
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ H3K27me3
В ТОЛСТОЙ КИШКЕ МЫШЕЙ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ**

© 2025 г. Е. А. Никельварт¹, С. С. Медведева¹, Ю. В. Попова¹,
Е. Н. Кожевникова^{1, *}

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: kozhevnikova@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 03.07.2025 г.

После доработки 15.08.2025 г.

Принята к публикации 20.08.2025 г.

За последние десятилетия распространенность воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) возросла во всем мире. Вслед за индустриализацией рост заболеваемости ВЗК наблюдается не только в странах Европы и Северной Америки, но и в странах Азии, включая Китай и Индию. Несмотря на широкую распространенность и большое количество исследований, причины ВЗК остаются не до конца изученными. Важную роль в их патогенезе играют эпигенетические механизмы, такие как метилирование ДНК и посттрансляционные модификации гистонов. Эти модификации определяют структуру хроматина и могут служить метками как транскрипционно активных, так и неактивных районов. Учитывая глобальные изменения профиля экспрессии генов в кишечнике пациентов с ВЗК, можно предполагать всеобъемлющие структурные изменения активности и доступности хроматина в ходе развития воспалительных процессов в кишечнике как на уровне клеток мукозального иммунитета, так и в эпителиальных клетках. В частности, в исследованиях с использованием образцов ткани кишки от пациентов с энтероколитом было показано снижение общего количества триметилирования гистона H3 по лизину 27 (H3K27me3) в эпителиальных клетках. Одновременно с этим ингибирование нанесения метки H3K27me3 является перспективным направлением в лечении ВЗК за счет регуляции транскрипции в иммунных клетках. В данной работе была исследована представленность этой модификации в ядрах эпителиальных клеток и в ткани кишки в целом на двух моделях хронического колита на мышах. Было показано, что общий уровень H3K27me3 повышается в ядрах энтероцитов в модели хронического колита с нокаутом гена *Muc2*. Этот результат указывает на значимое влияние модификации H3K27me3 на патогенез ВЗК не только в иммунных, но и в эпителиальных клетках толстой кишки.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, моделирование колита на мышах, эпигенетическая регуляция, хроматин, H3K27me3

DOI: 10.7868/S2658655X25100029

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – хронические рецидивирующие воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта, включающие в себя язвенный колит и болезнь Крона. Язвенный колит характеризуется непрерывными

поражениями слизистой оболочки толстой кишки, воспаление распространяется от прямой кишки в проксимальном направлении, охватывая всю толстую кишку [1]. Для болезни Крона характерно трансмуральное воспаление, которое может возникать очагами по всему желудочно-кишечному тракту, но в основном поражение локализуется в толстой и подвздошной кишках [2].

Клинические проявления, наблюдаемые у пациентов с ВЗК, включают в себя рецидивирующие боли в животе, снижение массы тела, наличие крови в стуле, диарею. На гистологическом уровне язвенный колит характеризуется инфильтрацией нейтрофилов в собственную пластинку и эпителиальный слой кишки, образуя микроабсцессы крипт, а также истончением слизистой барьера кишечника в связи со снижением выработки муцина бокаловидными клетками. При болезни Крона воспалением охвачены все слои кишечной стенки, также происходит инфильтрация нейтрофилов, часто – агрегация макрофагов, образующих эпителиоидные гранулемы [3].

Регуляция экспрессии генов при ВЗК является многоступенчатым и сложным процессом, играющим значительную роль в патогенезе и клиническом течении этой группы заболеваний. Одним из основных механизмов, регулирующих экспрессию генов при ВЗК, являются сигнальные пути, ассоциированные с иммунным ответом. Известно, что воспалительные цитокины, такие как интерлейкины и фактор некроза опухолей, играют центральную роль в развитии ВЗК. Эти молекулы активируют ряд транскрипционных факторов, которые, в свою очередь, увеличивают экспрессию генов, способствующих воспалению и разрушению тканей. Таким образом формируется положительная обратная связь, усиливающая воспалительный процесс [4, 5].

Ключевыми сигнальными каскадами при развитии ВЗК являются несколько путей, которые приводят к транскрипционным изменениям в клетках кишечника. Например, NF- κ B является одним из главных транскрипционных факторов регуляции воспалительных процессов. Активация NF- κ B приводит к увеличению экспрессии генов, кодирующих провоспалительные цитокины и хемокины [6–8].

В контексте ВЗК эпигенетическая регуляция играет важную роль, обеспечивая связь между генетическими и средовыми факторами, что имеет ключевое значение для патогенеза ВЗК. При исследовании некротического энтероколита – ВЗК у новорожденных детей – методами вестерн-блоттинга и иммуногистохимического анализа было показано увеличение количества деметилазы гистонов JMJD3 в кишечнике пациентов. Аналогичные результаты были получены и на мышинной модели некротического колита, при этом количество модифицированных гистонов H3K27me3 уменьшалось [9]. Также было показано, что уровень JMJD3 увеличивался и в мышинной модели DSS-индуцированного колита [10]. Иммуногистохимическое исследование показало уменьшение количества метилтрансферазы гистонов EZH2 в образцах кишечника у пациентов с язвенным колитом и болезнью Крона [11]. На фоне воспаления кишечника изучалось не только уменьшение количества репрессивных меток гистонов, но и увеличение модификаций, ассоциированных с повышением транскрипционной активности хроматина, в частности ацетилирование гистонов. Так, с помощью гистологических методов было показано повышение уровня H3K27ac в эпителиальном слое толстой кишки у мышей с DSS-индуцированным колитом и у пациентов с ВЗК [12]. Было доказано увеличение уровня ацетилирования гистона H4 в кишке крыс с язвенным колитом, вызванным TNBS (Trinitrobenzenesulfonic acid) [13]. В совокупности эти данные показывают, что в целом при воспалительных заболеваниях кишечника хроматин становится более открытым и доступным для связывания транскрипционных комплексов.

