

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО МЕТИЛИРОВАННЫХ ГЕНОВ, ПОТЕНЦИАЛЬНО СВЯЗАННЫХ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ У ЧЕЛОВЕКА

Назаренко М. С.^{1,2,3}, Марков А. В.¹, Королева Ю. А.¹, Слепцов А. А.¹, Казанцев А. Н.², Барбараш О. Л.², Пузырев В. П.^{1,3}

Цель. Идентификация генов, различающихся по уровню метилирования ДНК между клетками артерий, пораженных атеросклерозом, и интактными сосудами у пациентов с атеросклеротическим поражением коронарных и сонных артерий.

Материал и методы. В группу обследования вошли пациенты с атеросклерозом, которым проведены плановые операции аортокоронарного шунтирования и каротидной эндартэктомии, а также относительно здоровые индивиды. Оценка уровня метилирования отдельных 27578 CpG-сайтов/14475 генов выполнена с использованием микрочипа Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina) в образцах атеросклеротически измененных коронарных (n=6) и сонных артерий (САБ, n=6), интактных внутренних грудных артерий (n=8) и больших подкожных вен (n=8) пациентов. Уровень метилирования в локусе 2q31.1 (*HOXD4/HOXD3/MIR10B*) определялся с помощью бисульфитного пиросеквенирования ДНК в образцах САБ и лейкоцитах у одних и тех же пациентов (n=130), а также в лейкоцитах относительно здоровых мужчин (n=110). Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов профессиональных программ.

Результаты. В клетках атеросклеротически измененных артерий по сравнению с интактными сосудами изменение уровня метилирования на 20% и более установлено для 46 CpG-сайтов/42 генов ($p_{\text{FDR}} < 0,05$). Из них 8 генов (*TLR4*, *TRAF1*, *ABCB11*, *NPR2*, *ALOX12*, *TMEM182*, *ALX4* и *FABP1*) являются известными кандидатами для атеросклероза/его факторов риска в результате исследований генетических ассоциаций. Наибольшее количество CpG-сайтов, в которых выявлено существенное снижение уровня метилирования в клетках атеросклеротически измененных артерий по сравнению с интактными сосудами, располагалось в локусе 2q31.1, содержащем гены *HOXD4/HOXD3/MIR10B*. В лейкоцитах пациентов уровень метилирования одного из CpG-сайтов в локусе 2q31.1 (*HOXD4/HOXD3/MIR10B*) выше у курящих (18±5%), чем у некурящих (14±6%; $p < 0,05$), а уровень метилирования другого CpG-сайта в данном регионе генома ниже у тех, кто перенес ишемический инсульт (18±8%) по сравнению с индивидами без инсульта в анамнезе (20±7%; $p < 0,05$).

Заключение. Меньшая доля идентифицированных дифференциально метилированных генов между клетками артерий, пораженных атеросклерозом, и интактными сосудами связана с атеросклерозом/его факторами риска в результате исследований генетических ассоциаций. Установлено, что изменение уровня метилирования в локусе 2q31.1 (*HOXD4/HOXD3/MIR10B*) ассоциировано с атеросклеротическим поражением артерий, а в лейкоцитах паци-

ентов уровень метилирования в данном регионе генома связан с курением и ишемическим инсультом.

Российский кардиологический журнал 2017, 10 (150): 42–48

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-42-48>

Ключевые слова: атеросклероз, метилирование ДНК, микроРНК, микрочипы, биомаркеры.

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск; ² ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Томск; ³ ФГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия.

Назаренко М. С.* — к.м.н., руководитель лаборатории популяционной генетики, Марков А. В. — к.м.н., н.с. лаборатории популяционной генетики, Королева Ю. А. — м.н.с. лаборатории популяционной генетики, Слепцов А. А. — м.н.с. лаборатории популяционной генетики, Казанцев А. Н. — м.н.с. лаборатории реконструктивной хирургии мультифокального атеросклероза, Барбараш О. Л. — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор, Пузырев В. П. — д.м.н., академик РАН, профессор, научный руководитель, научный руководитель.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

maria.nazarenko@medgenetics.ru

БЛК — лейкоциты пациентов с атеросклеротическим поражением коронарных и сонных артерий, БПВ — интактные большие подкожные вены нижних конечностей, ВГА — интактные внутренние грудные артерии, ЗЛК — лейкоциты относительно здоровых мужчин, КАБ — атеросклеротические бляшки коронарных артерий, САБ — атеросклеротические бляшки сонных артерий, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания.

Рукопись получена 21.06.2017

Рецензия получена 09.08.2017

Принята к публикации 04.09.2017

IDENTIFICATION OF DIFFERENTLY METHYLATED GENES POTENTIALLY RELATED TO HUMAN ATHEROSCLEROSIS

Nazarenko M. S.^{1,2,3}, Markov A. V.¹, Koroleva Yu. A.¹, Sleptsov A. A.¹, Kazantsev A. N.², Barbarash O. L.², Puzyrev V. P.^{1,3}

Aim. Identification of the genes, different in the level of DNA methylation among the cells of intact or atherosclerotic arteries in patients with coronary and carotid atherosclerosis.

