

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ»



На правах рукописи

Марков Антон Владимирович

ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

03.02.07 – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
академик РАН, профессор
Пузырев Валерий Павлович

Томск – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Атеросклероз как основной компонент сердечно-сосудистых заболеваний.....	14
1.2. Морфология нормальной и пораженной атеросклерозом артерии	17
1.3 Основные теории возникновения атеросклероза.....	21
1.4 Современные представления о патогенезе атеросклероза.....	26
1.5. Эпигенетические модификации генома.....	32
1.5.1 Метилирование ДНК и его биологическая роль.....	34
1.5.2. Метилирование генома при атеросклерозе	38
1.5.3. Лocus-специфическое метилирование ДНК при атеросклерозе....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
2.1. Дизайн исследования, объем и структура материала.....	47
2.2. Клиническая характеристика больных	47
2.3. Формирование банка тканей	49
2.4. Выделение ДНК.....	50
2.5. Бисульфитная модификация ДНК.....	51
2.6. Анализ метилирования ДНК на биологических микрочипах	52
2.6.1. Биоинформационная обработка данных.....	53
2.6.2. Анализ дифференциального метилирования	58
2.6.3. Аннотирование результатов микрочипового исследования	60
2.7. Бисульфитное пиросеквенирование.....	60
2.8. Статистический анализ результатов	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
3.1. Общая характеристика профилей метилирования ДНК по результатам микрочипового анализа	67

3.2. Анализ дифференциального метилирования ДНК в группах тканей, исследованных с помощью биологических микрочипов.....	74
3.2.1. Сравнение уровней метилирования отдельных CpG-сайтов между атеросклеротическими бляшками и непораженными тканями артериальной стенки.....	74
3.2.2. Сравнение уровней метилирования отдельных CpG-сайтов между внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей.....	98
3.3. Подтверждающее исследование уровней метилирования отдельных CpG-сайтов генов-кандидатов в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови у больных атеросклерозом.....	105
3.3.1. Уровень метилирования промоторного региона гомеобоксного гена <i>HOXD4</i> и микроРНК (<i>MIR10B</i>).....	106
3.3.2. Уровень метилирования промотора/экзона 1a гена мезодерм-специфичного транскрипта (<i>PEG1/MEST</i>)	112
3.3.3. Уровень метилирования 11 экзона гена апоптоз-ассоциированной тирозинкиназы (<i>AATK</i>)	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
ВЫВОДЫ.....	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	153

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК	Активные формы кислорода
БПВ	Большая подкожная вена
ВГА	Внутренняя грудная артерия
ГМК	Гладкомышечные клетки
ДИ	Доверительный интервал
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
КАБ	Атеросклеротическая бляшка коронарной артерии
Кб	Килобаза (1000 пар нуклеотидов)
ЛВП	Липопротеиды высокой плотности
ЛНП	Липопротеиды низкой плотности
ЛОНП	Липопротеиды очень низкой плотности
ЛПК	Лейкоциты периферической венозной крови
РНК	Рибонуклеиновая кислота
п.н.	Пара нуклеотидов
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
САБ	Атеросклеротическая бляшка сонной артерии
САН	Макроскопически нормальный образец сонной артерии
ЭК	Эндотелиальные клетки
DMR	Дифференциально метилированный регион ДНК
ddNTP	Дидезоксинуклеозидтрифосфат (нуклеотид-терминатор)
dNTP	Дезоксинуклеозидтрифосфат (нуклеотид)
EWAS	Крупномасштабный эпигеномный поиск ассоциаций
FDR	Частота ложноположительных результатов
GWAS	Полногеномный поиск ассоциаций
PCoA	Метод главных координат
SDS	Додецилсульфат натрия
SNP	Однонуклеотидный полиморфизм
TSS	Сайт инициации транскрипции

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время основной причиной заболеваемости и смертности во многих странах мира являются болезни системы кровообращения. При этом показатели смертности среди мужчин и женщин трудоспособного возраста по России самые высокие в Европе [Шальнова С.А., 2012]. Одной из ведущих патологий в структуре болезней данной группы является атеросклеротическое поражение артерий. Длительное время атеросклероз протекает скрытно, пока не приведет к таким тяжелым осложнениям как инфаркт миокарда, инсульт, внезапная смерть [Аронов Д.М., Лупанов В.П., 2011]. Атеросклероз является мультифокальным заболеванием, поэтому, в большинстве случаев, поражение не ограничивается одним сосудистым бассейном. По частоте и медико-социальной значимости на первом месте находится атеросклероз коронарных артерий, а среди сосудов головного мозга чаще и тяжелее изменяются экстракраниальные (сонные) артерии [Карпов Р.С., Дудко В.А., 1998].

Патогенез атеросклероза (атерогенез) представляет собой многофакторный и динамичный процесс. Для объяснения феномена атерогенеза было выдвинуто большое множество теорий и гипотез, из которых в настоящее время доминируют и взаимно дополняют друг друга две: «ответ на повреждение» и липидно-инфильтрационная гипотеза [Дзизинский А.А., 1997; Аронов Д.М., Лупанов В.П., 2011]. Значительный вклад в развитие атеросклероза как многофакторного заболевания вносит генетическая компонента [Дзизинский А.А., Пузырев В.П., 1977; Lusis A.J., 2012]. В постгеномную эру достигнуты определенные успехи в идентификации локусов, ассоциированных с атеросклеротическим поражением артерий различной локализации. В то же время, существенная доля «недостающей наследуемости» остается невыясненной [Eichler E.E. et al., 2010].

Один из подходов в решении данного вопроса заключается в изучении эпигенетических модификаций генома в тканях при патологии. Эпигенетика – наука о наследуемых свойствах организма, которые не связаны с изменением собственно нуклеотидной последовательности ДНК и могут быть не прямо, а опосредованно закодированы в геноме [Ванюшин Б.Ф., 2013]. Основные эпигенетические изменения генома у млекопитающих включают метилирование ДНК, посттрансляционные модификации гистоновых хвостов (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и другие), ремоделирование хроматина и РНК-опосредованные механизмы, которые вызывают изменения в структуре хроматина [Khalil С.А., 2014].

Метилирование ДНК представляет собой ферментативный процесс ковалентного присоединения метильных групп к пятому атому углерода остатков цитозина, входящих в состав CpG-динуклеотидов (CpG-сайтов). Данная эпигенетическая модификация достаточно стабильна и относительно легко может быть оценена с помощью существующих технологий. В соматических клетках метилирование ДНК ответственно за поддержание и реализацию таких фундаментальных биологических процессов, как инактивация X-хромосомы, геномный импринтинг, регуляция тканеспецифичной экспрессии генов, репрессия ретротранспозонов в геноме [Лебедев И.Н., 2006].

В настоящее время известно, что некоторые из локусов генома обладают свойством сохранять относительно стабильный уровень метилирования на протяжении достаточно продолжительного времени наблюдения, и более того, их статус метилирования коррелирует с наличием ряда клинических признаков, значимых для развития многофакторной патологии [Feinberg A.P., 2010a; Paul D.S., Beck S., 2014]. В связи с этим, предполагается, что эпигенетический полиморфизм, наряду со структурным, может являться еще одним из значимых факторов риска многофакторных заболеваний.

Одним из ключевых свойств эпигенетических феноменов является их тканеспецифичность. В связи с этим, принципиальным вопросом предстоящих исследований является выяснение специфичности и универсальности эпигенетических модификаций генома в тканях органов-мишеней заболеваний по сравнению с периферической кровью. Основанием для существования таких корреляций могут быть появляющиеся в литературе данные о наличии эпигенетического полиморфизма в различных тканях организма [Yuen R.K., Robinson W.P., 2011; Feinberg A.P., 2010a].

Эпигенетика представляет собой важное связующее звено между хранящейся в геноме информацией и влиянием факторов среды при формировании различных промежуточных и конечных патологических фенотипов, включая сердечно-сосудистую систему. Помимо этого, факторы риска и биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний тесно взаимосвязаны с эпигенетическими паттернами [Vaccarelli A. et al., 2010].

Степень научной разработанности темы исследования

Экспериментальные работы, направленные на изучение вариабельности метилирования ДНК при атеросклерозе, немногочисленны. Исследования модельных животных и культур клеток *in vitro*, показали, что в атеросклеротических бляшках регистрируется как глобальное гипометилирование ДНК, так и гиперметилирование промоторных регионов генов одновременно, которое коррелирует с изменением их транскрипционной активности [Turunen M.P. et al., 2009].

В ранних работах, проведенных при обследовании больных с атеросклерозом, использовался относительно легкодоступный биологический материал – лейкоциты периферической крови. Результаты данных исследований противоречивы [Castro R. et al., 2003; Sharma P. et al., 2008]. Анализ вариабельности метилирования ДНК в тканях сосудистой стенки, как пораженных патологическим процессом, так и «здоровых», осуществлялся лишь для небольшого количества генов-кандидатов

[Post W.S. et al., 1999; Hiltunen M.O. et al., 2002; Zhu S. et al., 2005; Kim J. et al., 2007; Zawadzki C. et al., 2009].

Основываясь на опыте проведения широкогеномных исследований ассоциаций (GWAS), одним из закономерных этапов в отношении многофакторных заболеваний является проведение эпигеномных исследований ассоциаций (EWAS) [Rakyan V.K. et al., 2011]. Решение такой задачи становится возможным с использованием современных методов высокопроизводительного анализа генома (микрочиповой технологии и массового параллельного секвенирования), обеспечивающих проведение скрининга одновременно большого количества CpG-сайтов, которые, в дальнейшем, можно будет анализировать более детально. Относительно недавно такой подход был применен для изучения варибельности уровня метилирования ДНК при атеросклерозе [Castillo-Diaz S.A., 2010; Назаренко М.С. и др., 2011; Zaina S. et al., 2014; Yamada Y. et al., 2014; Wang Z. et al., 2014; Aavik E. et al., 2014].

Таким образом, возрастающий интерес исследователей к изучению особенностей метилирования ДНК при атеросклеротическом поражении артерий у человека указывает на высокую актуальность данной проблемы. При этом данные об уровне и спектре дифференциально метилированных генов между тканями сосудистой стенки и лейкоцитами периферической крови у больных атеросклерозом противоречивы, а число таких работ ограничено.

Цель исследования

Оценить профиль метилирования ДНК в клетках сосудистой стенки различной локализации и лейкоцитах периферической крови у больных с мультифокальным атеросклерозом.

Задачи исследования

1. Провести сравнительный анализ уровня метилирования отдельных CpG-сайтов широкого спектра генов в атеросклеротических бляшках правых коронарных и сонных артерий, макроскопически неизмененных сонных и внутренних грудных артерий, больших подкожных венах нижних конечностей, лейкоцитах периферической крови у больных с мультифокальным атеросклерозом.
2. Выявить и охарактеризовать спектр дифференциально метилированных генов между атеросклеротическими бляшками и непораженными тканями артериальной стенки.
3. Выявить и охарактеризовать спектр дифференциально метилированных генов между различными участками сосудистого русла, используемыми в качестве трансплантатов при коронарном шунтировании.
4. Сопоставить уровни метилирования отдельных CpG-сайтов генов-кандидатов в клетках сосудистой стенки различной локализации и лейкоцитах периферической крови у больных с мультифокальным атеросклерозом.

Научная новизна

В результате исследования впервые выявлены особенности профиля метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках правых коронарных и сонных артерий, макроскопически неизмененных сонных и внутренних грудных артерий, больших подкожных венах нижних конечностей, лейкоцитах периферической крови у больных с мультифокальным атеросклерозом. С помощью широкогеномного анализа уровня метилирования 27373 CpG-сайтов, локализованных в 14425 генах, установлено, что клетки сосудистой стенки и лейкоциты периферической крови сильно существенно различаются по профилю метилирования ДНК, в то же время атеросклеротические бляшки и макроскопически неизмененные сонные артерии близки друг к другу по профилю метилирования ДНК.

Сравнительный анализ уровня метилирования ДНК между атеросклеротическими бляшками и непораженными тканями артериальной стенки позволил идентифицировать новые гены, вовлеченные в сигнальные и метаболические пути при атеросклерозе, а также подтвердить на эпигенетическом уровне функциональную значимость ряда генов, рассматриваемых ранее в качестве генов-кандидатов, в развитии данного заболевания. Впервые получены данные о вариабельности метилирования генов *HOXD4 (MIR10B)*, *PEG1/MEST* и *AATK* в клетках сосудистой стенки различной локализации и лейкоцитах периферической крови у больных с мультифокальным атеросклерозом.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в ходе выполнения настоящего исследования новые знания расширяют представления о вариабельности уровня метилирования ДНК в клетках сосудов и лейкоцитах периферической крови у больных с мультифокальным атеросклерозом. Обнаруженное в работе сходство уровней метилирования некоторых локусов генома в клетках атеросклеротических бляшек артерий и лейкоцитов периферической крови создает основу для их более детального изучения.

Сформированный в результате исследования список генов, различающихся по уровню метилирования в клетках сосудистой стенки различной локализации, представляет особый интерес для дальнейшего изучения на предмет выделения потенциальных эпигенетических биомаркеров для оценки риска развития заболевания и прогноза эффективности аутотрансплантатов при коронарном шунтировании. Результаты настоящей работы используются в педагогическом процессе для формирования расширенного представления о генетике многофакторных заболеваний у студентов ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и в последипломном образовании врачей.

Методологическая основа диссертационного исследования

В работе использованы современные методы клинического и параклинического обследования, а также молекулярно-генетического и статистического анализа.

Молекулярно-генетические методы включали бисульфитную модификацию ДНК, ПЦР, гибридизацию на биологических микрочипах, пиросеквенирование. За время выполнения диссертационной работы был освоен и использован широкий спектр методов биоинформационного и статистического анализа данных, полученных с помощью биологических микрочипов, в программной статистической среде «R/Bioconductor».

Положения, выносимые на защиту

1. У больных мультифокальным атеросклерозом наиболее существенные различия профиля метилирования ДНК характерны для клеток сосудистой стенки различной локализации и степени поражения атеросклерозом по сравнению с лейкоцитами периферической крови. В то же время атеросклеротические бляшки и макроскопически неизмененные сонные артерии являются относительно близкими по профилю метилирования ДНК.

2. Гены с измененным уровнем метилирования в клетках атеросклеротических бляшек коронарных и сонных артерий относительно внутренних грудных артерий вовлечены в широкий спектр биологических процессов: регуляцию иммунного ответа, воспаление, апоптоз, клеточный ответ на различные стимулы (в том числе липиды), дифференцировку клеток и морфогенез.

3. Процессы, связанные с развитием организма, являются доминирующей категорией биологических процессов, в которую входят дифференциально метилированные гены в различных участках сосудистого русла, используемых в качестве трансплантатов при коронарном шунтировании.

4. Для тканей сосудистой стенки различной локализации и лейкоцитов периферической крови больных с мультифокальным атеросклерозом характерны разные уровни метилирования отдельных CpG-сайтов, входящих в состав гомеобоксного гена *HOXD4* и микроРНК *MIR10B*, а также генов мезодерм-специфичного транскрипта (*PEG1/MEST*) и апоптоз-ассоциированной тирозинкиназы (*AATK*).

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается достаточно большой по объему выборкой (всего было исследовано около 200 образцов тканей), применением современных методов исследования (гибридизация на биологических микрочипах, пиросеквенирование, биоинформационный анализ полученных данных). Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Цель и задачи, поставленные в работе, достигнуты.

Личное участие автора

Основные результаты настоящего исследования получены автором самостоятельно. Изучение литературы по теме диссертации, экспериментальная работа, анализ и статистическая обработка собственных результатов, а также написание диссертации выполнено лично автором.

Апробация материалов диссертации

Основные результаты исследования по теме диссертационной работы были представлены и обсуждены на Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии» (Томск, 2013); Международной конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 2013); научной конференции «Мутагенез и его роль в различных проблемах генетики человека», посвященная памяти доктора медицинских наук,

профессора, академика РАМН Николая Павловича Бочкова (Москва, 2013); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014» (Москва, 2014); Международной конференции «The European Human Genetics Conference 2014» (Милан, Италия, 2014); VI съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Ростов-на-Дону, 2014); Международном симпозиуме «Human Genetics» (Новосибирск 2014); X научной конференции «Генетика человека и патология. Проблемы эволюционной медицины» (Томск, 2014); VII съезде Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015); межлабораторном семинаре ФГБНУ «НИИ медицинской генетики» (Томск, 2015).

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 17 научных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах (из них – 5 в журналах, рекомендованных ВАК РФ), 1 статья в сборнике, 10 тезисов в материалах отечественных и зарубежных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 187 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования с обсуждением), заключение, выводы, список литературы, а также приложения. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 16 таблицами. Библиография включает 180 литературных источников, из них 26 источников отечественной и 154 источника зарубежной литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Атеросклероз как основной компонент сердечно-сосудистых заболеваний

По определению Всемирной организации здравоохранения, атеросклероз – это изменения внутренней оболочки артерий (интимы), включающие накопление липидов, сложных углеводов, фиброзной ткани, компонентов крови, отложение солей кальция и сопутствующие изменения средней оболочки (медии) в артериальной стенке [Glagov S. et al., 1990]. Такое определение весьма оправдано и характеризует основные патоморфологические изменения артерий. Более содержательное определение дается в учебнике по патофизиологии: «атеросклероз – это хроническое прогрессирующее заболевание крупных и средних эластических и мышечно-эластических артерий (но не артериол), характеризующееся пролиферативно-синтетическим ответом ряда клеток сосудистой стенки и крови – гладкомышечных клеток (ГМК), макрофагов, тромбоцитов, фибробластов – на патологические (качественно своеобразные и/или количественно избыточные) липопротеиды, с формированием в интима атером (фиброзно-липидных бляшек). Атерома приводит к извращению реакции поврежденного сосуда на вазомоторные стимулы и, как следствие, ишемическому поражению органов» [Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 2007].

Атеросклероз связан с поражением определенных артерий крупного и среднего калибра. По частоте и медико-социальной значимости на первом месте находится атеросклероз коронарных артерий. Среди сосудов головного мозга чаще и тяжелее изменяются экстракраниальные (сонные) артерии. Магистральные артерии нижних конечностей, в частности – ветви брюшной аорты, по частоте атеросклеротического поражения занимают третье место [Карпов Р.С., Дудко В.А., 1998].

Атеросклеротическое изменение артерий обычно развивается постепенно и бессимптомно в течение нескольких десятилетий жизни. Клинические проявления зависят от локализации и степени атеросклеротического поражения (рис. 1).

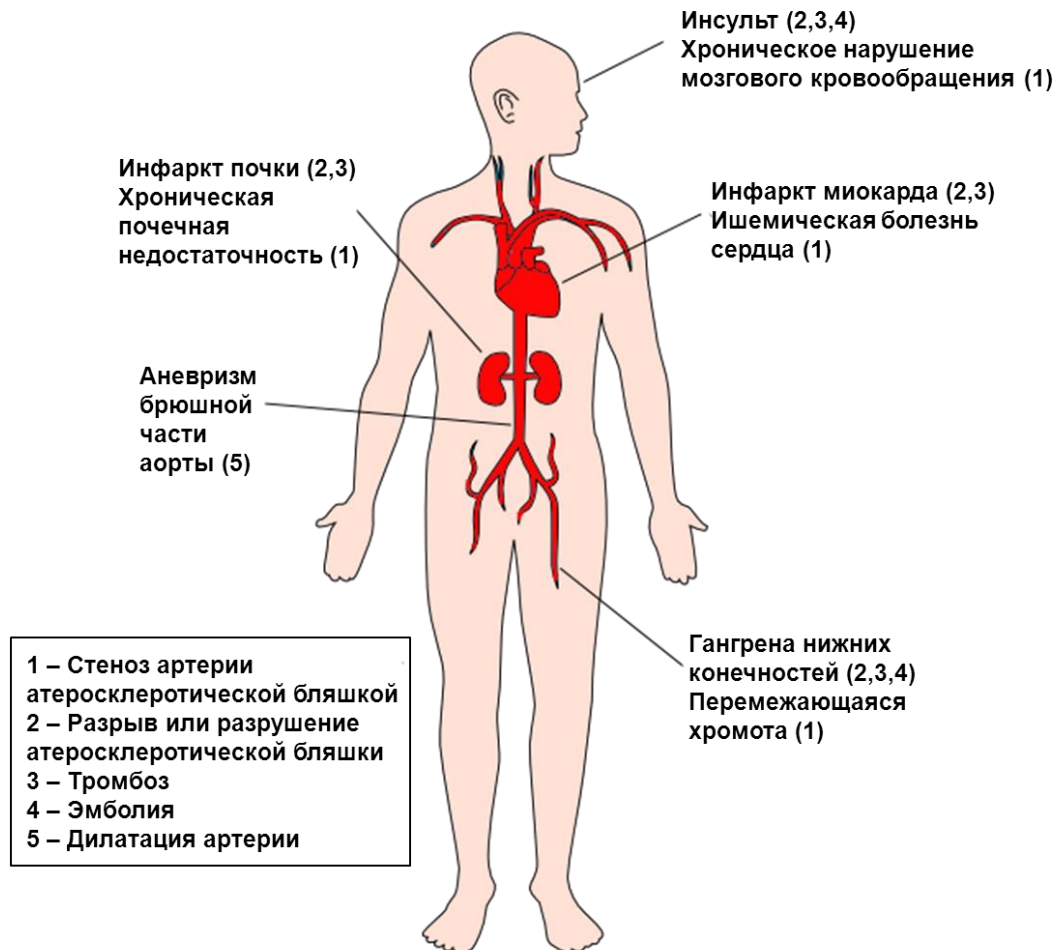


Рисунок 1. Основные клинические проявления атеросклероза.

Разрыв атеросклеротической бляшки, который сопровождается тромбозом и спазмом артерии, приводит к острой окклюзии сосуда и ишемическому некрозу (инфаркту) в органах-мишенях. Клинически это проявляется инфарктом миокарда, инсультом, инфарктом почки, гангреной нижних конечностей. При разрушении (эрозии) атеросклеротической бляшки возможно образование эмболов, что также приводит к острым сосудистым событиям. С другой стороны, постепенный и неполный стеноз артерии приводит к хронической ишемии органов, находящихся в зоне

кровоснабжения данного сосуда. В результате наблюдается ишемическая болезнь сердца (ИБС), хроническое нарушение мозгового кровообращения, хроническая почечная недостаточность, перемежающаяся хромота. На поздних стадиях патологического процесса в области атеросклеротической бляшки происходит атрофия эластической ткани и дилатация артерии с формированием аневризмы [Карпов Р.С., Дудко В.А., 1998].

В большинстве случаев патологический процесс захватывает несколько сосудистых бассейнов. При обследовании свыше 1802 индивидов в возрасте 60-102 года показано, что у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий в 32% случаев был ишемический инсульт и 26% – недостаточность кровообращения нижних конечностей [Ness J., Aronow W.S., 1999]. У больных с ишемическим инсультом диагностировался атеросклероз коронарных артерий и нижних конечностей в 56% и 28%, соответственно. В то же время, больные с недостаточностью кровообращения нижних конечностей имели атеросклероз коронарных (68%) и сонных артерий (42%). Несмотря на мультифокальность патологии, некоторые артерии (например, внутренние грудные) являются резистентными к атеросклеротическому поражению.

Согласно современным представлениям, атеросклероз является многофакторным заболеванием в предрасположенность и интенсивность развития которого вносят вклад разнообразные факторы. Факторы риска атеросклеротического поражения артерий можно разделить на неизменяемые (генетическая предрасположенность, мужской пол, возраст старше 50 лет) и изменяемые (артериальная гипертензия, сахарный диабет 2 типа, дислипидемия, ожирение, инфекции, гиподинамия, курение и т.п.). Следует отметить, что чем больше факторов риска воздействует на человека, тем выше вероятность развития у него атеросклероза и связанных с ним клинических проявлений [Ройтберг Г., Струтынский А., 2007].

Таким образом, проблема атеросклероза привлекает внимание, как практической медицины, так и научного сообщества, поскольку ее решение

тесно связано с профилактикой целого ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы.

1.2. Морфология нормальной и пораженной атеросклерозом артерии

Для понимания патологических процессов, происходящих в стенке артерий при атеросклерозе, необходимо напомнить об особенностях нормального строения и функционирования сосудов этого типа. В стенке артерий выделяются три слоя: внутренняя оболочка (*tunica intima*, интима), средняя (*tunica media*, медиа) и наружная (*tunica adventitia*, адвентиция), разделенные между собой эластическими мембранами (пластинами) [Гистология... под ред. Улумбекова Э.Г., Чельшева Ю.А., 2009].

Поверхность интимы выстлана пластом находящихся на базальной мембране плоских эндотелиальных клеток (ЭК). Под эндотелием расположен слой рыхлой волокнистой соединительной ткани (субэндотелиальный слой, или слой Лангханса). Эндотелиальные клетки имеют общее эмбриональное происхождение, однако в процессе развития приобретают свойства, специфические для каждого участка сосудистого русла, под действием факторов окружения и связанных с ними эпигенетических изменений [Libby P., 2012]. Помимо контроля проницаемости артериальной стенки (барьерной функции) эндотелий управляет рядом физиологических процессов и выполняет гемодинамическую, гемостатическую, и эндокринную функции, а также участвует в воспалении. Эндотелий контролирует кровоток через секрецию медиаторов, регулирующих тонус сосудов и реологические свойства крови. Секретируемые им вазоактивные молекулы включают вазодилататоры: оксид азота (NO) и простаглицлин – и вазоконстрикторы: эндотелин-1 (ET-1) и фактор активации тромбоцитов (PAF) [Cines D.V. et al., 1998]. Молекулы NO и ET-1 считаются наиболее сильными регуляторами сосудистого тонуса [Poredos P., 2001]. Кроме того, NO обладает протективным эффектом в отношении повреждений сосуда,

воспаления и тромбоза, он ингибирует адгезию лейкоцитов, а также адгезию и агрегацию тромбоцитов. Эндотелий создает антитромботическую поверхность и ограничивает локальный тромбоз, секретирруя молекулы активатора тканевого плазминогена, гепарина и тромбомодулина. Кроме того, ЭК экспрессируют поверхностные молекулы, которые участвуют в переносе и хемотаксисе клеток крови. Молекулы клеточной поверхности эндотелиоцитов направляют миграцию (интравазацию) лейкоцитов в физиологических и патологических процессах [Cines D.V. et al., 1998; Cullen P. et al., 2005]. Интима артерий человека, в отличие от лабораторных животных, используемых в качестве экспериментальной модели атеросклероза, содержит собственные резидентные ГМК [Libby P. et al., 2011].

Следует также отметить роль межклеточного (внеклеточного) матрикса кровеносных сосудов. Он состоит из коллагеновых и эластических волокон, протеогликанов, солей гиалуроновой кислоты, гликопротеинов и воды, которые поддерживают структуру сосудистой стенки и образуют биомеханически активный каркас [Wight T.N., 2005]. Внеклеточный матрикс подвергается модификации макрофагами и ГМК через секрецию последними как компонентов матрикса (коллагена), так и различных молекул деградации матрикса – протеолитических ферментов (металлопротеиназ) и факторов клеточного роста [Libby P., 2002; George S.J., Lyon C., 2010]. Изменение композиции протеогликанов внеклеточного матрикса влияет на проницаемость сосудов и стимулирует связывание липопротеидов низкой плотности (ЛНП) компонентами матрикса [Williams, 1998].

Средняя оболочка артерий состоит из двух основных элементов: ГМК, расположенных в виде полой спирали, и эластических волокон, расположенных в основном спирально, радиально, и дугообразно. Медия аорты и легочных артерий (сосудов эластического типа) состоит в основном из 50-70 рядов эластических окончатых мембран, связанных между собой эластическими волокнами, и отдельных ГМК. По мере уменьшения диаметра

сосудов (смешанного, а затем мышечного типа) содержание в меди эластических элементов уменьшается, а гладкомышечных, наоборот, увеличивается. Средняя оболочка сосудов мышечного типа (большинство артерий) содержит 10-40 плотно упакованных слоёв ГМК, наружная эластическая мембрана выражена слабо, либо отсутствует. В отличие от эндотелия, ГМК различных регионов сосудистого русла происходят из разных эмбриональных зачатков [Libby P., 2012]. Необходимо отметить, что ГМК сосудистой стенки многофункциональны. Они являются основным типом клеток, синтезирующих компоненты межклеточного матрикса: коллаген, эластические волокна и протеогликаны [Wight T.N., 2005]. В экспериментах было показано, что в ответ на повреждение артериальная стенка реагирует пролиферацией ГМК медиального слоя и миграцией части ГМК в субэндотелиальное пространство, где эти клетки участвуют в репарации артериальной стенки [Cullen P. et al., 2005].

Внешняя (адвентициальная оболочка) образована волокнистой соединительной тканью с сетью кровеносных сосудов (*vasa vasorum*) и сопровождающими их нервными волокнами (*nervi vasorum*). Собственные сосуды адвентиции питают только саму адвентицию и наружную часть меди. Интима и внутренняя треть меди не содержат капилляров. Питание этих слоев осуществляется за счет того, что через артериальную стенку в направлении адвентиции осуществляется постоянный, хотя и медленный, ток плазмы крови вместе с макромолекулярными соединениями, в том числе липопротеинами [Гистология... под ред. Улумбекова Э.Г., Чельшева Ю.А., 2009].

После обобщения имеющихся в мире данных о формировании атеросклеротического очага было сформулировано наиболее полное представление о шести последовательных стадиях развития (типах) атеросклеротической бляшки (рис. 2) [Stary H.C. et al., 1995; Fruchart J.C., 2003].

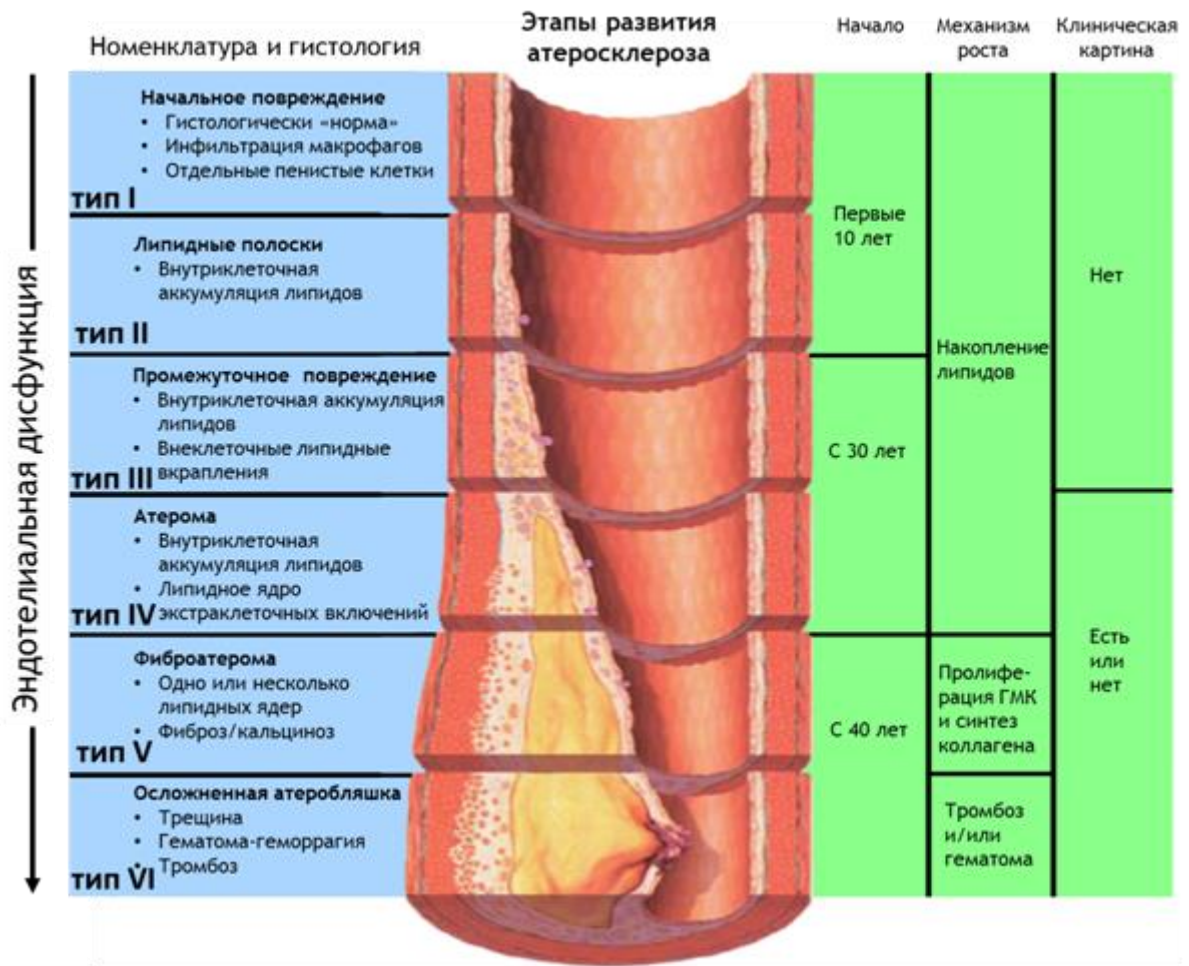


Рисунок 2. Этапы развития атеросклеротических поражений артерий.

При начальном повреждении (тип I) обнаруживаются повышенное число макрофагов и рассеянные пенистые клетки. Эти изменения нередко определяются в раннем детском возрасте и обычно более заметны в местах так называемого адаптивного утолщения интимы, подвергающихся более интенсивному механическому воздействию. Повреждения типа II (липидные пятна и полосы) являются сочетанием отложений пенистых клеток и нагруженных липидами гладкомышечных клеток. Липидные пятна представляют собой участки желтоватого цвета небольших размеров в интимае аорты или крупных артерий, которые наблюдаются с раннего детства. У детей старшего возраста липоидоз артерий встречается чаще и становится более интенсивным и распространенным. В возрасте 10 лет липидные пятна занимают около 10% интимы аорты, а к 25 годам – от 30 до 50%. В коронарных артериях липоидоз встречается с 10-15 лет, в артериях

мозга – к 35-45 годам. [Рагино Ю.И. и др., 2011]. Тип III – промежуточный между типом II и IV. В добавление к клеткам, нагруженным липидами, как при типе II, повреждения сосудистой стенки типа III содержат рассеянные внеклеточные липидные вкрапления и нарушения целостности интимы. Эти образования являются ближайшим предшественником более крупных внеклеточных включений, сливающихся в большое липидное ядро атеросклеротического повреждения IV типа, – собственно атеромы, которой часто сопутствует клиническая симптоматика. Начиная с четвертой декады жизни атеросклеротические образования, имеющие липидное ядро, могут также содержать толстые слои фиброзной соединительной ткани (повреждения V типа) и/или трещины, гематомы и внутренние тромбы (VI тип). Некоторые повреждения V типа сильно кальцифицированы (тип Vb), а некоторые состоят, преимущественно, из фиброзной соединительной ткани – тип Vc. Повреждения VI типа также могут подразделяться на подтипы – VIa при наличии трещины, VIb – при геморрагии и VIc – при развитии тромба. Комбинацию всех указанных признаков патологии рассматривают как повреждение типа VIabc [Stary H.C., 1992; Stary H.C. et al., 1995].

1.3 Основные теории возникновения атеросклероза

Все существующие теории и гипотезы атерогенеза укладываются в рамках двух концепций [Карпов Р.С., Дудко В.А., 1998]. Согласно одной из них патологическое начало атеросклероза «вносится» в артериальную стенку из крови. Примерами могут служить следующие теории: холестериновая или инфильтративно-комбинационная (количественные и качественные изменения липопротеидов крови и инфильтрация холестерином стенки артерий), тромбогенная (нарушения в свертывающей системе крови вызывают локальный тромбоз и формирование атеросклеротической бляшки), паразитарная (поражение сосудистой стенки как результат инфицирования вирусами, хламидиями или другими бактериями) и, отчасти,

нейроэндокринная (нарушение нейроэндокринного контроля состояния кровеносных сосудов) [Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 2007]. Другая концепция придает ведущее значение непосредственно патологическим изменениям в структурных компонентах артериальной стенки как первопричине развития атеросклероза. Под данную концепцию подходят теория «ответа на повреждение» (дисфункция эндотелия вследствие различных причин), аутоиммунная и воспалительная (нарушение функции иммунокомпетентных клеток), моноклональная (возникновение патологического клона гладкомышечных клеток), лизосомальная (нарушение функции лизосом), мутационная (накопление мутаций в клетках сосудистой стенки) теории [Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 2007].

Холестериновая теория атерогенеза, предложенная на основании экспериментальных исследований Н.Н. Аничкова и С.С. Халатова в начале прошлого столетия, выдержала испытание временем и удерживает прочные позиции в ряду других гипотез развития атеросклероза [Климов А.Н., Никульчева Н.Г., 1995]. Согласно данной теории первоочередная роль отводится инфильтрации холестерином бессосудистой зоны артерии (интима и внутренняя треть медики), которая при недостаточности дренажной функции собственных кровеносных и лимфатических сосудов приводит к липоидозу и ответной реакции на него [Аничков Н.Н., 1935; Халатов С.С., 1946].

Источником холестерина для клеток и тканей организма, в том числе и кровеносных сосудов, являются в первую очередь β -липопротеиды, содержащие апо В и включающие липопротеиды низкой плотности (ЛНП) и, в меньшей степени, липопротеиды очень низкой плотности (ЛОНП) и липопротеиды промежуточной плотности (ЛПП). Их избыток ассоциирован с высоким риском развития атеросклероза, поэтому данные липопротеиды считаются атерогенными. Липопротеиды высокой плотности (ЛВП, α -липопротеиды) представляют собой гетерогенную группу частиц с относительно малым содержанием холестерина, участвующих в его

«обратном транспорте» из клеток артерий в печень. Снижение фракции ЛВП в общем пуле липопротеидов крови также часто наблюдается у больных атеросклерозом, поэтому считается, что они обладают антиатерогенным эффектом [Гуревич В.С. и др., 2012]. Сохранение определенного баланса холестерина в клеточных мембранах, включая мембраны эндотелиальных клеток (ЭК), определяется соотношением атерогенных (ЛОНП и ЛНП) и антиатерогенных (ЛВП) липопротеидов. Липопротеиды являются также важной транспортной формой триацилглицеридов, обеспечивающих периферические ткани необходимым количеством свободных жирных кислот. В условиях стресса содержание богатых триацилглицеридами липопротеидов крови значительно увеличивается [Панин Л.Е., 2005]. У лиц с высокой физической активностью это не приводит к негативным последствиям. Хиломикроны и ЛОНП под влиянием липопротеидлипазы трансформируются в ЛВП. Это восстанавливает баланс холестерина в сердечно-сосудистой системе. У лиц, находящихся в состоянии гиподинамии или регулярно испытывающих эмоциональное напряжение, активность липопротеидлипазы низкая. У них трансформация ЛОНП идет, главным образом, с образованием ЛНП. Это нарушает баланс холестерина в сосудистой системе, и он начинает накапливаться главным образом в сосудах эластического типа. Данный процесс может усугубляться в связи с тем, что происходит модификация ЛНП. Это может быть окислительная модификация, ацетилирование, метилирование, гликозилирование (при сахарном диабете), образование аутоиммунных комплексов и другие модификации [Панин Л.Е., 2006].

Еще одной из общепринятых теорий патогенеза атеросклероза, согласующейся с экспериментальными данными, является предложенная в 1976 году R. Ross и соавт. гипотеза «ответа на повреждение» [Ross R. et al., 1977]. В соответствии с этой гипотезой эндотелиальные клетки, выстилающие внутреннюю оболочку, подвержены повторным или длительным воздействиям, которые нарушают их целостность. Прямое

механическое повреждение эндотелия (например, денудация ЭК) первоначально рассматривалось как фактор запуска атеросклеротического процесса, но впоследствии накапливаемые научные факты позволили отметить высокую значимость в инициации бляшки и таких патологических феноменов, как эндотелиальная дисфункция и окислительный стресс [Коноплева Л.Ф., 2011; Poredos P., 2001; Falk E., 2006]. При определенных условиях (например, при взаимодействии с клетками крови, стимуляции цитокинами и другими факторами воспаления) эндотелий активируется и увеличивает секрецию прокоагуляционных и провоспалительных факторов, таких, как тканевой фактор, фактор фон Виллебранда, фактор-1 хемотаксиса моноцитов (MCP-1), молекула-1 клеточной адгезии сосудов (VCAM-1), интерлейкины IL-1, IL-6 и IL-18 [Hamburg N.M., Vita J.A., 2005]. Эндотелиальная дисфункция характеризуется специфическим состоянием активации эндотелия и ассоциирована с определенными факторами риска, которые способствуют атерогенному окружению [Cullen P. et al., 2005]. Индукция атерогенного окружения может происходить по различным механизмам в присутствии тех или иных факторов риска. Например, при гиперхолестеролемии стимулируется адгезия лейкоцитов крови на поверхности эндотелия, а окисленные липопротеины и активные формы кислорода (АФК) вызывают его активацию и повреждение. Другой пример - проявление эффекта, антагонистического по отношению к действию эндотелиального оксида азота (NO), со стороны ангиотензина II, высокий уровень которого ассоциирован с артериальной гипертензией [Szmitko, 2003]. Такие факторы риска атеросклероза, как дислипидемия, сахарный диабет, метаболический синдром, курение, воспаление, артериальная гипертензия, интенсифицируют процессы окислительного стресса, который считается основной причиной эндотелиальной дисфункции [Stocker R., Keane J.F., 2005].

В середине 70-х годов много споров возникло вокруг моноклональной теории, предложенной Earl P. и John M. Benditt [Benditt E.P., Benditt J.M.,

1973]. Смысл этой теории заключается в представлении об атеросклерозе как о клональном неопластическом процессе (по типу доброкачественных лейомиом). Каждое очаговое атеросклеротическое поражение происходит из единственной ГМК, которая в результате мутаций вступила на путь пролиферации и образовала популяцию клеток, принимающих участие в поглощении липидов и преобразующихся в пенистые клетки или продукции компонентов межклеточного матрикса. Основу моноклональной теории составляет, тогда еще существующее на уровне гипотезы, представление об инактивированной X-хромосоме [Lyon M.F., 1961]. На раннем этапе эмбрионального развития в клетках женского организма одна из двух X-хромосом подавляется. Поэтому, за исключением ранней стадии эмбриогенеза, потомство клетки имеет ту же активную X-хромосому, что и родительская клетка. Таким образом, ткани взрослого организма имеют мозаичную структуру и состоят из «островков» родственных клеток с активными материнской или отцовской X-хромосомами [Murry C.E., 1997]. Мутагенами, запускающими моноклональную пролиферацию ГМК в атеросклеротической бляшке, по мнению основателей теории, могут быть производные холестерина, экзогенные гетероциклические соединения, а также вирусы.

Таким образом, за более чем вековую историю изучения атеросклероза, было предложено несколько десятков теорий и гипотез, в разной степени информативности объясняющие либо определенные патогенетические стороны, либо отдельные аспекты его этиологии. Однако по отдельности ни одна из теорий не может рассматриваться как всецело объясняющая весь комплекс патологических изменений при атеросклерозе, и только в общей совокупности дополняя одна другую, они лишь начинают формировать основу для построения целостной картины данной патологии.

1.4 Современные представления о патогенезе атеросклероза

С молекулярной точки зрения формирование морфологического субстрата патологии – атеросклеротических бляшек происходит постепенно через ряд событий, в которых участвуют многие клетки (рис. 3).

