

На правах рукописи

Денисова Елена Валерьевна

ФАРМАКОТЕРАПИЯ ПСОРИАЗА С УЧЕТОМ РОЛИ МЕТИЛИРОВАНИЯ  
ДНК В ГЕНАХ CD 3 КЛЕТОК.

14.01.10 - кожные и венерические болезни

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

30 НОЯ 2016



006660878

Москва 2016

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

**Научный руководитель:**

Российская академия наук Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук. Доктор медицинских наук, профессор  
**Пирузян Анастас Левонович**

**Научный консультант:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательское институт вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова» старший научный сотрудник, кандидат биологических наук **Владимир Васильевич Соболев**

**Официальные оппоненты:**

**Матусевская Елена Владиславовна** - доктор медицинских наук , профессор кафедры ФГОУ ДПО ИПК ФМБА России «Институт повышения квалификации Федерального медико – биологического агентства»

**Шарова Наталья Михайловна** – доктор медицинских наук, профессор кафедры дерматовенерологии педиатрического факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава РФ

**Ведущая организация:** ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

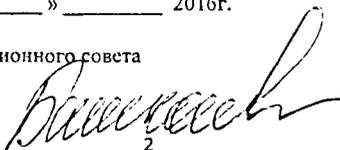
Защита состоится « 21 » декабря 2016 г. в 15.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.203.26 на базе РУДН «Российский университет дружбы народов» Министерства образования Российской Федерации **по адресу: Москва 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.10а аудитория 331**

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://dissovet.rudn.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Кандидат медицинских наук



Баткаева Н.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы:

Проблема исследования псориаза и разработка методов его терапии имеет многовековую историю, но, несмотря на это вопрос эффективной и безопасной терапии данного заболевания все еще остается актуальным. Псориаз является не только медицинской, но и социальной проблемой, поскольку за последнее десятилетие увеличилась доля распространенности тяжелых форм этого заболевания, приводящих как к ухудшению качества жизни и временной потери трудоспособности больных, так и к инвалидизации. Этиология и патогенез псориаза до сих пор до конца не выяснены. Однако было установлено, что псориаз является системным заболеванием, при котором поражаются не только кожный покров, но и другие органы и системы, в связи с чем ряд авторов рассматривает данную нозологию как «псориагическую болезнь» (Мордовцев В.Н. и др. 1992; Фитцпатрик Т. и др. 1999; Шилов В.Н., 2001; Altmeyer P. et al., 1996; Koo J. et al., 2004). На сегодняшний день лидирующие позиции занимают иммунологическая и генетическая теории этиологии псориаза. Это связано с выявленными нарушениями иммунной регуляции в коже больных псориазом, которые в свою очередь обусловлены сложными взаимодействиями различных генов и активируются триггерными факторами внешней среды, в результате чего активируются кератиноциты, лимфоциты, макрофаги и резидентные клетки дермы, вырабатывающие медиаторы иммунного ответа и воспаления, что усиливает пролиферацию неполноценных кератиноцитов и провоцирует развитие характерных для псориаза воспалительных изменений в коже (Пинсон И.Я., 2006; Prinz J., 2000; Kommieli T., 2004; Menter M. A. et al., 2003.). Более детальные исследования показали, что псориаз является мультигенным и многофакторным заболеванием с гетерогенным генетическим наследованием (Myashita T, et al.; 1994; Nair R. et al. 1999). С учетом выше сказанного становится ясно, что для эффективной диагностики, лечения и создания лекарственных препаратов является необходимым выявление критических звеньев патологического процесса при псориазе (Брускин С.А. и др., 2008; Campolmi P et al. 2002).

На сегодняшний день не существует единого подхода к терапии псориагической болезни (Короткий Н.Г., 1998; Косухин А. Б. и др. 1999; Владимиров В.В., 2002; Олисова О.Ю., 2004; Ferretti G., 2003; Gudjonsson JE, et al; 2007). Современные методы лечения направлены лишь на достижение и увеличение сроков ремиссии, снижению частоты рецидивов и предотвращение развития осложненной псориагической болезни. В настоящее время препаратами выбора преимущественно являются системные и местные препараты,

обладающие противовоспалительным и антипролиферативным действиями: кортикостероиды, цитостатики, иммуномодуляторы (Скрипкин Ю.К. и др. 1999, Молочков В.А., 1999; Томас П. 2006; Коо J. et al. 2004). Однако зачастую данные препараты обладают достаточно агрессивным действием в отношении гепатобиллиарной системы, функционирование которой и без того нарушено у многих больных с псориазом. В связи с этим гепатопротекторная терапия должна являться неотъемлемой частью системной терапии псориаза.

**Цель:** Разработать алгоритм терапии псориаза с учетом роли метилирования в патологическом процессе.

**Задачи:**

1. Изучить метилирование генов Т-лимфоцитов у здоровых индивидуумов и больных псориазом;
2. С помощью биоинформационного анализа базы данных провести выбор лекарственного препарата, влияющего на процесс метилирования;
3. Изучить влияние адеметионина на течение псориазического процесса посредством данных биохимических, клинических анализов крови и PASI;
4. Проанализировать эффективность фармакотерапии с учетом показателей качества жизни и отдаленных результатов;

**Научная новизна:**

Впервые проведено исследование метилирования *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2* в CD3+ клетках у больных псориазом.

С помощью биоинформационного исследования произведен выбор препарата, влияющего на процесс метилирования.

Разработанный алгоритм назначения адеметионина у больных псориазом демонстрирует высокую эффективность комбинированной терапии, выраженную в снижении индекса PASI, степени тревожности и улучшения качества жизни.

