

Метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в сосудах и клетках крови у пациентов с атеросклерозом сонных артерийКоролёва Ю.А.¹, Марков А.В.¹, Гончарова И.А.¹, Слепцов А.А.¹, Бабушкина Н.П.¹, Валиахметов Н.Р.², Шарыш Д.В.¹, Зарубин А.А.¹, Кузнецов М.С.², Козлов Б.Н.², Назаренко М.С.¹**Цель.** Сравнительный анализ уровня метилирования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* (локус 9p21.3) в тканях сосудов, пораженных и не пораженных атеросклерозом, а также в лейкоцитах пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (СА) и относительно здоровых индивидов.**Материал и методы.** В группу пациентов с клинически выраженным атеросклерозом вошли 22 индивида с выраженным стенозом (>80%) СА. У пациентов были получены образцы атеросклеротических бляшек, макроскопически неизмененных подлежащих участков СА, больших подкожных вен, а также образцы периферической крови (лейкоциты). Контрольную группу составили 14 индивидов с начальными стадиями атеросклероза СА (стеноз не >24%) и без гемодинамически значимых изменений, от каждого из них были получены образцы периферической крови. Исследование уровня метилирования ДНК было проведено методом таргетного бисульфитного секвенирования ампликонов с использованием высокопроизводительного массового параллельного секвенирования.**Результаты.** Установлена тканеспецифичность метилирования 31 CpG-сайта в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1*: ткани сосудистой стенки значимо отличались от лейкоцитов периферической крови. При этом наблюдалось увеличение уровня метилирования как отдельных CpG-сайтов, так и анализируемого региона в целом в СА, пораженных атеросклерозом (48,6 [34,8; 62,0]%, по сравнению с интактными сосудами — как артериями (25,2 [23,1; 41,60]%, $p=0,0001$), так и венами (35,0 [31,6; 40,0]%, $p=0,0039$). У пациентов отмечены более низкие, по сравнению с образцами кровеносных сосудов, уровни метилирования всех CpG-сайтов в лейкоцитах крови (8,7 [6,1; 9,7]%; $p<0,05$). В то же время уровень метилирования ДНК в исследованном регионе в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом не отличается от такового в лейкоцитах крови относительно здоровых индивидов (9,3 [8,3; 13,6]%; $p>0,8$).**Заключение.** В настоящем исследовании выявлена связь увеличения уровня метилирования ДНК энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в СА с их атеросклеротическим поражением, а также тканеспецифичность метилирования ДНК данной области генома между сосудами и лейкоцитами периферической крови.**Ключевые слова:** атеросклероз, метилирование ДНК, 9p21.3, *CDKN2A/2B*, *CDKN2B-AS1*.**Отношения и деятельность:** нет.¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,Томск; ² Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия.

Королёва Ю.А.* — м.н.с. лаборатории популяционной генетики, ORCID: 0000-0003-1498-6934, Марков А.В. — к.м.н., н.с. лаборатории популяционной генетики, ORCID: 0000-0002-5824-6439, Гончарова И.А. — к.б.н., н.с. лаборатории популяционной генетики, ORCID: 0000-0002-9527-7015, Слепцов А.А. — к.м.н., м.н.с. лаборатории популяционной генетики, ORCID: 0000-0003-3226-1750, Бабушкина Н.П. — к.б.н., н.с. лаборатории популяционной генетики, ORCID: 0000-0001-6133-8986, Валиахметов Н.Р. — аспирант, ORCID: 0000-0001-7969-7020, Шарыш Д.В. — аспирант, ORCID: 0000-0003-2173-2772, Зарубин А.А. — аспирант, ORCID: 0000-0001-6568-6339, Кузнецов М.С. — к.м.н., с.н.с. отделения сердечно-сосудистой хирургии, ORCID: 0000-0002-1975-043X, Козлов Б.Н. — д.м.н., в.н.с. отделения сердечно-сосудистой хирургии, ORCID: 0000-0002-0217-7737, Назаренко М.С. — д.м.н., руководитель лаборатории популяционной генетики, ORCID: 0000-0002-0673-4094.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
yuliya.koroleva@medgenetics.ruАСБ — атеросклеротическая бляшка, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, СА — сонная артерия, ANRIL — антисмысловая РНК в локусе INK4, Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus, *CDKN2A/2B* — ингибиторы циклин-зависимой киназы 2A и 2B, Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A, Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B, *CDKN2B-AS1* — антисмысловая РНК к *CDKN2B* (англ. *CDKN2B antisense RNA 1*), CpG — цитозин и гуанин, соединенные через фосфатную группу, SNPs — однонуклеотидные полиморфизмы, Single Nucleotide Polymorphisms.**Рукопись получена** 13.08.2020**Рецензия получена** 31.08.2020**Принята к публикации** 07.09.2020**Для цитирования:** Королёва Ю.А., Марков А.В., Гончарова И.А., Слепцов А.А., Бабушкина Н.П., Валиахметов Н.Р., Шарыш Д.В., Зарубин А.А., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в сосудах и клетках крови у пациентов с атеросклерозом сонных артерий. *Российский кардиологический журнал*. 2020;25(10):4060. doi:10.15829/1560-4071-2020-4060**Deoxyribonucleic acid methylation in the enhancer region of the *CDKN2A/2B* and *CDKN2B-AS1* genes in blood vessels and cells in patients with carotid atherosclerosis**Koroleva Yu. A.¹, Markov A. V.¹, Goncharova I. A.¹, Sleptsov A. A.¹, Babushkina N. P.¹, Valiakhmetov N. R.², Sharysh D. V.¹, Zarubin A. A.¹, Kuznetsov M. S.², Kozlov B. N.², Nazarenko M. S.¹**Aim.** Comparative analysis of the deoxyribonucleic acid (DNA) methylation level in the enhancer region of the *CDKN2A/2B* and *CDKN2B-AS1* genes (9p21.3 locus) in vessels with/without atherosclerotic lesions, as well as in leukocytes of patients with clinically relevant carotid artery (CA) atherosclerosis and healthy individuals.**Material and methods.** The group of patients with clinically relevant atherosclerosis included 22 individuals with severe stenosis (>80%) of CA. Samples of atherosclerotic plaques, presenting CA regions, and great saphenous veins, as well as peripheral blood samples (leukocytes) were obtained from patients. The control group consisted of 14 individuals with the mild CA stenosis ($\leq 24\%$) and

without hemodynamically relevant changes; peripheral blood samples were obtained from each of them. DNA methylation level was assessed by targeted bisulfite sequencing of amplicons.

