

**ВЛИЯНИЕ ДНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ 3А И ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ  
НА СОДЕРЖАНИЕ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ  
ЗДОРОВЫХ ЛИЦ ФОСФАТАЗ *PTP1B* И *PP2CA*, А ТАКЖЕ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ**

И.В. ТЕРЕХОВ

*ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», ул. Болдина, 128, Тула, 300028, Россия*

**Аннотация.** Эпигенетические молекулярные механизмы играют важную роль в формировании адаптивных реакций на внутриклеточном уровне, обеспечивая тонкую настройку адаптивных реакций позволяя организму реализовывать стратегии пластичности и гибкости в отношении внешних факторов. Активность транскрипции находится под контролем эпигенетических механизмов, к которым относятся метилирование ДНК и различные модификации гистонов, включая ацетилирование лизинов гистонов *H3* и *H4*. Указанные механизмы модификации молекулярной структуры оказывают значимое влияние на экспрессию генов, определяя вариабельность фенотипических проявлений, регулируя дифференцировку стволовых клеток.

Вместе с тем, также эпигенетические механизмы также играют важную роль в регуляции дифференцировки иммунокомпетентных клеток при формировании адаптивного иммунного ответа. При этом активация генов интерлейкинов, определяющая продукцию соответствующих молекул (*ИЛ-4*, *ИЛ-10*, *ИЛ-17*, *ИФН $\gamma$*  и др.), а также молекул, регулирующих активность сигнальных путей данных цитокинов (таких как фосфатазы *PP2CA* и *PTP1B*) способствует формированию одной из популяций *T*-лимфоцитов, что позволяет говорить о важности упомянутых молекулярных процессов в поддержании адекватного иммунного ответа. Указанное обстоятельство позволяет считать эпигенетические механизмы на ряду с системой регуляции продукции цитокинов и чувствительности к ним клеток потенциальными терапевтическими мишенями при различных иммунодефицитных состояниях.

Вместе с тем, несмотря на важную роль в обеспечении жизнедеятельности организма, взаимосвязи эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов с механизмами, определяющими функциональную активность иммунокомпетентных клеток исследованы недостаточно полно. При этом взаимосвязи между различными компонентами упомянутой системы оценены еще менее детально.

*Цель исследования* – изучение влияния ДНК метилтрансферазы 3А и гистондеацетилазы на продукцию цитокинов и содержание в мононуклеарных клетках цельной крови фосфатаз *PTP1B* и *PP2CA*.

Методом иммуноферментного анализа оценивали содержание в МНК *DNMT3A*, *HD*, *PP2CA*, *PTP1B*, а также концентрацию в клеточном супернатанте *ИЛ-4*, *ИЛ-10*, *ИЛ-17А*, *TGF $\beta$ 1*, *ИФН $\gamma$* .

Установлено стимулирующее влияние *DNMT3A* в отношении продукции клетками крови *ИЛ-4*, *ИЛ-17А* и *ИФН $\gamma$* , наблюдающееся на фоне снижения продукции *ИЛ-10* и *TGF $\beta$ 1*. В свою очередь, повышение содержания в клетке *HD* ассоциируется со статистически значимым повышением уровня *TGF $\beta$ 1* и снижением продукции *ИЛ-17А*. Интегральные эффекты совместного влияния на цитокиновую продукцию *DNMT3A* и *HD*, заключаются в статистически значимом повышении в супернатанте концентрации *ИЛ-4*, *TGF $\beta$ 1* и *ИФН $\gamma$* , на фоне снижения уровня *ИЛ-17А* и *ИЛ-10* при повышении в клетке исследованных регуляторов. В отношении содержания в МНК фосфатаз, установлено стимулирующее влияние *DNMT3A* на *PPM1B*, и противоположное влияние *HD* на содержание в клетке *PP2CA*. Взаимовлияние указанных факторов сопровождается статистически значимым повышением уровня в МНК фосфатазы *PPM1B* и снижением *PP2CA*.

**Ключевые слова:** *DNMT3A*, *HD*, *PTP1B*, *PP2CA*, эпигенетика, интерлейкины.

**INFLUENCE OF METHYLTRANSFERASE DNA 3A AND HISTONE DEACETYLASE ON THE  
CONTENT IN THE MONONUCLEAR CELLS OF THE WHOLE BLOOD IN PRACTICALLY  
HEALTHY PERSONS PHOSPHATES *PTP1B* AND *PP2CA*, AND ALSO PRODUCTION  
OF CYTOKINES**

I.V. TEREKHOV

*Tula State University, Boldin Str., 128, Tula, 300028, Russia*

**Abstract.** Epigenetic molecular mechanisms play an important role in the formation of adaptive responses at the intracellular level, providing fine-tuning of adaptive responses allowing the body to implement plasticity and flexibility strategies against external factors. Transcription activity is controlled by epigenetic mechanisms, which include DNA methylation and various modifications of histones, including the acetylation of

lysine histones H3 and H4. These mechanisms of modification of the molecular structure have a significant impact on gene expression, determining the variability of phenotypic manifestations, regulating the differentiation of stem cells.

At the same time, epigenetic mechanisms also play an important role in regulating the differentiation of immune competent cells in the formation of an adaptive immune response. Activation genes of interleukin (IL) defining the products of the respective molecules (IL-4, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , etc.), as well as of molecules that regulate the activity of signaling pathways of cytokines data (such as phosphatases PP2CA and PTP1B) contributes to the formation of one population of T lymphocytes that allows to speak about the importance of the mentioned molecular processes in the maintenance of an adequate immune response.

Despite the important role in ensuring the life of the body, the relationship of epigenetic mechanisms of regulation of gene expression with mechanisms that determine the functional activity of immune competent cells is not fully investigated. At the same time, the interrelations between the various components of the mentioned system are evaluated in even less detail.

The purpose of this work was to study the effect of DNA methyltransferase 3A and histone deacetylase on the production of cytokines and the content of whole blood of phosphatases PTP1B and PP2CA in mononuclear cells.

The content of DNMT3A, HD, PP2CA, PTP1B in MNC and the concentration in the cell supernatant IL-4, IL-10, IL-17A, TGF $\beta$ 1, IFN $\gamma$  were estimated by the enzyme immunoassay.