**Теоретическая и практическая значимость:**

Впервые изучен процесс метилирования в CD3+ клетках больных псориазом. На основании чего, с помощью биоинформационного исследования выбран препарат адеметионин. Разработан алгоритм назначения адеметионина у больных псориазом в

комплексной терапии, который открывает новые возможности для лечения соматически ослабленных пациентов, в частности с выраженным гепатобиллиарным синдромом. Использование предложенной комплексной терапии позволяет снизить уровень тревожности пациентов, повысить уровень качества жизни и увеличить межрецидивный период.

#### **Методология и методы исследования:**

Методология настоящего исследования спланирована с учетом современных принципов научного познания и организована адекватно поставленной цели. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов. В работе был использован современный комплекс клинических (сбор и подробный анализ данных анамнеза, определение степени тяжести псориаза, оценка эффективности терапии), лабораторных (общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, забор крови для изучения процессов метилирования) методов исследования. Был проведен биоинформационный анализ лекарственных средств с помощью реферативной базы данных ResNet® и программы PathwayStudio® компании AriadneGenomics (США).

Математическая обработка данных проводилась на персональном компьютере. Статистический анализ проведен с использованием прикладных программ Statistica 6.0 for Windows. Статистическая оценка результатов исследования проводилась при минимальном допустимом уровне вероятности (95%), стандартно используемом в медико-биологических исследованиях. Параметры нормальных распределений признаков в выборках описаны в формате  $M \pm sd$  (средние значения и средние квадратические отклонения). При сравнении показателей до и после лечения в различных группах применялся критерий Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

#### **Положения, выносимые на защиту :**

1. S-аденозилметионин, принимающий участие в реакциях переноса метильных групп, является эффективным средством в терапии псориаза.
2. Анализ уровня метилирования генов в CD3+ клетках больных является новым эффективным методом диагностики псориаза.
3. По уровню метилирования генов *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2* в CD3+ клетках можно определять предрасположенность к псориазу и, вероятно, проводить раннюю диагностику псориаза.

4. В результате сравнительного анализ действия адеметионина и фосфолипидов на течение псориатического процесса показана более высокая эффективность комплексной терапии с адеметионином на биохимические анализы крови и клинические проявления, качество жизни и степень тревожности у больных псориазом.

**Внедрение полученных результатов исследования в практику:**

Разработанный алгоритм терапии с применением адеметионина внедрен в практическую деятельность стационарного отделения ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии ДЗМ» и может быть рекомендован для широкого применения в работе дерматологических отделений и других специализированных центров.

Основные положения работы включены в программу образовательной деятельности ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии ДЗМ».

**Степень достоверности полученных результатов:**

Результаты исследования достоверны, что определяется достаточным объёмом исследования и применением современных методов статистической обработки и анализа.

**Апробация работы:**

Апробация работы проводилась на научно-практической конференции 23rd EADV Congress (Netherlands, Amsterdam, 08.10.2014), 22nd Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology Dermatovenerology in a Changing World, Istanbul, 2-6 октября 2013, Медицинский междисциплинарный форум «Здравоохранение Севастополя», г. Севастополь, 3-5 марта 2015.

**Личный вклад автора:**

Автором самостоятельно сформулированы цель и задачи работы, разработана программа исследования с определением направления, объема клинического наблюдения и методов обследования. Денисова Е.В. принимала непосредственное участие в организации и выполнении исследований по всем разделам диссертации: отбору пациентов, клиническому обследованию и назначению лечения больным, наблюдению их в динамике, оценке клинической эффективности и переносимости лечения, забору материала для исследования. Автором самостоятельно проведены анализ и статистическая обработка полученных данных, сформулированы основные научные положения работы, выводы и практические рекомендации.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности:**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 14.01.10 - кожные и венерические болезни. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности.

**Публикации:** По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 4 в рецензируемых изданиях.

**Структура и объем диссертации:** Диссертация изложена на 109 страницах, машинописного текста, иллюстрирована 10 таблицами, 22 графиками и фотографиями, состоит из введения и трех глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты собственных исследований», а также заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 175 источников (96 на русском и 79 – на иностранных языках).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Клинические исследования проводились на базе ГКБ №14 им. В.Г. Короленко в период 2012-2013 гг. за указанный период времени под нашим наблюдением на стационарном лечении находились 253 пациента, из них 103 мужчины и 150 женщины. У 116 (46 %) был установлен диагноз распространенный экссудативный псориаз и псориатический артрит, у 92 (36 %) - распространенный экссудативный псориаз, у 22 (9 %) – псориатическая эритродермия и псориатический артрит, у 12 (5%) – псориатическая эритродермия, и у 11 (4%) ладонно-подошвенная форма псориаза.

Для контроля исследования был разработан протокол наблюдения больных, одобренный этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН, в котором были отражены этнологических и патогенетических особенности и различные формы заболевания. Клиническое и лабораторно-инструментальное обследование включало изучение анамнеза жизни, заболевания, общего и локального статуса, определение индекса PASI, клинического и биохимического анализов крови, исследование крови для изучения процесса метилирования. Каждый пациент получил подробную информацию о проводимом исследовании и дал информированное согласие на участие в исследовании.

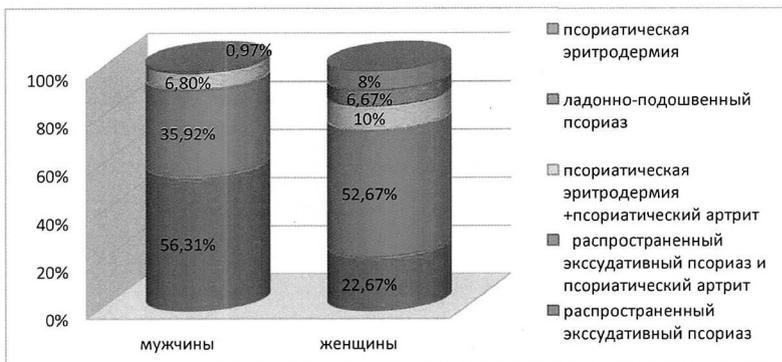
В соответствии с поставленными задачами было проведено открытое рандомизированное контролируемое исследование.