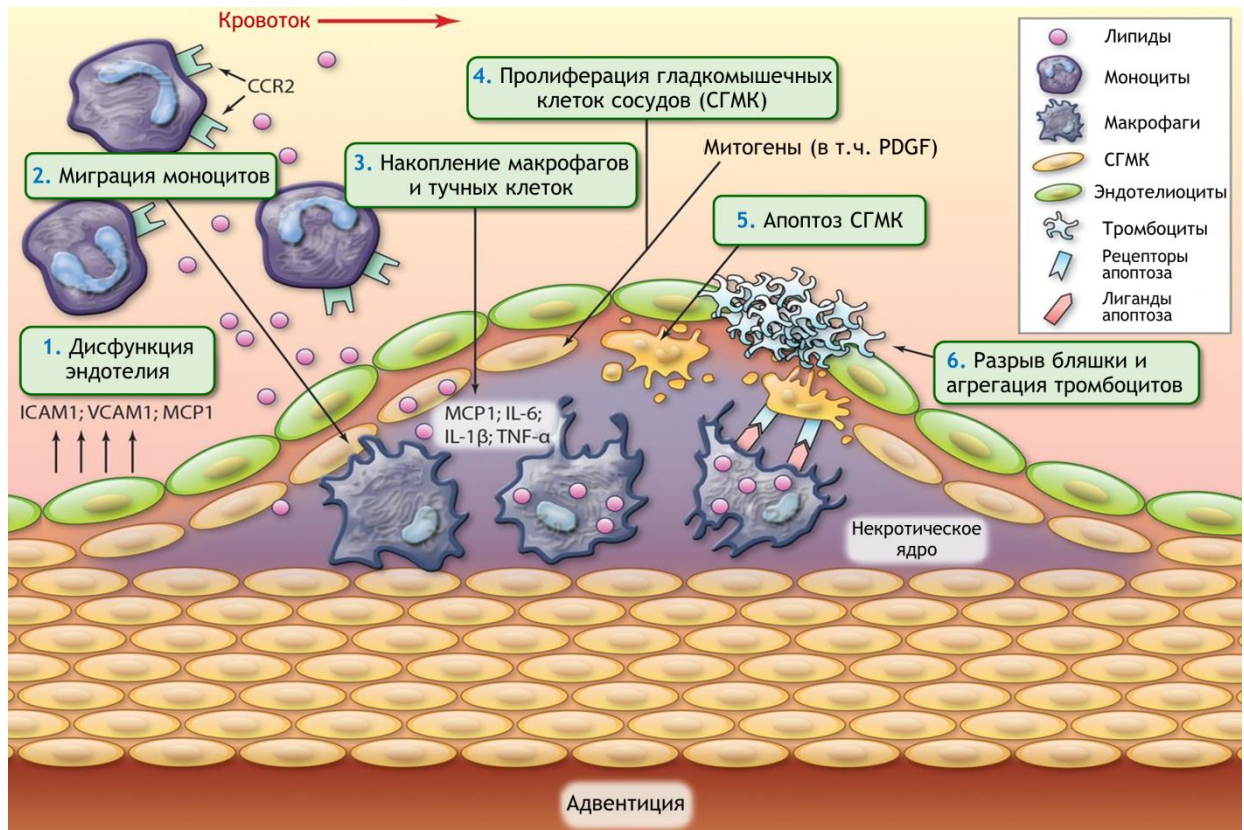


Рисунок 3. Процесс атерогенеза [Wang J.C., Bennett M., 2012]: IL – интерлейкин; $TNF\alpha$ – фактор некроза опухоли альфа; MCP1 – моноцитарный хемоаттрактантный фактор-1; PDGF – фактор роста тромбоцитарного происхождения; ICAM1, VCAM1 – молекулы адгезии; CCR2 – C-C рецептор хемокина 2.

На этапе инициации атеросклеротического процесса имеет место первичное повреждение эндотелия, которое морфологически характеризуется нарушением цитоскелета, ослаблением межклеточных связей, изменением расстояния между клетками, экспозицией субэндотелиальных структур [Stary H.C. et al., 1994]. Причинами этого могут быть интенсивное воздействие на сосудистую стенку пульсовой волны при артериальной

гипертензии, экзогенных и эндогенных химических факторов, в частности метаболитов табачного дыма, катехоламинов, продуктов перекисного окисления и гликозилирования. Важными факторами первичного повреждения эндотелия являются бактериальная и вирусная инфекции и сопутствующие им клеточные и гуморальные иммунные и/или аутоиммунные реакции [Гуревич В.С., 2006].

Под действием первичного повреждения эндотелий экспрессирует цитокины: интерлейкин-1 (IL-1), фактор некроза опухоли (TNF- α), γ -интерферон (IFN- γ); хемокины: моноцитарный хемоаттрактантный фактор (MCP-1), IL-8 и некоторые факторы роста: фактор роста тромбоцитарного происхождения (PDGF), основной фактор роста фибробластов (FGF-2) и другие биологически активные молекулы. [Stary H.C. et al., 1994; Ross R., 1999]. Немаловажным событием является эндотелиальная дисфункция, характеризующаяся, прежде всего, снижением продукции и биодоступности NO в сочетании с повышенным уровнем вазоконстрикторных молекул, таких, как ET-1. Эндотелиальная дисфункция, в свою очередь, препятствует эндотелий-опосредуемой вазодилатации и вызывает провоспалительное, пролиферативное, прооксидативное и прокоагуляционное состояния, которые являются атерогенными. Пониженная экспрессия NO и повышенная экспрессия селектинов, VCAM-1 и молекулы-1 межклеточной адгезии (ICAM-1) способствуют адгезии лейкоцитов с последующей их миграцией в субэндотелиальное пространство, что является одним из ранних событий в атерогенезе. Локальные факторы, такие, как гемодинамическое напряжение сдвига и генетические факторы, также ассоциированы с эндотелиальной дисфункцией и сопутствующей адгезией тромбоцитов и лейкоцитов [Szmitko P.E. et al., 2003; Cullen P. et al., 2005; Hamburg N.M., Vita J.A., 2005; George S.J., Lyon C., 2010].

К участкам эндотелия с повышенной адгезивностью прикрепляются моноциты и Т-лимфоциты, которые мигрируют в субэндотелиальное пространство. Моноциты дифференцируются в макрофаги, которые

захватывают ЛНП и трансформируются, в конечном итоге, в пенистые клетки, составляющие основу так называемых липидных пятен и полосок – начальной фазы атеросклеротического поражения сосуда [Liptay M.J. et al., 1993; Rosenfeld M.E., Ross R., 1990; Ball R. et al., 1995]. Нужно отметить, что пролиферация и накопление макрофагов является характерной особенностью атеросклеротического поражения, которая обнаруживается на любой стадии развития атеросклеротической бляшки и сопровождается появлением пенистых клеток и секрецией сигнальных молекул, цитокинов, медиаторов воспаления, протеолитических ферментов, ростовых факторов, АФК и компонентов межклеточного матрикса. Адгезия макрофагов и их диапедез регулируются хемоаттрактантами, интегринами и молекулами адгезии, секретлируемыми активированными клетками эндотелия (VCAM и ICAM) [Cullen P. et al., 2005; Ross R., 1999; Moore K.J., Tabas I., 2011]. Модифицированные липопротеиды обладают способностью запускать ключевые сигнальные пути воспаления и формирования пенистых клеток. Окисленные ЛНП и MCP-1, продуцируемые ЭК, макрофагами и ГМК, являются сильными хемоаттрактантами [Libby P., 2002].

Компоненты внеклеточного матрикса артерий (например, протеогликаны) могут связываться с ЛНП, способствуя их удержанию в субэндотелиальном пространстве [Williams K.J., Tabas I., 2008]. Повышенный уровень окислительного стресса в артериальной стенке способствует окислению липопротеидов, захваченных макрофагами. Окисленные ЛНП инициируют локальную воспалительную реакцию, сопровождающуюся гибелью ЭК и усугубляющую дисфункцию эндотелия. Модифицированные ЛНП приобретают свойства аутоантигенов и стимулируют аутоиммунные реакции, проявляющиеся на клеточном и гуморальном уровнях. Кроме того, окисленные ЛНП модифицируют реакцию сосудистой стенки на ангиотензин II. Это приводит к нарушению вазодилатации и индуцирует протромботическое состояние, активируя тромбоциты и запуская каскад факторов коагуляции плазмы крови [Erkkila F.T. et al., 2000; Holvoet P.,

Collen D., 1994; Klimov A.N. et al., 1993]. Фиксация модифицированных ЛНП в интима является ключевым триггером ранней аттракции моноцитов и их дифференцировки в макрофаги [Moore K.J., Tabas I., 2011]. Воспаление играет ведущую роль в процессе развития атеросклеротической бляшки и ассоциировано с эффектами многих хорошо изученных факторов риска атеросклероза [Hansson G.K., 2005; Libby P., Hansson G.K., 2011].

Макрофаги экспрессируют несколько типов рецепторов «сбора мусора» (скавенджер-рецепторов), в частности скавенджер-рецепторы типа А (SR-A), В1 (SR-B1) и CD36, которые участвуют в захвате окисленных ЛНП [George S.J., Lyon C., 2010]. Липиды накапливаются в цитоплазме макрофагов, особенно тех, что несут скавенджер-рецептор SR-A, так как его экспрессия, в отличие от обычных ЛНП-рецепторов, не регулируется механизмом отрицательной обратной связи [Moore K.J., Rayner K., 2010]. Макрофаги содержат холестерол в виде сложных эфиров жирных кислот и превращаются в пенистые клетки. Избыток холестерола может удаляться из макрофагов несколькими путями посредством его переноса: 1) в липопротеиды высокой плотности (ЛВП) через рецептор SR-B1; 2) в ApoA1- и ApoE-содержащие липопротеиды (ЛВП) и другие акцепторы холестерола с помощью АТФ-связывающих кассетных переносчиков ABCA1 и ABCG1; 3) «шеддинг» (слущивание) липидных рафтов [Cullen P. et al., 2005; Moore K.J., Tabas I., 2011; Cuchel M et al., 2010]. Таким образом, SR-A проявляет атерогенные свойства, тогда как SR-B1 и другие посредники обратного транспорта холестерола выполняют атеропротективную функцию. Обратный транспорт холестерола является важным звеном в процессе регрессии атеросклеротического поражения в случаях, когда факторы риска по возможности устранены. При продолжительном состоянии перегруженности холестеролом нарушаются адаптационные механизмы макрофагов, и, в итоге, клетки погибают путем некроза, что может привести к высвобождению протеолитических ферментов и медиаторов воспаления, а также аккумуляции внеклеточных липидов и некротических масс. Модифицированные

липопротеиды могут также запускать клеточный апоптоз [Moore K.J., Tabas I., 2011]. Таким образом, данная стадия атеросклероза представляет собой состояние неразрешенного воспаления, при котором макрофаги инфильтрируют атеросклеротическую бляшку, накапливают холестерол и модифицированные липопротеиды и погибают путем апоптоза или некроза, что, в конечном итоге, приводит к образованию некротического ядра атероматозной бляшки.

На следующих этапах атерогенеза происходит миграция ГМК из *tunica media* в интиму сосудов и их трансформация в фибробластподобные клетки с частичной или полной потерей сократительных свойств. В атеросклеротической бляшке наблюдаются процессы дедифференцировки и переключения фенотипа ГМК с сократительного на синтетический, продуцирующий компоненты межклеточного матрикса [Coen M., Vochaton-Piallot M.L., 2010]. Кроме того, ГМК осуществляют фагоцитарную функцию, активно захватывая липопротеиды и, таким образом, наравне с макрофагами пополняя пул пенистых клеток. В структурном тандеме с коллагеновыми и эластическими волокнами, ГМК отграничивают липидное ядро от других тканей и формируют покрывку стабильной атеросклеротической бляшки, отделенную от кровотока эндотелием, – формируется неоинтима [Stary H.C., 1990]. Таким образом, ГМК и продукция ими компонентов межклеточного матрикса поддерживают стабильность атероматозных бляшек, инкапсулируя липидно-некротическое ядро [Schwartz S.M. et al., 2000].

Неустойчивое состояние атеросклеротических бляшек имеет место в результате истончения покрывки из-за прогрессирования воспалительного процесса, увеличения ее внутреннего напряжения за счет роста липидного ядра и наружного напряжения за счет действия пульсовой волны, а иногда вследствие резкой вазодилатации. Основной причиной клинических осложнений атеросклероза является дестабилизация ранимой бляшки, заключающаяся в нарушении целостности ее покрывки и формировании тромба [Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 2007]. Тромбоциты оседают на

поверхности активированного эндотелия и субэндотелиальных структур (при эрозии или разрыве бляшки), а также сами принимают участие в активации эндотелия, секретирова провоспалительные и вазоактивные соединения. Высвобождение молекул адгезии, факторов роста, хемокинов, цитокинов и факторов свертывания усиливает рекрутирование, адгезию и диапедез моноцитов в интиму пораженной артерии [Harper M. et al., 2010]. Кроме того, тромбоциты наравне с макрофагами являются источником важного хемоаттрактанта ГМК – фактора роста тромбоцитов (PDGF) [Wamhoff B.R. et al., 2005]. На поздних стадиях атерогенеза нередко наблюдается отложение солей кальция в атеросклеротических бляшках, подобное процессу кальцификации при остеогенезе. Установлено, что некоторые субпопуляции ГМК могут создавать благоприятствующую для кальцификации среду, активируясь через разные пути сигнального каскада и секретирова цитокиновые молекулы морфогенеза костной ткани, гомологичные фактору TGF- β [Libby P., 2012].

Таким образом, атерогенез представляет собой комплексный процесс, включающий в себя различные молекулярные и клеточные события. Эндотелиальная дисфункция, аккумуляция липидов, продукция реактивных форм кислорода, окисление липопротеинов низкой плотности и воспаление – ранние события атерогенеза. Пролиферация и миграция гладкомышечных клеток, увеличение аккумуляции липидов, сильное воспаление, апоптоз и некроз клеток, ремоделирование сосуда способствуют прогрессии атеросклеротической бляшки. Для поздних стадий патологического процесса характерны ангиогенез, кальцификация, нестабильность бляшки и формирование тромбов. Не вызывает сомнения, что динамика процесса связана с изменениями в паттернах экспрессии тех или иных генов в клетках-участниках, причем эти изменения контролируются слаженной системой эпигенетических механизмов.

1.5. Эпигенетические модификации генома

Термин «эпигенетика» (от греч. «epigenesis», относящегося к эмбриологии и слова «генетика») ввел еще в 40-х годах XX века биолог-эволюционист С. Waddington (1905-1975), подчеркнув тем самым, что генетика и биология развития тесно взаимосвязаны. Он предположил, что не сами гены, а паттерны их экспрессии, образующиеся при «включении» и «выключении» генов, определяют клеточный фенотип, тем самым, связав гены, белковые продукты и их взаимодействие со средой [Barros S.P., Offenbacher S., 2009]. Через несколько лет в бактериальных геномах было впервые описано метилирование ДНК, но только в 1975 году два коллектива исследователей под руководством А. Riggs и R. Holliday независимо друг от друга сделали предположение о том, что 5-метилцитозин может подвергаться дубликации в ходе клеточного деления и регулировать экспрессию мРНК [Baccarelli A. et al., 2010]. Следует отметить пионерскую работу российских ученых под руководством Б.Ф. Ванюшина, опубликованную в 1970 году и сформулировавшую основные представления о метилировании ДНК, как механизме регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки [Ванюшин Б.Ф., 2013]. К этому времени Allfrey и соотр. (1968) показали, что ацетилирование и метилирование гистонов также участвует в контроле экспрессии генов [Baccarelli A. et al., 2010].

Согласно современным представлениям, «эпигенетика – это наука о наследуемых свойствах организма, которые не связаны с изменением собственно нуклеотидной последовательности ДНК и могут быть не прямо, а опосредованно закодированы в геноме» [Ванюшин Б.Ф., 2013]. Эпигенетические механизмы представляют собой гибкие, потенциально обратимые факторы генома, которые способны не только модулировать его функциональные возможности под воздействием внешних факторов, но также обеспечивать передачу состояний генной экспрессии от одного поколения клеток другому. Возможность трансгенерационной передачи

эпигенетических сигналов между индивидами, в особенности aberrантных эпигенетических изменений (эпимутаций), вызванных внешнесредовыми стимулами, является предметом активной дискуссии [Nilsson E.E., Skinner M.K., 2014; McCarrey J.R., 2014].

Эпигенетические механизмы, регулирующие хромосомную организацию и экспрессию генов, включают несколько уровней. Основные формы эпигенетических изменений у млекопитающих представлены метилированием ДНК, модификацией гистоновых хвостов (включая ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, УДФ-рибозилирование и убиквитинирование) и связанными с РНК механизмами (некодирующие РНК и феномен РНК-интерференции), которые вызывают изменения в структуре хроматина [Matouk C.C., Marsden A., 2008]. Важно, что эти изменения обратимы. Открытие механизмов эпигенетической регуляции неизбежно ведет за собой пересмотр определения фенотипа, потому что в настоящее время очевидно, что специфический фенотип клетки определяется не только последовательностью ДНК [Baccarelli A. et al., 2010].

Современная эпигенетика рассматривает доступные для экспериментальной проверки и контроля механизмы влияния факторов окружающей среды (варьирующих от стресса до инфекций) на экспрессию генов. Кроме того, эпигенетические изменения происходят в течение всей жизни организма, начиная с ранних этапов внутриутробного развития, и могут накапливаться в тканях и клетках организма с течением времени, изменяя паттерны экспрессии генов и клеточные фенотипы [Barros S.P., Offenbacher S., 2009]. Перспективным по отношению к широко распространенным заболеваниям (к которым относится атеросклероз и его клинические проявления) является проведение крупномасштабных эпигеномных исследований ассоциации (EWAS), которые, по аналогии с полногеномными исследованиями ассоциации (GWAS), изучают связь эпигенетических маркеров, преимущественно метилирования ДНК, с

патологическими фенотипами [Rakyan V.K. et al., 2011; Paul D.S., Beck S., 2014].

В настоящее время не вызывает сомнения, что большинство хронических заболеваний, в том числе и атеросклероз, является результатом взаимодействия генетических, средовых и эпигенетических факторов. Таким образом, эпигенетика дополняет картину многофакторной природы данной группы болезней. Современные достижения в технологиях эпигеномного профилирования позволяют изучать механизмы, когда факторы окружающей среды воздействуют на геном, приводя к эпигенетическим изменениям экспрессии генов и повышая риск развития патологии. Особенно важным является установление времени возникновения эпигенетических изменений, ассоциированных с болезнью. Они могут происходить до развития заболевания и вносить вклад в патологический фенотип. С другой стороны, эпигенетические изменения могут быть следствием болезни или ее лечения. Этот вопрос может быть решен путем комбинации проспективных эпигенетических исследований с более традиционными методами анализа (например, GWAS). Кроме того, работы в данном направлении все еще ограничены недостаточным пониманием «нормальных» эпигенетических паттернов, характеризующих различные типы клеток и тканей. Каталогизация паттернов эпигенетической вариабельности между клетками и тканями является актуальной и перспективной задачей на современном этапе развития науки [Smith R., Mill J., 2011].

1.5.1 Метилирование ДНК и его биологическая роль

Наиболее изученным эпигенетическим механизмом является метилирование ДНК – ковалентная модификация, которой подвергаются преимущественно остатки цитозина, находящиеся перед остатками гуанина (CpG-динуклеотиды, CpG-сайты) в полинуклеотидной цепи. При этом метильная группа переносится с молекулы S-аденозинметионина (SAM) на

углерод в пятом положении пиримидинового кольца с образованием 5-метилцитозина [Feinberg A.P., 2008]. Интересно, что 5-метилцитозин, известный как «пятое основание» впервые был описан Т. В. Johnson и R. D. Coghil в 1925 году, задолго до открытия двойной спиральной структуры молекулы ДНК [Matouk C.C., Marsden A., 2008].

У млекопитающих формированием паттернов метилирования ДНК *de novo* занимается семейство ферментов, называемых ДНК-метилтрансферазами 3 (DNMT3a и DNMT3b). Нокаут гена *Dnmt3b* несовместим с развитием зародыша, а *Dnmt3a*-дефицитные мышата доживают до 4 недель постнатально, что согласуется с различными сроками работы кодируемых ими ДНК-метиляз [Okano M. et al., 1999]. Данные ферменты различаются по своим функциям, так как только *Dnmt3b* участвует в метилировании центромерных минисателлитных повторов [Law J.A., Jacobsen S.E., 2010]. Некоторые компоненты данных ферментных систем являются общими с ферментным комплексом, участвующим в метилировании гистонов [Moore L.D. et al., 2013].

Поддержание паттернов метилирования ДНК осуществляется посредством работы ДНК-метилтрансферазы 1 (DNMT1), которая является наиболее изученным ферментом системы метилирования ДНК у позвоночных. Гомозиготная делеция гена *Dnmt1* у мышей приводит к летальному исходу на стадии эмбриона [Subramaniam D., 2014]. Именно это наблюдение явилось доказательством необходимости метилирования ДНК у высших эукариот.

Функциональное значение метилирования ДНК заключается в транскрипционной инактивации хроматина, обусловленной надмолекулярными изменениями его компактизации. В соматических клетках метилирование ДНК ответственно за поддержание и реализацию таких фундаментальных биологических процессов, как инактивация X-хромосомы, геномный импринтинг, регуляция тканеспецифичной экспрессии генов, репрессия ретротранспозонов в геноме [Лебедев И.Н. и др., 2006].

Наиболее значимые изменения эпигенетической организации генома происходят при созревании половых клеток и на ранних этапах пре- и постимплантационного развития млекопитающих. Совокупность закономерных и последовательных изменений характера метилирования генома (тотальное деметилирование с последующим метилированием *de novo*) в эти периоды онтогенеза получила название эпигенетического репрограммирования. Первая волна такого репрограммирования начинается в примордиальных половых клетках родителей, вторая волна затрагивает геном соматических клеток после оплодотворения и имплантации эмбриона [Лебедев И.Н., Саженова Е.А., 2008].

Существует несколько механизмов, с помощью которых метилирование ДНК может препятствовать транскрипции. Репрессия генов достигается путем предотвращения связывания транскрипционных факторов (таких, как с-Мус/Мун, AP-2, E2F и ATF/CREB-подобные белки) с их сайтами узнавания из-за метилирования цитозина или посредством «оккупирования» промоторных регионов одним из пяти метил-цитозин распознающих белков: MBD1, MBD2, MBD4, MeCP2 или Kaiso [Matouk S.C., Marsden A., 2008]. Было показано, что при атеросклерозе связывание некоторых транскрипционных факторов, таких, как HIF-1 α , мус и CTCF-инсулятор (CCCTC-связывающий фактор) происходит посредством метилирования ДНК. Установлено, что неметилированное состояние CpG-островков ассоциировано с открытой конфигурацией хроматина, в которой гистоны, формирующие нуклеосому, находятся в ацетилированной форме (транскрипционно компетентный хроматин). Связываясь с метилированным участком ДНК, репрессорный белок индуцирует образование комплекса с белками-корепрессорами, которые взаимодействуют с деацетилазами и подавляют транскрипцию путем деацетилирования гистонов и модификации структуры хроматина [Barros S.P., Offenbacher S., 2009].

В соматических клетках человека метилированные цитозинового основания составляют около 1% от всех других нуклеотидов

последовательности ДНК и, следовательно, затрагивают 70-80% CpG-динуклеотидов в геноме [Bird A., 2002]. Однако в эмбриональных стволовых клетках было обнаружено «не CpG» метилирование [Pinney S.E., 2014]. CpG-динуклеотиды, представленные в 5'-регуляторных районах генов (рядом с промоторной областью) собираются в плотные кластеры, называемые CpG-островками, и сохраняются в неметилированном состоянии. В то время как CpG-островки в интронах генов и повторяющихся элементах ДНК обычно метилированы [Turunen M.P. et al., 2009; Law J.A., Jacobsen S.E., 2010]. Метилирование промоторных CpG-островков ассоциировано в основном с транскрипционной инактивацией (сайленсингом) генов. Долгое время считалось, что метилирование в промоторных областях и CpG-островках имеют существенную функциональную значимость в контроле над генной экспрессией. Однако к настоящему времени установлено, что регионы, расположенные на расстоянии 2 Кб (CpG-берега) и даже 4 Кб (CpG-шельфы) от CpG-островков, имеют более динамическую природу метилирования и наиболее богаты функциональными CpG-сайтами. Между этими регионами располагаются одиночные CpG-сайты, именуемые по аналогии «открытым морем» [Irizarry R.A. et al., 2009; Sandoval J. et al., 2011].

Согласно вводимой в недавних исследованиях EWAS терминологии, CpG-сайты, проявляющие дифференциальное метилирование в сравниваемых группах, называются вариабельно метилированными позициями (MVP – англ. Methylation Variable Position) в геноме. Протяженные участки генома с множеством CpG-сайтов, показывающих разный уровень метилирования в группах сравнения, называются дифференциально метилированными регионами (DMR – англ. Differentially Methylated Region). Они могут быть, например, импринтированными (iDMR), тканеспецифичными (tDMR), репрограммирующими (rDMR), ассоциированными со злокачественными новообразованиями (cDMR) и с возрастом (aDMR). Выделяют также вариабельно метилированные регионы (VMR – англ. Variably Methylated Region), отличающиеся большей

внутренней вариабельностью метилирования между сравниваемыми образцами [Rakyan V.K. et al., 2011].

Уровень метилирования ДНК клеток изменяется в течение жизни индивида. В результате ряда недавних исследований были выявлены и проанализированы связанные с возрастом DMR в когортах относительно здоровых индивидов и в популяционной выборке [Bell J.T. et al., 2012; Florath I. et al., 2013; Horvath S., 2013]. Однако изменение уровня метилирования ДНК происходит и при патологических процессах, которые проявляются с увеличением возраста индивидов, в том числе атеросклерозе, артериальной гипертензии и сахарном диабете 2 типа. [Baccarelli A. et al., 2010].

1.5.2. Метилирование генома при атеросклерозе

Гипотеза об эпигенетической основе атеросклероза впервые высказана Р. Е. Newman в 1999 году. Автор основывался на том, что дефицит фолатов, витаминов В6 и В12 вызывает атеросклероз. Учитывая важную роль данных веществ в генерации S-аденозилметионина (SAM)-донора метильных групп для реакций метилирования, гипометилирование ДНК может быть механизмом, связывающим дефицит витаминов и сердечно-сосудистые заболевания [Newman P.E., 1999]. В дальнейшем экспериментальные модели на животных подтвердили эту гипотезу и показали, что метилирование ДНК играет важную роль в развитии атеросклероза и других сердечно-сосудистых заболеваний. Например, у мышей с дефектом генов, кодирующих ферменты метилирования: DNMT1 или 5,10-метилентетрагидрофолат редуктазу (MTHFR), – показано гипометилирование ДНК. В то же время, в лейкоцитах DNMT-дефицитных мышей обнаружена повышенная экспрессия медиаторов воспаления, а у MTHFR-дефицитных мышей гипометилирование ДНК предшествует образованию жировых полосок в стенке аорты [Makar K.W., Wilson C.B., 2004; Chen Z. et al., 2001]. Недавно было показано, что

активность DNMT1 в эндотелии артерий индуцируется под действием осцилляторного напряжения сдвига, возникающего при турбулентном течении крови в местах бифуркации, резкого сужения и изгиба артерий, в которых чаще всего впоследствии образуется атеросклеротическая бляшка. Таким образом турбулентный кровоток в сонных артериях мышей после частичного лигирования приводил к гиперметилированию промоторов 11 генов (в том числе транскрипционных факторов *HoxA5* и *Klf3*) и изменению экспрессии генов в клетках эндотелия [Dunn J. et al., 2014].

Часть современных работ посвящена изучению уровня метилирования ДНК клеток крови как простого и удобного диагностического инструмента для выявления предшествующих атеросклерозу изменений задолго до клинической манифестации болезни. Однако в литературе существуют некоторые разногласия по поводу изменения уровня метилирования ДНК при сердечно-сосудистых заболеваниях. У пациентов с инсультом и инфарктом миокарда выявлено гипометилирование ДНК в лимфоцитах [Castro R. et al., 2003]. В другой работе, наоборот, больные ИБС имели высокий уровень метилирования ДНК в клетках периферической крови [Sharma P. et al., 2008].

В настоящее время активно обсуждается вопрос участия гипергомоцистеинемии и воспалительных агентов в эпигенетических изменениях генома при атеросклерозе. В частности, у пациентов с инсультом и инфарктом миокарда одновременно с гипометилированием ДНК в лимфоцитах выявлено увеличение концентрации гомоцистеина и S-аденозилгомоцистеина в крови [Castro R. et al., 2003]. В высоких концентрациях гомоцистеин конкурирует с SAM за сайты связывания на ДНК-метилтрансферазах и может стать причиной пассивной потери метилирования в реплицирующейся ДНК [James S.J. et al., 2002]. Воспаление может способствовать гиперметилированию ДНК в лимфоцитах периферической крови, а у пациентов с хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе, биомаркеры

воспалительного процесса были связаны с увеличением смертности [Stenvinkel P. et al., 2007].

Старение и атеросклероз протекают совместно, и иногда трудно разграничить эти два процесса. Гипометилирование ДНК является характерным признаком старения [Wilson V.L., Jones A., 1983], а также некоторых патологических состояний, таких как канцерогенез, гипергомоцистеинемия и шизофрения [Butcher L.M., Beck S., 2008; Lee M.E., Wang H., 1999; Shimabukuro M. et al., 2007]. Гипометилирование ДНК регистрировалось в аорте у *ApoE*^{-/-} мыши еще до появления гистологических признаков атеросклероза [Lund G. et al., 2004]. Кроме того, снижение уровня метилирования ДНК характерно для областей пролиферации ГМК в выраженных атеросклеротических бляшках [Hiltunen M.O. et al., 2002].

1.5.3. Локус-специфическое метилирование ДНК при атеросклерозе

Изменение уровня метилирования может затрагивать отдельные гены (табл. 1). Например, было показано, что интенсивная пролиферация ГМК в пораженной атеросклерозом аорте зависит от фактора PDGF, секретируемого эндотелием в ответ на повышение уровня гомоцистеина в крови. Избыточная продукция PDGF частично зависит от деметилирования промотора соответствующего гена в ответ на гипергомоцистеинемию [Zhang D. et al., 2012a]. Высокий уровень гомоцистеина может вносить вклад в развитие атеросклероза через гидролиз эпоксиэйкозатриеновых кислот под действием повышенного количества эпоксид-гидролазы при гипометилировании ее промотора [Zhang D. et al., 2012b].

Несмотря на то, что гипергомоцистеинемия потенциально снижает метилирование ДНК у больных атеросклерозом, промоторы некоторых генов, например *NOS2*, остаются гиперметилированными [Turunen M.P. et al., 2009].

До недавнего времени в тканях сосудистой стенки у человека *in vivo* оценивался статус метилирования лишь отдельных генов, таких как гены 15-липоксигеназы (*ALOX15*), рецептора эстрогена (*ER α* и *ER β*), транспортера 3 монокарбоксилата (*MCT3*) и ингибитора 2 метаболического пути тканевого фактора (*TFPI2*) [Post W.S. et al., 1999; Hiltunen M.O. et al., 2002; Zhu S. et al., 2005; Kim J. et al., 2007; Zawadzki C. et al., 2009].

В выраженных атеросклеротических бляшках выявлено гипометилирование в 5'-фланкирующем регионе гена *ALOX15*, продукт которого активно экспрессируется при патологическом процессе и контролирует окисление липидов [Hiltunen M.O. et al., 2002].

Повышенное метилирование промоторной области гена *ER α* обнаружено в атеросклеротических бляшках, а также при фенотипической трансформации дифференцированных ГМК в активно пролиферирующие клетки [Post W.S. et al., 1999, Ying A.K. et al., 2000]. Кроме того, в промоторе гена *ER β* также был показан высокий уровень метилирования в клетках, взятых из области атеросклеротической бляшки по сравнению с неизменными участками сосудистой стенки [Kim J. et al., 2007]. Существует стойкая возрастная зависимость в повышении уровня метилирования промотора гена *ER α* . Хотя и очевидно, что *ER α* и *ER β* участвуют в активной пролиферации атероматозных ГМК, точная роль эстрогеновых рецепторов при патологии остается неясной.

Гиперметилирование во 2 экзоне гена *MCT3* выявлено в культуре гладкомышечных клеток и в атеросклеротических бляшках аорты [Zhu S. et al., 2005]. Эпигенетическая инактивация гена ингибитора 2 метаболического пути тканевого фактора (*TFPI-2*), связанная с метилированием CpG-богатых регионов промотора, была обнаружена в атеросклеротических бляшках сонных артерий [Zawadzki, 2009].

Метилирование генов при атеросклерозе

[Turunen M.P. et al., 2009; Napoli C. et al., 2012].

Ген	Метилирование ДНК	Биологический процесс
<i>ALOX15</i>	Гипометилирование промотора гена 15-липноксигеназы в области атеросклеротических бляшек	Окисление липидов
<i>F7</i>	Гипометилирование промотора гена фактора свертывания VII в лимфоцитах у больных атеросклерозом коронарных артерий	Коагуляция
<i>INS</i> <i>GNAS-AS1</i>	Гиперметилирование генов инсулина и GNAS антисмысловой РНК1 в лимфоцитах ассоциировано с риском инфаркта миокарда у женщин	Метаболизм глюкозы, рост плода
<i>NOS3</i>	Гипометилирование гена синтазы оксида азота 3 в эндотелиальных клетках Гиперметилирование гена синтазы оксида азота 3 в гладкомышечных клетках	Дисфункция эндотелия
<i>NOS2</i>	Гиперметилирование промотора гена синтазы оксида азота 2 в эндотелиальных и гладкомышечных клетках	Воспаление
<i>H19/Igh2</i>	Гиперметилирование дифференциально метилированного региона гена <i>H19</i> в аорте у мыши <i>Cbs+/-</i>	?
<i>ERα</i> <i>ERβ</i>	Гиперметилирование промоторной области гена рецептора эстрогена в атеросклеротических бляшках коронарных артерий	Контроль пролиферации клеток
<i>ec-sod</i>	Гипометилирование промотора гена внеклеточной супероксид дисмутазы в атеросклеротических бляшках аорты кролика	Окисление липидов
<i>MMP2</i>	Гиперметилирование промотора гена матриксной металлопротеиназы 2	Ремоделирование внеклеточного матрикса
<i>MMP7</i>	Гиперметилирование промотора гена матриксной металлопротеиназы 7	Ремоделирование внеклеточного матрикса
<i>MMP9</i>	Гиперметилирование промотора гена матриксной металлопротеиназы 9	Ремоделирование внеклеточного матрикса
<i>TIMP3</i>	Гиперметилирование промотора гена тканевого ингибитора 3 матриксной металлопротеиназы	Деградация внеклеточного матрикса
<i>PDGFA</i>	Гиперметилирование промотора гена фактора PDGF	Клеточная пролиферация
<i>MCT3</i>	Гиперметилирование 2 экзона гена транспортера 3 монокарбоксилата в атеросклеротических бляшках аорты	Контроль пролиферации клеток
<i>TFPI2</i>	Гиперметилирование ингибитора 2 метаболического пути тканевого фактора в атеросклеротических бляшках сонных артерий	Коагуляция, фибринолиз, деградация внеклеточного матрикса

Акцент современных исследований в области эпигенетики многофакторных заболеваний смещается в сторону крупномасштабного скрининга многих участков генома с помощью современных технологий массового параллельного секвенирования и анализа на микрочипах. Подобные работы появляются и в отношении сердечно-сосудистой патологии. Одной из первых в этом направлении является работа Feinberg A. P. и сотр. (2010), в которой при анализе 4,5 млн. CpG-сайтов 74 индивидов в возрасте 69-96 лет обнаружили высокую межиндивидуальную вариабельность уровней метилирования ДНК в 227 регионах генома. Половина этих локусов демонстрировала высокую стабильность метилирования на протяжении 11-летнего периода наблюдения. Причем уровень метилирования четырех локусов коррелировал с индексом массы тела – одним из факторов риска атеросклероза [Feinberg A.P., 2010b].

В другой работе Castillo-Diaz S. и сотр. (2010) выполнили анализ статуса метилирования 10367 CpG-островков в тканях коронарных артерий больных с выраженным атеросклерозом и образцах аорты, взятых у здоровых лиц. В контрольных образцах выявлено гиперметилирование 151 (1,4%) CpG-островка, из них в пораженных артериях 142 (94%) были деметилированы, а 17 гиперметилированы. Основные функциональные категории генов, связанные с дифференциально метилированными CpG-островками, представлены транскрипционными (23%) и сигнальными (16%) факторами. Некоторые из них, включая гены семейства *HOX*, *PROX1*, *NOTCH1* и *FOXP1*, принимают участие в регуляции ключевых стадий атерогенеза. Исследователи также показали дифференциальную экспрессию генов, включающих проанализированные CpG-сайты и выявили новые мотивы ДНК, которые могут быть потенциальными регуляторами метилирования данных CpG-сайтов [Castillo-Díaz S.A. et al., 2010].

В России пионерские работы в данном направлении принадлежат коллективу ФГБНУ «НИИМГ». В опубликованной в 2011 году работе с использованием микрочипа на платформе «Illumina GoldenGate Methylation

Cancer Panel I» впервые определен уровень метилирования 1505 CpG-сайтов в 807 генах в образцах атеросклеротических бляшек аорты и сонной артерии человека. Установлено дифференциальное метилирование 103 (7%) CpG-сайтов 90 (11%) генов. Наиболее существенные различия в уровне метилирования ДНК были найдены в импринтированном гене *H19*. Некоторые гены, дифференциальное метилирование которых показано в данной работе (*ICAM1*, *GSTM1*, *IGFBP1*, *POMC*, *APOA1*, *IL1RN*, *INS*, *LTA*, *MMP3*, *THBS2*), были отнесены к генам, предположительно связанным с широким спектром патологий, составляющих сердечно-сосудистый континуум [Назаренко М.С. и др., 2011]. Логично полагать, что эпигенетическая вариабельность таких общих генов может быть важным фактором атеросклеротического процесса и его клинических проявлений.

Наконец, в 2014 году наблюдается новая волна исследований в области крупномасштабного эпигенетического скрининга ДНК в тканях артерий *in vivo* при атеросклерозе. Например, коллектив ученых из Японии провел сравнение уровней метилирования ДНК в изъятых *post mortem* образцах интимы из разных участков аорты (содержащих атеросклеротические бляшки и патологически неизмененных) на микрочиповой платформе «Illumina HumanMethylation450 BeadChip». Установлено гипометилирование 15 CpG-сайтов 14 генов и гиперметилирование 30 CpG-сайтов 22 генов в атеросклеротических бляшках. В результате экспрессионного анализа для некоторых генов (*HEC*, *EBF1*, *NOD2*, *MAP4K4*, *ZEB1* и *FYN*) была доказана функциональная значимость изменения уровня их метилирования [Yamada Y. et al., 2014]. Их коллеги из Китая, используя различные микрочиповые платформы, показали снижение уровней метилирования ДНК, а также экспрессии мРНК и микроРНК в пораженных атеросклерозом коронарных артериях по сравнению с непораженными. Ими были выявлены не только гены, клеточные процессы и сигнальные пути, участие которых в атеросклерозе рассматривалось ранее, но и некоторые новые гены, микроРНК и пути, которые до этого не были изучены при атеросклерозе

(например, *SNTB2* и miR-519d). Они также установили особую роль убиквитин-зависимой системы деградации белков, показав инактивацию протеасом на поздних стадиях атерогенеза [Wang Z. et al., 2014].

Исследователи из Мексики и Испании, сравнивая профили метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках аорты и сонной артерии с таковыми в непораженных тканях аорты, идентифицировали дифференциально метилированные CpG-сайты генов, значимых для ранних стадий атерогенеза и вовлеченных в функционирование эндотелия и ГМК. Кроме того, в результате полногеномного бисульфитного секвенирования ими было установлено, что гиперметилирование в атеросклеротической бляшке происходит по многим локусам генома [Zaina S. et al., 2014]. В другой публикации на том же материале была показана корреляция между гистологическим типом атеросклеротической бляшки и степенью дифференциального метилирования для 1985 CpG-сайтов, большая часть которых подвергалась гиперметилированию по мере прогрессирования артериального поражения. Регуляция экспрессии найденных локусов опосредовалась известными транскрипционными факторами, участвующими в атерогенезе, воспалении и иммунном ответе [Valencia-Morales M.P. et al., 2015].

Финские ученые, также используя технологию массового параллельного секвенирования, сравнили профили метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках из области бедренной артерии и непораженных образцах внутренней грудной артерии, и сравнили с данными экспрессионных микрочипов. Они выяснили, что гипометилирование ДНК преобладает при атеросклерозе, и большая часть дифференциально метилированных генов экспрессируется в атеросклеротических бляшках по сравнению с непораженными артериями. Впервые было показано гипометилирование локуса 14q32, ассоциированное с гиперэкспрессией локализованных в нем генов *RTL* и микроРНК [Aavik E. et al., 2014].

Суммируя вышесказанное можно отметить, что ткани сосудистой стенки, пораженные атеросклерозом, обладают некоторыми особенностями метилирования ДНК в составляющих их клетках. Изучение данных особенностей позволит получить новые сведения об эпигенетической составляющей молекулярной природы атеросклероза и связанных с ним болезней системы кровообращения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования, объем и структура материала

Проведение настоящего исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» (г. Томск). Все пациенты подписали добровольное согласие на участие в эксперименте. Дизайн исследования представлен на рис. 4.



Рисунок 4. Схема проведения диссертационного исследования.

2.2. Клиническая характеристика больных

Формирование выборок и клиническая характеристика (осмотр, сбор анамнеза, жалоб и параклинических данных) больных с мультифокальным

атеросклерозом проходила на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (г. Кемерово). Группа обследованных состояла из 85 мужчин, славян (табл. 2).

Таблица 2

Общая характеристика группы исследования

Показатель	Мужчины с мультифокальным атеросклерозом, n = 85
Возраст, лет [m±SD]	60 ± 7
Индекс массы тела, кг/м ² [m±SD]	25,83 ± 3,91
Курение [абс. (%)]	69 (81%)
Сахарный диабет 2 типа [абс. (%)]	15 (18 %)
Гиперхолестеролемиа в анамнезе [абс. (%)]	67 (79%)
Длительность АГ, лет [m±SD]	11 ± 8
Длительность ИБС, лет [m±SD]	7 ± 6
ХСН [абс. (%)]	76 (89%)
Инфаркт миокарда [абс. (%)]	46 (54%)
Эпизоды острого нарушения мозгового кровообращения (ТИА, инсульт) [абс. (%)]	41 (48%)
Хроническая ишемия нижних конечностей [абс. (%)]	43 (51%)
Глюкоза, ммоль/л [m±SD]	6,48 ± 1,89
Общий холестерол, ммоль/л [m±SD]	5,93 ± 1,45
Триацилглицериды, ммоль/л [m±SD]	2,47 ± 2,09
Индекс атерогенности [m±SD]	4,36 ± 1,55

Примечание: АГ – артериальная гипертензия, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ТИА – транзиторная ишемическая атака, ФК – функциональный класс, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, m – среднее арифметическое, SD – среднеквадратическое отклонение.

Средний возраст больных составил 60 ± 7 лет. У всех пациентов имели место ишемическая болезнь сердца и артериальная гипертензия, а в 43 (51%)

случаях – хроническая ишемия нижних конечностей. Эпизоды острого нарушения мозгового кровообращения (транзиторная ишемическая атака, инсульт) в анамнезе регистрировались у 41 (48%) индивидов, а инфаркт миокарда в анамнезе выявлен у 46 (54%) больных. Гиперхолестеролемию в анамнезе была в 67 (79%) случаях. Сахарный диабет 2 типа выявлен у 15 (18%) больных. Факт курения отмечался у 69 (81%) пациентов.

2.3. Формирование банка тканей

В зависимости от степени выраженности локального атеросклеротического поражения и связанных с ним клинических проявлений пациентам были проведены хирургические операции 2 типов: каротидная эндартерэктомия или коронарное шунтирование. До операции от всех больных были получены образцы лейкоцитов периферической крови (ЛПК, n = 85).

В результате каротидной эндартерэктомии были получены образцы сонных артерий, которые включали биоптаты из области атеросклеротической бляшки (САБ, n = 60) и предлежащей макроскопически неизменной ткани (САН, n = 2). Макроскопически неизменные ткани отличались от областей атеросклеротических бляшек отсутствием на внутренней поверхности сосуда атероматозного детрита, кальцинатов, изъязвлений или фиброзных отложений.

Образцы правых коронарных артерий, пораженных атеросклерозом (КАБ, n = 22), а также морфологически сохранных внутренних грудных артерий (ВГА, n = 24) и больших подкожных вен нижних конечностей (БПВ, n = 24) собраны в результате коронарного шунтирования. Каждый образец был осмотрен. Правые коронарные артерии тщательно очищены от масс кальцификации, отложений липидов и тромбов, а также отмыты в стерильном физиологическом растворе. Всего для исследования было

собрано 217 образцов. Биологический материал был заморожен в жидком азоте и хранился при температуре -80°C вплоть до исследования.

2.4. Выделение ДНК

Для выделения ДНК из лейкоцитов периферической крови использовался стандартный метод фенол-хлороформной экстракции [Sambrook J., Russel D.W., 2001]. Протокол состоял из следующих этапов:

1. Размороженную кровь аккуратно перемешивали.
2. В микроцентрифужную пробирку к 500 мкл крови добавляли дистиллированную воду до конечного объема 1,5 мл. Тщательно перемешивали и оставляли на 15 минут.
3. Пробу центрифугировали при 4°C в течение 10 минут с ускорением 8000 об/мин. Супернатант осторожно сливали.
4. Осадок клеток отмывали, добавив в пробирку 500 мкл 1xSSC (3М NaCl; 0,3М цитрат натрия, рН 7,0). Аккуратно перемешивали.
5. Центрифугирование как в п.3. Супернатант осторожно сливали.
6. К осадку добавить 54 мкл 0,2М ацетата натрия и 6 мкл 10% раствора SDS. Осадок клеток тщательно ресуспендировали. Инкубировать при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа для прохождения лизиса клеток.
7. К образцу добавляли 2 объема буфера TE рН 8,0.
8. Последовательно проводили экстракцию ДНК равными объемами фенола, смеси фенол-хлороформ и хлороформом.
9. К образцу добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия, рН 5,3, перемешивали и осаждали ДНК 2,5 объемами холодного 96% этанола.
10. Пробу центрифугировали при 0°C в течение 15 мин. с ускорением 12000 об/мин. Супернатант сливали. Высушивали осадок ДНК на воздухе и растворяли в 50 мкл буфера TE рН 8,0.

