

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

## СТАТУС МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

М.С. Назаренко<sup>1</sup>, А.В. Марков<sup>1</sup>, И.Н. Лебедев<sup>1</sup>, А.А. Слепцов<sup>1</sup>, А.В. Фролов<sup>2</sup>,  
О.Л. Барбараш<sup>2</sup>, Л.С. Барбараш<sup>2</sup>, В.П. Пузырев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН  
634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10

<sup>2</sup> ФГБУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН  
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

Определен статус метилирования генов, белковые продукты которых участвуют в процессах клеточной пролиферации, в тканях сосудистой стенки больных атеросклерозом. Для тестирования использовались сонные и внутренние грудные артерии, большие подкожные вены нижних конечностей, различающиеся по морфофункциональным параметрам и подверженности к атеросклеротическому процессу. Анализ статуса метилирования ДНК осуществлялся с помощью микрочипа «Infinium HumanMethylation27 BeadChip» («Illumina», США), метилчувствительной и метилспецифической полимеразной цепной реакции. В результате при сравнении тканей сосудистой стенки впервые установлено дифференциальное метилирование 45 CpG-сайтов 36 генов. Наиболее существенные различия в уровне метилирования зарегистрированы в отношении отдельных CpG-динуклеотидов генов *ALOX12*, *CARD11*, *DAB2IP*, *PTPRC*, *RASIP1*, *THR3*, *TLR4*, *TNFRSF9* и *WNT16*. Гипотеза эпигенетической дисрегуляции генов клеточного цикла (*CDKN2A* (p16INK4a) и p14ARF), *CDKN2B* (p15INK4b)) при атеросклерозе не нашла подтверждения.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, атеросклероз, Infinium HumanMethylation27 BeadChip.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время становится все более очевидным, что наряду с генетической изменчивостью определенный вклад в риск развития и течение многофакторных заболеваний может вносить эпигенетическая вариабельность гено-

ма, представленная метилированием ДНК, модификацией гистоновых белков и РНК-опосредованными механизмами. Однако в отличие от онкологических заболеваний, эпигенетические основы сердечно-сосудистой патологии остаются относительно малоизученными [1].

**Назаренко Мария Сергеевна** — канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории популяционной генетики, e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

**Марков Антон Владимирович** — аспирант лаборатории популяционной генетики, e-mail: anton-markov@medgenetics.ru

**Лебедев Игорь Николаевич** — д-р биол. наук, зав. лабораторией цитогенетики, e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

**Слепцов Алексей Анатольевич** — аспирант лаборатории популяционной генетики, e-mail: alexei.sleptcov@medgenetics.ru

**Фролов Алексей Витальевич** — лаборант-исследователь лаборатории нейрососудистой патологии, e-mail: kjerne@yandex.ru

**Барбараш Ольга Леонидовна** — д-р мед. наук, проф., директор, e-mail: olb61@mail.ru

**Барбараш Леонид Семенович** — проф., академик РАМН, главный врач, МУЗ «Кемеровский кардиологический диспансер», e-mail: olb61@mail.ru

**Пузырев Валерий Павлович** — проф., академик РАМН, директор, e-mail: valery.puzurev@medgenetics.ru

© Назаренко М.С., Марков А.В., Лебедев И.Н., Слепцов А.А., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П., 2013

Экспериментальные исследования, связанные с оценкой вариабельности метилирования ДНК в тканях, пораженных атеросклеротическим процессом, немногочисленны. Работы с использованием модельных животных и культур клеток *in vitro* показали, что в атеросклеротических бляшках регистрируется как глобальное гипометилирование ДНК, так и гиперметилирование промоторных регионов некоторых генов одновременно, которое коррелирует с изменением их транскрипционной активности [2]. В тканях сосудистой стенки больных атеросклерозом анализ профиля метилирования ДНК осуществлялся с использованием микрочиповых технологий [3, 4], другой подход был связан с изучением метилирования отдельных генов-кандидатов [5–9].

Установлена надежная ассоциация локуса 9p21.3 с риском развития синтропных заболеваний сердечно-сосудистого континуума, в том числе тех, в основе развития которых лежит атеросклеротическое поражение сосудистой стенки [10–15]. Механизм такой ассоциации остается неизвестным, однако одним из направлений исследований в данной области является структурно-функциональная характеристика ближайших картированных генов, в том числе ингибиторов циклин-зависимых киназ *CDKN2A* (кодирует p16INK4a и p14ARF у человека или p19ARF у мыши) и *CDKN2B* (кодирует p15INK4b). Их белковые продукты играют важную роль в регуляции клеточного цикла и апоптоза. Потеря функции локуса *INK4b-ARF-INK4a* вследствие делеции и/или aberrантного метилирования является частым событием в опухолевой ткани. В то же время работы, посвященные исследованию соматической изменчивости генов ингибиторов циклин-зависимых киназ при атеросклерозе, единичны. Нокаут гена *Cdkn2a* (p19ARF) связан с увеличением темпов формирования атеросклеротических бляшек в определенных регионах аорты на модели заболевания у мыши [16]. Не исключено, что вариабельность метилирования данной категории генов может вносить вклад в предрасположенность к образованию и прогрессии атеросклеротической бляшки.

