

АКТУАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ИЗМЕНЕНИЙ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛАНДШАФТА ОРГАНИЗМА, ВЫЗВАННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

И. А. Заняткин [✉], А. Г. Титова, А. В. Баёв

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Диагностика и лечение заболеваний, вызванных воздействием поллютантов на эпигеном человека, затруднены пластичностью и нестабильностью эпигенома, наличием нескольких путей регуляции транскрипции с нелинейной суммацией эффектов. Наиболее исследованные пути — метилирование ДНК, ацетилирование и метилирование гистонов. Доступны простые способы оценки уровня глобального метилирования ДНК, однако для определения механизмов воздействия загрязнителя на организм необходимо изучать эпигенетический ландшафт в деталях. Это заставляет ученых применять методы полногеномного секвенирования и обрабатывать огромные массивы результатов, что привело к появлению нескольких баз данных эпигенома человека и животных. Препараты для лечения эпигенетических нарушений сосредоточены на симптоматическом лечении и действуют на глобальное редактирование эпигенома или на регуляцию активности ферментов, играющих критическую роль в нарушении. Более перспективны методы селективного эпигеномного редактирования, основанные на абсолютно новых технологиях, находящихся на стадии лабораторных исследований. Представлен обзор современных возможностей науки в области диагностики и лечения заболеваний, вызванных воздействием поллютантов на эпигеном человека.

Ключевые слова: эпигенетические сигнатуры, метилирование, ацетилирование, токсическое воздействие, поллютант, хронические заболевания, секвенирование, редактирование генома.

Вклад авторов: И. А. Заняткин — систематизация литературных данных, написание обзора; А. Г. Титова — дополнение материалов для обзора, редактирование текста; А. В. Баёв — редактирование текста.

✉ **Для корреспонденции:** Иван Андреевич Заняткин
ул. Щукинская, д. 5, стр. 6, комн. 323, г. Москва, 123182; izanyatkin@cspmrz.ru

Статья получена: 23.12.2020 **Статья принята к печати:** 26.01.2021 **Опубликована онлайн:** 10.02.2021

DOI: 10.47183/mes.2021.003

MODERN METHODS FOR ANALYSIS OF CHANGES TO EPIGENETIC LANDSCAPE CAUSED BY EXPOSURE TO ENVIRONMENTAL POLLUTANTS

Zanyatkin IA [✉], Titova AG, Bayov AV

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

The diagnosis and treatment of diseases caused by the exposure of human epigenome to environmental pollutants are hampered by epigenomic plasticity, instability and nonlinear cumulative effects of existing transcriptional regulatory pathways. DNA methylation, histone acetylation and histone methylation are the best studied epigenetic modifications. There are simple methods for assessing genome-wide DNA methylation; however, it is essential to study the epigenetic landscape in detail in order to uncover the mechanisms underlying pollutant-associated effects on the organism. This prompts researchers to employ whole-genome sequencing and analyze vast arrays of sequencing data that can be compiled into extensive databases of human and animal epigenomes. Drugs developed to counter epigenetic disorders neutralize their symptoms and either affect epigenetic modifications across the entire genome or regulate the activity of enzymes that play a critical role in such disorders. Promise is held by targeted genome editing methods supported by modern technologies that are undergoing preclinical trials. This review discusses the potential of modern science in the diagnosis and treatment of diseases caused by environmental pollutants.

Keywords: face transplant, microsurgery, facial flap, composite flap

Author contribution: Zanyatkin IA systematized literature data and wrote the manuscript; Titova AG provided additional literature for the review and edited the manuscript; Bayov AV edited the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ivan A. Zanyatkin
Shchukinskaya, 5, str. 6, k. 323, Moscow, 123182; izanyatkin@cspmrz.ru

Received: 23.12.2020 **Accepted:** 26.01.2021 **Published online:** 10.02.2021

DOI: 10.47183/mes.2021.003

Загрязняющее вещество (поллютант) — это любой природный или антропогенный химический агент, содержащийся в окружающей среде в количествах, превышающих фоновые значения, и вызывающий тем самым ее загрязнение. Урон от поллютантов несут те системы и органы, которые с ними напрямую контактируют: органы дыхательной системы поражают газообразные и взвешенные в воздухе поллютанты; органы пищеварительной системы страдают от поллютантов, попавших в пищу или питье; кровь несет урон как основной транспортный путь в организме; на печень и почки ложится огромная нагрузка по метаболизму и выведению токсических веществ из организма.

Среди системных нарушений, вызываемых поллютантами, выделяют следующие: раздражительный, т. е. раздражающий, эффект; повреждение мукоцилиарного аппарата, удаляющего загрязнители из легких, что

приводит к повышению проницаемости эпителия бронхов для аллергенов и инфекции и увеличивает риск развития бронхиальной астмы; развитие нейтрофильного воспаления; активацию перекисного окисления липидов и депрессию антиоксидантной защиты; увеличенному разрушительному действию нейтрофильной эластазы на легочную ткань; повышению продукции медиаторов воспаления — метаболитов арахидоновой кислоты, цитокинов и адгезивных молекул.

Основные понятия эпигенетики

Эпигенетика изучает комплекс закономерностей эпигенетического наследования — изменения экспрессии генов или фенотипа клетки, вызванных механизмами, не использующими в качестве носителя информации ДНК. В

Таблица 1. Виды эпигенетических меток, регулирующих транскрипцию ДНК

Молекулярный сигнал	Пример	Ссылки
Посттрансляционные модификации гистонов	Репрессивная метка триметилирования лизина 9 гистона H3 (H3K9me3)	[1]
Варианты гистонов	Гистон Макро H2A.1	[2]
Нуклеосомное позиционирование	Области без нуклеосом на промоторах генов	[3]
Хроматиновая петля	Kit Регулировка Gata1/Gata2	[4]
Модификации ДНК	5С-цитозин-метилирование	[5]
Структурная вариация ДНК	Формирование R-петли	[6]
РНК-опосредованные пути	Антисмысловая РНК-транскрипция	[7]

рамках изучения влияния окружающей среды на эпигеном внимание уделяют, в первую очередь, механизмам регуляции экспрессии генов, наиболее популярные из которых представлены в табл. 1.