Для выделения ДНК из клеток сосудов использовали вышеуказанный протокол с некоторыми модификациями. Перед выделением

ДНК сосуда гомогенизировали на приборе «Minilys» («Vertin Tech», США). Гомогенат переносили в микроцентрифужную пробирку и добавляли 350 мкл буфера (100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0, 10 mM Tris-HCl pH 8,0), 10 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и 40 мкл 10% SDS. Пробу ресуспендировали. Инкубировали 1-2 часа при 55°C, периодически переворачивая пробирку. После инкубации охлаждали микропробирку до комнатной температуры. Остальные этапы как в п. 8-10.

Оценка качества и концентрации выделенной ДНК была проведена с помощью спектрофотометра «NanoDrop» («Thermo», США). Полученные образцы хранились в морозильной камере при $t = -20^{\circ}\text{C}$.

2.5. Бисульфитная модификация ДНК

Обязательным этапом пробоподготовки для всех методов анализа метилирования ДНК, использованных в данной работе, являлась бисульфитная модификация исследуемых образцов ДНК. При обработке ДНК бисульфитом натрия (NaHSO_3) происходит дезаминирование неметилированного цитозина с образованием урацила, при этом 5-метилцитозин дезаминированию не подвергается (рис. 5) [Кузнецова Е.Б., Стрельников В.В., 2006].

При последующей амплификации ДНК в ходе ПЦР урацил заменяется на тимин, а 5-метилцитозин – на цитозин. Данная процедура отражения метильных меток ДНК в ее последовательности служит основанием для дискриминации метилированных и неметилированных аллелей CpG-сайтов в исследуемых образцах.

Бисульфитная модификация ДНК была проведена с использованием набора «EZ DNA Methylation Kit» («Zymo Research», США), согласно протоколу производителя. При этом ДНК в количестве 500-1000 нг инкубировали с конвертирующим реагентом (бисульфитом натрия) в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) в течение 16 циклов

по программе: 95°C - 30 сек, 60°C - 60 мин. Далее образцы подвергались десульфонуированию и очистке на специальных колонках из набора. Модифицированная бисульфитом одноцепочечная ДНК была элюирована в объеме 15 мкл.

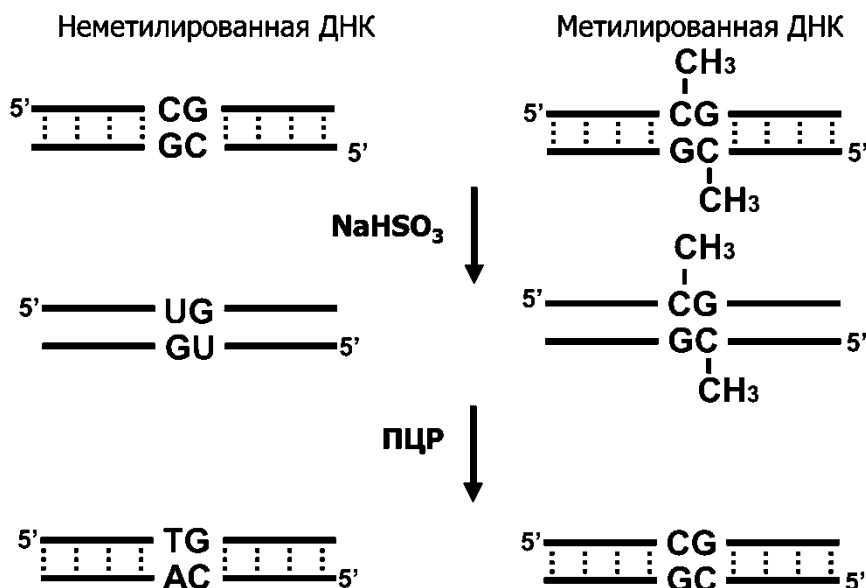


Рисунок 5. Принцип дискриминации ДНК по состоянию метилирования при бисульфитной модификации.

2.6. Анализ метилирования ДНК на биологических микрочипах

На данном этапе исследования анализировались 36 образцов ДНК, полученных из САБ (n = 6), САН (n = 2), КАБ (n = 6), ВГА (n = 8), БПВ (n = 8), ЛПК (n = 6).

Для оценки профиля метилирования ДНК была использована микрочиповая платформа «Infinium Human Methylation27 BeadChip» («Illumina», США). Данная платформа позволяет проводить одновременное тестирование 27578 CpG-сайтов 14475 генов человека. Таким образом, в среднем на каждый ген приходится не менее 2 CpG-сайтов на микрочипе. Образцы модифицированной бисульфитом натрия ДНК подвергали процедурам полногеномной амплификации, ферментативного расщепления на фрагменты, очистки и гибридизации на олигонуклеотидных микрочипах,

которые были выполнены согласно стандартному протоколу производителя [Bibikova M. et al., 2009].

Во время процедуры гибридизации фрагменты ДНК отжигались на локус-специфичных ДНК-зондах (пробах), иммобилизованных на специальных бусинах микрочипа и соответствующих метилированному (M-тип) или неметилированному (U-тип) состоянию остатков цитозина в CpG-сайтах. Далее производилось ферментативное удлинение праймеров на одно основание с использованием специальных нуклеотидов-терминаторов: ddATP и ddTTP, помеченных динитрофенолом (DNP), или ddCTP и ddGTP, меченых биотином. Детекция осуществлялась с помощью антител к DNP и стрептавидину, ассоциированными с красным (Cy3) и зеленым (Cy5) флуоресцентными красителями, соответственно. Бусины с зондами располагаются на микрочипе по заданной производителем схеме и соответствуют определенным CpG-сайтам генома. Пробы CpG-сайтов, входящих в структуру микрочипа, реплицированы на 4-8 бусинах и, таким образом, позволяют оценивать воспроизводимость и получать некоторую статистику сигнала детекции.

Каждый образец ДНК анализировался на отдельном микрочипе, который был консолидирован с другими микрочипами по 12 штук на одной несущей пластине. Интенсивности сигналов на микрочипах регистрировались с помощью сканера «Illumina BeadArray Reader» («Illumina», США) и фиксировались в виде изображений и выходных файлов заданного производителем формата.

2.6.1. Биоинформационная обработка данных

Файлы с изображениями и другой информацией о сканировании анализировались с помощью программного пакета «GenomeStudio Methylation Module» («Illumina», США). Первичные данные экспортировались в виде таблицы, содержащей значения уровней и качества

детекции сигналов, а также оценки метилирования в исследуемых образцах, некоторую статистику по бусинам и аннотационную информацию для каждого CpG-сайта, включенного в структуру микрочипа. Оценкой уровня метилирования служила величина β (индекс метилирования), которая соответствует отношению флуоресцентных сигналов метилированных аллелей к сумме флуоресцентных сигналов метилированных и неметилированных аллелей и рассчитывается по формуле:

$$\beta_i = \frac{\max(Y_i^M, 0)}{\max(Y_i^M, 0) + \max(Y_i^U, 0) + \alpha},$$

где Y_i^M и Y_i^U – это интенсивности флуоресцентных сигналов метилированных и неметилированных проб, соответственно, для i -го CpG-сайта, а α – некоторая константа (по умолчанию, $\alpha = 100$) [Du P. et al., 2010]. Индекс метилирования β варьирует от 0 (неметилированное состояние) до 1 (полное метилирование всех CpG-сайтов в данном положении).

Дальнейшая предобработка данных проводилась в программной среде для статистических вычислений «R (v 3.0.1) / Bioconductor (v 2.14)» с помощью программного пакета «lumi (v 2.5.1)» [Gentleman R. et al., 2005; Du P. et al., 2008; Шипунов А.Б. и др., 2012]. Стандартный протокол микрочипового исследования на данном этапе включал следующие процедуры: 1) трансформация данных, 2) контроль качества и фильтрация CpG-проб, 3) коррекция дисбаланса по цветовым каналам, 4) коррекция фонового сигнала, 5) нормализация между микрочипами, 6) коррекция эффекта группировки.

1) Предлагаемая производителем микрочипов величина для оценки метилирования ДНК – индекс метилирования (β) – является удобной для интерпретации полученных результатов с биологической точки зрения. Однако данная величина плохо подходит для статистического моделирования ввиду ее гетероскедатичности (зависимости дисперсии от значений среднего), особенно в диапазоне крайних значений величины. Поэтому рядом авторов была предложена величина M , которая более

релевантна для использования в статистическом моделировании и рассчитывается по формуле:

$$M_i = \log_2 \left(\frac{\max(Y_i^M, 0) + \alpha}{\max(Y_i^U, 0) + \alpha} \right).$$

Величина M представляет собой логит-трансформацию величины β , гомоскедатична (ее дисперсия не зависит от значений среднего) во всем диапазоне ее значений, теоретически не имеет пределов (варьирует от $-\infty$ до ∞) [Du P. et al., 2010]. Формулы перехода между величинами:

$$\beta_i = \frac{2^{M_i}}{2^{M_i+1}}; M_i = \log_2 \left(\frac{\beta_i}{1-\beta_i} \right).$$

2) Для контроля качества использовалась визуальная оценка графического представления полученных данных: графики плотности распределения, диаграммы типа «ящиков с усами», дендрограммы и двумерные графики кластеризации. Для отображения последних двух графиков использовались геометрические (евклидовы) расстояния между образцами, рассчитанные на основании исходного массива данных. Для построения дендрограмм иерархической кластеризации использовался метод средней связи [Everitt B.S. et al., 2011]. Классический метод многомерного шкалирования – метод главных координат (Principal Coordinates Analysis, PCoA) – был использован для построения графиков по первым двум координатам для визуализации и оценки сходства/различия между образцами [Gower J.C., 1966]. Такой подход к графической проверке распределения данных проводился на каждом этапе их предобработки.

В составе микрочипов имеется ряд контрольных проб, необходимых для проверки специфичности гибридизации, мечения, флуоресценции, а также полноты бисульфитной модификации ДНК, что представляет собой важную информацию о качестве выполнения этапов пробоподготовки и микрочипового анализа.

Из анализа были исключены полиморфные CpG-сайты (входящие в структуру микрочипа, но имеющие однонуклеотидные варианты (SNP) цитозинового основания), которые были обнаружены в работе Chen Y. и

сопр. [Chen Y.A. et al., 2011]. В той же работе идентифицированы аутосомные CpG-пробы с неспецифической кросс-гибридизацией на половых хромосомах. Однако в настоящем исследовании все образцы ДНК получены от лиц одного пола (мужчин), поэтому данный набор CpG-проб было решено не исключать из анализа. Дополнительно производился отбор и анализ только тех CpG-проб, для которых уровень флуоресцентного сигнала во всех образцах (микрочипах) был значимо выше по сравнению с сигналом зондов фонового отрицательного контроля ($P_{detection} < 0,05$). Таким образом, из дальнейшего анализа исключались CpG-пробы, которые не гибридизовались в достаточном количестве на фрагментах исследуемой ДНК.

3) Как уже упоминалось, особенностью данной микрочиповой технологии является использование двух цветов для мечения основания, удлиняющего цепь олигонуклеотидной пробы после гибридизации с фрагментом матричной ДНК. В результате интенсивности сигналов для некоторых CpG-сайтов измеряются в красном (для А и Т) или зеленом (для С и G) цветовых каналах, а для проб М- и U-типа, соответствующих определенному состоянию метилирования данного CpG-сайта, – в одном и том же канале цветового сигнала. Вследствие различной эффективности мечения и сканирования красителей Cy3 и Cy5, интенсивности их флуоресценции могут быть не сбалансированы. Несмотря на то, что рассчитываемые оценки метилирования ДНК, не зависят от соотношения интенсивностей свечения разных красителей, сильный дисбаланс сигналов по красному и зеленому цветовым каналам между образцами может являться дополнительным индикатором плохого качества результатов.

При наличии значительного цветового дисбаланса необходимо либо обрабатывать полученные результаты отдельно по каждому цветовому каналу, либо провести коррекцию данного дисбаланса. Данная процедура реализована в программном пакете «lumi» с помощью метода сглаженной квантильной нормализации (Smooth Quantile Normalization), представляющего собой метод квантильной нормализации, адаптированный

под выборки разного объема и сильно варьирующих диапазонов значений [Du P. et al., 2008].

4) Коррекция фонового сигнала является важным этапом предобработки данных, так как этот этап позволяет исключить большую часть фонового шума, наблюдаемого вследствие неспецифических процессов отжига зондов, встраивания ddNTP или свечения молекул флюорофора, которые негативным образом влияют на качество полученных результатов и их биологическую интерпретацию [Xie Y. et al., 2009]. Коррекция результатов микрочипового исследования была проведена путем вычитания медианы интенсивностей сигналов отрицательных контрольных проб, измеренных для каждого образца, из интенсивностей сигналов исследуемых CpG-проб. При отсутствии информации о контрольных пробах коррекция выполнялась с использованием рассчитанных оценок фонового шума, которые основывались на предположении, что большинство CpG-сайтов на микрочипах неметилированы. В этом случае оценкой фонового сигнала служила мода плотности распределения сигнала с зондов М-типа, соответствующих метилированному состоянию CpG-сайтов [Du P. et al., 2008].

5) Процедура нормализации результатов между микрочипами (Between Array Normalization) также является важным этапом предобработки данных. Эта процедура позволяет устранить или уменьшить долю «биологически не опосредованной» варибельности сигналов между образцами, которая по сути является систематической погрешностью, возникающей вследствие влияния технических факторов (неравных исходных количеств матричной ДНК, концентраций реагентов, различной эффективности чипов в отношении процессов гибридизации, мечения, детекции сигнала, вариация лабораторных условий и т.д.) [Novatta I. et al., 2005]. К настоящему времени для анализа метилирования ДНК не разработано собственных эффективных методов нормализации данных, поэтому они заимствованы из анализа

экспрессионных микрочипов и, как следствие, базируются на их допущениях [Dedeurwaerder S.A. et al., 2013].

В настоящей работе был использован метод квантильной нормализации (Quantile Normalization), который среди доступных в пакете «lumi» методов нормализации показал наилучшие результаты по выравниванию распределений уровня метилирования ДНК для разных микрочипов и устранению эффекта группировки. Метод позволяет сделать одинаковыми эмпирические распределения интенсивностей всех микрочипов, используя математическое преобразование вида: $Y_j' = F^{-1}[G(Y_j)]$, где $G(Y_j)$ – эмпирическое распределение интенсивностей сигналов j -го микрочипа, F – эмпирическое распределение усредненных квантилей образцов [Gentleman R. et al., 2005].

б) Между результатами этапов микрочипового анализа, проведенных в разное время, наблюдался эффект группировки (Batch Effect) (прил. 1). Распределения интенсивностей сигналов между образцами в объединенных данных были скорректированы методом квантильной нормализации. Помимо этого, на дальнейших этапах сравнительного анализа результатов, полученных в разное время, этот фактор учитывался в качестве ковариаты в линейной модели.

2.6.2. Анализ дифференциального метилирования

Сравнительный анализ уровня метилирования CpG-сайтов широкого спектра генов был проведен с помощью программного пакета «limma (v 3.20)» в статистической среде «R» [Gentleman R. et al., 2005]. Данный пакет позволяет проводить одновременные сравнения уровней метилирования множества CpG-сайтов между группами образцов малого объема с учетом дополнительных факторов. Процедура анализа дифференциального метилирования в «limma» включает использование обобщенных линейных

моделей (GLM) и эмпирическое байесовское «смягчение» (moderation) оценок дисперсии [Smyth G.K. et al., 2004].

Для сравнения профилей метилирования ДНК между КАБ, ВГА, БПВ и ЛПК была сформулирована линейная модель, позволяющая ввиду дизайна эксперимента учитывать парность образцов в виде дополнительных ковариат:

$$M = \sum_{g=1}^4 \alpha_g x_g + \sum_{p=1}^6 \beta_p y_p + \varepsilon,$$

где M – показания уровня метилирования для каждого отдельного CpG-сайта в каждом микрочипе, α и β – коэффициенты при x и y , которые принимают значения 0 или 1 в зависимости от того, из какой ткани выделен и от какого пациента взят данный образец ДНК; ε – случайная ошибка, включающая долю вариабельности в силу неизвестных факторов.

При сравнении САБ, САН и ВГА в объединенных данных в качестве дополнительных ковариат учитывалось время выполнения микрочипового исследования:

$$M = \sum_{g=1}^4 \alpha_g x_g + \gamma_1 z_1 + \gamma_2 z_2 + \varepsilon,$$

где предикторы z_1 и z_2 принимают значения 0 или 1 в зависимости от времени получения результатов, а γ_1 и γ_2 – коэффициенты влияния данного фактора.

Для проведения двухвыборочных сравнений задавались контрасты между коэффициентами предикторов сравниваемых групп и вычислялся модифицированный t-критерий Стьюдента (moderated t-test) с байесовской поправкой оценок дисперсии для каждой CpG-пробы, которая увеличивает мощность статистического теста при небольших объемах выборок [Smyth G.K. et al., 2004]. Сравнение уровней метилирования ДНК проводилось в группах КАБ и САБ против ВГА, а также ВГА против БПВ. Статистически значимыми считались различия в уровнях метилирования с достигнутым уровнем значимости $P_{FDR} < 0,05$, скорректированным для контроля частоты ложноположительных результатов (FDR) при множественной проверке статистических гипотез [Benjamini Y., Hochberg Y.,

1995]. Дополнительно вычислялись средние индексы метилирования для сравниваемых групп. Дифференциально метилированными считались CpG-сайты с разницей между этими показателями $|\Delta\beta| \geq 0,2$ (что превышает погрешность измерения на микрочипе и дополняет статистическую значимость различий биологически обоснованным критерием).

2.6.3. Аннотирование результатов микрочипового исследования

Функциональное аннотирование полученных списков генов, содержащих дифференциально метилированные CpG-сайты, проводилось с помощью инструмента «WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit», доступного онлайн в сети Интернет (URL: <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>) [Zhang B. et al., 2005; Wang J. et al., 2013]. Категории описываемых генов соответствовали классификаторам баз данных «Gene Ontology» (URL: <http://geneontology.org>) и «PharmGKB» (URL: <http://disease-ontology.org/>). Поиск генов, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, проводился в базе данных «CADgene» (URL: <http://www.bioguo.org/CADgene>).

2.7. Бисульфитное пиросеквенирование

Для подтверждающего анализа метилирования выбранных регионов генома был использован метод пиросеквенирования модифицированной бисульфитом ДНК на приборе «PyroMark Q24» («Qiagen», США). Спектр анализируемых тканей включал образцы САБ (n = 54), КАБ (n = 22), ВГА (n = 22), БПВ (n = 22) и ЛПК (n = 85).

Метод основан на технологии «секвенирования путем синтеза» и высвобождении пирофосфата при синтезе ДНК (рис. 6) [Ronaghi M., 2001]. Матрица одноцепочечной ДНК гибридизуется с секвенирующим праймером и инкубируется с ферментами: ДНК-полимеразой, АТФ-сульфурилазой,

люциферазой и апиразой, а также с субстратами: и аденозин-5'-фосфосульфатом (APS) и люциферинном.

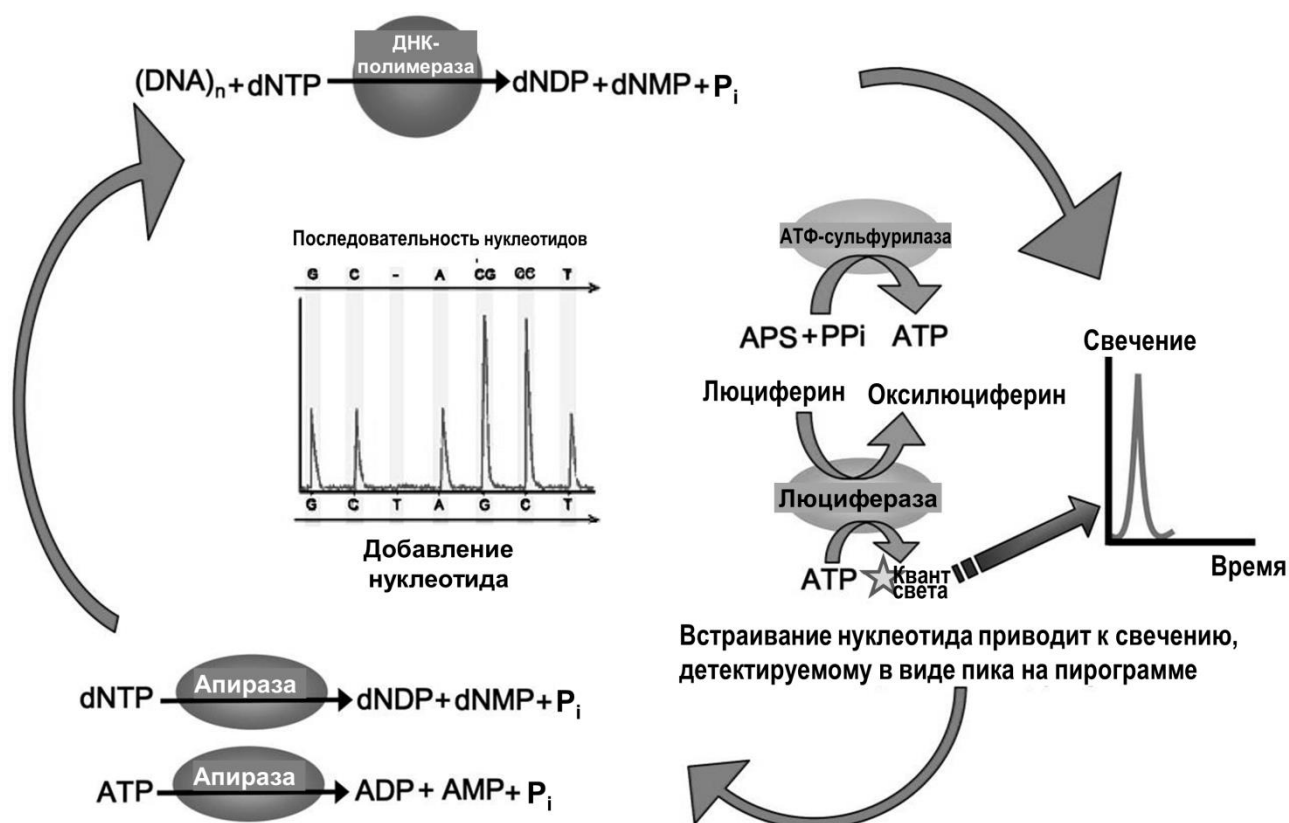


Рисунок 6. Схема реакции пиросеквенирования: встраивание под действием ДНК-полимеразы нуклеотида (dNTP) в растущую цепь ДНК приводит к стехиометрическому высвобождению пирофосфата (PP_i), который используется для синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) с последующим высвобождением кванта света в результате люциферин-люциферазной реакции [Petrosino J.F. et al., 2009].

Растворы дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) добавляются и отмываются последовательно после реакции. Вместо дезоксиаденозинтрифосфата (dATP) добавляют дезоксиаденозин-5'-фосфосульфат (dATP α S), который не является субстратом для люциферазы. ДНК-полимераза включает комплементарный dNTP в цепочку. При этом стехиометрически высвобождается пирофосфат, который в присутствии АТФ-сульфуриказы и APS количественно преобразуется в аденозинтрифосфат (АТФ). АТФ запускает люциферазную реакцию:

окисление люциферина до оксилуциферина, что сопровождается хемилюминесценцией, интенсивность которой пропорциональна количеству образовавшегося АТФ. Люминесценция регистрируется цифровой камерой и далее анализируется специальной компьютерной программой. Последовательность растворов, которые дают люминесцентный сигнал, позволяет определить последовательность матрицы. Неинкорпорированные dNTP и АТФ подвергаются деградации ферментом апиразой, и реакция начинается с новым нуклеотидом после его внесения в реакционную смесь.

Пробоподготовка образцов состояла из этапов амплификации модифицированной бисульфитом одноцепочечной ДНК методом ПЦР и вакуумной очистки образовавшихся ампликонов.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала 20-50 нг модифицированной бисульфитом ДНК; 0,4 пмоль специфической пары праймеров (табл. 3); 200 мкмоль каждого dNTP; 2,5 мкл SE-буфера (67 mM Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C); 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% Tween-20); 3 ммоль MgCl_2 и 0,5-1,0 единиц активности Hot Start Taq ДНК-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск).

Программа амплификации, проводимой в автоматическом минициклере «Thermocycler» («Biometra», Германия), включала предварительную денатурацию при 95°C в течение 5 мин, с последующими 42 циклами денатурации при 95°C (30 сек), отжига (45 сек) при температуре, специфичной для каждой пары праймеров (табл. 3), и элонгации цепи ДНК при 72°C (30 сек). Программу завершала финальная элонгация в течение 5 минут при 72°C.

Затем часть продукта ПЦР отбирали для проверки амплификации ДНК методом электрофореза в 3% агарозном геле. Для этого 4 мкл продукта фракционировали в геле при напряжении 130 В в течение 30 мин с последующей окраской бромистым этидием. Визуализацию проводили в ультрафиолетовом свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе «GelDoc 2000» («BioRad», США). Критически важной считалась

специфичность бэнда, соответствующего теоретически рассчитанной длине ампликона, а также отсутствие неспецифических продуктов, в особенности, димеров праймеров.

Таблица 3

Характеристика праймеров и анализируемых с помощью бисульфитного пиросеквенирования локусов ДНК

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров и анализируемого участка	Информация
<i>HOXD4</i> , промотор, <i>MIR10B</i>	F: 5'-GGTATTTGAATTGTTTTAGAAAG-3' R: Биотин-5'-CACTTAAATCTСТААСТАТТСС-3' S: 5'-TTTTGGGTGGGATTTAGAGGTTGT-3'	$t_{отж} = 56^{\circ}\text{C}$ $L_{амп} = 249$ пн
	Нативная последовательность ДНК: AACGTTGTСТАТАТААСССТGТАGAАССGAATTT GTGTGGTATCCGTАТАGTCACAGATTCCGA Бисульфит-модифицированная ДНК: AAUGTTGTTАТАТАТАТТТТGТАGAАTYGAATTT GTGTGGTATTYGTАТАGTTАТАGATTYGA	$N_{CpG} = 4$
<i>PEG1/MEST</i> , промотор- экзон 1a	F: 5'-GTTATTTTАТАТТТТТGТААТАG G-3' R: Биотин-5'-CCTTACCTACAАААСТССАТАТТТС-3' S: 5'-GGTTTTTTTTGGGAАТАG GGTGAAG-3'	$t_{отж} = 56^{\circ}\text{C}$ $L_{амп} = 232$ пн
	Нативная последовательность ДНК: GCCGAGAАСССТCTGGCCTCAGGAAGCGCATGCCGC AACCGGTTCTCCG Бисульфит-модифицированная ДНК: GTYGAGAАТТТТТGGTТТТАGGAAGYGTATGYGТА ATYGGTTTTTYG	$N_{CpG} = 5$
<i>AATK</i> , 11 экзон	F: 5'-TTTTTTTTGGGGAGTTTAGGG-3' R: Биотин-5'-CCCACTACTAАСТАТCTСТАТССА-3' S: 5'-GAGTTAGAGGAGGTGGGA-3'	$t_{отж} = 58^{\circ}\text{C}$ $L_{амп} = 381$ пн
	Нативная последовательность ДНК: GCGCGGAGGGCCGCCAGCGCGGGCACTGGCGCT ССААССG Бисульфит-модифицированная ДНК: GYGYGGAGGGTYGTTTAGYGYGGGТATTGGYGT ТТАAYG	$N_{CpG} = 7$

Примечание: В таблице указана структура прямого (F) и обратного (R) праймеров для ПЦР, а также праймера (S) для пиросеквенирования и анализируемых фрагментов ДНК; $t_{отж}$ - температура отжига, $L_{амп}$ - длина ПЦР-продукта, N_{CpG} - количество CpG-сайтов в анализируемом фрагменте ДНК.

Дальнейшие этапы пробоподготовки были проведены согласно стандартному протоколу производителя. Один из праймеров был конъюгирован с биотиновой меткой, что позволяло очистить образовавшиеся в результате ПЦР ампликоны от остальных компонентов реакционной смеси, используя взвесь частиц стрептавидин-сефарозы и систему вакуумной пробоподготовки «PyroMark Q24 Vacuum Workstation» («Qiagen», США).

После щелочной денатурации и очистки иммобилизованных на сефарозе одноцепочечных молекул ДНК к ним добавлялся комплементарный секвенирующий праймер, смесь нагревалась до 80°C в течение 2 мин. и затем охлаждалась до комнатной температуры. Плашку с подготовленными образцами загружали в прибор вместе с картриджем, содержащим отсеки с растворами субстрата, ферментов и dNTP. Внесение реактивов в плашку происходило по заранее заданной программе, основывающейся на известной структуре анализируемого фрагмента ДНК (табл. 3). В местах расположения CpG-сайтов производилось вкапывание dCTP и dTTP, соответствующих метилированному и неметилированному состояниям входящего в их состав цитозинового основания. По соотношению высоты полученных на пираграмме пиков рассчитывался уровень метилирования (доля метилированных аллелей) каждого CpG-сайта, входящего в анализируемый фрагмент ДНК (рис. 7). Каждый образец был протестирован в дубликатах, и для статистических расчетов взят средний уровень метилирования ДНК.

Необходимыми условиями для отбора измерения в анализ являлись:

- 1) полная бисульфитная модификация ДНК образца (проверялась по пираграмме);
- 2) отсутствие грубых ошибок секвенирования (дрейфа изолинии, высокой вариабельности контрольных пиков, ошибок вкапывания и прочтения);
- 3) низкая вариабельность между дубликативными измерениями (разница в уровнях метилирования не более 5%).

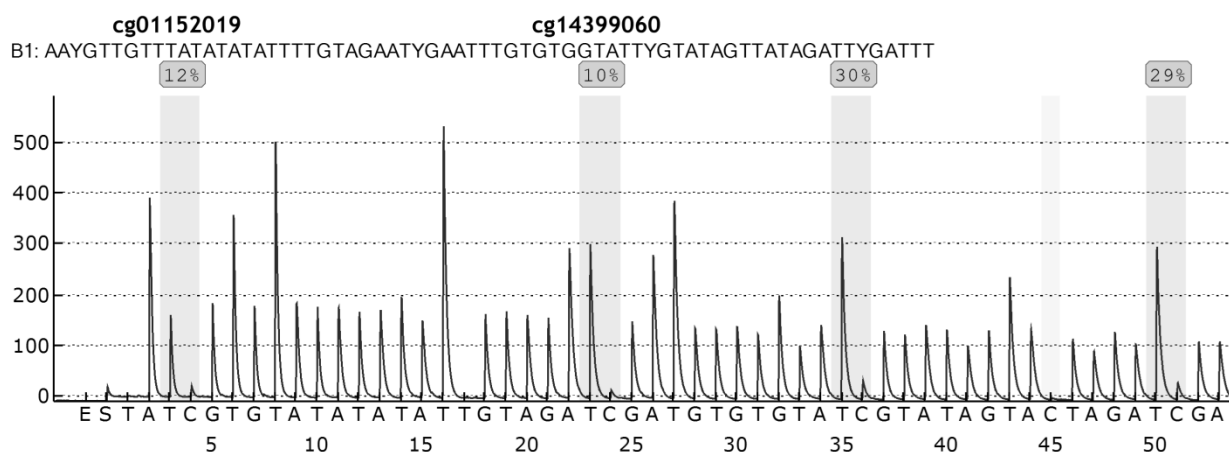


Рисунок 7. Пирограмма, получаемая в результате бисульфитного пиросеквенирования: уровень метилирования отдельных CpG-сайтов рассчитывался по соотношению высоты пиков С и Т, дополнительно проводилась проверка полноты бисульфитной модификации (на пирограмме С в 45-ой позиции).

2.8. Статистический анализ результатов

Методы описательного и сравнительного статистического анализа результатов микрочипового исследования указаны в разд. 2.6.1 и 2.6.2.

Для оценки уровней метилирования, полученных в результате бисульфитного пиросеквенирования, были использованы непараметрические оценки распределения: медиана, 1-й и 3-й квартили $[M(Q1-Q3)]$.

Сравнение уровней метилирования в группах исследования проводилось с использованием критериев Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни, для тестирования корреляционных отношений между измеряемыми величинами использовался линейный коэффициент корреляции Пирсона. Сравнительный анализ между группами сравнения проводился как для каждого CpG-сайта в отдельности, так и для средних по региону уровней метилирования, вычисленных как среднее арифметическое уровней метилирования всех CpG-сайтов в анализируемой области генома. Множественное тестирование статистических гипотез было проведено с

поправкой Бонферрони, и статистически значимыми считались результаты на достигнутом уровне значимости $P_{Bonf} < 0,05$ [Кобзарь А.И., 2006].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Общая характеристика профилей метилирования ДНК по результатам микрочипового анализа

Использованная в исследовании микрочиповая платформа охватывает 27578 CpG-сайтов, расположенных в области промоторов (на 1 Кб до и 500 п.н. после сайта начала транскрипции) 14475 генов [Bibikova M. et al., 2009]. Кроме этого, микрочипы позволяют проанализировать более 110 промоторов микроРНК. В среднем, на микрочипе приходится 2 CpG-сайта на белок-кодирующую область генома и от 3 до 20 CpG-сайтов на 200 опухоль-ассоциированных и импринтированных генов. Из 27578 CpG-динуклеотидов, входящих в состав микрочипа, 20006 (72,5%) расположены в CpG-островках. На этапе предобработки данных из анализа были исключены результаты полиморфных и не детектированных CpG-проб. Таким образом, микрочиповое исследование позволило оценить значения уровня метилирования 27373 CpG-сайтов 14425 генов в клетках сосудистой стенки (атеросклеротических бляшках правых коронарных артерий (КАБ), атеросклеротических бляшках (САБ) и макроскопически неизмененных (САН) сонных артерий, внутренних грудных артериях (ВГА), больших подкожных венах (БПВ)) и лейкоцитах периферической крови (ЛПК) у больных атеросклерозом. По результатам анализа были вычислены средние индексы метилирования β в группах сравнения. Значения индекса метилирования соответствовали доли метилированных аллелей (уровню метилирования) данного CpG-сайта в образце.

Распределение уровней метилирования ДНК имело бимодальный характер (рис. 8). Для всех групп было характерно преобладание CpG-сайтов с низким уровнем метилирования, основная часть которых входила в состав CpG-островков. Средний индекс метилирования всех анализируемых CpG-сайтов был не намного, но в то же время значимо ($P_{Bonf} < 0,05$) выше в ЛПК

(0,263) по сравнению с образцами сосудистой стенки: КАБ (0,249), САБ (0,257), САН (0,252), ВГА (0,246) и БПВ (0,247). При этом среднее значение величины β «островковых» CpG-сайтов составило 0,15, тогда как для CpG-сайтов вне островков средний уровень метилирования равнялся 0,58.

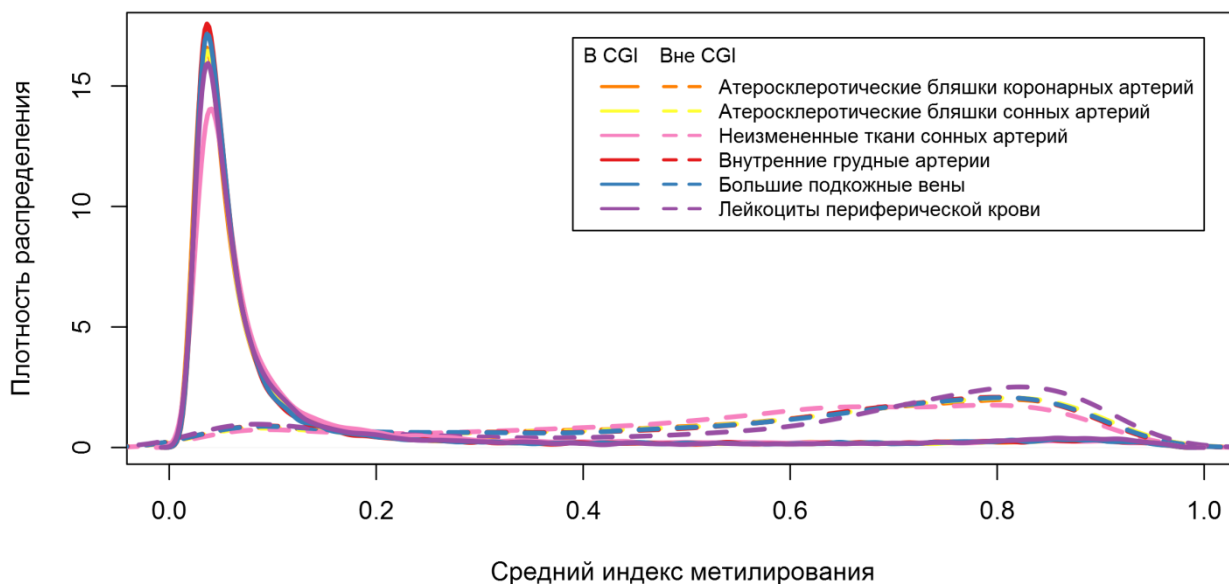


Рисунок 8. Распределение средних значений индекса метилирования анализируемых с помощью микрочипов CpG-сайтов в группах образцов сосудистой стенки и лейкоцитов периферической крови больных атеросклерозом.

По значениям индекса метилирования CpG-сайты можно условно классифицировать на неметилированные ($\beta < 0,2$), метилированные ($\beta > 0,6$) и имеющие промежуточный уровень метилирования ($0,2 \leq \beta \leq 0,6$), соответственно (табл. 4). Интересно, что в образцах САН наблюдалось больше CpG-сайтов с промежуточным уровнем метилирования (0,2; 0,6) по сравнению с другими группами ($P_{Bonf} < 0,001$), вне зависимости от локализации CpG-островков. Это может отражать эпигенетическую лабильность клеток макроскопически неизменных сонных артерий. Столь же сильные отличия были характерны для тканей сосудистой стенки, в которых количество метилированных CpG-сайтов было меньше при сравнении с ЛПК, причем большая доля этих различий приходилась на CpG-сайты вне островков ($P_{Bonf} < 0,001$).

Количество CpG-сайтов с различным индексом метилирования в группах исследования

Группы тканей	КАБ, n (%)	САБ, n (%)	САН, n (%)	ВГА, n (%)	БПВ, n (%)	ЛПК, n (%)
Все CpG-сайты на микрочипе (n = 27393)						
$\beta < 0,2$	17544 (64)	17430 (64)	17040 (62)	17831 (65)	17761 (65)	17689 (65)
$\beta = [0,2; 0,6]$	4032 (15)	4026 (15)	4850 (18)	3737 (14)	3785 (14)	3153 (12)
$\beta > 0,6$	5817 (21)	5937 (21)	5503 (20)	5825 (21)	5847 (21)	6551 (24)
Сайты внутри CpG-островков (n = 19969)						
$\beta < 0,2$	16505 (83)	16434 (82)	16133 (81)	16718 (84)	16659 (84)	16494 (83)
$\beta = [0,2; 0,6]$	1797 (9)	1845 (9)	2244 (11)	1638 (8)	1655 (8)	1667 (8)
$\beta > 0,6$	1667 (8)	1690 (9)	1592 (8)	1613 (8)	1655 (8)	1808 (9)
Сайты вне CpG-островков (n = 7424)						
$\beta < 0,2$	1039 (14)	996 (14)	907 (12)	1113 (15)	1102 (15)	1195 (16)
$\beta = [0,2; 0,6]$	2235 (30)	2181 (29)	2606 (35)	2099 (28)	2130 (29)	1486 (20)
$\beta > 0,6$	4150 (56)	4247 (57)	3911 (53)	4212 (57)	4192 (56)	4743 (64)

Примечание: КАБ – атеросклеротические бляшки правых коронарных артерий, САБ и САН – атеросклеротические бляшки и макроскопически неизмененные сонные артерии, соответственно, ВГА – внутренние грудные артерии, БПВ – большие подкожные вены нижних конечностей, ЛПК – лейкоциты периферической крови.

Количество неметилированных CpG-сайтов в группах сравнения составило в среднем 17549, при этом основная их часть (94%) приходилась на локусы, входящие в CpG-островки. Такой результат согласуется с

данными литературы о преимущественно неметилированном характере «островковых» CpG-сайтов ДНК в тканях взрослого человека [Auclair G., Weber M., 2012]. Гиперметилированные CpG-сайты были представлены 5913 локусами, 72% которых входили в CpG-островки.

Большая часть неметилированных CpG-сайтов локализовалась в области сайта инициации транскрипции (TSS; рис. 9). По мере отдаления от TSS наблюдалось увеличение среднего уровня метилирования ДНК и его размаха, характерное для всех групп сравнения. Этот результат согласуется с фактом преимущественного расположения неметилированных регуляторных CpG-островков в промоторных областях многих генов, а также метилированием CpG-сайтов в межгенных регионах [Auclair G., Weber M., 2012].

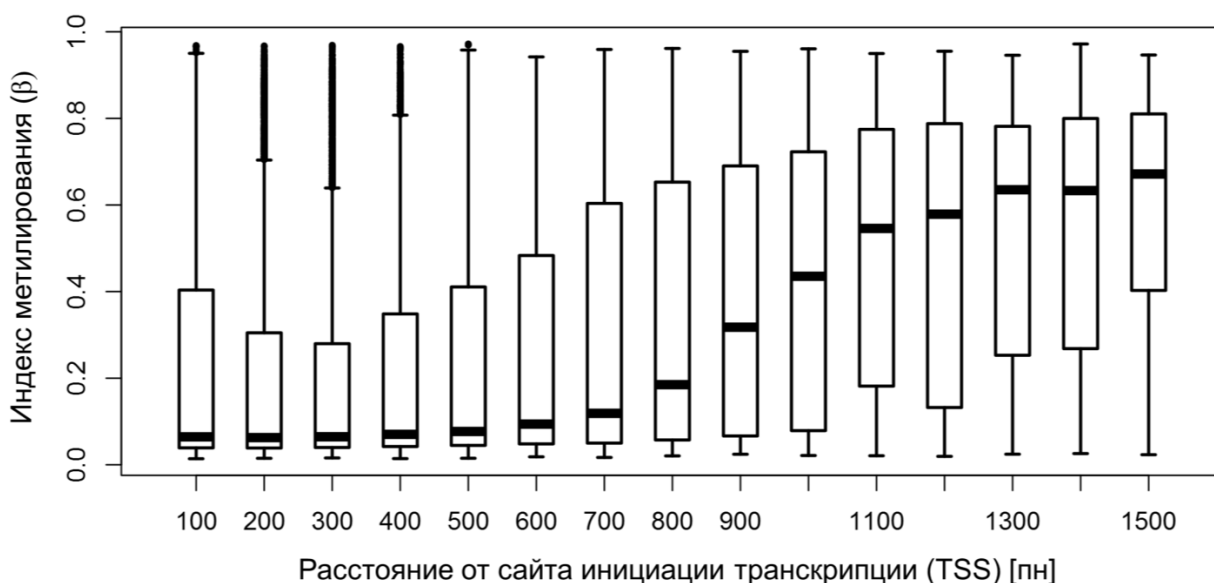


Рисунок 9. Распределение средних уровней метилирования анализируемых CpG-сайтов в зависимости от расстояния до сайта инициации транскрипции (TSS).

Коэффициент корреляции средних уровней метилирования всех анализируемых CpG-сайтов в сравниваемых группах был достаточно высок в целом (рис. 10), что, по-видимому, объясняется общим мезодермальным происхождением анализируемых тканей. В то же время, наименьшее

значение коэффициента корреляции было выявлено при оценке сходства профилей метилирования ДНК в ЛПК и образцах сосудистого русла, как пораженных (КАБ, САБ, САН, ВГА и БПВ), так и не пораженных атеросклерозом (ВГА и БПВ). Наиболее сильная корреляция средних уровней метилирования анализируемых CpG-сайтов наблюдалась при сравнении различных участков сосудистого русла между собой (КАБ, САБ, САН, ВГА и БПВ).