Цель настоящего исследования — определение статуса метилирования генов, белковые продукты которых участвуют в процессах клеточной пролиферации, в тканях сосудистой стенки больных атеросклерозом. Время образования и темп прогрессии атеросклеротических бляшек, представляющих собой морфологический субстрат патологии, зависят от типа и района сосуда. В связи с этим представлялось актуальным провести исследование сосудов, различающихся по своим морфофункциональным параметрам

и подверженности к развитию патологического процесса.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В группу обследования вошли 60 русских мужчин (средний возраст  $62,3 \pm 6,7$  года). В зависимости от степени сосудисто-мозговой недостаточности [17] больные распределились следующим образом: I степень — 21 (35 %), II степень — 3 (5 %), III степень — 19 (31,7 %), IV степень — 17 (28,3 %) человек. Инсульт или транзиторные ишемические атаки головного мозга в анамнезе регистрировались у 21 (35 %) пациента. Кроме этого все обследуемые имели ишемическую болезнь сердца и артериальную гипертензию, а у 26 (43,3 %) из них диагностирована хроническая ишемия нижних конечностей. Гиперхолестеринемия в анамнезе была у 53 мужчин, что составило 88,3 %. Сахарный диабет 2-го типа выявлен у 15 (25 %) больных.

Банк тканей сформирован из образцов сонных и внутренних грудных артерий, а также больших подкожных вен нижних конечностей. Образцы ткани сонных артерий, включая атеросклеротические бляшки и подлежащую макроскопически неизмененную ткань, получены в результате каротидной эндартерэктомии. Биоптаты внутренних грудных артерий и больших подкожных вен нижних конечностей собраны в результате аортокоронарного шунтирования. Каждый образец осмотрен, тщательно очищен от масс кальфикации, отложений липидов и тромбов, отмыт в стерильном физиологическом растворе. Биологический материал был заморожен в жидком азоте и хранился при температуре  $-80$  °C.

Выделение геномной ДНК из тканей сосудистой стенки проводили после стандартной обработки протеиназой К в течение ночи при  $37$  °C и экстракцией фенол/хлороформом.

Анализ статуса метилирования ДНК осуществляли с помощью микрочипа «Infinium Human Methylation27 BeadChip» («Illumina», США), позволяющего проводить исследование 27578 CpG-сайтов 14475 генов. Тестировали образцы ДНК, выделенные из области атеросклеротических бляшек ( $n = 6$ ) и подлежащей макроскопически неизмененной стенки сонных артерий ( $n = 2$ ), а также образцы внутренней грудной артерии ( $n = 2$ ) и большой подкожной вены нижних конечностей ( $n = 2$ ), собранные у 9 пациентов. Бисульфитная модификация геномной ДНК выполнена с использованием набора «EZ DNA Methylation Kit» («Zymo Research», США). Дальнейшие этапы полногеномной амплификации, ферментативного расщепления ДНК на

фрагменты, очистки и гибридизации проводили согласно стандартному протоколу производителя [18]. Первичную обработку полученных данных осуществляли в пакете программ «GenomeStudio Methylation Module» («Illumina», США). Оценкой статуса или уровня метилирования служила величина индекс-метилирования ( $\beta$ ), которая соответствует отношению флуоресцентных сигналов метилированных аллелей к сумме флуоресцентных сигналов метилированных и неметилированных аллелей. Индекс метилирования  $\beta$  варьирует от 0 (неметилированное состояние) до 1 (полное метилирование всех CpG-сайтов в данном положении). Статистический анализ данных выполнен с помощью программного пакета «Partek Genomics Suite 6.6» («Partek Inc.», США). Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) индекса метилирования в исследуемых группах выявляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующей коррекцией ложноположительных результатов (FDR) при множественном сравнении данных [19]. Для определения статистически значимых различий в индексе метилирования CpG-динуклеотидов между тканями использовали показатель  $\Delta\beta > |0,2|$  (20 %) [19]. Аннотацию метилочипа и выделение категории генов, белковые продукты которых участвуют в процессах клеточной пролиферации (GO:0008283, cell proliferation), проводили с помощью Интернет-ресурса TopGene Suite (<http://topgene.cchmc.org/>). Для визуализации дифференциально-метилированных CpG-сайтов использовали пакет «gplots» в программной среде R.