Для изучения патогенеза ВЗК разработана широкая панель моделей *in vivo*, ряд которых успешно воспроизводит различные аспекты ВЗК. Широко представленной группой являются генетические модели ВЗК [14]. Среди этой большой группы следует выделить мышей линии *Muc2*, моделирующей хронический язвенный колит и в последствии рак толстой кишки. Модель была получена с помощью нацеленного нокаута

гена *Muc2*. Гликопротеин *Muc2* является основным компонентом кишечной слизи, он формирует защитный барьер, предотвращающий проникновение бактерий к эпителиальным клеткам, так что заселение микроорганизмов происходит только в верхнем слое слизи, а внутренний слой остается свободным от микробиоты [15]. Муциновая выстилка также способствует аккумуляции микробиоты во внешнем слое, предотвращая ее удаление за счет перистальтики кишечника. Нокаут гена *Muc2* приводит к дисфункции муцинового и эпителиального барьеров, в связи с чем бактерии, находящиеся в просвете кишечника и в верхнем слое слизи, получают доступ к эпителиальным клеткам кишечника, что вызывает ответную реакцию в виде процесса воспаления [15–18].

Большой популярностью пользуются модели химически индуцированного колита в связи с относительной простотой их получения, высокой воспроизводимостью, возможностью отслеживать стадию воспаления в зависимости от длительности воздействия химических агентов. В качестве индукторов воспаления выступают декстран сульфат натрия (DSS), 2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота (TNBS), оксазолон, уксусная кислота, пептидогликан, каррагинан. Среди индуцирующих химических агентов следует выделить DSS. Декстран сульфат натрия – отрицательно заряженный полисахарид. Он состоит из единиц глюкозы, сульфатированной по положению 2, 4. Мономеры объединены в полимер связью α -1,6. DSS способен взаимодействовать с мембранами клеток, экстрагируя фосфолипидные молекулы из мембраны в мицеллу, что приводит к прямому повреждению мембраны эпителиальных клеток и возникновению эрозии. Также DSS связывается с жирными кислотами средней длины, приводя к повреждению эпителиального барьера и воспалению [19].

В данной работе изучены особенности распределения гистоновой модификации H3K27me3 в тканях толстой кишки при хроническом воспалении на двух экспериментальных моделях: у мышей с нокаутом гена *Muc2* и на модели DSS-индуцированного колита. Проведенный сравнительный анализ позволил оценить степень универсальности изменений данного эпигенетического маркера при развитии хронического воспалительного процесса в толстом кишечнике.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные животные и условия содержания

Эксперименты на животных были проведены на базе Новосибирского государственного аграрного университета и Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Исследование проводилось на 26 самцах мышей линии C57BL/6 в возрасте 12 недель и самцах линии *Muc2* на генетическом фоне C57BL/6 в возрасте 8 недель. В качестве контроля использовали однопометников дикого типа (*Muc2*^{+/+}, $n = 5$), а в качестве опыта – самцов, гомозиготных по мутации в гене *Muc2* (*Muc2*^{-/-}, $n = 5$). Гомозиготное состояние мутации в гене *Muc2* было подтверждено с помощью генотипирования с праймерами *Muc2*_gt_WT-F1 (5' CTT GCC CTG CCC TAT TGT T 3'), *Muc2*_gt_WT-R1 (5' AGA AAG CCC TGA AGC AGG A 3'), *Muc2*_gt_Neo-F2 (5' GAT CTG GAC GAA GAG CAT CA 3'), *Muc2*_gt_Neo-R2 (5' GAT ATT CGG CAA GCA GGC AT 3'). Животных содержали в испытательном центре Новосибирского государственного аграрного университета однополовыми группами по 5–8 животных в открытых клетках. Клетки были снабжены подстилом из обеспыленной березовой стружки (Фракция № 3, ИП Филонич, Новосибирск) и картонными укрытиями (картонные втулки). Животным был предоставлен доступ к пище (корм С-19 “Дельта фидс” “БиоПро”, Новосибирск, Россия) и фильтрованной воде в неограниченном количестве. В помещении для содержания животных соблюдался световой режим 12 : 12 (включение света в 24:00, выключение в 12:00), температура 22–24 °С, влажность 30–60%.

Схема эксперимента

В исследовании применялось две модели хронического колита на мышах:

- 1) химически индуцированный колит с помощью декстран сульфата натрия (dextran sulfate sodium, DSS);
- 2) генетическая модель колита – мыши с нокаутом гена *Muc2*.

Модель DSS-индуцированного колита позволяет получить как острое, так и хроническое течение колита. Для моделирования острого воспаления мыши были разделены на 4 группы: 6 контрольных и 6 опытных самцов были использованы для оценки острого колита, 6 контрольных и 8 опытных самцов были взяты в эксперимент для индукции хронического колита. Для получения острого колита мыши принимали 1.8%-ный раствор декстран сульфата натрия (DSS) (#9011-18-1, BioFroxx) 7 дней, после чего животных выводили из эксперимента. Для моделирования хронического воспаления 6 контрольных животных также получали воду, а 8 опытных – 1.8%-ный раствор DSS. Эксперимент по индукции хронического воспаления продолжался 42 дня по схеме, показанной на рис. 1. В ходе выполнения экспериментов проводили взвешивания животных: в случае острого эксперимента – ежедневно, в случае хронического – 3 раза в неделю. В последний день экспериментов проводилась клиническая оценка состояния животных.

У мышей с генетической моделью колита и мышей с химически индуцированным колитом в последний день эксперимента извлекали толстую кишку. Часть дистального отдела кишки была зафиксирована в 10%-ном растворе формальдегида в PBS для дальнейшего иммуногистохимического анализа на модификации гистонов H3K27me3, большую долю толстой кишки (проксимальный и медиальный отделы) брали для оценки общей представленности H3K27me3 с помощью вестерн-блоттинга.