Данный метод (в нашем исследовании: рандомизация простая, с использованием таблицы случайных цифр) позволил провести равномерное распределение больных по возрасту, длительности и тяжести заболевания (таблица 1).

**Таблица 1 - Общая характеристика пациентов, включенных в исследование**

Включение в исследование:	При соответствии критериям включения, при отсутствии критериев исключения
Рандомизация	Случайная
Общее количество пациентов	n = 253
Пол: мужской	n = 103(41%)
Женский	n = 150(59%)

Было отмечено, что среди мужчин основная масса пациентов - 58 (56,31 %) страдала распространенным экссудативным псориазом, в то время как большинство женщин 79 (52,67%) – сочетанной формой распространенного экссудативного псориаза и псориазического артрита. У 37 (35,92%) мужчин выявлен артропатический псориаз, сочетанный с распространенным экссудативным псориазом и у 34 (22,6 %) женщин - распространенный экссудативный псориаз, у 7 (6,8 %) мужчин и 15 (10%) женщин – псориазическая эритродермия, сочетанная с артропатическим псориазом, у 0,97% мужчин и 6,67 % женщин ладонно-подошвенный псориаз; и у 8% женщин – псориазическая эритродермия (рисунок 1).



**Рисунок 1 - Распределение удельного веса форм псориаза среди мужчин и среди женщин**

При сборе анамнеза и в ходе обследования больных мужчин с псориазом были выявлены наиболее часто диагностируемые сопутствующие заболевания: у 63% диагностированы заболевания желудочно-кишечного тракта (язвенная болезнь, гастрит, энтероколит, холецистит, печеночная патология), у 47,6% диагностирована сердечно-сосудистая патология (ИБС, гипертоническая болезнь), у 8,7% - заболевания эндокринной системы (сахарный диабет, аутоиммунный тиреоидит, гипотиреоз), у 7,8 % -- заболевания дыхательной системы и ЛОР-органов (хронический тонзиллит, бронхиальная астма). В то время как среди женщин доля патологии желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистые заболевания составляли 26,0% и 26,7% соответственно. У 10% женщин наблюдалась патология эндокринной системы, у 8%- заболевания органов дыхания (рисунок 2).



**Рисунок 2 - Распределение удельного веса сопутствующих патологий среди мужчин и среди женщин**

В качестве предшествующей терапии 57% пациентов получали метотрексат с разным количеством туров, на фоне которого появились изменения в биохимическом анализе крови. 32% ранее получали ПУВА-терапию, что также отразилось на биохимических показателях. У остальных пациентов (мужчин) изменения данных показателей произошло из-за злоупотребления алкогольными напитками.

Все пациенты были разделены на две группы. Первая группа из 145 человек помимо стандартной терапии (физ. раствор, 10% глюконат кальция, наружная терапия), в качестве гепатопротектора был выбран адеметионин. Вторая группа из 108 человек получала аналогичную стандартную терапию, в качестве гепатопротектора применялся Эссенциале-Н-Форте (фосфолипиды).

Первичное обследование пациентов включало в себя общеклиническое исследование, дерматологический осмотр и оценку PASI, определении биохимических параметров крови, клинических лабораторных показателей крови, общеклиническом исследовании мочи, рентгенологическое исследование. Оценка PASI производилась до и после проведения терапии

**В клиническое обследование** входили сбор жалоб, предъявляемых пациентами, изучение анамнеза с учетом факторов риска развития псориаза (семейная предрасположенность, вредные привычки, характер и особенности питания, прием лекарственных препаратов по поводу терапии сопутствующих заболеваний), длительность течения псориаза и эффективность ранее проводимого лечения, а также продолжительность ремиссии.

Одним из важных симптомов у больных псориазом является зуд, однако, данный показатель в вышеуказанный индекс PASI не входит, в связи с этим, при оценке эффективности лечения отдельно учитывалась динамика показателя зуда кожных покровов. Данный симптом также оценивался по 5-ти бальной шкале от 0 до 4 (0 – проявления признака отсутствуют, 1 – незначительно выражен, 2 – умеренные проявления, 3 – выраженные проявления, 4 – резкая выраженность признака).

Критериями клинической оценки эффективности терапии были взяты следующие интервалы уменьшения индекса:

- Клиническая ремиссия - уменьшение PASI на 75% и более от исходного показателя;
- Значительное улучшение регистрировалось при уменьшении PASI более 50 до 74%;
- За незначительное улучшение принимался регресс PASI от 25 до 49 %;
- Неудовлетворительным считался результат при уменьшении PASI менее 25 % и оценивался «без эффекта».

**Качество жизни** пациентов до и после проводимой терапии оценивалось с использованием дерматологического индекса качества жизни – Dermatology Life Quality Index (DLQI). Степень влияния заболевания на качество жизни больных определяется по четырехбалльной шкале Likert (0 – нет, 1 – немного, 2 – умеренно, 3 – очень сильно). Ответ «неактуально» оценивается в 0 баллов. Сумма из десяти ответов составляла индекс DLQI, который находился в пределах от 0 до 30. Максимальное значение (30 баллов) соответствует существенному ухудшению качества жизни за счет болезни.