Подтверждающее тестирование статуса метилирования локуса *INK4b-ARF-INK4a* выполнялось методами метилспецифической и метилчувствительной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Объем выборки составил 120 образцов ДНК, выделенных из тканей атеросклеротической бляшки и прилежащей макроскопически неизменной стенки сонной артерии. В ходе метилчувствительной ПЦР оценивали статус метилирования ДНК в области промоторов гена *CDKN2A* (*p16<sup>INK4a</sup>* и *p14<sup>ARF</sup>*). Для этого геномную ДНК, предварительно обработанную рестриктазой *HpaII* («Fermentas», Литва), подвергали амплификации с использованием соответствующих праймеров [20]. Кроме того, CpG-сайты в области первых экзонов генов *CDKN2A* (*p16<sup>INK4a</sup>* и *p14<sup>ARF</sup>*) и *CDKN2B* (*p15<sup>INK4b</sup>*) проанализированы с помощью метилспецифической ПЦР. Структура праймеров, которые применялись для амплификации бисульфит-модифицированной ДНК, взята из литературы [21, 22]. Разделение продуктов ПЦР производилось в 3%-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Детек-

цию фрагментов ДНК осуществляли в проходящем ультрафиолетовом свете с помощью геледокументирующей установки «Gel Doc 2000» («Bio-Rad», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Основным критерием выбора генов, белковые продукты которых участвуют в процессах клеточной пролиферации, служила классификация базы данных Gene Ontology (GO:0008283, cell proliferation). Именно эти локусы (1301) и стали предметом дальнейшего анализа. При сравнении статуса метилирования данных генов в тканях сонной (атеросклеротическая бляшка и прилежащая макроскопически неизменная область) и внутренней грудной артерий, а также большой подкожной вены нижних конечностей больных атеросклерозом выявлены различия в уровне метилирования 45 CpG-сайтов (36 генов клеточной пролиферации), среди которых 24 (53 %) CpG-динуклеотида расположены в CpG-островках (рис. 1). Все гены картированы на аутосомах. Среди дифференциально метилированных генов два – *WT1* и *H19* – относятся к категории импринтированных.

При сравнении групп образцов атеросклеротических бляшек и прилежащих макроскопически неизменных тканей сонных артерий не обнаружено CpG-сайтов с разностью среднего индекса метилирования  $\Delta\beta$  не менее 20 %. Однако сравнительный анализ тканей из области атеросклеротической бляшки с внутренней грудной артерией и большой подкожной веной нижних конечностей выявил 9 дифференциально метилированных CpG-сайтов генов *ALOX12*, *CARD11*, *DAB2IP*, *PTPRC*, *RASIP1*, *THRB*, *TLR4*, *TNFRSF9* и *WNT16* (см. таблицу). В частности, в тканях атеросклеротических бляшек отмечалось гиперметилирование CpG-динуклеотидов генов *ALOX12*, *CARD11*, *RASIP1* и *WNT16*, но гипометилирование отдельных сайтов генов *DAB2IP*, *PTPRC*, *THRB*, *TLR4* и *TNFRSF9* по сравнению с внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей.

С помощью метилочипа проанализировано 9 CpG-сайтов двух CpG-островков гена *CDKN2A* (*p16<sup>INK4a</sup>* и *p14<sup>ARF</sup>*) и 10 CpG-сайтов двух CpG-островков гена *CDKN2B* (*p15<sup>INK4b</sup>*). Во всех обследованных тканях, как в норме, так и при атеросклерозе, установлено гипометилирование большинства CpG-динуклеотидов анализируемых генов (рис. 2). В то же время относительно высокие значения среднего индекса метилирования регистрировались для 6 CpG-сайтов, локализованных в CpG-островке 9:21995095-21996291

