

течения микоза при одностороннем процессе. В этом случае целесообразно провести профилактическое лечение ТА симметричного участка.

• Микотический процесс у 32,8% больных ЭКС носил многоочаговый характер в связи с наличием микоза стоп и онихомикоза. С достаточной долей вероятности можно предполагать, что этиологическим фактором в данной ситуации являлся *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*. Таким больным необходимо проводить интенсивную терапию не только крупных складок, но и стоп и ногтей. В противном случае возможны рецидивы заболевания.

• Сертаконазол (Залаин) является эффективным препаратом для лечения ЭКС, в том числе сочетающейся с микозом стоп и онихомикозом, протекающим с минимальным поражением ногтевых пластинок. Сравнение эффективности сертаконазола при неосложненном и осложненном процессе показало значимые различия. Этот факт следует учитывать при оценке эффективности любого ТА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грибанова Т.В. Дерматозы крупных складок: диагностика, клиника, рациональная наружная терапия. *Клиническая дерматология и венерология*. 2010; 1: 40–4.
2. Рукавишников В.М. *Микозы стоп*. М.: Эликс Ком; 2003.
3. Гладько В.В., Соколова Т.В., Тарасенко Г.Н. Как с минимальными затратами организовать лечение и профилактику микозов стоп. *Лечащий врач*. 2006; 5: 86–7.
4. Хисматулина И.М. *Микоз стоп: рационализация терапии*: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2009.
5. Соколова Т.В., Мальярчук А.П., Мальярчук Т.А. Клинико-эпидемиологический мониторинг поверхностных микозов в России и совершенствование терапии. *Русский медицинский журнал*. 2011; 19(21): 1327–32.
6. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. *Грибковые инфекции. Руководство для врачей*. М.: БИНОМ-пресс; 2008.
7. Tasic S., Stojanovic S., Poljacki M. Etiopathogenesis, clinical picture and diagnosis of onychomycoses. *Med. Pregl.* 2001; 54(1–2): 45–51.

8. Бедриковская И.А. *Медико-организационные аспекты профилактики дерматомикозов на муниципальном уровне*: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2009.
9. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Чему учат клинициста исследования эпидемиологии дерматомикозов? *Успехи медицинской микологии. Национальная академия микологии*. М.; 2003; т. 2: 154–5.
10. Халдин А.А., Сергеев Ю.В., Изюмова И.М. Современные представления о паховых дерматофитиях: этиология, эпидемиология, клиника и эффективная терапия. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2005; 5: 103–6.

Поступила 16.04.14

REFERENCES

1. Gribanova T.V. Dermatoses large folds: diagnostics, clinic, rational therapy outside. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya*. 2010; 1: 40–4.
2. Rukavishnikova V.M. *Mycosis of the feet*. Moscow: Elikom; 2003.
3. Glad'ko V.V., Sokolova T.V., Tarasenko G.N. As with minimal cost to organize treatment and prevention mycosis of the feet. *Lechashchiy vrach*. 2006; 5: 86–7.
4. Khismatulina I.M. *Mycosis of the feet: rationalization of therapy*. Dis. Moscow; 2009.
5. Sokolova T.V., Malyarchuk A.P., Malyarchuk T.A. Clinical-epidemiological monitoring of superficial mycoses in Russia and improvement of therapy. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 19(21): 1327–32.
6. Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. *Fungal infections: a Guide for physicians*. Moscow: Binom-press; 2008.
7. Tasic S., Stojanovic S., Poljacki M. Etiopathogenesis, clinical picture and diagnosis of onychomycoses. *Med. Pregl.* 2001; 54(1–2): 45–51.
8. Bedrikovskaya I.A. *Medical and organizational aspects of prevention of ringworm on the municipal level*. Dis. Moscow; 2009.
9. Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. *Teach Clinician for research on the epidemiology of ringworm? Advances in medical Mycology*. National Academy of Mycology. Moscow; 2003. vol. 2: 154–5.
10. Khaldin A.A., Sergeev Yu.V., Izyumova I.M. Modern ideas about the inguinal dermatophytosis: etiology, epidemiology, clinic and effective therapy. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney*. 2005; 5: 103–6.

Received 16.04.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014
УДК 616.5-002-056.43-092

Современные представления об эпигенетических механизмах формирования атопического дерматита

Каюмова Л.Н.¹, Сами Бакер¹, Брускин С.А.², Гаранян Л.Г.¹, Кочергин Н.Г.¹, Олисова О.Ю.¹

¹Кафедра кожных и венерических болезней (зав. — проф. О.Ю. Олисова) лечебного факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва;

²ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

Проанализированы данные работ разных авторов по изучению экспрессии генов при атопическом дерматите, а также приведены результаты собственного исследования в отношении эпигенетического профиля (статуса метилирования ДНК) биоптатов у здоровых лиц и больных атопическим дерматитом до лечения с помощью микроципов Illumina с целью выявления ключевых звеньев патологического процесса. Проводимые исследования позволяют более рационально применять современные терапевтические подходы с учетом результатов индивидуального эпигенетического контроля.

Ключевые слова: метилирование ДНК, эпигенетика, атопический дерматит.

MODERN CONCEPTS OF THE EPIGENETIC MECHANISMS OF ATOPIC DERMATITIS FORMATION

Kayumova L.N.¹, Sami Baker¹, Bruskin S.A.², Garanyan L.G.¹, Kochergin N.G.¹, Olisova O.Yu.¹

¹I.M. Setchenov First Moscow Medical University, 119991, Moscow, Russia; ²N.I. Vavilov Institute of Genetics, 119333, Moscow, Russia

Gene expression in atopic dermatitis was analyzed and the epigenetic profiles (DNA methylation status) of biopsy specimens from normal subjects and patients with atopic dermatitis before therapy were studied by the Illumina microchips in order to detect the key components of the pathological process. The results suggested more rational therapeutic approaches with consideration for the results of individual epigenetic testing.

Key words: DNA methylation, epigenetics, atopic dermatitis

Проблема возникновения различных заболеваний является одной из ключевых в современной медицине. Эпицентром исследований последних десятилетий является «скрытая генетика» – эпигенетика. Известны факты, что именно эпигенетические изменения играют важную роль в развитии многих многофакторных заболеваний, которые наследуются как по материнской, так и по отцовской линии, – сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета 2-го типа, злокачественных опухолей, генетических аномалий, шизофрении, аутизма, депрессии, наркозависимости и др. Кожные патологии, такие как атопический дерматит (АД), экзема, псориаз, витилиго, эритематоз и другие, также по праву можно отнести к группе сложных многофакторных заболеваний, в основе которых лежит генетическая предрасположенность. Полиморфизм генов предрасположенности в сочетании с неблагоприятными внутренними и внешними факторами повышает риск развития заболевания.