Material and methods. Into the study group, atherosclerosis patients were included, who had undergone coronary bypass surgery or carotid endarterectomy, and relatively healthy individuals. The assessment of methylation level of various 27578 CpG-sites/14475 genes was done with the microchip Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina) in the specimens of atherosclerotically changed coronary (n=6), carotid (n=6), intact internal thoracic arteries (n=8) and large saphenous veins (n=8). Level of methylation in the locus 2q31.1 (*HOXD4/HOXD3/MIR10B*) was measured with bisulphite pyrosequencing of DNA in the vessels specimens and leucocytes of the same patients (n=130), as in the leucocytes of relatively healthy men (n=110).

Results. In the cells of atherosclerotically changed arteries, comparing to intact vessels, the change of methylation level by 20% and more is found for 46 CpG-

sites/42 genes ($p_{\text{FDR}} < 0,05$). Of those 8 genes (*TLR4*, *TRAF1*, *ABCB11*, *NPR2*, *ALOX12*, *TMEM182*, *ALX4* and *FABP1*) are known candidates for atherosclerosis or its risk factors by the results of genetics studies. Most number of CpG sites, where the highest decrease of methylation found in the cells of atherosclerotically changed arteries comparing to the intact, were located in the locus 2q31.1, with the genes *HOXD4/HOXD3/MIR10B*. In leucocytes of patients the level of methylation of one of the CpG-sites in locus 2q31.1 (*HOXD4/HOXD3/MIR10B*) higher in smokers (18±5%), than non-smokers (14±6%; $p < 0,05$), and level of methylation of one of CpG-sites in this area of genome is lower in those who had previous ischemic stroke (18±8%) comparing to those with no stroke anamnesis (20±7%; $p < 0,05$).

Conclusion. Lowest part of the identifiable differently methylated genes among the cells of lesioned arteries and intact vessels is related to atherosclerosis or its risk factors as a result of genetic studies on genetic associations. It is found that the change of methylation level in locus 2q31.1 (*HOXD4/HOXD3/MIR10B*) is associated with atherosclerotic lesion of arteries, and in leucocytes of patients the grade of

methylation in the studied region of genome is related to smoking and ischemic stroke.

Russ J Cardiol 2017, 10 (150): 42–48

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-42-48>

Key words: atherosclerosis, DNA methylation, microRNA, microchips, biomarkers.

¹SRI of Medical Genetics, Tomsk National Research Center of RAS, Tomsk; ²SRI of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Tomsk; ³Siberian State Medical University (SSMU), Tomsk, Russia.

Согласно мировой статистике, одной из ведущих патологий в структуре болезней системы кровообращения является атеросклеротическое поражение артерий, которое приводит к таким тяжелым осложнениям как инфаркт миокарда, инсульт, внезапная смерть [1]. По своей природе атеросклероз является многофакторным заболеванием, значительный вклад в развитие которого вносит генетическая компонента [2, 3]. В настоящее время достигнуты определенные успехи в идентификации локусов, ассоциированных с атеросклеротическим поражением артерий различной локализации. В то же время, существенная доля наследуемости данного заболевания остается невыясненной [4]. Можно предположить, что один из подходов в решении данного вопроса заключается в изучении эпигенетических модификаций генома в тканях органов-мишеней при патологии.

Метилирование ДНК является первым описанным эпигенетическим механизмом и представляет собой ферментативный процесс ковалентного присоединения метильных групп к остаткам цитозина, входящим в состав CpG-динуклеотидов (CpG-сайтов). Метилирование ДНК является нормальным феноменом онтогенеза, регулирующим тканеспецифичную экспрессию генов, стабильность генома, инактивацию X-хромосомы, контроль геномного импринтинга и т.п. Однако под воздействием факторов среды, уровень и рисунок метилирования ДНК может изменяться и быть связан с формированием подверженности к сердечно-сосудистым заболеваниям (ССЗ). Многие факторы риска и биомаркеры ССЗ, такие как возраст, курение, хроническое воспаление, сахарный диабет 2 типа, ожирение, гипергомоцистемия и гиперхолестеринемия, тесно ассоциированы с уровнем метилирования ДНК [5]. Большинство работ, связывающих уровень метилирования ДНК с фенотипами ССЗ, основаны на кандидатном подходе, и проводятся с использованием относительно легко доступного для исследования материала — лейкоцитов периферической крови [6]. Принимая во внимание существующую тканеспецифичность метилирования ДНК, актуальным является изучение данной эпигенетической модификации в клетках артерий, которые являются непосредственным морфологическим субстратом атеросклероза.

В настоящее время активно выполняются исследования с использованием микрочиповых технологий и массового параллельного секвенирования, в которых в качестве материала используются лейкоциты периферической крови и клетки артерий, пора-

женных атеросклерозом и интактных [7]. Данный подход позволяет идентифицировать определенные регионы генома, регулируемые с помощью метилирования ДНК, которые, в дальнейшем, могут быть проанализированы более детально, в том числе, и на предмет участия в патогенезе заболевания. Однако, данные работы сильно различаются между собой в отношении изучаемых клинических форм патологии, регионов сосудистого русла, критериев формирования выборок и их популяционных особенностей, а также используемых методических подходов анализа уровня метилирования ДНК и алгоритмов биоинформационной обработки данных. Поэтому трудно сопоставить результаты данных работ и выявить закономерности изменения уровня и рисунка метилирования ДНК клеток артерий, являющихся основным органом-мишенью атеросклероза. Таким образом, актуальным является исследование, в котором анализируются различные регионы сосудов, различающиеся по степени их атеросклеротического поражения, взятые как у разных, так и у одних и тех же пациентов для исключения влияния генетической изменчивости.