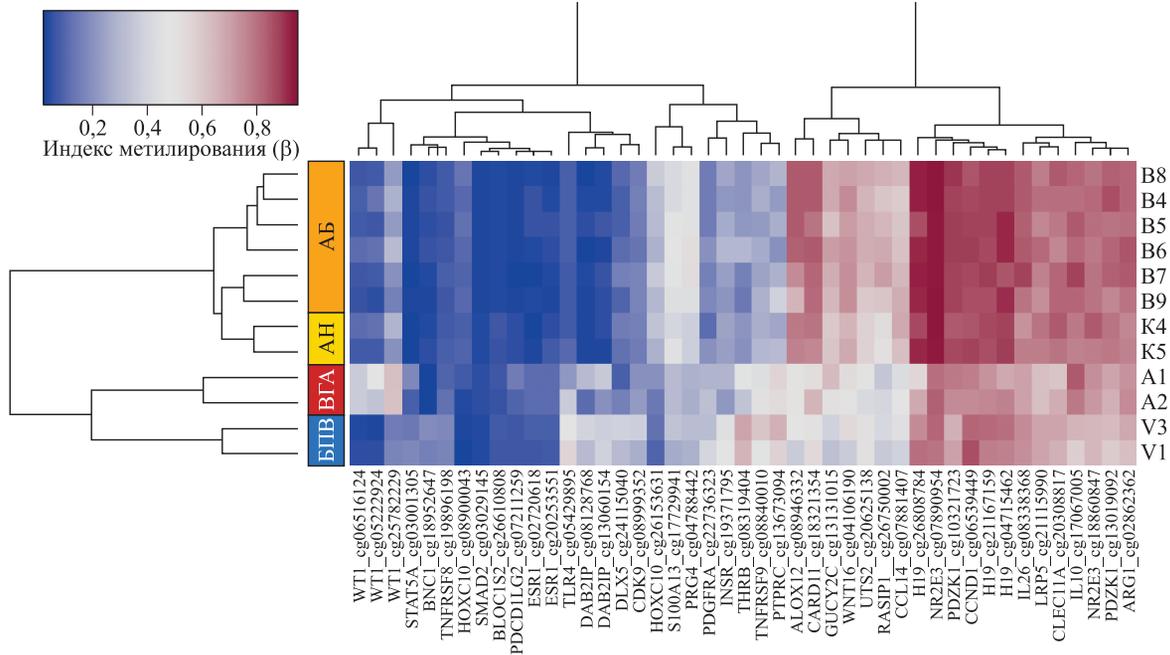


Рис. 1. Дифференциально-метилованные CpG-сайты генов, белковые продукты которых участвуют в процессах клеточной пролиферации в тканях сосудистой стенки больных атеросклерозом. АБ – атеросклеротическая бляшка сонной артерии; АН – макроскопически неизменная стенка сонной артерии; ВГА – внутренняя грудная артерия; БПВ – большая подкожная вена нижних конечностей

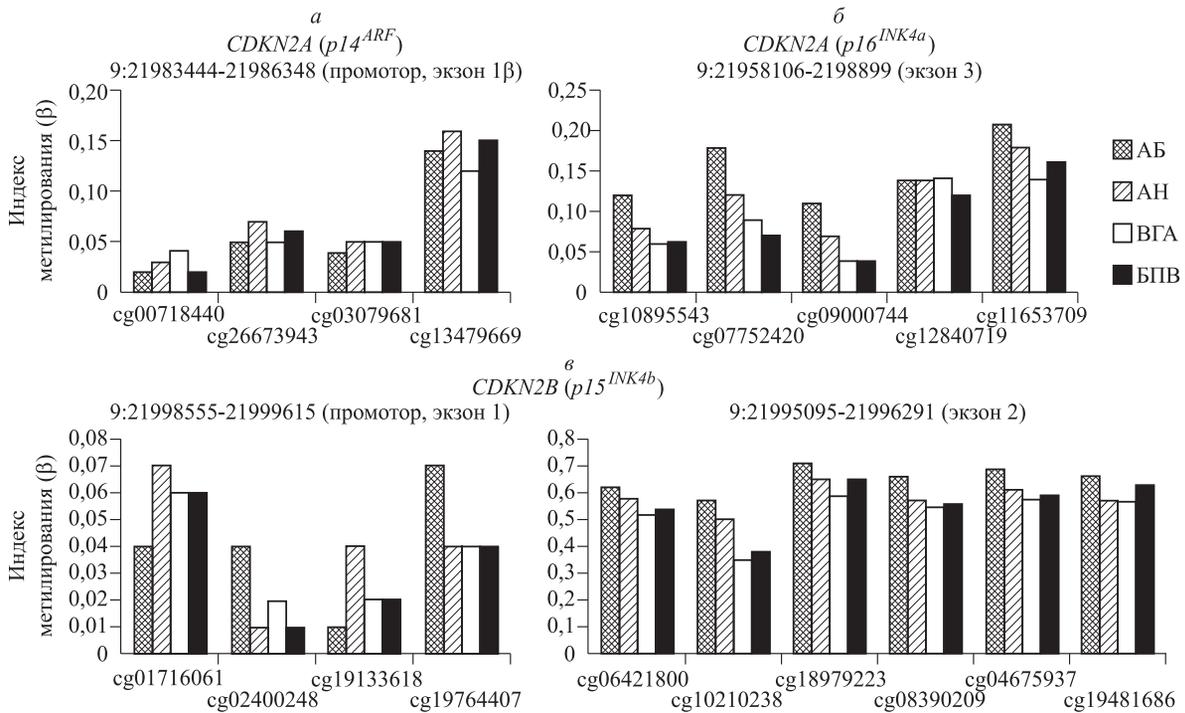


Рис. 2. Средний индекс метилирования (β) отдельных CpG-сайтов генов *CDKN2A* (а – *p14<sup>ARF</sup>* и б – *p16<sup>INK4a</sup>*) и *CDKN2B* (в – *p15<sup>INK4b</sup>*) в тканях сосудистой стенки больных атеросклерозом. Номер хромосомы и координаты CpG-островка, а также локализация CpG-сайта, согласно аннотации производителя метилочипа. АБ – атеросклеротическая бляшка сонной артерии; АН – макроскопически неизменная стенка сонной артерии; ВГА – внутренняя грудная артерия; БПВ – большая подкожная вена нижних конечностей

**Гены, отдельные CpG-сайты которых показали разность среднего индекса метилирования  $\Delta\beta > |0,2|$ , в тканях сосудистой стенки больных атеросклерозом**

