

## ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе описано влияние свободных радикалов на клетки организма: происходит замедление ангиогенеза и снижение пролиферативного потенциала [5]. Существующие медикаментозные методики лечения пищевода Барретта Урсосаном и Омепразолом [6-7] направлены только на снижение влияния желудочного сока на эпителий пищевода, таким образом, данная терапия лишь увеличивает срок, необходимый для развития рака. Терапия, которая была бы направлена на коррекцию дисплазии, на сегодняшний день не разработана. Хирургическое лечение обычно применяется на более поздних стадиях развития дисплазии. Свободные радикалы плазменной кислоты могли бы оказать значимое влияние на эпителий, подвергшийся морфологическим изменениям: снижение активности пролиферации ткани способствовало бы уменьшению вероятности перехода данной дисплазии в раковую опухоль.

## ВЫВОДЫ

Выявлена тенденция к увеличению площади ткани и клеток кишечного эпителия, подвергшихся апоптозу, что может свидетельствовать о роли плазменной кислоты и окислительного стресса при клеточной гибели.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Масленкина, К. С. Пищевод Барретта и цилиндроклеточная метаплазия как предраковые состояния пищевода / К. С. Масленкина, Л. М. Михалева // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2020. – Т. 10, № 3. – С. 101.
2. Распространенность и принципы ведения пациентов с пищеводом Барретта / В. В. Цуканов, Э. В. Каспаров, А. В. Васютин [и др.] // Фарматека. – 2016. – № 2(315). – С. 28-30.
3. Пищевод Барретта и аденокарцинома пищевода: биомаркеры пролиферации, апоптоза, аутофагии и ангиогенеза (обзор литературы) / Е. С. Петенева, А. Б. Салмина, С. И. Бердников [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т. 19, № 4. – С. 226-234.
4. Власова, В. В. Современные методы исследования апоптоза с применением проточной цитофлуориметрии / В. В. Власова, Е. В. Сайдакова // Вестник Пермского университета. Серия: биология. – 2018. – № 4. – С. 430-442.
5. Окислительный стресс и эндогенная интоксикация у онкологических больных / М. М. Добровольская, Г. Н. Зубрихина, В. Н. Блиндарь, А. В. Сытов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т. 66, № 7. – С. 401-406.
6. Химица, И. Н. Терапия ингибиторами протонной помпы, хирургические методы лечения пациентов с пищеводом Барретта / И. Н. Химица // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2016. – Т. 15, № 2. – С. 234-237.3
7. Жигаев, Г. Ф. Медикаментозная терапия пищевода Барретта / Г. Ф. Жигаев, Е. В. Кривигина, Е. Ю. Лудупова // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2010. – Т. 99, № 8. – С. 12-15.

## Сведения об авторах

Т.А. Данилин\* – студент медико-психолого-фармацевтического факультета, специальность Медицинская кибернетика

Н.А. Малиновская – заведующий кафедрой биохимии, доктор медицинских наук, профессор

## Information about the authors

T.A. Danilin\* – student of the Faculty of Medicine, Psychology and Pharmacy, specialty Medical Cybernetics

N.A. Malinovskaya – Head of the Department of Biochemistry, Doctor of Sciences (Medicine), Professor

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

timarik26@mail.ru

УДК 577.218

## ЭВАЛЮАЦИЯ УРОВНЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КАК КЛЮЧЕВОГО БИОМАРКЕРА В ПАТОГЕНЕЗЕ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Десятова Мария Анатольевна, Макеев Олег Германович

Кафедра медицинской биологии и генетики

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

Лаборатория технологий клеточной и генной терапии

Институт медицинских клеточных технологий

Екатеринбург, Россия

## Аннотация

**Введение.** В данной статье изучается изменение уровня ацетилирования гистоновых белков и метилирования ДНК, для выявления является ли он ключевым биомаркером нарушения барьерной функции у пациентов с ранее установленным фактом наличия атопического дерматита. **Цель исследования** – оценка роли эпигенетических изменений как ключевого звена в развитии атопического дерматита. **Материал и методы.** Проведено сравнительное исследование оценке уровня ацетилирования гистоновых белков и метилирования ДНК у 17

относительно здоровых пациентов и 123 пациентов, страдающих атопическим дерматитом. **Результаты.** Исследование эпигенома предоставляет новое объяснение развитию многофакторных патологических состояний, указывая на существование собственных цуникальных аутогенетических триггеров и свидетельствуют о том, что аномальные эпигенетические модификации вносят вклад в патофизиологию атопического дерматита. **Выводы.** В данном исследовании было показано, что закономерности метилирования ДНК и ацетилирования гистонов всего генома могут служить воспроизводимыми эпигенетическими биомаркерами развития и течения патологии.