АД является хроническим рецидивирующим воспалительным иммуноопосредованным дерматозом. Заболеваемость этим дерматозом в настоящее время принимает почти эпидемический характер. По данным разных авторов, в развитых странах 10–20% детей и 1–3% взрослых страдают этой болезнью [1–3]. В общей сложности заболеваемость увеличилась и в среднем количество больных АД составляет до 10% населения земного шара.

В настоящее время признано, что АД развивается у людей, рожденных с определенным набором генов предрасположенности, которые детерминируют сниженную барьерную функцию кожи и измененный врожденный иммунитет. Следующим этапом патогенеза является воздействие на данный комплекс изменений различных средовых факторов в виде триггеров, аллергенов, инфекций. Реактивность организма обусловлена иммунными механизмами в виде нарушения соотношения Th1/Th2-лимфоцитов в пользу последних, с образованием различных цитокинов и

гиперпродукцией IgE, что является ключевым патогенетическим событием.

Общий прогноз течения АД основывается на закономерностях ослабления и прекращения заболевания к 30 годам. Тем не менее недавние исследования показали, что значительное количество пациентов старше 30 лет до сих пор страдают АД. Заболевание может длиться на протяжении многих лет, оказывая тем самым неблагоприятное воздействие на физическое и психическое развитие, снижая качество жизни больного и его семьи. Так, на сегодняшний день недостаточно информации в отношении прогноза для больных АД [4–6]. Следует также отметить, что клинические особенности заболевания характеризуются выраженным фенотипическим характером.

Для АД в наше время характерны вариabельность клинических проявлений как по сочетанию различных признаков у каждого больного, так и по их выраженности, тенденция к увеличению частоты более тяжелых и торпидных форм заболевания в сочетании с изнурительным зудом и присоединением вторичной инфекции (бактериальной, грибковой или вирусной), иногда приводящих к инвалидизации больного даже в молодом возрасте [7]. Несмотря на имеющиеся успехи в изучении АД, специфическая терапия по-прежнему отсутствует, современные методы лечения не способствуют уменьшению численности больных, а подчас приводит к ятрогенным осложнениям, усугубляющим течение и прогноз болезни. Все это свидетельствует о необходимости постоянного научного поиска новых патогенетических лечебных подходов.

Вопросы участия генетических факторов в развитии той или иной кожной патологии, а также влияния генотипа на тяжесть течения, длительность ремиссии и прогноз остаются наименее изученными. Разработка современной концепции молекулярно-генетических механизмов патогенеза АД позволит определить в будущем новую стратегию и тактику лечения больных, а генетические и эпигенетические исследования смогут стать основой персонализации лечения, позволяющей в полной мере реализовать принцип «лечить не болезнь, а больного».

Последние 50 лет ведутся активные научные исследования в отношении АД на клеточном и молекулярном уровне [8]. Известно, что наследование носит полигенный характер с наличием главного (ведущего) гена, участвующего в реализации наследственной предрасположенности и определяющего поражение кожи, а также дополнительных генов.

Сведения об авторах:

Каюмова Ляля Наилевна, аспирант (avestohka2005@inbox.ru); Бакер Сами, аспирант; Брускин Сергей Александрович, кандидат биол. наук (brouskin@vigg.ru); Гаранян Лусинэ Гарегиновна, клинический ординатор; Кочергин Николай Георгиевич, доктор мед. наук, профессор (nkocha@yandex.ru); Олисова Ольга Юрьевна, доктор мед. наук, профессор.

Corresponding author:

Kochergin Nikolay, MD, PhD, D.Sc., prof. (nkocha@yandex.ru).

Пороговый эффект, приводящий к манифестации болезни, достигается при их аддитивном действии под влиянием неблагоприятных триггеров [9, 10].

АД, как известно, имеет сильный генетический компонент с предполагаемой наследуемостью 60% [11]. Было установлено, что риск возникновения атопии у детей существенно выше, если наследственность отягощена по материнской линии, чем по отцовской. По данным норвежских исследователей, АД развивается у 57% детей, если больна мать, и у 46%, если болен отец [12].

В ходе многочисленных исследований последних лет, посвященных изучению процессов эмбрионального развития и образования раковых опухолей, биологи установили, что человеческий геном изменяется на протяжении жизни человека под влиянием внешних факторов. При этом внешние факторы изменяют поведение генов, не влияя на заключенную в них информацию [13, 14].

Согласно современным представлениям, под эпигенетическими процессами понимают наследуемые, стабильные, но потенциально обратимые изменения экспрессии генов, не связанные с изменениями их нуклеотидной последовательности. Изменения экспрессии генов могут быть оценены, в частности, по характеру метилирования ДНК.

Суть метилирования ДНК заключается в том, что это химическая модификация, катализируемая ДНК-метилтрансферазами, которая добавляет метильную (CH_3) группу к азотистому основанию цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции C5 цитозинового кольца. У человека метилировано около 1% геномной ДНК. 70–80% от всех CpG-динуклеотидов в человеческом геноме метилированы [15]. Иными словами, присоединение или отщепление от ДНК и гистонов определенных химических групп приводит к изменению активности генов, при этом заключенная в них информация сохраняется [16]. Однако богатые CpG участки ДНК, в основном ассоциированные с промоторами генов, называемые CpG-островками, обычно избегают метилирования. Это правило имеет исключения, и некоторые CpG-островки подвергаются метилированию во время развития или в соматических клетках взрослого организма [17, 18]. Метилирование ДНК вне CpG-динуклеотидов встречается в эмбриональных стволовых клетках [19, 20]. Следует отметить, что некоторые гены, экспрессирующиеся в эмбриональном периоде, перестают функционировать к моменту рождения особи.

Эпигенетическая информация – это «скрытый слой» наследственности, который управляет многими процессами, начиная от эволюции стволовых клеток, дифференцировки клеток, заканчивая влиянием на процессы старения организма.

Метилирование ДНК играет ведущую роль в формировании и поддержании эпигенетической изменчивости – естественного наследственного динамического процесса, определяющего степень активности генов.

Профиль метилирования значительно влияет на функциональное состояние генов и стабильно передается в ряду клеточных поколений. В случае изменения эпигенетического статуса наступает дестаби-

лизация генома. Известен тот факт, что вирус, попав в человеческие клетки, может подвергаться метилированию, которое приводит к блокировке транскрипции и дальнейшей элиминации вируса. Возникают предположения, что роль метилирования ДНК как компонента клеточной системы, предназначенной для уничтожения чужой или излишней ДНК (или подавления ее функции), сохраняется, по-видимому, на протяжении всей жизни [21].