Results. The tissue-specific methylation of 31 CpG-site in the *CDKN2A/2B* and *CDKN2B-AS1* gene enhancer was established: the vascular tissues significantly differed from the peripheral blood leukocytes. At the same time, there was an increase in the methylation level of both certain CpG sites and whole analyzed CA region affected by atherosclerosis (48,6 [34,8; 62,0]%), compared with intact vessels, both arteries (25,2 [23,1; 41,60]%, $p=0,0001$) and veins (35,0 [31,6; 40,0]%, $p=0,0039$). Patients had lower methylation levels in all CpG sites in blood leukocytes compared to blood vessel samples (8,7 [6,1; 9,7]%; $p<0,05$). At the same time, the level of DNA methylation in the blood leukocytes of atherosclerotic patients does not differ from that in healthy individuals (9,3 [8,3; 13,6]%; $p>0,8$).

Conclusion. In the present study, the relationship between an increase in the DNA methylation in the enhancer of the *CDKN2A/2B* and *CDKN2B-AS1* genes in CA and their atherosclerotic lesions was revealed, as well as the tissue-specific DNA methylation between vessels and peripheral blood leukocytes.

Key words: atherosclerosis, DNA methylation, 9p21.3, *CDKN2A/2B*, *CDKN2B-AS1*.

Relationships and Activities: none.

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) локуса 9p21.3 ассоциированы с заболеваниями сердечно-сосудистого континуума (артериальная гипертензия, атеросклероз коронарных артерий и сонных артерий (СА), инфаркт миокарда, ишемический инсульт, дислипидемия, ожирение, сахарный диабет 2 типа), а также с патогенетически значимыми для них признаками (уровень артериального давления, индекс массы тела, уровень глюкозы сыворотки крови) [1].

Большинство SNPs данного локуса сцеплены между собой в протяженный гаплоглок, размером ~53 кб, который охватывает кластер генов ингибиторов циклин-зависимых киназ: *CDKN2A* (кодирует p14/ARF и p16/INK4A) и *CDKN2B* (кодирует p15/INK4B). Продукты этих генов вовлечены в регуляцию клеточного цикла и пролиферацию клеток [2, 3]. Оба гена, *CDKN2A* и *CDKN2B*, считываются с дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в обратном направлении, в то время как в прямом направлении происходит транскрипция гена *CDKN2B-AS1*, продуктом которого является длинная некодирующая РНК ANRIL (англ. antisense non-coding RNA in the INK4 locus) [3].

Показано, что ANRIL является компонентом множества генных путей, вовлеченных в пролиферацию, адгезию, старение и апоптоз клеток — ключевые механизмы атеросклеротического поражения артерий [4, 5]. Имеются данные о том, что SNPs в локусе 9p21.3 обуславливают повышение в клетках сосудов экспрессии ANRIL, которая подавляет *CDKN2A/2B*, что, в свою очередь, усиливает пролиферацию клеток и способствует развитию атеросклероза [2]. Связь полиморфизмов локуса 9p21.3 с атеросклерозом объясняется и наличием в данном регионе “энхансеров дальнего действия”, способных изменять функциональную активность генов данного локуса, в т.ч. *CDKN2A/2B*. Однако детальный механизм связи генетических

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk; ²Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia.

Koroleva Yu. A.* ORCID: 0000-0003-1498-6934, Markov A. V. ORCID: 0000-0002-5824-6439, Goncharova I. A. ORCID: 0000-0002-9527-7015, Sleptsov A. A. ORCID: 0000-0003-3226-1750, Babushkina N. P. ORCID: 0000-0001-6133-8986, Valiakhmetov N. R. ORCID: 0000-0001-7969-7020, Sharysh D. V. ORCID: 0000-0003-2173-2772, Zarubin A. A. ORCID: 0000-0001-6568-6339, Kuznetsov M. S. ORCID: 0000-0002-1975-043X, Kozlov B. N. ORCID: 0000-0002-0217-7737, Nazarenko M. S. ORCID: 0000-0002-0673-4094.

*Corresponding author: yuliya.koroleva@medgenetics.ru

Received: 13.08.2020 **Revision Received:** 31.08.2020 **Accepted:** 07.09.2020

For citation: Koroleva Yu. A., Markov A. V., Goncharova I. A., Sleptsov A. A., Babushkina N. P., Valiakhmetov N. R., Sharysh D. V., Zarubin A. A., Kuznetsov M. S., Kozlov B. N., Nazarenko M. S. Deoxyribonucleic acid methylation in the enhancer region of the *CDKN2A/2B* and *CDKN2B-AS1* genes in blood vessels and cells in patients with carotid atherosclerosis. *Russian Journal of Cardiology*. 2020;25(10):4060. (In Russ.) doi:10.15829/1560-4071-2020-4060

вариантов с патологическим фенотипом остается неизвестным [3].

