, as well as changes in their expression are among the molecular mechanisms involved in the neck squamous cell carcinoma development. They can be considered as prognostic and diagnostic markers for this pathology.

Keywords: DNA methylation, tumor-associated genes, head and neck squamous cell carcinoma

For citation: Kurevlev S.V., Tskhovrebova L.V., Aghajanyan A.V. et al. Methylation of the tumor associated genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Opukholi golovy i shei* = Head and Neck Tumors 2022;12(4):61–70. (In Russ.). DOI: 10.17650/2222-1468-2022-12-4-61-70

Введение

В настоящее время значительный интерес для диагностики, прогнозирования и профилактики онкологических заболеваний представляет изучение молекулярно-генетических и эпигенетических маркеров. Опухоли головы и шеи (ОГШ) – гетерогенная группа злокачественных новообразований разной этиологии, объединенных анатомическим расположением, общими факторами риска, сходными клинической картиной, принципами лечения и прогнозом. Большинство злокачественных ОГШ представлены плоскоклеточным раком. Аденокарциномы встречаются реже и могут развиваться из эпителия слюнных желез, щитовидной железы и придатков кожи. Неэпителиальные новообразования составляют около 18 % от общего числа опухолей данной локализации.

В настоящее время плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает 6-е место среди наиболее распространенных видов рака в мире. В последние годы отмечается рост заболеваемости данной патологией и связанной с ней смертности [1–3]. Плоскоклеточный рак головы и шеи имеет мультифакториальный характер. Показано, что у курильщиков риск развития заболевания в 10 раз выше, чем у некурящих, а курение совместно с частым употреблением алкоголя увеличивают его более чем в 35 раз [4]. К факторам риска также относят воздействие ультрафиолетового и ионизирующего излучений, различных токсичных соединений, ослабление иммунной системы, диету с низким содержанием витаминов А и В, возраст старше 40 лет, мужской пол, некоторые вирусные инфекции. Кроме того, наличие рака головы и шеи в анамнезе увеличивает риски повторно-го возникновения данной патологии в будущем [5–7].

Несмотря на многочисленные исследования, механизмы, лежащие в основе ПРГШ, до сих пор остаются не до конца выясненными. В последние годы появилось много данных, подчеркивающих важную роль эпигенетических факторов в онкогенезе, к числу которых относятся метилирование ДНК, модификация гистонов, ремоделирование хроматина и воздействие некодирующих РНК [8, 9]. Следует отметить, что метилирование ДНК является наиболее изученным эпигенетическим механизмом при ПРГШ. При этом наблюдаются изменения в паттернах метилирования как генома в целом, так и в отдельных генах, что может быть использовано для выявления новых биомаркеров

заболевания [10]. Для исследования можно применять различный биоматериал, включая жидкие биоптаты, что представляет собой неинвазивную альтернативу для раннего выявления рака.

В ряде работ показано гиперметилирование промоторных областей различных генов в образцах слюны, сыворотки и плазмы крови пациентов с ПРГШ [11–13]. Так, С. Zhou исследовал 27 aberrantly метилированных генов с измененной экспрессией и продемонстрировал, что метилирование *FAM135B* является благоприятным независимым прогностическим маркером повышения общей выживаемости пациентов с ПРГШ [14]. В настоящее время гиперметилирование промоторов генов-супрессоров опухолей является наиболее охарактеризованным эпигенетическим событием в канцерогенезе. В работе R. Noorlag и соавт. описан ряд генов, изменение метилирования которых способствует развитию ПРГШ [15].

Цель исследования – изучение статуса метилирования ДНК некоторых опухолеассоциированных генов (*RASSF1A*, *RASSF2*, *RASSF5*, *CDO1*, *MEST*, *WIF1*) у пациентов с ПРГШ. Эти гены играют большую роль в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза, и их нарушение может привести к развитию злокачественных новообразований (табл. 1).

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 25 пациентов (21 мужчина и 4 женщины) с ПРГШ, проходившие обследование и лечение в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба и Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена (Москва) – филиалах Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России.

Период наблюдения за пациентами варьировал от 3 до 9 мес. Характеристика больных представлена в табл. 2. Средний возраст мужчин составил 58 лет (30–72 года), женщин – 68 лет (59–81 год). В 20 случаях диагностирован первичный ПРГШ, в 5 – рецидив опухоли после терапии. Плоскоклеточный рак горла был обнаружен у 14 пациентов, верхнечелюстной пазухи – у 7, языка – у 3. У 1 больного наблюдался плоскоклеточный рак ротовой полости. Неороговевающий тип опухоли выявлен в 9 случаях, ороговевающий – в 16. Девять из 25 пациентов были курильщиками.