The stimulating effect of DNMT3A on the production of blood cells IL-4, IL-17A and IFN $\gamma$ , observed against the background of reduced production of IL-10 and TGF $\beta$ 1. In turn, the increase in HD content in the cell is associated with a statistically significant increase in the level of TGF $\beta$ 1 and a decrease in IL-17A production. The integral effects of the combined effect on the cytokine production of DNMT3A and HD consist in a statistically significant increase in the concentration of IL-4, TGF $\beta$ 1 and IFN, against the background of a decrease in the level of IL-17A and IL-10 with an increase in the studied regulators in the cell. With respect to the content of phosphatase in MNC, the stimulating effect of DNMT3A on PPM1B and the opposite effect of HD on the content in PP2CA cell was established. The interaction of these factors is accompanied by a significant increase level in MNCs phosphatase PPM1B and decrease PP2CA.

**Key words:** DNMT3A, HD, PTP1B, PP2CA, epigenetics, interleukins.

**Введение.** Эпигенетические молекулярные механизмы играют важную роль в формировании адаптивных реакций, обеспечивая тонкую настройку внутриклеточных метаболических механизмов позволяя организму реализовывать стратегии пластичности и гибкости в отношении внешних возмущений. Активность транскрипции находится под контролем эпигенетических механизмов, к которым относятся метилирование ДНК и различные модификации гистонов, включая их ацетилирование, фосфорилирование [1, 2]. Модификация ДНК за счет ее метилирования, осуществляемого ДНК метилтрансферазами, приводящая к изменению свойств хроматина позволяет регулировать активность транскрипционных факторов и внутриклеточных сигнальных путей. В данном процессе у млекопитающих принимают участие 4 фермента (*DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3a*, *DNMTb*). При этом, ДНК-метилтрансферазы *DNMT3a* и *DNMT3b*, экспрессия которых максимальна в недифференцированных клетках, осуществляют преимущественно метилирование полуметилированных и неметилированных сайтов *CpG*, менее активно модифицируя последовательности *CpA*, *CpT* и *CpC*. Другим классом молекул, обеспечивающим модификацию посттрансляционной структуры молекул, являются деацетилазы гистонов, обеспечивающие репрессию генов, за счет удаления ацетильной группы гистонов *H3* и *H4* [1]. Указанные механизмы модификации молекулярной структуры оказывают значимое влияние на экспрессию генов, определяя вариабельность фенотипических проявлений, регулируя дифференцировку стволовых клеток.

Вместе с тем, эпигенетические механизмы также играют важную роль в регуляции дифференцировки иммунокомпетентных клеток при формировании адаптивного иммунного ответа [3, 4]. При этом активация генов *интерлейкинов* (ИЛ), определяющая продукцию соответствующих молекул (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-17, ИФН $\gamma$  и др.), а также регуляторов их сигнальных путей (таких как фосфатазы *PP2CA* и *PTP1B*) способствует формированию одной из популяций Т-лимфоцитов, что позволяет говорить о важности упомянутых молекулярных процессов в поддержании адекватного иммунного ответа [5-9]. Указанное обстоятельство позволяет считать эпигенетические механизмы потенциальными терапевтическими мишенями при различных иммунодефицитных состояниях [10, 11].

Вместе с тем, несмотря на важную роль в обеспечении жизнедеятельности организма, взаимосвязи эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов с механизмами, определяющими функциональную активность иммунокомпетентных клеток, исследованы недостаточно полно.

**Цель исследования** – изучение влияния ДНК метилтрансферазы 3А и гистондеацетилазы на продукцию интерлейкинов и содержание в мононуклеарных клетках цельной крови фосфатаз *PTP1B* и *PP2CA*.

**Материалы и методы исследования.** Материалом для исследования служила венозная кровь, за-

бывавшаяся в утренние часы (с 7:00 до 7:30) из локтевой вены. В исследовании включено 120 практически здоровых молодых мужчин (средний возраст – 27±6 лет.) являвшихся донорами крови. Проведение клинического исследования было одобрено Ученым советом и Локальным этическим комитетом медицинского института ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет» (Протокол №2 от 01.09.2014 г.).

В работе использовали наборы для культивирования и митогенной стимуляции клеток цельной крови «Цитокин-Стимул-Бест» (ЗАО «Вектор Бест», Новосибирск). 1 мл цельной крови в стерильных условиях вносили во флакон, содержащий 4 мл поддерживающей среды *DMEM*, гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и *L*-глутамин (0,6 мг/мл), затем образцы крови помещали в термостат (37°C) и инкубировали в течение 24 ч [12].

После инкубации из флаконов с образцами крови забирали 1 мл супернатанта для определения концентрации *интерлейкинов* (ИЛ) 4, 10, 17А, *TGFβ1* и *интерферона гамма* (ИФНγ) *методом иммуноферментного анализа* (ИФА).

Для получения фракции МНК 4 мл клеточной суспензии наслаивали на раствор фикоколл-верографина ( $\rho=1,077$ , МедБиоСпектр, Россия) с последующим центрифугированием при 5000 об/мин. в течение 30 мин. Выделенные МНК дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере и 1 мл клеточной суспензии, содержащей  $5 \times 10^6$  клеток, лизировали, используя раствор следующего состава (*Sigma-Aldrich*, США): 10 mM Tris, pH 7,4; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM  $Na_4P_2O_7$ , 2 mM  $Na_3VO_4$ , 1% Triton X-100, 10% глицерола, 0,1% SDS, 0,5% деоксихолата, 1 mM PMSF (матричный 0,3 M раствор в DMSO). В лизирующий раствор добавляли (*ex tempore*) 1% коктейля ингибитора протеаз (*Sigma-Aldrich*, США), выдерживали на льду (при  $t=+4-5^{\circ}C$ ) в течение 15 мин., аликвотировали и замораживали при  $-76^{\circ}C$ . В полученных лизатах методом ИФА оценивали содержание ДНК метилтрансферазы 3А (*DNMT3A*), гистондеацетилазы (*HD*), фосфатаз *PP2CA* и *PTP1B*.

