

раннього призначення блокаторів РААС для профілактики виникнення дихальної недостатності. Перспективним виявляється подальше дослідження небажаних побічних ефектів блокаторів РААС та їх потенційного взаємозв'язку із функціональними поліморфізмами з метою індивідуалізації фармакотерапії.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Ruggenti P.* The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy / P. Ruggenti, P. Cravedi, G. Remuzzi // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2010. – N 6. – P. 319–330.

2. *Angiotensinogen M235T polymorphism and the risk of myocardial infarction and stroke among hypertensive patients on ACE-inhibitors or β -blockers* / H. Schelleman, O. H. Klungel, J. C. Wit-

teman // *European Journal of Human Genetics.* – 2007. – N 15. – P. 478–484.

3. *Cheng J.* Association between the M235T polymorphism of the AGT gene and cytokines in patients with hypertension / J. Cheng, A. Wang, J. Wan // *Exp Ther Med.* – 2012. – N 3 (3). – P. 509–512.

4. *AGT gene polymorphisms (M235T, T174M) are associated with coronary heart disease in a Chinese population* / X. Li, Q. Li, X. Wang [et al.] // *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* – 2013. – N 14 (4). – P. 354–359.

5. *Сіренко Ю. М.* Цільовий рівень АТ при цукровому діабеті 2 типу: оцінка наукових доказів / Ю. М. Сіренко // Міжнародний ендокринологічний журнал. – 2012. – № 6 (46). – С. 10–14.

6. *Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8)* / P. A. James, S. Oparil, B. L. Carter [et al.] // *JAMA.* – 2014. – N 311 (5). – P. 507–520.

7. *ESC/ESH Guidelines for management of arterial hypertension* / G. Mancia, R. Fagard, K. Narkiewicz [et al.] // *European heart journal.* – 2013. – N 34. – P. 2159–2219.

8. *KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease* // *Kidney International Supplement.* – 2013. – N 3. – P. 1–150.

9. *Blood pressure and interactions between the angiotensin polymorphism AGT M235T and sodium intake: a cross-sectional population study* / T. Norat, R. Bowman, R. Luben [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2008. – N 88 (2). – P. 392–397.

10. *Androulakis E.* Candidate gene polymorphisms and their association with preclinical organ damage in untreated hypertension / E. Androulakis // *JACC.* – 2013. – Vol. 61 (10). – P. 1470.

Надійшла 29.09.2015

Рецензент д-р мед. наук,
проф. Ю. І. Бажора

УДК 616.12-008.331.1+616.61-008.64:615.036

Т. Ю. Понятовська

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЕНАЛАПРИЛУ ЗАЛЕЖНО ВІД ПОЛІМОРФІЗМУ M235T АНГІОТЕНЗИНОГЕНУ У ГІПЕРТЕНЗИВНИХ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ

Метою дослідження було оцінити антигіпертензивний та нефропротективний ефекти еналаприлу залежно від типу мононуклеотидного поліморфізму M235T гена *AGT* у гіпертензивних пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу.

Субоптимальний антигіпертензивний та антипротеїнуричний ефекти еналаприлу в категорії Т-монозиготних пацієнтів за поліморфізмом M235T *AGT* зумовлює необхідність раннього призначення комбінованої антигіпертензивної терапії як з метою нефропротекції, так і задля зниження загального ризику серцево-судинних ускладнень.

Ключові слова: артеріальна гіпертензія, профілактика діабетичної нефропатії, еналаприл, M235T поліморфізм ангіотензиногену.

UDC 616.12-008.331.1+616.61-008.64:615.036

T. Yu. Ponyatovska

ENALAPRIL EFFICACY EVALUATION AND AGT M235T POLYMORPHISM IN HYPERTENSIVE PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

It was a research purpose to estimate antihypertensive and nephroprotective effects of enalapril depending on the type of the mononucleotide polymorphism of M235T gene *AGT* at hypertensive patients with saccharine diabetes of a 2 type.

Suboptimum antihypertensive and antiproteinuric the effects of enalapril in the category of the T-monozygotic patients after the M235T *AGT* polymorphism are predetermined by the necessity of the early setting of the combined antihypertensive therapy both with the purpose of nephroprotection and for the sake of decline of general risk of cardiovascular complications.

Key words: hypertension, diabetic nephropathy prevention, enalapril, AGT M235T polymorphism.

УДК 618.19-006.575.1

В. Н. Запорожан, д-р мед. наук, проф.,

В. Г. Дубинина, д-р мед. наук, проф.,

В. В. Бубнов, канд. мед. наук,

В. Г. Маричереда, д-р мед. наук, проф.,

Н. Н. Рожковская, д-р мед. наук, проф.,

Н. А. Быкова

АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНА *WIF1* У ЖЕНЩИН С ГИПЕРПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ПРОЦЕССАМИ И РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ

Одесский национальный медицинский университет

Метилирование ДНК может служить диагностическим и прогностическим маркером для клинического применения [1; 2]. Ген *WIF1*, взятый нами для

оценки возможности использования его как диагностического маркера риска развития рака эндометрия, относится к группе генов-супрессоров Wnt-пути [5].