Эпигенетические изменения не только являются частью нормального развития или процессов дифференцировки, но и могут быть вызваны факторами окружающей среды. Даже во время беременности могут происходить изменения в характере метилирования ДНК в клетках под влиянием триггеров. Все это может привести к модификационной изменчивости плода, вплоть до перепрограммирования в формирующихся половых клетках плода. А в случае сниженной активности ферментов (например, метилентетрагидрофолатредуктаза – MTHFR, играет ключевую роль в метаболизме фолата и метионина) во время беременности усиливается влияние тератогенных и мутагенных факторов внешней среды. Получается замкнутый «эпигенетический» круг.

Что касается АД, то работы по изучению метилирования ДНК при этом заболевании остаются немногочисленными.

Одно из первых таких исследований проведено в Японии в 2005 г., когда оценивали характер метилирования ДНК у 23 пациентов (9 женщин и 14 мужчин; возраст от 16 до 47 лет) с установленным диагнозом АД. С помощью ПЦР-диагностики в режиме реального времени было впервые продемонстрировано, что у лиц с атопией в сочетании как с высоким уровнем IgE сыворотки крови (группа А), так и с низким (группа В) уровнем ДНК-метилтрансферазы-1 (DNMT-1) мРНК в мононуклеарных клетках периферической крови значительно ниже, чем в группе контроля. Данные наблюдения свидетельствуют о возможной связи подавления DNMT-1 с патогенезом рассматриваемого дерматоза, особенно у больных с повышенным уровнем IgE [22].

Предполагается, что гипометилирование ДНК способствует гиперреактивности Th2-клеток к аллергенам в результате IgE-опосредованной аллергической реакции. Действительно, в некоторых докладах говорится о том, что IL-4-опосредованная продукция IgE В-клетками у пациентов с высоким уровнем сывороточных IgE связана с гипометилированием ДНК в Т-клетках [23–26]. Дальнейшее изучение роли метилирования в патогенезе АД и результаты исследования будут способствовать формированию новых взглядов на терапевтические стратегии при этом заболевании и более глубокому пониманию его этиологии.

В середине 1990-х годов датские специалисты проводили исследования, в ходе которых пришли к выводу, что курение матери во время беременности не влияет на риск развития АД [27, 28]. Но с появлением метилирования этот факт был полностью опровергнут. В 2013 г. на острове Тайвань оценивали влияние курения во время беременности на характер

метиляции ДНК. Данное исследование было задумано в связи с тем, что у большинства детей, страдающих АД, впоследствии возникает бронхиальная астма. В качестве материала использовали пуповинную кровь плода. Анализ метилирования проводили с помощью микрочипов Illumina Infinium 27K. В исследовании принимали участие 14 детей с АД. В пуповинной крови измерен уровень котинина (алкалоид табака). Было обнаружено дифференциальное метилирование в трех генах (*TSLP*, *GSTT1*, *CYB5R3*). Также был исследован ген *TSLP* у 150 детей: статус метилирования 5'-CpG-островков (CGI – цитозингуаниновые динуклеотиды) *TSLP* в значительной степени ассоциирован с пренатальным воздействием дыма в сочетании с АД. Степень метилирования 5'-CGI *TSLP* обратно коррелировала с уровнем экспрессии белка *TSLP*. Таким образом, влияние табачного дыма на риск развития АД у ребенка может быть опосредовано через метилирование ДНК [29].

Известен факт, что высокоаффинный Fcε-рецептор (FcεRI) IgE, находящийся на поверхности клеток, – важная структура в развитии IgE-опосредованных аллергических реакций. FcεRI представляет собой мультимерный иммунный рецептор. Его уровень определяет, какое количество аллергенспецифического IgE и соответственно аллергена сможет связаться с эффекторной клеткой для запуска аллергической реакции. В 2012 г. в Китае оценивали уровень экспрессии FcεRI на моноцитах и дендритных клетках лиц с атопией. Уровни метилирования ДНК моноцитов 10 пациентов с АД и 10 здоровых людей были оценены с помощью набора ДНК метилирования Kit. Бисульфитное секвенирование проводили для определения статуса метилирования промоторной области FCER1G. FcεRI γ мРНК и уровень FcεRI определяли методом ПЦР в режиме реального времени. Использовали также вестерн-блоттинг (аналитический метод, используемый для определения специфичных белков) и проточную цитометрию. Для определения функциональной значимости изменений метилирования в экспрессии FcεRI был применен деметилирующий агент 5-азацитидин. На основании полученных данных сделаны следующие выводы: в моноцитах лиц с атопией отмечается глобальное гипометилирование, а именно в промоторе FCER1G, в сравнении с группой контроля; степень метилирования гена *FCER1G* обратно коррелирует с его экспрессией. Лечение «здоровых» моноцитов 5-азацитидином вызвало снижение уровня метилирования и индукцию транскрипции FcεRI γ и поверхностной экспрессии FcεRI. Деметилирование специфических регуляторных элементов в пределах локуса FCER1G способствует избыточной экспрессии FcεRI на моноцитах у пациентов с АД [30].

Участие CD4⁺T-клеток при АД не подвергается сомнению. Во время поляризации CD4⁺ метилирование ДНК играет важную роль в регуляции транскрипции генов. В 2012 г. в Северной Корее проводили исследование, в ходе которого был проанализирован профиль метилирования ДНК «наивных» CD4⁺T-лимфоцитов (т.е. таких клеток, которые еще не вступали в процесс распознавания чужеродных антигенов) у пациентов с псориазом, АД и

здоровых людей с использованием метода секвенирования на чипах. Если T-клетки псориаза показали явное гипометилирование (более чем 4-кратное) по сравнению со здоровыми в 26 участках генома, а анализ 121 гена промотора на X-хромосоме продемонстрировал резко повышенные уровни метилирования, то подобных моделей с T-клетками лиц с атопией не наблюдалось. Полученные результаты говорят в пользу того, что изменения в метилировании «наивных» CD4⁺T-клеток могут повлиять на поляризацию CD4⁺T-клеток, особенно при псориазе [31].

Как известно, центральными регуляторами иммунного ответа являются регуляторные T-лимфоциты (T-регуляторные клетки, T-супрессоры, Treg). Основная их функция – контролировать силу и продолжительность иммунного ответа через регуляцию функции T-эффекторных клеток (T-хелперов и T-цитотоксических клеток). Эти T-лимфоциты экспрессируют *FOXP3* – фактор, регулирующий транскрипцию генов, ответственных за дифференцировку T-клеток и экспрессию цитокинов и других факторов, участвующих в супрессии иммунного ответа. Стоит отметить, что регион гена *FOXP3* деметилирован.