Цель исследования заключалась в идентификации генов, различающихся по уровню метилирования ДНК между клетками артерий, пораженных атеросклерозом, и интактными сосудами у пациентов с выраженным атеросклеротическим поражением коронарных и сонных артерий.

Материал и методы

В обследование вошли мужчины с выраженным атеросклеротическим поражением коронарных и сонных артерий ($n=130$; $63,4 \pm 8$ лет) и относительно здоровые мужчины, не имеющие клинических проявлений со стороны сердечно-сосудистой системы ($n=110$; $61,3 \pm 12,8$ лет). Индивиды в выборках были русскими по национальности. Формирование выборок и клиническая характеристика пациентов проходила на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний” (г. Кемерово). Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики (г. Томск). Все индивиды подписали информированное согласие на добровольное участие в исследовании.

У пациентов с атеросклеротическим поражением коронарных и сонных артерий, а также здоровых индивидов, получены образцы лейкоцитов перифе-

рической крови. Кроме того, в результате каротидной эндартерэктомии у пациентов получены образцы сонных артерий, которые включали биоптаты из области атеросклеротической бляшки. Образцы правых коронарных артерий, пораженных атеросклерозом, а также интактных внутренних грудных артерий и больших подкожных вен нижних конечностей собраны в результате коронарного шунтирования. Собранный биологический материал был заморожен в жидком азоте и хранился при температуре -80°C в составе биоколлекции НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ “Биобанк населения Северной Евразии”.

Анализ уровня метилирования 27578 CpG-сайтов, входящих в состав 14475 генов, выполнен с помощью микрочипа Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina) с использованием ДНК клеток сосудов (атеросклеротических бляшек коронарных (КАБ, $n=6$) и сонных артерий (САБ, $n=6$), интактных внутренних грудных артерий (ВГА, $n=8$) и больших подкожных вен нижних конечностей (БПВ, $n=8$), взятых у 14 мужчин с выраженным атеросклерозом сонных и коронарных артерий, артериальной гипертензией, гиперхолестеринемией, сахарным диабетом 2 типа и инфарктом миокарда в анамнезе. Часть тканей (по 6 образцов БЛК, КАБ, ВГА и БПВ) получена от одних и тех же индивидов.

Выделение ДНК из образцов выполнено с помощью стандартной фенол-хлороформной экстракции, а для биоптатов с предварительной гомогенизацией на приборе Minilys (Bertin Tech). Бисульфитная модификация ДНК осуществлена с использованием набора “EZ DNA Methylation Kit” (Zymo Research), согласно протоколу производителя.

Этапы полногеномной амплификации, ферментативного расщепления ДНК на фрагменты, очистки и гибридизации выполнены согласно стандартному протоколу производителя Illumina [8]. Интенсивность сигналов с матрицы измерялась с помощью сканера Illumina BeadArray Reader (Illumina). Первичная обработка полученных данных проводилась в пакете программ GenomeStudio Methylation Module (Illumina). В качестве параметра уровня метилирования использовали показатель индекса или уровня метилирования (β), который соответствовал отношению флуоресцентных сигналов метилированных аллелей к сумме флуоресцентных сигналов метилированных и неметилированных аллелей. Индекс метилирования β варьирует от 0 (неметилированное состояние) до 1 (полное метилирование всех CpG-сайтов в данном положении). Статистический анализ данных осуществлен с помощью пакетов lumi и limma в программной среде R (Bioconductor). Возникновение ложноположительных результатов (FDR, false discovery rate) при множественном сравнении данных скорректировано по методу Benjamini-Hochberg

(p_{FDR}). Дифференциально метилированными считались CpG-сайты с разницей среднего уровня метилирования между группами образцов $|\Delta\beta| \geq 0,2$, что превышает погрешность измерения на микрочипе и дополняет статистическую значимость различий биологически обоснованным критерием, и $p_{\text{FDR}} < 0,05$.

Для детального анализа уровня метилирования в области локуса 2q31.1 (*HOXD4/HOXD3/MIR10B*) использован метод пиросеквенирования модифицированной бисульфитом ДНК на приборе “PyroMark Q24” (Qiagen). Спектр анализируемых тканей включал САБ ($n=130$) и лейкоциты крови (БЛК, $n=130$), взятые у пациентов с выраженным атеросклеротическим поражением коронарных и сонных артерий, а также лейкоциты, полученные от относительно здоровых мужчин (ЗЛК, $n=110$). Амплификация модифицированной бисульфитом ДНК проводилась на термоциклере (Biometra) при $t_{\text{отж}} = 56^{\circ}\text{C}$ с использованием праймеров F: 5'-GGTTATTTGAATTGTTTGTAGAAAG-3'; R: Биотин-5'-CACTTTAATCTCTAACTATTCC-3'; S: 5'-TTTTGGGTGGGATTAGAGGTTGT-3'.