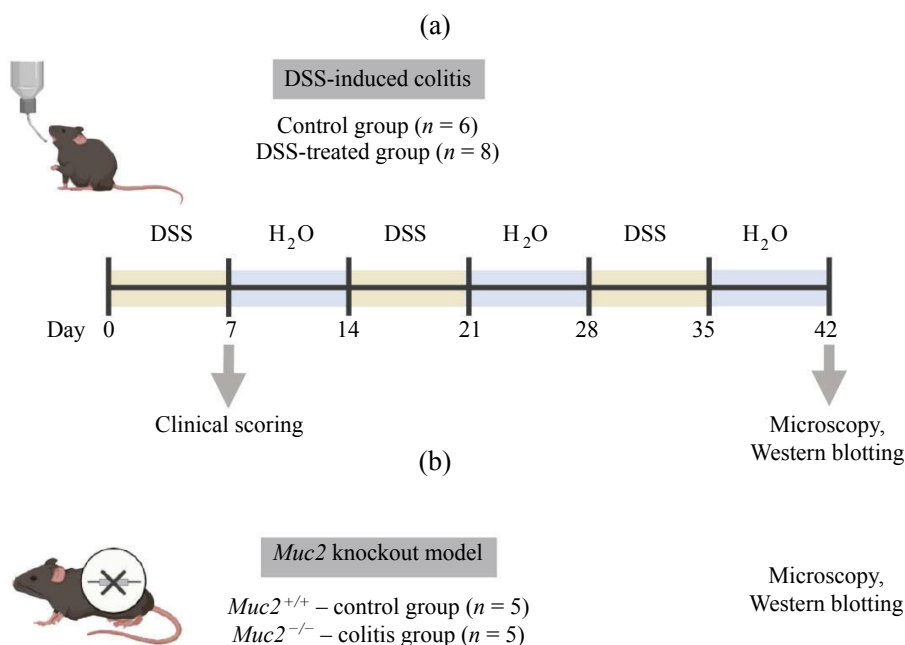


Рис 1. Схема эксперимента: (а) – схема получения модели хронического колита через три цикла предоставления DSS в питьевой воде; (б) – вторая экспериментальная модель, линия мышей с нокаутом гена *Muc2*, которая характеризуется врожденным колитом.

В ходе эксперимента у животных отмечали изменение массы тела, а также другие клинические признаки развития кишечного воспаления согласно шкале оценок, представленных в табл. 1. В конце эксперимента, через 6 недель после последнего предоставления DSS, мыши были подвергнуты эвтаназии с помощью краниоцервикальной дислокации. После вскрытия было оценено состояние толстой и прямой кишок.

Таблица 1. Шкала для оценки клинических проявлений воспаления в кишечнике

Клиническое проявление	Шкала и критерии для оценки
Кровотечение в кишечнике	0 – нет видимых признаков кровотечения, 1 – кровь в фекалиях, 2 – кровотечение в анальном отверстии, 3 – кровь на шерсти вокруг анального отверстия
Диарея	0 – сформированные фекалии, 1 – мягкий стул, 2 – диарея
Поведение	0 – нормальное, активное, 1 – сторбленное тело, 2 – вялость, низкая подвижность, 3 – неподвижность

Иммуногистохимический анализ срезов толстой кишки

Фрагменты нисходящей толстой кишки фиксировали в 10%-ном растворе формальдегида в PBS для иммуногистохимического анализа модификации гистонов H3K27me3, затем производили криопротекцию в растворах сахарозы 15% и 30% в течение 24 ч (4 °C). Затем кишку переносили в матричную среду для криотомии (O.C.T Compound containing, Tissue-Tek) и замораживали в жидком азоте. Срезы толщиной 20 мкм были изготовлены с использованием криостата CM1850 UV (Leica Biosystems). Препараты кишки инкубировали 2 ч при 4 °C в блокирующем буфере следующего состава: 0.5% BSA, 0.3% Triton в PBS. Затем срезы промывали раствором PBS, инкубировали в течение ночи с первичными антителами к H3K27me3 в концентрации 1 : 100 (#39155, Active Motif). В качестве вторичных антител использовали антитела козы против антител кролика, конъюгированные с красителем Alexa 488 (#A-11034, ThermoFisher) в концентрации 1 : 500. Для визуализации ядер клеток использовался краситель DAPI (#TC229-10MG, HiMedia) в разведении 1 : 1000.

Окрашенные образцы визуализировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2009 в центре коллективного пользования анализа микроскопических объектов Института цитологии и генетики СО РАН. Все препараты, относящиеся к одному эксперименту, были сняты с использованием одинаковых настроек программного обеспечения микроскопа и сохранены в формате Lsm. Полученные 16-битные изображения анализировали в приложении Fiji, используя автоматическую сегментацию ядер с помощью плагина StarDist (рис. 2). Область ядер выделяли на канале DAPI, интенсивность флуоресценции полученных областей измеряли на канале с целевыми белками (Alexa 488).

Полученный массив данных интенсивностей флуоресценции фильтровали по площади, исключая из анализа ядра собственной пластинки и мышц, имеющих меньшую площадь, а также скопления ядер большей площади, которые не были разделены программными средствами. Порог фильтрации ядер подбирали в соответствии

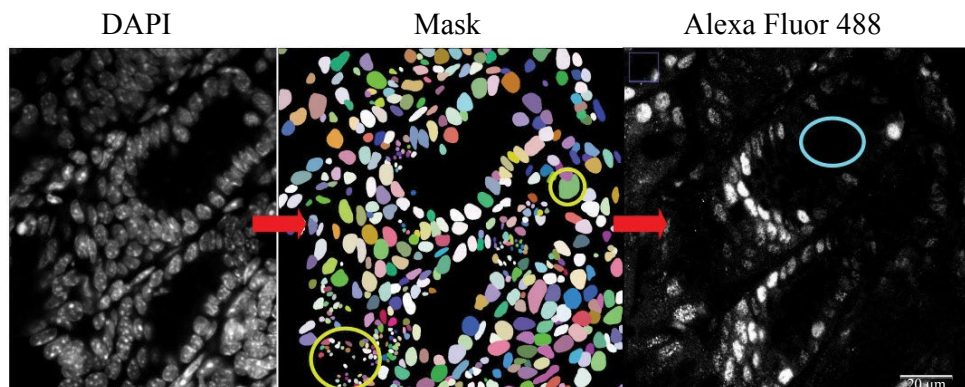


Рис. 2. Схема программного выделения ядер для оценки локализации эпигенетической модификации H3K27me3. Плагин StarDist запускали на изображении препарата, полученном с помощью красителя DAPI, что позволило получить очертания (маску) сегментированных областей ядер. Маску накладывали на канал Alexa Fluor 488 и проводили измерения каждой области по отдельности. С помощью фильтрации по площади из анализа исключались области с площадью, значительно меньшей или большей таковой ядер (обведены желтыми овалами). Ожидаемая площадь ядер определялась с помощью измерений, проведенных вручную на 800 ядрах эпителия толстой кишки. Нормировка сигнала проводилась по области, не включающей сигналы в ядрах клеток (голубой овал).