Таблица 1. Характеристика исследованных генов

Table 1. Characteristic of studied genes

Ген Gene	Локализация (хромосома) Location (chromosome)	Транскрипт Transcript	MIM	Тип гена Gene type	Функция гена Gene function	Сигнальный путь гена Gene pathway
Cysteine dioxygenase type 1 (<i>CDO1, CDO-1</i>)	5q22.3	NM_001323565.2	603943	Белок-кодирующий Protein-coding	Опухолевый супрессор Tumor suppressor	Ингибитор сигнального пути Wnt Inhibits Wnt signaling
Mesoderm specific transcript (<i>MEST, PEG1</i>)	7q32.2	NM_001253900.1	601029	Белок-кодирующий Protein-coding	Опухолеассоциированный Cancer associated	Неизвестно Unclear
Ras association domain family member 1 (<i>RASSF1, 123F2, RDA32, NORE2A, RASSF1A, REH3P21</i>)	3p21.31	NM_001206957.2	605082	Белок-кодирующий Protein-coding	Опухолевый супрессор Tumor suppressor	Проапоптотический путь Pro-apoptotic signaling
Ras association domain family member 2 (<i>RASSF2, RAPL, Maxp1, NORE1, NORE1A, NORE1B, RASSF3</i>)	20p13	NM_182663.4	609492	Белок-кодирующий Protein-coding	Опухолеассоциированный Cancer associated	Проапоптотический путь Pro-apoptotic signaling
Ras association domain family member 5 (<i>RASSF5, RAPL, Maxp1, NORE1, NORE1A, NORE1B, RASSF3</i>)	1q32.1	NM_182663.4	607020	Белок-кодирующий Protein-coding	Опухолевый супрессор Tumor suppressor	Проапоптотический путь Pro-apoptotic signaling
WNT inhibitory factor 1 (<i>WIF1, WIF-1</i>)	12q14.3	NM_007191.5	605186	Белок-кодирующий Protein-coding	Опухолевый супрессор Tumor suppressor	Ингибитор сигнального пути Wnt Inhibits Wnt signaling

Биоматериал. Образцы опухолевой и нормальной тканей от каждого пациента были получены во время хирургического вмешательства и хранились при температуре -20°C .

Выделение ДНК. Выделение ДНК из биоматериала осуществляли на микроколонках (K-SORB, ООО «Синтол», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ метилирования ДНК. Бисульфитную конверсию ДНК проводили с использованием набора EZ DNA Methylation-Lightning kit (Zymo Research, Irvine, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Оценка метилирования промоторных областей исследуемых генов была выполнена методом метил-чувствительного анализа кривых плавления с высоким разрешением (methylation-sensitive high resolution melting, MS-HRM) на базе амплификатора CFX 96 (BioRad, США).

Праймеры для реакции были подобраны с помощью программы Primer Blast (табл. 3). Для проведения двухступенчатой полимеразной цепной реакции использовалась готовая реакционная смесь компании ООО «Синтол» (Россия). Программа амплификации: 95°C –

5 мин; (95°C – 15 с, 60°C – 30 с, 72°C – 45 с) \times 30 циклов; (95°C – 15 с, 50°C – 30 с, 72°C – 45 с) \times 25 циклов [16]. Далее к полученным продуктам был добавлен интеркалирующий краситель EVAGreen (ООО «Синтол», Россия). Каждый образец имел две повторности. Условия для построения кривой плавления: 95°C – 30 с; 60°C – 10 мин, анализ плавления в диапазоне 60 – 90°C с шагом $0,2^{\circ}\text{C}$. Метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением проводили с использованием программного обеспечения Precision Melt Analysis Software (BioRad, США). Количественный уровень метилирования оценивался по флуоресценции, выраженной в относительных единицах флуоресценции (RFU) [17].

Статистический анализ. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программного обеспечения R-language. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

Результаты анализа уровня метилирования промоторных областей исследуемых генов в общей группе пациентов представлены на рис. 1. В нормальных

Таблица 2. Характеристики пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи
Table 2. Characteristics of patients

Пациент Patient	Пол Gender	Возраст, лет Age, years	Код по МКБ-10 ICD-10 code	Локализация опухоли Tumor origin	Стадия по классификации TNM TNM classification	Тип опухоли Type of lesion	Морфологическая форма опухоли Histological glade	Курение Smoker
1	М M	62	C32.0	Гортань Larynx	T3N0M0	Первичная Primary	Ороговевающий ПР SCC keratinizing	Нет No
2	М M	50	C02.1	Язык Tongue	T1N0M0	Первичная Primary	Ороговевающий ПР SCC keratinizing	Нет No
3	М M	72	C32.8	Гортань Larynx	T4aN0M0	Первичная Primary	Ороговевающий ПР SCC keratinizing	Да Yes
4	М M	57	C32.8	Гортань Larynx	T3N1M0	Первичная Primary	Ороговевающий ПР SCC keratinizing	Да Yes
5	М M	49	C32.0	Гортань Larynx	T3N1M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Да Yes
6	М M	61	C32.9	Гортань Larynx	T3N0M0	Первичная Primary	Ороговевающий ПР SCC keratinizing	Нет No
7	М M	64	C32.0	Гортань Larynx	T3N0M0	Первичная Primary	Ороговевающий ПР SCC keratinizing	Да Yes
8	М M	52	C02.1	Язык Tongue	T3N1M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No
9	М M	30	C03.0	Верхнечелюстная пазуха Maxillary sinus	T4aN0M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No
10	М M	62	C32.0	Гортань Larynx	T3N0M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No
11	М M	58	C32.8	Гортань Larynx	T4aN0M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No
12	Ж F	59	C02.1	Язык Tongue	T2N0M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No
13	М M	41	C31.0	Верхнечелюстная пазуха Maxillary sinus	T4aN0M0	Рецидив Recurrent	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No
14	Ж F	81	C32.8	Гортань Larynx	T4aN2bM0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No

