

За 100% принято значение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в интактных эритроцитах (контроль)

Инкубация эритроцитов человека с H_2O_2 в концентрациях от 30 до 1000 мкМ, как показано в таблице 1, приводит к статистически достоверному дозозависимому возрастанию интенсивности флуоресценции FluoZin-3, свидетельствующему об увеличении внутриклеточного пула Zn^{2+} . Так, при воздействии H_2O_2 в концентрации 30 мкМ, интенсивность флуоресценции FluoZin-3 увеличивается в среднем до 10%, при инкубации со 100 мкМ – до 15%, при инкубации с 500 мкМ – на 15–25%, а при воздействии 1000 мкМ – на 30–40%. Полученный эффект зависит также от времени воздействия H_2O_2 – если после 30-минутной инкубации эритроцитов с H_2O_2 внутриклеточный уровень Zn^{2+} увеличивается в среднем до 35%, то после 60 мин – до 70% по отношению к интактным клеткам (таблица 1).

Выводы

Таким образом, показано, что уровень внутриклеточного лабильного пула цинка – это динамическая система, которая изменяется в ответ на внешние стимулы. Использование флуоресцентного красителя FluoZin-3 АМ является чувствительным методом для оценки изменения цитозольного пула цинка в эритроцитах человека, что может иметь большую прогностическую ценность при диагностике патологий, патогенез которых ассоциирован с нарушением метаболизма цинка (напр.: сахарный диабет II типа).

Список литературы:

1. Гармаза Ю.М. Мембранные транспортные системы для поддержания гомеостаза цинка в клетках млекопитающих / Ю.М. Гармаза, К.А. Захарова, Е.И. Слобожанина // *Новости медико-биологических наук.* – 2019. – Т.19, №3. – С. 84-106
2. Гармаза Ю.М. Эссенциальность и токсичность цинка. Биофизические аспекты / Ю.М. Гармаза, Е.И. Слобожанина // *Биофизика.* – 2014. – Т. 59, Вып. 2. – С. 322-337
3. Гармаза Ю.М. Метод оценки изменения внутриклеточного пула цинка в эритроцитах человека с помощью флуоресцентного зонда FluoZin-3 / Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский, Е.И. Слобожанина // *Биохимия и молекулярная биология.* – 2018. – Вып. 2. – С. 51-54
4. Dean K.M. Visualizing metal ions in cells: an overview of analytical techniques, approaches, and probes / K.M. Dean, Y. Qin, A.E. Palmer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1823. – P. 1406-1415
5. Valko M. Metals, toxicity and oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M.T. Cronin // *Curr. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 12. – P. 1161-1208

УДК 577.24

Десятова М.А., Пономарев А.И., Коротков А.В., Макеев О.Г.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАЦИЕНТОВ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Лаборатория технологий клеточной и геной терапии
Институт медицинских клеточных технологий
Екатеринбург, Российская Федерация

Desyatova M.A., Ponomarev A.I., Korotkov A.V., Makeev O.G.
**EPIGENETIC FEATURES OF PATIENTS OF THE DIFFERENT
AGE GROUPS**

Department of medical biology and genetics
Ural State Medical University
Laboratory of cellular therapy and gen- technology
Institute of Medical Cell Technologies
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: mardesyatova@yandex.ru

Аннотация. В данной статье рассматривается эпигенетический профиль в качестве универсального метода оценки ремоделирования хроматина у пациентов разных возрастных групп.

Annotation. In this article, the application principle of the epigenetic markers had been considered and discussed as a universal methodic for assessment of the disruption of the stability of the genetic apparatus in patients of the different age groups.

Ключевые слова: метилирование ДНК, ацетилирование гистонов, стабильность генома, старение.

Key words: methylation of DNA, histones acetylation, genomic stability, ageing.

Введение

В настоящее время известно, что в течение жизни изменяется экспрессия генов, которая регулируется на эпигенетическом уровне. Последний наиболее полно отражают показатели метилирования ДНК и ацетилирования гистонов, которые одновременно являются характерной чертой процесса старения организма и/ или свидетельствуют о наличии той или иной патологии [1-7].

Кроме того показано, что в течение жизни постоянно имеет место ремоделирование хроматина вследствие модификации гистонов, что играет критическую роль в функционировании клеток, их дифференцировке и пролиферации.

Эти наблюдения привели к необходимости оценки эпигенетического профиля для последующей профилактики и мониторинга возраст-обусловленных заболеваний и в перспективе продления жизни человека.

Цель исследования – провести оценку эпигенетического профиля пациентов разных возрастных групп, путем исследования уровней метилирования ДНК и ацетилирования гистонов.

Материалы и методы исследования

Оценка уровня глобального метилирования ДНК

1. Экстракция ДНК

Исследовали образцы ДНК 39 пациентов. Пациенты были распределены на 2 возрастные группы [8]. В качестве контрольной группы были выбраны 9 пациентов молодого возраста (18- 44 лет). Опытная группа состояла 30 пациентов из обоего пола среднего возраста (45–59 лет).