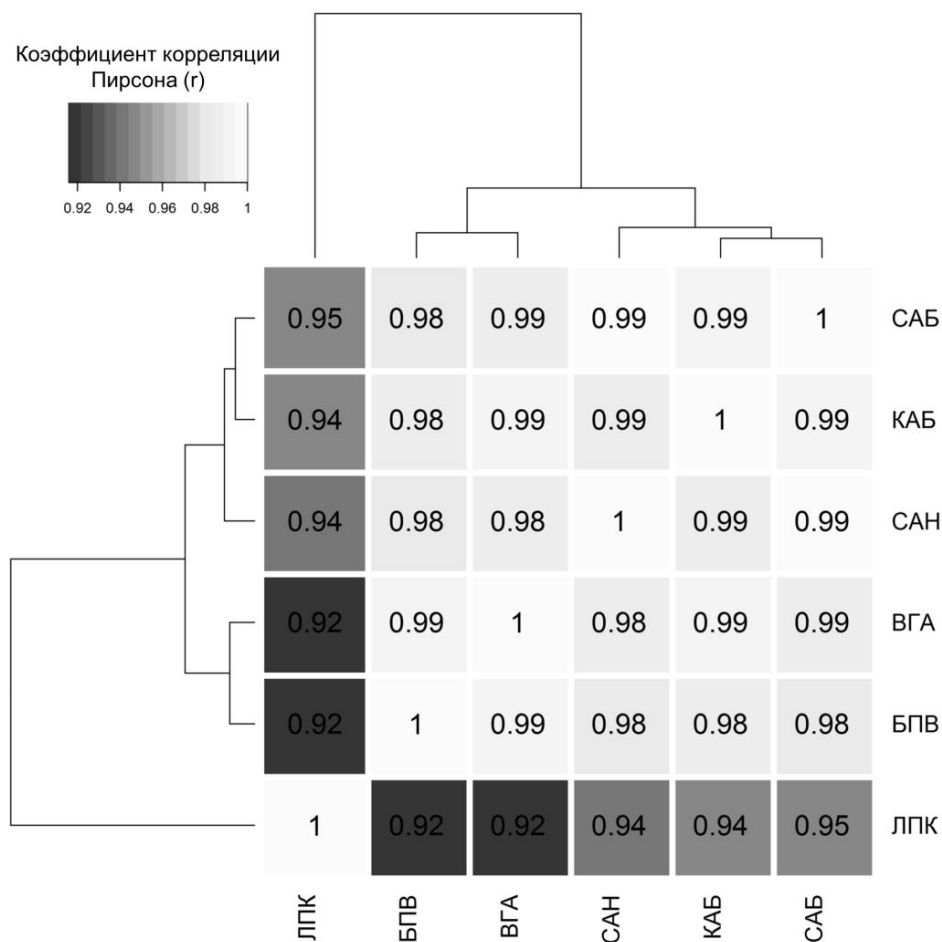


Рисунок 10. Корреляция средних уровней метилирования анализируемых CpG-сайтов в сравниваемых группах: атеросклеротических бляшках правых коронарных артерий (КАБ), атеросклеротических бляшках (САБ) и макроскопически неизмененных тканях (САН) сонных артерий, внутренних грудных артериях (ВГА), больших подкожных венах (БПВ) и лейкоцитах периферической крови (ЛПК). Все коэффициенты корреляции статистически значимо отличались от нуля ($P < 0,05$).

Оценка сходства профилей метилирования ДНК между образцами была проведена на основании данных уменьшенной размерности, полученных из исходных результатов микрочипового исследования с помощью метода главных координат (РСоА). Расположение образцов в пространстве первых двух главных координат показано на рис. 11.

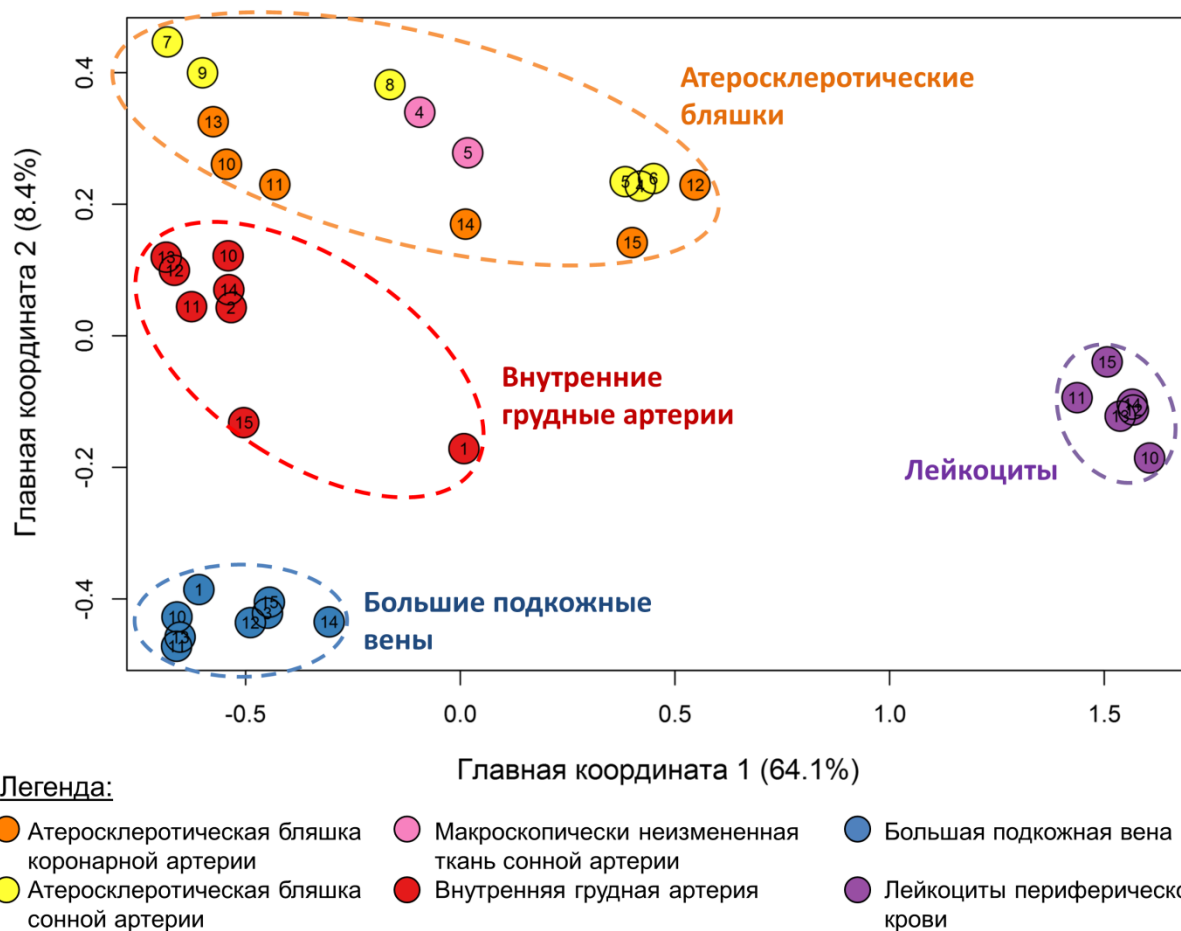


Рисунок 11. Диаграмма расположения исследованных образцов в пространстве первых двух координат, полученных на основании профилей метилирования их ДНК с помощью метода РСоА (числа в кружках соответствуют идентификационному номеру пациента).

Из рисунка видно, что по первой координате, объясняющей большую часть (64%) общей дисперсии всего массива данных, ЛПК четко дистанцировались от тканей сосудистой стенки и формировали плотный кластер. Этот результат можно объяснить с позиции тканевой специфичности эпигенетических паттернов. Между тем, некоторые образцы из кластера

пораженных атеросклерозом артерий располагались ближе к ЛПК по сравнению с непораженными тканями сосудистой стенки. Что косвенно свидетельствует об изменениях в профиле метилирования пораженных артерий, которое может быть связано с рекрутированием и инфильтрацией лейкоцитами тканей сосудистой стенки – характерного компонента воспаления в очаге атеросклеротического поражения.

По второй координате, объясняющей около 8% общей дисперсии данных, более детально дифференцировались сегменты сосудистого русла различной локализации и степени вовлеченности в патологический процесс: БПВ формировали плотный кластер, более гетерогенной оказалась группа образцов ВГА и наиболее разнородной выступила группа пораженных атеросклерозом тканей (КАБ, САБ), в которой были локализованы также образцы макроскопически неизмененных участков сонных артерий (САН), предлежащих к атеросклеротической бляшке. Между артериями, пораженными и не пораженными атеросклерозом, а также между артериями и венами наблюдались различия в метилировании ДНК, но менее выраженные, чем при сравнении тканей сосудистой стенки и ЛПК. Наконец, сходство профилей метилирования ДНК между тканями сосудистой стенки из области атеросклеротических бляшек и предлежащих тканей без макроскопически выраженного атеросклероза свидетельствует об эпигенетических изменениях в последних, которые могут быть связаны с атерогенезом и протекающими на микроуровне патологическими процессами, не приводящими на данном этапе к визуально различимому ремоделированию артериальной стенки.

Таким образом, у больных мультифокальным атеросклерозом образцы сосудистой стенки и лейкоциты периферической крови дифференцируются по уровню метилирования 27373 CpG-сайтов 14425 генов.

3.2. Анализ дифференциального метилирования ДНК в группах тканей, исследованных с помощью биологических микрочипов

Анализ дифференциального метилирования ДНК заключался в выявлении наборов CpG-сайтов, уровни метилирования которых статистически значимо ($P_{FDR} < 0,05$) различались между группами исследуемых тканей. Из списков, полученных в результате сравнения уровней метилирования ДНК с помощью обобщенных линейных моделей и модифицированного t-критерия Стьюдента, отбирались только те CpG-сайты, для которых абсолютная разница средних уровней метилирования между группами сравнения $|\Delta\beta|$ превышала установленное пороговое значение – 0,2 (или 20%).

3.2.1. Сравнение уровней метилирования отдельных CpG-сайтов между атеросклеротическими бляшками и непораженными тканями артериальной стенки

Для выявления спектра CpG-сайтов, дифференциально метилированных между артериями, пораженными и непораженными атеросклеротическим процессом, были проведены сравнения уровней метилирования ДНК в парах групп КАБ-ВГА, САБ-ВГА, САБ-САН. Можно предположить, что результирующий список CpG-сайтов, совпадающих при сравнениях КАБ-ВГА и САБ-ВГА, содержит локусы ДНК, метилирование которых напрямую или косвенно связано с атеросклеротическим процессом вне зависимости от локализации пораженного сегмента артериального русла. Результаты сравнения уровней метилирования ДНК между САБ и САН позволяют обнаружить CpG-сайты, метилирование которых ассоциировано с формированием атеросклеротической бляшки и визуально различимым ремоделированием сосудистой стенки в пределах одного и того же сегмента артериального русла.

При сравнительном анализе уровней метилирования ДНК образцов из групп КАБ и ВГА было выявлено статистически значимое дифференциальное метилирование 5466 CpG-сайтов 4438 генов ($P_{FDR} < 0,05$). При этом превышение порогового уровня разности метилирования $|\Delta\beta|$ было характерно только для 203 CpG-сайтов 185 генов. Из них 101 CpG-сайт (99 генов) имел повышенный уровень метилирования в КАБ по сравнению с ВГА, а 102 CpG-сайта (86 генов) оказались, наоборот, гипометилированы в атеросклеротических бляшках (рис. 12; прил. 2 и 3).

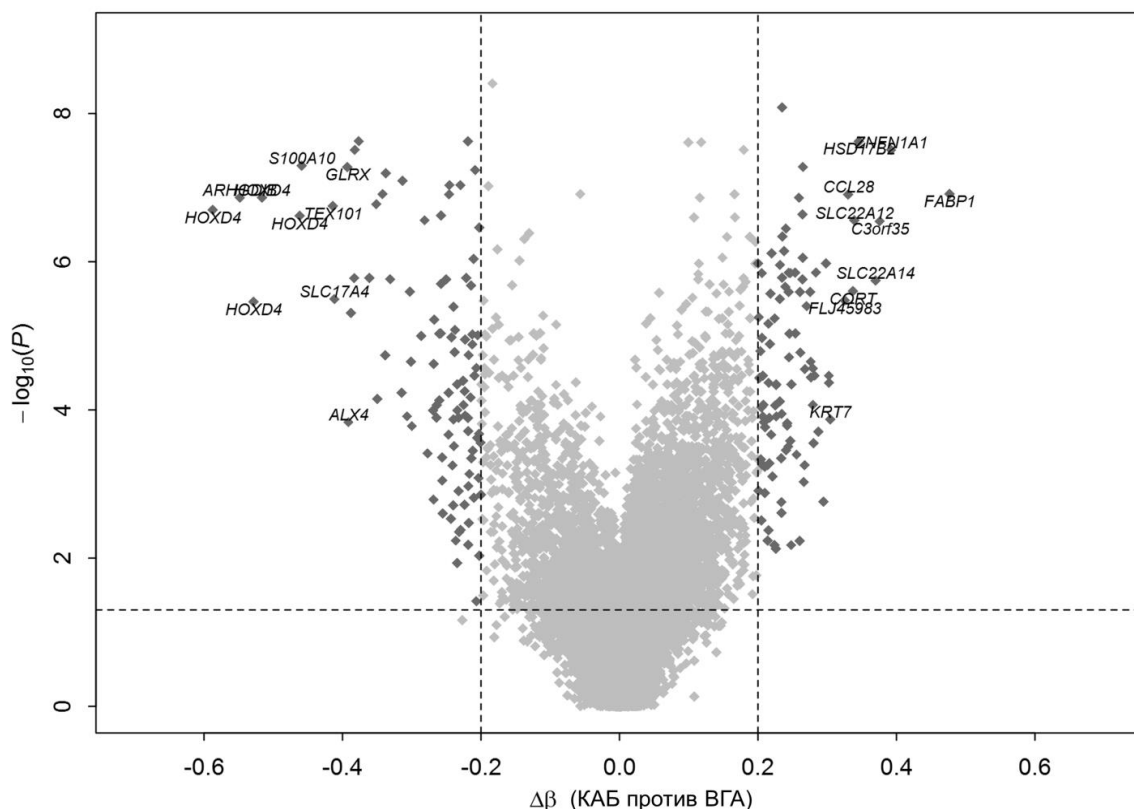


Рисунок 12. Диаграмма рассеяния разности метилирования ДНК между группами атеросклеротических бляшек правых коронарных артерий (КАБ) и внутренних грудных артерий (ВГА). Точки отображают анализируемые CpG-сайты на микрочипах, пунктирные линии – принятые пороговые значения для уровня значимости ($P_{FDR} = 0,05$) и показателя разности метилирования CpG-сайтов ($|\Delta\beta| = 0,2$). Для 20 локусов с наибольшими различиями в уровнях метилирования как в сторону увеличения (гипер-), так и снижения (гипо-) уровня метилирования в образцах КАБ по сравнению с ВГА, указаны аннотированные гены.

Плотность и локализация дифференциально метилированных локусов варьировала: из 203 CpG-сайтов одна треть (63 CpG-сайта 52 генов) была локализована в области CpG-островков. Половина «островковых» CpG-сайтов (34 CpG-сайта 33 генов) гиперметилированы в КАБ по сравнению с ВГА, другие – гипометилированы, соответственно. Тогда как из 140 CpG-динуклеотидов, локализованных вне островков, 67 (65 генов) оказались гиперметилированы, а 73 (67 генов) – гипометилированы в КАБ.

В списках дифференциально метилированных CpG-сайтов был проведен анализ представленности генов, аннотированных по данным производителя микрочипов, в различных функциональных категориях согласно классификации базы данных «Gene Ontology» (табл. 5). Для генов, уровень метилирования CpG-сайтов которых повышен в КАБ по сравнению с ВГА, наиболее представленной оказалась всего одна категория биологических процессов, связанная с гомеостазом ионов цитозольного кальция (GO:0051480), и одна категория внеклеточно расположенных белков (GO:0044421). Среди генов, CpG-сайты которых гипометилированы в КАБ относительно ВГА, оказалось намного больше генов, представленных в различных категориях биологических процессов, молекулярных функций и локализации в клетке. В частности, наиболее представленными оказались гены, связанные с функционированием иммунной системы и воспалением (GO:0002376, GO:0006954), эмбриогенезом и формированием паттернов развития (GO:0009790, GO:0007389), сигнальной регуляцией ответа на молекулы липидов (GO:0033993).

Согласно базе знаний по фармакогеномике «PharmGKB», некоторые гиперметилированные в КАБ относительно ВГА гены оказались более представлены в ряду генов, белковые продукты которых играют роль в патологических процессах, связанных со старением организма (ID: PA444330, $P_{FDR} = 0,011$). К ним относились такие гены, как *CNTN6*, *CORT*, *FOXP2*, *LEP*, *FIP1L1*, *IGFALS* и *SLC6A13*.

Представленность в категориях «Gene Ontology» генов, дифференциально метилированных в КАБ относительно ВГА

GO ID	Название категории	Число генов	Список генов	P_{FDR}
Гиперметилированные в КАБ относительно ВГА				
BP GO:0051480	Гомеостаз цитозольного кальция	7	<i>PKD2, CCL28, JPH4, UTS2, CHRNA10, P2RX3, MS4A2</i>	0,043
CC GO:0044421	Внеклеточный компартмент	16	<i>CORT, LGI1, CCL28, C1QTNF3, MMP20, USH2A, ANGPTL1, C1QTNF7, IGFALS, F3, SFTPВ, FGF7, LEP, UTS2, PLA2G3, TDGF1</i>	0,036
Гипометилированные в КАБ относительно ВГА				
BP GO:0002376	Процессы в иммунной системе	20	<i>HOXA7, CCL2, S100A8, TCF21, ARHGDIB, UBASH3A, DEFB1, CFP, PDCD1, AIM2, SPACA3, HOXA3, FASLG, VTCN1, CD3D, RUNX1, MFAP2, TLR4, CD28, ADORA3</i>	0,032
BP GO:0009790	Эмбриональное развитие	14	<i>HOXA7, HOXD3, HOXD4, HOXC5, ALX4, SCEL, HOXA2, NAT8, HOXA3, HOXB6, TCF21, RUNX1, HNF4A, HOXB5</i>	0,014
BP GO:0006954	Воспалительный ответ	10	<i>AIM2, CCL2, S100A8, CD163, DEFB1, TLR4, CD28, DARC, CFP, ADORA3</i>	0,015
BP GO:0033993	Ответ на молекулы липидов	10	<i>CCL2, WFDC1, PNLIP, UCN2, FASLG, S100A8, MEST, DEFB1, TLR4, MLC1</i>	0,040
BP GO:0007389	Процесс спецификации паттернов развития	9	<i>HOXA7, HOXD3, HOXD4, HOXC5, ALX4, HOXA2, HOXA3, HOXB6, HOXB5</i>	0,016
BP GO:0042742	Защитная реакция на бактериальные агенты	5	<i>S100A8, DEFB1, TLR4, CFP, SPACA3</i>	0,016
MF GO:0004872	Активность рецепторов	15	<i>SEMA6B, TFR2, EVI2A, GPR143, CHRNA6, CD3D, FSHR, CD163, MRGPRX2, TLR4, CD28, HNF4A, DARC, P2RY10, ADORA3</i>	0,023
MF GO:0003700	Активность транскрипционных факторов	14	<i>HOXA7, HOXD3, HOXD4, HOXC5, ALX4, HOXA2, HOXA3, HOXB6, TCF21, RUNX1, ZNF217, BATF, HNF4A, HOXB5</i>	0,023

Примечание: GO ID – идентификатор функциональной категории по классификации базы данных «Gene Ontology», BP – биологический процесс, MF – молекулярная функция, CC – клеточный компонент.

Кроме того, по данным Интернет-ресурса «CADgene», 5 генов из списка гиперметилированных в КАБ локусов, кодирующие арахидонат 12-липоксигеназу (*ALOX12*), тканевой фактор свертывания (*F3*), уротензин 2 (*UTS2*), рецептор 2 натрийуретического пептида (*NPR2*) и лептин (*LEP*), – являлись изученными кандидатными генами в отношении ассоциации их структурных вариантов с риском развития коронарного атеросклероза. Среди генов, CpG-сайты которых гипометилированы в КАБ, наблюдалась высокая представленность ассоциации их генетических вариантов с различными инфекционными, аутоиммунными и иммунодефицитными состояниями, что, по-видимому, является следствием насыщенности данного списка генами иммунного ответа и воспаления. Ранее изученными в отношении связи с коронарным атеросклерозом из данного списка, согласно «CADgene», оказались гены: аденозинового рецептора A3 (*ADORA3*), фактора хемотаксиса моноцитов (*CCL2*), кальций-связывающего белка (*S100A8*), полипептида A1 фактора свертывания XIII (*F13A1*), урокортина 2 (*UCN2*), толл-подобного рецептора 4 (*TLR4*), белка 1 программируемой клеточной гибели (*PDCD1*), – показавшие ассоциацию в кандидатных исследованиях, а также ген транскрипционного фактора 21 (*TCF21*), ассоциированный с атеросклерозом по результатам GWAS [Schunkert H. et al., 2011].

Сравнительный анализ уровней метилирования отдельных CpG-сайтов в группах САБ и ВГА выявил дифференциальное метилирование 2313 позиций, расположенных в области 2018 генов ($P_{FDR} < 0,05$). Превышение порогового значения разности средних уровней метилирования было показано для 163 CpG-сайтов 145 генов, из которых 105 CpG-сайтов (103 генов) оказались гиперметилированы, а 58 CpG-сайтов (42 генов) – гипометилированы в образцах САБ относительно ВГА (рис. 13; прил. 4 и 5).

Кроме того, из всех дифференциально метилированных CpG-сайтов, 61 (37%) входил в состав 45 генов и располагался в области CpG-островков. Причем, 34 CpG-динуклеотида (33 генов) имели повышенный уровень метилирования, а 27 CpG-сайтов (12 генов) – гипометилированы в САБ

относительно ВГА. Вне островков находилось 102 CpG-динуклеотида, из которых 71 динуклеотид (70 генов) был гиперметилирован, а 31 CpG-сайт (30 генов) – гипометилирован в САБ. Следует отметить, что в списке гипометилированных локусов встречались гены, представленные более чем одним CpG-сайтом, тогда как список гиперметилированных генов, в основном, включал единичные CpG-сайты.

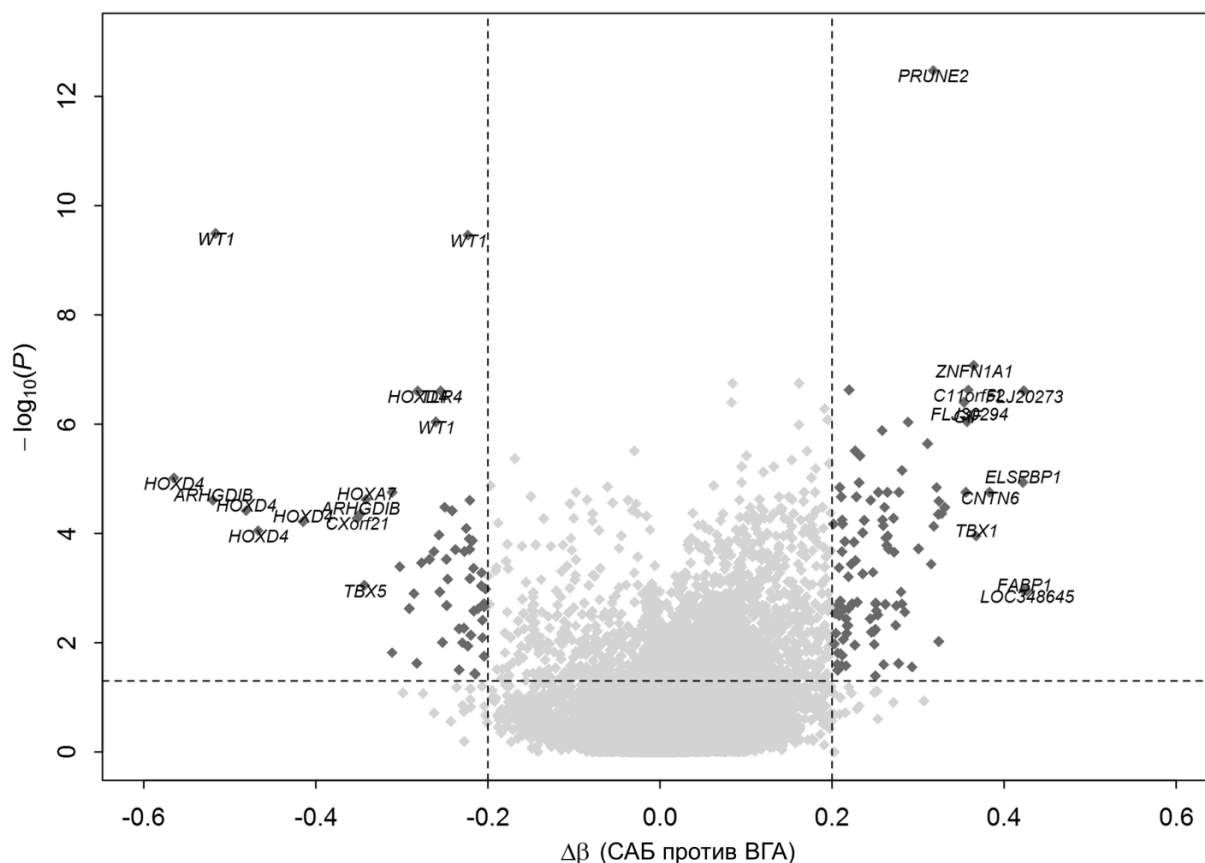


Рисунок 13. Диаграмма рассеяния разности метилирования ДНК между группами атеросклеротических бляшек сонных артерий (САБ) и внутренних грудных артерий (ВГА). Точки отображают анализируемые CpG-сайты на микрочипах, пунктирные линии – принятые пороговые значения для уровня значимости ($P_{FDR} = 0,05$) и показателя разности метилирования CpG-сайтов ($|\Delta\beta| = 0,2$). Для локусов с наибольшими, статистически значимыми различиями в уровнях метилирования в образцах САБ по сравнению с ВГА, указаны аннотированные гены.

При функциональном аннотировании генов, имеющих гиперметилированные CpG-сайты в САБ (табл. 6), было найдено три термина, связанных с функционированием рецепторных белков (GO:0004888 и GO:0017046), а также ионных транспортеров (GO:0015075). Гены, содержащие CpG-сайты с пониженным уровнем метилирования в САБ относительно ВГА, были представлены в различных перекрывающихся категориях биологических процессов, связанных с реализацией и регулированием программы развития организма (GO:0009888, GO:0007389, GO:0051093), апоптозом (GO:0012501), позитивной регуляцией клеточного ответа (GO:0048584, GO:0043123, GO:0045089) и депонированием липидов (GO:0019915). Единственная категория молекулярных функций включала гены, кодирующие сиквенс-специфичные ДНК-связывающие белковые факторы (GO:0043565). Помимо этого, повышенный уровень метилирования в САБ относительно ВГА был характерен для генов *EDNRB*, *GABRR2*, *MC4R*, *OPRK1*, *CHRNA3*, *P2RX3* и *HRH2*, белковые продукты которых являются рецепторами для различных нейроактивных лигандов и представлены в соответствующей категории базы данных о сигнальных и метаболических путях «KEGG» (ID: hsa04080, $P_{FDR} = 0,033$). Среди генов, гипометилированных в САБ, наиболее представленными оказались *MARCO*, *TLR4* и *MSR1*, продукты которых экспрессируются в макрофагах, где участвуют в захвате чужеродных частиц и формировании фагосом (ID: hsa04145, $P_{FDR} = 0,038$).

Согласно данным Интернет-ресурса «CADgene», ассоциация структурных вариантов с коронарным атеросклерозом в кандидатных исследованиях была ранее показана для 5 локусов из списка генов, гиперметилированных в САБ относительно ВГА. Эти локусы были представлены генами *UTS2*, *ALOX12*, а также *NPR2*, упоминаемыми выше и, по-видимому, являющимися общими для случаев поражения различных артериальных бассейнов.

Представленность в категориях «Gene Ontology» генов, дифференциально метилированных в САБ относительно ВГА

GO ID	Название категории	Число генов	Гены	P_{FDR}
Гиперметилированные в САБ относительно ВГА				
MF GO:0004888	Активность рецепторов трансмембранной передачи сигналов	14	<i>OPRK1, PAX8, P2RX3, NPR2, OR51E2, MS4A2, GPR133, EDNRB, MC4R, GABRR2, PKD2L1, CHRNA3, HTR3B, HRH2</i>	0,038
MF GO:0015075	Активность трансмембранных переносчиков ионов	12	<i>SLC22A11, P2RX3, SLC22A14, MS4A2, ABCB11, VDAC3, GABRR2, PKD2L1, SLC18A1, CHRNA3, HTR3B, SLC6A13</i>	0,038
MF GO:0017046	Взаимодействие с пептидными гормонами	3	<i>EDNRB, MC4R, NPR2</i>	0,038
Гипометилированные в САБ относительно ВГА				
BP GO:0009888	Развитие тканей	13	<i>TBX5, HOXA7, HOXD3, BMX, ALX4, S100A4, SRGN, WT1, STAT5A, MEST, SPRR1A, FGF23, HOXB5</i>	0,010
BP GO:0007389	Процесс спецификации паттернов развития	8	<i>WT1, TBX5, HOXA7, HOXD3, HOXD4, ALX4, MID1, HOXB5</i>	0,003
BP GO:0051093	Негативная регуляция развития	7	<i>WT1, TBX5, HOXA7, STAT5A, FGF23, TLR4, SRGN</i>	0,023
BP GO:0012501	Программируемая клеточная гибель	11	<i>TBX5, TNFRSF9, BMX, TRAF1, AIM2, ALX4, SRGN, WT1, TNFSF10, STAT5A, TLR4</i>	0,046
BP GO:0048584	Позитивная регуляция ответа на стимулы	9	<i>MARCO, TRAF1, AIM2, S100A4, TNFSF10, STAT5A, TLR4, FGF23, MID1</i>	0,046
BP GO:0043123	Позитивная регуляция каскада I-кВ/NF-кВ	4	<i>TNFSF10, TRAF1, TLR4, S100A4</i>	0,023
BP GO:0045089	Активация врожденного иммунитета	4	<i>MARCO, STAT5A, AIM2, TLR4</i>	0,034
BP GO:0019915	Депонирование липидных молекул	3	<i>STAT5A, MEST, MSR1</i>	0,023
MF GO:0043565	Сиквенс-специфичное связывание ДНК	10	<i>TBX5, HOXA7, HOXD3, HOXD4, ALX4, WT1, STAT5A, DMRT3, BATF, HOXB5</i>	0,001

Примечание: GO ID – идентификатор функциональной категории по классификации базы данных «Gene Ontology», BP – биологический процесс, MF – молекулярная функция.

Кроме них в данный список вошли ген натрийуретического пептида А (*NPPA*) и GATA-связывающего протеина 2 (*GATA2*). В списке гипометилированных в САБ относительно ВГА локусов оказались 2 кандидатных гена (*UCN2* и *TLR4*), которые также присутствовали среди генов со сниженным уровнем метилирования в КАБ относительно ВГА. К тому же, по данным «PharmGKB» для белковых продуктов генов, гипометилированных в САБ, было характерно участие в различных воспалительных реакциях инфекционного генеза.

Для локус-специфического метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках в независимости от их локализации можно выделить несколько общих особенностей. Во-первых, большая часть дифференциально метилированных CpG-динуклеотидов концентрируется в районе сайта инициации транскрипции (рис. 14), что может указывать на вовлеченность aberrантного метилирования cis-регуляторных элементов, локализованных в данной области.

Во-вторых, повышенный уровень метилирования характерен для генов, белковые продукты которых задействованы в трансмембранном переносе ионов, межклеточной коммуникации и поддержании физиологического гомеостаза организма. Гипометилированное состояние в пораженной атеросклерозом стенке артерий являлось особенностью некоторых генов, связанных с процессами пролиферации и дифференцировки клеток, регуляцией клеточного ответа на различные стимулы (в том числе молекулы липидов) и реализации механизмов иммунной защиты. Не удивительно, что наиболее представленными в данном списке являлись гены транскрипционных факторов.

В-третьих, для некоторых генов (*UTS2*, *ALOX12*, *NPR2*, *UCN2* и *TLR4*) ранее была выявлена ассоциация их структурных вариантов с коронарным атеросклерозом. Не исключено, что aberrантное метилирование данных генов в артериальной стенке также вносит вклад в риск развития атеросклеротического поражения.

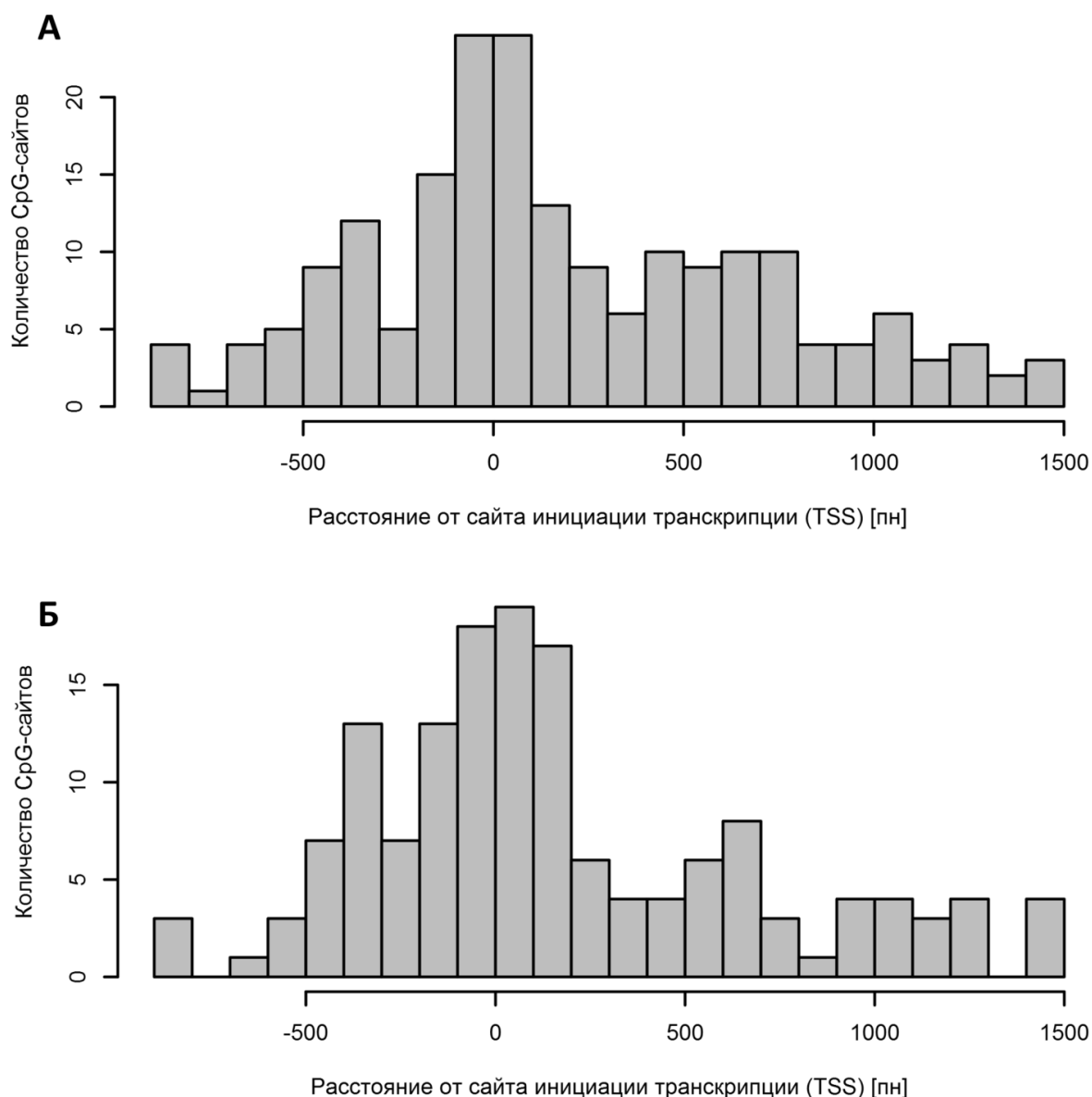


Рисунок 14. Количество CpG-сайтов, дифференциально метилированных в атеросклеротических бляшках коронарных (А) и сонных артерий (Б) относительно внутренних грудных артерий на разном расстоянии от сайта инициации транскрипции (TSS).

Общими для списков дифференциально метилированных в КАБ и САБ по сравнению с ВГА, оказались 72 CpG-сайта (65 генов). Уровни метилирования данных локусов в изученных образцах представлены на диаграмме (рис. 15).

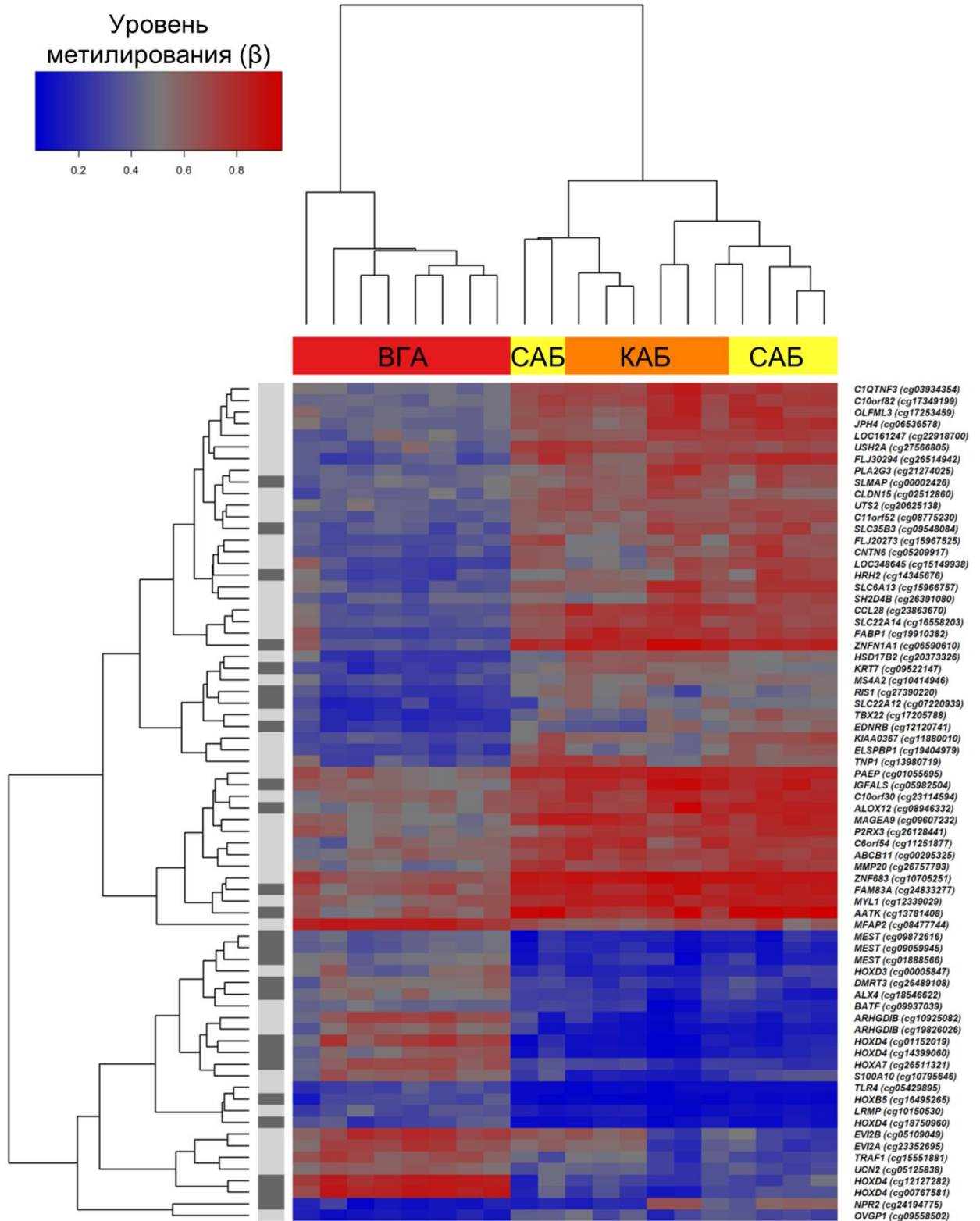


Рисунок 15. Тепловая карта уровней метилирования CpG-сайтов, дифференциально метилированных в тканях атеросклеротических бляшек из области коронарных (КАБ) и сонных (САБ) артерий по сравнению с образцами внутренних грудных артерий (ВГА). Темно-серым цветом слева от теплокарты указаны CpG-сайты, входящие в состав CpG-островков.

В образцах пораженных атеросклерозом артерий наблюдалось преимущественно гиперметилирование отдельных CpG-сайтов по сравнению с редко поражаемыми атеросклерозом ВГА. Однако наиболее представленной в CpG-островках оказалась фракция сайтов, гипометилированных в атеросклеротических бляшках относительно ВГА. В то же время, хотя и существовала статистически значимая разница между уровнями метилирования в сравниваемых группах, характер метилирования был таков, что если в одной группе сравнения величина β достигала крайних значений (соответствующих практически полному метилированию или деметилированию данного CpG-сайта во всех клетках образца), то в другой группе наблюдались промежуточные значения β . То есть не было выявлено локусов, для которых были бы зарегистрированы полярные значения уровня метилирования в сравниваемых группах. Кроме того, для выделенных CpG-сайтов также наблюдалась относительно невысокая вариация уровней их метилирования внутри групп, обусловленные, по-видимому, гетерогенностью клеточного состава образцов и межиндивидуальной вариабельностью метилирования ДНК.

Все 48 CpG-сайтов, гиперметилированных в атеросклеротических бляшках по сравнению с тканями ВГА, относились к разным генам, в первом приближении функционально не связанным друг с другом. Поиск представленностей белковых продуктов в базе данных «WikiPathway» позволил выявить пары взаимосвязанных генов, вовлеченных в общие сигнальные пути белка G13 (ID: WP524, гены *ARHGD1B* и *MYL1*) и эндотелина (ID: WP2197, гены *EDNRB* и *MYL1*), а также синтез простагландинов (ID: WP98, гены *EDNRB* и *S100A10*) [Kelder T. et al., 2012].

Гипометилированы в атеросклеротических бляшках относительно ВГА были 24 CpG-сайта (17 генов), половина из которых входила в состав CpG-островков и находилась в области 6 генов: *ALX4*, *DMRT3*, *HOXA7*, *HOXB5*, *HOXD4* и *MEST*. Белковые продукты данных генов являются транскрипционными факторами, большая часть из которых играет ключевую

роль в эмбриогенезе и продолжает экспрессироваться в тканях взрослого организма. Интересно, что для генов *HOXD4* и *MEST* было показано устойчивое однонаправленное изменение уровня метилирования нескольких CpG-сайтов (5 и 3, соответственно), входящих в набор проб микрочипа. Данный результат, выделяющийся на фоне информации относительно других генов, показавших множественное изменение метилирования двух и более CpG-сайтов преимущественно вне CpG-островков, привел к более пристальному рассмотрению данных генов в качестве кандидатных на предмет участия в неочевидных сигнальных путях в процессе реализации атеросклеротической патологии.

Сравнительный анализ профилей метилирования ДНК в различных сегментах сонной артерии: с атеросклеротической бляшкой (САБ) и прилежащих, без видимых невооруженным глазом патологических изменений (САН), – позволил выявить немногочисленный набор дифференциально метилированных CpG-сайтов (табл. 7). Для половины из них был характерен повышенный уровень метилирования в клетках атеросклеротической бляшки, другие же были гипометилированы относительно макроскопически неизмененных участков сонных артерий. Все CpG-сайты находились на расстоянии от сайта инициации транскрипции, не превышающим 400 п.н. Однако в составе CpG-островка был обнаружен всего один CpG-динуклеотид, принадлежащий гену *IGSF21*. Продукт данного гена принадлежит к надсемейству иммуноглобулиновых рецепторных белков, который не был ранее ассоциирован с какой-либо многофакторной патологией. Гены из данного, в целом небольшого, списка не были сверхпредставлены в какой-либо категории из рассматриваемых в данном исследовании баз данных.

Следует отметить, что для всех дифференциально метилированных CpG-сайтов не наблюдалось диаметрально противоположных уровней метилирования, которые принимали бы в сравниваемых группах крайние значения ($\beta < 0,2$ и $\beta > 0,8$). Характерная картина представляла собой список

СрG-сайтов, для которых были характерны промежуточные значения уровня метилирования в одной группе тканей в сочетании с гипер/гипометилированием в другой, и наоборот.