Окончание табл. 2
The end of table 2

Пациент Patient	Пол Gender	Возраст, лет Age, years	Код по МКБ-10 ICD-10 code	Локализация опухоли Tumor origin	Стадия по классификации TNM TNM classification	Тип опухоли Type of lesion	Морфологическая форма опухоли Histological glade	Курение Smoker
15	М M	69	C32.0	Гортань Larynx	T2N0M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Да Yes
16	М M	67	C31.0	Верхнечелюстная пазуха Maxillary sinus	T4aN0M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No
17	М M	64	C32.8	Гортань Larynx	T3N0M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Да Yes
18	М M	61	C31.8	Верхнечелюстная пазуха Maxillary sinus	T4aN0M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No
19	М M	70	C32.8	Гортань Larynx	T2N0M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No
20	М M	70	C32.8	Гортань Larynx	T4aN2aM0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Да Yes
21	Ж F	66	C04.1	Ротовая полость Oral cavity	T3N1M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Нет No
22	М M	64	C31.8	Верхнечелюстная пазуха Maxillary sinus	T3N0M0	Рецидив Recurrent	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Да Yes
23	Ж F	66	C02.1	Верхнечелюстная пазуха Maxillary sinus	T3N0M0	Рецидив Recurrent	Ороговевающий ПР SCC keratinizing	Нет No
23	М M	69	C32.8	Гортань Larynx	T3N0M0	Первичная Primary	Неороговевающий ПР SCC non-keratinizing	Да Yes
25	Ж F	37	C03.0	Верхнечелюстная пазуха Maxillary sinus	T4N0M0	Первичная Primary	Ороговевающий ПР SCC keratinizing	Нет No

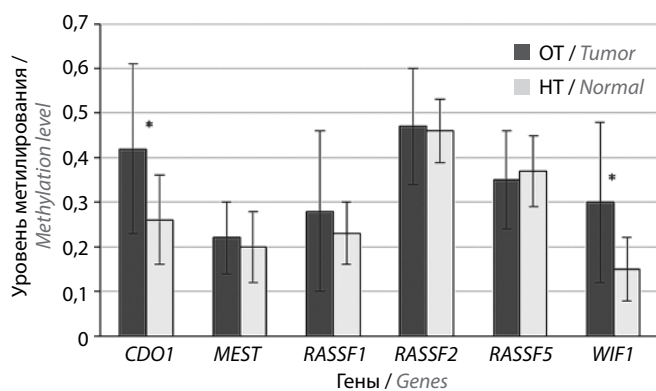
Примечание. М – мужской пол, Ж – женский пол; ПР – плоскоклеточный рак; МКБ-10 – Международная классификация болезней 10-го пересмотра; TNM – Tumor, Nodus and Metastasis.

Note. M – male, F – female; SCC – squamous cell carcinoma; ICD-10 – International Classification of Diseases of the 10th revision; TNM – Tumor, Nodus and Metastasis.

Таблица 3. Праймеры, использованные для оценки метилирования генов

Table 3. Primer sequences used for methylation specific polymerase chain reaction

Ген Gene	Нуклеотидные последовательности прямых праймеров (5' → 3') Forward primer sequence (5' → 3')	Нуклеотидные последовательности обратных праймеров (5' → 3') Reverse primer sequence (5' → 3')	Размер продукта, п. н. Product size (bp)
<i>CDO1</i>	GGGAGGATGA ATTTTATAGATTTG	TAAACTTCCATA ATAACCTACACCTC	396
<i>MEST</i>	ATTAGGGGA AGGGTTGAAATA	CAAATAAACCTT ACCTACAAAACCTC	416
<i>RASSF1</i>	GGGTAAAGGTAT TTTAAAGATAAGAA	ACAACATAAT CCCTAACC	389
<i>RASSF2</i>	GGTGAGGGGAGTTA GTTTATTTTTT	CAACCCCTTAACCT TTTTCAAC	313
<i>RASSF5</i>	AAAGAGGTAGGGT TGAAGGTTTAG	CCTACCTTCACACT TACTAATACAAC	823
<i>WIF1</i>	GAGTGATGTT TTAGGGGT	CCTCAACCA AAACTATTCC	464