Ген	CpG-островок*	CpG-сайт*	Средний индекс метилирования ( $\beta$ )			Продукт гена
			АБ	ВГА	БПВ	
<i>ALOX12</i>	17:6839463-6841283	cg08946332	<b>0,79</b>	0,50	0,43	12-липоксигеназа
<i>CARD11</i>	—	cg18321354	<b>0,83</b>	0,59	0,53	Белок 11 семейства CARD-содержащих белков
<i>DAB2IP</i>	9:123500662-123502056	cg13060154	<b>0,05</b>	0,28	0,38	DAB2-взаимодействующий белок
<i>PTPRC</i>	—	cg13673094	0,28	0,55	<b>0,62</b>	Белковая тирозин-фосфатаза, рецепторный тип, C
<i>RASIP1</i>	19:53936336-53936649	cg26750002	<b>0,65</b>	0,38	0,39	Взаимодействующий с Ras белок 1
<i>THRB</i>	3:24510366-24512597	cg08319404	0,21	0,41	<b>0,68</b>	$\beta$ -Рецептор тиреоидного гормона (трийодтиронина)
<i>TLR4</i>	—	cg05429895	<b>0,09</b>	0,30	0,52	Толл-подобный рецептор 4
<i>TNFRSF9</i>	—	cg08840010	0,26	0,48	0,54	Белок 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли
<i>WNT16</i>	—	cg04106190	<b>0,73</b>	0,52	0,46	Белок 16 WNT-семейства сигнальных факторов

Примечание. \* — номер хромосомы и координаты CpG-островка, а также локализация CpG-сайта, согласно аннотации производителя микрочипа. АБ — атеросклеротическая бляшка сонной артерии; ВГА — внутренняя грудная артерия; БПВ — большая подкожная вена нижних конечностей. Жирным шрифтом выделены CpG-сайты с индексом метилирования  $\beta \leq 0,2$  или  $\beta \geq 0,6$ .

гена *CDKN2B* (p15<sup>INK4b</sup>), также во всех исследуемых образцах тканей сосудистой стенки. Тем не менее статистически значимых различий в индексах метилирования всех CpG-сайтов между тестируемыми группами получено не было.

Подтверждающий анализ статуса метилирования CpG-сайтов промоторов и первых экзонов генов *CDKN2A* (p16<sup>INK4a</sup> и p14<sup>ARF</sup>) и *CDKN2B* (p15<sup>INK4b</sup>) с использованием метилспецифической и метилчувствительной ПЦР проводился в большей по объему группе тканей сонных артерий ( $n = 120$ ). Показано отсутствие aberrантного метилирования анализируемых регионов генов в тканях из области атеросклеротических бляшек и предлежащей макроскопически неизменной сосудистой стенки у тех же самых больных.

Ранее в работе Post et al. был выявлен высокий уровень метилирования в промоторе и первом экзоне гена рецептора эстрогена (*ESR1*), который также относится к категории генов клеточной пролиферации в атеросклеротических бляшках коронарных артерий по сравнению с таковым в тканях аорты и внутренней грудной артерии [6]. В настоящем исследовании в состав микрочипа входили пробы для тестирования индекса метилирования отдельных CpG-сайтов гена *ESR1*. Выявлено, что индекс метилирова-

ния двух сайтов cg20253551 и cg02720618 данного гена был ниже в тканях атеросклеротических бляшек сонных артерий (0,05 и 0,05) по сравнению с внутренней грудной артерией (0,12 и 0,12) и большой подкожной веной нижних конечностей (0,09 и 0,08).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Дисбаланс процессов пролиферации различных типов клеток играет важную роль при атеросклерозе [23]. Деление гладкомышечных клеток и синтез ими белков внеклеточного матрикса вносит вклад в поддержание стабильности атеросклеротической бляшки. С другой стороны, избыточная пролиферация клеток обуславливает окклюзию просвета сосудов на поздних стадиях патологического процесса и вызывает рестеноз как осложнение оперативных вмешательств. В связи с этим понимание молекулярных механизмов клеточной пролиферации будет иметь особое значение для разработки новых диагностических и терапевтических подходов.

Впервые при сравнении тканей сосудистой стенки различной локализации у больных атеросклерозом выявлено дифференциальное метилирование 45 CpG-сайтов 36 генов, белковые

продукты которых участвуют в клеточной пролиферации. Наиболее существенные различия в уровне метилирования зарегистрированы в отношении отдельных CpG-сайтов генов *ALOX12*, *CARD11*, *DAB2IP*, *PTPRC*, *RASIP1*, *THRB*, *TLR4*, *TNFRSF9* и *WNT16* (см. таблицу). Связь генов *ALOX12*, *RASIP1*, *TLR4* и *TNFRSF9* с атеросклерозом установлена в ряде публикаций, другие же локусы в качестве генов-кандидатов патологического процесса ранее не рассматривались.

Выявлено гиперметилирование отдельных CpG-сайтов генов *ALOX12* и *RASIP1* в тканях из области атеросклеротических бляшек сонных артерий по сравнению с внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей (см. таблицу).

Тромбоцитарная 12-липоксигеназа участвует в метаболизме арахидоновой кислоты и приводит к образованию эйкозаноидов. Ген *ALOX12* практически не экспрессируется в сонных артериях, пораженных атеросклерозом [24]. Исследования ассоциации полиморфных вариантов гена с ишемическим инсультом, инфарктом миокарда и кальфикацией коронарных артерий противоречивы (<http://hugenavigator.net/>).