## **Тест Спилбергера (State-Trait Anxiety Inventory, STAI)**

Психо-эмоциональный статус пациентов оценивался по тесту Спилберга. Тест Спилбергера состоит из 20 высказываний, относящихся к тревожности как состоянию (состояние тревожности, реактивная или ситуативная тревожность) и из 20 высказываний на определение тревожности как диспозиции, личностной особенности (свойство тревожности).

Уровень тревожности до 30 баллов считается низким, от 30 до 45 баллов - умеренным, от 46 баллов и выше - высоким. Минимальная оценка по каждой шкале - 20 баллов, максимальная - 80 баллов.

### **Лабораторные и инструментальные методы исследования**

В соответствии с задачами исследования, было проведено лабораторно-инструментальное обследование пациентов, включавшее клинический анализ крови, биохимический анализ крови, забор крови для изучения процесса метилирования.

Метилирование ДНК является важным элементом контроля экспрессии генов в клетках млекопитающих. Это регулируемый процесс и предполагается, что он играет важную роль в регуляции экспрессии генов. Нарушение механизма метилирования ДНК существенно влияет на развитие различных патологий.

В своей работе мы провели анализ статуса метилирования генов Т-лимфоцитов у здоровых индивидуумов и больных псориазом до лечения. После обработки образцы ДНК гибридизовали с BeadChips. На заключительном этапе анализа чипы сканировали при помощи HiScanSQ System (Illumina, USA). Полученные изображения анализировали с помощью биоинформатических методов.

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

### **Метод статистической обработки данных**

Статистический анализ проведен с использованием прикладных программ Statistica 6.0 for Windows. В данной программе для обработки полученных результатов применяется альтернативный метод вариационной статистики с вычислением средней арифметической ( $M$ ), средней ошибки ( $m$ ), среднеквадратичного отклонения ( $g$ ), коэффициента достоверности ( $P$ ) по таблице Стьюдента ( $t$ ). Статистическая оценка

результатов исследования проводилась при минимальном допустимом уровне вероятности (95%), стандартно используемом в медико-биологических исследованиях. Параметры нормальных распределений признаков в выборках описаны в формате  $M \pm sd$  (средние значения и средние квадратические отклонения). При сравнении показателей до и после лечения в различных группах применялся критерий Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Метилирование

В своей работе мы провели анализ статуса метилирования генов Т-лимфоцитов у здоровых индивидуумов и больных псориазом до лечения.

Забор крови производился у группы волонтеров больных псориазом и группы здоровых людей. С помощью микрочипов Illumina был проведен анализ статуса метилирования в геномах Т-клеток полученных от 10 больных псориазом и 11 здоровых волонтеров.

В результате были выявлены локусы, дифференциально метилированные в CD3+ клетках больных псориазом и здоровых индивидуумах. Среди наиболее метилированных локусов в CD3+ клетках больных псориазом выделяются гены киназ *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2*

**Таблица 2. Наиболее метилированные гены киназ в CD3+ клетках больных псориазом и здоровых индивидуумов**

№	P-Value	Pval Adj	$\beta$ -Difference	Средняя $\beta$ у здоровых	Средняя $\beta$ у больных	Локализация, хромосома	Ген	Функции
1	1.0E-06	6.8E-05	0,153	0,313	0,159	6	FRK	<b>Fyn-related kinase</b> Белок относится к группе киназ типа TYR. Играет роль в подавлении роста и во время G1 S фаз клеточного цикла.

Продолжение таблицы 2

2	1.5E -07	2.0E -05	- 0,18 1	0,447	0,628	1	JAK 1	<b>Janus kinase 1 (JAK1)</b> , относится к группе protein-tyrosine kinases (PTK), характеризующиеся наличием второго phosphotransferase-related домена domain immediately N-terminal to the PTK домена. JAK1 is вовлечена в пути передачи сигнала интерферона альфа/бета/гамма
3	7.0E -06	2.1E -04	- 0,16 3	0,406	0,569	6	AK AP7	<b>A kinase (PRKA) anchor protein 7</b> фермент группы A-kinase anchoring protein (AKAP), присоединяется к регуляторной субъединице (RII) cAMP-dependent protein kinase A (PKA)
4	4.6E -08	9.5E -06	- 0,14 7	0,419	0,565	21	DY RK1 A	<b>Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A</b> Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK), катализирует автофосфорилирование сериновых /треониновых/тирозиновых остатков, играет роль в сигнальных путях регуляции клеточной пролиферации, играет роль в развитии мозга.
5	5.1E -11	1.6E -07	- 0,14 4	0,568	0,712	17	PRK CA	<b>Protein kinase C, alpha</b> киназа C (PKC) серин- треонин специфичных белков, активируется кальцием и вторичным мессенджером диацилглицеролом. Продукт этого гена играет роль в клеточной трансформации, клеточной адгезии и cell volume control.

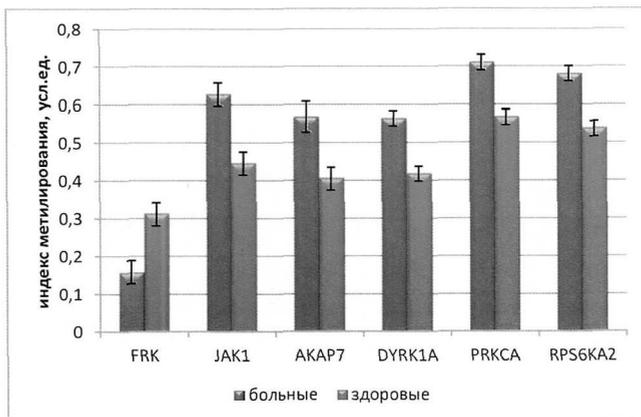
Продолжение таблицы 2

6	1.1E-08	4.0E-06	- 0,14 3	0,538	0,682	6	RPS 6KA 2	<b>Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2</b> белок группы RSK (ribosomal S6 kinase) сериновых/треониновых киназ. Содержит 2 неидентичных катализирующих домена и фосфорилирует различные субстраты, включая mitogen-activated kinase (MAPK) signalling pathway. Активность белка контролирует клеточный рост и клеточную дифференциацию.
---	---------	---------	----------------	-------	-------	---	-----------------	--

Чипы Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip анализировали с помощью модуля Methylation 1.9.0 Illumina GenomeStudio . Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip-новые чипы, позволяющие проанализировать более 450.000 метилированных CpG сайтов внутри человеческого генома.