В то же время развитие атеросклероза как многофакторного заболевания может быть обусловлено не только генетическими вариантами, но и эпигенетическими модификациями, которые регулируют экспрессию генов, не нарушая первичную последовательность нуклеотидов ДНК [6]. Одним из наиболее изученных эпигенетических механизмов регуляции функциональной активности генов является метилирование скопленных CpG-динуклеотидов, так называемых CpG-островков. В основном изучение метилирования ДНК проводится в отношении промоторов генов, и метилирование CpG-островков в их промоторных регионах коррелирует с сайленсингом транскрипции соответствующих генов. Однако имеются данные и о том, что гипометилирование ДНК энхансеров, позволяя связывать транскрипционные факторы, также приводит к активации транскрипции соответствующих генов [7].

Исследования, посвященные анализу уровня метилирования ДНК локуса 9p21.3 в сосудах и клетках крови при заболеваниях сердечно-сосудистого континуума, немногочисленны [8-10]. В данных работах проводится анализ уровня метилирования ДНК в области CpG-островков промоторов генов *CDKN2A/2B* только в одной ткани в сосудистой стенке, либо лейкоцитах периферической крови у пациентов с атеросклерозом различной локализации, в т.ч. осложненным острыми сосудистыми событиями.

Целью данного исследования стал сравнительный анализ уровня метилирования ДНК в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в тканях сосудистой стенки, различающихся по степени их атеросклеротического поражения, а также в лейкоцитах пациентов с клинически выраженным атеросклерозом СА и относительно здоровых индивидов.

Материал и методы

Формирование выборок и обследование пациентов с клинически выраженным атеросклерозом СА проводили на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ. Общими критериями для включения индивидов в исследование были отсутствие родственных связей между индивидами, этническая принадлежность к европеоидам, отсутствие онкологических заболеваний. Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ кардиологии и НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Все участники подписали информированное согласие о цели и возможных рисках исследования.

Группа пациентов с клинически выраженным атеросклерозом составила 22 человека в возрасте от 53 до 77 лет, из них 17 мужчин и 5 женщин (табл. 1). У всех пациентов при ультразвуковом исследовании обнаружен выраженный стеноз (>80%) СА, что является показанием к каротидной эндартерэктомии. До

оперативного вмешательства у каждого пациента были взяты образцы периферической крови (лейкоциты).

В результате оперативного вмешательства от всех пациентов получены образцы атеросклеротических бляшек (АСБ), макроскопически неизмененных подлежащих участков СА и больших подкожных вен. Каждый образец сосуда был осмотрен и тщательно очищен от масс кальцификации, отложений липидов и тромбов, отмыт в стерильном физиологическом растворе с целью удаления сгустков крови. Образцы тканей были заморожены в жидком азоте и хранились при температуре -80°C вплоть до момента исследования.

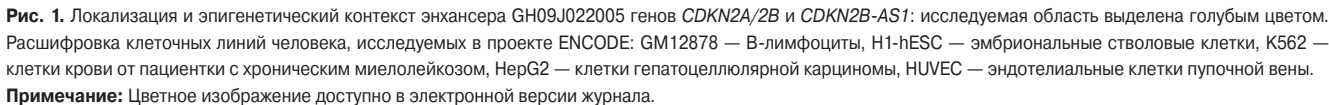
Для фрагментов 20 образцов АСБ проведено гистологическое исследование с окраской гематоксилин-эозином (табл. 1). Диапедез эритроцитов в стенку артерий наблюдался в 15% случаев, как и наличие выраженной мононуклеарной инфильтрации; нали-

Таблица 1

Клиническая характеристика групп, включенных в исследование

Параметр	Пациенты с клинически выраженным атеросклерозом СА (N=22)	Контрольная группа относительно здоровых индивидов (N=14)
Клинические параметры		
Пол (мужчины:женщины)	17:5	10:4
Возраст, лет (Q2 [Q1;Q3])	64 [60; 69]	66 [59; 71]
ИМТ кг/м ² (Q2 [Q1;Q3])	27 [26; 31]	29 [26; 32]
Инфаркт миокарда в анамнезе, абс. (%)	14 (63,6)	0 (0,0)
ИБС в анамнезе, абс. (%)	17 (77,3)	0 (0,0)
ОНМК (ТИА, инсульт) в анамнезе, абс. (%)	4 (18,2)	0 (0,0)
Артериальная гипертензия, абс. (%)	21 (95,5)	8 (56,1)
Курение, абс. (%)	17 (77,3)	4 (28,6)
Сахарный диабет, абс. (%)	6 (27,3)	2 (14,2)
Ультразвуковое исследование СА (Q2 [Q1;Q3])		
Степень стеноза, %	80 [75; 81]	24 [19; 26]
Гистологический тип АСБ (классификация АНА, 1995) [18]		
Тип V: фиброатерома с возможной кальцификацией	13 (59,1%)	–
Тип VI: смешанная АСБ с возможными дефектами поверхности, кровоизлиянием или тромбами	7 (31,8%)	–
Не классифицированы	2 (9,1%)	–
Лабораторные данные (Q2 [Q1;Q3])		
Глюкоза, ммоль/л	5,5 [5,2; 5,8]	5,6 [5,2; 6,3]
Общий холестерол, ммоль/л	4,2 [3,8; 5,2]	5,2 [4,7; 5,3]
Триглицериды, ммоль/л	1,5 [1,3; 1,6]	1,3 [1,0; 1,6]
ЛНП, ммоль/л	2,0 [1,8; 2,1]	3,0 [2,8; 3,6]
ЛВП, ммоль/л	1,1 [1,1; 1,4]	1,3 [1,1; 1,7]
Индекс атерогенности	2,4 [1,8; 2,4]	2,6 [2,3; 3,0]
Приём лекарственных препаратов, абс. (%)		
Антикоагулянты/деагреганты	20 (90,8)	2 (14,2)
Антигипертензивные препараты	16 (72,7)	4 (28,6)
Статины	13 (59,09)	1 (7,1)
Противодиабетические препараты	5 (22,7)	1 (7,1)

Сокращения: абс. — число индивидов в группе, АСБ — атеросклеротическая бляшка, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМТ — индекс массы тела, ЛВП — липопротеиды высокой плотности, ЛНП — липопротеиды низкой плотности, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, СА — сонная артерия, ТИА — транзиторная ишемическая атака, “–” исследование не проводилось, Q1 — 25% квартиль, Q2 — 50% квартиль (медиана), Q3 — 75% квартиль.