с установленным вручную диапазоном значений площади, характерных для эпителиальных ядер, и сохраняли неизменным для животных одного генотипа. Области, содержащие неспецифические объекты (пыль, содержимое кишки), удаляли вручную. Таким образом, на каждой микрофотографии было оценено в среднем около ста ядер эпителиальных клеток. Для каждой группы было использовано по три среза от трех животных, для каждого из которых было сделано пять микрофотографий. Таким образом, для одной экспериментальной группы было проанализировано около 4500 ядер. Данные представлены на рисунках как среднее значение для каждой микрофотографии. Интенсивность флуоресценции нормировали на значения фона, измеренные в области отсутствия специфического сигнала (вне области среза или в просвете крипт).

Приготовление белковых экстрактов и вестерн-блоттинг

Для приготовления белковых экстрактов толстую кишку лизировали в буфере RIPA ((1 M Tris-HCl (pH 7.6), 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, 10% NP-40, 10% Na-deoxycholate, 10% SDS)) с добавлением 1 mM NAMBS и 1 mM DTT и гомогенизировали. Лизат центрифугировали (30 мин, 12 000 g, 4 °C), после чего отбирали супернатант (экстракт растворимой фракции белков) и измеряли концентрацию белка с помощью набора AbiProt BCA Protein Assay Kit (#PRT-011-3-100ML, Abisense) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для вестерн-блоттинга белковые экстракты (20 мкг) денатурировали в буфере Laemmli (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% глицерола, 0.01% бромфенолового синего, 5% 1 β-меркаптоэтанол) и электрофоретически разделяли в 15%-ном полиакриламидном геле с помощью системы для вертикального электрофореза WIX-easyPRO4 Mini Easy (WIX). Использовали маркер молекулярного веса белков RAV-10 (#PS-1050, Biolabmix). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (#RPN303D, Amersham) осуществляли, используя систему для полусухого переноса белков Trans-Blot Turbo (BIORAD). Мембрану блокировали (5% BSA, 5% обезжиренного сухого молока, 0.1% Tween 20 в PBS) в течение 1 ч при комнатной температуре.

После промывки инкубировали с первичными антителами к H3K27me3 (#39155, Active Motif) в концентрации 1 : 1000 в течение ночи при 4 °C. Затем инкубировали со вторичными антителами к антителам кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (#CSB-PA564648-500, Cusabio) в разведении 1 : 5000, в течение 2 ч при комнатной температуре. Для нормировки были использованы антитела к белку GAPDH (#GB15004, Servicebio) в разведении 1 : 1000. Детекцию белков проводили с помощью набора для хемилюминесценции (#G2020-25ML, Servicebio) согласно указаниям производителя. Изображения были получены с использованием системы Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Интенсивность сигналов целевых белков оценивали с помощью программы ImageJ, нормируя на сигнал GAPDH.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью различных статистических пакетов языка программирования R (4.4.1), для графического отображения результатов использовали библиотеку ggplot.2. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Нормально распределенные данные анализировали с помощью *t*-критерия Стьюдента, для данных, распределение которых не соответствует нормальному, использовали критерий Уилкоксона. Для анализа динамики массы тела применяли двухфакторный дисперсионный анализ повторных измерений ANOVA с апостериорным тестом Тьюки, данные представлены в виде среднего значения со стандартным отклонением. В остальных случаях данные представлены диаграммами размаха.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка эффективности химической индукции колита с помощью DSS

В ходе эксперимента животных взвешивали ежедневно в остром и 2–3 раза в неделю в хроническом эксперименте. Острый эксперимент проводился для валидации эффективности развития колита на ранних этапах, поскольку выраженность колита на первоначальных стадиях эксперимента определяет клиническую картину в хронической стадии. Дисперсионный анализ показал достоверное взаимодействие факторов группы и повтора как в остром, так и в хроническом эксперименте ($n = 6-8$, острый DSS: $F(7, 80) = 17.49$, $p < 0.001$; хронический DSS: $F(17, 180) = 14.85$ двухфакторный ANOVA повторных измерений). Начиная с 6-го дня после начала эксперимента было выявлено достоверное снижение массы тела у мышей с острым DSS-индуцированным колитом в сравнении с мышами контрольной группы ($n = 6$ в каждой группе, день 6-й: $p < 0.001$, post hoc тест Тьюки, рис. 3а). В хроническом эксперименте статистически значимые различия наблюдались на 9-й, 14-й и 21-й дни ($n = 6-8$, $p < 0.001$, post hoc тест Тьюки, рис. 3а). Кроме того, в остром эксперименте наблюдались клинические признаки воспаления, включая диарею, наличие крови в стуле, сгорбленную позу ($n = 6$ в обеих группах, $p < 0.01$, критерий Уилкоксона, рис. 3б). Также были проведены измерения длины толстой и слепой кишок мышей как в остром, так и в хроническом эксперименте (рис. 3с). Можно видеть, что происходит достоверное укорочение длины толстой и слепой кишок при остром воспалении ($n = 6$ в обеих группах, $W = 36$, $p < 0.01$, критерий Уилкоксона). Все перечисленные изменения соответствуют ожидаемому течению острого и хронического колита, как следует из литературных данных [18]. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об успешном развитии колита у мышей в наших экспериментальных условиях.