**Ключевые слова:** эпигенетика, метилирование, ацетилирование, атопический дерматит

## EVALUATION OF LEVELS OF EPIGENETIC CHANGES AS A KEY BIOMARKER IN THE PATHOGENESIS OF ATOPIC DERMATITIS

Desyatova Mariya Anatolievna, Makeev Oleg Germanovich

Department of Medical Biology and Genetics

Ural State Medical University

Laboratory of Cellular Therapy and Gen-Technology

Institute of Medical Cell Technologies

Yekaterinburg, Russia

### Abstract

**Introduction.** This article examines changes in histone protein acetylation and DNA methylation to determine whether it is a key biomarker of barrier dysfunction in patients with established atopic dermatitis. **The aim of this study** -is an assessment of the role of epigenetic changes as a key chain in the development of atopic dermatitis. **Material and methods.** A comparative study was conducted to assess the level of acetylation of histone proteins and DNA methylation in 17 relatively healthy patients and 123 patients suffering from atopic dermatitis. **Results.** Epigenome research provides a new explanation for the development of multifactorial pathological conditions, pointing to the existence of intrinsic autogenetic triggers and suggesting that aberrant epigenetic modifications contribute to the pathophysiology of atopic dermatitis. **Conclusion.** In this study, it was shown that the patterns of DNA methylation and histone acetylation of the entire genome can serve as reproducible epigenetic biomarkers of the rate of biological aging.

**Keywords:** epigenetics, methylation, acetylation, atopic dermatitis.

### ВВЕДЕНИЕ

Атопический дерматит (АтД) - одно из наиболее распространённых воспалительных заболеваний кожи, которое поражает каждого пятого ребенка и до 9 % взрослых по всему миру. В промышленно развитых странах в течение последних трёх десятилетий распространённость АтД возросла в 3 раза [1, 2, 3].

Данный дерматоз обычно дебютирует на первом году жизни и у части пациентов проходит спонтанно, у некоторых сохраняется во взрослом возрасте и приобретает тяжелое течение. Спонтанная ремиссия наступает у 70% пациентов после года, у остальных ремиссия наблюдается в первые 5 лет жизни. У 40–70% детей, имевших АтД в младенческом возрасте, спонтанная ремиссия наступает до 12 лет. Кроме того, растет число пациентов с поздним дебютом АтД [4].

Особенности клинического течения АтД связаны с взаимодействием неаллельных генов и факторов окружающей среды. Известно более 70 генов, ассоциированных с развитием АтД. Гены, ассоциированные с АтД, можно разделить на следующие группы: гены, влияющие на функцию эпидермального барьера (например, ген филаггрина (FLG)), гены, влияющие на врожденные иммунные механизмы (гены Th2-ответа), гены, влияющие на адаптивный иммунитет, а именно ген тимусного стромального лимфопоэтина TSLPR, гены, кодирующие алармины, продуцируемые кератиноцитами (интерлейкины ИЛ-25 и ИЛ-33), гены, регулирующие метилирование ДНК (ген KIF3A), гены, регулирующие пути поступления витамина D (гены CYP27A1, CYP2R1, VDR) [5,6].

Однако описанные выше генетические ассоциации характерны лишь для некоторых пациентов с АтД, а также наблюдаются у здоровых лиц; кроме того, существуют пациенты с мутацией в других генах, связанных с АтД с неидентифицируемой мутацией. Данная особенность заболевания только у части носителей мутации и проявление его у пациентов без мутации, по-видимому, обусловлена эпигенетической регуляцией экспрессии генов и является одним факторов патогенеза АтД, наряду с патогенными мутациями [7].

Термин «эпигеном» объединяет модификации хроматина, такие как ковалентные модификации гистоновых белков, метилирование ДНК, а также некодирующую РНК-зависимую регуляцию. Эпигеном может влиять на ДНК и гистоновые белки и, следовательно, регулировать экспрессию генов. Следует подчеркнуть, что эпигенетические изменения не модифицируют сам генетический код, т. е. последовательность ДНК. Однако модификации структуры хроматина могут приводить к активации или ингибированию процесса транскрипции определенных генов и, следовательно, процесс трансляции новой мРНК в полипептидную цепь [7].