В 2012 г. в Германии было решено проанализировать влияние пренатальных факторов на количество Treg в пуповинной крови посредством деметилирования специфического региона TSDR (Treg-specific demethylated region) в гене *FOXP3*, а также последующий риск развития аллергических заболеваний. В качестве материала применяли образцы крови беременных (34-я неделя беременности) и пуповинной крови (всего 346 пар мать–ребенок). Treg были обнаружены с помощью деметилирования ДНК в *FOXP3* TSDR. В крови детей в возрасте 1 года был измерен уровень общего и специфического IgE. Кроме того, проводили анализ продукции цитокинов (Th1/Th2/Th17) у матерей. В ходе исследования у мальчиков обнаружено меньшее количество Treg, чем у девочек ($p < 0,001$). Родительский атопический анамнез, особенно сенная лихорадка матери и бронхиальная астма отца, был ассоциирован с низким количеством Treg в пуповинной крови плода. Цитокины (IL-13, IL-17E и IFN- γ) матери и ее курение/воздействие табачного дыма во время беременности также были ассоциированы со снижением количества Treg в пуповинной крови. У детей с низким количеством Treg при рождении имелся более высокий риск развития АД и сенсibilизации к пищевым аллергенам в течение первого года жизни. Полученные результаты говорят в пользу того, что и генетические факторы, и факторы окружающей среды влияют на развитие эмбриональных Tregs. Низкое количество Treg в пуповинной крови может служить прогностическим критерием раннего АД [32].

Таким образом, метилирование ДНК является важным элементом контроля экспрессии генов в клетках млекопитающих. Это процесс, который играет важную роль в регуляции экспрессии генов. Нарушение механизма метилирования ДНК существенно влияет на развитие различных патологий.

В доступной литературе представлены результаты нескольких исследований по изучению эпигенетических изменений в пораженной ткани, преимуще-

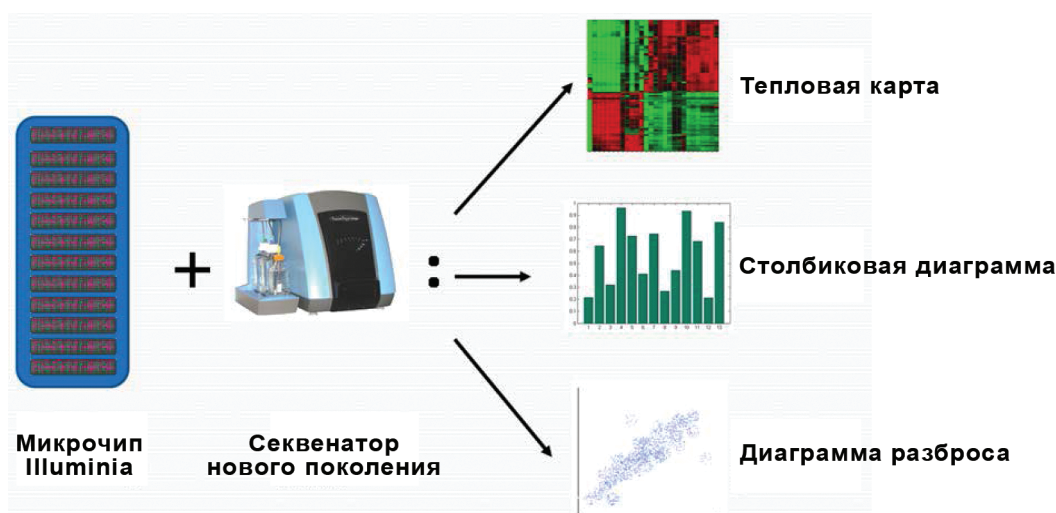


Рис. 1. Технология определения статуса метилирования ДНК.

ственно онкогенной природы. Статус метилирования опухолевых геномов сравнивали с нормальной тканью [33–36]. Исследования по изменению метилирования в пораженных тканях пациентов с различными заболеваниями, в том числе аутоиммунной природы, ограничены в связи с тем, что некоторые ткани являются труднодоступными.

АД имеет преимущество перед многими аутоиммунными заболеваниями из-за доступности своего главного органа-мишени – кожи. Тем не менее полногеномные исследования по метилированию ДНК в биоптатах при АД ранее не были описаны. Среди нескольких работ по метилированию ДНК в крови лиц с атопией обнаружено только одно сообщение об изменении эпигенетического профиля в пределах промоторов отдельных генов в пораженной коже.

В исследовании, проведенном в 2014 г. [37], китайские коллеги изучали избыточную экспрессию тимического стромального лимфопоэтина (TSLP) в коже больных АД и здоровых. Данный цитокин способствует инициации иммунного ответа, индуцируя миграцию клеток Лангерганса в лимфатические узлы. TSLP играет важную роль в развитии Т-клеточного гомеостаза и, по-видимому, является центральным участником манифестации аллергических патологий, таких как бронхиальная астма и АД [37, 38]. У лиц с атопией TSLP продуцируется кератиноцитами как в острой, так и в хронической фазе. Тем не менее механизм его экспрессии остается неясным. Необходимо было также ответить на вопрос, регулируется ли эта экспрессия посредством aberrантного метилирования промоторной части TSLP у пациентов с АД. В качестве материала использованы образцы поврежденной кожи 10 детей с АД и 10 человек из группы контроля. мРНК и уровни белка TSLP были измерены в режиме реального времени методом ПЦР с обратной транскрипцией и иммуногистохимии. Бисульфитное секвенирование проводили для определения статуса метилирования в промоторе TSLP, а 5-азацитидин (5-aza), ингибитор ДНК-метилтрансферазы, применяли для определения влияния метилирования ДНК на экспрессию TSLP. В ходе исследования было зафиксировано следующее:

уровни экспрессии мРНК TSLP и белка увеличены в коже лиц с атопией по сравнению со здоровым контролем; в «атопичных» биоптатах наблюдается гипометилирование промоторной области гена TSLP; лечение 5-аза способствует снижению уровня метилирования промотора TSLP и увеличению транскрипции. Таким образом, деметилирование ДНК определенной регуляторной области гена TSLP может привести к его сверхэкспрессии в коже больных с АД [37].