Для исследования уровня метилирования ДНК был выбран участок, который локализуется во 2 экзоне гена *CDKN2B* и в 1 интроне гена *CDKN2B-AS1*, содер-

Амплификация ДНК была проведена на приборе ProFlex PCR System (ThermoFisher Scientific) по программе: 95° С — 5 мин, 40х (95° С — 30 сек, 62° С — 30 сек, 72° С — 60 сек), 72° С — 5 мин. Бисульфитное секвенирование ДНК было выполнено на приборе MiSeq (Illumina). Статистический анализ данных был выполнен в свободно распространяемой программной среде R (версия 3.6.2). Для оценки уровней метилирования CpG-сайтов были использованы непараметрические оценки распределения в виде: $M [Q1; Q3]$, где M — медиана, $Q1$ — 1-й квартиль (25-й перцентиль), $Q3$ — 3-й квартиль (75-й перцентиль). Сходство образцов по профилям метилирования (сочета-

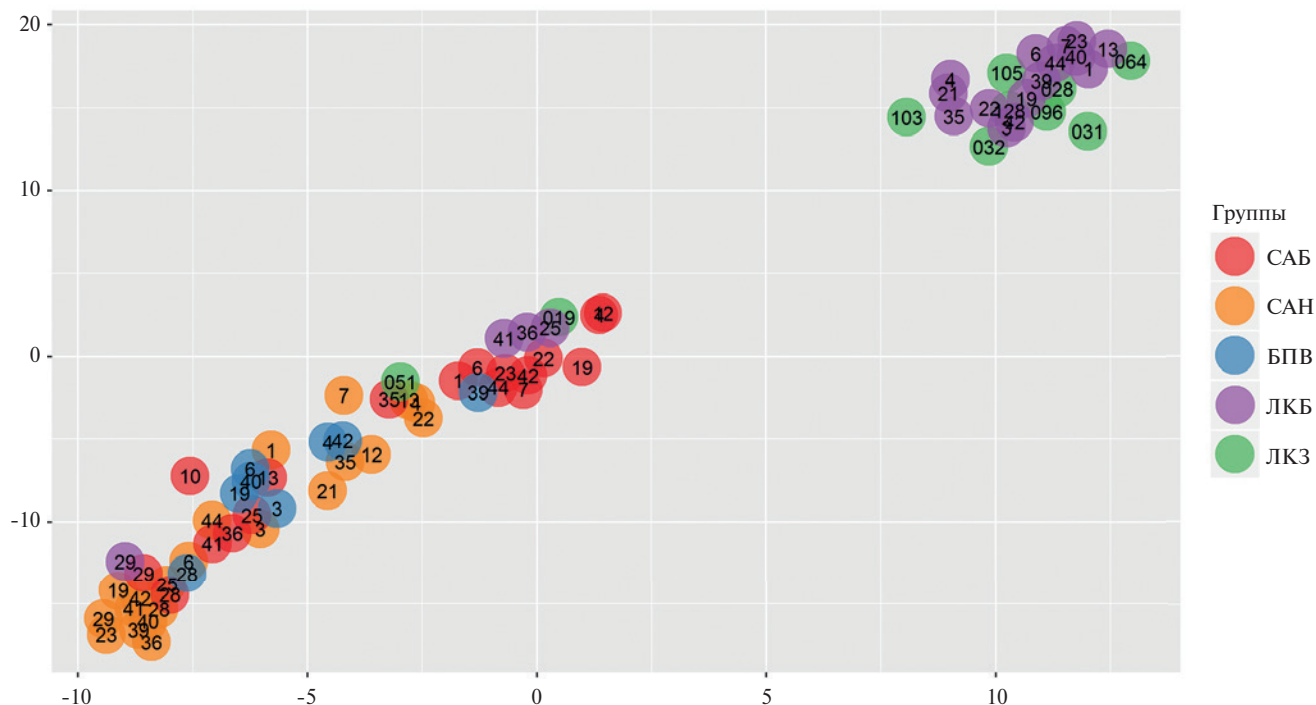


Рис. 2. Взаимное расположение и кластеризация сосудов и лейкоцитов крови (по методу tSNE) в зависимости от профилей метилирования CpG-сайтов в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1*.

Примечание: Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

Сокращения: БПВ — образцы больших подкожных вен, ЛКБ — лейкоциты крови пациентов с атеросклерозом, ЛКЗ — лейкоциты крови контрольной группы, САБ — образцы атеросклеротических бляшек сонных артерий, САН — образцы макроскопически неизмененных участков сонных артерий.