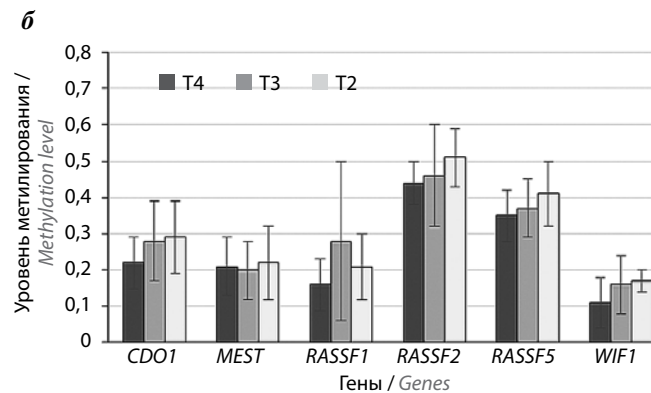
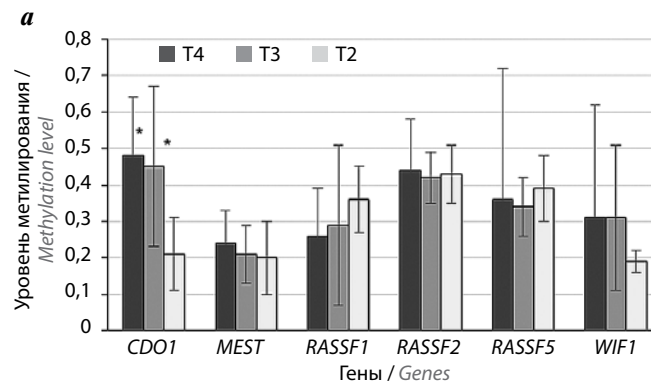


*Достоверные различия между уровнями метилирования генов в опухолевой (OT) и нормальной (HT) тканях ($p < 0,05$) / *Significant differences between tumor and normal tissue ($p < 0,05$)

Рис. 1. Средний уровень метилирования исследуемых генов в опухолевой и нормальной тканях всех пациентов

Fig. 1. Average level of DNA methylation of the studied genes in tumor and normal tissues in all patients

и опухолевых тканях обнаружены достоверные различия уровней метилирования генов *CDO1* ($0,40 \pm 0,19$ и $0,26 \pm 0,10$ соответственно) и *WIF1* ($0,30 \pm 0,18$ и $0,15 \pm 0,07$ соответственно). Для более детального анализа пациенты были разделены на подгруппы. Полученные данные представлены в табл. 4. У больных раком гортани, плоскоклеточным ороговевающим раком, рецидивирующей опухолью и у курильщиков выявлены значимые различия уровней метилирования гена *CDO1* в опухолевой и нормальной тканях. Во всех исследованных подгруппах, за исключением пациентов с плоскоклеточным неороговевающим раком, уровень метилирования гена *WIF1* был достоверно выше в опухолевых тканях. В общей группе больных и в подгруп-



*Достоверное различие между уровнем метилирования опухолевой и нормальной ткани ($p < 0,05$) / *Significant differences between tumor and normal tissues ($p < 0,05$)

Рис. 2. Средний уровень метилирования ДНК в опухолевой (а) и нормальной (б) тканях пациентов с различными стадиями по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM)

Fig. 2. Average level of DNA methylation in tumor (a) and normal (b) tissues in patients with different Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) classification

пах достоверных различий в уровнях метилирования генов *MEST*, *RASSF1*, *RASSF2* и *RASSF5* не наблюдалось.

Таблица 4. Средний уровень метилирования ДНК в опухолевой и нормальной тканях пациентов разных подгрупп, $M \pm m$ (разброс)
Table 4. Average level of DNA methylation in tumor and normal tissue of patients of different subgroups