ДНК выделяли из ядросодержащих клеток периферической крови пациентов сорбентным методом.

За счет добавления к образцу лизирующего раствора и протеиназы К производили разрушение клеток и клеточных белков, в том числе нуклеаз. Далее применялась твердофазная очистка на микроцентрифужных колонках: к клеточному лизату добавляли раствор, способствующий связыванию ДНК с сорбентом колонки. При прохождении лизата через мембрану колонки происходила сорбция ДНК. Серия последующих отмывок удаляла посторонние примеси и ингибиторы ПЦР с сорбента. Затем очищенную и сконцентрированную ДНК смывали с мембраны колонки элюирующим раствором. Полученную ДНК переносили в чистые микроцентрифужные пробирки (Eppendorf) и хранили при температуре -83С.

2. Оценка глобального уровня метилирования ДНК

Для оценки уровней глобального метилирования ДНК применялся количественный метод анализа с использованием 96 луночных микропланшетов.

В исследовании применялись специфические антитела, и проводилась количественная колориметрия. В качестве контрольных образцов использовалась тотально метилированная ДНК (FullymethylatedDNA, SigmaAldrich) и отрицательный контроль/ бланк, без ДНК.

Оценка уровня ацетилирования гистонов

Выделение гистоновых белков проводилось с применением смеси тиоцианата гуанидина и фенола в однофазном растворе, который позволяет эффективно растворять белок в процессе клеточного лизиса. Следующим этапом служило добавление 1-бром-3-хлорпропан и центрифугирование, для преципитации белков и последующей изоляции органической фазы, содержащей гистоны.

Для исследования уровня модификации гистонов применялась колориметрическая система оценки. В качестве положительного контроля использовали активный ядерный экстракт. Ацетилирование субстрата

проводилось за счет применения активной гистонацетилтрансферазы, которая высвобождает свободную форму CoA, что служит коферментом для продуцирования NADH. К продукту реакции добавляли растворимый тетразолиевый краситель.

Для учета сигналов использовался микропланшетный спектрофотометр MultiscanGO, ThermoFisherScientific. Детекция оптической плотности проводилась при OD= 450 нм (метилирование ДНК) и OD =440 нм (ацетилирование гистонов).

Статистический анализ проведен в программе RStudio (Version 1.1.419 – © 2018 RStudio, Inc.). Нормальность распределения значений в группе определяли тестом Шапиро-Уилка. Гомогенность дисперсий оценивалась с помощью теста Бартлетта. Для определения статистически значимых различий количественных параметров двух групп использовался Т-критерий Стьюдента. Для попарного сравнения был использован ранговый критерий Манна-Уитни. Величина параметра $p < 0.05$ принималась как статистически значимая.

Результаты исследования и их обсуждение

Данные исследования представлены на рисунках в виде бокс - плотов.

Показатели метилирования в группе молодого возраста (контрольная группа) составляет 15,97%, а в группе среднего возраста (опытная группа) 47 %.

Полученные данные по исследованию метилома позволяют заключить, что у пациентов средней возрастной группы (опытная группа), уровень метилирования ДНК составила в 2,87 раз выше, чем у пациентов контрольной группы. Выявленные различия статистически достоверны с вероятностью ошибки первого и второго рода (двусторонний критерий Стьюдента) с $p < 2.87 \times 10^{-5}$.

Таким образом, в опытной группе наблюдается гиперметилирование генома, что свидетельствует о низкой транскрипционной активности в данной группе.

Вместе с тем, скорость транскрипции в первую очередь определяется структурной перестройкой хроматина, в ходе которой промотерные области оказываются доступными для РНК- полимеразы.

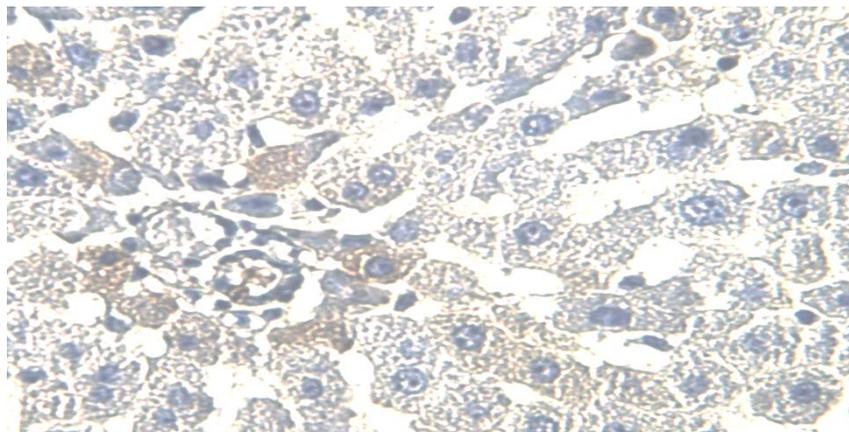
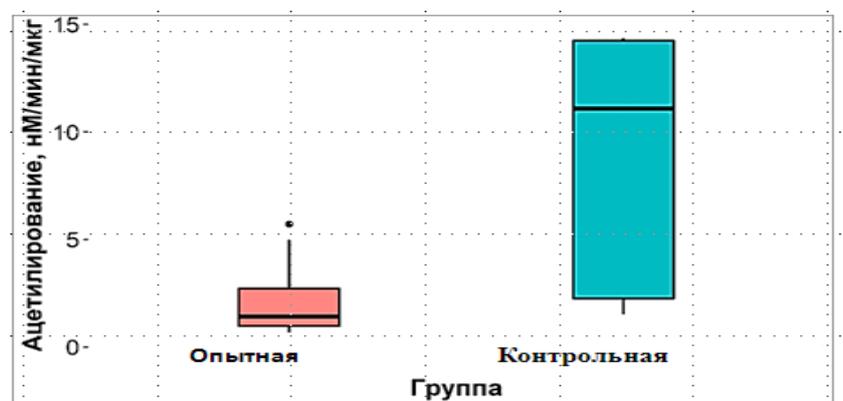