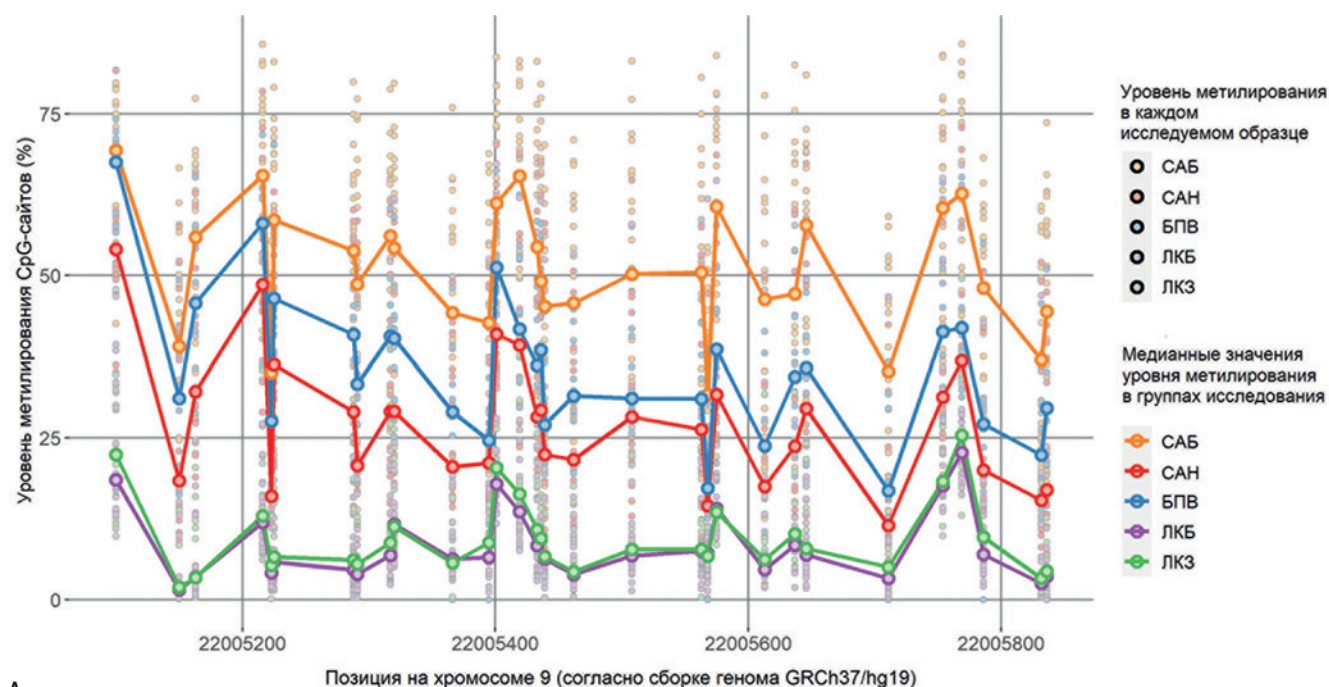
ниям уровней метилирования) CpG-сайтов в анализируемом регионе генома было визуализировано с помощью алгоритма машинного обучения “t-distributed Stochastic Neighbor Embedding” (t-SNE). Сравнение уровней метилирования в группах исследования также проводилось с использованием непараметрических критериев: критерия Уилкоксона — при сравнении связанных выборок разных тканей, полученных от одних и тех же пациентов, а также U-критерия Манна-Уитни — при сравнении независимых групп исследования (образцов лейкоцитов крови, полученных от пациентов и относительно здоровых индивидов). Статистически значимыми считались различия с достигнутым уровнем статистической значимости $p < 0,05$. Поскольку уровни метилирования всех CpG-сайтов сильно коррелировали (минимальное значение Spearman’s Rho составило 0,76), было принято решение о нецелесообразности введения статистических поправок, предполагающих независимость данных, таких как поправки Бонферрони или Бенджамини-Хохберга.

Результаты и обсуждение

В результате анализа уровня метилирования 31 CpG-сайта в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* выявлено, что образцы кровеносных сосудов (артерий и вен), за исключением единичных

случаев, кластеризуются отдельно от образцов ДНК лейкоцитов крови (рис. 2). Причем по профилю метилирования ДНК СА, пораженные атеросклерозом, расположены в одной группе с интактными кровеносными сосудами, а лейкоциты крови пациентов сгруппированы с лейкоцитами крови здоровых индивидов. Таким образом, существует выраженная тканеспецифичность метилирования данного региона для тканей кровеносных сосудов и лейкоцитов крови, что согласуется с литературными данными о различии уровня метилирования ДНК “энхансеров” между различными клетками и тканями [15].

При сравнении уровня метилирования ДНК между кровеносными сосудами выявлено увеличение уровня метилирования как отдельных CpG-сайтов, так и среднего уровня метилирования ДНК анализируемого региона в целом в СА, пораженных атеросклерозом (48,6 [34,8; 62,0]%), по сравнению с интактными сосудами — как артериями (25,2 [23,1; 41,60]%, $p = 0,0001$), так и венами (35,0 [31,6; 40,0]%, $p = 0,0039$; рисунки 3А и 3Б). Различия по уровню метилирования ДНК анализируемого региона между интактными артериями и венами не достигли статистической значимости ($p > 0,05$). У пациентов отмечены более низкие, по сравнению с образцами кровеносных сосудов, уровни метилирования всех CpG-сайтов в лейкоцитах крови (8,7 [6,1; 9,7]%; $p < 0,05$).

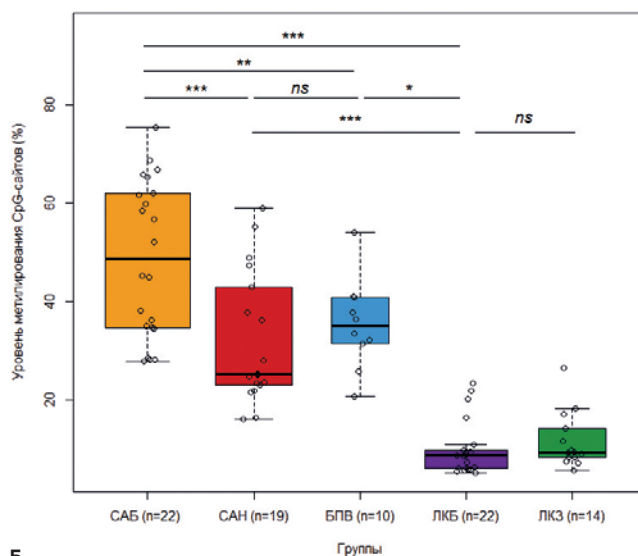


А

Однако уровень метилирования ДНК в исследованном регионе в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом не отличается от такового в лейкоцитах крови относительно здоровых индивидов (9,3 [8,3; 13,6]%; $p > 0,8$, рисунки 3А и 3Б).