Имуноферментный анализ проводили на анализаторе *Personal LAB (Adaltis Italia S.p.A., Италия)*: разрешение фотометрирования не меньше 0,001 ед. оптической плотности (0,03%) и точность измерения оптической плотности не меньше 0,5%.

Для определения исследуемых факторов в лизатах МНК использовали наборы реактивов *CSB-E13526H*, *CSB-E08503H*, *CSB-EL018489HU*, *CSB-EL018490HU*; в клеточных супернатантах: *CSB-E04593H (Cusabio Biotech, Китай)*, *BMS228HS*, *BMS2017 (Bender Medsystems, Австрия)*, *SEA111HU (Cloud-Clone, США)*, *ELH-IL17-001 (RayBiotech, США)*. Подсчет клеток и анализ их жизнеспособности выполняли на счетчике клеток *TC20 (Bio-Rad, США)*. Жизнеспособность выделенных МНК превышала 90%.

Статистическую обработку осуществляли с применением программы *Statistica 8.0*. Статистическую значимость (*p*) различий исследуемых показателей в зависимости от содержания в клетке *DNMT3A* и *HD*, влияние которых рассматривалось с позиции фиксированных эффектов, оценивали методом дисперсионного анализа (*VEPAC*). Результаты исследования представлены в виде: медиана выборки; 25 и 75 процентиля (25%, 75%).

**Результаты и обсуждение.** Уровень исследованных факторов в МНК и клеточных супернатантах в представлен в табл. 1.

Таблица 1

#### Концентрация исследованных цитокинов в супернатантах

Цитокин	<i>x</i>	25%	<i>Me</i>	75%
ИЛ-4, пг/мл	2,49	2,12	2,51	2,87
ИЛ-10, пг/мл	14,4	12,9	13,8	16,0
ИЛ-17А, пг/мл	2,28	2,13	2,33	2,54
ИФНγ, пг/мл	3,14	2,74	3,04	3,29
ТФРβ1, нг/мл	50,7	46,3	47,7	51,8

Содержание в МНК исследованных регуляторных протеинов представлено в табл.2.

Результаты исследования содержания в МНК практически здоровых лиц *DNMT3A* позволили разделить обследуемую популяцию на две группы, в зависимости от значения медианы концентрации фермента в образцах МНК. В первую группу включены образцы с содержанием фермента менее 0,35 пг/мл ( $n=58$ ), во вторую – с уровнем 0,35 пг/мл и более ( $n=62$ ). Условно, в соответствии с концентрацией фактора в подгруппах полагали, что уровень 0,35 и менее соответствует низкому содержанию фактора в МНК (обозначен индексом «0»), уровень более 0,35 – высокому (обозначен индексом «2»). Аналогично предыдущему фактору, по отношению к деацетилазе гистонов, так же были сформированы две подгруппы, в одну из которых были включены образцы с концентрацией исследуемого фактора менее 0,64 нг/мл ( $n=60$ ), в другую – 0,58 пг/мл и более ( $n=58$ ). Таким образом, в соответствии с содержанием в клетке

*DNMT3A* и *HD*, каждый образец мог быть отнесен к одному из четырех подгрупп: с высоким и низким уровнем *DNMT3A* и *HD* высоким уровнем *DNMT3A* и низким уровнем *HD*, низким уровнем *DNMT3A* и высоким уровнем *HD*. В соответствии с целью исследования, в каждой из подгрупп в супернатанте исследовали концентрацию цитокинов, а в МНК содержание фосфатаз *PP2CA* и *PTP1B*.

Таблица 2

Внутриклеточное содержание исследованных факторов

Фактор	<i>x</i>	25%	<i>Me</i>	75%
<i>DNMT3A</i> , пг/мл	0,39	0,32	0,35	0,44
<i>HD</i> , пг/мл	0,63	0,58	0,64	0,72
<i>PPM1B</i> , пг/мл	1,24	0,95	1,2	1,58
<i>PP2CA</i> , пг/мл	0,84	0,66	0,76	0,98

Концентрация в супернатанте ИЛ-4 в зависимости от уровня в МНК деацетилазы гистонов и ДНК метилтрансферазы 3А представлена на рис. 1.

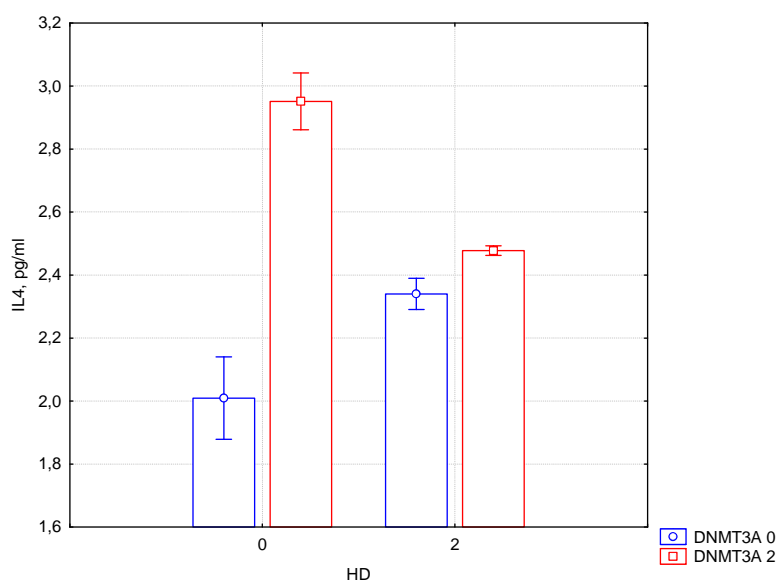


Рис. 1. Влияние *DNMT3A* и *HD* на продукцию ИЛ-4

Проведенный анализ показал, что продукция ИЛ-4 находилась в зависимости от содержания в МНК исследуемых факторов. При этом, результаты анализа указывают о том что повышение содержания *HD* в условиях низкого уровня в клетке *DNMT3A* не оказывает статистически значимого влияния на концентрацию в супернатанте ИЛ-4 ( $F=0,71$ ;  $p=0,4$ ), тогда как увеличение содержания *DNMT3A* при условии высокого уровня *HD* сопровождается снижением продукции ИЛ-4 ( $F=40,5$ ;  $p<0,0001$ ). Таким образом, совместное влияние рассматриваемых факторов, при повышении их уровня в МНК, отличаясь статистически значимым характером ( $F=22,5$ ;  $p<0,0001$ ) определяет снижение продукции ИЛ-4.