Четкое разделение образцов на две группы – больных псориазом и здоровых людей, позволяет предположить, что по уровню метилирования генов *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2* в CD3+ клетках можно определять предрасположенность к псориазу и, вероятно, проводить раннюю диагностику псориаза.

Проведя сравнительный анализ изучаемых генов по уровню их метилирования можно отметить, что большинство из них наиболее метилированы в CD3+ клетках больных псориазом людей по сравнению со здоровыми индивидуумами (рисунок 3). Однако у гена *FRK* уровень метилирования, почти в два раза, выше в CD3+ клетках здоровых индивидуумах по сравнению с больными псориазом до лечения, т.е. у больных он наиболее деметилирован и, возможно, наиболее активно транскрибируется.



**Рисунок 3 - Уровень метилирования *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2* генов в CD3+ клетках больных псориазом людей и здоровых людей**

Ген *FRK* относится к группе киназ типа TYR. Играет роль в подавлении роста и во время G1 S фаз клеточного цикла и активная его транскрипция во время псориазического процесса вполне логична, так как при псориазе происходит гиперпролиферация кератиноцитов.

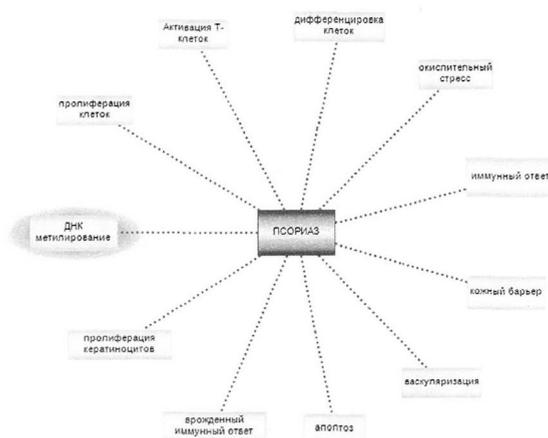
Скорее всего, наблюдаемое при псориазе массовое метилирование CpG-островков (неметилированных в норме) обусловлено, по-видимому, не собственно реакцией *de novo*, а скорее механизмом спрединга, результаты активности которого закрепляются поддерживающим метилированием в ряду поколений гиперпролиферирующих кератиноцитов. Но, тем не менее, полученные результаты свидетельствуют о явной роли метилирования генов *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2* в CD3+ клетках в развитии псориазического процесса.

### **Биоинформационный подход к выбору лекарственного препарата**

Следующим этапом нашей работы предстояло определиться с выбором лекарственного препарата влияющего на процесс метилирования. Для этого было решено провести биоинформационную работу с помощью реферативной базы данных ResNet® и программы PathwayStudio® компании AriadneGenomics (США). Объектами базы данных ResNet являются аннотации биологических объектов в том числе клеточных процессов и малых молекул, а также аннотации функциональных связей между ними, сформированные в результате обработки текстового массива полнотекстовых статей и

абстрактов, индексированных в Medline. Значимость, объединенных общей функцией процессов и малых молекул, оценивалась по тому, насколько пересечение их множества, приписанных к данной категории, превышало ожидаемый размер. Гипергеометрическое распределение использовали в качестве модели случайного пересечения множеств.

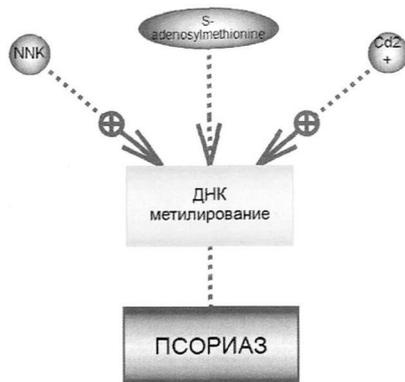
При помощи программы производится расклад процессов по приоритетам, исходя из того, что чем меньше р-значение, тем больше вероятность того, что процессы, относящиеся к заболеванию, включены туда не случайно. Нами был проанализирован список клеточных процессов, которые достоверно регулируется при псориазе по литературным данным. Было выявлено, что 103 клеточных процесса участвуют в патологическом процессе псориаза. Из полученных данных были отобраны процессы с наибольшим количеством ссылок. При этом оказалось, что наиболее релевантными являются только 11 процессов (рисунок 4). В число наиболее релевантных процессов так же вошло и метилирование, что подтверждает полученные нами ранее результаты.



**Рисунок 4 - Клеточные процессы вовлеченные в патологический процесс развития псориаза**

Далее нами был проанализирован список малых молекул, которые достоверно регулируют процесс метилирования при псориазе. Было выявлено 437 малых молекул достоверно регулирующих процесс метилирования при псориазе. Из полученных данных, так же были отобраны молекулы с наибольшим количеством ссылок и ранее не используемые в терапии псориаза. Предъявляемым условиям соответствовали только три

малые молекулы, это NNK (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone), Cd<sup>2+</sup> (Cadmium, isotope of mass 115) и S-adenosylmethionine (Heptral) (рисунок 5).