Регион энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* содержит отдельные CpG-сайты (chr9:22,005,288 и chr9:22,005,564), которые включены в состав микрочипов фирмы Illumina — cg19481686 и cg08390209, соответственно. В таблице 2 представлена информация об уровне метилирования данных CpG-сайтов по результатам настоящей работы и опубликованных ранее исследований. Уровень метилирования cg19481686 и cg08390209 в СА, пораженных атеросклерозом, в настоящем исследовании (53,85 [30,18; 63,57]%) и 50,45 [32,24; 60,88]%, соответственно) совпадает с таковыми в СА, полученных как от пациентов с инсультом (55,03 [50,39; 61,24]%) и 47,31 [43,50; 56,06]%, соответственно), так и без инсульта в анамнезе (55,27 [49,70; 59,63]%) и 50,04 [42,04; 53,88]%, соответственно).

Однако в коронарных артериях и аорте при их поражении атеросклерозом уровень метилирования cg19481686 и cg08390209 существенно выше, чем в СА, и для коронарных артерий составляет 69,13 [56,37; 78,95] и 67,11 [57,87; 72,87]%, соответственно, а для аорты 69,28 [66,95; 70,93] и 66,52 [60,41; 71,18]%, соответственно. При этом уровень метилирования cg19481686 и cg08390209 в аорте, пораженной атеросклерозом, был статистически значимо на 9–15% ниже по сравнению с интактной аортой, а коронарные артерии, пораженные атеросклерозом, имели меньший уровень метилирования данных CpG-сайтов на 2–4%,



Б

Рис. 3. Профили метилирования (А) и средний уровень метилирования (Б) CpG-сайтов в энхансере генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в сосудах и лейкоцитах крови.

Примечания: ns — различия статистически незначимы, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$, *** — $p < 0,001$. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

Сокращения: БПВ — образцы больших подкожных вен, ЛКБ — лейкоциты крови пациентов с атеросклерозом, ЛКЗ — лейкоциты крови контрольной группы, САБ — образцы атеросклеротических бляшек сонных артерий, САН — образцы макроскопически неизмененных участков сонных артерий.

чем интактные внутренние грудные артерии, но больший уровень метилирования по сравнению с большими подкожными венами на 4%.

В целом в сосудах пациентов с атеросклерозом различной локализации уровень метилирования про-

Таблица 2

**Уровень метилирования отдельных CpG-сайтов в области энхансера генов
CDKN2A/2B и *CDKN2B-AS1* в сосудах и лейкоцитах крови при атеросклеротическом поражении артерий**

Ткань	Уровень метилирования CpG-сайта, %, Q2 [Q1;Q3]		Источник
	chr9:22,005,288 (cg19481686)	chr9:22,005,564 (cg08390209)	
Сосуды			
СА, пораженные атеросклерозом (n=22)	53,85 [30,18; 63,57]	50,45 [32,24; 60,88]	Настоящее исследование
Интактные СА (n=18)	28,98 [24,19; 46,30]	26,31 [22,87; 36,78]	
Большие подкожные вены (n=10)	40,90 [31,65; 43,00]	31,00 [28,57; 36,79]	GSE66500 [19]
СА, пораженные атеросклерозом, пациентов с инсультом (n=19)	55,03 [50,39; 61,24]	47,31 [43,50; 56,06]	
СА, пораженные атеросклерозом, пациентов без инсульта (n=19)	55,27 [49,70; 59,63]	50,04 [42,04; 53,88]	GSE62867 [20]
Коронарные артерии, пораженные атеросклерозом (n=6)	69,13 [56,37; 78,95]	67,11 [57,87; 72,87]	
Интактные внутренние грудные артерии (n=6)	73,20 [68,76; 73,57]	69,21 [67,30; 70,02]	GSE46401 [21]
Интактные большие подкожные вены (n=6)	64,93 [59,79; 69,18]	63,18 [62,70; 65,00]	
Аорта, пораженная атеросклерозом (n=15)	69,28 [66,95; 70,93]	66,52 [60,41; 71,18]	GSE46401 [21]
Интактная аорта (n=15)	78,54 [77,12; 80,39]	81,34 [78,13; 85,01]	
Лейкоциты крови			
Пациенты с выраженным атеросклерозом СА (n=22)	4,60 [2,84; 7,76]	7,47 [5,44; 8,77]	Настоящее исследование
Относительно здоровые индивиды (n=14)	6,11 [3,61; 12,25]	7,77 [5,92; 11,41]	
Пациенты с выраженным атеросклерозом коронарных артерий (n=8)	14,50 [9,04; 20,88]	15,54 [10,31; 18,84]	GSE107143 [22]
Относительно здоровые индивиды (n=8)	12,85 [9,82; 14,58]	13,55 [11,24; 15,54]	
Пациенты с инсультом в результате атеросклероза артерий (n=132)	11,38 [9,65; 13,64]	12,50 [10,63; 14,23]	GSE69138 [23]
Пациенты с лакунарным инсультом (n=141)	11,51 [9,96; 13,60]	12,98 [10,93; 14,27]	
Пациенты с кардиоэмболическим инсультом (n=127)	11,47 [11,51; 11,38]	12,20 [12,98; 12,50]	

Сокращения: СА — сонная артерия, Q1 — 25% квартиль, Q2 — 50% квартиль (медиана), Q3 — 75% квартиль.