Сравнение уровней метилирования отдельных CpG-сайтов в группах исследования проводилось с использованием критериев Краскела-Уоллиса, Манна-Уитни и Уилкоксона, для тестирования корреляционных отношений между измеряемыми величинами использовался коэффициент корреляции Спирмена. Различия принимались как статистически значимые при $p < 0,05$.

Экспериментальные исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом “Медицинская геномика” НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования было проведено сравнение уровней метилирования 27578 CpG-сайтов, входящих в состав 14475 генов, между образцами КАБ-ВГА, КАБ-БПВ, САБ-ВГА, САБ-БПВ. В результате получены списки дифференциально метилированных CpG-сайтов и генов, различающихся по уровню метилирования на 20% и более, между образцами атеросклеротически пораженных артерий (САБ и КАБ) и интактных сосудов (ВГА и БПВ). Метилирование ДНК — тканеспецифичный феномен, поэтому для того, чтобы идентифицировать вариабельность метилирования ДНК, потенциально связанную не с регионарными особенностями сосудов, а с собственно атеросклеротическим поражением артерий, мы сравнили спектр дифференциально метилированных регионов генома между клетками артерий, пораженных атеросклерозом и относящихся к разным сосудистым руслам (КАБ и САБ), и интактными сосудами (ВГА и БПВ).

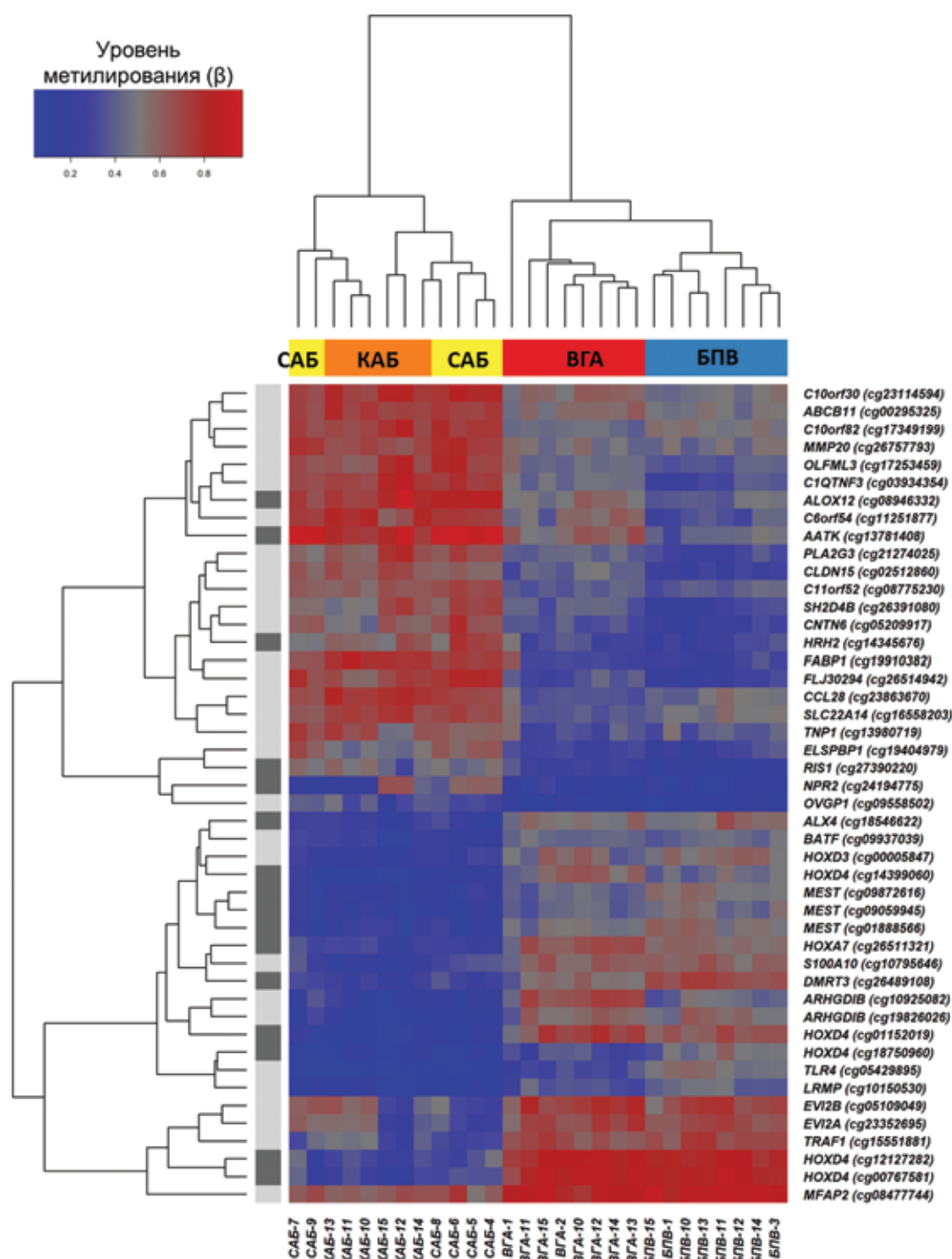


Рис. 1. Дифференциально метилированные CpG-сайты (гены) с различиями в уровне метилирования 20% и более и $p_{\text{FCR}} < 0,05$ между атеросклеротически измененными артериями и интактными сосудами.