Метилирование цитозинов в ДНК — самая распространенная эпигенетическая метка. Наиболее часто встречающаяся модификация этого типа — 5-метил-цитозин (5-мС), которая содержится в регионах, богатых CpG, известных как «островки CpG» и типичных для регуляторных областей генома. При рождении паттерн метилирования ДНК у организма, в отсутствие влияния внешних факторов, повторяет родительский, а если поддержание метилирования становится невозможным, организм быстро погибает. За метилирование ДНК отвечают ферменты цитозин(С5)-ДНК-метилтрансферазы (DNMT) [8], переносящие метильную группу с субстрата S-аденозилметионина на цитозины в ДНК. DNMT1 поддерживает родительский уровень метилирования, а в комплексе с хроматиновым белком UHRF1 этот фермент способен распознавать метилированные сайты в родительской хромосоме и устанавливать метилированную «метку» в том же локусе в дочерних цепях ДНК. DNMT3a и 3b осуществляют метилирование de novo. Считается, что гиперметилирование генов ферментов репарации ДНК, произведенное именно DNMT3b, играет ключевую роль в злокачественном перерождении и образовании нескольких типов раковых опухолей [9], а мутации гена DNMT3a ассоциированы с развитием острой миелоидной лейкемии у 1/5 пациентов. Процесс деметилирования проходит иначе, через последовательное окисление от 5-мС до 5-формилцитозина (5f-С) и 5-карбоксилцитозина (5ca-С) с дальнейшим иссечением и замещением этих модифицированных остатков неметилированным цитозином с участием тиминовой ДНК-глицозилазы (TDG) и ферментов механизма эксцизионной репарации оснований (BER) [10].

Вторая по распространенности эпигенетическая метка — модификация гистонов. Гистоны — очень консервативные белки, отвечающие за упаковку и упорядочивание ДНК. К регуляторным модификациям гистонов относят ацетилирование лизина, приводящее к активации транскрипции, и метилирование лизина, которое в зависимости от положения в цепи может быть либо активирующим, либо репрессирующим механизмом [11]. Ацетилирование гистонов по лизинам регулируют два семейства ферментов: ацетилирующие гистонацетилтрансферазы (HAT) и гистондеацетилазы (HDAC). Существует четыре класса 11 HDAC: класс I включает HDAC 1, 2, 3 и 8, которые экспрессируются в ядро; класс IIa включает HDAC 4, 5, 7 и 9, которые курсируют между цитоплазмой и ядром; класс IIb включает HDAC 6 и 10, которые остаются в цитоплазме; класс IV включает HDAC 11.

Как метилирование ДНК, так и модификации гистонов (метилирование и ацетилирование) подвержены

экзогенным изменениям. Например, активность сиртуин-1–NAD⁺-зависимой HDAC может быть модулирована такими биологически активными веществами, как ресвератрол. Ингибирование HDAC приводит к снятию репрессии транскрипции и молчания генов, что может вызывать несвоевременную активацию генов и развитие патологий. Ингибиторы HAT, напротив, способны помочь восстановить эпигенетический контроль, предотвращая транскрипцию ненужных генов.

Таким образом, даже нормально действующие эпигенетические механизмы регуляции представляют собой многоуровневую и пока малоизученную систему. Введение в эту систему факторов воздействия окружающей среды усложняет анализ ситуации многократно.

Методы анализа эпигенетического ландшафта

Обычно выделяют два пути получения индивидом эпигенетических меток. Прямое наследование означает, что в первом поколении организм приобретает эпигенетические изменения на эмбриональной стадии или на стадии зародышевых клеток [12], затем эти изменения закрепляются вплоть до второго-третьего поколений, а изменения проявляются уже в первом. При опосредованном наследовании фенотипическое проявление происходит уже после удаления эпимутагена из среды, во втором-третьем поколениях. Чтобы эпимутации сказались на здоровье организма в течение его жизни, они должны быть достаточно интенсивными и затронуть критические для жизнедеятельности организма гены.

Для быстрого анализа уровней метилирования отдельных генов могут быть использованы косвенные иммуногистохимические методы. Использование биомаркеров на основе измерения уровня метилирования некоторых ДНК в периферической крови стало весьма перспективным методом в отношении разработки методов детекции многочисленных малых очагов метастаз [13]. Изменение количества белка в клетках может быть связано с онкологическими заболеваниями: количество гликолитических и митохондриальных белков (альфа-енолаза и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, АТФ-синтаза) значительно увеличивается в ткани карциномы молочной железы человека, появившейся в результате воздействия бензо-[a]-пирена [14]. Однако этот показатель информативен лишь при сравнении транскриптомов и протеомов. Кроме того, клетки могут менять свой протеом, чтобы компенсировать воздействие поллютанта: клетки MCF-7 компенсируют воздействие бензо-[a]-пирена, дибензо-[a,i]-пирена и экстракта каменноугольной смолы гиперэкспрессией белков теплового шока HSP-70 и HSP-27 [14]. Известно также, что мутации могут изменять связывание конечного белка с антителами, специфичными к нативному белку.

Например, в экспериментальных работах была проверена реактивность белка p53 в клетках MCF-7 после воздействия солей кадмия с помощью конформационно-специфичных моноклональных антител PAб1620 и PAб240, и оказалось, что кадмий приводит к изменению фолдинга белка p53, нарушая его конформацию и узнавание антителами [15]. Анализ подобных изменений проводят с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле.

В идеальной ситуации у гена должно быть только три значения метилирования: 0 — без метилирования, 50% — один аллель метилирован, 100% — оба аллеля метилированы. Однако на практике из-за неоднородности образцов, особенно взятых в реальных популяциях, дискретные значения степени метилирования не обнаруживаются, а в большинстве исследований сообщается об изменении уровня метилирования ДНК на 10–30%. Такие данные можно получить только при помощи количественных методов анализа.

Методы исследования генома и транскриптома весьма схожи между собой, их делят на две группы (табл. 2). Первый метод — РНК-ДНК-гибридизация, при котором короткие ДНК иммобилизуют на чипе, исследуемые ДНК или РНК гибридируются с этой иммобилизованной ДНК, далее на их основе синтезируют ДНК, включая в нее нуклеотиды с флуоресцентными метками. При помощи специального прибора измеряют флуоресценцию, коррелирующую с количеством исследуемой ДНК или РНК. Этот метод позволяет быстрее определять изменения уровня транскрипции известных генов, но при этом существует риск ошибки, связанной с неправильной гибридизацией.