Идентифицировано большое количество механизмов, с помощью которых эпигенетические изменения могут регулировать экспрессию генов:

- посттрансляционные изменения гистоновых белков, такие как ацетилирование, фосфорилирование, метилирование, убиквитинирование, сумоилирование, влияющие на архитектуру хроматина, а также на его плотность и доступность для ферментных комплексов. Ацетилирование гистонов приводит к тому, что хроматин становится более плотно упакованным, что блокирует транскрипцию, тогда как деацетилирование ослабляет структуру хроматина, активируя транскрипцию гена в этом регионе;

- метилирование, гидроксиметилирование или деметилирование цитозина в последовательностях регуляторных генов (промотор или энхансер), изменяют транскрипцию гена. Метилирование CpG островков промоторов приводит к их инактивации и предотвращению транскрипции. Напротив, деметилирование промоторов запускает процесс транскрипции и индуцирует экспрессию определенного гена;

- некодирующие РНК, включая микро-РНК (миРНК), малые интерферирующие РНК (миРНК), замкнутые малые РНК (циркРНК), длинные некодирующие РНК (лн-РНК) и Рivi-взаимодействующие РНК (пиРНК) также представляют собой важный сигнальный и регуляторный инструмент.

Патогенетическая терапия предполагает подходы по коррекции двух основных механизмов – нарушений эпидермального барьера и иммунного ответа. Хотя самые доступные увлажняющие кремы и местная стероидная терапия обычно используются для лечения АТД, однако их неэффективность и побочные эффекты ограничивают их применение. В свою очередь, применение генноинженерных препаратов также вызывает новые ранее неизвестные осложнения, преодоление которых требует разработки средств, нивелирующих их побочное действие.

**Цель исследования** - оценить эпигенетический профиль пациентов, страдающих АТД, путем изучения уровней метилирования ДНК и ацетилирования гистонов.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

### **Характеристика обследуемых лиц**

В исследовании случай-контроль в период с января 2023 по октябрь 2023 г. приняли участие 123 больных с АТД обоих полов и 12 – контрольная группа. Все обследуемые лица были в возрасте до 17 лет. Для определения степени тяжести для каждого пациента высчитывался индекс SCORAD (<http://www.atopic.ru/phase/index.htm>). Индекс тяжести SCORAD соответствовал среднетяжелой (SCORAD 25–50) и тяжелой (SCORAD  $\geq$  50) степени у 40 и 8 пациентов соответственно. В группу контроля включены соответствующие больным основной группы по возрасту и полу.

### **Условия проведения**

Прием, обследование, отбор для участия в исследовании и забор образцов проводили на базе государственного бюджетного учреждения здравоохранения Свердловской области «Свердловский областной кожно-венерологический диспансер».

### **Описание медицинского вмешательства**

От пациентов был произведен забор венозной крови в асептических условиях утром натощак в объеме до 3 мл (собраны в пробирки с ЭДТА 2мг/мл). Далее полученный материал использовали для проведения исследований. Для оценки концентрации веществ использовали плазму крови, которую получали после отделения клеточного осадка путем

центрифугирования. Для оценки метилирования ДНК и ацетилирования гистонов использовали ядродержащие клетки из осадка на дне пробирки. Комплекс исследований проведен на базе Отдела молекулярных и клеточных технологий Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) УГМУ.

### **Оценка глобального уровня метилирования ДНК**

#### Экстракция ДНК

ДНК выделяли из ядродержащих клеток лимфоцитов периферической крови больных сорбентным методом. При добавлении к образцу лизирующего раствора и протеиназы К клетки и клеточные белки, включая нуклеазы, разрушались. Далее использовали твердофазную очистку на микроцентрифужных колонках: к клеточному лизату добавляли раствор, что способствовало связыванию ДНК с сорбентом колонки. При прохождении лизата через мембрану колонки происходила сорбция ДНК. Серия последующих промывок удалила из сорбента примеси и ингибиторы ПЦР. Затем очищенную и концентрированную ДНК смывали с мембраны колонки с элюирующим раствором. Полученную ДНК переносили в чистые микроцентрифужные пробирки (Eppendorf) и хранили при  $-85^{\circ}\text{C}$ .