Таблица 7

Список дифференциально метилированных СрG-сайтов в образцах сонных артерий с разной степенью выраженности атеросклеротического поражения

Ген	СрG-сайт*	Локализация в геноме**	СрG-островок	β САБ	β САН	P_{FDR}
<i>GPR109B</i>	cg15447486	12:121767629	нет	$0,64 \pm 0,17$	$0,36 \pm 0,18$	0,044
<i>MAB21L2</i>	cg20334738	4:151722389	нет	$0,72 \pm 0,14$	$0,49 \pm 0,18$	0,036
<i>C20orf186</i>	cg21519900	20:31134273	нет	$0,64 \pm 0,08$	$0,42 \pm 0,08$	0,022
<i>HIPK3</i>	cg05501357	11:33264845	нет	$0,54 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,02$	0,034
<i>IGSF21</i>	cg23349790	1:18307163	1:18306563-18308558	$0,09 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,10$	< 0,01
<i>TANK</i>	cg23871659	2:161701610	нет	$0,18 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,02$	< 0,01
<i>TP73L</i>	cg12188416	3:190831697	нет	$0,33 \pm 0,13$	$0,56 \pm 0,10$	0,050
<i>C14orf105</i>	cg19903229	14:57030403	нет	$0,36 \pm 0,11$	$0,59 \pm 0,12$	0,035

Примечание: β – индекс (уровень) метилирования, САБ – атеросклеротические бляшки сонных артерий, САН – макроскопически неизмененные сонные артерии, * - идентификаторы СрG-сайтов даны согласно производителю микрочипа, ** - хромосома:позиция (координаты приведены относительно сборки генома GRCh36/hg18).

Первые исследования по изучению метилирования ДНК *in vivo* в тканях артериальной стенки человека, пораженной атеросклерозом, были нацелены на изучение отдельных генов-кандидатов. Таким образом, было показано гипометилирование четырех СрG-сайтов в 5'-фланкирующем регионе гена *ALOX15* в макроскопически выраженных атеросклеротических

бляшках [Hiltunen M.O. et al., 2002]. Высокий уровень метилирования регистрировали в промоторах и первых экзонах генов *ESR1* и *ESR2* в атеросклеротических бляшках коронарных артерий по сравнению с таковым в тканях аорты и внутренней грудной артерии [Post W.S. et al., 1999; Kim J. et al., 2007]. Гиперметилирование CpG-района в экзоне 2 гена *SLC16A8* установлено в атеросклеротических бляшках аорты [Zhu S. et al., 2005]. Эпигенетическая инактивация гена *TFPI2*, связанная с метилированием CpG-богатых регионов промотора, обнаружена в атеросклеротических бляшках сонных артерий [Zawadzki C. et al., 2009].

Результаты настоящего исследования не подтверждают дифференциальный характер метилирования генов *ALOX15*, *ESR1*, *ESR2*, *SLC16A8* и *TFPI2* в тканях пораженных атеросклерозом артерий по сравнению с образцами ВГА (табл. 8). Все CpG-сайты этих генов, проанализированные с помощью микрочипов, входили в состав CpG-островков и имели низкий или средний уровень метилирования (за исключением гена *SLC16A8*, CpG-сайты которого оказались гиперметилированы) во всех исследованных образцах. Интересно, что некоторые CpG-сайты гена *ESR1* показали умеренно повышенный уровень метилирования в клетках КАБ, но не САБ и САН, в которых он был, наоборот, понижен относительно ВГА.

Одним из первых прецедентов широкогеномного скрининга aberrаций метилирования ДНК в области атеросклеротической человека является работа S. Castillo-Diaz и сотр. (2010), в которой с помощью биологических микрочипов был оценен статус метилирования 10367 CpG-островков в тканях 45 образцов пораженных атеросклерозом коронарных артерий. В качестве контроля были выбраны фрагменты аорты (n = 16), полученные в результате операции по пластике аортального клапана у здоровых в отношении атеросклероза пациентов. Возраст индивидов составлял 22–79 лет, соотношение полов 1:1 [Castillo-Diaz S.A. et al., 2010].

Таблица 8

Результаты микрочипового исследования для отдельных генов, aberrантное метилирование которых ранее было показано в атеросклеротических бляшках *in vivo* у человека

Ген	СрG-сайт*	Локализация в геноме**	СрG-островок**	β КАБ	β САБ	β САН	β ВГА	β БПВ
<i>ALOX15</i>	cg09872233	17:4491674	17:4489288-4492318	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0
	cg15843823	17:4491713	17:4489288-4492318	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
<i>ESR1</i>	cg00655307	6:152170436	6:152170010-152172178	0,04 ± 0	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0	0,04 ± 0
	cg02720618	6:152171484	6:152170010-152172178	0,27 ± 0,11	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0	0,12 ± 0,06	0,13 ± 0,05
	cg07671949	6:152170031	6:152170010-152172178	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,01
	cg11251858	6:152170729	6:152170010-152172178	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	cg15626350	6:152171900	6:152170010-152172178	0,38 ± 0,12	0,31 ± 0,14	0,3 ± 0,04	0,21 ± 0,05	0,34 ± 0,04
	cg20253551	6:152171093	6:152170010-152172178	0,21 ± 0,11	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,11 ± 0,05	0,12 ± 0,04
	cg20627916	6:152170021	6:152170010-152172178	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,02
<i>ESR2</i>	cg11059483	14:63830617	14:63830389-63831156	0,08 ± 0	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
	cg16792632	14:63830961	14:63830389-63831156	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0	0,03 ± 0
<i>SLC16A8</i>	cg14014225	22:36809182	22:36809096-36809364	0,9 ± 0,05	0,91 ± 0,03	0,8 ± 0,02	0,91 ± 0,02	0,92 ± 0,02
	cg20439022	22:36808733	22:36808478-36808906	0,57 ± 0,08	0,58 ± 0,09	0,55 ± 0,01	0,54 ± 0,04	0,53 ± 0,04
<i>TFPI2</i>	cg07380959	7:93358259	7:93357211-93358411	0,05 ± 0	0,05 ± 0	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0
	cg09558850	7:93358381	7:93357211-93358411	0,24 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,19 ± 0	0,24 ± 0,03	0,31 ± 0,02
	cg14377593	7:93358119	7:93357211-93358411	0,03 ± 0	0,04 ± 0	0,06 ± 0	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0
	cg19784477	7:93357337	7:93357211-93358411	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,1	0,09 ± 0	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01
	cg22799321	7:93357557	7:93357211-93358411	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	cg23141855	7:93357828	7:93357211-93358411	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
	cg23686014	7:93357860	7:93357211-93358411	0,05 ± 0	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0	0,05 ± 0	0,05 ± 0

Примечание: КАБ – атеросклеротические бляшки коронарных артерий, САБ – атеросклеротические бляшки сонных артерий, САН – макроскопически неизмененные ткани сонных артерий, ВГА – внутренние грудные артерии, БПВ – большие подкожные вены; * - идентификаторы СрG-сайтов даны согласно производителю микрочипа, ** - хромосома:позиция (сборка генома GRCh36/hg18).

В результате исследования S. Castillo-Diaz и сотр. (2010) в контрольных образцах выявлено гиперметилирование 151 (1,4%) CpG-островка, из них в пораженных артериях 142 (94%) были деметилированы. В то же время 17 CpG-остривков, которые находились в неметилированном состоянии в неизмененных образцах, оказались гиперметилированными в тканях коронарных артерий больных с выраженным атеросклерозом. Основные функциональные категории продуктов генов, связанных с дифференциально метилированными CpG-остривками, представлены транскрипционными (23%) и сигнальными (16%) факторами, в том числе генами семейства *HOX*, *PROX1*, *NOTCH1* и *FOXP1*.

При сравнении списков дифференциально метилированных генов, полученных в данном исследовании и в работе S. Castillo-Diaz и сотр. (2010) выявлено совпадение результатов по двум генам – *HOXD4* и *GPR143*. При этом последний был в списке генов, гипометилированных только в КАБ относительно ВГА в настоящем исследовании и работе мексиканских ученых, возможно выделяя некоторую специфичность поражения коронарных артерий. *GPR143* (Xp22.3) кодирует дофаминовый рецептор, который связывается с гетеромерным G_q-белком и участвует во внутриклеточной сигнальной трансдукции. Мутации в данном гене приводят к развитию глазного альбинизма 1 типа. Связь с атеросклерозом или другими многофакторными заболеваниями ранее не найдена. Кроме того, трактовка результатов анализа метилирования ДНК, полученных на гетерогенной по полу выборке, в данном случае может быть затруднена. Касательно гена *HOXD4*, S. Castillo-Diaz и сотр. (2010) показано гиперметилирование CpG-островка, локализованного ниже гена, в тканях из области атеросклеротических бляшек коронарных артерий по сравнению с непораженной аортой. Результаты нашего микрочипового исследования противоположны – выявлено 4 CpG-сайта и 5 CpG-сайтов гена *HOXD4*, гипометилированных в КАБ и САБ, соответственно, относительно

непораженных образцов ВГА. При этом CpG-сайты локализовались в промоторной области и первом экзоне гена.

В 2014 году коллектив японских исследователей провел сравнение уровней метилирования ДНК в 48 изъятых *post mortem* образцах интимы из разных участков аорты, содержащих атеросклеротические бляшки и патологически неизмененных, на микрочиповой платформе «Illumina HumanMethylation450 BeadChip» [Yamada Y. et al., 2014]. Используя жесткий критерий уровня статистической значимости ($P < 1,03 \times 10^{-7}$), они обнаружили гипометилирование 15 CpG-сайтов 14 генов и гиперметилирование 30 CpG-сайтов 22 генов в атеросклеротических бляшках. Для нескольких генов из этих списков (*HECA*, *EBF1*, *NOD2*, *MAP4K4*, *ZEB1* и *FYN*) ранее была установлена связь с атеросклерозом. В опытах на культуре клеток НЕК293 японским ученым удалось подтвердить функциональную значимость изменения экспрессии данных генов. Однако между списками дифференциально метилированных генов, полученных коллективом Y. Yamada и сотр. (2014) и в результате настоящего исследования, не оказалось совпадающих CpG-сайтов.

В том же году была опубликована работа итальянских исследователей, которые сравнили метилирование ДНК в разных участках аорты, пораженных и непораженных атеросклерозом и полученных от одних и тех же индивидов ($n = 15$) [Zaina S. et al., 2014]. В данной работе была проведена оценка уровня метилирования более 450000 CpG-сайтов с использованием биологических микрочипов, и обнаружены 1895 дифференциально метилированных CpG-сайта. Метилирование 16 CpG-сайтов было подтверждено методами бисульфитного секвенирования и пиросеквенирования в 24 парных образцах аорты. Выбранные CpG-сайты относились к генам (семейство *HOX*, *PDGFA*, *PLAT*, *PRRX1* и *PXDN*), продукты которых участвуют в поддержании сосудистого гомеостаза. Для 7 дифференциально метилированных генов (*HOXA6*, *HOXA9*, *MIR23b*, *PDGFA*, *PLAT*, *PRRX1* и *PXDN*) была показана разная транскрипционная

активность в тех же тканях. Сопоставление списков дифференциально метилированных CpG-сайтов, полученных в данном исследовании, с результатами S. Zaina и сотр. (2014) выявило совпадения (рис. 16).

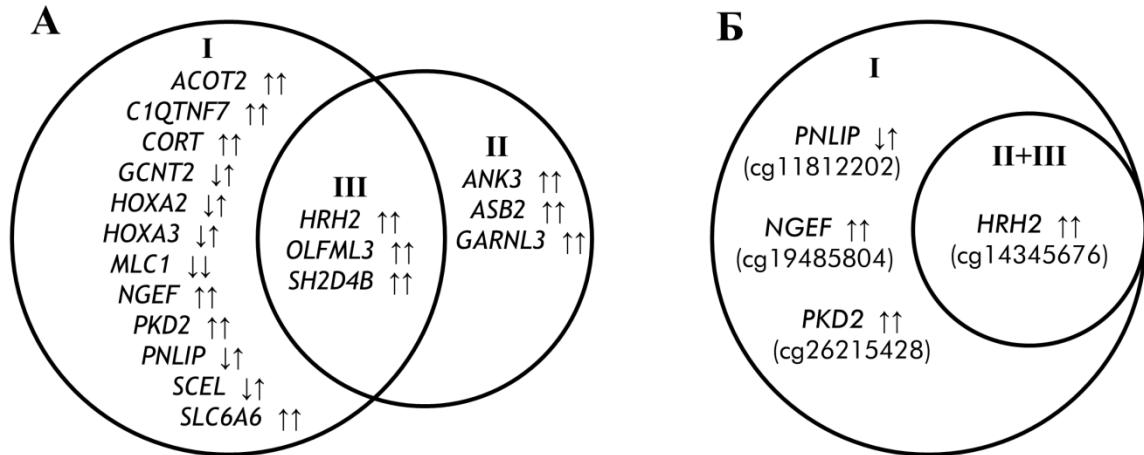


Рисунок 16. Диаграммы Эйлера-Венна, указывающие на совпадения между списками дифференциально метилированных генов (А) и CpG-сайтов (Б), полученными S. Zaina и сотр. (2014) и в результате настоящего исследования при: I – сравнении КАБ-ВГА, II – сравнении САБ-ВГА, III – список совпадающих результатов при сравнениях КАБ-ВГА и САБ-ВГА. Стрелками указано направление изменения уровня метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках относительно непораженных артерий по результатам настоящего исследования (левая стрелка) и коллектива S. Zaina и сотр. (2014) (правая стрелка).

При сравнении списков генов, дифференциально метилированных в КАБ относительно ВГА в настоящей работе и атеросклеротических бляшках и непораженных участках аорты в работе итальянских исследователей, общими оказались 15 генов (рис. 16 А). Одинаковая направленность изменения метилирования ДНК в обеих работах сохранялась только для 10 генов: *ACOT2*, *C1QTNF7*, *CORT*, *HRH2*, *NGEF*, *OLFML3*, *PKD2*, *SLC6A6* и *SH2D4B* оказались

гиперметилированы, а ген *MLC1* – гипометилирован в КАБ и атеросклеротических бляшках аорты по сравнению с ВГА и непораженными образцами аорты, соответственно.

Аналогичное сравнение со списком генов, дифференциально метилированных в САБ относительно ВГА, выявило 6 генов (*ANK3*, *ASB2*, *GARNL3*, *HRH2*, *OLFML3* и *SH2D4B*), причем последние 3 из них были общими для сравниваемых списков (рис. 16 А). Изменение в уровне метилирования CpG-сайтов этих генов было однонаправленным и характеризовалось гиперметилированием в пораженных атеросклерозом артериях по сравнению с условно контрольными образцами непораженных артерий. Следует отметить, что для большинства совпадающих генов, однако, были характерны разные CpG-сайты, дифференциально метилированные в исследованиях нашего коллектива и итальянских авторов.

Микрочиповая платформа, использованная в работе S. Zaina и сотр. (2014) «Infinium Human Methylation 450K BeadChip» («Illumina», США) включала до 90% CpG-проб, входящих в состав микрочипов примененных в настоящем исследовании [Touleimat N., Tost J., 2012], что позволило сравнить не только списки генов, но и дифференциально метилированных CpG-сайтов (рис. 16 Б). Одни и те же CpG-сайты генов *NGEF*, *PKD2* и *HRH2* показали гиперметилирование в атеросклеротических бляшках относительно непораженных артерий. При этом для CpG-сайта cg14345676 гена *HRH2* гиперметилирование сохранялось в тканях и КАБ, и САБ, и пораженных атеросклерозом образцов аорты. Ген *HRH2* (5q32.2) кодирует гистаминовый рецептор, участвующий в функционировании желудочно-кишечного тракта и, возможно, регуляции клеточного роста и дифференцировки [Del Valle J., Gantz I., 1997]. Недавно на моделях нокаутных мышей было показано, что провоспалительное действие данного рецептора может играть роль в развитии атеросклеротического поражения артерий, индуцированного гиперлипидемией

[Yamada S. et al., 2015]. Между тем, дифференциально метилированный CpG-сайт, расположенный в 5'-нетранслируемой области гена, не входит в CpG-островки и его роль в регуляции активности гена *HRH2* не очевидна.

Новым этапом высокопроизводительного анализа метилирования ДНК стало применение технологии массового параллельного секвенирования. Вышеупомянутый коллектив итальянских ученых с помощью метода полногеномного бисульфитного шотган-секвенирования (WGBS – whole genome bisulfite sequencing) сравнил профили метилирования ДНК в одном пораженном и одном непораженном атеросклерозом образцах аорты. Они обнаружили 54625 DMR со средним размером 615 п.н. и содержащими минимум 11 CpG-сайтов. Большинство из них было преимущественно гиперметилировано в атеросклеротической бляшке. Интересно, что были обнаружены минимум двукратные различия в метилировании не-CpG-цитозинов (0,4% всех CHG и 0,2% всех CHH), хотя общий уровень их метилирования был низким. Кроме того, анализ метилирования повторяющихся элементов генома выявил гиперметилирование в атеросклеротической бляшке большинства транспозонов (в том числе, Alu), и лишь LINE1 оказался гипометилированным по сравнению с непораженной аортой [Zaina S. et al., 2014].

Коллективу финских исследователей тем же методом удалось сравнить уровни метилирования ДНК, выделенной из образцов пораженных атеросклерозом бедренных артерий ($n = 22$) и внутренних грудных артерий ($n = 9$). Они обнаружили статистически значимое ($P < 0,05$) дифференциальное метилирование в 4779 промоторных, 8604 экзонных и 17782 интронных CpG-сайтов. Преобладающая часть CpG-сайтов была гипометилирована и приходилась на гены, кодирующие белки цитоскелета и хроматина. Исследователи также провели анализ экспрессии на микрочипах «Affymetrix HGU133 Plus2» и выяснили, что большинство гипометилированных генов

показало повышенный уровень (в 2,5 раза и более) мРНК-транскриптов. Интересно, что внутригенное метилирование было связано с гиперэкспрессией некоторых генов. Наконец, авторы впервые показали гипометилирование в атеросклеротических бляшках импринтированного локуса 14q32, которое сопровождалось увеличением экспрессии локализованных в нем микроРНК (miR-127, miR-136, miR-410, miR-431, miR-433) и гена *RTL1*, ассоциированного с формированием капиллярной сети [Aavik E. et al., 2014].

При сравнении данных финских исследователей с результатами настоящей работы были найдены общие дифференциально метилированные гены. Из списка генов, гипометилированных в КАБ и САБ относительно ВГА, со списком локусов, гипометилированных в работе E. Aavik и сотр. (2014), общими были 31 и 19 генов, соответственно. При этом на пересечении данных списков оказались 7 генов, гипометилированных во всех пораженных атеросклерозом образцах в рассматриваемых работах (табл. 9). Аналогично, гиперметилирование в КАБ и САБ относительно ВГА в данной работе было показано для 11 и 14 генов, соответственно, общих со списком гиперметилированных локусов в работе финских исследователей. На пересечении списков гиперметилированных локусов было выявлено 6 генов (табл. 9). Локализация дифференциально метилированных регионов или отдельных CpG-сайтов, найденных в результате данной работы и исследования E. Aavik и сотр. (2014), для большинства генов не совпадает. Несмотря на различные технологические подходы в рассматриваемых исследованиях, можно предположить, что изменения уровня и рисунка метилирования происходит на довольно протяженных участках данных генов. Функциональная значимость внутригенного метилирования изучена недостаточно, однако, несмотря на относительно бедный CpG-состав фланкирующих экзоны интронов предполагается, что их метилирование может принимать участие в регуляции альтернативного сплайсинга [Jones P.A., 2012; Gelfman S. et al., 2013].

Общие дифференциально метилированные регионы и позиции генома, найденные в настоящем исследовании и работе финских ученых

Ген	Результаты настоящего исследования *	Данные Е. Aavik и сотр. (2014)
Гипометилированные локусы		
<i>AIM2</i>	1:159046973 (промотор)	1:159040920-159041591 (интрон)
<i>ALX4</i>	11:44325585-44326645 (интрон) 11:44324736-44325270 (интрон)	11:44285997-44287067 (экзон 4) 11:44323645-44324392 (интрон)
<i>HOXB5</i>	17:46670433-46672433 (экзон 1)	17:46673205-46673614 (промотор) 17:46669566-46669857 (экзон 2) 17:46669308-46669565 (экзон 2)
<i>HOXD3</i>	2:177029073 (интрон)	2:177036842-177037073 (экзон 4) 2:177036485-177036841 (экзон 4) 2:177009038-177009386 (интрон)
<i>HOXD4</i>	2:177014251-177014718 (промотор) 2:177014827-177015340 (промотор) 2:177016282-177017663 (экзон 1)	2:177014775-177015253 (промотор)
<i>MEST</i>	7:130125647-130126979 (экзон 1)	7:130132505-130133289 (экзон 2) 7:130130377-130130815 (интрон)
<i>TRAF1</i>	9:123688715 (интрон)	9:123692681-123693197 (промотор)
Гиперметилированные локусы		
<i>CIQTNF3</i>	5:34043140 (экзон 1)	5:34012177-34012623 (интрон) 5:34012177-34012623 (интрон)
<i>CCL28</i>	5:43411929 (интрон)	5:43387395-43387965 (интрон)
<i>IKZF1</i>	7:50444256-50444506 (экзон 1)	7:50425352-50425925 (интрон)
<i>RBM47</i>	4:40517938 (экзон 1b)	4:40547406-40547639 (интрон)
<i>TMEM182</i>	2:103378506 (промотор)	2:103440597-103441327 (интрон)
<i>USH2A</i>	1:216596808 (промотор)	1:216140578-216140843 (интрон) 1:215987899-215988012 (интрон)

Примечание: координаты генома приведены относительно сборки GRCh37/hg19; * - для «островковых» CpG-сайтов указаны координаты CpG-островка, для остальных позиций – точная локализация в геноме.

Единственным дифференциально-метилованным регионом, совпавшим по локализации между результатами настоящей работы и исследованием финского коллектива, оказался гипометилованный промоторный участок гена *HOXD4*.

Различные результаты, полученные в настоящей работе и вышеописанных исследованиях, могут быть обусловлены несколькими причинами. Во-первых, образцы пораженных и не пораженных атеросклерозом артерий взяты из различных областей сосудистого русла. Во-вторых, исследование статуса метилирования ДНК проводили с использованием различных технологий и платформ (микрочипов и массового параллельного секвенирования). Кроме того, в трех работах использованы различные подходы к статистической обработке данных, в том числе при функциональной аннотации продуктов дифференциально метилированных генов. Относительно поиска дифференциально метилированных CpG-сайтов с применением микрочипов фирмы «Illumina», кажется разумным, что статистическая значимость является необходимым, но не достаточным критерием, так как даже на высоких значениях уровня P в результатах некоторых авторов можно наблюдать незначительные отличия в уровнях метилирования между сравниваемыми группами образцов. В связи с этим, целесообразным является введение дополнительного критерия биологически значимых различий, который основан на разности между средними уровнями метилирования в группах сравнения. Для объявления исследуемых позиций генома дифференциально метилированными необходимо, чтобы данный критерий превышал некоторое пороговое значение, подобранное на основании имеющейся информации о погрешности измерения, литературных предпосылок и понимания биологической роли метилирования ДНК.

3.2.2. Сравнение уровней метилирования отдельных CpG-сайтов между внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей

Помимо изучения эпигенетических особенностей атеросклеротических бляшек и непораженных тканей артериальной стенки, в настоящей работе было проведено сравнение профилей метилирования ДНК между образцами внутренней грудной артерии (ВГА) и большой подкожной вены нижней конечности (БПВ), используемых в качестве трансплантатов (графтов) при коронарном шунтировании. Результат сравнения уровней метилирования ДНК между ВГА и БПВ позволит обнаружить CpG-сайты, метилирование которых ассоциировано с молекулярной идентификацией этих сегментов сосудистого русла. Профиль метилирования ВГА и БПВ, ассоциированный с их морфофункциональными особенностями, может определять преимущества и недостатки их использования в качестве шунтов.

Сравнительный анализ уровней метилирования ДНК образцов в группах ВГА и БПВ выявил статистически значимое дифференциальное метилирование 2455 CpG-сайтов 2101 гена ($P_{FDR} < 0,05$). Разница средних уровней метилирования в группах сравнения $|\Delta\beta|$ с превышением 20%-ного порогового уровня была характерна для 213 CpG-сайтов 175 генов (рис. 17; прил. 6 и 7). Из них 96 CpG-сайтов (78 генов) оказались гиперметилированными, а 117 CpG-сайтов 99 генов, наоборот, – гипометилированными в клетках ВГА по сравнению с таковыми БПВ.

Из 213 дифференциально метилированных локусов 41% (88 CpG-сайтов 60 генов) входили в состав CpG-островков, и большая их часть (57 CpG-сайтов 42 генов) показала пониженный уровень метилирования, тогда как остальные (31 CpG-сайт 18 генов) оставались гиперметилированными в клетках ВГА относительно БПВ. Среди не входящих в состав CpG-островков 125 сайтов,

распределенных среди 116 генов, число локусов с повышенным и пониженным уровнем метилирования в ВГА относительно БПВ было примерно одинаковым: 65 CpG-сайтов (60 генов) и 60 CpG-сайтов (57 генов), соответственно.

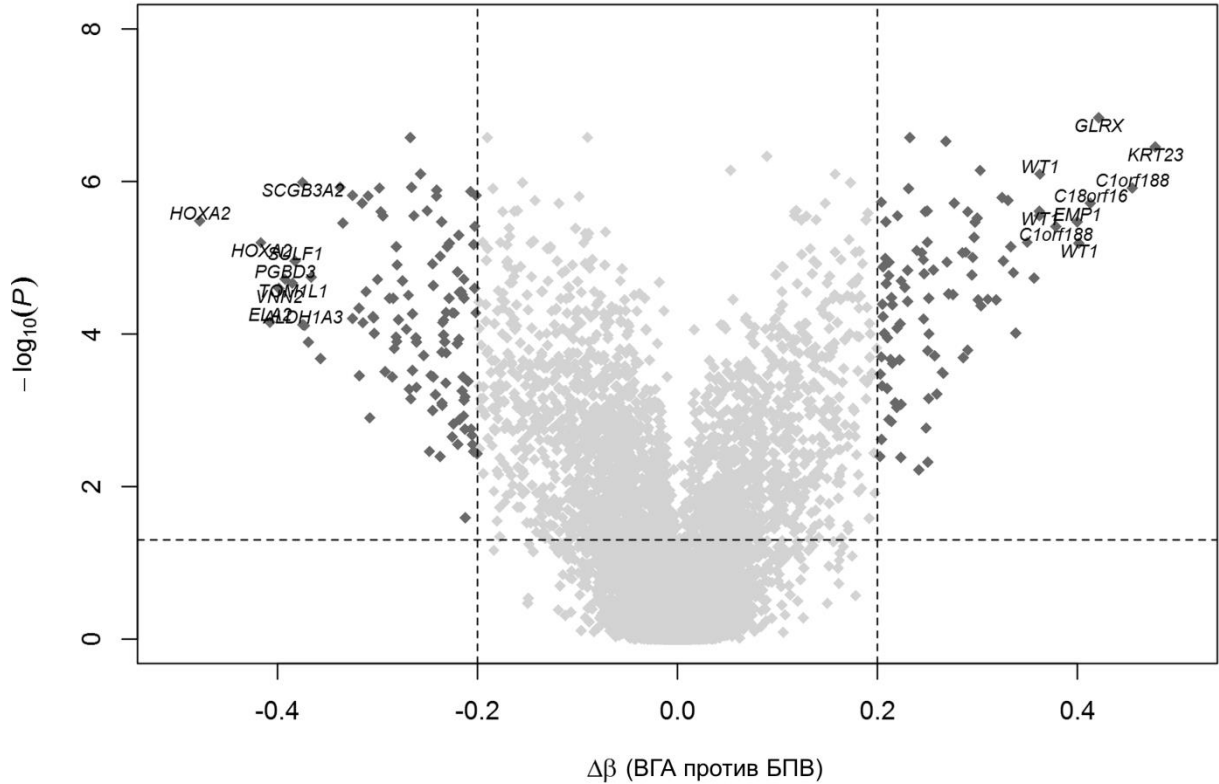


Рисунок 17. Диаграмма рассеяния и статистической значимости разности метилирования ДНК между группами внутренних грудных артерий (ВГА) и больших подкожных вен нижних конечностей (БПВ). Точки отображают CpG-сайты на микрочипах, пунктирные линии – принятые пороговые значения для уровня значимости ($P_{FDR} = 0,05$) и показателя разности метилирования CpG-сайтов ($|\Delta\beta| = 0,2$). Для локусов с наибольшими различиями в уровнях метилирования в образцах ВГА по сравнению с БПВ указаны аннотированные гены.

Гены, содержащие дифференциально метилированные CpG-сайты, были представлены в различных категориях по классификации базы данных «Gene Ontology». Причем статистически значимая сверхпредставленность в терминах

биологических процессов и молекулярных функций была характерна только для списка генов, гипометилированных в образцах ВГА относительно БПВ. В табл. 10 отражены основные термины со сверхпредставленными генами: биологические процессы, связанные с развитием (GO:0032502) и детерминацией различных характеристик организма (GO:0065008), а также молекулярные функции, включающие активность ДНК-связывающих транскрипционных факторов (GO:0003700), рецепторов (GO:0004872) и факторов роста (GO:0008083).

Список генов в категории процессов развития разделялся на множество более мелких и пересекающихся списков, насыщающих дочерние термины биологических процессов (не представленные в табл. 10), включающих развитие тканей (GO:0009888, $P_{FDR} = 0,001$), органов (GO:0048513, $P_{FDR} = 0,003$) и их систем (GO:0048731, $P_{FDR} = 0,001$). Сверхпредставленность наблюдалась и в их подкатегориях, связанных с развитием соединительной ткани (GO:0061448, $P_{FDR} = 0,002$), скелетной системы (GO:0001501, $P_{FDR} = 0,002$), и хрящей (GO:0051216, $P_{FDR} = 0,001$), а также морфогенезом органов (GO:0009887, $P_{FDR} = 0,002$) и схожих терминах. Такое обилие терминов биологических процессов, связанных с развитием, в списке генов, дифференциально метилированных в клетках ВГА и БПВ, указывает на сильную регионарную и тканевую специфичность их профилей метилирования ДНК.

В категориях молекулярных функций были представлены гены, связанные с активностью транскрипционных факторов, рецепторов и ростовых факторов, что может быть обусловлено различными функциональными состояниями этих молекулярных систем в клетках ВГА и БПВ. Скорее всего, формирование локальных профилей метилирования некоторых генов в клетках сосудистого русла детерминируется в процессе развития организма под действием микроокружения и связано с морфофункциональными особенностями его

сегментов (тем более таких различных, как ВГА и БПВ). Эти особенности проявляются и при использовании данных сосудов в качестве шунтов.

Таблица 10

Основные категории «Gene Ontology» генов, гипометилированных в ВГА по сравнению с БПВ

GO ID	Название категории	Число генов	Гены	P_{FDR}
BP GO:0032502	Процессы развития	45	<i>SOST, KRT4, TCF3, MYL1, SRGN, ZNF536, AQP1, SULF1, PPL, HOXA11, NTF3, SEPP1, ASGR2, F3, EFEMP1, PDCD1, ALDH1A3, ZEB1, DAB2IP, CYP17A1, P2RY2, THRB, BNC1, TCP11, MSX1, SNAI1, FGF6, TMEM204, MARK2, HOXB3, AVIL, GFAP, HNF1A, ZIC3, HOXA2, HOXA5, DAND5, TG, DLX5, RUNX1, P2RX5, CD28, RBP1, EGLN1, CA9</i>	0,0027
BP GO:0065008	Регуляция биологических качеств	30	<i>THRB, SUN1, MSX1, P2RX3, TCF3, SRGN, MS4A2, AQP1, GP9, DIO1, ELANE, MC4R, SLC22A12, NTF3, ASGR2, SLC6A13, F3, AVIL, HNF1A, GFAP, HOXA5, ALDH1A3, TG, RDH12, CYP17A1, P2RX5, RBP1, EGLN1, P2RY2, CCL1</i>	0,0049
MF GO:0003700	Активность транскрипционных факторов	15	<i>THRB, BNC1, HNF1A, ZIC3, MSX1, SNAI1, HOXA2, HOXA5, TCF3, ZEB1, NFATC2, DLX5, RUNX1, HOXA11, HOXB3</i>	0,0222
MF GO:0004872	Рецепторная активность	15	<i>EFEMP1, THRB, GPRC5A, OPRK1, P2RX3, MS4A2, TG, MC4R, TNFRSF25, ASGR2, P2RX5, CD28, HTR3B, RXFP4, P2RY2,</i>	0,0493
MF GO:0008083	Активность факторов роста	5	<i>EFEMP1, IL9, NTF3, MACC1, FGF6</i>	0,0466

Примечание: GO ID – идентификатор функциональной категории по классификации базы данных «Gene Ontology», BP – биологический процесс, MF – молекулярная функция.

Основные атеросклеротические изменения в аутовенозных трансплантатах, связанные не только с утолщением интимы вследствие клеточной пролиферации и фиброза, но и накоплением пенистых клеток и образованием некротического ядра, происходят раньше, чем в аутоартериальных шунтах [Otsuka F. et al., 2013]. Эпигенетические профили CpG-сайтов клеток сосудов, ассоциированных с определенными паттернами экспрессии, могут играть немаловажную роль в рестенозе шунтов. Прежде всего, это относится к «островковым» CpG-сайтам. Наличие не менее двух таких сайтов, дифференциально метилированных в клетках ВГА по сравнению с клетками БПВ, было характерно всего для 11 генов (табл. 11).

Например, ген *DAB2IP*, для которого было найдено гипометилирование в ВГА относительно БПВ двух сайтов, принадлежащих одному и тому же CpG-островку (табл. 11). Продукт данного гена – белок DAB2IP из семейства активаторов Ras-ГТФаз – относится к категории опухолевых супрессоров. Белок является важным компонентом многих сигнальных путей, контролирующих рост, миграцию и дифференцировку клеток, апоптоз, врожденный иммунитет, воспаление и ангиогенез. Инактивация экспрессии гена *DAB2IP* с помощью гиперметилирования выявляется при злокачественных новообразованиях [Dote H. et al., 2005]. Недавно была установлена ассоциация полиморфного варианта rs7025486 гена *DAB2IP* с атеросклерозом коронарных артерий [Harrison S.C. et al., 2012]. Экспрессия данного гена обнаружена в ЭК и ГМК сосудистой стенки у мышей. В эндотелии функция белка заключается в ингибировании воспалительного ответа [Huang Q. et al., 2013]. С другой стороны, при атеросклеротическом поражении шунта Dab2ip ингибирует формирование неоинтимы через контроль инфильтрации Т-клеток и ингибирование IFN- γ -опосредованного сигнального пути миграции и пролиферации ГМК [Min W., Pober J.S., 2011].

CpG-островки, дифференциально метилированные в ВГА относительно БПВ

Ген	CpG-островок*	CpG-сайт**	$\Delta\beta$ (ВГА-БПВ)	P_{FDR}
<i>ALDH1A3</i>	15:99236455-99238833	cg23191950	-0,22	$5,57 \times 10^{-4}$
		cg27652350	-0,30	$9,79 \times 10^{-5}$
		cg26509022	-0,30	$5,92 \times 10^{-5}$
		cg19224278	-0,37	$7,56 \times 10^{-5}$
<i>RNF207</i>	1:6190892-6192286	cg15731815	0,45	$1,22 \times 10^{-6}$
		cg00030047	0,38	$3,89 \times 10^{-6}$
<i>DAB2IP</i>	9:123500662-123502056	cg24794433	-0,25	$3,51 \times 10^{-4}$
		cg08128768	-0,26	$1,27 \times 10^{-4}$
<i>DLX5</i>	7:96487969-96489640	cg27016494	-0,21	$3,63 \times 10^{-4}$
	7:96489769-96490524	cg24115040	-0,22	$5,33 \times 10^{-5}$
	7:96487969-96489640	cg11500797	-0,37	$7,73 \times 10^{-5}$
		cg00503840	-0,25	$1,91 \times 10^{-4}$
		cg13462129	-0,28	$1,10 \times 10^{-4}$
		cg12041387	-0,28	$1,55 \times 10^{-4}$
<i>HOXA2</i>	7:27108930-27109394	cg20080624	-0,29	$3,66 \times 10^{-4}$
		cg09871315	-0,42	$6,34 \times 10^{-6}$
<i>HOXA5</i>	7:27147983-27152159	cg26069745	-0,48	$3,27 \times 10^{-6}$
		cg12128839	-0,37	$1,79 \times 10^{-5}$
<i>MSX1</i>	4:4908144-4911629	cg02248486	-0,60	$1,05 \times 10^{-5}$
		cg20588069	-0,22	$3,06 \times 10^{-5}$
<i>PAX9</i>	14:36199815-36200327	cg24840099	-0,24	$4,04 \times 10^{-3}$
		cg26620157	0,30	$3,56 \times 10^{-5}$
<i>SOST</i>	17:39191384-39191613	cg00509670	0,29	$8,57 \times 10^{-6}$
		cg14256699	-0,28	$7,16 \times 10^{-6}$
<i>WT1</i>	11:32404590-32406255	cg22264436	-0,34	$1,19 \times 10^{-6}$
		cg12006284	0,25	$1,05 \times 10^{-5}$
	11:32406516-32407359	cg04096767	0,22	$2,01 \times 10^{-5}$
		cg25782229	0,58	$5,45 \times 10^{-6}$
		cg04456238	0,36	$2,82 \times 10^{-6}$
		cg16501028	0,34	$9,77 \times 10^{-5}$
		cg05222924	0,29	$2,49 \times 10^{-6}$
	11:32408563-32409903	cg06516124	0,26	$1,45 \times 10^{-5}$
		cg01693350	0,36	$7,99 \times 10^{-7}$
		cg13641903	0,36	$2,46 \times 10^{-6}$
		cg15446391	0,25	$2,42 \times 10^{-6}$
	11:32411271-32413831	cg12781568	0,24	$6,03 \times 10^{-3}$
cg16463460		0,40	$6,42 \times 10^{-6}$	
<i>ZC3H7A</i>	16:11783829-11784227	cg26521448	-0,20	$3,88 \times 10^{-6}$
		cg14959707	-0,31	$1,55 \times 10^{-6}$

Примечание: * - хромосома:позиция (координаты даны по сборке генома GRCh36/hg18),

** - идентификаторы CpG-сайтов указаны согласно производителю микрочипа.

Полагают, что индукция синтеза DAB2IP может служить терапевтическим подходом для профилактики атеросклеротического поражения шунта [Min W., Pober J.S., 2011].

Другой ген, *WT1*, содержал наибольшее число CpG-сайтов, дифференциально метилированных между ВГА и БПВ (табл. 11). Причем уровень метилирования всех его CpG-сайтов из данного списка в образцах ВГА значительно превышал таковой в клетках БПВ. Данный ген обладает комплексным тканеспецифичным и импринтированным паттерном импринтинга, проявляя биаллельную или моноаллельную экспрессию с одного из родительских гомологов в различных типах тканей [Dallosso A.R. et al., 2004].

Ген *WT1* кодирует белок, который содержит мотивы типа «цинкового пальца» и относится к транскрипционным факторам и онкосупрессорам. Он играет ключевую роль в процессе развития мочеполовой системы, а его мутации наблюдаются у пациентов с опухолью Вильмса. Функциональная значимость гена *WT1* в последнее время раскрывается и в отношении формирования сердечно-сосудистой системы и ее ремоделирования в онтогенезе. В ответ на локальную ишемию и гипоксию сердца у крыс экспрессия гена *Wt1* в коронарных артериях увеличивалась более чем в два раза [Wagner K.D. et al., 2002]. Ген *Wt1* играет важную роль в процессе нормального ангиогенеза и формировании сосудов сердца, а также в неоваскуляризации миокарда после инфаркта [Scholz H. et al., 2009]. Ангиогенное действие его продукта реализуется через стимуляцию экспрессии кадгерина-5 (CDH5), рецепторов к эндотелиальному фактору роста (VEGF) и ангиопоэтина-2 [Kirschner K.M. et al., 2010]. Недавние исследования показали, что в эмбриональном периоде *Wt1* выявляется в большинстве эндотелиальных клеток миокарда желудочков формирующегося сердца, но в сердце взрослого человека лишь небольшая часть ЭК продолжает синтезировать данный белок. В постинфарктный период повышение уровня экспрессии гена *Wt1* имеет

временный характер и ограничивается пораженным участком миокарда. По-видимому, индукция его экспрессии происходит в ответ на гипоксию и ассоциирована с пролиферацией ЭК, а также регуляцией экспрессии циклина D1 [Duijn S.N. et al., 2015].

Таким образом, у больных атеросклерозом внутренние грудные артерии и большие подкожные вены существенно отличаются друг от друга по уровню метилирования 213 CpG-сайтов 175 генов ($|\Delta\beta| = 0,2$, $P_{FDR} < 0,05$). Белковые продукты генов, содержащих CpG-сайты с низким уровнем метилирования во внутренних грудных артериях и больших подкожных венах, связаны с активностью транскрипционных факторов, рецепторов, факторов роста и обеспечивают процессы развития.

3.3. Подтверждающее исследование уровней метилирования отдельных CpG-сайтов генов-кандидатов в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови у больных атеросклерозом

По результатам микрочипового исследования на основании статистического и биологического критериев был составлен список CpG-сайтов, дифференциально метилированных в пораженных атеросклерозом артериях (КАБ и САБ) относительно ВГА. В этом списке более одного CpG-сайта приходилось на нескольких генов, в том числе *HOXD4* (5 CpG-сайтов) и *MEST* (3 CpG-сайта). Данные гены, гипометилированные в КАБ и САБ относительно ВГА, были выбраны в качестве кандидатных для подтверждающего анализа метилирования. Еще один кандидатный ген *AATK* включал один гиперметилированный CpG-сайт, показатель $|\Delta\beta|$ которого был достаточно высок в обоих сравнениях КАБ-ВГА и САБ-ВГА (прил. 2 и 4). Для данных генов были подобраны праймеры и условия для анализа метилирования ДНК в

области одного или нескольких CpG-сайтов, показавших дифференциальное метилирование по результатам микрочипового исследования.

3.3.1. Уровень метилирования промоторного региона гомеобоксного гена *HOXD4* и микроРНК (*MIR10B*)

Ген *HOXD4* располагается на длинном плече 2-й хромосомы (локус 2q31.1) и состоит из двух экзонов (рис. 18).

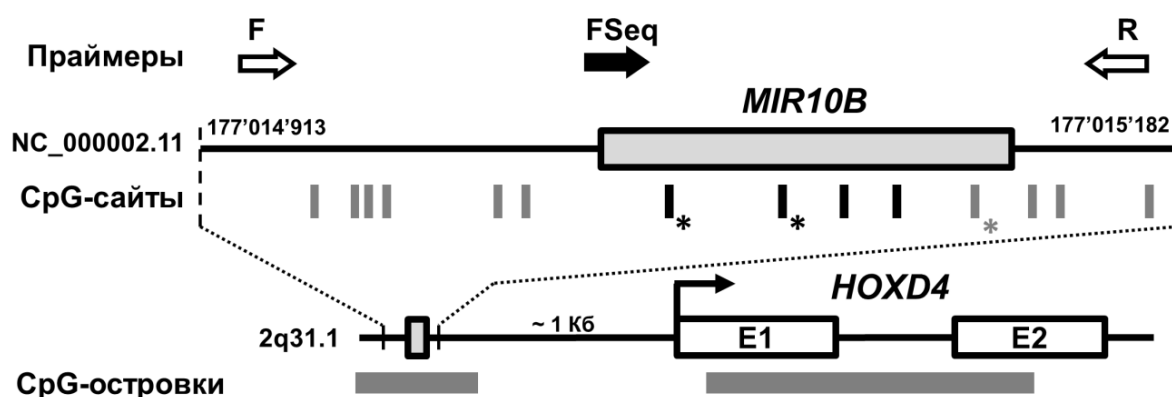


Рисунок 18. Структура анализируемого региона гена *HOXD4/MIR10B*: области гибридизации ДНК с прямым (F) и обратным (R) праймерами для ПЦР, а также секвенирующим (FSeq) праймером указаны стрелками. Проанализированные в данном исследовании CpG-сайты выделены черным цветом. Звездочками отмечены CpG-сайты, вошедшие в состав микрочипов. Координаты приведены согласно сборке генома GRCh36/hg18.

В промоторной области гена находится последовательность, кодирующая предшественник микроРНК miR-10b (ген *MIR10B*). В данном участке ДНК располагается CpG-островок, отдельные CpG-сайты которого оказались дифференциально метилированы по результатам микрочипового исследования в тканях КАБ и САБ относительно ВГА (на рис. 18* отмечены звездочками).

Исследованный методом бисульфитного пиросеквенирования регион генома расположен в области предшественника малой некодирующей РНК (*MIR10B*) и примерно на 1 Кб выше сайта старта транскрипции гена *HOXD4*. Регион включал 4 CpG-сайта (на рис. 18 выделены черным цветом), в том числе CpG-сайты cg01152019 и cg14399060, оказавшиеся дифференциально метилированными при микрочиповом исследовании (прил. 3 и 5).

В результате бисульфитного пиросеквенирования выявлено статистически значимое снижение уровня метилирования как отдельных CpG-сайтов (табл. 12), так и общее гипометилирование (рис. 19) данного региона ДНК в образцах пораженных атеросклерозом артерий, а также ЛПК по сравнению с неизмененными артериями и венами. При этом средний уровень метилирования в образцах КАБ и САБ составил 18%, в ЛПК – 16%, а в образцах ВГА и БПВ – 61% и 59%, соответственно.