Ген *RASIP1* кодирует белок из семейства Ras, который участвует в морфогенезе и гомеостазе кровеносных сосудов, миграции эндотелиальных клеток [25]. Показана ассоциация однонуклеотидных полиморфных вариантов гена с калибром вен сетчатки – эндофенотипом нарушения микроциркуляции, связанным с сердечно-сосудистыми заболеваниями [26].

Нами установлено гипометилирование отдельных сайтов генов *TLR4* и *TNFRSF9* в тканях из области атеросклеротических бляшек сонных артерий по сравнению с внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей (см. таблицу).

Трансмембранный толл-подобный рецептор 4 активно экспрессируется в различных клетках на ранних и поздних стадиях атеросклеротического поражения сосудистой стенки [27]. Причем более высокий уровень мРНК *TLR4* выявляется в макрофагах и эндотелиальных клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий по сравнению с внутренними грудными артериями. Установлена ассоциация ряда полиморфных вариантов данного гена с риском развития атеросклероза и его осложнений (<http://hugenavigator.net/>). Данный рецептор рассматривается в качестве перспективной терапевтической мишени для предотвращения развития и уменьшения выраженности симптомов осложненного течения атеросклеротического процесса [28].

Ген *TNFRSF9* кодирует белок 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (CD137). Экспрессия гена выявлена в эндотелиальных и гладкомышечных клетках атеросклеротических бляшек сонных и ренальных артерий человека [29]. Увеличение экспрессии CD137 в моноцитах периферической крови может отражать нестабильность атеросклеротических бляшек у больных с острым коронарным синдромом [30]. Полагают, что блокирование сигнального пути рецептора и его лиганда является терапевтической мишенью при атеросклерозе [31].

В рамках настоящего исследования осуществлена оценка статуса метилирования генов *CDKN2A* (*p16<sup>INK4a</sup>* и *p14<sup>ARF</sup>*) и *CDKN2B* (*p15<sup>INK4b</sup>*). Результаты количественного анализа на микрочипе были подтверждены методиками метилспецифичной и метилчувствительной ПЦП. Предположение о роли нарушения метилирования ДНК в данном локусе при атеросклеротическом поражении сонных артерий у человека не нашло подтверждения.

Поскольку существует зависимость между плотностью метилирования CpG-островков промоторных регионов генов и их функциональной активностью, полученные результаты согласуются с данными литературы в отношении экспрессии. В частности, Holdt et al. показали, что гены *CDKN2A* (*p16<sup>INK4a</sup>* и *p14<sup>ARF</sup>*) и *CDKN2B* (*p15<sup>INK4b</sup>*) активно экспрессируются в области атеросклеротических бляшек и морфологически неизменной стенке коронарных артерий [32].

Для идентификации информативных локусов генома необходимо проведение скрининга одновременно большого числа сайтов в тканях при патологическом процессе. Решение такой задачи становится возможным с использованием микрочиповых технологий, обеспечивающих высокопроизводительный анализ широкого спектра генов одновременно в нескольких образцах. Такой подход применялся в отношении количественного анализа метилирования ДНК тканей сосудистой стенки при атеросклерозе у человека *in vivo* лишь в двух работах [3, 4].

При сравнении списков дифференциально-метилированных генов, полученных в настоящем исследовании и работах Castillo-Diaz et al. [3], Назаренко с соавт. [4], показано, что «общими» являются гены *HOXC10* и *SMAD2*, а также гены *H19* и *PDGFRA* соответственно.

Уровень метилирования CpG-островков генов *HOXC10* (12:52663262-52664017) и *SMAD2* (18:43041077-43041115) был ниже в тканях из области атеросклеротических бляшек коронар-

ных артерий по сравнению с непораженной аортой [3]. В настоящем исследовании сайты cg08900043 и cg26153631, расположенные в CpG-островке 12:52664872-52666801 гена *HOXC10*, были гиперметилированы в тканях атеросклеротических бляшек сонных артерий по сравнению с внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей.

Существенное снижение уровня метилирования cg15886040 гена *H19* выявлено в тканях из области атеросклеротической бляшки аорты по сравнению с сонной артерией [4]. Показано гиперметилирование cg04715462, cg21167159 и cg26808784, входящих в CpG-островок 11:1973888-1974871 гена *H19*, во всех анализируемых группах тканей сосудистой стенки. В тканях из области атеросклеротических бляшек сонной артерии регистрировалось гипометилирование cg20629161 гена *PDGFRA* по сравнению с аортой [4]. В настоящей работе более низкий уровень метилирования cg22736323 данного гена был характерен для сонной артерии, нежели для внутренних грудных артерий и больших подкожных вен нижних конечностей.

Не исключено, что полученные различия могут быть обусловлены несколькими причинами. Во-первых, тестируемые образцы взяты из различных мест сосудистого русла: коронарные, сонные и внутренние грудные артерии, аорта, большая подкожная вена нижних конечностей. Castillo-Diaz et al. [3] использовали в качестве контрольных образцы аорты здоровых индивидов обоих полов, а в работах с микрочипами фирмы «Illumina» проводился анализ образцов сосудистого русла, различающихся по степени подверженности к патологическому процессу у мужчин, больных атеросклерозом. Во-вторых, исследование статуса метилирования ДНК проводили с использованием различных технологий и платформ, в частности микрочипа, содержащего 14923 клон CpG-островков с наборами HCG18.1K и 6.8K, GoldenGate Methylation Cancer Panel I и Infinium Human Methylation27 BeadChip. Кроме того, все три работы отличались в отношении использованных подходов к статистической обработке данных.