Второй метод — иммунопреципитация ДНК на хроматине — основан на химическом связывании ДНК с белком, очистке ДНК по белку, высвобождении и

секвенировании ДНК. В результате можно получить процент содержания ДНК с определенными сиквенсами в общей смеси. Главное ограничение массового параллельного секвенирования (МПС) — длина секвенируемых фрагментов: в процессе иммунопреципитации ДНК обычно разрезают на участки 100–500 п.о., так как более длинные фрагменты могут порождать ошибки секвенирования. Иммунопреципитация хроматина не позволяет различать разницу в уровне модификации и экспрессии в 10–20%, при этом в незлокачественных заболеваниях различия в метилировании локуса обычно находятся как раз в пределах 10–20% [16]. В то же время метод позволяет проводить секвенирование не только отдельных генов, но и полногеномное, для его ускорения применяются технологии автоматизированного МПС. Результаты МПС, в отличие от данных, полученных с помощью микрочипов, позволяют распознавать аллели, обнаруживать альтернативные сплайсинги, проводить исследование метилирования ДНК с нуклеотидным разрешением, получать информацию из ранее не отсеквенированных областей генома, что делает данные МПС потенциально более ценными со временем. Достоинство метода — в наличии потенциала для развития: МПС становится все быстрее и доступнее по себестоимости, в то время как применение чипов практически достигло своего предела. Кроме того, секвенирование обладает большей точностью измерения метилирования, чем чипирование.

Методы метиломного секвенирования также сводятся к двум вышеописанным путям. Для анализа метилома процедура секвенирования была модифицирована. Согласно классическому методу, ковалентная модификация бисульфитом натрия приводит к образованию урацила на месте немодифицированного

Таблица 2. Известные виды эпигенетической регуляции транскрипции ДНК и способы обнаружения регуляторных меток

Регулятор транскрипции гена	Метод детекции	Достоинства (+) и недостатки (–) метода	
Рекомендуемые			
Метилирование ДНК	Бисульфитный мутагенез	MethylC-seq [17]	(+) Нуклеотидное разрешение; охватывает большинство цитозинов в геноме (–) Высокая стоимость
		RRBS [18]	(+) Нуклеотидное разрешение, относительно невысокая стоимость (–) Охватывает ограниченный пул цитозинов, преимущественно в CpG-островках
	Рестрикционный анализ ферментами, чувствительными к модификациям ДНК	HELP-tagging [19] MSCC [20]	(+) Относительно невысокая стоимость, не зависит от плотности CpG-групп (–) Охватывает ограниченный пул цитозинов
Метилирование ДНК	Аффинный анализ	meDIP-seq [21]	(+) Может охватить весь геном (–) Количественный анализ только в CpG-бедных зонах
	Микрочипы	Infinium Methylation BeadChip [22]	(+) Невысокая стоимость, ориентирован на области предполагаемой функции (–) Охватывает ограниченный пул цитозинов; достоверность зависит от последовательности нуклеотидов
миРНК	Секвенирование	[23]	(+) Количественный, может сканировать ранее необнаруженные миРНК (–) Относительно сложная подготовка библиотеки
мРНК	Секвенирование	[23]	(+) Количественный, позволяет оценить процессы в ходе транскрипции, например альтернативный сплайсинг (–) Подходы к анализу данных все еще на стадии оптимизации
Альтернативные			
Посттрансляционные модификации хроматина	Секвенирование на чипах	[24]	(+) Анализ всего секвенированного генома (–) Слабое разрешение
Структура хроматина	Секвенирование ДНКазами	[25]	(+) Идентифицирует регуляторные области ДНК, не расположенные в аннотированных промоторах (–) Неколичественный

Таблица 3. Известные базы данных по эпигенетическим меткам и браузеры для их использования

Проект	Web-ресурсы
ENCyclopedia Of DNA Elements (ENCODE, modENCODE)	http://www.genome.gov/10005107 http://genome.ucsc.edu/ENCODE/ http://www.modencode.org/ http://www.genome.gov/modencode/
Roadmap in Epigenomics	http://www.roadmapepigenomics.org/ http://www.epigenomebrowser.org/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/epigenomics
BPA The Cancer Genome Atlas (TCGA)	http://www.genome.gov/17516564 http://cancergenome.nih.gov/ http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga
International Human Epigenome Consortium (IHEC)	http://www.ihec-epigenomes.org/
NGSmethDB	http://bioinfo2.ugr.es/NGSmethDB
The Smith Lab MethBase	http://smithlabresearch.org/software/methbase

цитозина, в то время как 5С-метилцитозин в эту реакцию не вступает. Полученные различия в сиквенсах позволяют определить сайты метилирования цитозина. Новый метод люминометрического анализа метилирования основан на совместном расщеплении ДНК чувствительными к метилированию ферментами рестрикции и последующем пиросеквенировании ДНК с попутным введением флуоресцентных меток. Известная платформа для проведения такой методики — Qiagen's Pyrosequencer [26]. Метод количественный, воспроизводимый и легко масштабируемый, не требует никакой модификации геномной ДНК для анализа, поэтому процедура занимает немного времени. Кроме того, методика требует только 200–500 нг геномной ДНК и включает внутренний контроль для устранения ошибок, возникающих из-за различных количеств исходной ДНК. Недостатками пиросеквенирования считают сравнительно небольшой по протяженности размер цепочек ДНК, доступных к прочтению без ошибок, а также возможность появления ошибок при прочтении участков с повторяющимся основанием.

Стратегия поиска связи между воздействием поллютантов и конкретными генетическими/эпигенетическими метками требует сопоставления информации обо всем геноме, эпигеноме и транскриптом. Для систематизации этой информации созданы базы данных (БД; табл. 3), например, ENCODE и Roadmap in Epigenomics. Анализ осложнен трудностью выбора «эталонного эпигенома», поскольку эпигеном даже в пределах одного организма варьируется в разных тканях [27], меняется с возрастом и клеточным циклом [28]. Проекты баз данных продолжают развиваться в основном за счет пополнения новыми сведениями. Со временем БД будут превращены в рабочие инструменты для определения патогенеза большинства заболеваний человека, вызванных воздействием поллютантов.

Сложности при обработке данных эпигенома

Разнообразие модификаций, вызываемых одним и тем же поллютантом, затрудняет построение моделей воздействия поллютанта на организм. Например, после воздействия поллютантов диоксинового ряда на модельных мышей «СрG-островки», локализованные в импринтинговой регуляторной контрольной области гена *Igf2*, были гиперметилированы, а сайты дифференциального удержания гистонов, расположенные выше соседних некодирующих областей H19, гипометилированы по сравнению с контрольными животными [29].