Таблица 12

Уровни метилирования отдельных CpG-сайтов промоторного региона гена *HOXD4* (*MIR10B*) в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови

CpG-сайт [координата*]	Уровень метилирования (%)**				
	САБ	КАБ	ЛПК	ВГА	БПВ
cg01152019 [2:177015044]	14 (10 - 16)	12 (10 - 15)	10 (7 - 13)	62 (61 - 66)	62 (60 - 64)
cg14399060 [2:177015070]	13 (11 - 16)	13 (11 - 15)	11 (9 - 13)	49 (44 - 53)	39 (37 - 42)
CpG 3 [2:177015088]	26 (22 - 29)	26 (22 - 28)	28 (24 - 32)	71 (66 - 75)	73 (70 - 76)
CpG 4 [2:177015104]	29 (25 - 33)	23 (21 - 26)	20 (19 - 26)	61 (52 - 73)	52 (51 - 53)

Примечание: * - хромосома: позиция (локализация сайтов указана по сборке генома GRCh37/hg19); ** - оценками распределения уровней метилирования являлись медиана, а также первый и третий квартили (указаны в круглых скобках); САБ - атеросклеротические бляшки сонных артерий, КАБ - атеросклеротические бляшки коронарных артерий, ЛПК - лейкоциты периферической крови, ВГА - внутренние грудные артерии, БПВ - большие подкожные вены.

Полученные результаты подтверждают данные относительно уровня метилирования сайтов *cg01152019* и *cg14399060* в тканях сосудистой стенки, установленных по результатам микрочипового исследования. У больных атеросклерозом обнаруживалось гиперметилирование (полное или частичное) CpG-сайтов локуса в тканях ВГА и БПВ, непораженных атеросклерозом, наравне с гипометилированием *cg01152019*, *cg14399060* и рядом расположенных CpG-сайтов ($P < 0,001$) в тканях атеросклеротических бляшек в независимости от их локализации (в сонных или коронарных артериях).

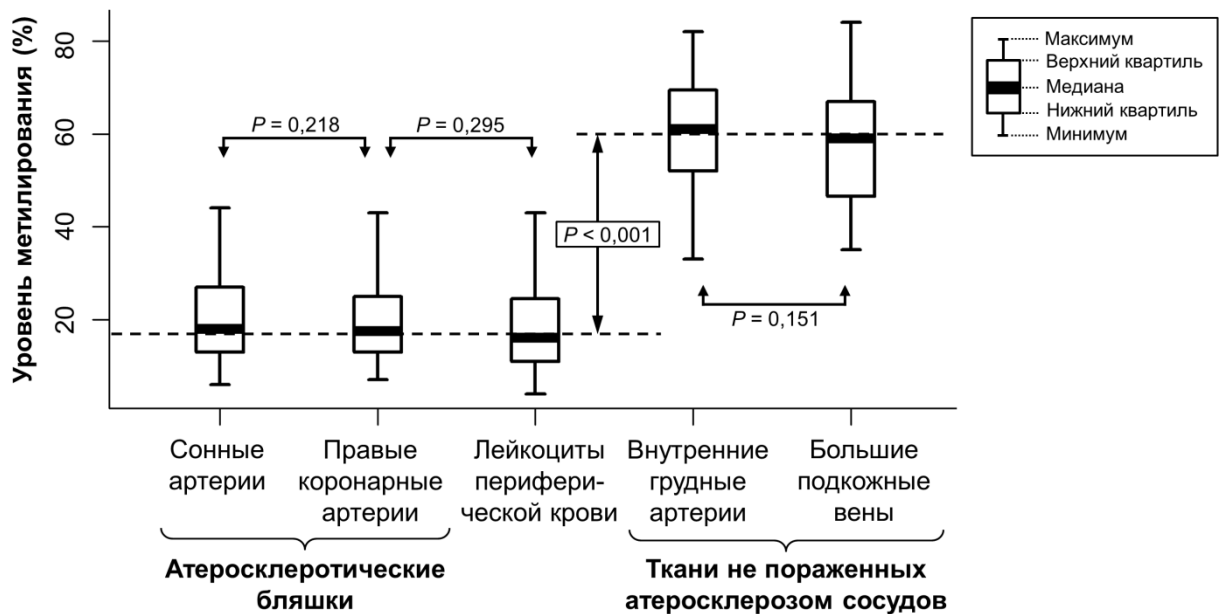


Рисунок 19. Уровень метилирования анализируемого региона гена *HOXD4* (*MIR10B*) в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови.

При этом воспроизводимость измерений уровня метилирования β CpG-сайтов *cg01152019* и *cg14399060*, полученных с помощью биологических микрочипов, была высокой и подтверждалась для тех же самых образцов методом бисульфитного пиросеквенирования (рис. 20).

Ген *HOXD4* относится к категории гомеобокс-содержащих генов, которые кодируют семейство высоко консервативных транскрипционных факторов.

Семейство *HOX* включает 39 членов, сгруппированных в 4 кластера (*HOXA-HOXD*). Гомеодомен-содержащие белки являются ключевыми регуляторами эмбрионального развития. Эти гены также экспрессируются и в клетках взрослого человека, где они выступают в качестве регуляторов клеточной дифференцировки [Morgan R., 2006]. Поэтому белковые продукты генов *HOX* играют важную роль не только во время формирования сердечно-сосудистой системы у эмбриона, но и при ремоделировании сосудов в процессе ангиогенеза в постнатальном периоде. В частности, они регулируют пролиферацию, дифференцировку и миграцию эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудистой стенки [Gorski D.H., Walsh K., 2000]. Данные белки определяют фенотипические характеристики клеток при васкулогенезе и ремоделировании сосудов как при физиологических (например, заживление ран, менструальный цикл), так и при патологических состояниях [Pruett N.D. et al., 2008].

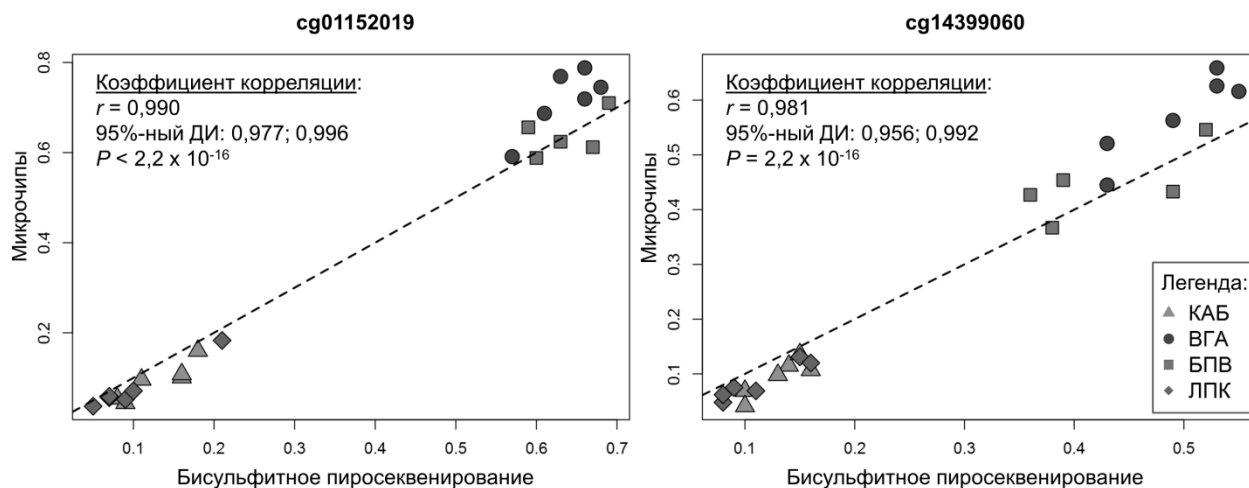


Рисунок 20. Корреляционная зависимость между использованными в настоящей работе методами измерения уровней метилирования CpG-сайтов гена *HOXD4* (cg01152019 и cg14399060) в образцах тканей сосудистого русла и лейкоцитах периферической крови.

Следует отметить, что по результатам микрочипового исследования в настоящей работе метилирование *HOXD*-кластера было неравномерным (рис. 21). На фоне общего низкого уровня метилирования в данном регионе наблюдалось гиперметилирование локусов *HOXD4* и, в меньшей степени, *HOXD3* в тканях ВГА и БПВ. В группах образцов из области КАБ и ЛПК наблюдался неизменно низкий уровень метилирования на протяжении всего кластера. В связи с этим, корректнее было бы говорить не о гипометилировании гена *HOXD4* в образцах КАБ и САБ относительно ВГА и БПВ, а о гиперметилировании данного локуса в непораженных атеросклерозом образцах сосудистой стенки и снижении его уровня метилирования при атеросклерозе.

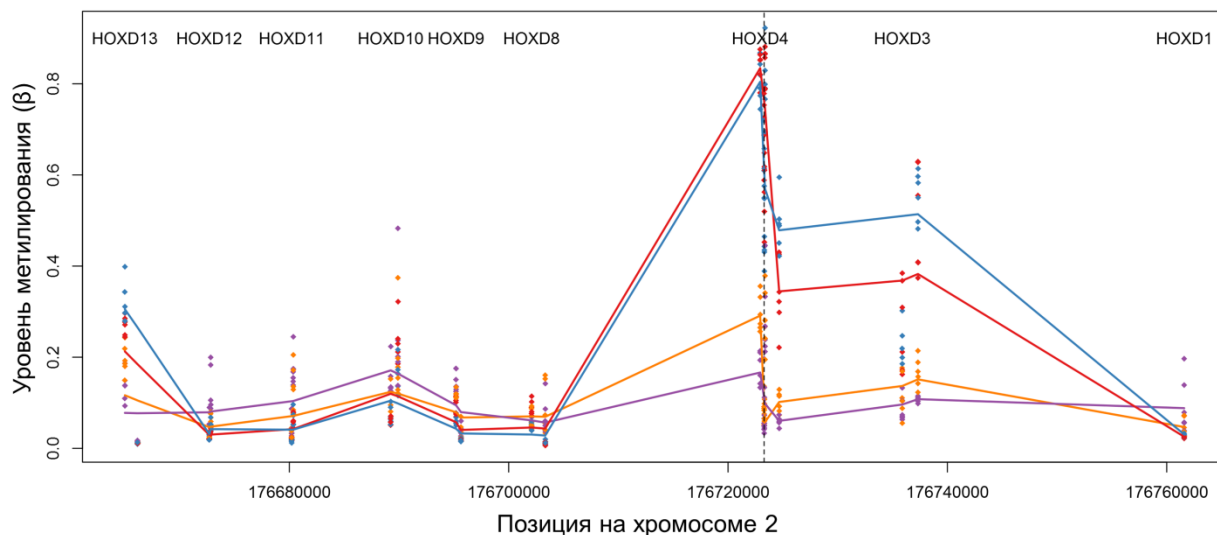


Рисунок 21. Профиль метилирования *HOXD*-кластера по результатам микрочипового исследования: точки показывают уровни метилирования в образцах КАБ (оранжевые), ВГА (красные), БПВ (синие) и ЛПК (фиолетовые), линии соединяют средние значения в группе. Координаты позиций даны по сборке генома GRCh36/hg18.

Функциональные последствия изменения уровня метилирования в исследованном участке генома могут быть связаны с экспрессией гена *HOXD4*. В частности, дифференциальная экспрессия гена на уровне мРНК была

выявлена в тканях аорты с различной степенью поражения атеросклеротическим процессом [Seo D. et al., 2004]. Кроме того, экспрессия его паралога (обладающего структурной гомологией и функциональной взаимозаменяемостью), гена *HOXA4*, регистрировалась в тканях сердечно-сосудистой системы в постнатальном периоде и была снижена при патологическом ремоделировании (аневризме) абдоминальной аорты [Gorski D.H., Walsh K., 2000; Lillvis J.H. et al., 2011]. Наконец, недавно в культурах эндотелиальных клеток человека показана дифференциальная экспрессия гена *HOXD4* в зависимости от локализации эндотелиоцитов на протяжении сосудистого русла [Toshner M et al., 2014]. Причем, ранее была установлена роль гена *HOXD4* в качестве ключевого регулятора васкулогенеза у рыбок *Danio rerio* [Amali A.A. et al., 2013]. Таким образом, можно предположить, что повышение экспрессии гена *HOXD4*, реализуемое через гипометилирование его промотора, играет первоочередную роль в процессах пролиферации и миграции ЭК, связанных с реваскуляризацией атеросклеротической бляшки собственными сосудами и формированием неоинтимы.

С другой стороны, все четыре анализируемых CpG-сайта входят в последовательность гена *MIR10B*, кодирующего микроРНК (рис. 18). Мишенями микроРНК являются свыше 50% белок-кодирующих генов, и практически все функции клеток могут подлежать их контролю [Biagioni F. et al., 2013]. Увеличение экспрессии *MIR10B* было показано в тканях выраженных атеросклеротических бляшек сонных артерий по сравнению с ВГА [Bidzhekov K. et al., 2012]. Предполагается несколько механизмов участия miR-10b в атерогенезе (рис. 22). Данная микроРНК индуцирует миграцию ЭК и ангиогенез посредством снижения экспрессии гена *HOXD10* и других механизмов [Shen X. et al, 2011; Hassel D. et al., 2012]. В макрофагах miR-10b через репрессию белков ABCA1 и ABCG1 негативно регулирует процесс переноса холестерина из макрофагов на ЛПВП («эффлюкс холестерина»)

[Wang D. et al., 2012]. Таким образом, снижается интенсивность обратного транспорта холестерина из тканей сосудистой стенки в кровь и его накопление, что является ключевым событием атерогенеза. В связи с этим, miR10b в числе прочих микроРНК, ингибирующих «эффлюкс холестерина», является кандидатом для разрабатываемых моделей таргетной фармакотерапии (например, антоцианидином), направленной на увеличение обратного транспорта и отдачи холестерина макрофагами [Dávalos A., Fernández-Hernando C., 2013].

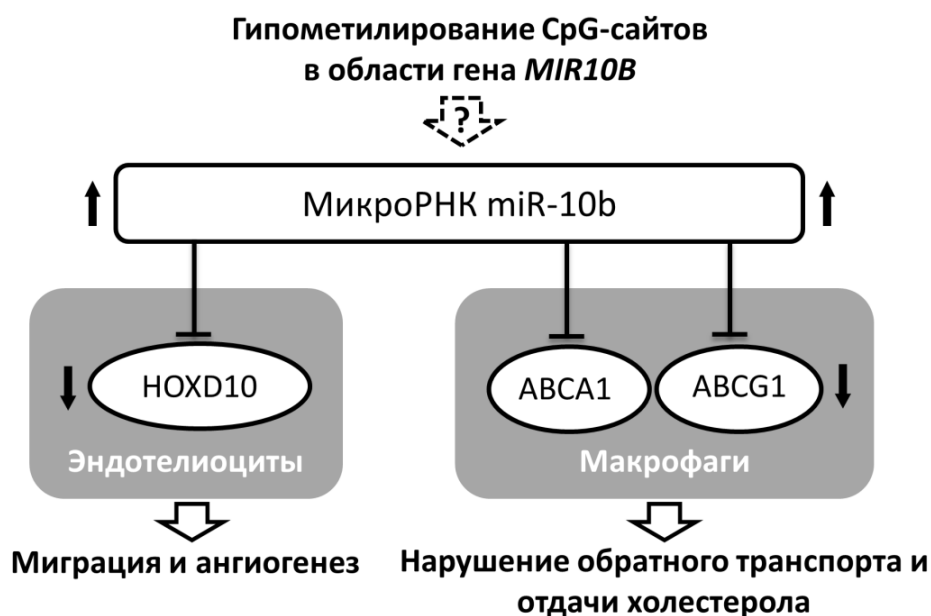


Рисунок 22. Возможные механизмы участия локуса *MIR10B* в атерогенезе.

3.3.2. Уровень метилирования промотора/экзона 1a гена мезодерм-специфичного транскрипта (*PEG1/MEST*)

Ген *PEG1/MEST*, расположенный на длинном плече седьмой хромосомы (локус 7q32), является импринтированным. Ген состоит из 12 экзонов, альтернативного экзона и имеет два промотора, которые регулируют экспрессию транскриптов с разных первых экзонов (рис. 23). Продукт гена

является белком суперсемейства α/β -гидролаз, играющем особую роль в процессе развития организма. Изоформа 1 данного фермента, транскрибируемая с экзона 1, импринтирована и в эмбриональных тканях считывается преимущественно с отцовского аллеля. С альтернативного промотора и экзона 1a считывается РНК-транскрипт короткой изоформы 2 белка, экспрессия которого происходит в тканеспецифической, нежели импринтированной манере. Необходимо отметить, что у гена *PEG1/MEST* имеются и другие РНК-транскрипты, не кодирующие белок.

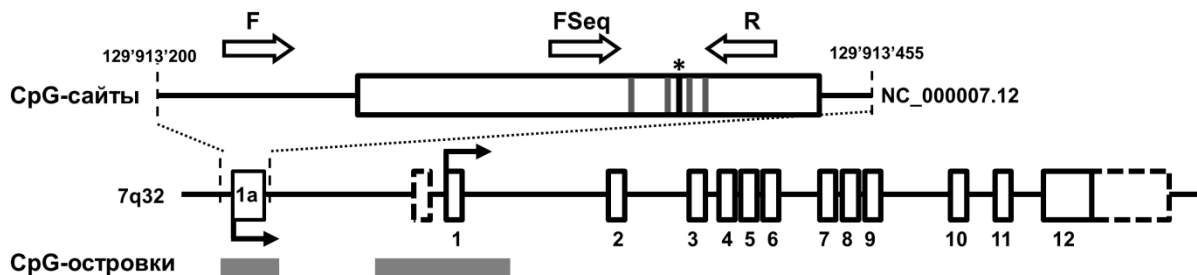


Рисунок 23. Структура анализируемого региона гена *PEG1/MEST*: области гибридизации ДНК с прямым (F) и обратным (R) праймерами для ПЦР, а также секвенирующим (FSeq) праймером указаны стрелками. Проанализированные в данном исследовании CpG-сайты указаны в виде черных вертикальных линий, cg09872616 отмечен звездочкой. Координаты приведены согласно сборке генома GRCh36/hg18.

В результате микрочипового исследования было обнаружено 3 CpG-сайта (cg09059945, cg09872616 и cg01888566), оказавшихся гипометилированными в тканях КАБ и САБ относительно ВГА (прил. 3 и 5). Причем все три CpG-сайта входили в состав CpG-островка, локализованного в области промотора и экзона 1a гена *PEG1/MEST*. Для подтверждающего исследования методом

бисульфитного пиросеквенирования был выбран регион, включающий cg09872616 и окружающие его CpG-сайты по два с каждой стороны (рис. 23).

Уровень метилирования CpG-сайтов в области экзона 1а гена *PEG1/MEST* в тканях сосудистой стенки различной локализации и лейкоцитах периферической крови представлен на рис. 24 и в табл. 13. Самый низкий уровень метилирования анализируемого региона гена *PEG1/MEST* выявлен в лейкоцитах (4%). Пораженные атеросклерозом правые коронарные и сонные артерии имели уровень метилирования в анализируемом регионе ДНК – 8% и 12%, соответственно. В то же время, в морфологически неизмененных внутренних грудных артериях и больших подкожных венах нижних конечностей уровень метилирования экзона 1а гена *PEG1/MEST* составил 21% и 34%, соответственно.

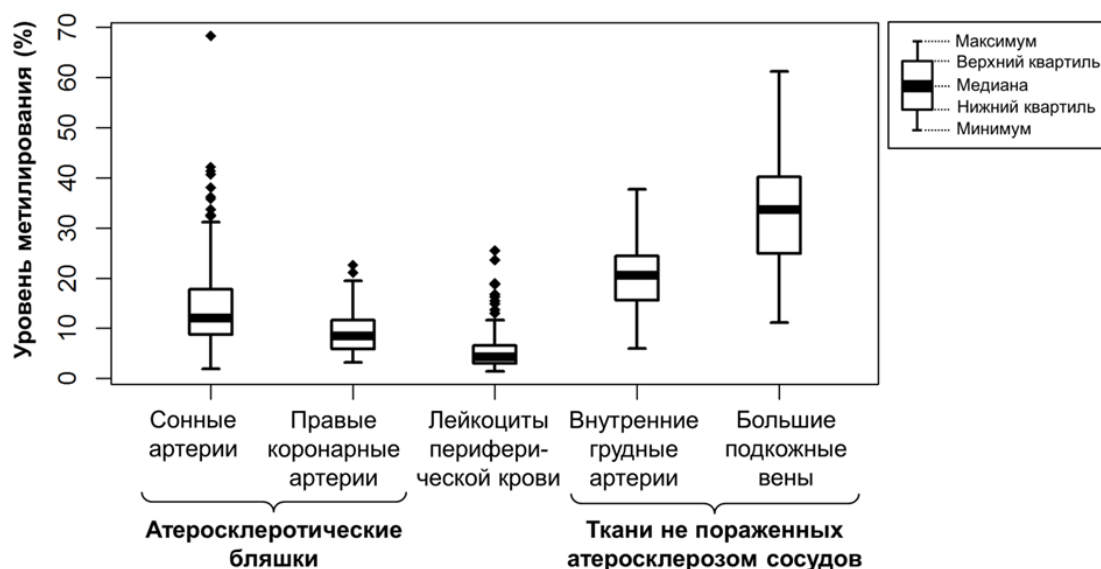


Рисунок 24. Уровень метилирования в области экзона 1а гена *PEG1/MEST* в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови.

Уровни метилирования CpG-сайтов во всех сравниваемых группах значительно различались ($P_{Bonf} < 0,001$; табл. 13), отражая тканеспецифический характер метилирования экзона 1а гена *PEG1/MEST*.

Результаты бисульфитного пиросеквенирования для образцов КАБ, ВГА, БПВ и ЛПК, использованных в микрочиповом исследовании, хорошо коррелировали с результатами последнего ($r = 0,93$ [95%-ный ДИ: 0,85; 0,97]; $P = 8,3 \times 10^{-11}$). Тенденция и характер изменения уровней метилирования CpG-сайтов между сравниваемыми группами образцов сохранялись вне зависимости от используемого метода, хотя прослеживалось некоторое завышение результатов измерения при микрочиповом исследовании по сравнению с пиросеквенированием.

Таблица 13

Различие уровней метилирования первого экзона 1a гена *PEG1/MEST* в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови

Исследуемая ткань	Уровень метилирования (%)	Достигнутый уровень значимости (P_{Bonf}) сравнительного анализа			
		САБ	КАБ	ЛПК	ВГА
САБ	12 (9 - 18)	-			
КАБ	8 (6 - 12)	$1,57 \times 10^{-6}$	-		
ЛПК	4 (3 - 7)	$1,02 \times 10^{-21}$	$3,87 \times 10^{-9}$	-	
ВГА	21 (16 - 24)	$2,04 \times 10^{-11}$	$1,49 \times 10^{-21}$	$8,89 \times 10^{-25}$	-
БПВ	34 (25 - 40)	$6,30 \times 10^{-33}$	$5,05 \times 10^{-32}$	$9,84 \times 10^{-31}$	$5,80 \times 10^{-13}$

Примечания: оценками распределения уровней метилирования являются медиана, 1-й и 3-й квартили (указаны в скобках); САБ - атеросклеротические бляшки сонных артерий, КАБ - атеросклеротические бляшки коронарных артерий, ЛПК - лейкоциты периферической крови, ВГА - внутренние грудные артерии, БПВ - большие подкожные вены.

Подробная информация о метилировании отдельных CpG-сайтов по результатам пиросеквенирования в исследованном регионе гена *PEG1/MEST* представлена в табл. 14.

Поскольку анализируемый регион расположен в области CpG-островка промотора и экзона 1a, можно предположить, что изменение его уровня метилирования связано с регуляцией функциональной активности гена *PEG1/MEST*. В частности, метилирование может определять переключение между альтернативными изоформами продукта данного гена. В пользу данного предположения свидетельствует также высокий уровень метилирования (свыше 60%) CpG-сайтов в экзоне 1 гена *PEG1/MEST* (cg17347253 и cg07427065), обнаруженный по результатам микрочипового исследования в тканях КАБ.

Таблица 14

Уровни метилирования отдельных CpG-сайтов экзона 1a гена *PEG1/MEST* в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови

CpG-сайт [координата*]	Уровень метилирования (%)**				
	САБ	КАБ	ЛПК	ВГА	БПВ
CpG 1 [7:129913389]	13 (10 - 20)	9 (7 - 12)	5 (3 - 6)	23 (21 - 26)	39 (34 - 43)
CpG 2 [7:129913412]	12 (9 - 16)	10 (8 - 11)	6 (4 - 9)	21 (18 - 22)	30 (26 - 34)
cg09872616 [7:129913418]	11 (9 - 13)	6 (5 - 8)	3 (3 - 4)	19 (17 - 21)	30 (28 - 35)
CpG 4 [7:129913424]	8 (5 - 11)	5 (5 - 6)	3 (3 - 4)	11 (9 - 12)	16 (14 - 18)
CpG 5 [7:129913432]	22 (16 - 29)	14 (12 - 17)	6 (5 - 9)	28 (25 - 31)	48 (42 - 53)

Примечание: * - локализация сайтов указана по сборке генома GRCh37/hg19; ** - оценками распределения уровней метилирования являлись медиана, а также первый и третий квартили (указаны в скобках); САБ - атеросклеротические бляшки сонных артерий, КАБ - атеросклеротические бляшки коронарных артерий, ЛПК - лейкоциты периферической крови, ВГА - внутренние грудные артерии, БПВ - большие подкожные вены.

Первые работы, посвященные изучению экспрессии гена *PEG1/MEST*, указывают на биаллельную транскрипцию изоформы 2 в ЛПК и лимфобластоидных клетках [Riesewijk A.M. et al., 1997]. В дальнейшем было показано, что в тканях некоторых органов (включая плаценту, молочную железу и толстый кишечник) изоформа 2 может быть импринтирована и, кроме того, статус импринтинга (моноаллельной или биаллельной экспрессии) различается между индивидами [Kosaki K. et al., 2000].

Изоформа 2 экспрессируется преимущественно с отцовского аллеля в тканях плаценты, а также почек и фибробластах. Вариабельность импринтинга гена *PEG1/MEST*, в том числе изоформы 2, также была зарегистрирована между линиями эмбриональных стволовых клеток человека, поднимая вопрос об эпигенетической стабильности данных клеток [Kosaki K. et al., 2000].

Ген *PEG1/MEST*, как известно, ассоциирован с ростом клеток мезодермального происхождения [Moon Y.S. et al., 2010]. Поэтому изменение метилирования экзона 1а данного гена при атеросклерозе может быть связано с пролиферацией клеточного компонента стенки артерии и ее ремоделированием. Кроме того, в норме ген *PEG1/MEST* принимает участие в депонировании липидов и метаболизме глюкозы. Повышенная экспрессия данного гена была обнаружена в белой жировой ткани мышей с ожирением и/или сахарным диабетом, индуцированными диетой или генетическим нокаутом [Takahashi M. et al., 2005].

3.3.3. Уровень метилирования 11 экзона гена апоптоз-ассоциированной тирозинкиназы (AATK)

Ген *AATK* (альтернативные названия: *AATYK1*, *LMR1*, *LMTK1*) занимает около 49 Кб на длинном плече семнадцатой хромосомы (локус 17q25.3) и состоит из 14 экзонов (рис. 25). Ген кодирует белок, который обладает

тирозинкиназной активностью и экспрессируется клеткой в ходе апоптоза. С гена считывается два РНК-транскрипта, кодирующих две изоформы белка ААТК. Предполагается, что экспрессия данного гена необходима для остановки клеточного роста и/или индукции апоптоза, что было показано для клеток-предшественников миелоидного ряда и некоторых опухолевых линий [Gaozza E. et al., 1997; Ma S., Rubin P., 2014]. На клетках нейробластомы было показано участие гена *AATK* в нейрональной дифференцировке [Raghunath M. et al., 2000]. Данный ген является супрессором опухолей и часто инактивируется при онкологических заболеваниях [Haag T. et al., 2014].

В результате микрочипового исследования было выявлено гиперметилирование CpG-сайта cg13781408 в тканях КАБ, САБ и ЛПК относительно ВГА и БПВ. Данный CpG-сайт был локализован в экзоне 11 гена *AATK* в районе CpG-островка (рис. 25). Другой CpG-сайт гена *AATK*, включенный в состав микрочипа, находился в том же экзоне, но не принадлежал к CpG-островку и был гиперметилирован ($\beta > 0,7$) во всех анализируемых образцах. Уровни метилирования «островкового» сайта cg13781408 и 6 CpG-сайтов в его области (рис. 25) были проанализированы методом бисульфитного пиросеквенирования.

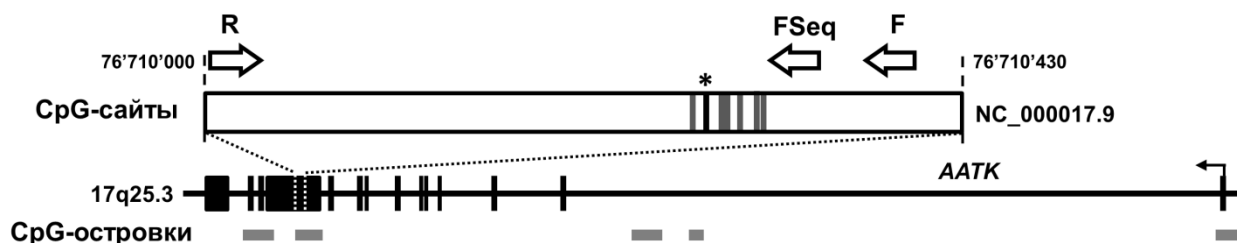


Рисунок 25. Структура анализируемого региона гена *AATK*: области гибридизации ДНК с прямым (F) и обратным (R) праймерами для ПЦР, а также секвенирующим (FSeq) праймером указаны стрелками. Проанализированные в данном исследовании CpG-сайты указаны в виде полос, cg13781408 отмечен звездочкой. Координаты приведены согласно сборке генома GRCh36/hg18.

Самый низкий уровень метилирования анализируемых CpG-сайтов гена апоптоз-ассоциированной тирозинкиназы (*AATK*) выявлен в морфологически неизмененных больших подкожных венах (14%) и внутренних грудных артериях (28%; рис. 26 и табл. 15).

Пораженные атеросклерозом правые коронарные и сонные артерии, напротив, имели гиперметилирование в анализируемом регионе – 62% и 84%, соответственно. Лейкоциты (81%) и сонные артерии с атеросклеротическими бляшками статистически значимо не различались по уровню метилирования данного региона гена *AATK* (табл. 15).

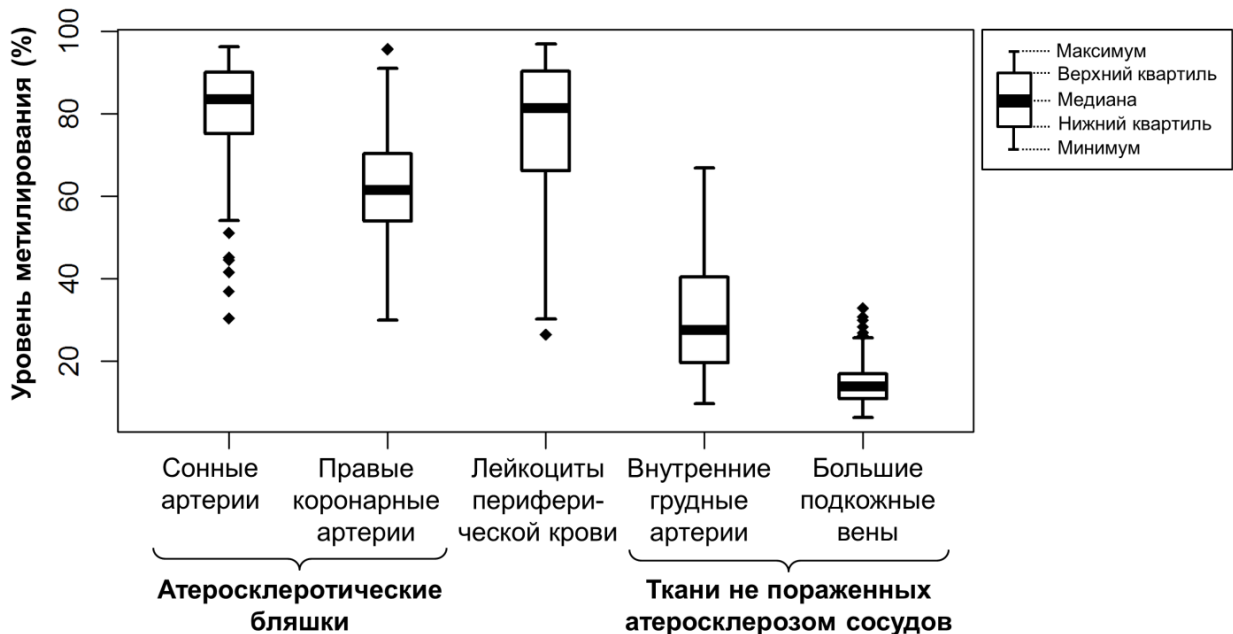


Рисунок 26. Средний уровень метилирования в области экзона 11 гена *AATK* в тканях сосудистой стенки различной локализации и лейкоцитах периферической крови у больных атеросклерозом.

Распределение уровней метилирования отдельных CpG-сайтов в исследуемом регионе гена *AATK* в сравниваемых группах образцов приведены в табл. 16. Наравне с однородным характером метилирования в тканях САБ и

ЛПК, для большинства из анализируемых CpG-сайтов также было характерно отсутствие различий в метилировании между группами КАБ и ЛПК.

Другими словами, после поправки на множественность сравнения, статистически значимое дифференциальное метилирование между КАБ и ЛПК наблюдалось только для четвертого CpG-сайта ($P_{Bonf} = 0,043$). В то же время для каждого CpG-сайта в отдельности, как и для анализируемого региона в целом, сохранялось статистически значимое гиперметилирование в образцах КАБ, САБ и ЛПК по сравнению с тканями ВГА и БПВ, что повторяло результаты микрочипового исследования. Корреляция значений уровня метилирования между результатами различных методов анализа: микрочипов и пиросеквенирования – была довольно высокой (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,91$ [95%-ный ДИ: 0,79; 0,96]; $P = 2,3 \times 10^{-9}$).

Таблица 15

Различие уровней метилирования 11 экзона гена *AATK* в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови

Исследуемая ткань	Уровень метилирования (%)	Достигнутый уровень значимости (P) сравнительного анализа			
		САБ	КАБ	ЛПК	ВГА
САБ	84 (75 - 90)	-	-	-	-
КАБ	62 (54 - 70)	$1,13 \times 10^{-21}$	-	-	-
ЛПК	81 (66 - 90)	0,977	$3,01 \times 10^{-12}$	-	-
ВГА	28 (20 - 40)	$5,51 \times 10^{-35}$	$5,91 \times 10^{-37}$	$1,83 \times 10^{-34}$	-
БПВ	14 (11 - 17)	$1,88 \times 10^{-41}$	$3,34 \times 10^{-54}$	$6,86 \times 10^{-46}$	$8,12 \times 10^{-27}$

Примечание: оценками распределения уровней метилирования являются медиана, 1-й и 3-й квартили (указаны в скобках); САБ - атеросклеротические бляшки сонных артерий, КАБ - атеросклеротические бляшки коронарных артерий, ЛПК - лейкоциты периферической крови, ВГА - внутренние грудные артерии, БПВ - большие подкожные вены.

Функциональная значимость изменений метилирования ДНК в изученном регионе гена *AATK* является предметом дискуссий. Ген был клонирован и

картирован в 1998 году, но еще не достаточно хорошо исследован в отношении его потенциальной связи с многофакторными заболеваниями и связанных с этим эпигенетических изменений. Недавно было обнаружено, что ген *AATK* эпигенетически инактивирован в клетках некоторых опухолей (например, при раке легкого или раке молочной железы) [Naag T. et al., 2014]. Регуляция экспрессии гена апоптоз-ассоциированной тирозинкиназы осуществляется через метилирование CpG-островка, охватывающего промотор и экзон 1 гена *AATK*. Однако изученные в настоящей работе CpG-сайты расположены в протяженном CpG-островке (3354 п.н.) экзона 11 гена *AATK*. Данный регион подвергается альтернативному сплайсингу [Baker S.J. et al., 2001].

Таблица 16

Уровни метилирования отдельных CpG-сайтов одиннадцатого экзона гена *AATK* в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови

CpG-сайт [координата*]	Уровень метилирования (%)				
	САБ	КАБ	ЛПК	ВГА	БПВ
CpG 1 [17:79095729]	93 (90 - 94)	68 (63 - 76)	88 (72 - 94)	34 (28 - 49)	16 (14 - 19)
CpG 2 [17:79095727]	90 (88 - 92)	70 (66 - 77)	88 (74 - 93)	34 (32 - 50)	18 (16 - 22)
CpG 3 [17:79095719]	90 (87 - 91)	64 (61 - 73)	90 (79 - 92)	26 (22 - 40)	13 (12 - 16)
CpG 4 [17:79095712]	84 (81 - 86)	61 (56 - 67)	87 (71 - 91)	25 (20 - 37)	13 (11 - 14)
CpG 5 [17:79095710]	75 (74 - 78)	55 (51 - 61)	79 (64 - 84)	23 (18 - 34)	11 (9 - 13)
cg13781408 [17:79095700]	82 (81 - 87)	62 (57 - 69)	81 (67 - 86)	29 (24 - 42)	15 (14 - 17)
CpG 7 [17:79095692]	69 (66 - 73)	47 (45 - 54)	72 (59 - 77)	19 (15 - 28)	10 (8 - 11)

Примечание: * - локализация сайтов указана по сборке генома GRCh37/hg19; ** - оценками распределения уровней метилирования являлись медиана, а также первый и третий квартили (указаны в скобках); САБ - атеросклеротические бляшки сонных артерий, КАБ - атеросклеротические бляшки коронарных артерий, ЛПК - лейкоциты периферической крови, ВГА - внутренние грудные артерии, БПВ - большие подкожные вены.

Согласно существующим представлениям, области экзонов по сравнению с интронами обычно гиперметилированы, обеспечивая корректное распознавание экзонов при альтернативном сплайсинге [Jones P.A., 2012]. Если экзон гена метилирован, то элонгация транскрипции в данном месте замедляется и экзон включается в транскрипт. Изменение уровня метилирования в области экзонов, подверженных альтернативному сплайсингу, приводит к нарушению процесса сплайсинга [Maunakea A.K. et al., 2013]. Не исключено, что метилирование в области 11 экзона гена *AATK* обеспечивает корректный альтернативный сплайсинг данного гена. Гиперметилирование данного региона, наблюдаемое в тканях артерий и ЛПК при атеросклерозе, скорее всего, связано с переключением альтернативных транскриптов, а не регуляцией экспрессии гена в целом.

Следует отметить, что метилирование промоторного региона гена *HOXD4* (*MIR10B*) и экзона 11 гена *AATK* в ЛПК соотносилось с таковым в тканях пораженных сосудов (рис. 19 и рис. 26, соответственно). Для экзона 1а гена *PEG1/MEST* был характерен крайне низкий (с некоторой вариацией) уровень метилирования в ЛПК, а пораженные артерии по уровню метилирования занимали промежуточное значение между ними и непораженными атеросклерозом образцами ВГА и БПВ (рис. 24). Такой промежуточный или тождественный с ЛПК характер метилирования в пораженных атеросклерозом сосудах может быть объяснен воспалительной природой атеросклеротической бляшки: уровень метилирования в ней, в той или иной степени, определяется статусом метилирования ДНК мигрировавших из просвета сосуда в результате инфильтрации лимфоцитов и моноцитов, составляющих «лейкоцитарную фракцию» в ткани. Не исключен и вариант изменения картины метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках независимо от статуса метилирования клеток крови. На самом деле, природа связи метилирования тех или иных генов

в тканях атеросклеротической бляшки и лейкоцитах периферической крови может быть намного сложнее и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови больных с атеросклерозом выявлено дифференциальное метилирование отдельных CpG-сайтов, входящих в состав гомеобоксного гена *HOXD4* и микроРНК *MIR10B*, а также генов мезодерм-специфичного транскрипта (*PEG1/MEST*) и апоптоз-ассоциированной тирозинкиназы (*AATK*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В постгеномную эру достигнуты большие успехи в выявлении генов и сигнальных путей, вовлеченных в атеросклероз и его осложнения (ишемия и инфаркт миокарда, инсульт), а также сочетания с другими заболеваниями, образующих единый патофизиологический сердечно-сосудистый континуум (синтропию) [Dzau V.J. et al., 2006; Пузырев В.П. и др., 2009]. С увеличением понимания сложных механизмов регуляции активности генов, становится очевидным, что традиционные методы поиска локусов подверженности широко распространенных заболеваний, такие как анализ сцепления и исследования ассоциаций, не достаточны. Один из подходов заключается в изучении эпигенетических модификаций генома, включающих метилирование ДНК, посттрансляционные изменения гистоновых белков и РНК-опосредованные механизмы, в тканях при патологическом процессе. Однако экспериментальные работы, проводимые в данном направлении, немногочисленны.

В настоящем исследовании проведена оценка профилей метилирования ДНК в клетках сосудистой стенки, а также лейкоцитах периферической крови у 85 больных с мультифокальным атеросклерозом. Анализ метилирования 27378 CpG-сайтов 14425 генов проведен на микрочипах фирмы «Illumina» с верификацией результатов для отдельных локусов методом бисульфитного пиросеквенирования. Ткани сосудистой стенки получены из области атеросклеротических бляшек правых коронарных и сонных артерий, а также макроскопически неизмененных сонных артерий, внутренних грудных артерий и больших подкожных вен нижних конечностей. Выбор данных тканей для исследования был неслучаен. Можно предположить, что различия в уровне метилирования ДНК между артериями, пораженными атеросклерозом и макроскопически неизмененными, являются ключевыми для объяснения их дифференциальной подверженности к атеросклерозу. В то же время,

внутренние грудные артерии и большие подкожные вены нижних конечностей используются в качестве трансплантатов при коронарном шунтировании. Сравнение уровней метилирования ДНК между данными двумя тканями может объяснить существующие различия в их состоятельности в качестве шунтов и подверженности стенозированию.

В результате настоящего исследования было показано, что ткани сосудистой стенки и лейкоциты периферической крови больных атеросклерозом дифференцируются по уровню метилирования 27373 CpG-сайтов 14425 генов. Выявленные в настоящем исследовании сильные отличия в профиле метилирования ДНК образцов сосудистой стенки и лейкоцитов периферической крови ставят под сомнение возможность использования лейкоцитов в качестве суррогатного и легкодоступного материала тех молекулярно-генетических изменений, которые происходят в артериях при атеросклерозе. Для решения данного вопроса необходимо провести более детальное исследование.

Интересный результат настоящей работы связан с тем, что существует сильная корреляция средних уровней метилирования анализируемых CpG-сайтов между атеросклеротическими бляшками и макроскопически неизменными сонными артериями ($r = 0,99$). Такое сходство профилей метилирования ДНК между тканями сосудистой стенки из области атеросклеротических бляшек и подлежащих тканей без макроскопически выраженного атеросклероза свидетельствует об эпигенетических изменениях в последних, которые могут быть связаны с атерогенезом и протекающими на микроуровне патологическими процессами, не приводящими на данном этапе к визуально различимому ремоделированию артериальной стенки. Кроме того, макроскопически неизменные сонные артерии характеризуются большим количеством CpG-сайтов с промежуточным уровнем метилирования (20-60%) по сравнению с другими тканями ($P_{Bonf} < 0,001$). Это может обуславливать

эпигенетическую лабильность клеток макроскопически неизменных сонных артерий.

При сравнении уровней метилирования отдельных CpG-сайтов между атеросклеротическими бляшками коронарных и сонных артерий относительно неизменных внутренних грудных артерий установлена широкая сфера компетенции дифференциально метилированных генов в сигнальных и метаболических путях. Повышенный уровень метилирования характерен для генов, белковые продукты которых задействованы в трансмембранном переносе ионов, межклеточной коммуникации и поддержании физиологического гомеостаза организма. Причем, среди генов с повышенным уровнем метилирования в атеросклеротических бляшках артерий поиск представленностей их белковых продуктов в базе данных «WikiPathway» позволил выявить пары взаимосвязанных генов, вовлеченных в общие сигнальные пути белка G13 (*ARHGDI1* и *MYL1*) и эндотелина (*EDNRB* и *MYL1*), а также синтез простагландинов (*EDNRB* и *SI00A10*). С другой стороны, гипометилированное состояние в пораженной атеросклерозом стенке артерий являлось особенностью некоторых генов, связанных с процессами регуляции иммунного ответа, воспаления, апоптоза, клеточного ответа на различные стимулы (в том числе липиды), дифференцировки клеток и морфогенеза. Широкий спектр сигнальных и метаболических путей, связанных с атеросклерозом, хорошо согласуется с современными представлениями о патогенезе данного заболевания.