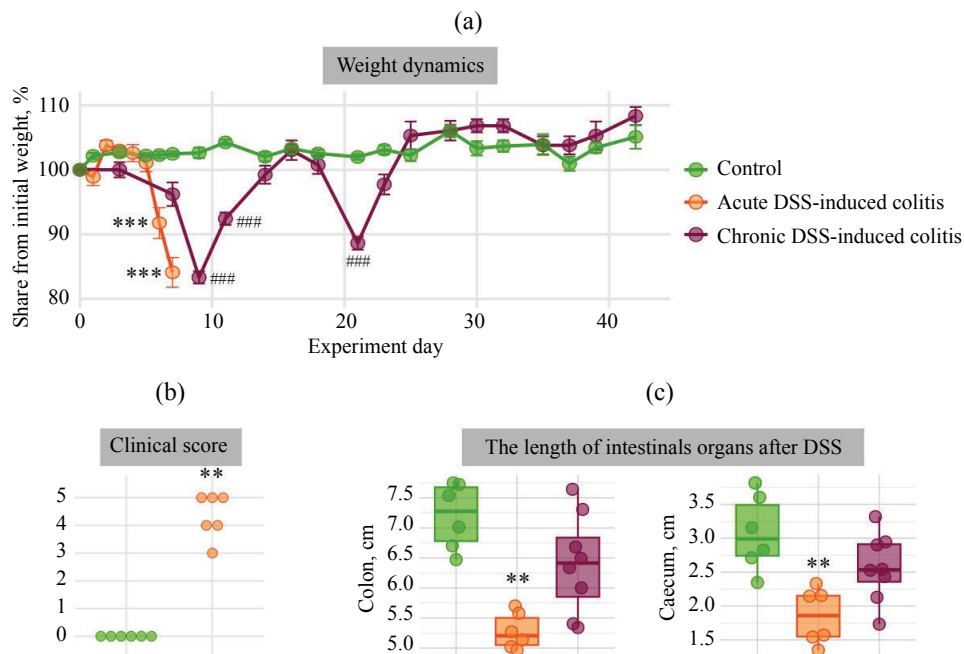


Рис. 3. Оценка проявлений язвенного колита у мышей в группе с DSS-индуцированным колитом. (а) – Динамика изменения массы тела мышей в трех группах: контрольная группа ($n = 6$, зеленый), острый колит ($n = 6$, оранжевый), хронический колит ($n = 8$, фиолетовый). *** – $p < 0.001$ “Острый DSS” по сравнению с “Контролем”, тест Тьюки HSD. ### – $p < 0.001$ “хронический DSS” по сравнению с “Контролем”, тест Тьюки HSD. Точки на графике показывают процент от начальной массы тела животных, усредненный по группе в конкретный день эксперимента. (б) – Оценка клинических проявлений колита. На диаграмме представлен общий балл, отражающий сумму баллов по критериям, включающим в себя состояние стула, внешний вид, кровотечение ($n = 6$ в обеих группах, ** – $p < 0.01$ “острый DSS” по сравнению с “Контролем”, критерий Уилкоксона). (с) – Длина толстой кишки при остром и хроническом колите (** – $p < 0.01$, “Острый DSS” по сравнению с “Контролем”, критерий Уилкоксона), длина слепой кишки при остром и хроническом колите (** – $p < 0.01$, “Острый DSS” по сравнению с “Контролем”, критерий Уилкоксона). Каждая точка на графике отражает значение длины кишки одной мыши.

Представленность H3K27me3 в толстой кишке мышей после химической индукции хронического колита

Далее были проведены эксперименты по окрашиванию срезов толстой кишки антителами к модифицированному гистону H3K27me3 с целью оценить интенсивность флуоресценции у животных двух экспериментальных групп: контрольной и с хроническим DSS-индуцированным колитом. Антитела показали специфичный сигнал в ядрах клеток, общая интенсивность сигнала была сравнимой в обеих группах (рис. 4а). Количественный подсчет интенсивности окрашивания ядер подтвердил отсутствие статистически значимых различий (рис. 4б). В то же время результаты вестерн-блоттинга полностью согласуются с результатами иммуногистохимического исследования и показывают отсутствие различий уровня H3K27me3 в ткани толстой кишки мышей с хроническим DSS-индуцированным колитом от контрольных животных (рис. 4с). Таким образом, данные иммуногистохимического анализа и результаты оценки общего белка с помощью вестерн-блоттинга согласуются друг с другом.

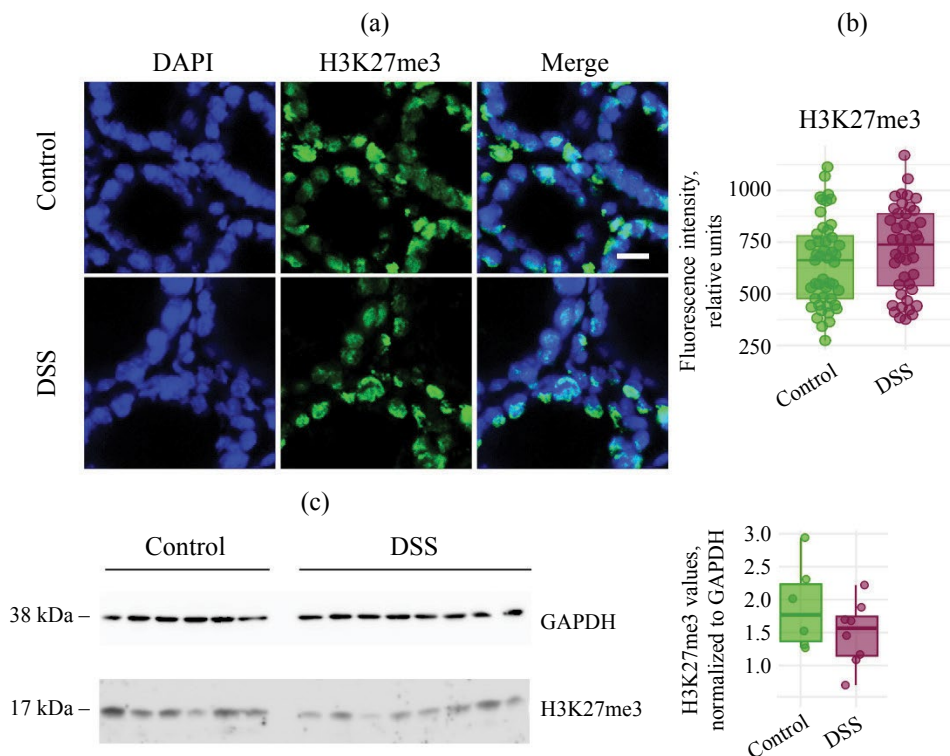


Рис. 4. Представленность модификации гистонов H3K27me3 в ткани толстой кишки на фоне хронического DSS-индуцированного колита. (a) – Репрезентативная микрофотография иммуногистохимического анализа срезов толстой кишки. Масштабная линейка – 10 мкм. (b) – Количественное измерение интенсивности сигнала иммуногистохимических срезов толстой кишки (количество микрофотографий $n = 45$ в каждой группе, точки представляют собой усредненные значения интенсивности на микрофотографию). (c) – Вестерн-блоттинг и его количественный обсчет в ткани толстой кишки, $n = 6-8$ образцов в группе. Точками показаны нормированные на белок GAPDH значения интенсивности сигнала для каждого образца.