**Рисунок 5 - Малые молекулы, влияющие на процесс метилирования, но ранее не изучавшиеся в контексте развития псориаза**

Nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK), так же известный как 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone является ключевым компонентом табака и играет важную роль в канцерогенезе. Исходя из факта, что NNK являясь мутагеном и играя очень важную роль в замыкание генов, модификации и функциональных нарушениях, которые вызывают раннее развитие канцерогенеза, мы не можем рассматривать его в качестве лекарственного препарата для терапии псориаза.

Соединения кадмия, так же являются высоко токсичными и и не могут рассматриваться в качестве лекарственного препарата для терапии псориаза.

S-аденозилметионин — это кофермент, принимающий участие в реакциях переноса метильных групп. В клетке участвует в таких метаболических путях, как трансметилирование, транссульфирование и аминопропилирование. Метильная группа (CH<sub>3</sub>), которая присоединена к атому серы в молекуле метионина, в составе S-аденозилметионина является химически активной. Поэтому метильная группа может быть перенесена на молекулу субстрата в трансметилазной реакции. Более сорока метаболических реакций требуют переноса метильной группы от S-аденозилметионина на такие субстраты, как нуклеиновые кислоты, белки и липиды. Известно так же и терапевтическое применение этого препарата. Однако в терапии псориаза он не применялся.

С учетом всех перечисленных фактов было принято решение провести изучение терапевтического действия S-аденозилметионина на псориаз.

### Результаты лабораторных исследований

Проведенный биохимический анализ крови показал, что среди пациентов с псориазом мужского пола по сравнению с пациентами женского пола, в большей степени распространены и более выражены изменения показателей АлАТ, АсАТ и общего билирубина. Так, у мужчин отмечалось повышение АлАТ в 2,5 раза выше нормы, АсАТ – в 1,85 раза, общего билирубина – в 1,38 раза, в то время как у женщин уровень показателей АлАТ и АсАТ превышал границы нормы лишь в 1,2 раза и 1,15 раза соответственно, а уровень общего билирубина находился в пределах нормы. Среди всех пациентов мужского пола повышенное содержание АлАТ наблюдалось у 46% , АсАТ – у 53%. Высокая концентрация общего билирубина в крови отмечалась у 58% больных мужского пола. В ходе проведенного курса терапии гепатопротекторами повышенные показатели биохимии крови у мужчин значительно снизились. Так, уровни АлАТ и АсАТ уменьшились в 1,5 раза по сравнению с исходными величинами, а уровень общего билирубина снизился в 1,2 раза.

Все пациенты с признаками печеночной патологии были разделены на две группы. Первая группа в качестве гепатопротектора получала препарат Гептрал, вторая группа – Эссенциале Н Форте.

**Таблица 3 - Биохимические показатели крови до и после лечения у пациентов с псориазом**

Показатели	I группа (основная)		II группа (контрольная)		Норма
	Базисная терапия, включавшая Гептрал		Базисная терапия, включавшая Эссенциале-Н-Форте		
	До лечения	После	До лечения	После	
АлАТ	66,1± 1,3	42,6± 1,4*	67,2± 3,1	52,4± 3,1*	5-40
АсАт	42,1± 1,1	37,6± 1,2	40,1± 2,1	38,1± 1,8	10-37
Общий билирубин	22,5± 1,4	19,9± 2,0*	22,9± 1,4	19,1± 1,8*	8,5-20,5

\*р- достоверно значимое различие( р<0,05)

В ходе терапии в группе пациентов, получавших Гептрал, уровень АЛТ снизился на 36% по сравнению с первоначальными повышенными значениями, в то время как в группе пациентов, получавших гепатопротекторную терапию Эссенциале Н Форте, значения АЛТ снизились лишь на 22%. Содержание АСТ у пациентов, принимавших Гептрал, уменьшилось на 11%, приблизившись к верхней границе нормы, у пациентов, получавших Эссенциале Н Форте, уровень АСТ снизился лишь на 5%. Содержание общего билирубина в крови в обеих группах снизилось до нормальных значений. Необходимо отметить, что в результате проведенной гепатопротекторной терапии улучшились не только биохимические показатели крови, но и наблюдался значительный положительный эффект в отношении кожного процесса.

Также в процессе терапии оценивались данные клинического исследования крови. До лечения гематологические показатели были в пределах нормы, исключая отдельных больных, у которых наблюдалось снижение содержания гемоглобина, количества эритроцитов, небольшой лейкоцитоз и повышение СОЭ.

#### **Изменение индекса PASI**

Всем пациентам до начала и после терапии проводилось изменения индекса PASI, позволяющего оценить степень поражения кожных покровов. Полученные результаты представлены в таблице 4.

**Таблица 4 - Изменение индекса PASI на фоне терапии гепатопротекторами**

Показатели	I группа (основная)		II группа (контрольная)	
	Базисная терапия, включавшая Гептрал		Базисная терапия, включавшая Эссенциале-Н-Форте	
	До лечения	После	До лечения	После
Индекс PASI	29,6±2,4	7,1±0,6	30,5±1,8	10,1±0,6

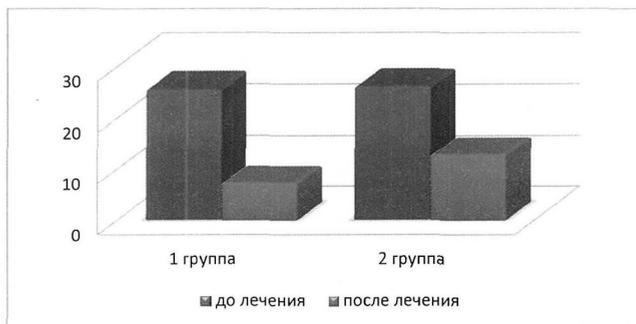
\*р- достоверно значимое различие(  $p < 0,05$ )

Как мы видим, Средний балл индекса PASI до начала терапии в группе, принимавшей Гептрал, составлял 29,6 балла, а в группе пациентов, получавших Эссенциале Н Форте- 30,5 балла. После проведенной терапии индекс PASI в обеих группах снизился до 7,1 и 10,1 балла, соответственно.