Согласно базе данных «CADgene», из 72 CpG-сайтов (65 генов), дифференциально метилированных между атеросклеротическими бляшками и непораженными тканями артериальной стенки, лишь пять генов (*ALOX12*, *UTS2*, *NPR2*, *UCN2* и *TLR4*) являлись кандидатами атеросклероза. Ранее была проведена ассоциация их структурных вариантов с риском развития атеросклеротического поражения артерий. Не исключено, что aberrантное

метилование данных генов служит механизмом регуляции их активности в артериальной стенке при патологии.

При сравнении списков дифференциально метилированных генов, полученных в данной работе и при других исследованиях [Post W.S. et al., 1999; Hiltunen M.O. et al., 2002; Zhu S. et al., 2005; Kim J. et al., 2007; Zawadzki C. et al., 2009; Castillo-Diaz S.A. et al., 2010; Yamada Y. et al., 2014; Zaina S. et al., 2014; Aavik E. et al., 2014] практически не было совпадений, за исключением промоторного участка гена *HOXD4*. Различные результаты, полученные в настоящей работе и вышеописанных исследованиях, могут быть обусловлены несколькими причинами. Во-первых, образцы пораженных и не пораженных атеросклерозом артерий взяты из различных областей сосудистого русла. Во-вторых, анализ статуса метилирования ДНК проводили с использованием различных технологий и платформ (микрочипов и массового параллельного секвенирования). Кроме того, в трех работах использованы различные подходы к статистической обработке данных, в том числе при функциональной аннотации продуктов дифференциально метилированных генов.

Особенностью настоящего исследования было сравнение профилей метилирования ДНК между образцами внутренних грудных артерий и больших подкожных вен нижних конечностей. Свыше сорока лет наблюдений в сосудистой хирургии выявили, что использование аутоартериальных трансплантатов из внутренних грудных артерий при коронарном шунтировании показывает более эффективные результаты в плане их долгосрочной проходимости и выживаемости пациентов по сравнению с аутовенозными шунтами [Вечерский Ю.Ю. и др., 2010; Otsuka F. et al., 2013]. Функциональная аннотация дифференциально метилированных генов между анализируемыми образцами артерий и вен выявила большую категорию биологических процессов, связанных с развитием. Такое обилие терминов, касающихся развития, указывает на сильную регионарную и тканевую детерминированность

их профилей метилирования ДНК. Возможно, что эти особенности проявляются и при использовании данных сосудов в качестве шунтов.

На заключительном этапе настоящего исследования уровни метилирования отдельных CpG-сайтов кандидатных генов *HOXD4* (*MIR10B*), *PEG1/MEST* и *AATK* были измерены в расширенных выборках образцов методом бисульфитного пиросеквенирования.

В результате установлено, что промотор гена *HOXD4* (локус *MIR10B*) гипометилирован в клетках атеросклеротических бляшек коронарных и сонных артерий, а также лейкоцитах периферической крови по сравнению с непораженными внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей. Функциональные последствия изменения уровня метилирования в исследованном участке генома могут быть связаны с экспрессией гена *HOXD4*, белковый продукт которого важен для пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, связанных с ревазуляризацией атеросклеротической бляшки собственными сосудами и формированием неоинтимы. С другой стороны, анализируемые CpG-сайты, входят в последовательность гена *MIR10B*, кодирующего микроРНК. Увеличение экспрессии *MIR10B* было показано в тканях выраженных атеросклеротических бляшек сонных артерий по сравнению с ВГА [Bidzhekov K. et al., 2012]. Данная микроРНК индуцирует миграцию ЭК и ангиогенез посредством снижения экспрессии гена *HOXD10* и других механизмов [Shen X. et al., 2011; Hassel D. et al., 2012]. В макрофагах miR-10b через репрессию белков ABCA1 и ABCG1 негативно регулирует процесс переноса холестерина из макрофагов на ЛПВП («эффлюкс холестерина») [Wang D. et al., 2012]. Таким образом, снижается интенсивность обратного транспорта холестерина из тканей сосудистой стенки в кровь и его накопление, что является ключевым событием атерогенеза. В связи с этим, miR-10b в числе прочих микроРНК, ингибирующих «эффлюкс холестерина», является кандидатом для разрабатываемых моделей таргетной

фармакотерапии (например, антоцианидином), направленной на увеличение обратного транспорта и отдачи холестерина макрофагами [Dávalos A., Fernández-Hernando C., 2013].

Уровни метилирования CpG-сайтов экзона 1a гена *PEG1/MEST* статистически значимо различались во всех анализируемых тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови. Можно предположить, что изменение уровня метилирования данного гена связано с регуляцией функциональной активности гена *PEG1/MEST*. В частности, метилирование может определять переключение между альтернативными изоформами продукта данного гена. Ген *PEG1/MEST*, как известно, ассоциирован с ростом клеток мезодермального происхождения [Moon Y.S. et al., 2010]. Поэтому изменение метилирования экзона 1a данного гена при атеросклерозе может быть связано с пролиферацией клеточного компонента стенки артерии и ее ремоделированием. Кроме того, в норме ген *PEG1/MEST* принимает участие в депонировании липидов и метаболизме глюкозы. Повышенная экспрессия данного гена была обнаружена в белой жировой ткани мышей с ожирением и/или сахарным диабетом, индуцированными диетой или генетическим нокаутом [Takahashi M. et al., 2005].

Высокий уровень метилирования в области 11 экзона гена *AATK* выявлен в правых коронарных и сонных артериях, а внутренние грудные артерии и большие подкожные вены нижних конечностей, напротив, проявляли гипометилирование в анализируемом регионе. Функциональная значимость изменений метилирования ДНК в области 11 экзона гена *AATK* является предметом дискуссий. Данный регион подвергается альтернативному сплайсингу. Согласно существующим представлениям, области экзонов по сравнению с интронами обычно гиперметилированы, обеспечивая корректное распознавание экзонов при альтернативном сплайсинге [Jones P.A., 2012]. Если экзон гена метилирован, то элонгация транскрипции в данном месте

замедляется и экзон включается в транскрипт. Изменение уровня метилирования в области экзонов, подверженных альтернативному сплайсингу, приводит к нарушению процесса сплайсинга [Maunakea A.K. et al., 2013]. Не исключено, что гиперметилирование данного региона, наблюдаемое в тканях артерий и лейкоцитах периферической крови при атеросклерозе, скорее всего, связано с переключением альтернативных транскриптов, а не регуляцией экспрессии гена в целом.

Ткани сосудистой стенки, пораженные атеросклерозом, обладают собственным профилем метилирования ДНК, подчеркивающим вовлеченность множества генов, метаболических и сигнальных путей в процесс развития атеросклеротической бляшки. Изучение вариабельности уровня метилирования ДНК в клетках сосудов и лейкоцитах периферической крови дополняет существующие представления о молекулярных механизмах атерогенеза. Исследования в данном направлении помогут идентифицировать новые патофизиологические пути и специфические мишени для профилактики, диагностики и лечения патологии.

Таким образом, проведенное исследование расширяет представления о молекулярных механизмах атеросклероза, дополняя их новой эпигенетической компонентой, которая подкрепляет выявленную ранее, в ходе ассоциативных исследований, вовлеченность одних генов-кандидатов, а также обозначает новые гены, сигнальные и метаболические пути.

ВЫВОДЫ

1. У больных мультифокальным атеросклерозом наименьшее значение коэффициента корреляции уровня метилирования 27373 CpG-сайтов выявлено между образцами сосудистой стенки различной локализации и лейкоцитами периферической крови.

2. Установлено, что атеросклеротические бляшки и макроскопически неизмененные сонные артерии имеют высокий коэффициент корреляции по уровню метилирования ДНК и наименьшее количество дифференциально метилированных CpG-сайтов.

3. При функциональном аннотировании локусов, дифференциально метилированных в атеросклеротически измененных артериях по сравнению с непораженными артериями, выявлено обогащение генами, связанными с регуляцией иммунного ответа, воспалением, апоптозом, клеточным ответом на различные стимулы (в том числе липиды), дифференцировкой клеток и морфогенезом, трансмембранным переносом ионов, межклеточной коммуникацией.

4. Установлено, что в правых коронарных и сонных артериях с атеросклеротическими бляшками и непораженных внутренних грудных артериях изменения в уровне метилирования более 20% имеют 72 CpG-сайта, входящих в состав 65 генов ($P_{FDR} < 0,05$).

5. При сравнении внутренних грудных артерий и больших подкожных вен нижних конечностей показано дифференциальное метилирование 213 CpG-сайтов, входящих в состав 175 генов ($P_{FDR} < 0,05$ и $|\Delta\beta| > 0,2$), белковые продукты которых обеспечивают процессы развития и связаны с активностью транскрипционных факторов, рецепторов, факторов роста.

6. Промотор гена *HOXD4* (локус *MIR10B*) гипометилирован в клетках атеросклеротических бляшек коронарных (уровень метилирования – 18%) и

сонных артерий (18%), а также лейкоцитах периферической крови (16%) по сравнению с внутренними грудными артериями (61%) и большими подкожными венами нижних конечностей (59%; $P_{Bonf} < 0,001$).

7. Показано, что уровень метилирования в области промотора/экзона 1а гена *PEG1/MEST* варьирует во всех анализируемых тканях ($P_{Bonf} < 0,001$): лейкоциты периферической крови (4%), атеросклеротические бляшки коронарных (8%) и сонных артерий (12%), внутренние грудные артерии (21%) и большие подкожные вены нижних конечностей (34%).

8. Высокий уровень метилирования в области 11 экзона гена *AATK* выявлен в правых коронарных (62%) и сонных артериях (84%), лейкоцитах периферической крови (81%), а внутренние грудные артерии и большие подкожные вены нижних конечностей, напротив, имеют гипометилирование в анализируемом регионе – 28% и 14%, соответственно ($P_{Bonf} < 0,001$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аничков, Н. Н. Об этиологии и патогенезе атеросклероза / Н. Н. Аничков // Архив биол. наук. – 1935. – Т. 39. – С. 51-85.
2. Аронов, Д. М. Некоторые аспекты патогенеза атеросклероза / Д. М. Аронов, В. П. Лупанов // Атеросклероз и дислипидемии. – 2011. - № 1. – С. 48-56.
3. Ванюшин, Б. Ф. Эпигенетика сегодня и завтра / Б. Ф. Ванюшин // Вавиловский журн. генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4. – С. 805-832.
4. Вечерский, Ю. Ю. Сравнительное исследование функционирования различных аутоартериальных и венозных графтов по данным шунтографии после изолированного коронарного шунтирования / Ю. Ю. Вечерский, С. Л. Андреев, В. В. Затолокин // Сибирский медицинский журнал. – 2010. – Т. 25. – № 4. – С. 43-49.
5. Гистология, эмбриология, цитология: учебник для вузов / под ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Челышева – 3-е изд. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 480 с.
6. Гуревич, В. С. Современные представления о патогенезе атеросклероза / В. С. Гуревич // Болезни сердца и сосудов. – 2006. – Т. 1. – № 4. – С. 4-7.
7. Гуревич, В. С. Эволюция представлений о про- и антиатерогенных свойствах липопротеинов / В. С. Гуревич, С. А. Уразгильдеева, М. И. Бутхашвили // Атеросклероз и дислипидемии. – 2012. – № 4. – С. 54-62.
8. Дзизинский, А. А. Атеросклероз / А. А. Дзизинский. – Иркутск : изд-во Иркутского ун-та, 1997. – 280 с.
9. Дзизинский, А. А. Наследственность и атеросклероз / А. А. Дзизинский, В. П. Пузырев. – Новосибирск : Наука, 1977. – 176 с.

10. Зайчик, А. Ш. Патохимия (эндокринно-метаболические нарушения) / А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов. – 3-е изд., доп. и исп. – СПб. : ЭЛБИ-СПб, 2007. – Гл. 7. – С. 175-197.
11. Карпов, Р. С. Атеросклероз: патогенез, клиника, функциональная диагностика, лечение / Р. С. Карпов, В. А. Дудко. – Томск : STT, 1998. – 672 с.
12. Климов, А. Н. Липиды, липопротеиды и атеросклероз / А. Н. Климов, Н. Г. Никульчева. – СПб. : Питер Пресс, 1995. – 304 с.
13. Кобзарь А. И. Прикладная математическая статистика. / А. И. Кобзарь. – М. : Физматлит, 2006. – 816 с.
14. Коноплева, Л. Ф. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и методы ее коррекции / Л. Ф. Коноплева // Therapia. – 2011. – № 3. – С. 26-30.
15. Кузнецова, Е. Б. Методы анализа метилирования ДНК / Е. Б. Кузнецова, В. В. Стрельников // Медицинская генетика. – 2006. – № 11. – С. 3-11.
16. Лебедев, И. Н. Патогенетические эффекты нестабильности эмбрионального генома в развитии человека / И. Н. Лебедев, Т. В. Никитина, А. Г. Токарева и др. // Вестник ВОГиС. – 2006. – Т. 10, № 3. – С. 520-529.
17. Лебедев, И. Н. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией / И. Н. Лебедев, Е. А. Саженова // Генетика. – 2008. – Т. 44. – С. 1356-1373.
18. Назаренко, М. С. Профиль метилирования ДНК в области атеросклеротических бляшек человека // М. С. Назаренко, В. П. Пузырев, И. Н. Лебедев и др. // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45. – № 4. – С. 610-616.

19. Панин, Л. Е. Стресс, сердце и сосуды / Л. Е. Панин // Вопросы атерогенеза / Ю. П. Никитин, Л. Е. Панин, М. И. Воевода и др. – Новосибирск, 2005. – С. 20-34.
20. Панин, Л. Е. Обмен липопротеинов и атеросклероз / Л. Е. Панин // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – № 2 (120). – С. 15-22.
21. Пузырев, В. П. Синтропные гены болезней сердечно-сосудистого континуума / В. П. Пузырев, В. А. Степанов, О. А. Макеева // Медицинская генетика. – 2009. – № 3. – С. 31-38.
22. Рагино, Ю.И. Факторы и механизмы развития коронарного атеросклероза / Ю. И. Рагино, А. М. Чернявский, А. М. Волков и др. – Новосибирск : Наука, 2011 – 168 с.
23. Ройтберг, Г. Внутренние болезни. Сердечно-сосудистая система / Г. Ройтберг, А. Струтынский. – М. : Бином, 2007. – Гл. 4, § 4.1. – С. 301-311.
24. Халатов, С. С. Холестериновая болезнь в ее патофизиологическом и клиническом значении / С. С. Халатов. – М. : Медгиз, 1946 – 128 с.
25. Шальнова, С. А. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах российской федерации, участвующих в исследовании «эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России» / С. А. Шальнова, А. О. Конради, Ю. А. Карпов и др. // Российский кардиологический журнал. - 2012. - № 5 (97). - С. 6-11.
26. Шипунов, А. Б. Наглядная статистика. Используем R! / А. Б. Шипунов, Е. М. Балдин, П. А. Волкова и др. – М. : ДМК Пресс, 2012. – 298 с.
27. Aavik, E. Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster / E. Aavik, H. Lumivuori, O. Lepp et al. // Eur. Heart. J. – 2015. – V. 36. – № 16. – P. 993-1000.
28. Amali, A. A. Zebrafish *hoxd4a* acts upstream of *meis1* / A. A. Amali, L. Sie, C. Winkler et al. // PLoS One. – 2013. – V. 8. – № 3. – e58857.

29. Auclair, G. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals / G. Auclair, M. Weber // *Biochimie*. – 2012. – V. 94. – № 11. – P. 2202-2211.
30. Baccarelli, A. Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies / A. Baccarelli, M. Rienstra, E. J. Benjamin // *Circ. Cardiovasc. Genet*. – 2010. – № 3. – P. 567-573.
31. Baker, S. J. Characterization of an alternatively spliced AATYK mRNA: expression pattern of AATYK in the brain and neuronal cells / S. J. Baker, R. Sumerson, C. D. Reddy et al. // *Oncogene*. – 2001. – V. 20. – № 9. – P. 1015-1021.
32. Ball, R. Y. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma // R. Y. Ball, E. C. Stowers, J. H. Burton et al. // *Atherosclerosis*. – 1995. – № 114. – P. 45-54.
33. Barros, S. P. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease / S. P. Barros, S. Offenbacher // *J. Dent. Res*. – 2009. – № 88. – P. 400-408.
34. Bell, J. T. Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population / J. T. Bell, P. C. Tsai, T. P. Yang et al. // *PLoS Genet*. – 2012. – V. 8. – № 4. – e1002629.
35. Benditt, E. P. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques / E. P. Benditt, J. M. Benditt // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1973. – № 70. – P. 1753-1756.
36. Benjamini Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing / Y. Benjamini, Y. Hochberg // *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B*. – 1995. – V. 57. – № 1. – P. 289-300.
37. Biagioni, F. The locus of microRNA-10b: a critical target for breast cancer insurgence and dissemination / F. Biagioni, N. Bossel Ben, G. Moshe et al. // *Cell. Cycle*. – 2013. – V. 12. – № 15. – P. 2371-2375.

38. Bibikova, M. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay / M. Bibikova, J. Le, B. Barnes et al. // *Epigenomics*. – 2009. – V. 1. – № 1. – P. 177-200.
39. Bidzhekov, K. microRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans / K. Bidzhekov, L. Gan, B. Denecke et al. // *Thromb. Haemost.* – 2012. – V. 107. – № 4. – P. 619-625.
40. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory / A. Bird // *Genes. Dev.* – 2002. – V. 16. – № 1. – P. 6-21.
41. Butcher, L. M. Future impact of integrated high-throughput methylome analyses on human health and disease / L. M. Butcher, S. Beck // *J. Genet. Genomics*. – 2008. – № 35. – P. 391-401.
42. Castillo-Díaz, S. A. Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries / S. A. Castillo, M. E. Garay-Sevilla, M. A. Hern et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2010. – V. 26. – № 5. – P. 691-700.
43. Castro, R. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease / R. Castro, I. Rivera, E. A. Struys // *Clin. Chem.* – 2003. – № 49. – P. 1292-1296.
44. Chen, Y. A. Sequence overlap between autosomal and sex-linked probes on the Illumina HumanMethylation27 microarray / Y. A. Chen, S. Choufani, J. C. Ferreira et al. // *Genomics*. – 2011. – V. 97. – № 4. – P. 214-222.
45. Chen, Z. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition / Z. Chen, A. C. Karaplis, S. L. Ackerman et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – № 10. – P. 433-443.
46. Cines, D. B. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders / D. B. Cines, E. S. Pollak, C. A. Buck et al. // *Blood*. – 1998. – V. 91. – № 10. – P. 3527-3561.

47. Coen, M. Phenotypic heterogeneity of smooth muscle cells – implications for atherosclerosis / M. Coen, M. L. Bochaton-Piallot // *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms* / Eds. S. J. George, J. Johnson. – Weinheim : Wiley-Blackwell, 2010. – P. 327-337.
48. Cuchel, M. Pathways by which reconstituted high-density lipoprotein mobilizes free cholesterol from whole body and from macrophages / M. Cuchel, S. Lund-Katz, M. Llera-Moya et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – V. 30. – № 3. – P. 526-532.
49. Cullen, P. The pathogenesis of atherosclerosis / P. Cullen, J. Rauterberg, S. Lorkowski // *Atherosclerosis: Diet and Drugs* / Ed. A. von Eckardstein. – Berlin : Springer, 2005. – P. 3-70.
50. Dallosso, A. R. Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilms' tumours / A. R. Dallosso, A. L. Hancock, K. W. Brown et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2004. – V. 13. – № 4. – P. 405-415.
51. Dávalos, A. From evolution to revolution: miRNAs as pharmacological targets for modulating cholesterol efflux and reverse cholesterol transport / A. Dávalos, C. Fernández-Hernando // *Pharmacol. Res.* – 2013. – V. 75. – P. 60-72.
52. Dedeurwaerder, S. A comprehensive overview of Infinium HumanMethylation450 data processing / S. Dedeurwaerder, M. Defrance, M. Bizet et al. // *Brief. Bioinform.* – 2014. – V. 15. – № 6. – P. 929-941.
53. Del Valle, J. Novel insights into histamine H2 receptor biology / J. Del Valle, I. Gantz // *Physiol.* – 1997. – V. 273. – P. G987-G996.
54. Dote, H. Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in gastrointestinal tumour / H. Dote, S. Toyooka, K. Tsukuda et al. // *Br. J. Cancer.* – 2005. – V. 92. – № 6. – P. 1117-1125.

55. Du, P. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis / P. Du, X. Zhang, C. C. Huang et al. // *BMC. Bioinformatics.* – 2010. – V. 11. – P. 587-596.
56. Du, P. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray / P. Du, W. A. Kibbe, S. M. Lin // *Bioinformatics.* – 2008. – V. 24. – № 13. – P. 1547-1548.
57. Duim, S. N. Cardiac endothelial cells express Wilms' tumor-1: Wt1 expression in the developing, adult and infarcted heart / S. N. Duim, K. Kurakula, M. J. Goumans et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2015. – V. 81. – P. 127-135.
58. Dunn, J. Flow-dependent epigenetic DNA methylation regulates endothelial gene expression and atherosclerosis / J. Dunn, H. Qiu, S. Kim et al. // *J. Clin. Invest.* – 2014. – V. 124. – № 7. – P. 3187-3199.
59. Dzau, V. J. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part I: Pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease) / V. J. Dzau, E. M. Antman, H. R. Black et al. // *Circulation.* – 2006. – V. 114. – № 25. – P. 2850-2870.
60. Eichler, E. E. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease / E. E. Eichler, J. Flint, G. Gibson et al. // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – V. 11. – № 6. – P. 446-450.
61. Erkkila, F. T. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins and cardiolipin in patients with coronary heart disease / F. T. Erkkila, O. Narvanen, S. Lehto et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – № 20. – P. 204-209.
62. Everitt, B. S. Cluster analysis / B. S. Everitt, S. Landau, M. Leese, D. Stahl. – 5th ed. – John Wiley & Sons, Ltd., 2011. – 330 p.
63. Falk, E. Pathogenesis of atherosclerosis / E. Falk // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2006. – V. 47. – P. C7-C12.
64. Feinberg, A. P. Epigenetics at the epicenter of modern medicine / A. P. Feinberg // *JAMA.* – 2008. – № 299. – P. 1345-1350.

65. Feinberg, A. P. Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease / A. P. Feinberg // *Virchows. Arch.* – 2010a. – № 456. – P. 13-21.
66. Feinberg, A. P. Personalized epigenomic signatures that are stable over time and covary with body mass index / A. P. Feinberg, R. A. Irizarry, D. Fradin et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2010b. – V. 2. – № 49. – P. 49.
67. Florath, I. Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites / I. Florath, K. Butterbach, H. Bewerunge-Hudler et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2014. – V. 23. – № 5. – P. 1186-1201.
68. Fruchart, J. C. Pathophysiology of stages of development of atherosclerosis / J. C. Fruchart // *Handbook of dyslipidemia and atherosclerosis.* – France University of Lille, 2003. – Pt. 1. – P. 1-65.
69. Gaozza, E. AATYK: a novel tyrosine kinase induced during growth arrest and apoptosis of myeloid cells / E. Gaozza, S. J. Baker, R. K. Vora et al. // *Oncogene.* – 1997. – V. 15. – № 25. – P. 3127-3135.
70. Gelfman, S. DNA-methylation effect on cotranscriptional splicing is dependent on GC architecture of the exon-intron structure / S. Gelfman, N. Cohen, A. Yearim et al. // *Genome. Res.* – 2013. – V. 23. – № 5. – P. 789-799.
71. Gentleman, R. Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor / Eds. R. Gentleman, V. J. Carey, W. Huber et al. – New York : Springer Science + Business Media, Inc., 2005. – 473 p.
72. George, S. J. Pathogenesis of atherosclerosis / S. J. George, C. Lyon // *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms* / Eds. S. J. George, J. Johnson. – Weinheim : Wiley-Vch Gmbh, 2010. – P. 3-20.
73. Glagov, S. Pathobiology of the Human Atherosclerotic Plaque / Eds. S. Glagov, W. P. Newman III, S. A. Schaffer. – New York : Springer, 1990 – 923 p.

74. Gorski D. H. The role of homeobox genes in vascular remodeling and angiogenesis / D. H. Gorski, K. Walsh // *Circ. Res.* – 2000. – V. 87. – № 10. – P. 865-872.
75. Gower, J. C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis / J. C. Gower // *Biometrika.* – 1966. – № 53. – P. 325-338.
76. Haag, T. The apoptosis associated tyrosine kinase gene is frequently hypermethylated in human cancer and is regulated by epigenetic mechanisms / T. Haag, C. E. Herkt, S. K. Walesch et al. // *Genes. Cancer.* – 2014. – V. 5. – P. 365-374.
77. Hamburg, N. M. Endothelial dysfunction in atherosclerosis: mechanisms of impaired nitric oxide bioactivity / N. M. Hamburg, J. A. Vita // *Molecular Mechanisms of Atherosclerosis* / Ed. J. Loscalzo. – Abingdon : Taylor & Francis, 2005. – P. 95-110.
78. Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease / G. K. Hansson // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – V. 352. – № 16. – P. 1685-1695.
79. Harper, M. Platelets: their role in atherogenesis and thrombosis in coronary artery disease / M. Harper, L. MacCarthy-Morrogh, M. L. Jones, et al. // *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms* / Eds. S. J. George, J. Johnson. – Weinheim : Wiley-Blackwell, 2010. – P. 343-363.
80. Harrison, S. C. Association of a sequence variant in DAB2IP with coronary heart disease / S. C. Harrison, J. A. Cooper, K. Li et al. // *Eur. Heart. J.* – 2012. – V. 33. – № 7. – P. 881-888.
81. Hassel D. MicroRNA-10 regulates the angiogenic behavior of zebrafish and human endothelial cells by promoting vascular endothelial growth factor signaling / D. Hassel, P. Cheng, M. P. White et al. // *Circ. Res.* – 2012. – V. 111. – № 11. – P. 1421-1433.

82. Hiltunen, M. O. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions / M. O. Hiltunen, M. P. Turunen, T. P. Hakkinen et al. // *Vasc. Med.* – 2002. – № 1. – P. 5-11.
83. Holvoet, P. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis / P. Holvoet, D. Collen // *FASEB. J.* – 1994. – № 8. – P. 1279–1284.
84. Horvath, S. DNA methylation age of human tissues and cell types / S. Horvath // *Genome. Biol.* – 2013. – V. 14. – № 10. – P. 96.
85. Hovatta, I. DNA microarray data analysis / I. Hovatta, K. Kimppa, A. Lehmuusola et al. – Helsinki : Picaset Oy, 2005 – 165 p.
86. Huang, Q. AIP1 suppresses atherosclerosis by limiting hyperlipidemia-induced inflammation and vascular endothelial dysfunction / Q. Huang, L. Qin, S. Dai et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2013. – V. 33. – № 4. – P. 795-804.
87. Irizarry, R. A. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores / R. A. Irizarry, C. Ladd-Acosta, B. Wen // *Nat Genet.* – 2009. – № 41. – P. 178-186.
88. James, S. J. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology / S. J. James, S. Melnyk, M. Pogribna et al. // *J. Nutr.* – 2002. – 132. – P. 2361S-2366S.
89. Jones, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond / P. A. Jones // *Nat. Rev. Genet.* – 2012. – V. 13. – № 7. – P. 484-492.
90. Kelder, T. WikiPathways: building research communities on biological pathways / T. Kelder, M. P. Iersel, K. Hanspers et al. // *Nucleic. Acids. Res.* – 2012. – V. 40. – P. D1301-D1307.
91. Khalil, C. A. The emerging role of epigenetics in cardiovascular disease / C. A. Khalil // *Ther. Adv. Chronic. Dis.* – 2014. – V. 5. – № 4. – P. 178-187.

92. Kim, J. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence / J. Kim, J. Y. Kim, K. S. Song // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – № 1. – P. 72-80.
93. Kirschner, K. M. Wilms' tumour protein Wt1 stimulates transcription of the gene encoding vascular endothelial cadherin / K. M. Kirschner, L. K. Sciesielski, H. Scholz // *Pflugers Arch.* – 2010. – V. 460. – № 6. – P. 1051-1061.
94. Klimov, A. N. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo / A. N. Klimov, V. S. Gurevich, A. A. Nikiforova et al. // *Atherosclerosis.* – 1993. – № 100. – P. 13-18.
95. Kosaki, K. Isoform-specific imprinting of the human PEG1/MEST gene / K. Kosaki, R. Kosaki, W. J. Craigen et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – V. 66. – № 1. – P. 309-312.
96. Law, J. A. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals / J. A. Law, S. E. Jacobsen // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – № 11. – P. 204-220.
97. Lee, M. E. Homocysteine and hypomethylation. A novel link to vascular disease / M. E. Lee, H. Wang // *Trends Cardiovasc. Med.* – 1999. – № 9. – P. 49-54.
98. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis / P. Libby // *Nature.* – 2002. – V. 420. – № 6917. – P. 868-874.
99. Libby, P. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis / P. Libby, P. M. Ridker, G. K. Hansson // *Nature.* – 2011. – V. 473. – № 7347. – P. 317-325.
100. Libby, P. The Vascular Biology of Atherosclerosis / P. Libby // *Braunwald's heart disease : a textbook of cardiovascular medicine* / R. O. Bonow, D. L. Mann, D. P. Zipes, P. Libby. – 9th ed. – Philadelphia : Saunders, 2012. – Pt. 6. – P. 897-913.

101. Lillvis, J. H. Regional expression of HOXA4 along the aorta and its potential role in human abdominal aortic aneurysms / J. H. Lillvis, R. Erdman, C. M. Schworer et al. // BMC. Physiol. – 2011. – V. 11. – P. 9-20.
102. Liptay, M. J. Neointimal macrophages colocalize with extracellular matrix gene expression in human atherosclerotic pulmonary arteries / M. J. Liptay, W. C. Parks, R. P. Mecham et al. // J. Clin. Invest. – 1993. – № 91. – P. 588-594.
103. Lund, G. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E / G. Lund, L. Andersson, M. Lauria et al. // J. Biol. Chem. - 2004. - V. 279. - № 28. - P. 29147-29,154.
104. Lusis, A. J. Genetics of atherosclerosis / A. J. Lusis // Trends. Genet. – 2012. – V. 28. – № 6. – P. 267-275.
105. Lyon, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.) / M. F. Lyon // Nature. - 1961. - V. 190. - P. 372-373.
106. Ma, S. Apoptosis-associated tyrosine kinase 1 inhibits growth and migration and promotes apoptosis in melanoma / S. Ma, B. P. Rubin // Lab. Invest. –2014. – V. 94. – № 4. – P. 430-438.
107. Makar, K. W. DNA methylation is a nonredundant repressor of the th2 effector program / K. W. Makar, C. B. Wilson // J. Immunol. – 2004. – № 173. – P. 4402-4406.
108. Matouk, C. C. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression / C. C. Matouk, P. A. Marsden // Circ. Res. – 2008. – № 102. – P. 873-887.
109. Maunakea, A. K. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition / A. K. Maunakea, I. Chepelev, K. Cui et al. // Cell. Res. – 2013. – V. 23. – № 11. – P. 1256-1269.
110. McCarrey, J. R. Distinctions between transgenerational and non-transgenerational epimutations / J. R. McCarrey // Mol. Cell. Endocrinol. – 2014. – V. 398. – P. 13-23.

111. Min, W. AIP1 in graft arteriosclerosis / W. Min, J. S. Pober // Trends. Cardiovasc. Med. – 2011. – V. 21. – № 8. – P. 229-233.
112. Moon, Y. S. Imprinting and expression status of isoforms 1 and 2 of PEG1/MEST gene in uterine leiomyoma / Y. S. Moon, S. K. Park, H. T. Kim et al. // Gynecol. Obstet. Invest. – 2010. – V. 70. – № 2. – P. 120-125.
113. Moore, K. J. Macrophage foam cells formation: the pathways to cholesterol engorgement / K. J. Moore, K. Rayner // Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms / Eds. S. J. George, J. Johnson. – Weinhein : Wiley-Vch Gmbh & Co, 2010. – P. 231-254.
114. Moore, K. J. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis / K. J. Moore, I. Tabas // Cell. – 2011. – V. 145. – № 3. – P. 341-355.
115. Moore, L. D. DNA methylation and its basic function / L. D. Moore, T. Le, G. Fan // Neuropsychopharmacology. – 2013. – V. 38. – № 1. – P. 23-38.
116. Morgan, R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning / R. Morgan // Trends. Genet. – 2006. – V. 22. – № 2. – P. 67-69.
117. Murry, C. E. Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis / C. E. Murry, C. T. Gipaya, T. Bartosek et al. // Am. J. Pathol. – 1997. – № 151. – P. 697-705.
118. Napoli, C. Primary prevention of atherosclerosis: a clinical challenge for the reversal of epigenetic mechanisms / C. Napoli, V. Crudele, A. Soricelli et al. // Circulation. - 2012. - V. 125. - № 19. - P. 2363-2373.
119. Ness, J. Prevalence of coexistence of coronary artery disease, ischemic stroke, and peripheral arterial disease in older persons, mean age 80 years, in an academic hospital-based geriatrics practice / J. Ness, W. S. Aronow // J. Am. Geriatr. Soc. – 1999. – V. 47. – № 10. – P. 1255-1256.
120. Newman, P. E. Can reduced folic acid and vitamin B12 levels cause deficient DNA methylation producing mutations which initiate atherosclerosis / P. E. Newman // Med. Hypotheses. – 1999. – V. 53. – № 5. – P. 421-424.

121. Nilsson, E. E. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease susceptibility / E. E. Nilsson, M. K. Skinner // *Transl. Res.* – 2015. – V. 165. – № 1. – P. 12-17.
122. Okano, M. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development / M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber et al. // *Cell.* – 1999. – V. 99. – № 3. – P. 247-257.
123. Otsuka, F. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis / F. Otsuka, K. Yahagi, K. Sakakura et al. // *Ann. Cardiothorac. Surg.* – 2013. – V. 2. – № 4. – P. 519-526.
124. Paul, D. S. Advances in epigenome-wide association studies for common diseases / D. S. Paul, S. Beck // *Trends. Mol. Med.* – 2014. – V. 20. – № 10. – P. 541-543.
125. Petrosino, J. F. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification / J. F. Petrosino, S. Highlander, R. A. Luna et al. // *Clin. Chem.* – 2009. – V. 55. – № 5. – P. 856-866.
126. Pinney, S. E. Mammalian Non-CpG Methylation: Stem Cells and Beyond / S. E. Pinney // *Biology.* – 2014. – V. 3. – № 4. – P. 739-751.
127. Poredos, P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis / P. Poredos // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* – 2001. – V. 7. – № 4. – P. 276-280.
128. Post, W. S. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system / W. S. Post, P. J. Goldschmidt-Clermont, C. C. Wilhide et al. // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – № 4. – P. 985-991.
129. Pruett, N. D. Evidence for Hox-specified positional identities in adult vasculature / N. D. Pruett, R. P. Visconti, D. F. Jacobs et al. // *BMC. Dev. Biol.* – 2008. – V. 8. – P. 93-105.
130. Raghunath, M. A novel kinase, AATYK induces and promotes neuronal differentiation in a human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line / M. Raghunath,

- R. Patti, P. Bannerman et al. // *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* – 2000. – V. 77. – № 2. – P. 151-162.
131. Rakyan, V. K. Epigenome-wide association studies for common human diseases / V. K. Rakyan, T. A. Down, D. J. Balding et al. // *Nat. Rev. Genet.* - 2011. - V. 12. - № 8. - P. 529-541.
132. Riesewijk, A. M. Monoallelic expression of human PEG1/MEST is paralleled by parent-specific methylation in fetuses / A. M. Riesewijk, L. Hu, U. Schulz et al. // *Genomics.* – 1997. – V. 42. – № 2. – P. 236-244.
133. Ronaghi, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing / M. Ronaghi // *Genome. Res.* – 2001. – V. 11. – № 1. – P. 3-11.
134. Rosenfeld, M. E. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits / M. E. Rosenfeld, R. Ross // *Arteriosclerosis.* – 1990. – № 10. – P. 680-687.
135. Ross, R. Response to injury and atherogenesis / R. Ross, J. Glomset, L. Harker // *Am. J. Pathol.* – 1977. – V. 86. – № 3. – P. 675-684.
136. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease / R. Ross // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – V. 340. – № 2. – P. 115-126.
137. Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual* / J. Sambrook, D. W. Russel. – 3rd ed. – New York : Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001. – 2344 p.
138. Sandoval, J. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome / J. Sandoval, H. Heyn, S. Moran et al. // *Epigenetics.* – 2011. – V. 6. – № 6. – P. 692-702.
139. Scholz, H. Role of the Wilms' tumour transcription factor, Wt1, in blood vessel formation / H. Scholz, K. D. Wagner, N. Wagner // *Pflugers. Arch.* – 2009. – V. 458. – № 2. – P. 315-323.

140. Schunkert, H. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease / H. Schunkert, I. R. Kathiresan, S. Reilly et al. // *Nat. Genet.* – 2011. – V. 43. – № 4. – P. 333-338.
141. Schwartz, S. M. The good smooth muscle cells in atherosclerosis / S. M. Schwartz, R. Virmani, M. E. Rosenfeld // *Curr. Atheroscler. Rep.* – 2000. – V. 2. – № 5. – P. 422-429.
142. Seo, D. Gene expression phenotypes of atherosclerosis / D. Seo, T. Wang, H. Dressman et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – V. 24. – № 10. – P. 1922-1927.
143. Sharma, P. Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients / P. Sharma, J. Kumar, G. Garg et al. // *DNA Cell Biol.* – 2008 – № 27. – P. 357-365.
144. Shen X. Heparin impairs angiogenesis through inhibition of microRNA-10b / X. Shen, J. X. Fang, X. J. Lv et al. // *J. Biol. Chem.* - 2011. – V. 286. – № 30. – P. 26616-26627.
145. Shimabukuro, M. Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia: a potential link between epigenetics and schizophrenia / M. Shimabukuro, T. Sasaki, A. Imamura et al. // *J. Psychiatr. Res.* – 2007. – № 41. – P. 1042-1046.
146. Smith, R. Epigenetics and Chronic Diseases: An Overview / R. Smith, J. Mill // *Epigenetic Aspects of Chronic Diseases* / Eds. H. I. Roach, F. Bronner, R. O. C. Oreffo. – London : Springer, 2011. – P. 1-20.
147. Smyth, G. K. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments / *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* – 2004. – V. 3 – № 1. – P. 1-25.
148. Stary, H. C. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life / H. C. Stary // *Eur. Heart. J.* – 1990. – №11. – P. 3-19.

149. Stary, H. C. Composition and classification of human atherosclerotic lesions / H. C. Stary // *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* – 1992. – V. 421. – № 4. – P. 277-290.
150. Stary, H. C. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Special report / H. C. Stary, A. B. Chandler, S. Glagov et al. // *Arterioscler. Thromb.* – 1994. – № 14. – P. 840-856.
151. Stary, H. C. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis / H. C. Stary, A. B. Chandler, R. E. Dinsmore et al. // *Circulation.* – 1995. – V. 92. – № 5. – P. 1355-1374.
152. Stenvinkel, P. Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease / P. Stenvinkel, M. Karimi, S. Johansson et al. // *J. Intern. Med.* - 2007. - V. 261. - № 5. - P. 488-499.
153. Stocker, R. Oxidative stress and atherosclerosis / R. Stocker, J. F. Keaney // *Molecular Mechanisms of Atherosclerosis* / Ed. J. Loscalzo. – Abingdon : Taylor & Francis, 2005. – P. 61-83.
154. Subramaniam, D. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy / D. Subramaniam, R. Thombre, A. Dhar et al. // *Front. Oncol.* – 2014. – V. 4. – P. 80.
155. Szmitko, P. E. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I / P. E. Szmitko, C. H. Wang, R. D. Weisel et al. // *Circulation.* – 2003. – V. 108. – № 16. – P. 1917-1923.
156. Takahashi, M. Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size / M. Takahashi, Y. Kamei, O. Ezaki // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2005. – V. 288. – № 1. – P. E117-E124.

157. Toshner, M. Transcript analysis reveals a specific HOX signature associated with positional identity of human endothelial cells / M. Toshner, B. J. Dunmore, E. F. McKinney et al. // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – № 3. – e91334.
158. Touleimat, N. Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation / N. Touleimat, J. Tost // *Epigenomics*. – 2012. – V. 4. – № 3. – P. 325-341.
159. Turunen, M. P. Epigenetics and atherosclerosis / M. P. Turunen, E. Aavik, S. Ylä-Herttuala // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – № 1790. – P. 886-891.
160. Valencia-Morales, M. P. The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression / M. P. Valencia-Morales, S. Zaina, H. Heyn et al. // *BMC. Med. Genomics*. – 2015. – V. 8. – P. 7.
161. Wagner, K. D. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction / K. D. Wagner, N. Wagner, A. Bondke et al. // *FASEB. J.* – 2002. – V. 16. – № 9. – P. 1117-1119.
162. Wamhoff, B. R. Role of alterations in the differentiated state of smooth muscle cell in atherothrombogenesis / B. R. Wamhoff, M. S. Kumar, G. K. Owens // *Atherothrombosis and Coronary Artery Disease* / Eds. V. Fuster, E. J. Topol, E. G. Nabel. – Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2005. – P. 401-419.
163. Wang, D. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b / D. Wang, M. Xia, X. Yan et al. // *Circ. Res.* – 2012. – V. 111. – № 8. – P. 967-981.
164. Wang, J. C. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence / J. C. Wang, M. Bennett // *Circ. Res.* – 2012. – V. 111. – № 2. – P. 245-259.
165. Wang, J. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013 / J. Wang, D. Duncan, Z. Shi et al. // *Nucleic. Acids. Res.* – 2013. – V. 41. – P. W77-W83.

166. Wang, Z. Integrated analysis of microarray data of atherosclerotic plaques: modulation of the ubiquitin-proteasome system / Z. Wang, D. Guo, B. Yang et al. // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – № 10. – e110288.
167. Wight, T. N. The vascular extracellular matrix / T. N. Wight // *Atherothrombosis and Coronary Artery Disease* / Eds. V. Fuster, E. J. Topol, E. G. Nabel. – ed. 2. – Philadelphia : Williams & Wilkins, 2005. – P. 421-437.
168. Williams, K. J. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced / K. J. Williams, I. Tabas // *Curr. Opin. Lipidol.* – 1998. – V. 9. – № 5. – P. 471-474.
169. Wilson, V. L. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells / V. L. Wilson, P. A. Jones // *Science*. – 1983– № 220. – P. 1055-1057.
170. Xie, Y. Statistical methods of background correction for Illumina BeadArray data / Y. Xie, X. Wang, M. Story // *Bioinformatics*. - 2009. – V. 25. – № 6. – P. 751-757.
171. Yamada, S. Novel function of histamine signaling in hyperlipidemia-induced atherosclerosis: Histamine H1 receptors protect and H2 receptors accelerate atherosclerosis / S. Yamada, K. Y. Wang, A. Tanimoto et al. // *Pathol. Int.* – 2015. – V. 65. – № 2. – P. 67-80.
172. Yamada, Y. Identification of hypo- and hypermethylated genes related to atherosclerosis by a genome-wide analysis of DNA methylation / Y. Yamada, T. Nishida, H. Horibe et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2014. – V. 33. – № 5. – P. 1355-1363.
173. Ying, A. K. Methylation of the estrogen receptor-alpha gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells / A. K. Ying, H. H. Hassanain, C. M. Roos et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2000. – № 46. – P. 172-179.