Проведенный анализ особенностей продукции функционального антагониста ИЛ-4 – ИФН $\gamma$  свидетельствует о том, что повышение содержания *DNMT3A* способствует повышению уровня в супернатанте ИФН $\gamma$  ( $F=3,9$ ;  $p=0,05$ ), тогда как изолированное увеличение содержания *HD* не оказывает статистически значимого влияния на уровень ИФН ( $F=1,3$ ;  $p=0,25$ ). На этом фоне сочетание двух исследуемых факторов оказывает значимое влияние на продукцию ИФН ( $F=36,7$ ;  $p<0,0001$ ) проявляющееся в уравнивании продукции ИФН, таким образом, что повышение содержания в *HD* на фоне низкого уровня *DNMT3A* сопровождается повышением, а на фоне высокого – снижением уровня ИФН. При этом снижение продукции носит более выраженный характер, чем ее наблюдаемый рост.

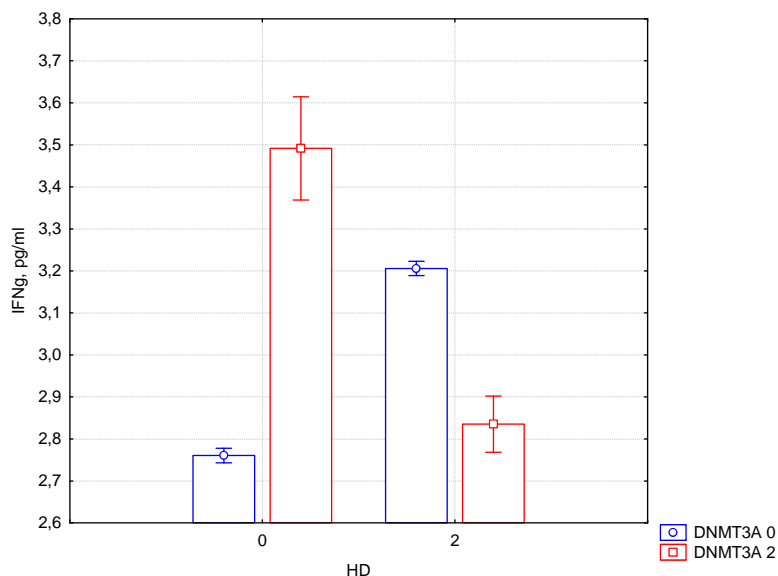


Рис. 2. Влияние DNMT3A и HD на продукцию ИФН $\gamma$

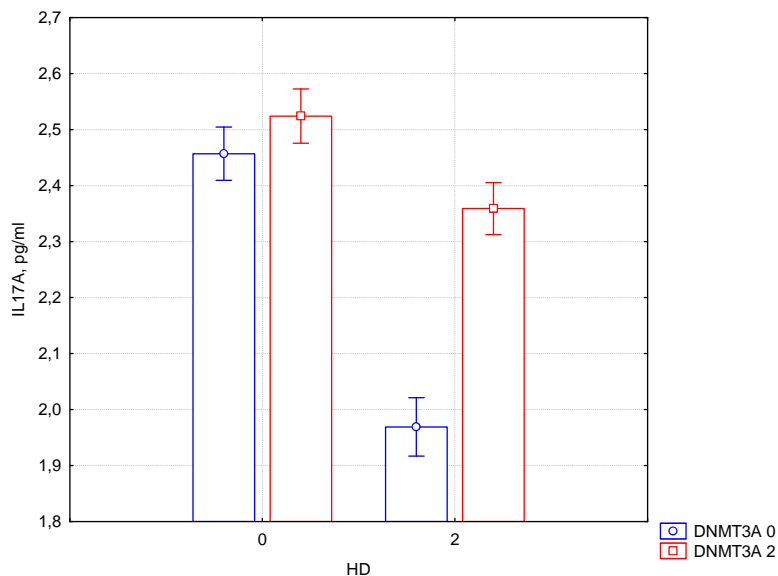


Рис. 3. Влияние DNMT3A и HD на продукцию ИЛ-17А

Результаты исследования эффектов эпигенетических регуляторов на продукцию ключевого фактора *T-x17*, свидетельствуют о значимом ( $F=36,0$ ;  $p<0,0001$ ) влиянии HD на уровень ИЛ-17, проявляющимся в снижении уровня данного цитокина при повышении содержания в клетке HD. Менее выраженное стимулирующее влияние на продукцию ИЛ-17, оказывает DNMT3A ( $F=17,7$ ;  $p=0,0005$ ). Эффекты сочетанного влияния рассматриваемых факторов на уровень ИЛ-17 проявляются угнетающим влиянием на продукцию исследуемого цитокина HD ( $F=8,8$ ;  $p=0,004$ ).

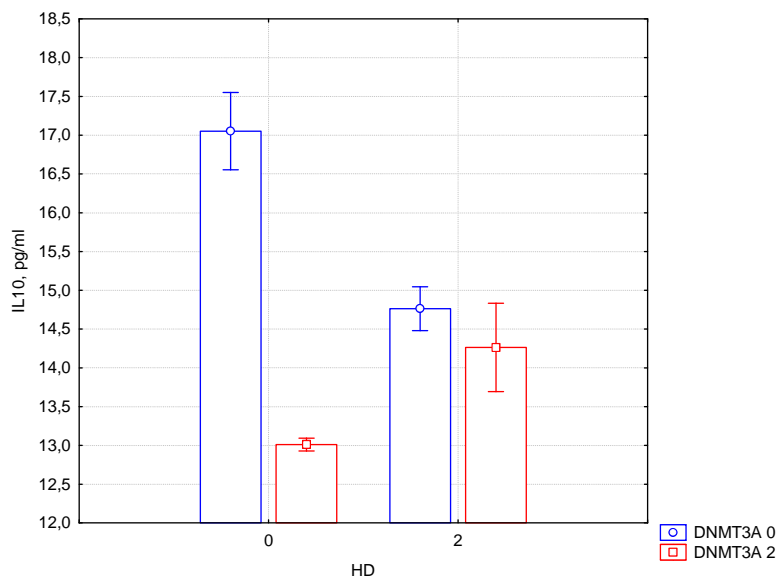


Рис. 4. Влияние *DNMT3A* и *HD* на продукцию ИЛ-10

Проведенный анализ влияния исследуемых факторов в отношении продукции ИЛ-10 свидетельствует о том, что *DNMT3A* оказывает значимое негативное влияние на его уровень в супернатанте ( $F=44,4$ ;  $p<0,0001$ ), при этом в сочетании с *HD* выявленная тенденция к снижению продукции сохраняется. Однако роль *HD* можно рассматривать в качестве фактора способствующего не столь сильному снижению ( $F=26,9$ ;  $p<0,0001$ ), т.к. самостоятельного влияния на продукцию данного цитокина *HD* не оказывает ( $F=2,3$ ;  $p=0,13$ ).