Для исследования метилирования применяли ДНК из ядродержащих клеток крови. Выделение лейкоцитарной фракции из крови у пациентов с АтД и здоровых добровольцев проводили с помощью метода седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина. В центрифужную пробирку на 2 мл раствора фиколл-урографина ( $\rho = 1,077$  г/мл) настилали 2 мл разведенной в физиологическом растворе крови без плазмы. Центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об/мин. Слой лейкоцитов осторожно собирали по всей площади сечения пробирки, переносили в чистую, сухую центрифужную пробирку и разводили физиологическим раствором. Содержимое пробирки центрифугировали 10 мин при 4500 об / мин. Концентрированный осадок собирали и переносили в чистую криопробирку и замораживали при  $-85$  С.

Геномную ДНК выделяли при помощи набора QIAamp DNA BloodKit (Qiagen, UK) из ядродержащих клеток крови пациентов в соответствии с инструкцией производителя. Клетки лизировали в растворе, содержащем хаотропную соль, для обеспечения денатурации, а этанол использовали для осаждения ДНК, когда лизат пропускали через кварцевую мембрану. Затем ДНК элюировали раствором Трис-ЭДТА (10 мМТрис- Cl, 0,5 мМ ЭДТА, pH 9,0) и определяли концентрацию ДНК спектрометрически (260 нм) при помощи Ultraspec 1100 pro, Amersham Biosciences. Уравнение ( $\text{OD}_{260} \times 100$  (коэффициент разбавления)  $\times 50$  мкг/мл) использовали для определения концентрации ДНК. Гель-электрофорез проводили на 1% агарозном геле для подтверждения целостности элюированной ДНК.

Метилированную ДНК количественно определяли из геномной ДНК с использованием набора Imprint® Methylated DNA Quantification Kit (MDQ1, Sigma-Aldrich, Ирландия) по протоколу, рекомендованному производителем. Геномную ДНК связывали с лунками, с последующим использованием антител к 5-метилцитозину для связывания метилированной ДНК, а антитела для вторичной детекции применяли для формирования колориметрического изменения, которое количественно определяет уровень метилированной ДНК. Каждый эксперимент проводили в трехкратной повторности. Полученные результаты выражали в процентах к стандарту, входящему в состав набора.

### **Оценка уровня ацетилирования гистонов**

Определение ацетилирования гистонов проводили с использованием набора NAT Activity Colorimetric Assay Kit (Sigma Aldrich). Выделение гистоновых белков из ядер ядродержащих клеток крови 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. Учет результатов проводился спектрофотометрически (Multiscan Go, ThermoFisher Scientific). Полученные результаты выражали в процентах к стандарту, входящему в состав набора.

#### Этическая экспертиза

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (протокол заседания № 6 от 18 июня 2021 г.). При проведении исследования соблюдались «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Лица, участвующие в исследовании, заполняли информированное согласие пациента, законного представителя в отношении несовершеннолетнего, не достигшего возраста, установленного частью 2 статьи 54 ФЗ от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» на проведение исследования, диагностических и лечебных мероприятий. Каждый представитель обследованного получал информационный листок для пациентов, содержащий цель и структуру исследования.

#### Статистический анализ

Статистический анализ данных проведен в программе R-Studio (Version 1.1.419 –2018 R-Studio, 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.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Важными факторами, определяющими развитие заболевания, являются не столько генетические нарушения, но эпигенетические перестройки в ответ на воздействие факторов окружающей среды.

Ацетилирование гистонов и метилирование промоторных участков ДНК представляют собой два разных механизма эпигенетической регуляции.

У пациентов, страдающих АтД, выявлено статистически значимое снижение уровня ацетилирования гистонов (на 30%). Вероятно, что снижение уровня ацетилирования гистонов может лежать в основе механизмов развития АтД (таблица 1).

Таблица 1

Уровень ацетилирования гистонов у здоровых лиц (контроль) и пациентов (опыт), страдающих АтД	
Группа	Процент ацетилирования гистонов
Контроль	33,77+/-1,57
Опыт	25,45+/-1,93*

\*- p<0.05

Кроме того, среди пациентов, страдающих АД, выявлен более высокий (почти в 2 раза) уровень метилирования ДНК (таблица 2).