Представленность H3K27me3 в толстой кишке мышей в генетической модели хронического колита

Затем была проведена оценка уровня H3K27me3 у контрольных животных и мышей линии *Muc2*, чтобы выявить возможные изменения этой модификации у животных с врожденным воспалением кишечника. По результатам иммуногистохимического анализа было выявлено увеличение данной модификации в ядрах эпителия толстой кишки мышей линии *Muc2* ($W = 499$, *** – $p < 0.001$ “*Muc2*^{-/-}” по сравнению с “*Muc2*^{+/+}”, критерий Уилкоксона, рис. 5a, b). Этот результат говорит в пользу того, что врожденный колит может приводить к изменению структуры хроматина за счет увеличения общего уровня H3K27me3 не только в иммунных клетках, как было показано ранее, но и в эпителиальных клетках. Далее был проанализирован общий уровень этой модификации гистона H3 во всей ткани кишки с помощью вестерн-блоттинга, но статистически достоверных разниц выявлено не было (рис. 5c). Этот результат может указывать на то, что уровень модификации H3K27me3 меняется только в одном типе клеток, но не во всех клеточных типах толстой кишки.

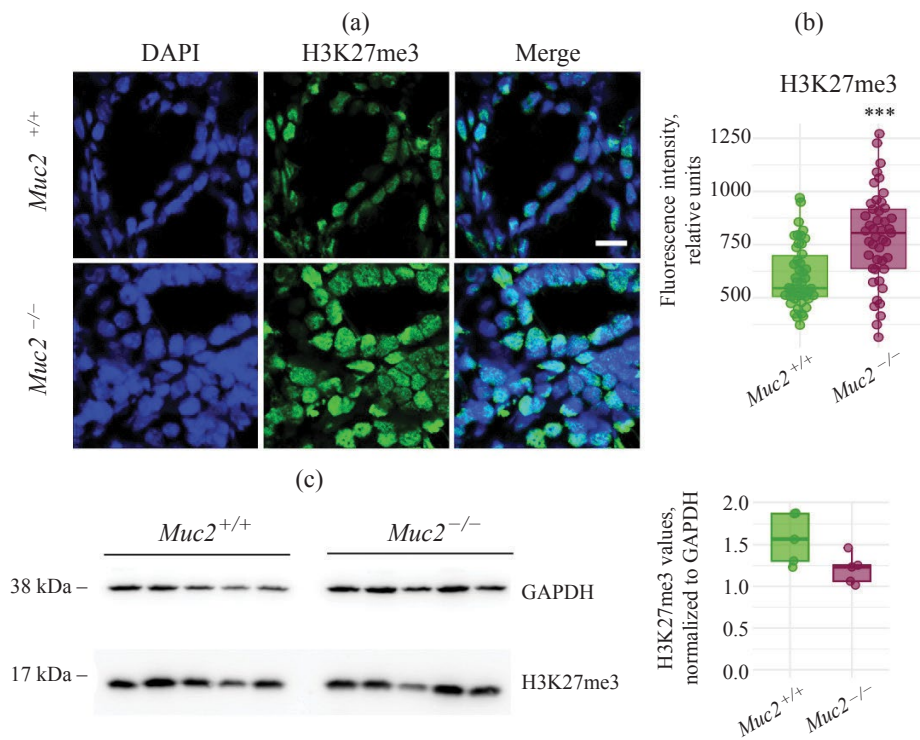


Рис. 5. Представленность модификации гистонов H3K27me3 в ткани толстой кишки на фоне хронического колита у мышей с нокаутом гена *Muc2*. (а) – Репрезентативная микрофотография иммуногистохимического анализа срезов толстой кишки. Масштабная линейка – 10 мкм. (б) – Количественное измерение интенсивности иммуногистохимического сигнала срезов толстой кишки ($n = 45$ в каждой группе, точки представляют собой усредненные значения интенсивности на микрофотографию). *** – $p < 0.001$ “*Muc2*” в сравнении с “Контролем”, критерий Уилкоксона. (с) – Вестерн-блоттинг и его количественный обсчет в ткани толстой кишки; $n = 5$ образцов в каждой группе. Точками показаны нормированные на белок GAPDH значения интенсивности сигнала для каждого образца.

Таким образом, было обнаружено достоверное увеличение модификации H3K27me3 в ядрах эпителия нисходящей толстой кишки мышей с генетически обусловленным хроническим колитом. В то же время ни в контрольной группе, ни в модели химически индуцированного колита нам не удалось выявить изменений в общем уровне данной модификации в тканях кишки ни одним из методов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе были исследованы особенности перестройки хроматина, обусловленные модификацией гистонов H3K27me3 в ткани толстой кишки, на моделях хронического колита у лабораторных мышей. Для оценки распределения данной модификации использовались методы иммуногистохимического анализа и вестерн-блоттинга. Полученные результаты свидетельствуют о существенных изменениях эпигенетического статуса клеток кишечного эпителия при хроническом воспалении, вызванном нокаутом гена *Muc2*.

Ранее было показано, что в тканях кишечника пациентов с воспалительными заболеваниями, такими как воспалительный энтероколит, отмечается снижение уровня

H3K27me3, что сопровождается повышением активности деметилазы JMJD3 [9]. В то же время исследования на моделях колита демонстрируют неоднозначные результаты. Например, нокаут гена *Ezh2*, кодирующего фермент, отвечает за метилирование H3K27 и у мышей приводит к усиленной экспрессии воспалительных генов, а также более выраженной симптоматике острого колита [11]. Однако фармакологическое ингибирование EZH2 у животных с DSS-индуцированным колитом зачастую ассоциируется с частичным сглаживанием воспалительных проявлений, что указывает на сложную роль этого фермента в регуляции воспаления [20]. Исследования также показывают, что стимуляция воспалительного ответа, например с помощью липополисахарида клеточной стенки бактерий, способствует увеличению уровней EZH2 и H3K27me3, что, возможно, отражает защитную или компенсаторную реакцию организма [21]. Таким образом, роль H3K27me3 в воспалении кишечника остается предметом активных дискуссий и требует дальнейшего изучения, особенно в контексте различий между острым и хроническим воспалением.