Результаты настоящего исследования по оценке статуса метилирования гена-кандидата *ESR1* отличаются от работы Post et al. [6]. Причинами могут быть разная локализация анализируемых CpG-сайтов и другие тестируемые районы сосудистого русла.

Для подтверждения выявленных различий в уровне метилирования ДНК при использовании микрочиповых технологий необходимо применение верифицирующих методик, среди кото-

рых «золотым стандартом» является технология секвенирования (бисульфитное секвенирование, пиросеквенирование), что является предметом дальнейшего исследования. Кроме того, актуальной для решения в рамках продолжения работ представляется проблема, связанная с высокой межклеточной гетерогенностью тканей сосудистой стенки. Не менее важным вопросом предстоящих исследований будет выяснение специфичности и универсальности эпигенетических модификаций генома при патологическом процессе в тканях сосудов по сравнению с периферической кровью. Понимание эпигенетического влияния при атеросклерозе не может быть полным без связи с данными полногеномных исследований ассоциаций и транскрипционных профилей.

## ВЫВОДЫ

При сравнении статуса метилирования ДНК из тканей атеросклеротических бляшек и макроскопически неизмененных сонных артерий, внутренних грудных артерий, а также больших подкожных вен нижних конечностей у больных атеросклерозом выявлено дифференциальное метилирование 45 CpG-сайтов 36 генов, белковые продукты которых участвуют в клеточной пролиферации. Полученные предварительные данные свидетельствуют о том, что наиболее существенные различия в уровне метилирования имеются в отношении отдельных CpG-сайтов генов *ALOX12*, *CARD11*, *DAB2IP*, *PT-PRC*, *RASIP1*, *THRB*, *TLR4*, *TNFRSF9* и *WNT16*. Предположение об эпигенетической дисрегуляции генов ингибиторов циклин-зависимых киназ (*CDKN2A* (p16INK4a и p14ARF), *CDKN2B* (p15INK4b)) при атеросклеротическом поражении сонных артерий у человека не нашло подтверждения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-00674) и гранта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы для проведения научных исследований коллективами НОЦ (соглашение № 8062).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schnabel R.B., Baccarelli A., Lin H. et al. Next steps in cardiovascular disease genomic research-sequencing, epigenetics, and transcriptomics // Clin. Chem. 2012. Vol. 58. P. 113–126.
2. Turunen M.P., Aavik E., Yla-Herttuala S. Epigenetics and atherosclerosis // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1790. P. 886–891.