Сокращения: БПВ — интактные большие подкожные вены нижних конечностей, ВГА — интактные внутренние грудные артерии, КАБ — атеросклеротические бляшки коронарных артерий, САБ — атеросклеротические бляшки сонных артерий.

В результате идентифицировано 46 ДМ CpG-сайтов, входящих в состав 42-х генов (рис. 1). Большая часть данных CpG-сайтов (генов) была гиперметилирована в пораженных атеросклерозом коронарных и сонных артериях по сравнению с интактными сосу-

дами. Это гены *C10orf30/BEND7*, *ABCB11*, *C10orf82*, *MMP20*, *OLFML3*, *C1QTNF3*, *ALOX12*, *C6orf54/KIF25-AS1*, *AATK*, *PLA2G3*, *CLDN15*, *C11orf52/HSPB2*, *SH2D4B*, *CNTN6*, *HRH2*, *FABP1*, *FLJ30294/TMEM182*, *CCL28*, *SLC22A14*, *TNP1*, *ELSPBP1*, *RIS1/TMEM158*,

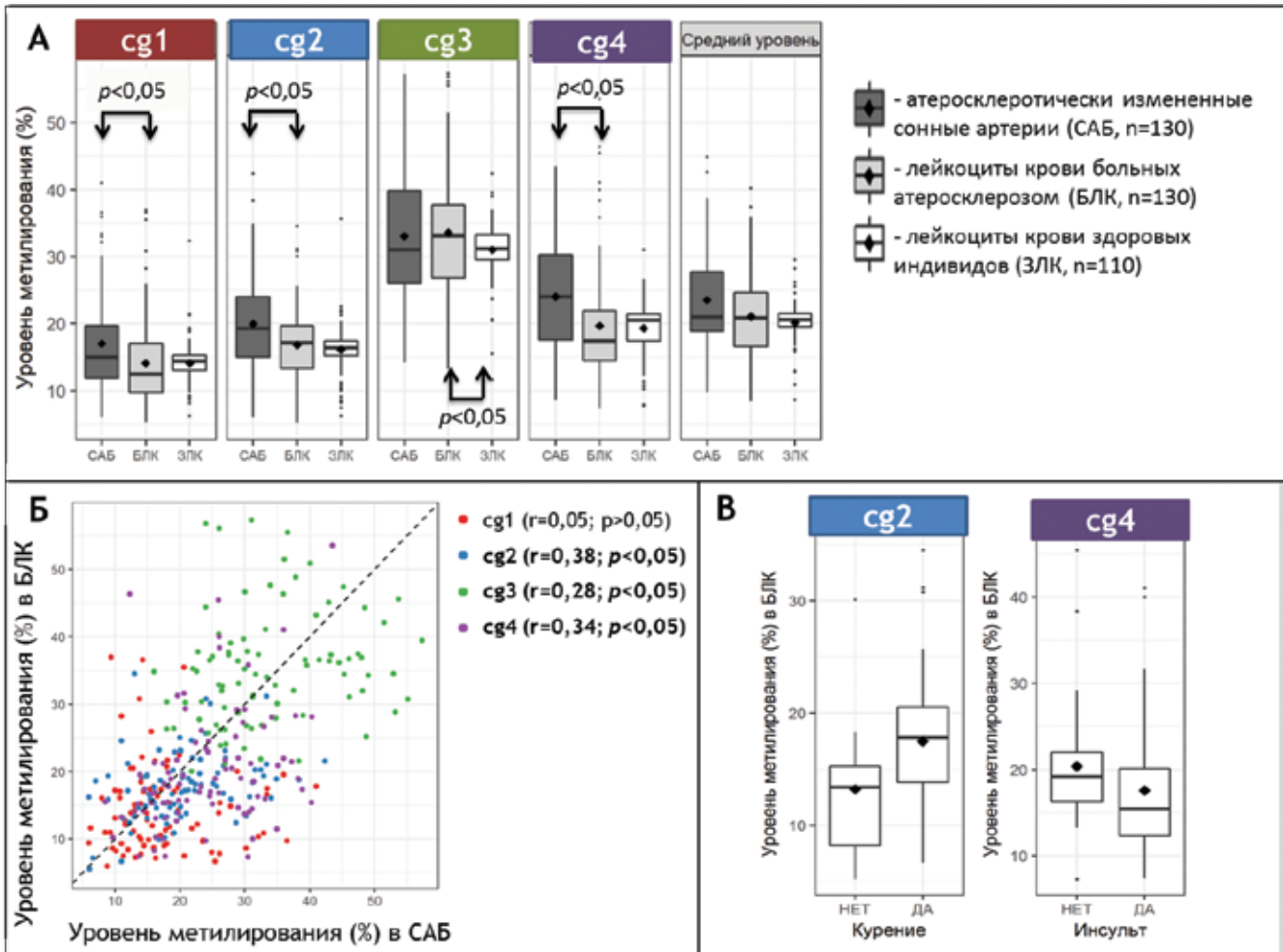


Рис. 2 (А, Б, В). А — уровень метилирования 4 CpG-сайтов (cg1, cg2, cg3 и cg4) в локусе 2q31.1 (гены *HOXD4/HOXD3/MIR10B*) в атеросклеротически измененных сонных артериях (САБ), а также в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом (БЛК) и относительно здоровых индивидов (ЗЛК); Б — корреляция уровня метилирования анализируемых CpG-сайтов между лейкоцитами и клетками атеросклеротически измененных сонных артерий; В — уровень метилирования cg4 и cg2 в лейкоцитах пациентов с атеросклеротическим поражением коронарных и сонных артерий в зависимости от курения и перенесенного ишемического инсульта в анамнезе.