В данной работе не было выявлено значительных изменений в общем количестве и распределении H3K27me3 в ткани толстой кишки на модели хронического DSS-индуцированного колита, что может свидетельствовать о сложности регуляции этой метки в длительном воспалительном процессе или о локальных изменениях в регуляции эпигенетического статуса клеток. В то же время отмечено достоверное увеличение интенсивности ядерных сигналов H3K27me3 в эпителиальных клетках в генетической модели хронического колита, вызванной дефицитом гликопротеина Muc2. Эти результаты согласуются с данными о том, что в условиях хронического воспаления происходит перераспределение эпигенетических маркеров – это может отражать адаптивные или патологические изменения в регуляции генов, отвечающих за воспаление и регенерацию тканей [22].

Однако данные, полученные по результатам вестерн-блоттинга, не подтвердили значимых изменений уровня H3K27me3 в тканях. Это может быть связано с тем, что методы иммуногистохимии позволяют выявлять локальные изменения в распределении маркера в отдельных клетках или слоях ткани, тогда как вестерн-блоттинг отражает общий уровень отдельного белка в образце. Также следует отметить ограничения метода, связанные с использованием цитозольного белка GAPDH в качестве нормиратора для ядерных белков.

Такое различие подчеркивает необходимость применения множественных методов для комплексной оценки эпигенетических изменений. Для более точного изучения динамики H3K27me3 целесообразно использовать такие методы, как ChIP-seq, что позволит выявить изменения на уровне отдельных локусов генома и понять, какие гены подвергаются эпигенетической регуляции в условиях хронического воспаления [23].

Важно отметить особую роль фермента EZH2, который не только участвует в метилировании H3K27, но и взаимодействует с другими компонентами эпигенетических белковых комплексов, такими как комплекс PRC2, а также регулируется различными сигнальными путями, включая воспалительные. Было показано, что подавление активности EZH2 смягчает воспаление кишечника в экспериментальных моделях и задерживает развитие колоректального рака, ассоциированного с воспалением. Считается, что терапевтический эффект ингибирования EZH2 и, как следствие, снижения H3K27me3 опосредован клетками миелоидного ряда, обладающими иммуносупрессорными свойствами, например Т-регуляторными клетками [20]. Аналогичный эффект был показан и для ингибиторов деацетилаз гистонов, которые также вовлечены в формирование иммуносупрессорной функции Т-регуляторных клеток [24]. Данные исследования подчеркивают важную роль модификаций гистонов в регуляции иммунных клеток в патогенезе ВЗК. В частности, было показано, что H3K27me3 участвует в формировании воспаления за счет изменения структуры хроматина и профиля экспрессии генов прямо в эпителиальных клетках. Такое влияние свидетельствует

о новых механизмах развития воспаления, включая возможную трансформацию тканей слизистой оболочки кишечника. Таким образом, эпигенетическая регуляция воспаления в кишечнике – сложный и многогранный процесс, в котором H3K27me3 занимает важное место, однако его роль в патогенезе хронического колита остается недостаточно изученной. Наши данные указывают на необходимость дальнейших исследований, включающих более детальный анализ локальных изменений в различных типах клеток кишечника. Понимание механизмов эпигенетической регуляции может способствовать развитию новых терапевтических стратегий, направленных на коррекцию эпигенетического статуса клеток кишечника и потенциально на улучшение клинических исходов у пациентов с ВЗК.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. Н. К.), сбор данных (Е. А. Н.), обработка данных (С. С. М., Ю. В. П.), написание и редактирование манускрипта (Е. А. Н., С. С. М., Ю. В. П., Е. Н. К.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект РНФ № 20-74-10022-П).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации. Протоколы экспериментов на лабораторных животных были одобрены Этическим комитетом Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН (протоколы № 02/21 от 04.08.2021 г. и № 2/25 от 23.04.2025 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gajendran M, Loganathan P, Jimenez G, Catinella AP, Ng N, Umapathy C, Ziade N, Hashash JG* (2019) A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Disease-a-Month* 65: 100851. <https://doi.org/10.1016/J.DISAMONTH.2019.02.004>
2. *Mak WY, Hart AL, Ng SC* (2019) Crohn's disease. *Medicine* 47: 377–387. <https://doi.org/10.1016/J.MPMED.2019.03.007>
3. *Xavier RJ, Podolsky DK* (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448(7152): 427–434. <https://doi.org/10.1038/nature06005>
4. *Neurath MF* (2014) Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Rev Immunol* 14(5): 329–342. <https://doi.org/10.1038/nri3661>
5. *Saha S, Müller D, Clark AG* (2023) Mechanosensory feedback loops during chronic inflammation. *Front Cell Dev Biol* 11: 1225677. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1225677>