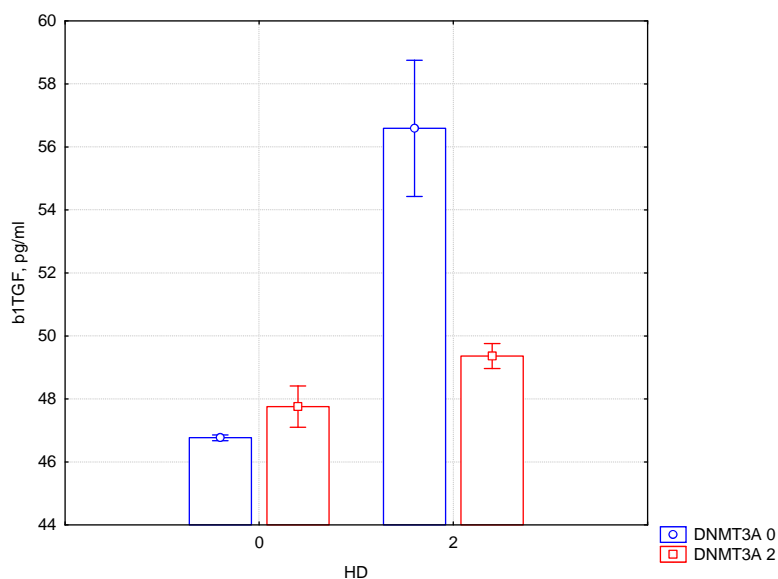


Рис. 5. Влияние *DNMT3A* и *HD* на продукцию *TGFβ1*

Проведенный анализ влияния исследуемых факторов в отношении *TGFβ1* свидетельствует о том, что *HD* определяет значимую ( $F=14,1$ ;  $p=0,0003$ ) стимуляцию его продукции, при существенно меньшем вкладе *DNMT3A* ( $F=4,2$ ;  $p=0,043$ ), так же стимулирующей продукцию *TGFβ1*. При этом следует отметить, что в отношении продукции данного цитокина, стимулируемую *HD*, *DNMT3A* действует как сдерживающий фактор, препятствуя росту концентрации фактора в супернатанте ( $F=7,3$ ;  $p=0,008$ ).

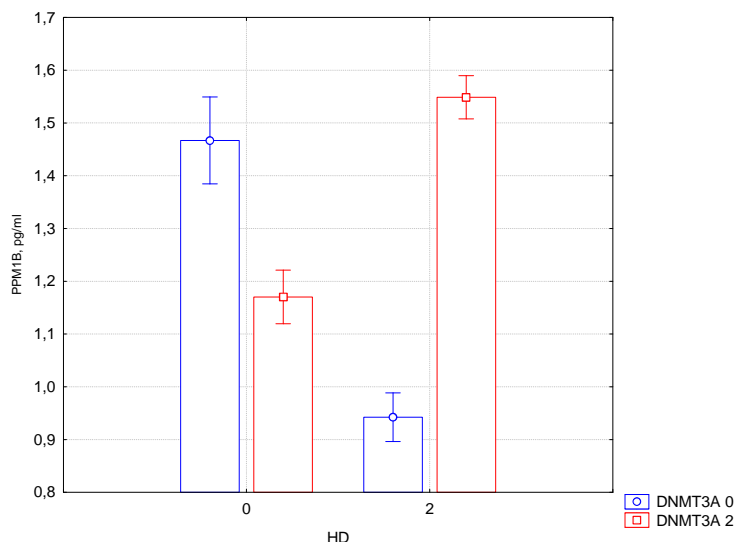


Рис.6. Влияние DNMT3A и HD на содержание PTP1B

Результаты оценки эффектов эпигенетических регуляторов на внутриклеточный уровень негативного регулятора активности сигнальных путей цитокинов – фосфатазы PTP1B свидетельствуют о том, что каждый из факторов в отдельности, в целом приводит к снижению содержания в МНК исследуемой фосфатазы. При этом уровень DNMT3A обеспечивает статистически значимый эффект ( $F=7,3$ ;  $p=0,008$ ), тогда как HD – тенденцию к снижению его уровня ( $F=1,6$ ;  $p=0,2$ ). Вместе с тем их совместное влияние характеризуется повышением содержания PTP1B в клетке ( $F=62,1$ ;  $p<0,0001$ ).

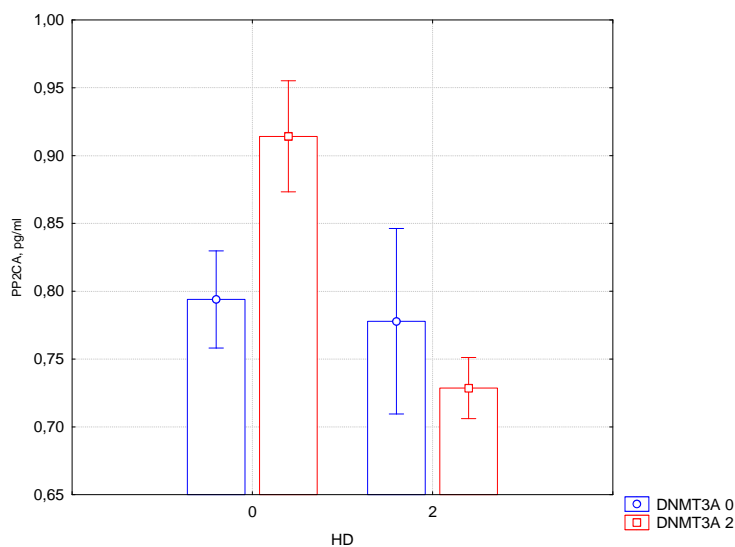


Рис.7. Влияние DNMT3A и HD на содержание PP2CA

Влияние исследованных факторов на содержание в МНК фосфатазы PP2CA не достигало статистической значимости. При этом, влияние HD проявлялось снижением ее уровня в клетке ( $F=3,2$ ;  $p=0,07$ ), тогда как DNMT3A – повышением ( $F=0,4$ ;  $p=0,52$ ). При совместном влиянии отмечалось тенденция к снижению содержания PP2CA, т.е. усиление отрицательного эффекта HD.