Представляет интерес исследование, проведенное в США в 2011 г. E. Roberson и соавт. [39], в котором изучался эпигенетический статус генов клеток пораженной и непораженной кожи больных псориазом по сравнению с таковым у здоровых людей. Уровень метилирования ДНК в исследуемых биоптатах оценивали с помощью микрочипов Illumina. В ходе анализа полученных данных авторы получили четкое разделение результатов на два кластера: больные и здоровые. При этом уровень метилирования большинства исследованных генов был статистически значимо выше в образцах пораженной псориазом кожи по сравнению с другими изучаемыми биоптатами. «Непораженная кожа» занимала промежуточную позицию.

В данной работе были проанализированы РР-биоптаты 5 больных псориазом, которые проходили лечение анти-ФНО- α моноклональными антителами адалимумаб (Humira). Стандартная начальная доза для пациентов составляла 80 мг в виде подкожных инъекций, затем через 1 нед после начальной дозы в качестве поддерживающей дозы вводили по 40 мг, затем по 40 мг 1 раз в 2 нед. Оценивали также возраст, пол и PASI этих пациентов. Биопсию производили до лечения и через 1 мес после получения адалимумаба. Биоптаты «до лечения» были получены из псориазической бляшки, а биоптаты «после лечения» – из соседней с биопсией области или из разрешающейся псориазической бляшки контралатерально месту биопсии. У 4 из 5 пациентов был получен хороший ответ на лечение адалимумабом и улучшение по PASI к концу 6-го месяца достигло более 75% (PASI-75). Пиросеквенирование в определенных локусах проводили на образцах «до» и «после» лечения. За 1 мес бляшки полностью не раз-

решились. Тем не менее в каждом локусе было обнаружено, что средние уровни метилирования «пролеченных» образцов становились более похожими на уровни в непораженной коже. Такое клиническое испытание продемонстрировало эффективность TNF-блокады при лечении псориаза. Таким образом, анализ метилирования на дискретном наборе локусов может быть полезным в качестве возможного прогнозирования развития кожной патологии и ответа на лечение в самом его начале [39].

Целью нашего исследования стал анализ эпигенетического профиля (статуса метилирования ДНК) биоптатов у здоровых лиц и больных АД до лечения.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие 4 женщины с АД в возрасте от 20 до 27 лет, получавшие комплексное лечение в виде наружных средств, физиопроцедур, иммуносупрессивной терапии. Анамнестически заболевание часто сочеталось с личным или семейным анамнезом бронхиальной астмы, вазомоторного ринита, конъюнктивита, крапивницы. Критерии включения пациентов в исследование: обострение кожного процесса, отсутствие других кожных патологий, антитела к вирусу иммунодефицита человека не обнаружены, комплекс серологических реакций на сифилис отрицательный, анализ крови на HBsAg и anti-HCV отрицательный.

Контрольную группу составили 7 здоровых лиц (5 женщин и 2 мужчин) в возрасте от 20 до 35 лет.

Биоптаты пораженной кожи у пациентов с АД (ADLS) были получены с помощью punch-биопсии (диаметр 4 мм) из очагов наиболее активного атопического поражения (лихенификации). Образцы непораженной кожи у этих же пациентов с АД (ADNL) были взяты из очагов, где отсутствовали любые признаки макроскопических изменений. Все атопические биоптаты были собраны исключительно до начала терапии. Индекс SCORAD у исследуемых колебался от 50 до 80 баллов. Биоптаты здоровой кожи (K) получали от здоровых добровольцев без АД в анамнезе и каких-либо клинических признаков поражения кожи. Таким образом, наше исследование включало 4 ADLS, 4 ADNL и 7 K биоптатов.

Из данных биоптатов была выделена геномная ДНК. Современная технология поиска метильных групп заключается в следующем: образцы ДНК химически модифицируют так, что неметилированные нуклеотиды превращаются в другой тип нуклеотидов — урацил. Как известно, в норме ДНК не содержит урацил вовсе, поэтому после определения последовательности специалисты могут узнать, какие цитозины содержат метильную группу.

Далее ДНК была подвергнута бисульфидной конвертации. После подготовки образцов их подвергают гибридизации на микрочипах.

Для выделения сигналов метилирования ДНК из сканированных чипов использовали программное обеспечение GenomeStudio® (версия 2011.1; модель метилирования версия 1.9.0, Illumina Inc.).

Данные метилирования были получены из сырых сигналов без выделения фона или нормализации дан-

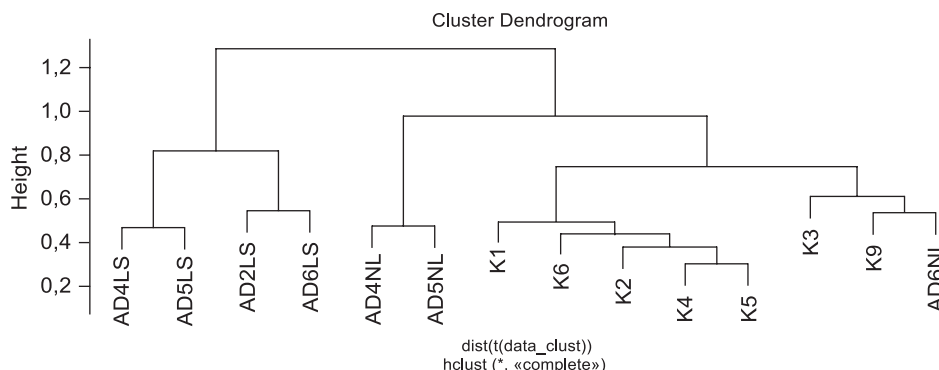


Рис. 2. Кластерная диаграмма распределения образцов дифференциально метилированных локусов CpG.

ных. Наблюдаемые значения: β – уровень метилирования для каждого CpG, которые варьируют от 0 (неметилированные, U) до 1 (полное метилирование, M) на непрерывной шкале. Мы рассчитывали интенсивность аллелей со значениями M и U как показатель сигнала флуоресценции по формуле

$$\beta = \frac{\text{Max}(M, 0)}{\text{Max}(M, 0) + \text{Max}(U, 0) + 100}.$$

Все этапы – обработка, коррекция и нормализация проводили с помощью программного обеспечения R (версия 2.14.0) с приложением Bioconductor (версия 2.9) или адаптировали с помощью приложения IMA (версия 2.0.1) и lumi (версия 2.6.0) программного обеспечения R. Таким образом, с помощью секвенатора нового поколения была определена нуклеотидная последовательность. Данная технология позволяет провести полногеномный анализ экспрессии. Интерпретация результатов представляется в виде различных диаграмм (рис. 1).

В настоящее время ведется дифференциальный анализ метилирования CpG-локусов для выявления изменений метилирования в норме и при патологии.