анализированных CpG-сайтов был существенно выше такового в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом СА (4,60 [2,84; 7,76]% и 7,47 [5,44; 8,77]%, соответственно), в т.ч. осложненным инсультом (11,38 [9,65; 13,64]% и 12,50 [10,63; 14,23]%, соответственно), а также относительно здоровых индивидов (6,11 [3,61; 12,25]% и 7,77 [5,92; 11,41]%). При этом уровень метилирования cg19481686 и cg08390209 в лейкоцитах крови у пациентов с атеросклерозом, осложненным инсультом, был статистически значимо на 5% выше по сравнению с лейкоцитами крови относительно здоровых индивидов. В то же время уровень метилирования cg19481686 и cg08390209 в лейкоцитах крови между пациентами с атеросклерозом СА статистически значимо не отличается от относительно здоровых индивидов. Таким образом, в настоящем исследовании выявлена связь увеличения уровня метилирования ДНК энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в СА с их атеросклеротическим поражением. Для решения вопроса о связи уровня метилирования ДНК анализируемого региона генома с атеросклерозом коронарных артерий и аорты, а также с риском развития острых сосудистых событий, необходимо дополнительное исследование с привлечением больших по размеру выборок.

Следует отметить, что в литературе имеются данные об изменении уровня метилирования ДНК в локусе 9p21.3 в кровеносных сосудах и лейкоцитах кро-

ви, а также его связи с атеросклеротическим поражением артерий. Наиболее часто в работах анализируется область CpG-островков промоторов генов *CDKN2A/2B* и промотора гена *CDKN2B-AS1*. В частности, в предыдущем исследовании нашей лаборатории не было обнаружено различий в уровне метилирования CpG-островков промоторов генов *CDKN2A/2B* в АСБ СА и прилежащей макроскопически интактной сосудистой стенки у тех же самых больных. Однако в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* отмечалось гиперметилирование ДНК, особенно, в области АСБ СА [8].

Что касается артерий другой локализации, пораженных атеросклерозом, то результаты таких работ, как было показано выше, менее однозначны и зависят от того, какой именно регион локуса 9p21.3 был изучен, анализировалась ли цельная стенка сосуда или определенный тип клеток, а также какой метод анализа уровня метилирования ДНК использовался в работе. В широкогеномном исследовании выявлено гипометилирование промотора *CDKN2B-AS1* в регионе chr9:21,993,116-21,994,101 и экзона 7 данного гена (chr9:22,056,255-22,056,627), но гиперметилирование экзона 8 (chr9:22,056,256-22,056,628) в АСБ бедренных артерий по сравнению с непораженными внутренними грудными артериями [16]. В то же время в работе, использующей метод бисульфитного пиросеквенирова-

ния ДНК, высокий уровень метилирования (>55%) 9 CpG-сайтов (область промотора *CDKN2B-AS1*, chr9:21,993,583-21,993,721) в эндотелиальных клетках пупочной вены, взятых у новорождённых, коррелировал с повышенной скоростью распространения пульсовой волны (субклиническим маркером ригидности артерий) у этих же детей в возрасте 9 лет, что считается фактором риска развития в дальнейшем сердечно-сосудистых заболеваний [17].

В серии исследований Zhou S, et al. (2016, 2017) проанализировали уровень метилирования 24 CpG-сайтов гена *CDKN2A* (область chr9:21,993,993-21,995,909) и 12 CpG-сайтов гена *CDKN2B* (chr9:22,008,804-22,009,259) в лейкоцитах периферической крови пациентов с ишемическим инсультом головного мозга, в зависимости от сопутствующей кальцификации крупных сосудов. В первом исследовании был обнаружен повышенный уровень метилирования 1 CpG-сайта гена *CDKN2A* и 7 CpG-сайтов гена *CDKN2B* (а также исследованного региона в целом) при кальцификации СА [9], во втором — повышенный уровень метилирования 4 CpG-сайтов гена *CDKN2A* и 11 CpG-сайтов гена *CDKN2B* (а также исследованного региона в целом) при кальцификации дуги аорты [10]. В то же время, по данным обоих исследований, средний уровень метилирования *CDKN2A* и *CDKN2B* в лейкоцитах периферической крови пациентов с ишемическим инсультом не превышал 6% [9, 10], что в целом согласуется с низким уровнем метилирования ДНК в лейкоцитах в данном исследовании.

Анализ таргетного бисульфитного секвенирования ампликонов с использованием высокопроизводительного массового параллельного секвенирования позволяет, в том случае, если в исследуемом регионе имеются SNPs, оценить частоту генотипов и их связь с уровнем метилирования ДНК. В области энхансера GH09J022005 генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* расположен rs3217986:T>G (рис. 1). Аллель G rs3217986 связан с риском развития тяжелого атеросклероза коронарных артерий и инфарктом миокарда в двух разных популяциях [13, 14]. Распределение генотипов rs3217986 в группе пациентов было следующим: 21 (95,5%) индивид с генотипом TT и 1 (4,5%) с генотипом TG, а в контрольной группе — 13 (92,9%) индивидов с генотипом TT и 1 (7,1%) с генотипом TG. В связи с малым размером групп, анализ метилирова-

ния ДНК в тканях сосудов и лейкоцитах у индивидов в зависимости от их генотипов не проводился.