Изучение метилирования гена *WIF1* в оценке прогноза выживаемости при раке цервикального канала показало наличие в опухоли метилированной ДНК

промотора гена *WIFI* и было связано с плохой выживаемостью пациентов при раке шейки матки [3]. Также в работе Н. Suzuki (2008) было выявлено метилирование промотора гена *WIFI* в 45 % случаев у больных раком молочной железы [1]. В перечисленных выше работах авторов метилирование изучалось методом метилспецифической полициклической реакции (ПЦР), которая не дает возможности определять количественное содержание метилированной по CG-сайтам ДНК в образце опухоли, а оценивает метилирование по принципу «есть» или «нет». Нами же было проведено количественное определение содержания метилированной ДНК в первом экзоне гена *WIFI* с использованием технологии комбинированного бисульфит рестрикционного анализа (COBRA).

Материалы и методы исследования

Изучение метилирования первого экзона гена *WIFI* проводилось на биопсийном материале 12 образцов аденокарциномы эндометрия, 11 образцов ткани от больных с доброкачественными гиперпролиферативными процессами эндометрия и 6 образцов нормальной ткани эндометрия. Геномная ДНК была выделена с помощью наборов GeneJET DNA Purification Kit (Thermo scientific). Бисульфитная обработка геномной ДНК была выполнена согласно протоколу к набору EpiTect Bisulfite kit (Qiagen). После бисульфитной обработки выделенной ДНК была проведена амплификация методом TouchDown ПЦР с Hot-StartTag DNA Polymerase с использованием набора (Qiagen) и 5 пкмоль специфических праймеров: 95 °C — 15 мин, 10 циклов 95 °C — 30 с, 65 °C — 1 мин, со снижением температуры на 1 °C на цикл, 42 цикла 95 °C — 30 с, 60 °C — 30 с, 72 °C — 45 с; 72 °C — 10 мин.

Дизайн праймеров осуществляли с помощью программы

MethylPrimer Express v 1.0. Количественный анализ метилирования гена проводили с помощью метода COBRA. Для выполнения анализа к амплифицированной ДНК гена в объеме 15 мкл добавляли 2,5 мкл 10-кратного буфера и 1 мкл BStuI рестриктазы и инкубировали 1 ч при 60 °C. После инкубации проводили электрофорез в 2 % агарозном геле, затем окрашивали гель этидиум бромидом и сканировали с использованием системы визуализации VercaDoc 4000 (Bio-RAD). Анализировали электрофореграммы с помощью программы Quantitative One (BIORAD).

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение эпигенетических механизмов регуляции эмбрионального развития, роста и старения и нарушение этих механизмов, приводящее к возникновению различных заболеваний, в том числе онкологических, имеет большое значение в понимании механизмов онкогенеза. Одним из быстрых и количественных методов для анализа абберантного метилирования ДНК является COBRA. Суть метода состоит в проведении рестрикционного анализа амплифицированного участка гена по сайтам *CGCG*. Если ДНК метилирована, то происходит нарезание ферментом рестрикции BStuI амплифицированной цепи ДНК гена между *CGCG* последовательностью с образованием нескольких фрагментов в зависимости от количества *CGCG*-сайтов гена и степени их метилирования. В гене *WIFI* в первом экзоне находятся два *CGCG*-сайта или четыре *CG*-последовательности, которые могут быть метилированы. Поэтому для гена *WIFI* (после рестрикции и электрофореза в агарозном геле) характерно образование двух полос амплифицированного продукта с молекулярным весом 90 и 170 п. н. Последующий электрофорез,

сканирование геля и программная обработка данных с Quantitative One позволяют выявить количество метилированной и неметилированной ДНК в образце.

Во всех образцах ткани рака эндометрия не выявлено метилированной ДНК гена *WIFI*. Две полосы продуктов рестрикции амплифицированной ДНК видны только в положительном контроле (100 % метилированная ДНК, Qiagen). В образцах ткани с гиперплазией эндометрия и нормальной ткани эндометрия, взятых для анализа, также не было выявлено наличия метилированной ДНК. Метилирование промотора и первого экзона гена *WIFI*, по данным литературы, было обнаружено при различных формах рака, таких как рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки [2; 4]. Следует отметить, что отсутствие метилированной ДНК первого экзона гена *WIFI* в образцах ткани рака эндометрия и нормальной ткани эндометрия не свидетельствует о том, что ДНК вообще не метилирована. Данный анализ показывает отсутствие метилирования в двух *CGCG*-сайтах первого экзона гена (или в четырех *CG*-последовательностях), которые были взяты нами для изучения и которые, по данным литературы, были метилированы при раке молочной железы и раке шейки матки [2; 6].