Ген Gene	Образцы ДНК DNA samples	Рак гортани ($n = 14$) Larynx cancer ($n = 14$)	Рак другой локализации ($n = 11$) Other cancers ($n = 11$)	Ороговевающий ПР ($n = 9$) SCC keratinizing ($n = 9$)	Неороговевающий ПР ($n = 16$) SCC non-keratinizing ($n = 16$)	Первичный рак ($n = 20$) Primary cancer ($n = 20$)	Рецидив рака ($n = 5$) Cancer recurrence ($n = 5$)	Курящие ($n = 9$) Smokers ($n = 9$)	Некурящие ($n = 16$) Non-smokers ($n = 16$)
CDOI	ОТ T	0,39 ± 0,18 ^a (0,06÷0,76)	0,46 ± 0,21 (0,07÷0,71)	0,44 ± 0,17 ^a (0,17÷0,66)	0,42 ± 0,22 (0,06÷0,76)	0,40 ± 0,19 (0,06÷0,71)	0,53 ± 0,22 ^a (0,26÷0,76)	0,51 ± 0,19 ^{a,b} (0,19÷0,76)	0,38 ± 0,19 (0,06÷0,71)
	НТ N	0,22 ± 0,08 (0,11÷0,37)	0,30 ± 0,10 (0,14÷0,53)	0,26 ± 0,08 (0,11÷0,38)	0,26 ± 0,11 (0,14÷0,53)	0,25 ± 0,10 (0,11÷0,53)	0,28 ± 0,08 (0,17÷0,38)	0,25 ± 0,08 (0,11÷0,37)	0,26 ± 0,10 (0,14÷0,53)
MEST	ОТ T	0,19 ± 0,07 (0,09÷0,31)	0,24 ± 0,08 (0,12÷0,34)	0,18 ± 0,08 (0,10÷0,31)	0,23 ± 0,07 (0,09÷0,34)	0,21 ± 0,08 (0,09÷0,34)	0,24 ± 0,06 (0,15÷0,30)	0,19 ± 0,07 (0,10÷0,30)	0,23 ± 0,08 (0,09÷0,34)
	НТ N	0,18 ± 0,08 (0,07÷0,28)	0,23 ± 0,08 (0,02÷0,31)	0,20 ± 0,08 (0,07÷0,30)	0,21 ± 0,08 (0,02÷0,31)	0,20 ± 0,08 (0,02÷0,31)	0,22 ± 0,06 (0,13÷0,29)	0,17 ± 0,07 (0,07÷0,27)	0,22 ± 0,08 (0,02÷0,31)
RASSF1	ОТ T	0,26 ± 0,20 (0÷0,58)	0,30 ± 0,15 (0,13÷0,59)	0,27 ± 0,23 (0,04÷0,59)	0,29 ± 0,16 (0÷0,54)	0,26 ± 0,18 (0÷0,58)	0,37 ± 0,18 (0,23÷0,59)	0,25 ± 0,22 (0÷0,58)	0,27 ± 0,16 (0,03÷0,59)
	НТ N	0,21 ± 0,07 (0,07÷0,33)	0,31 ± 0,17 (0,10÷0,63)	0,20 ± 0,18 (0,07÷0,33)	0,24 ± 0,17 (0,08÷0,63)	0,20 ± 0,17 (0,07÷0,33)	0,28 ± 0,14 (0,12÷0,51)	0,24 ± 0,21 (0,07÷0,51)	0,23 ± 0,15 (0,10÷0,63)
RASSF2	ОТ T	0,39 ± 0,16 (0÷0,56)	0,47 ± 0,06 (0,36÷0,56)	0,44 ± 0,05 (0,34÷0,49)	0,42 ± 0,16 (0÷0,56)	0,41 ± 0,14 (0÷0,56)	0,49 ± 0,04 (0,47÷0,56)	0,44 ± 0,04 (0,39÷0,49)	0,42 ± 0,16 (0÷0,56)
	НТ N	0,44 ± 0,06 (0,34 ± 0,55)	0,48 ± 0,08 (0,32÷0,57)	0,45 ± 0,06 (0,38÷0,57)	0,46 ± 0,08 (0,32÷0,57)	0,45 ± 0,07 (0,32÷0,57)	0,49 ± 0,07 (0,49÷0,57)	0,44 ± 0,07 (0,34÷0,55)	0,47 ± 0,07 (0,32÷0,57)
RASSF5	ОТ T	0,31 ± 0,13 (0÷0,46)	0,40 ± 0,05 (0,29÷0,45)	0,34 ± 0,07 (0,22÷0,45)	0,36 ± 0,13 (0÷0,46)	0,33 ± 0,12 (0÷0,45)	0,42 ± 0,03 (0,39÷0,46)	0,33 ± 0,09 (0,16÷0,43)	0,36 ± 0,12 (0÷0,46)
	НТ N	0,35 ± 0,17 (0,23÷0,47)	0,39 ± 0,08 (0,23÷0,47)	0,35 ± 0,07 (0,28÷0,46)	0,39 ± 0,08 (0,23÷0,47)	0,36 ± 0,08 (0,23÷0,47)	0,43 ± 0,04 (0,36÷0,46)	0,32 ± 0,08 (0,23÷0,46)	0,38 ± 0,07 (0,23÷0,47)
WIF1	ОТ T	0,26 ± 0,18 ^a (0,07÷0,58)	0,34 ± 0,17 ^a (0,09÷0,56)	0,41 ± 0,19 ^{a,b} (0,08÷0,58)	0,23 ± 0,14 (0,07÷0,56)	0,29 ± 0,18 ^a (0,07÷0,58)	0,32 ± 0,20 ^a (0,09÷0,56)	0,35 ± 0,12 ^a (0,08÷0,58)	0,29 ± 0,17 ^a (0,07÷0,58)
	НТ N	0,14 ± 0,05 (0,04÷0,22)	0,16 ± 0,10 (0÷0,27)	0,15 ± 0,09 (0,01÷0,27)	0,14 ± 0,07 (0÷0,26)	0,14 ± 0,08 (0÷0,27)	0,18 ± 0,07 (0,08÷0,26)	0,14 ± 0,07 (0,04÷0,26)	0,15 ± 0,08 (0÷0,27)

^a Достоверные различия между опухолевой и нормальной тканями ($p < 0,05$). ^b Достоверные различия между подгруппами пациентов ($p < 0,05$).

Примечание. ОТ — опухолевая ткань; НТ — нормальная ткань; ПР — плоскоклеточный рак.

^a Significant differences between tumor and normal tissues ($p < 0.05$). ^b Significant differences between tumor and normal tissues in subgroups ($p < 0.05$).

Note. T — tumor, N — normal; SCC — squamous cell carcinoma.

При сравнении подгрупп в нормальной ткани различий не обнаружено, в то время как в опухолевой ткани курящих пациентов метилирование промоторной области гена *CDO1* было значимо выше, чем у некурящих, а метилирование гена *WIF1* оказалось выше у больных с ороговевающим плоскоклеточным раком по сравнению с пациентами с неороговевающим плоскоклеточным раком.