3. **Castillo-Diaz S.A., Garay-Sevilla M.E., Hernandez-Gonzalez M.A. et al.** Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries // *Int. J. Mol. Med.* 2010. Vol. 26. P. 691–700.
4. **Назаренко М.С., Пузырев В.П., Лебедев И.Н. и др.** Профиль метилирования ДНК в области атеросклеротических бляшек человека // *Молекулярная биология.* 2011. Т. 45. С. 610–616.
5. **Hiltunen M.O., Turunen M.P., Hakkinen T.P. et al.** DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions // *Vasc. Med.* 2002. Vol. 7. P. 5–11.
6. **Post W.S., Goldschmidt-Clermont P.J., Wilhide C.C. et al.** Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system // *Cardiovasc. Res.* 1999. Vol. 43. P. 985–991.
7. **Kim J., Kim J.Y., Song K.S. et al.** Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. Vol. 1772. P. 72–80.
8. **Zhu S., Goldschmidt-Clermont P.J., Dong C.** Inactivation of monocarboxylate transporter MCT3 by DNA methylation in atherosclerosis // *Circulation.* 2005. Vol. 112. P. 1353–1361.
9. **Zawadzki C., Chatelain N., Delestre M. et al.** Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques // *Atherosclerosis.* 2009. Vol. 204. P. e4–e14.
10. **Wellcome Trust Case Control Consortium.** Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls // *Nature.* 2007. Vol. 447. P. 661–678.
11. **Helgadottir A., Thorleifsson G., Manolescu A. et al.** A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction // *Science.* 2007. Vol. 316. P. 1491–1493.
12. **McPherson R., Pertsemlidis A., Kavaslar N. et al.** A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease // *Science.* 2007. Vol. 316. P. 1488–1491.
13. **Samani N.J., Erdmann J., Hall A.S. et al.** Genome-wide association analysis of coronary artery disease // *N. Engl. J. Med.* 2007. Vol. 357. P. 443–453.
14. **Cunnington M.S., Keavney B.** Genetic mechanisms mediating atherosclerosis susceptibility at the chromosome 9p21 locus // *Curr. Atheroscler. Rep.* 2011. Vol. 13. P. 193–201.
15. **Popov N., Gil J.** Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health // *Epigenetics.* 2010. Vol. 5. P. 685–690.
16. **Gonzalez-Navarro H., Abu Nabah Y.N., Vinue A. et al.** p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010. V. 55. P. 2258–2268.
17. **Покровский А.В., Кованева Р.А., Зингерман Л.С. и др.** Показания к хирургическому лечению сосудисто-мозговой недостаточности у больных с окклюзирующими поражениями брахиоцефальных сосудов // *Невропатология и психиатрия* 1977. С. 1789–1797.
18. **Bibikova M., Le J., Barnes B. et al.** Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay // *Epigenomics.* 2009. Vol. 1. P. 177–200.
19. **Benjamini Y., Hochberg Y.** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* 1995. Vol. 57. P. 289–300.
20. **Землякова В.В., Стрельников В.В., Зборовская И.Б. и др.** Сравнительный анализ аномального метилирования CpG-островков, расположенных в промоторных областях генов P16/CDKN2A и P14ARF, при немелкоклеточном раке легкого и остром лимфобластном лейкозе // *Мол. биол.* 2004. Т. 38. С. 966–972.
21. **Amatya V.J., Takeshima Y., Inai K.** Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation // *Mod. Pathol.* 2004. Vol. 17. P. 705–10.
22. **Herman J. G., Graff J. R., Myohanen S. et al.** Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 9821–9826.
23. **Fuster J.J., Fernandez P., Gonzalez-Navarro H. et al.** Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies // *Cardiovasc. Res.* 2010. Vol. 86. P. 254–264.
24. **Gertow K., Nobili E., Folkersen L. et al.** 12- and 15-lipoxygenases in human carotid atherosclerotic lesions: associations with cerebrovascular symptoms // *Atherosclerosis.* 2011. Vol. 215. P. 411–416.
25. **Xu K., Sacharidou A., Fu S. et al.** Blood vessel tubulogenesis requires Rasip1 regulation of GTPase signaling // *Dev. Cell.* 2011. Vol. 20. P. 526–539.
26. **Ikram M.K., Sim X., Jensen R.A. et al.** Four novel Loci (19q13, 6q24, 12q24, and 5q14) influence the microcirculation in vivo // *PLoS Genet.* 2010. Vol. 6. P. e1001184.
27. **den Dekker W.K., Cheng C., Pasterkamp G., Duckers H.J.** Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization // *Atherosclerosis.* 2010. Vol. 209. P. 314–320.
28. **Moghimpour Bijani F., Vallejo J.G., Rezaei N.** Toll-like Receptor Signaling Pathways in Cardiovascular Diseases: Challenges and Opportunities // *Int. Rev. Immunol.* 2012. Vol. 31. P. 379–395.
29. **Olofsson P.S., Soderstrom L.A., Wagsater D. et al.** CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice // *Circulation.* 2008. Vol. 117. P. 1292–1301.
30. **Yan J., Gong J., Liu P. et al.** Positive correlation between CD137 expression and complex stenosis morphology in patients with acute coronary syndromes // *Clin. Chim. Acta.* 2011. Vol. 412. P. 993–998.
31. **Jeon H.J., Choi J.H., Jung I.H. et al.** CD137 (4-1BB) deficiency reduces atherosclerosis in hyperlipidemic mice // *Circulation.* 2010. Vol. 121. P. 1124–1133.
32. **Holdt L. M., Sass K., Gabel G.** Expression of Chr9p21 genes *CDKN2B* (p15INK4b), *CDKN2A* (p16INK4a), *p14ARF* and *MTAP* in human atherosclerotic plaque // *Atherosclerosis.* 2011. Vol. 214. P. 264–270.

## DNA METHYLATION STATUS OF THE CELL PROLIFERATION GENES IN ATHEROSCLEROSIS

M.S. Nazarenko, A.V. Markov, I.N. Lebedev, A.A. Sleptsov,  
A.V. Frolov, O.L. Barbarash, L.S. Barbarash, V.P. Puzyrev

The purpose of this study was to identify the features of methylation status of genes whose products are involved in the cell proliferation in vascular tissues of patients with atherosclerosis. We tested the vascular samples from carotid arteries, internal mammary arteries and saphenous veins, which differ in their morphological and functional characteristics and the degree of susceptibility to pathology. DNA methylation profiling was performed by using the microarray «Infinium Human-Methylation27 BeadChip» («Illumina», USA), methylation-sensitive polymerase chain reaction and methylation-specific PCR. For the first time we identified 45 CpG-sites of 36 genes with differential DNA methylation between vascular tissues. The most pronounced differences in the DNA methylation level were registered for CpG-dinucleotides of genes *ALOX12*, *CARD11*, *DAB2IP*, *PTPRC*, *RASIP1*, *THRB*, *TLR4*, *TNFRSF9* and *WNT16*. Our data do not support the hypothesis of epigenetic dysregulation of cell-cycle genes (*CDKN2A* (p16INK4a and p14ARF), *CDKN2B* (p15INK4b)) in atherosclerosis.

**Keywords:** DNA methylation, atherosclerosis, Infinium HumanMethylation27 BeadChip.

---

*Статья поступила 10 декабря 2012 г.*