Второй проблемой становится интерпретация эпигенетических маркеров организмом, которая зависит от ткани, возраста организма и контекста метки. Например, метку триметилирования лизина 9 гистона H3 (H3K9me3) система транскрипции распознает как репрессивную, когда гистон H3 связан с гетерохроматином в цитологическом масштабе [30] и когда он присутствует в контексте генного промотора. Однако та же модификация гистона была обнаружена в телах активно транскрибируемых генов [31]. Метилирование ДНК в промоторе гена ингибирует транскрипцию, а в теле гена — наоборот, что свойственно активно транскрибируемым генам [20]. Кроме того, было показано, что паттерны нуклеосомного позиционирования [32] и метилирования ДНК, наблюдаемые на границах интрона/экзона, различаются [33]. Этим путем эпигенетические регуляторы могут влиять на выбор способа сплайсинга и функций конечного белка. Таким образом, при построении моделей работы эпигенетических меток снова необходимо проанализировать транскриптом.

Анализ эпигенетического ландшафта осложняют его динамичность и изменения даже на разных этапах клеточного цикла. В то же время важными свойствами эпигеномных сигнатур являются их динамическое поддержание и способность сохраняться сильно дольше индуцировавшего их воздействия [34], которая привела к созданию парадигмы ограничения внутриутробного развития (IUGR): отдаленное во времени событие вызывает эпигенетические изменения, придающие клеточной памяти фенотипические последствия. Повышенный риск ожирения и развития сахарного диабета 2-го типа во взрослом возрасте через много времени после подтвержденного токсического воздействия подтверждает эту теорию [16,35]. Предположительно, дефицит калорий в утробе матери вызывает адаптивный ответ, заставляя плод перестроить свой метаболизм во время беременности для накопления калорий, но после рождения при доступности нормального рациона эта адаптация оказывается пагубной [36].

Еще одна сложность — это взаимодействие нескольких метаболических путей, подвергшихся воздействию поллютанта, и возможная нелинейность интерференции этих путей. Например, бисфенол А сам по себе взаимодействует с S-аденозил-метионином [73] и через эстрогеновые рецепторы влияет на экспрессию miRNA-29 [37], что снижает уровень экспрессии ДНК-метилтрансфераз, увеличивает экспрессию гистонметилтрансферазы EZH2, создающую репрессивную модификацию на гистонах [38]. Вследствие этого предсказать суммарный эффект от всех изменений метилома тяжело.

Наконец, усложнение системы происходит при переходе от модельных объектов к популяции. Организмы подвергаются воздействию смесей поллютантов, что создает трудно предсказуемую интерференцию эффектов, затрудняющую сравнение с лабораторными условиями. Данная проблема может быть решена с применением информативного подмножества эпигенетических меток разной природы [39].

Выбор биологических моделей для геномного и эпигеномного анализа

При планировании исследований эпигенома необходимо учитывать основополагающие принципы токсикологических исследований, такие как выбор соответствующей дозы, способ введения и продолжительность воздействия [40,41].

События эпигенетической дисрегуляции принято считать соматическими, поэтому требуется, чтобы был отобран тип клеток, на котором изменения генома/эпигенома/фенотипа были бы четко определимы. Это приводит к трудностям при исследованиях человека, так как доступна лишь локальная биопсия в малых объемах. Кроме того, в образцах тканей из живых организмов даже клетки одной ткани могут находиться в разных состояниях и влиять друг на друга.

Доступные биологические модели можно разделить на три основные группы. К первой относят системы клеточных культур. Первичные клеточные культуры, взятые при биопсии животных или пациентов, имеют наиболее близкие к клеткам в организме эпигеном и транскриптом, однако трудны в культивировании и имеют ограниченное число циклов пассирования. Кроме того, для поддержания стабильности их метилома в течение длительного времени требуется трудоемкое выращивание искусственных органоидов. Культуры клеток онкологического происхождения гораздо менее требовательны к условиям культивирования и способны пережить больше 200 пассирований [18]. Однако их эпигеном, транскриптом, иногда и геном (нестабильное число хромосом) сильно отличаются от здоровых тканей *in vivo*, что делает сомнительной экстраполяцию результатов анализа их метилома на здоровые клетки. Компромиссным вариантом можно считать использование первичных культур, иммортализованных [42] различными вирусами: по метаболизму их различия с первичными культурами не столь радикальны, они не имеют ограничений на число пассирований и проще в поддержании. Новым направлением считается получение первичных культур из стволовых клеток, как эмбриональных, так и индуцированных.

Вторая группа моделей включает животных. Опыт показывает, что часто одни и те же эпигенетические нарушения приводят к одинаковым последствиям у модельных млекопитающих и человека [43], т. е. результаты, полученные, допустим, на мышах, можно с определенной долей вероятности экстраполировать на людей. Возможность изучать наследственные эффекты поллютантов [44–47] считают одним из важных преимуществ использования модельных животных в научной работе. Созданы линии животных, такие как линия мышей «желтых Агути» A^y , чей фенотип напрямую коррелирует с уровнем метилирования ДНК. Впрочем, иногда у них отсутствует отклик на положительный контроль известного эпимутагена [48,49]. Еще одним популярным

модельным объектом стали рыбки *Danio rerio*: этот объект удобен быстрой сменой поколений, т. е. позволяет в короткие сроки изучить наследование эпигенетических меток [50]. Геном *Danio rerio* полностью отсеквенирован, поэтому его изменения легко отслеживать. Механизмы эпигенетической регуляции этих рыбок незначительно отличаются от таковых у млекопитающих [51]. Наконец, их эмбрионы зарекомендовали себя удачной моделью для отслеживания токсического действия загрязнителей на ранних этапах развития.

К третьей группе относят клеточные культуры, постоянно генерируемые животными и которые можно получить, не лишая животное жизни. Например, метилом половых клеток можно использовать для оценки восприимчивости к заболеваниям у потомства [52].

Потенциальные лекарства против заболеваний, вызванных поллютантами

Основная стратегия лечения болезней, вызванных эпигенетическими нарушениями, включает в себя следующие шаги: устранение фактора, вызывающего отклонение эпигенома от нормы, и компенсация остаточных эффектов. Для компенсации иногда достаточно специальной диеты: например, деметилирующий эффект ВРА может быть компенсирован потреблением продуктов с метил-донорными веществами (фолиевая кислота и витамин В12). В настоящее время для противодействия эпигенетическим изменениям, связанным с онкологическими заболеваниями [53], все чаще используют природные и синтетические химиопрепараты, эффект которых основан на обратимости эпигенетических меток. Подобные препараты часто являются ингибиторами ДНК-метилтрансфераз и гистондеацетилаз. Так, полифенолы зеленого чая (GTP) и эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) ингибируют активность фермента DNMT и его экспрессию, что приводило к реактивации экспрессии GSTP1 [54] и онкосупрессорного гена RAR β 2 и подавляло размножение клеток рака пищевода [55], молочной железы [56] и легких [57] на модельных клеточных культурах и мышцах. С одной стороны, онкосупрессорный эффект этих веществ был доказан, с другой стороны, такое глобальное деметилирование генома может привести к реактивации генов, активность которых сама по себе приведет к тяжелым побочным эффектам.