Таким образом, в группе пациентов, получавших Гептрал, индекс PASI уменьшился в 4,2 раза, в то время как у пациентов, принимавших Эссенциале Н Форте, - в 3 раза.

## Изменение ДИКЖ

Также все пациенты до начала и после проведения терапии проходили анкетирование для определения дерматологического индекса качества жизни (ДИКЖ). Для этой цели использовался вопросник, русифицированный Н.Г. Кочергиным (2001).



**Рисунок 6 - Изменение ДИКЖ в процессе терапии**

Результаты изменения оценки качества жизни пациентов на фоне терапии представлены на рисунке 1. Как мы видим, средний балл качества жизни до начала терапии в группе, принимавшей Гептрал, составлял 25,6 балла, а в группе пациентов, получавших Эссенциале Н Форте- 26,1 балла. После проведенной терапии ДИКЖ в обеих группах снизился до 7,2 и 12,8 балла, соответственно.

### Изменение психо-эмоционального статуса

Проведенное исследование по тесту Спилберга для определения личностной тревоги пациентов показало высокий уровень тревожности у пациентов обеих групп.

**Таблица 5 - Динамика показателей личностной тревоги по тесту Спилберга**

	1 группа	2 группа
До лечения	51,2±0,7	50,6±0,81
После лечения	33,4±0,65*	42,8±1,2

\* $p \leq 0,05$

После применения курса адеметионина отмечается значительное снижение уровня тревожности, улучшение общего эмоционального состояния и самочувствия.

## Отдаленные результаты терапии

Динамическое наблюдение за пациентами обеих групп в течение года показало, что 18,6% пациентов в первой группе вообще не имело обострений, у 66,9% пациентов обострение наступило через 6 и более месяцев после окончания терапии, тогда как во второй группе 67,6% пациентов обратились с рецидивом через 6 и более месяцев

## ВЫВОДЫ

1. Проведенный анализ статуса метилирования генов Т-лимфоцитов выявил локусы, дифференциально метилированные в CD3+ клетках больных псориазом и здоровых индивидуумах. Наиболее метилированными локусами в CD3+ клетках больных псориазом являются гены киназ *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2*. Ген *FRK* наиболее гипометилирован у больных псориазом относительно здоровых индивидуумов.

2. Кластерный анализ образцов, полученных от здоровых и больных пациентов, позволил получить четкое разделение на 2 группы – больных псориазом и здоровых людей, что позволяет предположить, что по уровню метилирования генов *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2* в CD3+ клетках можно определять предрасположенность к псориазу.

3. Проведенный биоинформационный анализ с помощью реферативной базы данных ResNet и программы PathwayStudio позволил отобрать лекарственный препарат (S-аденозилметионин), принимающий участие в реакциях переноса метильных групп, и ранее не использовавшийся в терапии псориаза.

4. Сравнительный анализ действия адеметионина и фосфолипидов на течение псориазического процесса показал, что адеметионин повышает эффективность комплексной терапии, что видно по динамике данных биохимии крови. У пациентов, получавших адеметионин, уровень АЛТ снизился на 36%, значения АЛТ снизились на 22%, содержание АСТ уменьшилось на 11%, приблизившись к верхней границе нормы;

5. Применение адеметионина в комплексной терапии псориаза снизило индекс PASI более чем в 3 раза ( до лечения 29,6 +/- 2,4, после 7,1 +/- 0,6), увеличило межрецидивный период. Обострение наступило через 3-6 месяцев в первой группе у 47,6% пациентов, в то время как за этот же период обострение отмечено у 87% пациентов второй группы.

6. После проведенной терапии ДИКЖ у пациентов получавших адеметионин снизился до 7,2 балла, более чем в 3 раза по сравнению с началом терапии, а степень

тревожности, определяемая по тесту Спилберга, уменьшилась на 65%. ( до лечения 51,2 +/- 0,7; после лечения 33,4 +/- 0,65)

#### **Практические рекомендации**

1. У пациентов с гепатобилиарными изменениями необходимо включение в терапию препаратов, способствующих нормализации биохимических показателей крови.

2. При псориазе необходимо проводить не только тщательное клиническое обследование, но и проводить психо-эмоциональное тестирование.

3. При констатации наличия проблем в психо-эмоциональном статусе предпочтение стоит отдавать адеметионину, ввиду его положительного влияния на нервную систему.

4. Внедрение анализа уровня метилирования гена FRK в CD3 клетках , позволяющего не только раннюю диагностику псориаза , но и начать раннюю патогенетически обусловленную терапию .