**Результаты и их обсуждение.** Цитокины относятся к важнейшим регуляторным молекулам, определяющим характер иммунного ответа. Их биологические эффекты зависят при этом от состояния внутриклеточных сигнальных путей, из которых наиболее важен JAK/STAT-сигнальный путь, определяющий чувствительность T-лимфоцитов к ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-17, интерферонам, проводящий внутрь клетки сигналы дифференцировки и активации T-хелперов-1, -2, -17. В формировании адаптивного иммунного ответа, а также регуляции интенсивности воспалительной реакции так же важна роль ИЛ-10 и TGFβ, обеспечивающих негативную регуляцию воспаления, за счет подавления активности T-хелперов 1 типа и макрофагов, активируя репаративные процессы в тканях. Негативная регуляция внутриклеточных сигнальных путей осуществляется супрессорами, дефосфорилирующими компоненты JAK/STAT пути, в

числе которых *SOCS*-белки, а также фосфатазы *PP2CA* и *PTP1B* [13]. При этом уровень продукции цитокинов определяется активностью экспрессии генов, в регуляцию которой вовлечены эпигенетические механизмы, контролируемые различными факторами, в том числе *DNMT* и *HD* [14, 15].

Таким образом, эпигенетические механизмы способны контролировать как продукцию цитокинов, так и чувствительность к ним иммунокомпетентных клеток, оказывая модулирующее влияние на формирование адаптивного иммунитета и активность воспалительного ответа [2-5, 16].

Анализ результатов проведенного исследования позволяют говорить о том, что эпигенетические регуляторы оказывают значимое влияние на продукцию клетками крови. При этом установлено стимулирующее влияние *DNMT3A* на продукцию ИЛ-4, ИЛ-17А, а также *ИФН $\gamma$* , однако уровень ИЛ-4 при этом изменяется более существенно. В отношении продукции ИЛ-10 и *TGF $\beta$ 1*, повышение содержания в клетке *DNMT3A* сопровождается снижением их концентрации в супернатанте. В свою очередь, повышение содержания в клетке *HD* ассоциируется со статистически значимым повышением уровня *TGF $\beta$ 1* и снижением продукции ИЛ-17А. Таким образом, проведенный анализ показал, что исследованные эпигенетические регуляторы оказывают противоположное влияние на продукцию исследованных цитокинов.

Анализ показал, что интегральные эффекты исследуемых эпигенетических факторов проявляются статистически значимым повышением уровня ИЛ-4, *TGF $\beta$ 1* и *ИФН $\gamma$* , на фоне снижения продукции ИЛ-17А и ИЛ-10. При этом следует отметить антагонистический характер взаимосвязи влияния исследуемых факторов на продукцию цитокинов. Таким образом, можно полагать, что повышение метилирования ДНК стимулирует экспрессию генов, в первую очередь ИЛ-4 и ИЛ-17, и ослабляет ИЛ-10 и *TGF $\beta$ 1*. При этом деацетилирование гистонов стимулирует экспрессию гена *TGF*, подавляя экспрессию гена ИЛ-17.

В отношении содержания в МНК фосфатаз, установлено стимулирующее влияние *DNMT3A* на *PPM1B*, при том что *HD* способствует снижению содержания в клетке *PP2CA*. Взаимовлияние указанных факторов сопровождается статистически значимым повышением содержания в МНК фосфатазы *PPM1B* и снижением уровня *PP2CA*. Соответствующие эффекты определяют участие эпигенетических механизмов в регуляции реактивности МНК в отношении цитокинов, за счет регуляции фосфорилирования *STAT* белков. При этом повышение содержания в МНК определяет регуляцию чувствительности *T*-хелперов и *B*-лимфоцитов, в связи с модулирующим влиянием на фосфорилирование *JAK2*, *TYK2*, *STAT5*, *STAT6* играющим важную роль в дифференцировке лимфоцитов [17].

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты позволяют говорить о том, что у практически здоровых лиц, процессы дифференцировки отдельных субпопуляций *T*-хелперов, в частности, *T*-хелперов 2 типа, *T*-хелперов 17 и *T*-рег, очевидно, находится под контролем эпигенетических механизмов [5, 6]. Кроме этого, так же очевидно, что под эпигенетическим контролем, реализующимся с участием ДНК-метилтрансфераз и деацетилаз гистонов находится и процесс поляризации макрофагов [8, 9]. При этом в каждом конкретном случае влияние исследованных факторов определяется их сочетанием, что требует комплексного подхода в изучении влияния эпигенетических механизмов на процессы формирования адаптивного иммунного ответа.

#### **Выводы:**

1. Результаты исследования выявили стимулирующее влияние *DNMT3A* в отношении продукции клетками крови ИЛ-4, ИЛ-17А и *ИФН $\gamma$* , наблюдающееся на фоне снижения продукции ИЛ-10 и *TGF $\beta$ 1*. В свою очередь, повышение содержания в клетке *HD* ассоциируется со статистически значимым повышением уровня *TGF $\beta$ 1* и снижением продукции ИЛ-17А.

2. Интегральные эффекты совместного влияния на цитокиновую продукцию *DNMT3A* и *HD*, заключаются в статистически значимом повышении в супернатанте концентрации ИЛ-4, *TGF $\beta$ 1* и *ИФН $\gamma$* , на фоне снижения уровня ИЛ-17А и ИЛ-10 при повышении в клетке исследованных регуляторов.