Таким образом, в образцах тканей рака эндометрия, гиперпластических процессов и нормальной ткани эндометрия при анализе методом COBRA не выявлено наличия метилированной ДНК этого гена, относящего к ингибиторам Wnt сигнального каскада. Отсутствие метилированной ДНК в первом экзоне гена *WIFI* в указанных сайтах, которое было выявлено при других формах рака, возможно, указывает на то, что развитие рака эндометрия не связано с метилированием этих сайтов в гене *WIFI*, являющим-

ся супрессором Wnt сигнального пути.

Выводы

1. В результате проведенных исследований показано отсутствие метилированной ДНК в первом экзоне гена *WIF1* во всех изученных образцах ткани, включая рак эндометрия, гиперпластические процессы эндометрия и нормальную ткань эндометрия.

2. Полученные данные позволяют предположить, что метилирование первого экзона гена *WIF1* не является патогенетическим механизмом гипер-

пластических процессов и рака эндометрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Frequent* epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer / H. Suzuki, M. Touyta, H. Carrawa [et al.] // *Br. J. Cancer*. – Mar. 2008. – Vol. 25, N 98 (6). – P. 1147–1156.

2. *Quantitative* DNA methylation analysis of candidate genes in cervical cancer / E. M. Siegel, B. M. Riggs, A. L. Delmas [et al.] // *PLoS One*. – Mar., 2015. – Vol. 31, N 10 (3). – P. 113–121.

3. *Epigenetic* inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (*WIF1*) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis / J. Veeck, C. Geisler, E. Noetzel [et al.] // *Carcinogenesis*. – May, 2008. – Vol. 31. – P. 991–998.

4. *Verschuur-Maes A. H.* Epigenetic progression of columnar cell lesions of the breast to invasive breast cancer / A. H. Verschuur-Maes, P. C. de Bruin, P. J. van Diest // *Breast Cancer Res Treat.* – Dec., 2012. – Vol. 136 (3). – P. 705–715.

5. *Promoter* methylation of *WIF1* in patients with ovarian clear cell adenocarcinoma / C. M. Ho, H. C. Lai, S. H. Huang [et al.] // *Eur J Clin Invest.* – Apr., 2010. – Vol. 40 (4). – P. 310–318.

6. *Prognostic* relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (*WIF1*) and Dickkopf-3 (*DKK3*) promoter methylation in human breast cancer / P. J. Veeck, P. J. Wild, T. Fuchs [et al.] // *BMC Cancer*. – 2009. – Vol. 9. – P. 217–224.

Поступила 15.10.2015

Рецензент д-р мед. наук,
проф. И. З. Гладчук

УДК 618.19-006.575.1

В. Н. Запорожан, В. Г. Дубинина, В. В. Бубнов, В. Г. Маричереда, Н. Н. Рожковская, Н. А. Быкова

АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНА *WIF1* У ЖЕНЩИН С ГИПЕРПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ПРОЦЕССАМИ И РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ

Эпигенетические изменения играют важную роль в опухолевой трансформации эпителиальной ткани эндометрия. Одной из составляющих эпигенетической трансформации клеток может быть метилирование промотора и первого экзона генов-супрессоров опухолевого роста.

Целью данного исследования был сравнительный анализ состояния метилирования гена *WIF1* у женщин с гиперпролиферативными процессами и раком эндометрия. Анализ метилирования был проведен методом COBRA, который, в отличие от метилспецифической ПЦР, дает возможность выявлять количество метилированной ДНК в изучаемом образце ткани. Установлено отсутствие метилированной ДНК гена *WIF1* в образцах ткани с гиперпластическими процессами, аденокарциномой и нормальной ткани эндометрия.

Ключевые слова: метилирование ДНК, ген *WIF1*, CG-сайт, рак эндометрия.

UDC 618.19-006.575.1

V. N. Zaporozhan, V. G. Dubinina, V. V. Bubnov, V. G. Marichereda, N. N. Rozhkovskaya, N. A. Bykova

ANALYSIS OF GENE *WIF1* METHYLATION IN WOMEN WITH HYPERPROLIFERATIVE PROCESSES OF ENDOMETRIUM AND ENDOMETRIAL CARCINOMA

Epigenetic changes play important role in tumor transformation of endometrium. One of the pathogenic mechanisms of epigenetic cell transformation may be a methylation of promotor and first exon of gene-suppressors of tumor growth.

The aim of the study was a comparative analysis of gene *WIF1* methylation in women with hyperproliferative processes of endometrium and endometrial carcinoma. Methylation analysis was done by using COBRA method, which could detect the amount of methylated DNA in tissue sample, unlike methylspecific PCR method. It was established the absence of gene *WIF1* methylated DNA as in endometrial hyperplasia, carcinoma and in normal endometrium.

Key words: DNA methylation, gene *WIF1*, CG-site, endometrial carcinoma.