Относительно малый объём выборок не позволил однозначно определить связь между уровнем метилирования ДНК в сосудах и лейкоцитах крови, SNP rs3217986:T>G и патогенетически значимыми признаками атеросклеротического поражения СА в рамках данной работы. Выявленное различие уровня метилирования ДНК в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в СА может быть связано не столько с их атеросклеротическим поражением, а с существующей клеточной гетерогенностью сосудов. Для определения функциональной значимости изменения уровня метилирования ДНК в клетках и тканях необходим анализ функциональной активности генов. С другой стороны, в данной работе использованы современные технологии анализа уровня метилирования ДНК в нескольких типах тканей (сосудистая стенка и лейкоциты периферической крови) у одних и тех же индивидов, такой подход учитывает существующую межиндивидуальную изменчивость метилирования ДНК. Кроме того, в исследовании впервые выполнен анализ области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в тканях сосудов и лейкоцитах периферической крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом и относительно здоровых индивидов.

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании впервые установлена связь увеличения уровня метилирования ДНК энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в СА с их атеросклеротическим поражением. Выявлена тканеспецифичность метилирования ДНК данной области генома в кровеносных сосудах и лейкоцитах периферической крови, что важно для планирования дальнейших исследований: молекулярно-генетические механизмы атеросклеротического поражения артерий следует изучать с использованием тканей и клеток артерий, а поиск биомаркеров данной патологии, в т.ч. ее осложненного острыми сосудистыми событиями течения — с использованием лейкоцитов периферической крови.

Отношения и деятельность: авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. GWAS Catalog. Region: 9p21.3. <https://www.ebi.ac.uk/gwas/regions/9p21.3>. (9 August 2020).
2. Motterle A, Pu X, Wood H, et al. Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells. *Human molecular genetics*. 2012;21(18):4021-9. doi:10.1093/hmg/dds224.
3. Almontashiri NAM. The 9p21.3 risk locus for coronary artery disease: A 10-year search for its mechanism. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2017;12(3):199-204. doi:10.1016/j.jtumed.2017.03.001.
4. Dechamethakun S, Muramatsu M. Long noncoding RNA variations in cardiometabolic diseases. *Journal of human genetics*. 2017;62(1):97-104. doi:10.1038/jhg.2016.70.
5. Navarro E, Mallén A, Cruzado JM, et al. Unveiling ncRNA regulatory axes in atherosclerosis progression. *Clinical and translational medicine*. 2020;9(1):5. doi:10.1186/s40169-020-0256-3.
6. Aavik E, Babu M, Ylä-Herttua S. DNA methylation processes in atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. 2019;281:168-79. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.006.
7. Clermont PL, Parolia A, Liu HH, et al. DNA methylation at enhancer regions: Novel avenues for epigenetic biomarker development. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2016;21:430-46. doi:10.2741/4399.
8. Nazarenko MS, Markov AV, Lebedev IN, et al. Methylation profile of INK4B-ARF-INK4A locus in atherosclerosis. *Genetika*. 2013;49(6):783-7. (In Russ.) Назаренко М. С., Марков А. В., Лебедев И. Н. и др. Профиль метилирования локуса INK4B-ARF-INK4A при атеросклерозе. *Генетика*. 2013;49(6):783-7. doi:10.7868/s0016675813060076.
9. Zhou S, Cai B, Zhang Z, et al. CDKN2B Methylation and Aortic Arch Calcification in Patients with Ischemic Stroke. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2017;24(6):609-20. doi:10.5551/jat.36897.
10. Zhou S, Zhang Y, Wang L, et al. CDKN2B methylation is associated with carotid artery calcification in ischemic stroke patients. *Journal of translational medicine*. 2016;14(1):333. doi:10.1186/s12967-016-1093-4.
11. GeneCards®: The Human Gene Database. <http://www.genecards.org>.
12. MethPrimer. <http://www.uogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer.cgi>.
13. Helgeland Ø, Hertel JK, Mølven A, et al. The Chromosome 9p21 CVD- and T2D-Associated Regions in a Norwegian Population (The HUNT2 Survey). *International journal of endocrinology*. 2015;2015:164652. doi:10.1155/2015/164652.
14. Xu JJ, Jiang L, Xu LJ, et al. Association of CDKN2B-AS1 Polymorphisms with Premature Triple-vessel Coronary Disease and Their Sex Specificity in the Chinese Population. *Biomedical and environmental sciences*. 2018;31(11):787-96. doi:10.3967/bes.2018.106.
15. Angeloni A, Bogdanovic O. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation. *Essays Biochem*. 2019;63(6):707-15. doi:10.1042/EBC20190030.
16. 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. *European heart journal*. 2015;36(16):993-1000. doi:10.1093/eurheartj/ehu437.
17. Murray R, Bryant J, Titcombe P, et al. DNA methylation at birth within the promoter of ANRIL predicts markers of cardiovascular risk at 9 years. *Clinical epigenetics*. 2016;8(1):90. doi:10.1186/s13148-016-0259-5.
18. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995;15(9):1512-31. doi:10.1161/01.atv.15.9.1512.
19. Zaina S, Gonçalves I, Carmona FJ, et al. DNA methylation dynamics in human carotid plaques after cerebrovascular events. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35(8):1835-42. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305630.
20. Nazarenko MS, Markov AV, Lebedev IN, et al. A comparison of genome-wide DNA methylation patterns between different vascular tissues from patients with coronary heart disease. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122601. doi:10.1371/journal.pone.0122601.
21. Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, et al. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circulation. Cardiovascular genetics*. 2014;7(5):692-700. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000441.
22. Iltis G, Declerck K, Pudenz M, et al. Identification of differentially methylated BRCA1 and CRISP2 DNA regions as blood surrogate markers for cardiovascular disease. *Scientific reports*. 2017;7(1):5120. doi:10.1038/s41598-017-03434-0.
23. Soriano-Tárraga C, Jiménez-Conde J, Giralte-Steinhauer E, et al. Epigenome-wide association study identifies TXNIP gene associated with type 2 diabetes mellitus and sustained hyperglycemia. *Human molecular genetics*. 2016;25(3):609-19. doi:10.1093/hmg/ddv493.