Следует отметить, что все эти геномные методы остаются трудоемкими и дорогостоящими. Современные микроматрицы американской компании “Illumina” просты в применении, но позволяют проанализировать около 450 тыс. CpG, что составляет около 2% от всех CpG-динуклеотидов генома человека.

Результаты и обсуждение

Проведя систематический поиск по геному на сцепление с АД, мы в очередной раз подтвердили, что существуют гены, которые являются ключевыми в развитии данного заболевания. Получены данные о CpG-сайтах, где регуляцию генной экспрессии осуществляли с помощью метилирования. С помощью микрочипов в полученных образцах кожи были определены уровни метилирования более чем в 480 тыс. CpG-локусах, выбранных из более чем 22 тыс. генов. Анализ наиболее дифференциально метилированных сайтов четко показал разделение результатов на два кластера: «атопическая» кожа и здоровая (рис. 2).

CpG метилирование в образцах ADLS отличается от K на 482 CpG-сайта. В общей сложности 310 CpG-сайтов продемонстрировали дифференциальное метилирование в коже ADLS по сравнению с кожей ADNL, что может быть объяснено маленькими выборками. Дополнительные локусы могут быть об-

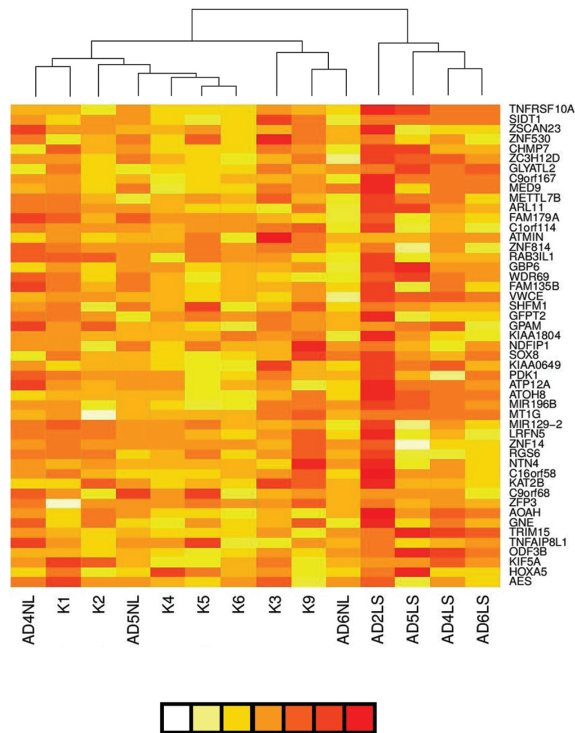


Рис. 3. Тепловая карта уровней метилирования наиболее дифференцированно метилированных генов между образцами пораженной кожи и кожей здоровых лиц.

Здесь и на рис. 4: красный цвет указывает на относительно повышенное метилирование, в то время как белый – на относительное сниженное метилирование.

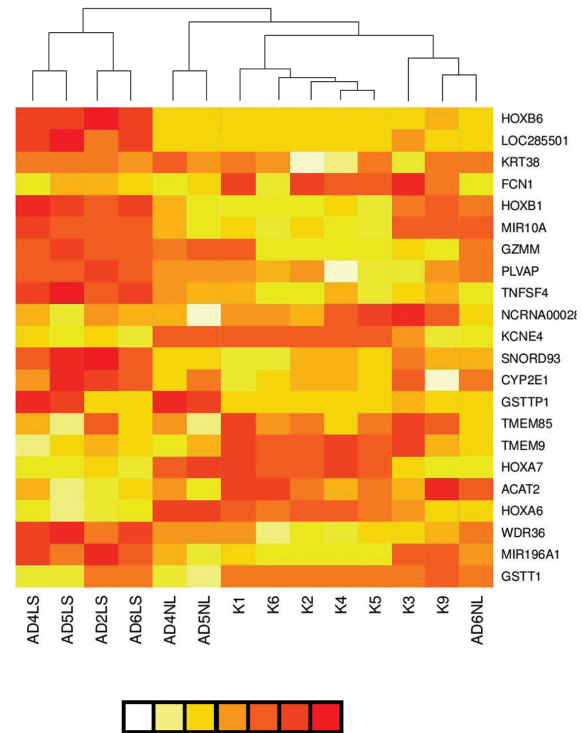


Рис. 4. Тепловая карта уровней метилирования наиболее дифференцированно метилированных генов между образцами пораженной и непораженной кожи больных atopическим дерматитом.

наружены в последующих исследованиях с большим количеством образцов в каждой группе.

Тепловая карта уровней метилирования наиболее дифференцированных сайтов была создана со всеми образцами ADLS, ADNL и K (рис. 3, 4).

Наибольшее число различий в метилировании наблюдались в ADLS коже по сравнению с K, при этом можно отметить сравнительно мало изменений в метилировании кожи ADNL по сравнению с K.

Уровни метилирования дифференциально метилированных CpG-сайтов верно определили пораженную, непораженную и здоровую кожу, что может быть использовано для классификации различных групп кожи.

В общем можно полагать, что исследование генетических и эпигенетических механизмов, лежащих в основе наследственных заболеваний, в частности АД, является одним из приоритетных направлений как в дерматологии, так и в генетике. Однако по-прежнему остаются вопросы. Могут ли такие эпигенетические факторы, как метилирование ДНК, изменить характер течения АД? Может ли эпигенетика пролить свет на механизм формирования АД у определенного контингента людей, объяснить механизм передачи предрасположенности к кожным патологиям от поколения к поколению.

Задача ближайшего будущего – создать патогенетически и этиологически обоснованные подходы к лечению наследственной патологии на смену симптоматической терапии. Активное развитие геноми-

ки, происходящее в последнее время, предоставляет новые мощные инструменты описания и анализа генетического разнообразия – секвенирование индивидуальных геномов и полногеномный анализ на биочипах, проекты «НарМар» и «1000 Genomes Project», позволяя все чаще обнаруживать «мишени болезни» – точечные мутации или полиморфные гены предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям. Следовательно, внедрение новых эпигенетических методов для активного выявления группы риска по любой патологии является перспективным, что позволяет значительно повысить результативность скрининга. Терапия ДНК или отдельно взятого гена сможет стать базовой при основных заболеваниях современного человека. Новое «генное» лечение болезней, в том числе АД, на сегодняшний день является очень актуальным и представляет огромный интерес как для врачей, так и для пациентов.