3. В отношении содержания в МНК фосфатаз, установлено стимулирующее влияние *DNMT3A* на *PPM1B*, и противоположное влияние *HD* на содержание в клетке *PP2CA*. Взаимовлияние указанных факторов сопровождается статистически значимым повышением уровня в МНК фосфатазы *PPM1B* и снижением *PP2CA*.

4. У практически здоровых лиц продукция цитокинов, определяющих формирование адаптивных иммунных реакций, в том числе за счет поляризации *T*-хелперов и макрофагов, отличается нелинейным характером взаимосвязи с уровнем *DNMT3A* и *HD*, реализуясь за счет изменения экспрессии соответствующих генов.

#### **Литература**

1. Терехов И.В., Бондарь С.С., Хадарцев А.А. Лабораторное определение внутриклеточных факторов противовирусной защиты при внебольничной пневмонии в оценке эффектов низкоинтенсивного СВЧ-излучения // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. № 61(6). С. 380–384.

2. Хадарцев А.А., Терехов И.В., Никифоров В.С., Бондарь С.С. Продукция цитокинов клетками цельной крови реконвалесцентов внебольничной пневмонии под влиянием низкоинтенсивного СВЧ-облучения // Вестник новых медицинских технологий (электронный журнал). 2014. URL:



<http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4815.pdf> (дата обращения 30.06.2014).

3. Хадарцев А.А., Зилов В.Г., Терехов И.В., Бондарь С.С. Взаимосвязь содержания в мононуклеарных лейкоцитах цельной крови в постклиническую фазу внебольничной пневмонии циклинов, циклинзависимых киназ и их ингибиторов под влиянием микроволн частотой 1 ГГц // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163, № 5. С. 578–581.
4. Хадарцев А.А., Логаткина А.В., Терехов И.В., Бондарь С.С. Влияние ингибитора ангиотензин-превращающего фермента на концентрацию в плазме крови цитокинов и вазоактивных молекул при артериальной гипертензии // Терапевтический архив. 2017. № 12.
5. Bierre H., Hamon M., Cossart P. Epigenetics and Bacterial Infections // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2012. №2(12). P. a010272. doi:10.1101/cshperspect.a010272.
6. Castro-Sánchez P., Ramirez-Munoz R., Roda-Navarro P. Gene Expression Profiles of Human Phosphotyrosine Phosphatases Consequent to Th1 Polarisation and Effector Function // Journal of Immunology Research. 2017. №2017. P. 8701042. doi:10.1155/2017/8701042.
7. Comer B.S., Ba M., Singer C.A., Gerthoffer W.T. Epigenetic targets for novel therapies of lung diseases // Pharmacology & therapeutics. 2015. №0. P. 91–110. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.006.
8. Du J., Johnson L.M., Jacobsen S.E., Patel D.J. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation // Nature reviews Molecular cell biology. 2015. №16(9). P. 519–532. doi:10.1038/nrm4043.
9. Kapellos T.S., Iqbal A.J. Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation // Mediators of Inflammation. 2016. №2016. P. 6591703. doi:10.1155/2016/6591703.
10. Koh H.B., Scruggs A.M., Huang S.K. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Increases DNA Methyltransferase 1 and 3a Expression through Distinct Post-transcriptional Mechanisms in Lung Fibroblasts // The Journal of Biological Chemistry. 2016. №291(37). P. 19287–19298. doi:10.1074/jbc.M116.723080.
11. Ladle B.H., Li K-P, Phillips M.J. De novo DNA methylation by DNA methyltransferase 3a controls early effector CD8<sup>+</sup> T-cell fate decisions following activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016. №113(38). P. 10631–10636. doi:10.1073/pnas.1524490113.
12. Leoni C., Montagner S., Rinaldi A. Dnmt3a restrains mast cell inflammatory responses // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2017. №114(8). E1490-E1499. doi:10.1073/pnas.1616420114.
13. Lu X., Malumbres R., Shields B. PTP1B is a negative regulator of interleukin 4-induced STAT6 signaling // Blood. 2008. №112(10). P. 4098–4108. doi: 10.1182/blood-2008-03-148726.
14. Mehta S., Jeffrey K.L. Beyond receptors and signaling: epigenetic factors in the regulation of innate immunity // Immunology and cell biology. 2015. №93(3). P. 233–244. doi:10.1038/icb.2014.101.
15. Mukherjee S., Vipat V.C., Chakrabarti A.K. Infection with influenza A viruses causes changes in promoter DNA methylation of inflammatory genes // Influenza and Other Respiratory Viruses. 2013. №7(6). P. 979–986. doi:10.1111/irv.12127.
16. Patel U., Rajasingh S., Samanta S., Cao T., Dawn B., Rajasingh J. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation // Drug discovery today. 2017. №22(1). P. 186–193. doi:10.1016/j.drudis.2016.08.006.
17. Pham D., Yu Q., Walline C.C., Muthukrishnan R., Blum J.S., Kaplan M.H. Opposing roles of STAT4 and Dnmt3a in Th1 gene regulation // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). 2013. №191(2). P. 902–911. doi:10.4049/jimmunol.1203229.
18. Samanta S., Rajasingh S., Cao T., Dawn B., Rajasingh J. Epigenetic Dysfunctional Diseases and Therapy for Infection and Inflammation // Biochimica et biophysica acta. 2017. №1863(2). P. 518–528. doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.030.
19. Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. Cell Communication and Signaling. 2017;15:23. doi:10.1186/s12964-017-0177-y.
20. Yu Q., Thieu V.T., Kaplan M.H. Stat4 limits DNA methyltransferase recruitment and DNA methylation of the IL-18R $\alpha$  gene during Th1 differentiation // The EMBO Journal. 2007. №26(8). P. 2052–2060. doi:10.1038/sj.emboj.7601653.