Средний уровень метилирования ДНК в опухолевых и нормальных тканях у пациентов, разделенных на подгруппы в зависимости от стадий заболевания по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM), представлен на рис. 2. Опухоль стадии T4 выявлена у 9 больных, T3 – у 12, T2 – у 3. У 1 пациента было заболевание стадии T1N0M0; уровни метилирования в генах *CDO1*, *MEST*, *RASSF1*, *RASSF2*, *RASSF5* и *WIF1* в опухолевой ткани составили 0,36; 0,13; 0,13; 0,39; 0,41 и 0,40 соответственно, в нормальной ткани – 0,29; 0,23; 0,24; 0,51; 0,41 и 0,17 соответственно. Уровень метилирования ДНК гена *CDO1* в опухолевой ткани был достоверно выше в подгруппах пациентов с опухолью T4 и T3 ($0,48 \pm 0,16$ и $0,45 \pm 0,22$ соответственно) по сравнению с опухолью T2 ($0,21 \pm 0,13$). По уровням метилирования остальных генов в анализируемых подгруппах значимых различий выявлено не было.

Обсуждение

Согласно данным литературы последнего десятилетия, наряду с мутациями не меньшее значение в процессе канцерогенеза имеют эпигенетические нарушения в клетках опухолевых тканей при различных видах онкопатологии. Эпигенетические изменения могут быть определены на ранних стадиях заболевания и использованы для ранней диагностики опухолей и прогноза онкологических заболеваний. Метилирование ДНК обратимо за счет фармакологического ингибирования ДНК-метилтрансферазы и может быть молекулярной мишенью для терапии рака. Полученные нами результаты по генам *CDO1*, *WIF-1*, *RASSF1a*, *RASSF2*, *RASSF5* и *MEST* вносят вклад в изучение особенностей эпигенетического профиля опухолевых тканей при ПРГШ.

Мутации в генах, кодирующих белки в пути Wnt (Wingless / Int1), редки при раке головы и шеи, в связи с чем этот путь не считается значимым для данной патологии [18]. Однако недавние исследования показывают, что гиперактивация пути Wnt может быть результатом другого механизма, который основан на aberrантном гиперметилировании негативных регуляторов. Во многих работах продемонстрировано повышение уровня метилирования промотора и, соответственно, подавление гена *CDO1* в различных опухолевых клетках [19, 20]. Метилирование промоторной области гена *CDO1* достоверно коррелирует с прогрессированием опухоли при первичном раке молочной железы и может быть использовано в качестве важного про-

гностического показателя [21]. Также оно ассоциировано с неблагоприятным прогнозом для пациентов с раком предстательной железы [22]. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, поскольку уровень метилирования промотора гена *CDO1* в опухолевой ткани достоверно выше, чем в нормальной ткани, как в общей группе пациентов с ПРГШ, так и в различных подгруппах. Более того, выявлены значимые различия по данному показателю между курильщиками и некурящими.

Гиперметилирование промоторной области гена *WIF-1* (ингибирующий фактор Wnt-1) часто встречается при немелкоклеточном раке легкого, хотя возраст, пол и статус курения пациентов не коррелируют со статусом метилирования [23]. Показано, что нарушение регуляции передачи сигналов Wnt может также являться одной из причин развития рака головы и шеи. Метилирование гена *WIF-1*, выступающего одним из антагонистов этого пути, часто связывают с развитием данной патологии [24]. Сообщалось, что промотор гена метилирован у 18 % пациентов с плоскоклеточной карциномой полости рта [25] и у 35 % – с карциномой языка [26]. Мы выявили достоверные различия между средними уровнями метилирования промотора *WIF-1* в опухолевых и нормальных тканях как в общей группе пациентов, так и в подгруппах. Следует отметить, что по данному показателю наблюдались значительные различия в опухолевой ткани в подгруппах пациентов с ороговевающим и неороговевающим ПРГШ.

Семейство генов *RASSF* кодирует белки, содержащие домены, ассоциированные с Ras и подавляющие их активность. Недавние исследования показывают, что, помимо мутаций в генах *RAS*, значительную роль в развитии опухолей может играть инактивация негативных эффекторов Ras [27]. Обнаружено, что передача сигналов Ras часто активируется при плоскоклеточной карциноме полости рта, при этом наблюдается подавление *RASSF2* метилированием [28]. Кроме того, было показано, что экспрессия гена подавляется и при других видах онкопатологии, включая колоректальный рак, рак желудка, легких и носоглотки [29]. *RASSF1a* был идентифицирован как опухолевый супрессор, способный индуцировать апоптоз в опухолевых клетках. Метилирование его промоторной области является установленным эпигенетическим событием при многих типах рака, включая рак головы и шеи [30, 31].

Ген *MEST* относится к категории импринтированных генов [32]. Была выявлена ассоциация потери импринтинга этого гена с некоторыми типами рака. Также обнаружено, что уровни метилирования гена *MEST* значительно выше в большинстве опухолей первичной гепатоцеллюлярной карциномы по сравнению с неопухолевыми тканевыми аналогами [33, 34].