Таблица 2

Уровень метилирования ДНК у здоровых лиц (контроль) и пациентов (опыт), страдающих АтД	
Группа	Процент метилирования ДНК
Контроль	62,0565+/-4,57
Опыт	99,335+/-3,93*

\*-- p<0.05

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные по исследованию метилома позволяют сделать вывод, что у пациентов, страдающих возрастной патологией, уровень метилирования ДНК в 2,87 раза выше, чем у клинически здоровых пациентов группы «Относительно здоровых».

Таким образом, в группе «Контроль» наблюдается гиперметилирование генома, что означает низкую транскрипционную активность генома в этой группе. Соответственно,

уровень активности промотора в изученных группах неодинаков. В то же время скорость транскрипции в первую очередь определяется структурной перестройкой хроматина. Во время которого промоторные области доступны для РНК-полимеразы.

Наше исследование показало значительное снижение ацетилирования гистонов у пациентов с установленным диагнозом возрастной патологии. В то же время в группе «Относительно здоровые» наблюдался статистически значимо высокий уровень активности гистон-ацетилтрансферазы (ХАТ) по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о повышении активности генома и увеличении уровня транскрипции.

Возможно, это является свидетельством отсутствия рекомбинации гетерохроматин-эухроматин и ограничения транскрипции генов. Снижение транскрипционной активности генов может быть одним из эпигенетических механизмов развития патологического процесса в организме, такого как АтД. Значение параметра в данном исследовании приравнивалось к  $p < 0,01935$  и принималось как статистически значимое.

## **ВЫВОДЫ**

1. Отмечено значительное изменение эпигенетического ландшафта у пациентов с АтД по сравнению с здоровыми лицами, заключающееся в снижении уровня ацетилирования гистонов и повышении уровня метилирования ДНК. С одной стороны, это согласуется с данными литературы и объясняет феномен развития стойкой ремиссии заболевания у большинства детей с возрастом, а с другой - выявленный нами механизм играет ключевую роль в развитии патологии.

2. Расшифровка эпигенетических модификаций может служить пониманию патогенеза заболеваний и разработки персонализированных методов лечения, что требует дальнейших исследований.

## **СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Watson, W. Atopic dermatitis / W. Watson, S. Kapur // *Allergy. Asthma. Clinical Immunology*. – 2021. – Vol. 7. – P. 137-144.
2. Weidinger, S. Atopic dermatitis / S. Weidinger, N. Novak // *Lancet*. – 2018. – Vol. 400., № 10348. – P. 1109–1222.
3. Long-term Western diet intake leads to dysregulated bile acid signaling and dermatitis with Th2 and Th17 pathway features in mice // P. K. Jena, L. Sheng, K. McNeil [et al.] // *Journal of Dermatological Science*. – 2019. – Vol. 95, № 1. – P. 13–20.
4. A short period of breastfeeding in infancy, excessive house cleaning, absence of older sibling, and passive smoking are related to more severe atopic dermatitis in children / M. Fotopoulou, M. Iordanidou, E. Vasileiou [et al.] // *European Journal of Dermatology*. – 2018. – Vol. 28. – P. 56–63.
5. What is the evidence for interactions between filaggrin null mutations and environmental exposures in the aetiology of atopic dermatitis? A systematic review / H. Blakeway, V. Van-de-Velde, V. B. Allen [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2020. – Vol. 183, № 3. – P. 443–551.
6. Kim, S.Y. Atopic dermatitis is associated with active and passive cigarette smoking in adolescents / S. Y. Kim, S. Sim, H. G. Choi // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 11. – P. 127-135.
7. Bishop, K.S. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer / K. S. Bishop, L. R. Ferguson // *Nutrients*. – 2018. – Vol. 7, № 2. – P. 922–947.

## **Сведения об авторах**

М.А. Десятова\* - ассистент кафедры, младший научный сотрудник

О.Г. Макеев – главный научный сотрудник, доктор медицинских наук, профессор

## **Information about the authors**

M.A. Desyatova\* – Department assistant, Junior Researcher

O.G. Makeev – Chief Researcher, Doctor of Sciences (Medicine), Professor

**Автор ответственный за переписку (Corresponding author):**

mardesyatova@yandex.ru

УДК 612.123: 796.07

## **БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ИНДИВИДУАЛЬНОМ МЕДИЦИНСКОМ КОНТРОЛЕ ПЕРЕНОСИМОСТИ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ В МАЛЫХ ГРУППАХ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ ПОДГОТОВКИ**

Ермилова Мария Сергеевна, Мезенцева Анастасия Юрьевна, Каминская Людмила Александровна

Кафедра биохимии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России