## References

1. Terekhov IV, Bondar' SS, Hadarcev AA. Laboratornoe opredelenie vnutrikletochnyh faktorov protivovirusnoj zashchity pri vnebol'nichnoj pnevmonii v ocenke ehffektov nizkointensivnogo SVCH-izlucheniya [Laboratory determination of intracellular antiviral defense factors in community-acquired pneumonia in the evaluation of the effects of low intensity microwave radiation]. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2016;61(6):380-4. Russian.
2. Hadarcev AA, Zinchenko YUP, Filatova OE. Vvedenie v biofiziku gomeostaticeskikh sistem (complexity) [Introduction to the Biophysics of homeostatic systems (complexity)]. Slozhnost'. Razum. Postneklassika. 2016;3:6-15. Russian.
3. Hadarcev AA, Terekhov IV, Nikiforov VS, Bondar' SS. Produktiya citokinov kletkami cel'noj krovi rekonvalescentov vnebol'nichnoj pnevmonii pod vliyaniyam nizkointensivnogo SVCH-oblucheniya [Production of cytokines by whole blood cells of patients with community-acquired pneumonia under the influence of low-intensity microwave irradiation]. Vestnik novykh medicinskih tekhnologij (ehlektronnyj zhurnal). 2014 [cited 2014 Jun 30]. Rus-

sian. Available from: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4815.pdf>.

4. Hadarcev AA, Zilov VG, Terekhov IV, Bondar' SS. Vzaimosvyaz' sodержaniya v mononuklearnykh lejko-citah cel'noj krovi v postklinicheskuyu fazu vnebol'nichnoj pnevmonii ciklinov, ciklinzavisimyykh kinaz i ih inhibitorov pod vliyaniem mikrovoln chastotoj 1 GGc [the interrelation between the content in mononuclear leukocytes of whole blood post-clinical phase of community-acquired pneumonia of cyclins, cyclin dependent kinases and their inhibitors under the influence of microwaves 1 GHz]. Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny. 2017;163(5):578-81. Russian.

5. Hadarcev AA, Logatkina AV, Terekhov IV, Bondar' SS. Vliyanie ingibitora angiotenzin-prevrashchayushchego fermenta na koncentraciyu v plazme krovi citokinov i vazoaktivnykh molekul pri arterial'noj gipertenzii [Effect of angiotensin-converting enzyme concentration in plasma cytokines and vasoactive molecules in arterial hypertension]. Terapevticheskij arhiv. 2017;12. Russian.

6. Bierne H, Hamon M, Cossart P. Epigenetics and Bacterial Infections. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2012;2(12):a010272. doi:10.1101/cshperspect.a010272.

7. Castro-Sánchez P, Ramirez-Munoz R, Roda-Navarro P. Gene Expression Profiles of Human Phosphotyrosine Phosphatases Consequent to Th1 Polarisation and Effector Function. Journal of Immunology Research. 2017;2017:8701042. doi:10.1155/2017/8701042.

8. Comer BS, Ba M, Singer CA, Gerthoffer WT. Epigenetic targets for novel therapies of lung diseases. Pharmacology & therapeutics. 2015;0:91-110. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.006.

9. Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. Nature reviews Molecular cell biology. 2015;16(9):519-32. doi:10.1038/nrm4043.

10. Kapellos TS, Iqbal AJ. Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation. Mediators of Inflammation. 2016;2016:6591703. doi:10.1155/2016/6591703.

11. Koh HB, Scruggs AM, Huang SK. Transforming Growth Factor-β1 Increases DNA Methyltransferase 1 and 3a Expression through Distinct Post-transcriptional Mechanisms in Lung Fibroblasts. The Journal of Biological Chemistry. 2016;291(37):19287-98. doi:10.1074/jbc.M116.723080.

12. Ladle BH, Li K-P, Phillips MJ, et al. De novo DNA methylation by DNA methyltransferase 3a controls early effector CD8<sup>+</sup> T-cell fate decisions following activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016;113(38):10631-6. doi:10.1073/pnas.1524490113.

13. Leoni C, Montagner S, Rinaldi A, et al. Dnmt3a restrains mast cell inflammatory responses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2017;114(8):E1490-E1499. doi:10.1073/pnas.1616420114.

14. Lu X., Malumbres R., Shields B., et al. PTP1B is a negative regulator of interleukin 4-induced STAT6 signaling. Blood. 2008;112(10):4098–108. doi: 10.1182/blood-2008-03-148726.

15. Mehta S, Jeffrey KL. Beyond receptors and signaling: epigenetic factors in the regulation of innate immunity. Immunology and cell biology. 2015;93(3):233-44. doi:10.1038/icb.2014.101.

16. Mukherjee S, Vipat VC, Chakrabarti AK. Infection with influenza A viruses causes changes in promoter DNA methylation of inflammatory genes. Influenza and Other Respiratory Viruses. 2013;7(6):979-86. doi:10.1111/irv.12127.

17. Patel U, Rajasingh S, Samanta S, Cao T, Dawn B, Rajasingh J. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. Drug discovery today. 2017;22(1):186-93. doi:10.1016/j.drudis.2016.08.006.

18. Pham D, Yu Q, Walline CC, Muthukrishnan R, Blum JS, Kaplan MH. Opposing roles of STAT4 and Dnmt3a in Th1 gene regulation. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). 2013;191(2):902-11. doi:10.4049/jimmunol.1203229.

19. Samanta S, Rajasingh S, Cao T, Dawn B, Rajasingh J. Epigenetic Dysfunctional Diseases and Therapy for Infection and Inflammation. Biochimica et biophysica acta. 2017;1863(2):518-28. doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.030.

20. Seif F, Khoshmirisafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. Cell Communication and Signaling. CCS. 2017;15:23. doi:10.1186/s12964-017-0177-y.

21. Yu Q, Thieu VT, Kaplan MH. Stat4 limits DNA methyltransferase recruitment and DNA methylation of the IL-18Rα gene during Th1 differentiation. The EMBO Journal. 2007;26(8):2052-60. doi:10.1038/sj.emboj.7601653.

#### **Библиографическая ссылка:**

Терехов И.В. Влияние ДНК метилтрансферазы 3а и гистондеацетилазы на содержание в мононуклеарных клетках цельной крови практически здоровых лиц фосфатаз *PTP1B* и *PP2CA*, а также продукцию цитокинов // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №4. Публикация 3-3. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/3-3.pdf> (дата обращения: 04.07.2018). DOI: 10.24411/2075-4094-2018-16103.\*

\* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/e2018-4.pdf>