Несмотря на результаты ряда работ, указывающие на ассоциацию метилирования генов *RASSF* и *MEST*

с онкологическими заболеваниями, в нашем исследовании мы не обнаружили существенных различий в средних уровнях метилирования между нормальными и опухолевыми тканями для генов *MEST*, *RASSF1*, *RASSF2*, *RASSF5*. Возможно, следует повторить исследование в выборке большего объема и / или стратифицировать пациентов по иным критериям.

Заключение

На основании полученных данных можно заключить, что повышение уровня метилирования генов *CDO1* и *WIFI* и, следовательно, изменение их экспрессии выступают молекулярными механизмами, способствующими развитию ПРГШ, и могут быть рассмотрены в качестве прогностических и диагностических маркеров данной патологии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Demokan S., Dalay N. Role of DNA methylation in head and neck cancer. *Clin Epigenet* 2011;2:123–50. DOI: 10.1007/s13148-011-0045-3
- Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с. Malignant neoplasms in Russia in 2016 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. M.: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute, Branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of Russia, 2018. 250 p. (In Russ.).
- Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022;72:7. DOI: 10.3322/caac.21708
- Marcu L.G., Yeoh E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135(10):1303–14. DOI: 10.1007/s00432-009-0648-7
- World Health Organization. World health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9241562072>.
- World Health Organization. WHO global report on trends in tobacco smoking 2000–2025, 2015. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/who-global-report-on-trends-in-prevalence-of-tobacco-use-2000-2025-third-edition>.
- Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Available at: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bubbles?type=0&sexes=1_2&mode=population&group_populations=0&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=39&populations=903_904_905_908_909_935&pc=cat_ca20v1.5_ca23v-1.5&group_cancers=1.
- Gupta Sh., Kumar P., Maini J. et al. Epigenetic biomarkers in head and neck cancer. *J Cancer Genetics Biomark* 2018. DOI: 10.14302/issn.2572-3030.jcgb-18-2428. Available at: https://www.researchgate.net/publication/329389358_Epigenetic_Biomarkers_in_Head_and_Neck_Cancer.
- Castilho R.M., Squarize C.H., Almeida L.O. Epigenetic modifications and head and neck cancer: Implications for tumor progression and resistance to therapy. *Int J Mol Sci* 2017;18(7):1506. DOI: 10.3390/ijms18071506
- Ovchinnikov D.A., Cooper M.A., Pandit P. et al. Tumor-suppressor gene promoter hypermethylation in saliva of head and neck cancer patients. *Transl Oncol* 2012;5(5):321–6. DOI: 10.1593/tlo.12232
- Liyanage C., Wathupola A., Muraleetharan S. et al. Promoter hypermethylation of tumorsuppressor genes *p16INK4a*, *RASSF1A*, *TIMP3*, and *PCQAP/MED15* in salivary DNA as a quadruple biomarker panel for early detection of oral and oropharyngeal cancers. *Biomolecules* 2019;9(4):148. DOI: 10.3390/biom9040148
- Righini C.A., de Fraipont F., Timsit J.F. 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. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2027
- Arantes L.M.R.B., De Carvalho A.C., Melendez M.E., Carvalho A.L. Serum, plasma and saliva biomarkers for head and neck cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2018;18(1):85–112. DOI: 10.1080/14737159.2017.1404906
- Zhou C., Ye M., Ni S. et al. DNA methylation biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma. *Epigenetics* 2018;13(4):398–409. DOI: 10.1080/15592294.2018.1465790
- Noorlag R., van Kempen P.M.W., Moelans C.B. et al. Promoter hypermethylation using 24-gene array in early head and neck cancer better outcome in oral than in oropharyngeal cancer. *Epigenetics* 2014;9(9):1220–7. DOI: 10.4161/epi.29785
- Красный А.М., Куревлев С.В., Садекова А.А. и др. Профиль метилирования генов первичной опухоли у больных люминальным HER2-негативным раком молочной железы при метастазировании в регионарные лимфатические узлы. *Биомедицинская химия* 2021;67(1):88–94. Krasny A.M., Kurevlev S.V., Sadekova A.A. et al. The profile of methylation of primary tumor genes in patients with luminal HER2-negative breast cancer with metastasis to regional lymph nodes. *Biomedicinskaya himiya = Biomedical Chemistry* 2021;67(1):88–94. (In Russ.).
- Słomka M., Sobalska-Kwapis M., Wachulec M. et al. High resolution melting (HRM) for high-throughput genotyping – limitations and caveats in practical case studies. *Int J Mol Sci* 2017;18(11):2316. DOI: 10.3390/ijms18112316
- Yeh K.T., Chang J.G., Lin T.H. et al. Correlation between protein expression and epigenetic and mutation changes of Wnt pathway-related genes in oral cancer. *Int J Oncol* 2003;23(4):1001–7. DOI: 10.3892/ijo.23.4.1001
- Brait M., Ling Sh., J. Nagpal K. et al. Cysteine dioxygenase 1 is a tumor suppressor gene silenced by promoter methylation in multiple human cancers. *PLoS One* 2012;7(9):e44951. DOI: 10.1371/journal.pone.0044951
- Sjblom T., Jones S., Wood L.D. et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006;314(5797):268–74. DOI: 10.1126/science.1133427
- Minatani N., Waraya M., Yamashita K. et al. Prognostic significance of promoter DNA hypermethylation of cysteine dioxygenase 1 (CDO1) gene in primary breast cancer. *PLoS One* 2016;11(1):e0144862. DOI: 10.1371/journal.pone.0144862
- Meller S., Zipfel L., Gevensleben H. et al. CDO1 promoter methylation is associated with gene silencing and is a prognostic biomarker for biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients. *Epigenetics* 2016;11(12):871–80. DOI: 10.1080/15592294.2016.1241931
- Yang T.-M., Leu S.-W., Li J.-M. et al. WIF-1 promoter region hypermethylation as an adjuvant diagnostic marker for non-small cell lung cancer-related malignant pleural effusions. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135(7):919–24. DOI: 10.1007/s00432-008-0527-7
- Paluszczak J., Sarbak J., Kostrzewska-Poczekaj M. et al. The negative regulators of Wnt pathway – DACH1, DKK1, and WIF1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1