Рис. 1. Процент метилирования ДНК в контрольной и опытной группах пациентов

Нашим исследованием показан значительно меньший уровень ацетилирования гистонов у пациентов опытной группы. В тоже время в контрольной группе отмечается статистически значимый высокий уровень активности гистонацетилтрансферазы (ХАТ) по сравнению с опытной группой, что свидетельствует о возрастании экспрессии генов и их доступности для транскрибирования (рис.2). Возможно, это является свидетельством отсутствия перехода гетерохроматин – эухроматин. Достоверность отличия между опытной и контрольной группами в данном исследовании составляет $p < 0.01935$.



0.01935.

Рис. 2. Уровень активности гистонацетилтрансферазы в контрольной и опытной группах пациентов

Показано, что рост ацетилирования приводит к повышению экспрессии генов. Однако, столь однозначную трактовку в отношении метилирования дать не представляется возможным.

Выводы:

1. Оценка ацетилирования гистонов позволила выявить значимые различия между группами пациентов. Так, показатели пациентов молодого возраста продемонстрировали большую активность гистонацетилтрансферазы и, следовательно, увеличенный уровень транскрипции генов относительно группы пациентов среднего возраста.

2. Для опытной группы характерна стимуляция экспрессии генов. Скорее всего, тотальное метилирование отражает экспрессию промоторов, которые

тормозят транскрипцию. Тотальное гипометилирование ДНК с явлениями гиперметилирования отдельных участков генов в процессе старения организма, обуславливает возможность хромосомной нестабильности и реарранжировки, что согласуется с представлениями других исследователей.

3. В данном исследовании было показано, что паттерны метилирования ДНК и ацетилирования гистонов всего генома могут служить в качестве воспроизводимых эпигенетических биомаркеров темпов биологического старения.

4. При оценке результатов метилирования ДНК и ацетилирования гистонов прослеживается конкордантность. С возрастом наблюдаются меньшие темпы ацетилирования и возрастание уровня метилирования, что по-видимому приводит к снижению транскрибирования генов и соответственно выхода специфических белков.

Список литературы:

1. Brabender J., Usabel H., Danenberg K.D. et al. APC gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. // 2001. *Oncogene* 20, 3528-3532

2. Bremner R., Du D.C., Connolly-Wilson M., Bridge P., Ahmad K., Mostachifi H., Rushlow D. and Gallie B. Deletion of RB exons 24 and 25 causes low-penetrance retinoblastoma. // 1997. *Hum. Genet.* 61, 559-570

3. Burbee D.C., Forgacs E., Zochbauer-Muller S. et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancer and malignant phenotype suppression. // 2001. *Natl. Cancer Inst.* 93, 691-699

4. Cairns P., Polascik T., Eby Y., Tokino K., et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumors. // 2005. *Nat. Genet.*, 210-212

5. Chan A.O., Kim S.G., Bedeir A. et al. CpG island methylation in carcinoid and pancreatic endocrine tumors. // 2003. *Oncogene* 13, 924-934

6. Chano T., Ikegawa S., Kontani K. Identification of RBI CC1, a novel human gene that can induce RBI in various cells. // 2002. *Oncogene* 21, 1295-1298

7. Choy K., Pang C., To K. et al. Impaired expression and promoter hypermethylation of 06-methylguanine-DNA methyltransferase in retinoblastoma tissues. // 2007. *Inv. Ophthalmol. & Visual Sci.* 43, 1344-1349

8. Islene Araujo de Carvalho. World report on ageing and health. / Islene Araujo de Carvalho // 2016. WHO., 53-77

УДК 61:001.89

**Зайцева О.В., Милованкин В.А., Маклакова И.Ю.
ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГСК+ММСК НА
МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ
СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ.**

Кафедра патологической физиологии
Уральский государственный медицинский университет