Таким образом, перспективным путем лечения является выявление генов, подвергающихся эпигенетической модификации при дерматозах. Необходимо направить все усилия на создание диагностики на досимптомном этапе развития заболеваний и поиск лекарственных веществ, которые инактивируют модифицированные гены или их продукты. Учитывая индивидуальную предрасположенность, можно будет своевременно проводить адекватную профилактику патологии и назначать пациенту персонализированную схему лечения.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

- Watson W., Kapur S. Atopic dermatitis. *Allergy. Asthma. Clin. Immunol.* 2011; 7 (Suppl. 1):S4. doi: 10.1186/1710-1492-7-S1-S4.
- Larsen F.S., Hanifin J.M. Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunol. Allergy. Clin. North. Am.* 2002; 22(1): 1–25. doi: 10.1016/S0889-8561(03)00066-3.
- Flohr C., Mann J. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. *Allergy.* 2014; 69(1): 3–16. doi: 10.1111/all.12270.
- Katoh N., Hirano S., Kishimoto S. Prognostic factor of adult patients with atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 2008; 35(8): 477–83. doi: 10.1111/j.1346-8138.2008.00507.x.
- Sandström M.H., Faergemann J. Prognosis and prognostic factors in adult patients with atopic dermatitis: a long-term follow-up questionnaire study. *Br. J. Dermatol.* 2004; 150(1): 103–10.
- Sandström Falk M.H., Faergemann J. Atopic dermatitis in adults: does it disappear with age? *Acta. Derm. Venereol.* 2006; 86(2): 135–9. doi: 10.2340/00015555-0040.
- Кочергин Н.Г. Основные аспекты патогенеза, клиники и современной терапии atopического дерматита: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М.; 2001. [Kochergin N.G. *Basic aspects of the pathogenesis, clinics and modern therapy of atopic dermatitis*. Dis. Moscow; 2001]. (in Russian)
- Williams H.C. Epidemiology of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Dermatol.* 2000; 25(7): 522–9.
- Иллек Я.Ю., Зайцева Г.А., Галанина А.В. Ассоциации HLA-антигенов при тяжелом течении atopического дерматита у детей раннего возраста. *Педиатрия.* 2008; 87(4): 18–20. [Illek Ya.Yu., Zaytseva G.A., Galanina A.V. Association of HLA antigens in severe atopic dermatitis in infants. *Pediatrics*. 2008; 87(4): 18–20]. (in Russian)
- Wollenberg A., Bieber T. Atopic dermatitis from the genes to skin lesions. *Allergy.* 2000; 55(3): 205–13. doi: 10.1034/j.1398-9995.2000.00115.x.
- Uehara M., Kimura C. Descendant family history of atopic dermatitis. *Acta. Derm. Venereol.* 1993; 73(1): 62–3.
- Гомберг М.А., Соловьев А.М., Аковбян В.А. Атопический дерматит. *Русский медицинский журнал.* 1998; 6(20): 1326–35. [Gomberg M.A., Solovyev A.M., Akovbyan V.A. Atopic dermatitis. *Russkiy meditsinskiy zhurnal.* 1998; 6(20): 1326–35]. (in Russian)
- Allis C.D., Jenuwein T., Reinberg D., Caparros M.L., eds. Epigenetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007.
- Колмакова Т.С., Григорян Н.А. Современное представление об эпигенетических механизмах формирования наркотической и психических расстройств эмоциональной сферы. *Фундаментальные исследования.* 2012; 10(2): 380–385. [Kolmakova T.S., Grigoryan N.A. Modern view of epigenetic mechanisms of formation of addiction and mental disorders of emotional sphere. *Fundamentalnyye issledovaniya.* 2012; 10(2): 380–385]. (in Russian)
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes. Dev.* 2002; 16(1): 6–21.
- Tsankova N., Renthal W., Kumar A., Nestler E.J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007; 8(5): 355–67. doi:10.1038/nrn2132.
- Shen L., Waterland R.A. Methods of DNA methylation analysis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2007; 10(5): 576–81.
- Weber M., Schübeler D. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2007; 19(3): 273–80.
- Dodge J.E., Ramsahoye B.H., Wo Z.G., Okano M., Li E. De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene.* 2002; 289(1–2): 41–8. doi: 10.1016/S0378-1119(02)00469-9.
- Haines T.R., Rodenhiser D.I., Ainsworth P.J. Allele-specific non-CpG methylation of the Nf1 gene during early mouse development. *Dev. Biol.* 2001; 240(2): 585–98.
- Гречанина Е.Я., Лесовой В.Н., Мясоедов В.В., Гречанина Ю.Б., Гусар В.А. Закономерная связь между развитием некоторых эпигенетических болезней и нарушением метилирования ДНК вследствие дефицита ферментов фолатного цикла. Доступно на сайте: <http://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/628/3/%D0%93%D1%80%D0%B5%D1%87%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%BD%D0%B0%20%D0%95.%D0%AF.%2B.pdf>. [Grechanina E.Ya., Lesovoy V.N., Myasoedov V.V., Grechanina Yu.B., Gusar V.A. Relationship between the development of certain epigenetic diseases and alterations of DNA methylation due to a deficiency of enzymes of folate cycle. Available on: <http://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/628/3/%D0%93%D1%80%D0%B5%D1%87%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%BD%D0%B0%20%D0%95.%D0%AF.%2B.pdf>]. (in Russian)
- Nakamura T., Sekigawa I., Ogasawara H., Mitsuishi K., Hira K., Ikeda S., Ogawa H. Expression of DNMT-1 in patients with atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 2006; 298(5): 253–6.
- Sekigawa I., Yoshiike T., Iida N., Hashimoto H., Ogawa H. Allergic diseases in systemic lupus erythematosus: prevalence and immunological considerations. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2003; 21(1): 117–21.
- Kuwabara N., Kondo N., Fukutomi O., Fujii H., Orii T. Methylation pattern of I epsilon region in B cells stimulated with interleukin 4 and Epstein–Barr virus in patients with a high level of serum IgE. *Eur. J. Immunogenet.* 1995; 22(3): 265–75.
- Lorenzo P.R., Kuwabara N., Kondo N., Orii T. IgE production by B-cells stimulated with interleukin-4 and Epstein–Barr virus in patients with elevated serum IgE levels. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 1995; 5(2): 78–81.
- Strickland F.M., Richardson B.C. Epigenetics in human autoimmunity. Epigenetics in autoimmunity – DNA methylation in systemic lupus erythematosus and beyond. *Autoimmunity.* 2008; 41(4): 278–86. doi:10.1080/08916930802024616.
- Боткина А.С. Клинико-метаболические и генетические аспекты atopического дерматита у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2003. [Botkina A.S. *Clinical, metabolic and genetic aspects of atopic dermatitis in children*. Dis. Moscow; 2003]. (in Russian)
- Olesen A.B., Ellingsen A.R., Olesen H., Juul S., Thestrup-Pedersen K. Atopic dermatitis and birth factors: historical follow up by record linkage. *Br. Med. J.* 1997; 314. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.314.7086.1003>.
- Wang I.J., Chen S.L., Lu T.P., Chuang E.Y., Chen P.C. Prenatal smoke exposure, DNA methylation, and childhood atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy.* 2013; 43(5): 535–43. doi: 10.1111/cea.12108.
- Liang Y., Wang P., Zhao M., Liang G., Yin H., Zhang G., et al. Demethylation of the FCER1G promoter leads to FcεRI overexpression on monocytes of patients with atopic dermatitis. *Allergy.* 2012; 67(3): 424–30. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02760.x.
- Han J., Park S.G., Bae J.B., Choi J., Lyu J.M., Park S.H., et al. The characteristics of genome-wide DNA methylation in naïve CD4+ T cells of patients with psoriasis or atopic dermatitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 422(1): 157–63. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.128.
- Hinz D., Bauer M., Röder S., Olek S., Huehn J., Sack U., et al. Cord blood Tregs with stable FOXP3 expression are influenced by prenatal environment and associated with atopic dermatitis at the age of one year. *Allergy.* 2012; 67(3): 380–9. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02767.x.
- Катаргин А.Н. Эпигенетические изменения в опухолях шейки матки: гипер- и гипометилирование повторяющихся