6. Jarmakiewicz-Czaja S, Zielińska M, Sokal A, Filip R (2022) Genetic and Epigenetic Etiology of Inflammatory Bowel Disease: An Update. *Genes (Basel)* 13: 2388.
<https://doi.org/10.3390/genes13122388>
7. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nüez G, Cho JH (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603–606.
<https://doi.org/10.1038/35079114>
8. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC (2017) NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2: 1–9.
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
9. Ma S, Xu L, Chen L, Sun X, Hu F, Gong Y, Yang R, Li J, Wang Q, Huang S, Zhou H, Wang J (2022) Novel pharmacological inhibition of JMJD3 improves necrotizing enterocolitis by attenuating the inflammatory response and ameliorating intestinal injury. *Biochem Pharmacol* 203: 115165.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115165>
10. Huang M, Wang Q, Long F, Di Y, Wang J, Zhun Zhu Y, Liu X (2020) Jmjd3 regulates inflammasome activation and aggravates DSS-induced colitis in mice. *The FASEB J* 34: 4107–4119.
<https://doi.org/10.1096/fj.201902200RR>
11. Liu Y, Peng J, Sun T, Li N, Zhang L, Ren J, Yuan H, Kan S, Pan Q, Li X, Ding Y, Jiang M, Cong X, Tan M, Ma Y, Fu D, Cai S, Xiao Y, Wang X, Qin J (2017) Epithelial EZH2 serves as an epigenetic determinant in experimental colitis by inhibiting TNFα-mediated inflammation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E3796–E3805.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1700909114>
12. Felice C, Lewis A, Iqbal S, Gordon H, Righi A, Colombo MP, Armuzzi A, Feakins R, Lindsay JO, Silver A (2021) Intestinal Inflammation is Linked to Hypoacetylation of Histone 3 Lysine 27 and can be Reversed by Valproic Acid Treatment in Inflammatory Bowel Disease Patients. *CMGH* 11: 889–891.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.11.009>
13. Tsaprouni LG, Ito K, Powell JJ, Adcock IM, Panchard N (2011) Differential patterns of histone acetylation in inflammatory bowel diseases. *J Inflamm* 8: 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1476-9255-8-1>
14. Goyal N, Rana A, Ahlawat A, Bijem KR V, Kumar P (2014) Animal models of inflammatory bowel disease: A review. *Inflammopharmacology* 22: 219–233.
<https://doi.org/10.1007/s10787-014-0207-y>
15. Bergstrom KSB, Kissoon-Singh V, Gibson DL, Ma C, Montero M, Sham HP, Ryz N, Huang T, Velcich A, Finlay BB, Chadee K, Vallance BA (2010) Muc2 Protects against Lethal Infectious Colitis by Disassociating Pathogenic and Commensal Bacteria from the Colonic Mucosa. *PLoS Pathog* 6: e1000902.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000902>
16. Kim YS, Ho SB (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12: 319–330.
<https://doi.org/10.1007/S11894-010-0131-2>
17. Petersson J, Schreiber O, Hansson GC, Gendler SJ, Velcich A, Lundberg JO, Roos S, Holm L, Phillipson M (2011) Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: 327–333.
<https://doi.org/10.1152/AJPGI.00422.2010>
18. Borisova MA, Achasova KM, Morozova KN, Andreyeva EN, Litvinova EA, Ogienko AA, Morozova MV, Berkaeva MB, Kiseleva E, Kozhevnikova EN (2020) Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium. *Scient Rep* 10: 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78141-4>
19. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M (2014) Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr Protoc Immunol* 104: 15.25.1–15.25.14.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>
20. Zhou J, Huang S, Wang Z, Huang J, Xu L, Tang X, Wan YY, Li Q, Symonds ALJ, Long H, Zhu B (2019) Targeting EZH2 histone methyltransferase activity alleviates experimental intestinal inflammation. *Nature Communicat* 10: 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10176-2>

21. Zhou T, Sun Y, Li M, Ding Y, Yin R, Li Z, Xie Q, Bao S, Cai W (2018) Enhancer of zeste homolog 2-catalysed H3K27 trimethylation plays a key role in acute-on-chronic liver failure via TNF-mediated pathway article. *Cell Death Dis* 9: 590.
<https://doi.org/10.1038/S41419-018-0670-2>
22. Toruner M, Unal NG (2023) Epigenetics of Inflammatory Bowel Diseases. *The Turkish J Gastroenterol* 34: 437.
<https://doi.org/10.5152/TJG.2023.22515>
23. Boyd M, Thodberg M, Vitezic M, Bornholdt J, Vitting-Seerup K, Chen Y, Coskun M, Li Y, Lo BZS, Klausen P, Jan Schweiger P, Pedersen AG, Rapin N, Skovgaard K, Dahlgaard K, Andersson R, Terkelsen TB, Lilje B, Troelsen JT, Petersen AM, Jensen KB, Gögenur I, Thielsen P, Seidelin JB, Nielsen OH, Bjerrum JT, Sandelin A (2018) Characterization of the enhancer and promoter landscape of inflammatory bowel disease from human colon biopsies. *Nat Commun* 9: 1661.
<https://doi.org/10.1038/S41467-018-03766-Z>
24. Tao R, De Zoeten EF, Özkaynak E, Chen C, Wang L, Porrett PM, Li B, Turka LA, Olson EN, Greene MI, Wells AD, Hancock WW (2007) Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat Med* 13: 1299–1307.
<https://doi.org/10.1038/NM1652>

The Abundance of H3K27me3 Histone Modification in the Mouse Colon under Chronic Inflammation

E. A. Nickelvart^a, S. S. Medvedeva^a, J. V. Popova^a, and E. N. Kozhevnikova^{a, *}

*^aInstitute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia*

**e-mail: kozhevnikova@mcb.nsc.ru*

The prevalence of inflammatory bowel diseases (IBD) has increased globally over recent decades. Following industrialization, the incidence of IBD has been rising not only in European and North American countries but also in Asian nations, including China and India. Despite its widespread occurrence and extensive research efforts, the etiopathogenesis of IBD remains incompletely understood. Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation and post-translational modifications of histones, play a crucial role in its pathogenesis. Histone modifications influence chromatin structure and can serve as markers for transcriptionally active or inactive regions. Given the global alterations in gene expression profiles observed in the intestines of IBD patients, it is plausible to hypothesize comprehensive structural changes in chromatin activity and accessibility during intestinal inflammatory processes, affecting both mucosal immune cells and epithelial cells. Particularly, studies utilizing colonic tissue samples from patients with enterocolitis have demonstrated a reduction in the overall levels of trimethylation of histone H3 at lysine 27 (H3K27me3) within epithelial cells. Concurrently, targeting the H3K27me3 modification presents a promising therapeutic approach for IBD through the regulation of transcription in immune cells. This research investigated the presence of this histone modification in epithelial cell nuclei and in colonic tissue as a whole within two mouse models of chronic colitis. Our findings indicate that the overall level of H3K27me3 increases in the nuclei of enterocytes in a chronic colitis model with *Muc2* gene knockout. This result suggests that the H3K27me3 modification significantly influences the pathogenesis of IBD, not only in immune cells but also in colonic epithelial cells.

Keywords: inflammatory bowel disease, mouse models of colitis, epigenetic regulation, chromatin, H3K27me3