При разработке синтетических препаратов, воздействующих на ферменты регуляции эпигенома, ученые стремятся повысить их селективность. Например, цитостатик N-гидрокси-N'-фенилоктандиамид, одобренный в США для лечения кожной T-клеточной лимфомы [58] и рака щитовидной железы [59], и известный в РФ под коммерческими наименованиями «Воринонат» и «Золинза», ингибирует HDAC I и II класса, не влияя на HDAC III класса. Аналогичным эффектом обладает ромидеписин, получивший на рынке название «Истодакс». Еще одним перспективным препаратом считают ДИМ (3,3'-дииндолилметан), селективно ингибирующий HDAC I класса, что приводит к повышению уровня транскрипции генов циклинзависимых киназ $p21$ и $p27$ [60] и остановке клеточного цикла в фазе G2/M; замедлению роста папилломавирусных новообразований [61], индукции апоптоза в клетках рака груди [62] и подавлению развития рака простаты [63]. ДИМ потенциально можно использовать для предотвращения или симптоматического смягчения острой лучевой болезни в результате техногенных аварий

или радиотерапии рака [64]. Возможно использование предшественников ДИМ, например, индол-3-карбинола (I3C), способного дозозависимо снижать уровни метилирования промоторной области гена *p16 INK4a* и [65] и останавливать клеточное деление. Однако I3C способен подавлять выработку медиаторов эстрогенового ряда, что, с одной стороны, позволяет использовать I3C для облегчения течения некоторых аутоиммунных заболеваний [66], с другой стороны, его активное применение может привести к гормональным нарушениям. Кроме этого, в настоящее время активно ведут клинические испытания ингибиторов гистонметилтрансфераз (HMT). Первым препаратом данной группы стал таземетостат, блокирующий активность EZH2-метилтрансферазы [67]. Позднее на стадии доклинических испытаний вывели пинометостат, ингибитор (DOT1L) HMT [68] и GSK3326595, который ингибирует белок аргининметилтрансферазы 5 (PRMT5) [69].

Таким образом, на сегодняшний день все одобренные к использованию препараты, влияющие на метилом, действуют на уровень метилирования ДНК либо в целом [70,71], либо через ингибирование одного фермента [72], вовлеченного в метилирование. Кроме того, эти препараты предназначены для симптоматического лечения уже развившихся заболеваний, но не могут таргетно корректировать эпимутации.

Перспективы для развития генетических и эпигенетических лекарств

Наиболее перспективным направлением считают создание *de novo* лекарств, способных попадать в клеточное ядро, селективно связываться с локусом в ДНК и привлекать или нести на себе соответствующие ферменты для изменения уровня метилирования ДНК. Наиболее перспективно на данный момент выглядят системы направленного редактирования генома. Изначально на эту роль предлагали эндонуклеазы с цинксодержащим доменом узнавания ДНК (ZFN или TAL) [73], однако эта технология требует создания отдельного белка под каждый сайт связывания, что резко повышает стоимость производства. Более универсальная система CRISPR/Cas9 основана на системе бактериального иммунитета, специфически распознающего последовательности нуклеотидов, свойственных вирусам. Модификации этого белкового комплекса позволяют устранить его эндонуклеазную активность и интегрировать в него РНК, обеспечивающую узнавание локуса, получив РНК-направляемый ДНК-связывающий белок. Полученный

комплекс с помощью генно-инженерных методов можно дополнить ферментом, влияющим на эпигенетическую метку ДНК. Использование укороченных молекул Cas9 позволяет упаковать ферментативную систему в частицы аденоассоциированного вируса и таким образом интегрировать систему в геном реципиента, закрепляя эффект. Менее детально изученным, но также перспективным выглядит использование другой эндонуклеазы Crpf1, меньших размеров, но обладающей похожей активностью.

Заключение

Генетические и эпигенетические изменения связаны между собой. В определенных условиях ферменты репликации/транскрипции воспринимают эпигенетическую метку как иной нуклеотид, что может привести к мутации. Эпигенетические метки могут влиять на эффективность работы систем репарации, что снижает уровень экспрессии белков, способных восстанавливать повреждения ДНК. В свою очередь и генетические aberrации могут нарушать функционирование систем редактирования эпигенома.

Исследования эпигенетических эффектов воздействия поллютантов на данный момент остаются более сложной научной проблемой, нежели генетический анализ, ввиду разной природы эпигенетических меток, их пластичности, зависимости их трактовки от контекста и влияния различных путей регуляции транскрипции друг на друга. Для практической эпигенетики очень важен системный подход. Большую пользу в систематизации информации об эпигеноме могут принести биоинформатические проекты.

В основном методы исследования эпигенетических меток направлены на анализ самых популярных ковалентных модификаций ДНК (метилирования) и гистонов (метилирования и ацетилирования); выделение ДНК и получение информации об эпигеноме представляют собой модификации аналогичных методов исследования генома с поправкой на детекцию модифицированных сайтов.

Исследования влияния поллютантов на геном и эпигеном людей сильно ограничены. В качестве модельных объектов для экспериментов и особенно предсказания патогенных эффектов поллютантов используют клеточные культуры тканей и органов, культуры эмбриональных стволовых клеток, анализ развития тканей в эмбрионах и модельные животные, такие как мыши, крысы, рыбы *Danio rerio*.

Серийные эпигенно-терапевтические препараты сейчас обладают в основном симптоматическим эффектом, активные исследования идут в направлении селективного редактирования патогенных эпигенетических локусов.