- methylation predicts shorter survival. *Tumor Biol* 2015;36(4):2855–61. DOI: 10.1007/s13277-014-2913
25. Pannone G.B.P., Santoro A., Franco R. et al. WNT pathway in oral cancer: epigenetic inactivation of WNT-inhibitors. *Oncol Rep* 2010;24(4):1035–41. DOI: 10.3892/or.2010.1035
 26. Supic G., Kozomara R., Jovic N. et al. Hypermethylation of RUNX3 but not WIF1 gene and its association with stage and nodal status of tongue cancers. *Oral Dis* 2011;17(8):794–800. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2011.01838
 27. Takashi I., Minoru T., Suzuki H. et al. Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2008;99(5):958–66. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00769
 28. 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.
 29. Zhang Z., Van Sun D., Do N. et al. Inactivation of RASSF2A by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2007;120:32–8. DOI: 10.1002/ijc.22185
 30. Lo K.W., Kwong J., Hui A.B. et al. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2001;61(10):3877–81. DOI: 10.1080/00313020500058623
 31. Strzelczyk J.K., Krakowczyk Ł., Owczarek A.J. Methylation status of *SFRP1*, *SFRP2*, *RASSF1A*, *RARβ* and *DAPK1* genes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Arc Oral Biol* 2019;98:265–72. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2018.12.001
 32. Kerjean A., Dupont J.M., Vasseur C. et al. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2000 ;9(14):2183–7. DOI: 10.1093/hmg/9.14.2183
 33. Boot A., Oosting J., de Miranda N. et al. Imprinted survival genes preclude loss of heterozygosity of chromosome 7 in cancer cells. *J Pathol* 2016;240(1):72–83. DOI: 10.1002/path.4756
 34. Dohi O., Yasui K., Gen Y. et al. Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2013;42(2):411–8. DOI: 10.3892/ijo.2012.1724

Вклад авторов

С.В. Куревлев: молекулярно-генетические исследования, разработка дизайна исследования;
Л.В. Цховребова: обработка материала, написание текста статьи, анализ публикаций по теме статьи;
А.В. Агаджанян: написание текста статьи, анализ публикаций по теме статьи, статистическая обработка полученных данных;
Т.Х. Фатхудинов: научное консультирование;
К.Б. Гордон: забор биоматериала; анализ клинических данных;
М.М. Азова: научное руководство исследованием.

Authors' contribution

S.V. Kurevlev: molecular genetic research, development of research design;
L.V. Tskhovrebova: processing of the material, article writing, analysis of publications on the topic of the article;
A.V. Aghajanyan: writing the text of the article, analysis of publications on the topic of the article, statistical processing of the data obtained;
T.H. Fatkhutdinov: scientific consulting;
K.B. Gordon: biomaterial sampling; analysis of clinical data;
M.M. Azova: scientific management of research.

ORCID авторов / ORCID of authors

Л.В. Цховребова / L.V. Tskhovrebova: <https://orcid.org/0000-0003-4685-5007>
А.В. Агаджанян / A.V. Aghajanyan: <https://orcid.org/0000-0003-0129-1156>
К.Б. Гордон / K.B. Gordon: <https://orcid.org/0000-0002-3146-5615>
Т.Х. Фатхудинов / T.H. Fatkhutdinov: <https://orcid.org/0000-0002-6498-5764>
М.М. Азова / M.M. Azova: <https://orcid.org/0000-0002-7290-1196>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение от 7.10.2021 № 075-15-2021-1356; внутренний номер соглашения 15.СИН.21.0011; идентификатор RF 0951.61321X0012).

Funding. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia (Agreement No. 075-15-2021-1356 dated 7.10.2021; internal agreement number 15.SIN.21.0011; identifier RF 0951.61321X0012).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (протокол № 634 от 17.11.2021). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 634 of 17.11.2021).

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 07.11.2022. **Принята к публикации:** 10.12.2022.

Article submitted: 07.11.2022. **Accepted for publication:** 10.12.2022.