NPR2, OVGP1. Среди CpG-сайтов, гипометилированных в артериях, пораженных атеросклерозом, по сравнению с интактными сосудами, были гены *ALX4, BATF, HOXD3, HOXD4, MIR10B, MEST/PEG1, HOXA7, S100A10, DMRT3, ARHGDIB, TLR4, LRMP, EVI2B/NF1, EVI2A/NF1, TRAF1, MFAP2*.

В клетках атеросклеротически измененных артерий по сравнению с интактными сосудами выявлено существенное снижение уровня метилирования в генах *TLR4* и *TRAF1*, а увеличение — в генах *ABCB11, NPR2, ALOX12, TMEM182, ALX4* и *FABP1* (рис. 1). Полиморфизм по однонуклеотидным заменам перечисленных генов ранее показал связь с атеросклерозом и его факторами риска у человека при анализе генетических ассоциаций. С субклиническим атеросклерозом и осложнениями атеросклероза в виде острых сосудистых событий ассоциирован полиморфизм генов *TLR4* и *TRAF1* [9, 10], а для гена *ALOX12*

установлена связь с атеросклерозом, сахарным диабетом 2 типа и артериальной гипертензией [11]. Полиморфизм генов *FABP1* и *ABCB11* связан с метаболическими нарушениями (ожирение, метаболический синдром, дислипидемия, неалкогольная жировая болезнь печени) [12, 13], а гены *TMEM182* и *NPR2* — с сосудистыми нарушениями в виде артериальной гипертензии [14, 15], ген *ALX4* — с сосудисто-метаболическими нарушениями в виде сахарного диабета 2 типа [16].

Наибольшее количество CpG-сайтов, в которых выявлено существенное снижение уровня метилирования в клетках атеросклеротически измененных артерий по сравнению с интактными сосудами, располагалось в локусе 2q31.1, содержащем гены *HOXD4/HOXD3/MIR10B* (рис. 1). В связи с этим, данный локус выбран для детального анализа уровня метилирования CpG-сайтов с помощью метода пиросеквениро-

вания модифицированной бисульфитом ДНК. Анализируемый регион включает 4 CpG-сайта (cg1, cg2, cg3 и cg4), в том числе cg1 (cg01152019) и cg2 (cg14399060), которые были исследованы на микрочипе (рис. 2А). Уровень метилирования cg1, cg2 и cg4 на 3% выше в атеросклеротически измененных сонных артериях, чем в лейкоцитах ($p < 0,05$; рис. 2А). CpG-сайты cg2, cg3 и cg4 коррелируют по своему уровню метилирования между тканями ($r = -0,38$ – $-0,28$ – $-0,34$; $p < 0,05$; рис. 2Б). Это свидетельствует о том, что лейкоциты как легкодоступный для исследования источник ДНК могут быть использованы в качестве суррогатного материала для оценки уровня метилирования ДНК данного локуса в атеросклеротически измененных артериях. Уровень метилирования cg3 анализируемого региона генома был выше в лейкоцитах пациентов ($34 \pm 9\%$) по сравнению с относительно здоровыми индивидами ($31 \pm 4\%$; рис. 2А). Кроме того, в лейкоцитах пациентов уровень метилирования cg2 выше у курящих ($18 \pm 5\%$), чем у некурящих ($14 \pm 6\%$; $p < 0,05$; рис. 2В), а уровень метилирования cg4 ниже у тех, кто перенес ишемический инсульт ($18 \pm 8\%$) по сравнению с индивидами без инсульта в анамнезе ($20 \pm 7\%$; $p < 0,05$; рис. 2В). Несмотря на то, что изменение уровня метилирования ДНК между анализируемыми тканями составляло 3%, даже такие значения могут быть связаны с изменением экспрессии генов и нарушать функцию клеток и органов [17].

Локус 2q31.1 содержит гены *HOXD4/HOXD3/MIR10B*. Гомеобокс-содержащие гены *HOXD3* и *HOXD4* кодируют транскрипционные факторы, которые играют важную роль в установлении позиционной информации при васкулогенезе во время эмбрионального развития, а также определяют фенотип эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов при ремоделировании в сосудистом русле у взрослого человека [18]. Принимая во внимание, что экспрессия *HOX* генов регулируется эпигенетическими механизмами [19, 20], не исключено, что выявленное в настоящем исследовании изменение уровня метилирования в данном регионе генома связано с изменением функциональной активности генов в сосудах.