- элементов ДНК: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.; 2010.
- [Katargin A.N. *Epigenetic changes in cervical tumors: hyper- and hypomethylation of repetitive DNA elements*. Dis. Moscow; 2010]. (in Russian)
34. Михайленко Д.С. *Анализ молекулярно-генетических нарушений, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований почки*: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2008. [Mikhaylenko D.S. *Analysis of molecular genetic disorders associated with the development of kidney cancer*. Dis. Moscow; 2008]. (in Russian)
35. Wielscher M., Liou W., Pulverer W., Singer C.F., Rappaport-Fuerhauser C., Kandioler D., et al. Cytosine 5-Hydroxymethylation of the LZTS1 Gene Is Reduced in Breast Cancer. *Transl. Oncol.* 2013; 6(6): 715–21.
36. Kunstman J.W., Korah R., Healy J.M., Prasad M., Carling T. Quantitative assessment of RASSF1A methylation as a putative molecular marker in papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 2013; 154(6): 1255–61.
37. Luo Y., Zhou B., Zhao M., Tang J., Lu Q. Promoter demethylation contributes to TSLP overexpression in skin lesions of patients with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Dermatol.* 2014; 39(1): 48–53. doi: 10.1111/ced.12206.
38. Soumelis V., Reche P.A., Kanzler H., Yuan W., Edward G., Homey B., et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.* 2002; 3(7): 673–80.
39. Roberson E.D., Liu Y., Ryan C., Joyce C.E., Duan S., Cao L., et al. A subset of methylated CpG sites differentiate psoriatic from normal skin. *J. Invest. Dermatol.* 2012; 132(3, Pt 1): 583–92. doi: 10.1038/jid.2011.348. <http://www.nature.com/jid/journal/v132/n3-1/full/jid2011348a.html> - fig4

Поступила 30.06.14
Received 30.06.14

© МИРЗОЕВА М.Т., ИСАЕВА М.С., 2014
УДК 616.834-002.152-036.2(575.3)

К вопросу об эпидемиологии *Herpes zoster* в Таджикистане в 2000–2011 годах

Мирзоева М.Т., Исаева М.С.

Кафедра дерматовенерологии Таджикского государственного медицинского университета им. Абу али Ибн Сина, Душанбе, Таджикистан

Представлены результаты эпидемиологического исследования по опоясывающему герпесу в Республике Таджикистан, за период с 2000 по 2011 г. При сборе сведений применяли способы непосредственного наблюдения (ведение больных) и выкопировки (работа с текущей и архивной медицинской документацией). За этот период были выявлены 6732 больных опоясывающим герпесом. Установлено, что в последние годы отмечается значительный рост заболеваемости, особенно в старших возрастных группах (на 100 000 населения 9 против 7). Мужчины болели чаще (57,9%), чем женщины (42,1%). Заболевание чаще регистрируют в зимнее время года, ранней весной и осенью, реже – летом. Основными причинами роста заболеваемости являются социальные и медико-биологические факторы.

Ключевые слова: герпес; опоясывающий герпес; эпидемиология *Herpes zoster*.

ON THE EPIDEMIOLOGY OF HERPES ZOSTER IN TAJIKISTAN IN 2000-2011

Mirzoeva M.T., Isaeva M.S.

Avicenna Tajik State Medical University, 743001, Dushanbe, Tajikistan Republic

Epidemiological studies of herpes zoster in Tajikistan were carried out for the period of 2000–2011. A total of 6732 patients with the disease were detected over this period. The morbidity increased significantly in recent years, particularly in older age groups (9 vs. 7 per 100 000). Men more often affected than women (57.9 vs. 42.1%). The disease was more often recorded in winter, early spring, and autumn than in summer. The main causes of morbidity increase were social and biomedical factors.

Key words: herpes; *Herpes zoster*; herpes zoster epidemiology.

В современной медицине возросла роль инфекционных болезней в общей патологии человека. Распространенность их остается высокой и не имеет тенденции к снижению. Среди открытых в последние десятилетия инфекций с доказанной нозологической и этиологической самостоятельностью наиболее ак-

туальными являются герпесвирусы [1–3]. Около 90% населения земного шара инфицировано герпес-вирусами [4, 5]. В 2002 г. ВОЗ объявила о пандемии герпетических инфекций (ГИ) в мире [6–8].

Одной из наиболее распространенных ГИ является опоясывающий герпес (ОГ), проявляющийся общим инфекционным синдромом, возникновением ограниченных или генерализованных высыпаний, поражением нервной системы, нередко других систем и органов [9]. ОГ был известен еще в античные времена и рассматривался как самостоятельное заболевание, не связанное с ветряной оспой. Общность ветряной оспы и ОГ была доказана К. Kundratitz в 1925 г. путем

Сведения об авторах:

Мирзоева Мунира Тахировна, аспирант (AnsoriSJ@gmail.com);
Исаева Мавджуда Сироджидиновна, доктор мед. наук.

Corresponding author:

Mirzoeva Munira, postgraduate student (AnsoriSJ@gmail.com).