#### **СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Денисова Е.В. Коморбидность сердечно-сосудистой патологии и хронических дерматозов на примере псориаза. Подходы к диагностике и лечению/ Е.В. Денисова, Л.В. Егоренкова, И.М. Корсунская, М.Т. Миннибаев// **Больница. Все для ЛПУ.-2012.- №3.-С. 33-37.**
2. Денисова Е.В. Метилирование генов в CD3+ клетках при псориазе/ Е.В. Денисова, В.В. Соболев, А.Г. Соболева, И.М. Корсунская ,Е.В. Чекалин, А.Д. Золотаренко, С.А. Брускин// **Российский журнал кожных и венерических болезней. -2013. -№1.-С.40-43.**
3. Денисова Е.В. Особенности гомеопатических препаратов в терапии псориаза/ Е.В. Денисова, Л.Ш. Тогоева, О.О. Мельниченко, Е.А. Буткалюк, И.М. Корсунская// **Приложение к журналу Consilium Medicum Дерматология.- 2014.-№2.-С.36-39.**
4. Денисова Е.В. Новое в патогенетической терапии псориаза, Е.В. Денисова, И.М. Корсунская, М.М. Резникова, Л.Т. Тогоева, С.С. Аветикян, З.Г. Фаттехитдинова , Л.В. Егоренкова ,В.Н. Авакян // **Доктор.ру.-2005.-№3.-С. 6-10.**
5. Денисова Е.В. Антигистаминные препараты в решении проблемы кожного зуда, Е.В. Дворянкова, И.М. Корсунская, Л.Р. Сакания, Л.Ш. Тогоева, Е.В. Денисова, А.А. Лавров // **Клиническая дерматология и венерология – 2013 - № 3 - С. 88-92.**

6. Денисова Е.В. Особенности течения буллезного пемфигонда у лиц пожилого возраста, Трофимова И.Б., Резникова М.М., Фатхетдинова З.А., Путинцев А.Ю., Денисова Е.В. // *Лечащий врач* – 2013 - №6 – С. 63-67
7. Денисова Е.В. Новый подход к комплексной терапии псориаза/ Е.В. Денисова, В.В. Соболев, И.М. Корсунская, А.А. Лавров, Л.Г. Кривошапов// *Клиническая дерматология и венерология.-2015.-№2.-С. 79-82.*
8. Denisova E. Methylation of genes in skin biopsies from patients with psoriasis, E. Denisova, A. Lavrov, I. Korsunskaya, A. Zolotareno, E.Chekalin, S. Bruskin //23rd EADV Congress. Amsterdam .08.10.2014.
9. Денисова Е.В. Крем Лостерин в терапии заболеваний, сопровождающийся нарушением кератинизации. Сакания Л.Р., Дорджиева О.В., Невозинская З.А., Денисова Е.В., Корсунская И.М.//*Эффективная фармакотерапия, дерматовенерология и дерматокосметология – 2015 - № 3- С.12-14*

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ:

АлАТ – аланинаминотрансфераза;	DLQI – dermatology life quality index
АсАТ – аспаратаминотрансфераза;	DYRK1A - Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A
ДИКЖ – динамика индекса качества жизни	FRK - Fyn-related kinase
ИБС – ишемическая болезнь сердца	JAK1 - Janus kinase 1
ПУВА – фотохимиотерапия с использованием псораленов и УФА;	NNK - Nicotine-derived nitrosamine ketone
СОЭ – скорость оседания эритроцитов	PASI – Psoriasis Area and Severity Index – индекс оценки кожных проявлений псориаза.
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания	PRKCA - Protein kinase C, alpha
АКАР7- A kinase (PRKA) anchor protein 7	RPS6KA2 - Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2
Cd2+ - Cadmium, isotope of mass 115	STAI - State-Trait Anxiety Inventory
CD3+ - Т-цитотоксические лимфоциты	

## АННОТАЦИЯ

Работа посвящена изучению фармакотерапии псориаза с учетом роли метилирования ДНК в генах CD3 клеток. Целью настоящего исследования явилась разработка терапии псориаза основанная на значении процесса метилирования в патогенезе данного дерматоза. В работе освещены проблемы коморбидности псориаза и заболеваний гепатобилиарной системы. Приведенные эпидемиологические данные о поражении печени при псориазе, подтверждают несомненный интерес к препаратам, оказывающим влияние не только на изменения со стороны гепатобилиарной системы, но и на течение псориаза. В работе по результатам изучения метилированной Т-лимфоцитов с помощью биоинформационного анализа подобран препарат адеметионин и проведено исследование его влияния на течение псориазического процесса посредством сравнения данных клинических, биохимических анализов крови и индекса PASI. Показана эффективность выбранного препарата в комплексной терапии псориаза, что подтверждено данными биохимических анализов крови, динамикой индекса PASI, а также положительными изменениями дерматологического индекса качества жизни и степени тревожности, оцененному по тесту Спилберга. Внедрение анализа уровня метилирования гена FRK в CD3 клетках позволит провести раннюю диагностику псориаза, что в свою очередь даст возможность проведения ранней эффективной патогенетической терапии.

## ABSTRACT

The presented work covers the study of psoriasis pharmacotherapy with considering the role of DNA methylation in genes CD3 cells. The goal of this research is development of the therapy of psoriasis based on significance of methylation in the pathogenesis of this dermatosis. This research highlights the problem of comorbidity of psoriasis and diseases of the hepatobiliary system. The presented epidemiological data of liver diseases in psoriasis confirm undoubted interest in the drugs, having effect not only on dysfunction of hepatobiliary system, but on psoriasis as well. According to the results of the study of the methylation processes of T-lymphocytes with using of bioinformatic analysis, medication Ademetionine was selected. Its effects on psoriatic process were studied by comparing the data of clinical and biochemical blood tests and PASI score. The efficiency of the selected medication in the treatment of psoriasis was proved by the data of biochemical blood tests, PASI index dynamics, the positive changes in dermatology life quality index and degree of anxiety, assessed by the test Spielberg. The introduction of the analysis of the level of gene FRK methylation in CD3 cells allows implementation of psoriasis early diagnostics that provides the opportunity for effective early pathogenetic therapy.

Подписано в печать: 19.10.2016  
Объем: 1,0 усл.п.л.  
Тираж: 100 экз. Заказ №621  
Отпечатано в типографии "Реглет"  
г.Москва, Ленинский проспект, д.2  
8(495)978-66-63