Среди CpG-сайтов, гипометилированных в клетках атеросклеротически измененных артерий по сравнению с интактными сосудами, были другие гомеобокс-содержащие гены — *HOXA7* и *ALX4* (рис. 1). С одной стороны, эпигенетические изменения в гомеобокс-содержащих генах отражают естественные процессы развития, заключающиеся в пролиферации и дифференцировки клеток. С другой стороны, изменение уровня метилирования данных генов связано с патологией. В частности, выявленное гипометилирование гомеобокс-содержащих генов в клетках атеросклеротически измененных артерий по сравнению с интактными сосудами может быть признаком

патологического ремоделирования артерий, которое происходит на поздних стадиях атеросклеротического процесса. Изменение уровня метилирования в гомеобокс-содержащих генах в стенозных клетках отражает способность ткани к самовосстановлению, что в настоящее время является фокусом пристального внимания регенеративной медицины [21].

Гиперметилирование в генах *HOX* и *ALX4* часто регистрируется в опухолевом очаге по сравнению с неизменной тканью и связано с неблагоприятным течением патологического процесса и исходом [22]. В то же время, в скелетных мышцах у пациентов ювенильным дерматомиозитом по сравнению с контролем выявлено снижение уровня метилирования в генах *HOXD3*, *HOXD4* и *ALX4* [23]. Такое сходство профиля метилирования гомеобокс-содержащих генов при атеросклерозе и такого хронического системного аутоиммунно-воспалительного заболевания скелетных мышц и васкулопатии — как ювенильный дерматомиозит, говорит об общности патогенеза данных патологических состояний, но отличается от злокачественных новообразований, которые характеризуются гиперметилированием данных генов.

Следует отметить, что 3 CpG-сайта в локусе 2q31.1 располагались также в области гена *MIR10B*. Связь изменения уровня метилирования ДНК в данном регионе генома с атеросклерозом может быть реализована через регуляцию экспрессии микроРНК — miR-10b. Данная микроРНК экспрессируется в эндотелиальных клетках, индуцируя их миграцию и ангиогенез через снижение экспрессии гена *HoxD10* [24]. В макрофагах miR-10b может ингибировать экспрессию генов *Abca1* и *Abcg1*, тем самым снижая интенсивность обратного транспорта холестерина из данных клеток [25]. Кроме того, мишенью miR-10b является KLF-4, который играет важную роль в регуляции поляризации макрофагов из провоспалительного в противовоспалительный фенотип *in vitro* [26].

Параллельно с нашим научным коллективом работали финские исследователи [27]. В своей работе они обнаружили гипометилирование более 140 областей генов микроРНК, включая *MIR10B*, с помощью технологии полногеномного бисульфитного секвенирования в атеросклеротических бляшках бедренных артерий по сравнению с интактными внутренними грудными артериями [27]. Это говорит о том, что данное событие неслучайно и может являться важной детерминантой атеросклеротического поражения артерий, причем вне зависимости от его локализации. Настоящее исследование одно из первых, в котором установлено, что у человека *in vivo* в клетках артерий при их атеросклеротическом поражении, метилирование ДНК может быть связано с функциональной активностью генов микроРНК. Согласно данным литературы, в пораженных атеросклерозом сонных артериях по сравнению с неизмененными

внутренними грудными артериями показано увеличение экспрессии miR-10b [28]. Более того, увеличение экспрессии miR-10b является маркером самовосстановления столовых клеток злокачественных опухолей [29]. Поскольку данная микроРНК детектируется в сыворотке, не исключено, что она важна для ранней диагностики и прогнозирования течения атеросклеротического поражения артерий и злокачественных новообразований у человека. MiR-10b, в числе прочих, является перспективной терапевтической мишенью и кандидатом для разрабатываемых схем таргетной фармакотерапии, направленной на ее ингибирование и увеличение обратного транспорта холестерина из клеток при дислипидемиях [30], а также на ингибирование процесса метастазирования при раке [31].

Заключение

Таким образом, у пациентов с атеросклерозом в клетках атеросклеротически измененных коронар-

ных и сонных артерий на поздних стадиях патологического процесса по сравнению с интактными сосудами выявлено дифференциальное метилирование 46 CpG-сайтов, входящих в состав 42 генов. Из них только 8 генов (*TLR4*, *TRAF1*, *ABCB11*, *NPR2*, *ALOX12*, *TMEM182*, *ALX4* и *FABP1*) связаны с атеросклерозом или его факторами риска в результате анализа генетических ассоциаций. Однако, большая часть идентифицированных в работе генов с измененным уровнем метилирования ДНК ранее не была изучена в отношении данной патологии. Установлено, что изменение уровня метилирования в локусе 2q31.1 (*HOXD4/HOXD3/MIR10B*) ассоциировано с атеросклеротическим поражением артерий, а в лейкоцитах пациентов уровень метилирования в данном регионе генома связан с курением и ишемическим инсультом.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10150).