Литература

- Hiragami-Hamada K, et al. The molecular basis for stability of heterochromatin-mediated silencing in mammals. *Epigenetics Chromatin*. 2009; 2 (1): 14.
- Bernstein E, et al. A phosphorylated subpopulation of the histone variant macroH2A1 is excluded from the inactive X chromosome and enriched during mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Feb 5; 105 (5): 1533–8.
- Hartley PD, Madhani HD. Mechanisms that Specify Promoter Nucleosome Location and Identity. *Cell*. 2009; 137 (3): 445–58.
- Jing H, et al. Exchange of GATA Factors Mediates Transitions in Looped Chromatin Organization at a Developmentally Regulated Gene Locus. *Molecular Cell*. 2008; 29 (2): 232–42.
- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006. DOI: 10.1016/J.TIBS.2005.12.008.
- Roy D, Yu K, Lieber MR. Mechanism of R-Loop Formation at Immunoglobulin Class Switch Sequences. *Mol Cell Biol*. 2008 Jan; 28 (1): 50–60.
- Beiter T, et al. Antisense transcription: A critical look in both directions. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Jan; 66 (1): 94–112.
- Gore AC, et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*. Endocrine Society. 2015; 36 (6): 1–150.
- Subramaniam D, et al. DNA Methyltransferases: A Novel Target

- for Prevention and Therapy. *Front Oncol.* 2014; 4: 80.
10. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature.* 2013; 502 (7472): 472–79.
 11. Gillette TG, Hill JA. Readers, writers, and erasers: Chromatin as the whiteboard of heart disease. *Circulation Research.* 2015; 116 (7): 1245–53.
 12. Софронов Г. А., Паткин Е. Л. Эпигенетическая токсикология: перспективы развития. *Токсикологический вестник.* 2018; 0 (1): 2–7.
 13. Anglim PP, et al. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for squamous cell lung cancer. *Mol Cancer.* 2008; 7: 62.
 14. Hooven LA, Baird WM. Proteomic analysis of MCF-7 cells treated with benzo[a]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene, coal tar extract, and diesel exhaust extract. *Toxicology.* 2008; 249 (1): 1–10.
 15. Méplán C, Mann K, Hainaut P. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem.* 1999; 274 (44): 31663–70.
 16. Thompson RF, et al. Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats. *J Biol Chem.* 2010; 285 (20): 15111–8.
 17. Lister R, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009; 462 (7271): 315–22.
 18. Meissner A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature.* 2008; 454 (7205): 766–70.
 19. Suzuki M, et al. Optimized design and data analysis of tag-based cytosine methylation assays. *Genome Biol.* 2010; 1 (4): R36.
 20. Ball MP et al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol.* 2009; 27 (4): 361–8.
 21. Down TA, et al. A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. *Nat Biotechnol.* 2008; 26 (7): 779–85.
 22. Bibikova M, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics.* 2011; 98 (4): 288–95.
 23. Nagalakshmi U, et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science.* 2008; 320 (5881): 1344–9.
 24. Mikkelsen TS, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature.* 2007; 448 (7153): 553–60.
 25. Song L, Crawford GE. DNase-seq: A high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2010; 5 (2): pdb. prot5384.
 26. Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi M. PyrosequencingTM: An accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation.* 2002; 19 (5): 479–85.
 27. De Bustos C, et al. Tissue-specific variation in DNA methylation levels along human chromosome 1. *Epigenetics Chromatin.* 2009; 2 (1): 7.
 28. Christensen BC, et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CPG island context. *PLoS Genet.* 2009; 5 (8): e1000602.
 29. Ma X, Chen J, Tian Y. Pregnane X receptor as the sensor and effector in regulating epigenome. *J Cell Physiol.* 2015; 230 (4): 752–7.
 30. Peters AH, et al. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet.* 2002; 30 (1): 77–80.
 31. Vakoc CR, et al. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 γ are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell.* 2005; 19 (3): 381–91.
 32. Tilgner H. et al. Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat Struct Mol Biol.* 2009; 16 (9): 996–1001.
 33. Laurent L, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* 2010; 20 (3): 320–31.
 34. Hou Lifang, et al. Environmental Chemical Exposures and Human Epigenetics. *Int J Epidemiol.* 2012; 41 (1): 79–105.
 35. Simmons R. Perinatal Programming of Obesity. *Semin Perinatol.* 2008; 32 (5): 371–4.
 36. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: Evolution, development, and patterns of disease. *Science.* 2004; 305 (691): 1733–6.
 37. Derghal A, et al. An emerging role of micro-RNA in the effect of the endocrine disruptors. *Front Neurosci.* 2016; 10: 318.
 38. Doherty LF, et al. In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: An epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Horm Cancer.* 2010; 1 (3): 146–55.
 39. Ernst J, Kellis M. Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat Biotechnol.* 2010; 28 (8): 817–25.
 40. LeBaron MJ, et al. Epigenetics and chemical safety assessment. *Mutat Res.* 2010; 705 (2): 83–95.
 41. Jay IG, et al. What Do We Need to Know Prior to Thinking About Incorporating an Epigenetic Evaluation Into Safety Assessments? *Toxicol Sci.* 2010; 116 (2): 375–81.
 42. Wild L, et al. In vitro transformation of mesenchymal stem cells induces gradual genomic hypomethylation. *Carcinogenesis.* 2010; 31(10): 1854–62.
 43. He Y, et al. Spatiotemporal DNA methylome dynamics of the developing mouse fetus: 7818. *Nature.* 2020; 583 (7818): 752–9.
 44. Anway M, Cupp A, Uzumcu M. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science.* 2005; 308 (5727): 1466–9.
 45. Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology.* 2006; 147 (6 Suppl): S43–9.
 46. Crews D, et al. Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104 (14): 5942–6.
 47. Guerrero-Bosagna CM, Skinner MK. Epigenetic transgenerational effects of endocrine disruptors on male reproduction. *Semin Reprod Med.* 2009; 27 (5): 403–8.
 48. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104 (32): 13056–61.
 49. Rosenfeld CS, et al. Maternal exposure to bisphenol A and genistein has minimal effect on A vya offspring coat color but favors birth of agouti over nonagouti mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110 (2): 537–42.
 50. Udvadia AJ, Linney E. Windows into development: Historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev Biol.* 2003; 256 (1): 1–17.
 51. Krauss V, Reuter G. DNA Methylation in drosophila—a critical evaluation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2011; 101: 177–91.
 52. Se K, et al. Sperm Epimutation Biomarkers of Obesity and Pathologies Following DDT Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Disease. *Environ Epigenet.* 2019; 5 (2): dvz008
 53. Скрябин Н. А. и др. Методы исследования метилирования ДНК: возможности и перспективы использования в онкологии. *Сибирский Онкологический Журнал.* 2013; 6.
 54. Pandey M, Shukla S, Gupta S. Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2010; 126 (11): 2520–33.
 55. Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary Polyphenols May Affect DNA Methylation. *J Nutr.* 2007; 137 (1 Suppl): 223S–228S.
 56. Won JL, Shim JY, Zhu BT. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol.* 2005; 68 (4): 1018–30.
 57. Gao Z, et al. Promoter demethylation of WIF-1 by epigallocatechin-3-gallate in lung cancer cells. *Anticancer Res.* 2009; 29 (6): 2025–30.
 58. FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Oncologist.* 2007; 12 (10): 1247–52.
 59. Bubna AK. Vorinostat — An Overview. *Indian J Dermatol.* 2015; 60 (4): 419.
 60. Beaver LM, et al. 3,3'-Diindolylmethane, but not indole-3-carbinol, inhibits histone deacetylase activity in prostate cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 263 (3): 345–51.
 61. Goon P, Sonnex C, Jani P, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008; 265: 147–51.
 62. Rajendran P, et al. Dietary phytochemicals, HDAC inhibition,