Литература

- Shalnova SA, Konradi AO, Karpov YuA, et al. Mortality analysis from cardiovascular diseases in 12 regions of the Russian Federation participating in the study "Epidemiology of cardiovascular diseases in various regions of Russia". Russ J Cardiol 2012; 97: 6-11. (In Russ.) Шальнова С.А., Конради А.О., Карпов Ю.А., и др. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвующих в исследовании "Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России". Российский Кардиологический Журнал 2012; 97: 6-11.
- Dzizinsky AA, Puzurev VP. Heredity and atherosclerosis. Nauka. Novosibirsk: 1977. p. 176. (In Russ.) Дзизинский А.А., Пузырев В.П. Наследственность и атеросклероз. Наука. Новосибирск: 1977 с. 176.
- Björkegren JLM, Kovacic JC, Dudley JT, et al. Genome-wide significant loci: How important are they?: Systems genetics to understand heritability of coronary artery disease and other common complex disorders. J Am Coll Cardiol 2015; 65: 830-45.
- Eichler EE, Flint J, Gibson G, et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. Nat Rev Genet 2010; 11: 446-50.
- Hai Z, Zuo W. Aberrant DNA methylation in the pathogenesis of atherosclerosis. Clin Chim Acta 2016; 456: 69-74.
- Muka T, Koromani F, Portilla E, et al. The role of epigenetic modifications in cardiovascular disease: A systematic review. Int J Cardiol 2016; 212: 174-83.
- Fernandez-Sanles A, Sayols-Baixeras S, Subirana I, et al. Association between DNA methylation and coronary heart disease or other atherosclerotic events: A systematic review. Atherosclerosis 2017; S0021-9150: 30225-3.
- Bibikova M, Le J, Barnes B, et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay. Epigenomics 2009; 1: 177-200.
- Sharma S, Garg I, Ashraf MZ. TLR signalling and association of TLR polymorphism with cardiovascular diseases. Vascu Pharmacol 2016; 87: 30-7.
- Hessler N, Geisel MH, Coassin S, et al. Linkage and Association Analysis Identifies *TRAF1* Influencing Common Carotid Intima-Media Thickness. Stroke 2016; 47: 2904-9.
- Mashima R, Okuyama T. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. Redox Biol 2015; 6: 297-310.
- McCaffery JM, Papandonatos GD, Huggins GS, et al. Human cardiovascular disease IBC chip-wide association with weight loss and weight regain in the look AHEAD trial. Hum Hered 2013; 75: 160-74.
- Schroeder F, McIntosh AL, Martin GG, et al. Fatty Acid Binding Protein-1 (FABP1) and the Human FABP1 T94A Variant: Roles in the Endocannabinoid System and Dyslipidemias. Lipids 2016; 51: 655-76.
- Ellis KL, Newton-Cheh C, Wang TJ, et al. Association of genetic variation in the natriuretic peptide system with cardiovascular outcomes. J Mol Cell Cardiol 2011; 50: 695-701.
- Kim YK, Kim Y, Hwang MY, et al. Identification of a genetic variant at 2q12.1 associated with blood pressure in East-Asians by genome-wide scan including gene-environment interactions. BMC Med Genet 2014; 15: 65.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. Nature 2007; 445: 881-5.
- Leenen FA, Muller CP, Turner JD. DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype? Clin. Epigenetics 2016; 8: 92.
- Pruett ND, Visconti RP, Jacobs DF, et al. Evidence for Hox-specified positional identities in adult vasculature. BMC Dev Biol 2008; 8: 93.
- Burridge KA, Friedman MH. Environment and vascular bed origin influence differences in endothelial transcriptional profiles of coronary and iliac arteries. AJP Hear Circ Physiol 2010; 299: H837-H846.
- Jiang Y-Z, Manduchi E, Stoeckert CJ, et al. Arterial endothelial methylome: differential DNA methylation in athero-susceptible disturbed flow regions in vivo. BMC Genomics 2015; 16: 506.
- Seifert A, Werheid DF, Knapp SM, et al. Role of Hox genes in stem cell differentiation. World J Stem Cells 2015; 7: 583-95.
- Bhatlekar S, Fields JZ, Boman BM. HOX genes and their role in the development of human cancers. J Mol Med 2014; 92: 811-23.
- Wang M, Xie H, Shrestha S, et al. Methylation alterations of WT1 and homeobox genes in inflamed muscle biopsy samples from patients with untreated juvenile dermatomyositis suggest self-renewal capacity. Arthritis Rheum 2012; 64: 3478-85.
- Shen X, Fang J, Lv X, et al. Heparin impairs angiogenesis through inhibition of microRNA-10b. J Biol Chem 2011; 286: 26616-27.
- Wang D, Xia M, Yan X, et al. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b. Circ Res 2012; 111: 967-81.
- Tian Y, Luo A, Cai Y, et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines. J Biol Chem 2010; 285: 7986-94.
- Aavik E, Lumivuori H, Leppänen O, et al. Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster. Eur Heart J 2015; 36: 993-1000.
- Bidzhikov K, Gan L, Denecke B, et al. microRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans. Thromb Haemost 2012; 107: 619-25.
- Bahena Ocampo I, Espinosa M, Ceballos Cancino G, et al. miR-10b expression in breast cancer stem cells supports self-renewal through negative PTEN regulation and sustained AKT activation. EMBO Rep 2016; 17: 648-58.
- Davalos A, Fernandez-Hernando C. From evolution to revolution: MiRNAs as pharmacological targets for modulating cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. Pharmacol Res 2013; 75: 60-72.
- Devulapally R, Sekar NM, Sekar TV, et al. Polymer nanoparticles mediated codelivery of AntimiR-10b and AntimiR-21 for achieving triple negative breast cancer therapy. ACS Nano 2015; 9: 2290-302.