- and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clin Epigenetic*. 2011; 3 (1): 4.
63. Zhang WW, Feng Z, Narod SA. Multiple therapeutic and preventive effects of 3,3'-diindolylmethane on cancers including prostate cancer and high grade prostatic intraepithelial neoplasia. *J Biomed Res*. 2014; 28 (5): 339–48.
 64. Fan S, et al. DIM (3,3'-diindolylmethane) confers protection against ionizing radiation by a unique mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (46): 18650–5.
 65. Lyn-Cook BD, Mohammed SI, et al. Gender differences in gemcitabine (Gemzar) efficacy in cancer cells: effect of indole-3-carbinol. *Anticancer Res*. 2010; 30 (12): 4907–13.
 66. Auburn KJ, et al. Lifespan Is Prolonged in Autoimmune-Prone (NZB/NZW) F1 Mice Fed a Diet Supplemented with Indole-3-Carbinol. *J Nutr Oxford Academic*. 2003; 133 (11): 3610–3.
 67. Italiano A, et al. Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol*. 2018; 19 (5): 649–59.
 68. Campbell CT, et al. Mechanisms of Pinometostat (EPZ-5676) Treatment–Emergent Resistance in MLL-Rearranged Leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2017; 16 (8): 1669–79.
 69. Siu LL, Rasco DW, Vinay SP, et al. METEOR-1: a phase I study of GSK3326595, a first-in-class protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibitor, in advanced solid tumours. *Ann Oncol*. 2019; 30 (Suppl 5): v159–v193.
 70. Claus R, Lübbert M. Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene*. 2003; 22 (42): 6489–96.
 71. Pogribny IP, Tryndyak VP, Boureiko A, Melnyk S, Bagnyukova TV, Montgomery B, et al. Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutat Res*. 2008; 644 (1–2): 17–23.
 72. Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr*. 2002; 132 (8 Suppl): 2333S–5S.
 73. Verma S, et al. Computational approaches in epitope design using DNA binding proteins as vaccine candidate in Mycobacterium tuberculosis. *Infect Genet Evol*. 2020; 83: 1348–1567.

References

1. Hiragami-Hamada K, et al. The molecular basis for stability of heterochromatin-mediated silencing in mammals. *Epigenetics Chromatin*. 2009; 2 (1): 14.
2. Bernstein E, et al. A phosphorylated subpopulation of the histone variant macroH2A1 is excluded from the inactive X chromosome and enriched during mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Feb 5; 105 (5): 1533–8.
3. Hartley PD, Madhani HD. Mechanisms that Specify Promoter Nucleosome Location and Identity. *Cell*. 2009; 137 (3): 445–58.
4. Jing H, et al. Exchange of GATA Factors Mediates Transitions in Looped Chromatin Organization at a Developmentally Regulated Gene Locus. *Molecular Cell*. 2008; 29 (2): 232–42.
5. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006. DOI: 10.1016/J.TIBS.2005.12.008.
6. Roy D, Yu K, Lieber MR. Mechanism of R-Loop Formation at Immunoglobulin Class Switch Sequences. *Mol Cell Biol*. 2008 Jan; 28 (1): 50–60.
7. Beiter T, et al. Antisense transcription: A critical look in both directions. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Jan; 66 (1): 94–112.
8. Gore AC, et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*. Endocrine Society. 2015; 36 (6): 1–150.
9. Subramaniam D, et al. DNA Methyltransferases: A Novel Target for Prevention and Therapy. *Front Oncol*. 2014; 4: 80.
10. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 2013; 502 (7472): 472–79.
11. Gillette TG, Hill JA. Readers, writers, and erasers: Chromatin as the whiteboard of heart disease. *Circulation Research*. 2015; 116 (7): 1245–53.
12. Sofronov GA, Patkin EL. Jepigeneticheskaja toksikologija: perspektivy razvitiya. *Toksikologicheskij vestnik*. 2018; 0 (1): 2–7. Russian.
13. Anglim PP, et al. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for squamous cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2008; 7: 62.
14. Hooven LA, Baird WM. Proteomic analysis of MCF-7 cells treated with benzo[a]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene, coal tar extract, and diesel exhaust extract. *Toxicology*. 2008; 249 (1): 1–10.
15. Méplan C, Mann K, Hainaut P. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem*. 1999; 274 (44): 31663–70.
16. Thompson RF, et al. Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats. *J Biol Chem*. 2010; 285 (20): 15111–8.
17. Lister R, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009; 462 (7271): 315–22.
18. Meissner A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*. 2008; 454 (7205): 766–70.
19. Suzuki M, et al. Optimized design and data analysis of tag-based cytosine methylation assays. *Genome Biol*. 2010; 1 (4): R36.
20. Ball MP et, al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol*. 2009; 27 (4): 361–8.
21. Down TA, et al. A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. *Nat Biotechnol*. 2008; 26 (7): 779–85.
22. Bibikova M, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011; 98 (4): 288–95.
23. Nagalakshmi U, et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*. 2008; 320 (5881): 1344–9.
24. Mikkelsen TS, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 2007; 448 (7153): 553–60.
25. Song L, Crawford GE. DNase-seq: A high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010; 5 (2): pdb.p05384.
26. Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi M. Pyrosequencing™: An accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation*. 2002; 19 (5): 479–85.
27. De Bustos C, et al. Tissue-specific variation in DNA methylation levels along human chromosome 1. *Epigenetics Chromatin*. 2009; 2 (1): 7.
28. Christensen BC, et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CPG island context. *PLoS Genet*. 2009; 5 (8): e1000602.
29. Ma X, Chen J, Tian Y. Pregnane X receptor as the sensor and effector in regulating epigenome. *J Cell Physiol*. 2015; 230 (4): 752–7.
30. Peters AH, et al. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet*. 2002; 30 (1): 77–80.
31. Vakoc CR, et al. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 γ are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*. 2005; 19 (3): 381–91.
32. Tilgner H. et al. Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat Struct Mol Biol*. 2009; 16 (9): 996–1001.
33. Laurent L, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*. 2010; 20 (3): 320–31.
34. Hou Lifang, et al. Environmental Chemical Exposures and Human Epigenetics. *Int J Epidemiol*. 2012; 41 (1): 79–105.
35. Simmons R. Perinatal Programming of Obesity. *Semin Perinatol*. 2008; 32 (5): 371–4.
36. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: Evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 2004; 305 (691): 1733–6.
37. Dergal A, et al. An emerging role of micro-RNA in the effect of the endocrine disruptors. *Front Neurosci*. 2016; 10: 318.
38. Doherty LF, et al. In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or

- bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: An epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Horm Cancer*. 2010; 1 (3): 146–55.
39. Ernst J, Kellis M. Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat Biotechnol*. 2010; 28 (8): 817–25.
 40. LeBaron MJ, et al. Epigenetics and chemical safety assessment. *Mutat Res*. 2010; 705 (2): 83–95.
 41. Jay IG, et al. What Do We Need to Know Prior to Thinking About Incorporating an Epigenetic Evaluation Into Safety Assessments? *Toxicol Sci*. 2010; 116 (2): 375–81.
 42. Wild L, et al. In vitro transformation of mesenchymal stem cells induces gradual genomic hypomethylation. *Carcinogenesis*. 2010; 31(10): 1854–62.
 43. He Y, et al. Spatiotemporal DNA methylome dynamics of the developing mouse fetus: 7818. *Nature*. 2020; 583 (7818): 752–9.
 44. Anway M, Cupp A, Uzumcu M. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science*. 2005; 308 (5727): 1466–9.
 45. Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*. 2006; 147 (6 Suppl): S43–9.
 46. Crews D, et al. Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (14): 5942–6.
 47. Guerrero-Bosagna CM, Skinner MK. Epigenetic transgenerational effects of endocrine disruptors on male reproduction. *Semin Reprod Med*. 2009; 27 (5): 403–8.
 48. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (32): 13056–61.
 49. Rosenfeld CS, et al. Maternal exposure to bisphenol A and genistein has minimal effect on A v/a offspring coat color but favors birth of agouti over nonagouti mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (2): 537–42.
 50. Udvardi AJ, Linney E. Windows into development: Historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev Biol*. 2003; 256 (1): 1–17.
 51. Krauss V, Reuter G. DNA Methylation in drosophila—a critical evaluation. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011; 101: 177–91.
 52. Se K, et al. Sperm Epimutation Biomarkers of Obesity and Pathologies Following DDT Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Disease. *Environ Epigenet*. 2019; 5 (2): dvz008
 53. Skryabin NA, i dr. Metody issledovaniya metilirovaniya DNK: vozmozhnosti i perspektivy ispol'zovaniya v onkologii. *Sibirskij Onkologicheskij Zhurnal*. 2013; 6. Russian.
 54. Pandey M, Shukla S, Gupta S. Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 2010; 126 (11): 2520–33.
 55. Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary Polyphenols May Affect DNA Methylation. *J Nutr*. 2007; 137 (1 Suppl): 223S–228S.
 56. Won JL, Shim JY, Zhu BT. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol*. 2005; 68 (4): 1018–30.
 57. Gao Z, et al. Promoter demethylation of WIF-1 by epigallocatechin-3-gallate in lung cancer cells. *Anticancer Res*. 2009; 29 (6): 2025–30.
 58. FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Oncologist*. 2007; 12 (10): 1247–52.
 59. Bubna AK. Vorinostat — An Overview. *Indian J Dermatol*. 2015; 60 (4): 419.
 60. Beaver LM, et al. 3,3'-Diindolylmethane, but not indole-3-carbinol, inhibits histone deacetylase activity in prostate cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012; 263 (3): 345–51.
 61. Goon P, Sonnex C, Jani P, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008; 265: 147–51.
 62. Rajendran P, et al. Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clin Epigenetic*. 2011; 3 (1): 4.
 63. Zhang WW, Feng Z, Narod SA. Multiple therapeutic and preventive effects of 3,3'-diindolylmethane on cancers including prostate cancer and high grade prostatic intraepithelial neoplasia. *J Biomed Res*. 2014; 28 (5): 339–48.
 64. Fan S, et al. DIM (3,3'-diindolylmethane) confers protection against ionizing radiation by a unique mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (46): 18650–5.
 65. Lyn-Cook BD, Mohammed SI, et al. Gender differences in gemcitabine (Gemzar) efficacy in cancer cells: effect of indole-3-carbinol. *Anticancer Res*. 2010; 30 (12): 4907–13.
 66. Auburn KJ, et al. Lifespan Is Prolonged in Autoimmune-Prone (NZB/NZW) F1 Mice Fed a Diet Supplemented with Indole-3-Carbinol. *J Nutr Oxford Academic*. 2003; 133 (11): 3610–3.
 67. Italiano A, et al. Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol*. 2018; 19 (5): 649–59.
 68. Campbell CT, et al. Mechanisms of Pinometostat (EPZ-5676) Treatment-Emergent Resistance in MLL-Rearranged Leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2017; 16 (8): 1669–79.
 69. Siu LL, Rasco DW, Vinay SP, et al. METEOR-1: a phase I study of GSK3326595, a first-in-class protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibitor, in advanced solid tumours. *Ann Oncol*. 2019; 30 (Suppl 5): v159–v193.
 70. Claus R, Lübbert M. Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene*. 2003; 22 (42): 6489–96.
 71. Pogribny IP, Tryndyak VP, Boureiko A, Melnyk S, Bagnyukova TV, Montgomery B, et al. Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutat Res*. 2008; 644 (1–2): 17–23.
 72. Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr*. 2002; 132 (8 Suppl): 2333S–5S.
 73. Verma S, et al. Computational approaches in epitope design using DNA binding proteins as vaccine candidate in Mycobacterium tuberculosis. *Infect Genet Evol*. 2020; 83: 1348–1567.