174. Yuen, R. K. Review: A high capacity of the human placenta for genetic and epigenetic variation: implications for assessing pregnancy outcome / R. K. Yuen, W. P. Robinson // *Placenta*. - 2011. - V. 32. - P. S136-S141.
175. Zaina, S. DNA methylation map of human atherosclerosis / S. Zaina, H. Heyn, F. J. Carmona et al. // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2014. – V. 7. – № 5. – P. 692-700.
176. Zawadzki, C. Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques / C. Zawadzki, N. Chatelain, M. Delestre et al. // *Atherosclerosis*. – 2009. – № 2. – P. 4-14.
177. Zhang, B. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts / B. Zhang, S. Kirov, J. Snoddy // *Nucleic. Acids. Res.* – 2005. – V. 33. – P. W741-W748.
178. Zhang, D. Homocysteine activates vascular smooth muscle cells by DNA demethylation of platelet-derived growth factor in endothelial cells / D. Zhang, Y. Chen, X. Xie et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2012a. – V. 53. – № 4. – P. 487-496.
179. Zhang, D. Homocysteine upregulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo / D. Zhang, X. Xie, Y. Chen et al. // *Circ. Res.* – 2012b. – V. 110. – № 6. – P. 808-817.
180. Zhu, S. Inactivation of monocarboxylate transporter MCT3 by DNA methylation in atherosclerosis / S. Zhu, P. J. Goldschmidt-Clermont, C. Dong // *Circulation*. – 2005. – № 9. – P. 1353-1361.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Обработка результатов гибридизации на микрочипах

«Infinium Human Methylation27 BeadChip»

Результаты микрочипового исследования были получены с использованием программного пакета «GenomeStudio Methylation Module» («Illumina», США), из которого они были экспортированы в виде таблицы данных следующего вида:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	[Header]														
2	GSGX Version	01.01.2000													
3	Report Date	1/31/2013 1:58:25 PM													
4	Project	2013_01_30													
5	Group Set	new													
6	Analysis	raw_data													
7	Normalizator	none													
8	[Group Methylation Profile]														
9	TargetID	ProbeID_ A	ProbeID_ B	2leu.MIN_Beta	2leu.AVG_Beta	2leu.MA_X_Beta	2leu.NA_RRAYS	2leu.ARRAY_STDEV	2leu.Avg_ NBEADS_A	2leu.Avg_ NBEADS_B	2leu.BEAD_STDERR_A	2leu.BEAD_STDERR_B	2leu.Signal_A	2leu.Signal_B	2leu.Detection Pval
10	cg00000292	990370	6660678	0.72725	0.72725	0.72725	1	NaN	17	20	44	75	982	2885	0
11	cg00002426	6580397	6100343	0.84914	0.84914	0.84914	1	NaN	17	24	45	77	406	2848	0
12	cg00003994	7150184	7150392	0.02002	0.02002	0.02002	1	NaN	25	16	144	11	4110	86	0
13	cg00005847	4850717	1260113	0.16775	0.16775	0.16775	1	NaN	17	15	96	53	3616	749	0
14	cg00006414	6980731	4280093	0.02589	0.02589	0.02589	1	NaN	13	18	194	13	4339	118	0
15	cg00007981	5260689	6860356	0.04999	0.04999	0.04999	1	NaN	20	23	219	39	8280	441	0
16	cg00008493	7200647	2900438	0.9773	0.9773	0.9773	1	NaN	18	10	8	367	183	12183	0
17	cg00008713	6860184	3780392	0.02168	0.02168	0.02168	1	NaN	19	19	369	23	16643	371	0
18	cg00009407	4230376	6380376	0.00899	0.00899	0.00899	1	NaN	23	24	330	17	14342	131	0
19	cg00010193	4780008	1580192	0.56809	0.56809	0.56809	1	NaN	24	15	414	549	11577	15359	0
20	cg00011459	3120296	7320368	0.91631	0.91631	0.91631	1	NaN	19	17	24	100	151	2748	0
21	cg00012199	6200228	6200154	0.01688	0.01688	0.01688	1	NaN	20	12	239	27	10442	181	0

Затем данные были загружены и обработаны в программной среде для статистических вычислений «R (v 3.0.1) / Bioconductor (v 2.14)» с помощью программного пакета «lumi (v 2.5.1)».

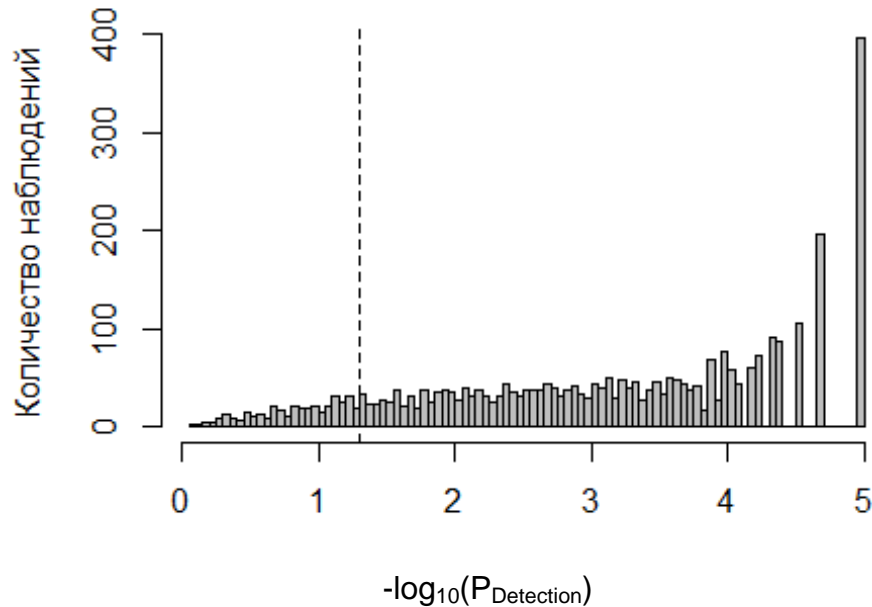
Трансформация данных

На основе изначальных данных функция загрузки по умолчанию рассчитывает значения M-величины для каждой CpG-пробы (обозначаются идентификатором "cg" в каждом образце (микрочипе)). Таблица данных выглядела следующим образом:

	S_2leu	S_2mk	S_2kap	S_2vk	S_3leu	S_3mk	и т.д.
cg00000292	1.464030	0.0612446	0.2123181	-0.5779761	2.153782	0.0136849	...
cg00002426	2.542527	0.0569746	0.5752473	-0.0790604	2.494913	-0.3265884	...
cg00003994	-4.500446	-4.4102479	-4.3222350	-4.5515910	-3.983360	-4.7082482	...
cg00005847	-2.129914	0.8152896	-1.8882670	0.0561051	-2.554589	-0.4842505	...
cg00006414	-4.347835	-4.2266798	-4.2090956	-4.5261141	-4.445542	-4.5898547	...

Оценка качества и распределения «сырых» данных

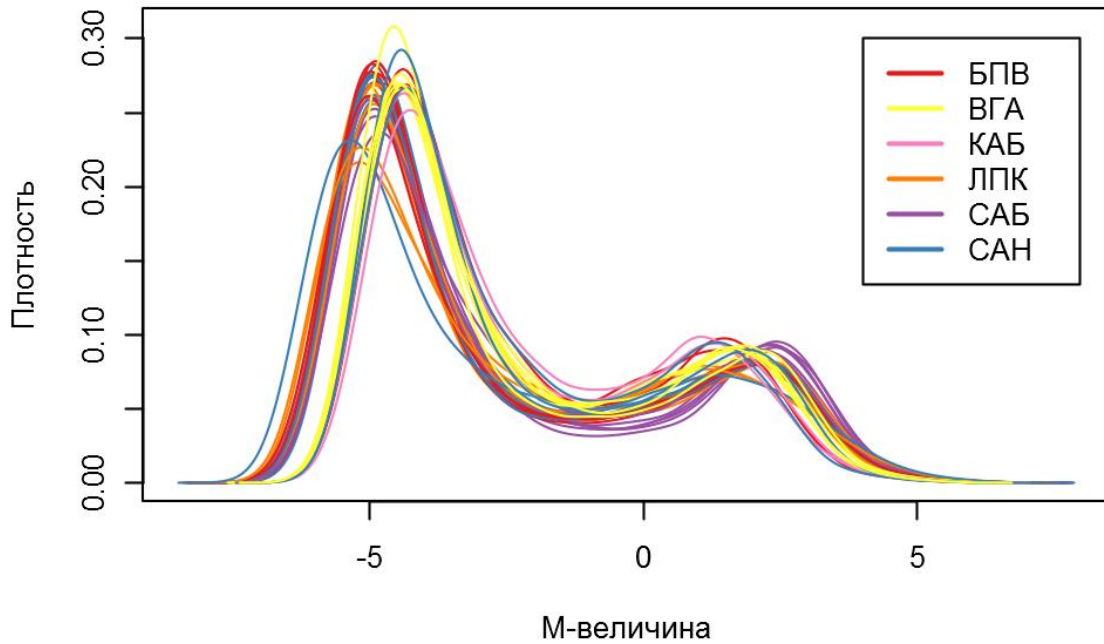
Важным показателем качества полученных данных является величина $P_{\text{Detection}}$ (Detection Pval в таблице), указывающая на значимость отличия сигнала свечения пробы от фонового шума. Распределение значений данной величины во всем массиве данных:



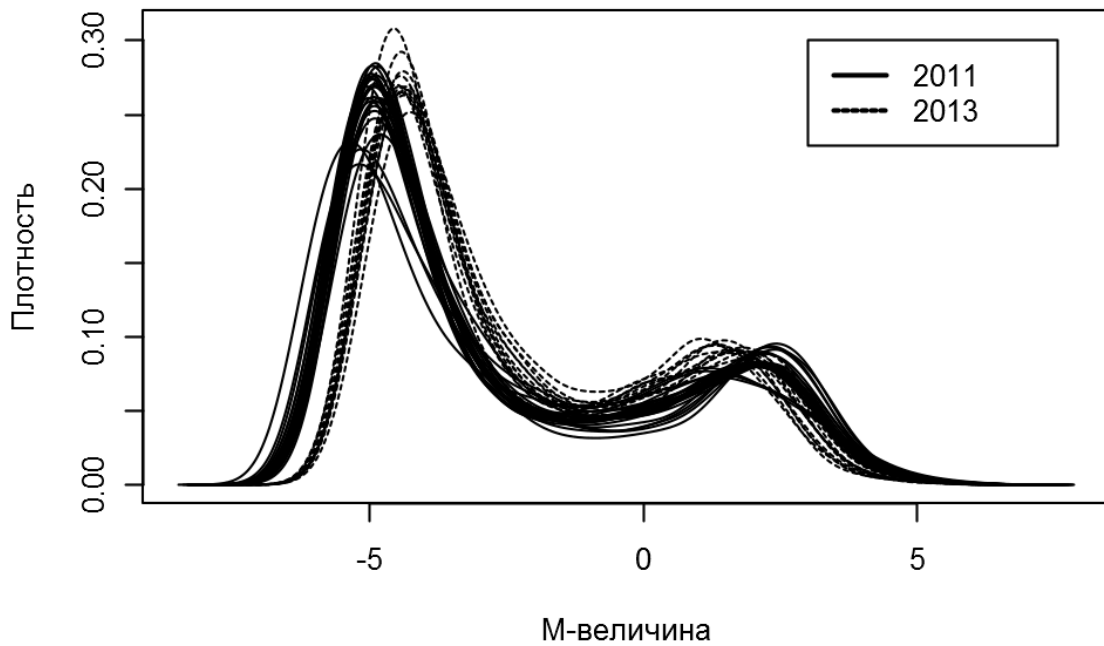
Пунктирной линией обозначен пороговый уровень данной величины $P = 0,05$. Из анализа были исключены все наблюдения, превышающие пороговый уровень (на графике расположенные слева от пунктирной линии). Таких наблюдений оказалось 356, а количество CpG-проб, которым они соответствуют - 122. Кроме того, из дальнейших этапов анализа были исключены CpG-пробы, комплементарные областям с известными сайтами однонуклеотидного полиморфизма ДНК (SNP). По данным литературы, для 67 CpG-сайтов с микрочипов "Infinium Human Methylation27 BeadChip" характерны SNP в позиции цитозина. При этом 4 CpG-сайта из списка полиморфных уже оказались несостоятельными при оценке качества их детекции с помощью Detection P-value. Таким образом, всего из дальнейшего анализа было исключено 185 из 27578 CpG-проб, входящих в состав микрочипов.

Анализ качества данных производился на основании визуальной оценки графиков.

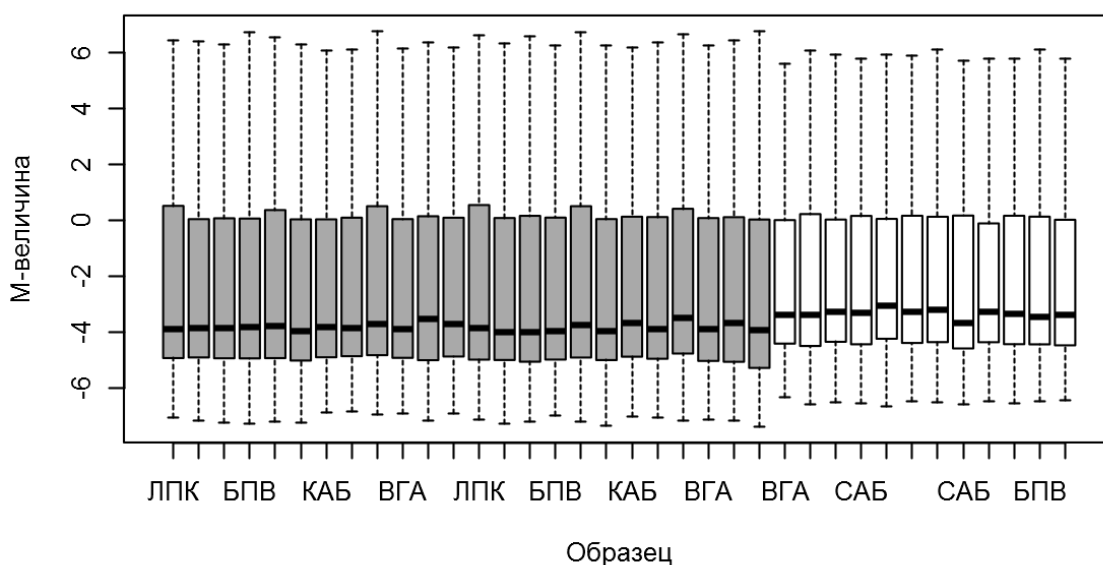
Распределение значений М-величины выглядело следующим образом:



При этом заметен "эффект группировки" при окрашивании графиков в зависимости от времени получения результатов микрочипового исследования:

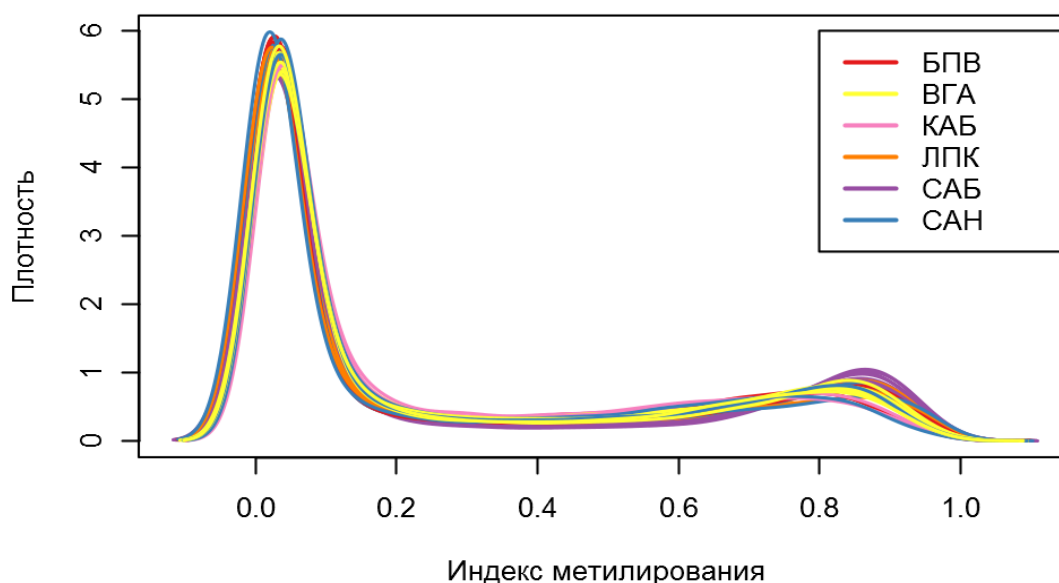


Прослеживается он и на графиках распределения данных типа «ящик с усами»:

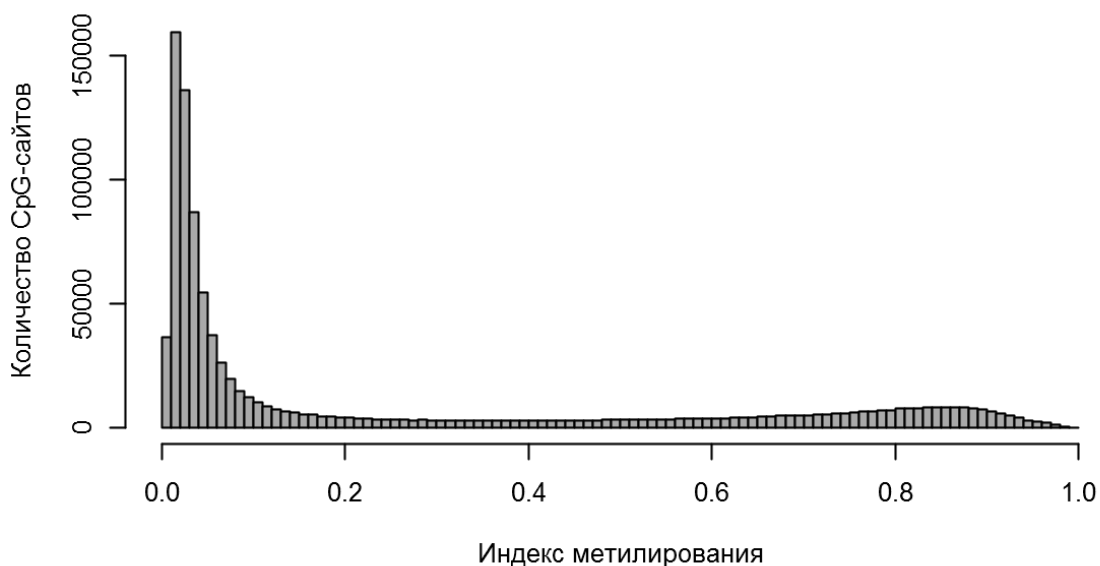


Результаты 2011 года имеют более высокий уровень медианных значений и немного меньший разброс по сравнению с данными 2013 года. Эффект группировки необходимо учитывать на дальнейших этапах анализа, и особенно, при сравнении уровней метилирования в образцах, проанализированных в разное время.

Бимодальное распределение характерно для данных метилирования. Максимумы на графике плотности распределения М-величины соответствуют метилированному ($M > 0$) и неметилированному ($M < 0$) состояниям изучаемых CpG-сайтов. Более нагляден характер распределения величины β :

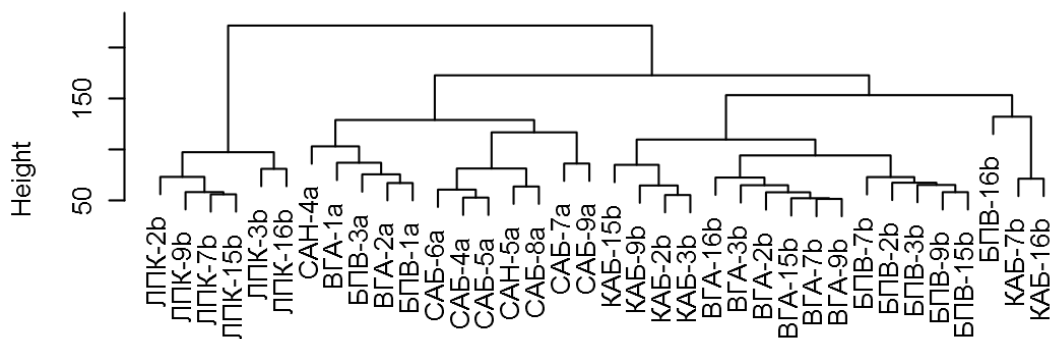


Индекс метилирования, в отличие от оценки плотности вероятности его значений, не принимает отрицательных значений, что наглядно показано на гистограмме средних уровней метилирования:



Из графика видно, что неметилированных CpG-сайтов в исследуемых образцах намного больше, что логично, учитывая, что большая часть CpG-сайтов, включенных в состав анализируемых на микрочипах, входят в состав CpG-островка

Сходство/различие профилей метилирования образцов можно оценить с опомощью кластерного анализа. Для этого по матрице данных рассчитываются Евклидовы расстояния между образцами, и на их основе происходит построение дендрограммы путем аггломеративной иерархической кластеризации (метод средней связи):

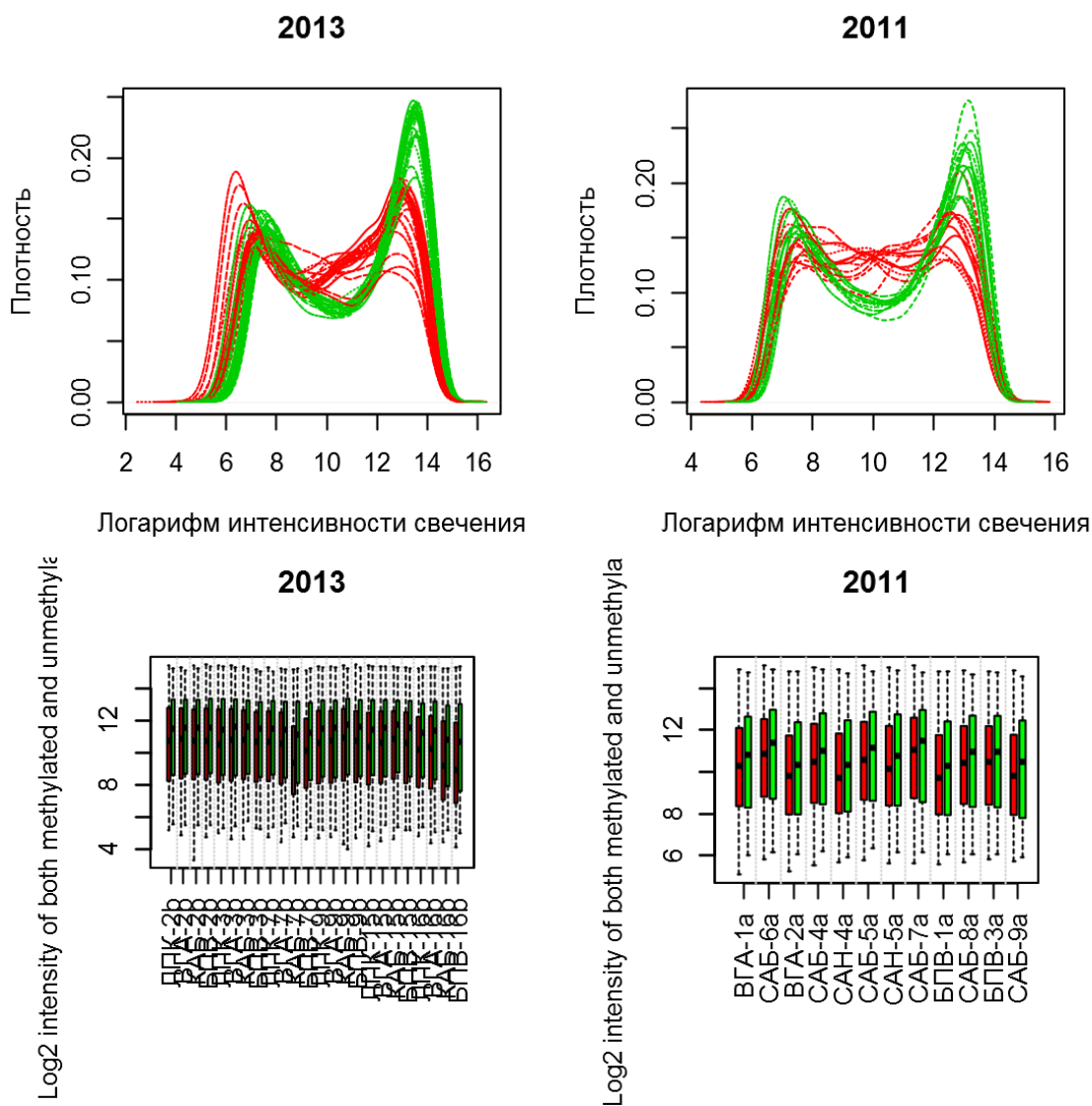


Лейкоциты (ЛПК) дистанцируются от тканей сосудистой стенки. Образцы сосудистой стенки делятся на два кластера в зависимости от времени получения результатов ("эффект группировки", подписи а и б в названиях образцов).

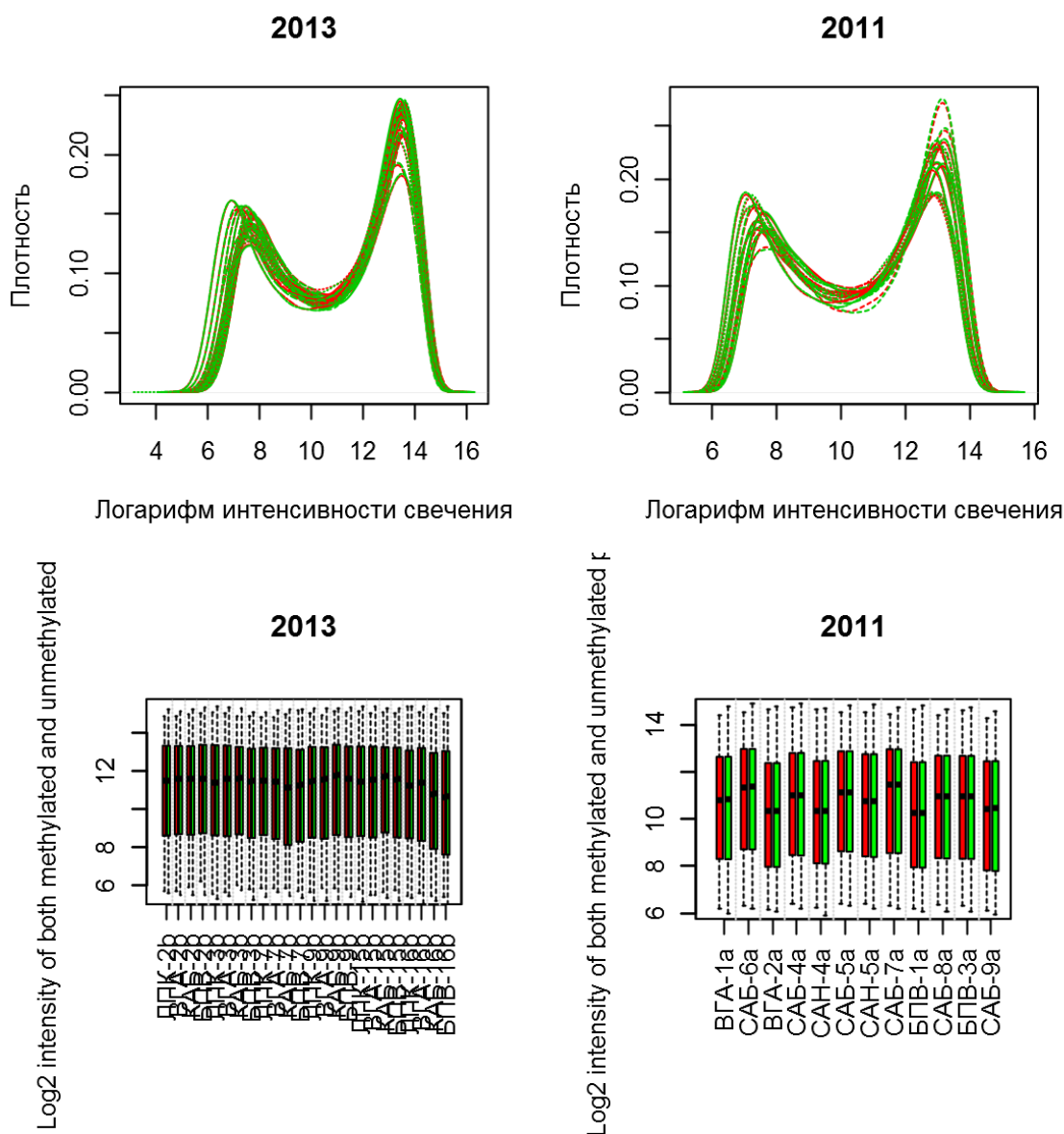
Коррекция цветового дисбаланса

Используемые микрочипы являются двухцветными (используются флуоресцентные красители Cy3 и Cy5). Однако цветовой канал не влияет на определение уровня метилирования, так как дискриминация метилированных и неметилированных позиций происходит на уровне зондов, а флуорофором метятся нуклеотиды, встраиваемые уже после отжига матричной ДНК на зондах микрочипа.

Тем не менее, можно оценить дисбаланс сигналов по цветовым каналам (показаны отдельно для результатов, полученных в разное время):



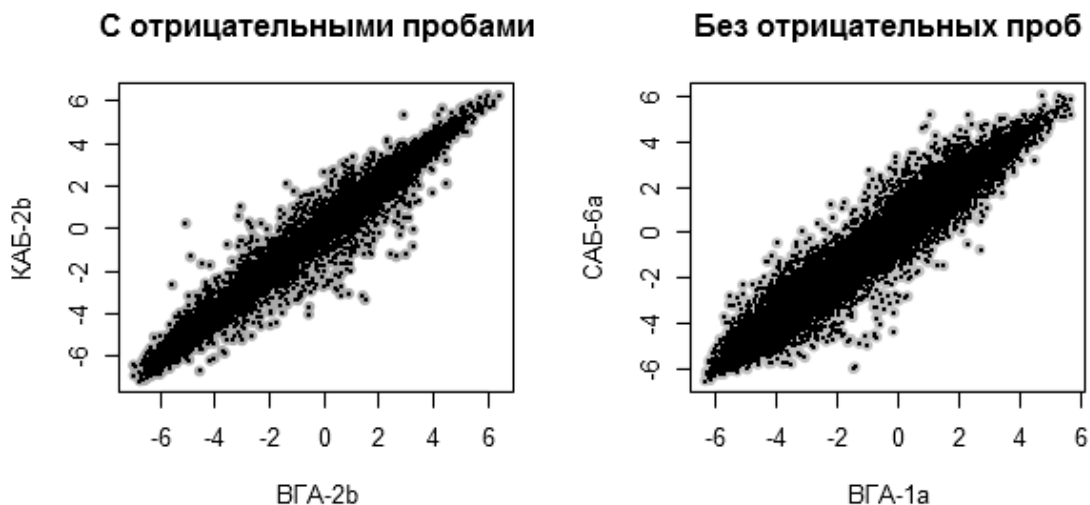
Коррекция цветового дисбаланса проводилась с помощью специальной функции "lumiMethyC" с параметрами по умолчанию. Результат коррекции - отсутствие цветового дисбаланса:



Коррекция фонового сигнала

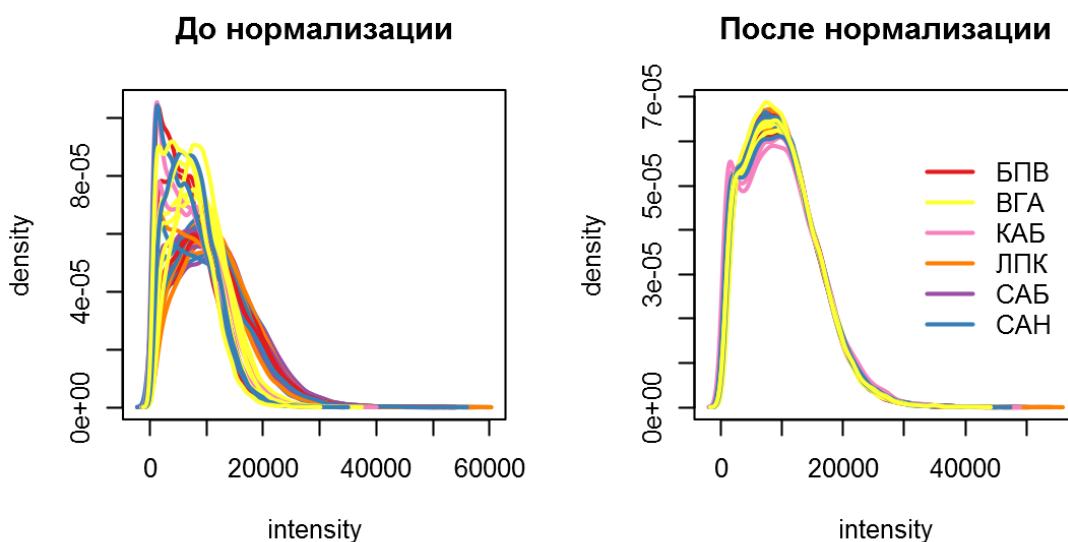
Коррекция фонового шума проводилась с помощью функции "lumiMethyB" с параметрами по умолчанию. Для некоторых микрочипов была недоступна информация о пробах отрицательного контроля, поэтому использовались рассчитанные эмпирически оценки фонового сигнала (см. Гл. 2). Результат фоновой коррекции показан на примере рассеяния значений М-величины в парах образцов: серым цветом обозначены "сырые"

результаты, черными точками - после коррекции. Можно отметить, что фоновая коррекция не практически не изменяла значения сигналов.



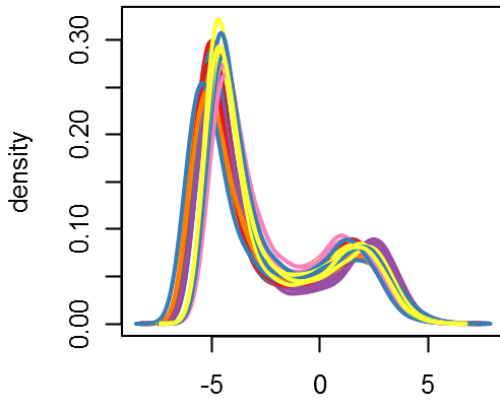
Нормализация

Нормализация была проведена в данных, объединенных после предыдущих этапов обработки. Для этого был применен метод квантильной нормализации (функция "lumiMethyN" с параметром `method="quantile"`), показавший лучшие результаты по "выравниванию" распределений сигналов в образцах. Распределение интенсивности свечения CpG-проб на микрочипах:

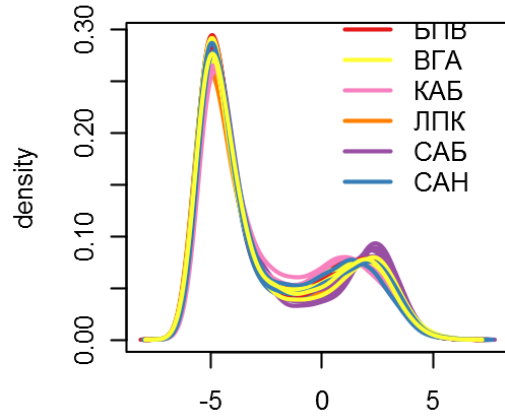


Распределение расчетной М-величины:

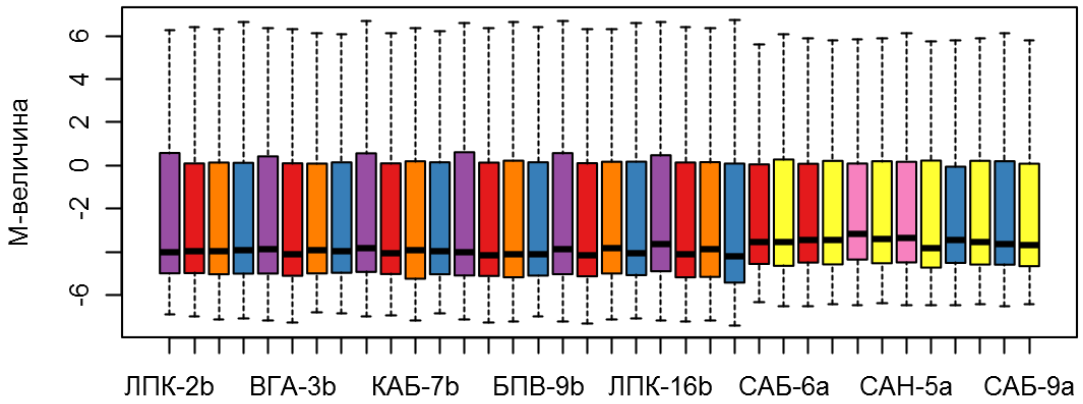
М-величина до нормализации



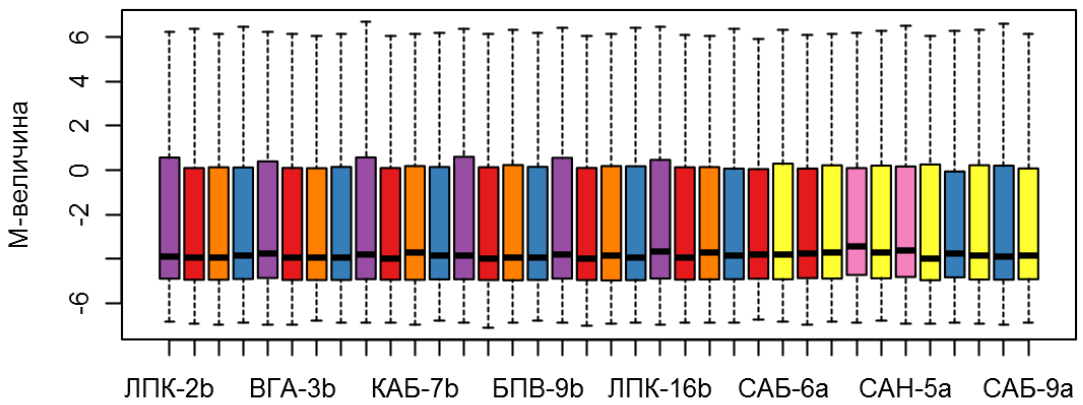
М-величина после нормализации



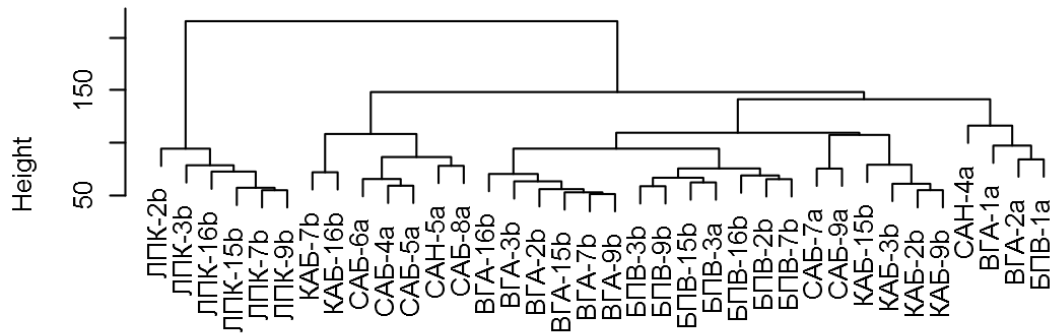
До нормализации



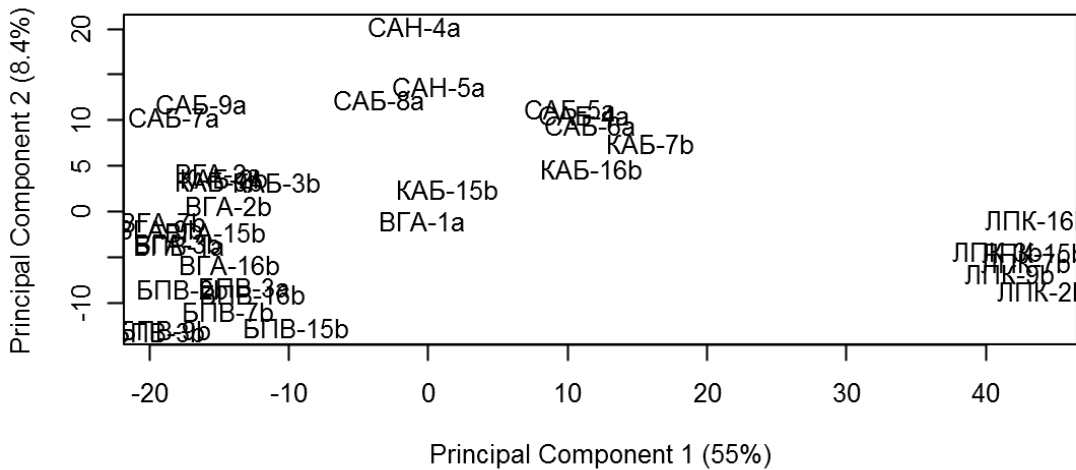
После нормализации



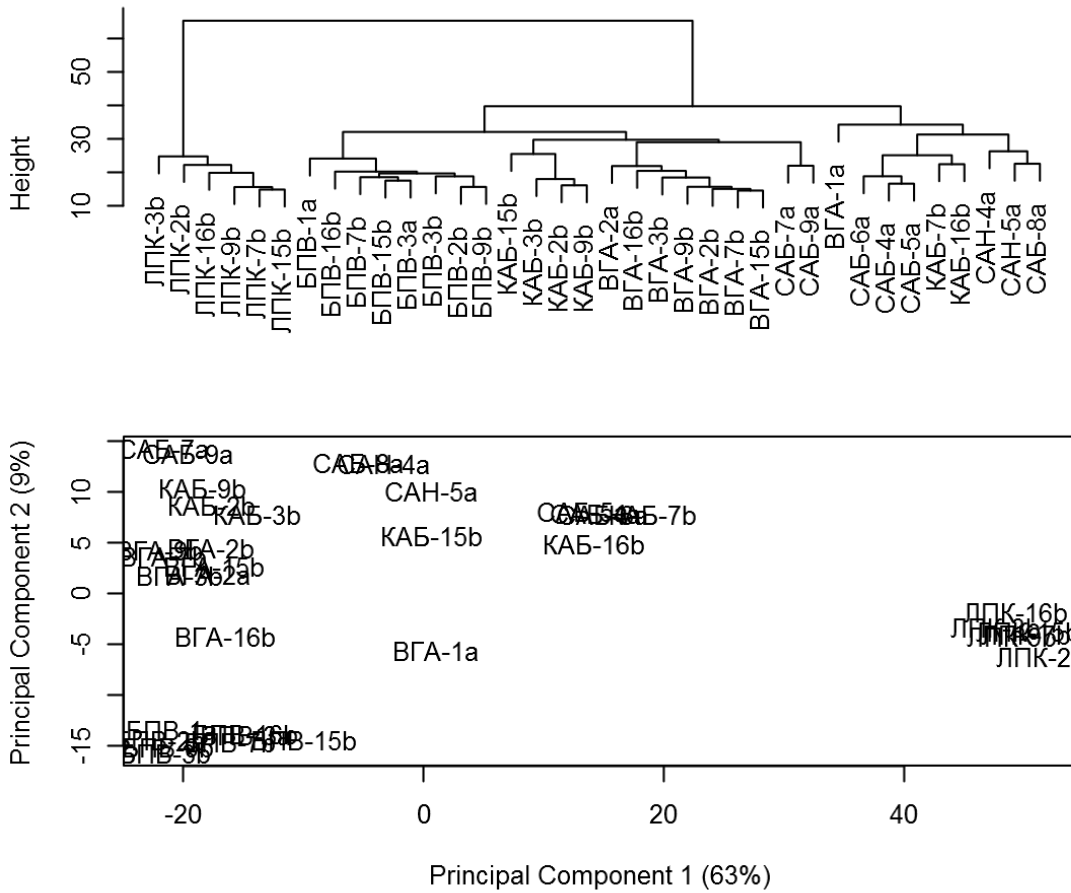
Кластеризация образцов после процедуры нормализации:



Более наглядно можно отразить распределение образцов в зависимости от профилей их метилирования в пространстве двух координат, полученных при уменьшении размерности данных (многомерном шкалировании) классическим методом основных координат (Principal Coordinate Analysis):



Результаты кластерного анализа для расчетной величины β немного отличались от тех, что были получены для M -величины, но с сохранением той же группировки образцов:



По-прежнему отчетливо дистанцировались лейкоциты (ЛПК) от тканей сосудистой стенки. Хорошо различались и группы тканей одной локализации: вены (БПВ) и артерии (ВГА, КАБ, САБ, САН). Пораженные атеросклерозом ткани обладали более высокой гетерогенностью - часть образцов группировалась с неповрежденными артериями (КАБ-2,3,9,15; САБ-7,9), другая образовывала собственный кластер (КАБ-7,16 и оставшиеся САБ). Нормализация частично нивелировала «эффект группировки», но для лучшего контроля данный фактор был учтен в обобщённой линейной модели (GLM) при сравнении результатов, полученных в разное время, с помощью пакета «limma».

Список CpG-сайтов, гиперметилированных в КАБ по сравнению с ВГА

Ген	CpG-сайт	Локализация в геноме*	CpG-островок	β КАБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>ZNF683</i>	cg10705251	1:26572192	нет	$0,88 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,06$	$8,27 \times 10^{-9}$
<i>HSD17B2</i>	cg20373326	16:80626304	нет	$0,63 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,09$	$2,37 \times 10^{-8}$
<i>ZNFN1A1</i>	cg06590610	7:50411811	7:50411750-50412000	$0,82 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,07$	$3,09 \times 10^{-8}$
<i>KRT4</i>	cg17667972	12:51494560	нет	$0,84 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,11$	$5,26 \times 10^{-8}$
<i>FABP1</i>	cg19910382	2:88208676	нет	$0,81 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,15$	$1,22 \times 10^{-7}$
<i>CCL28</i>	cg23863670	5:43447686	нет	$0,73 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,06$	$1,23 \times 10^{-7}$
<i>FOXP2</i>	cg05232889	7:113842655	нет	$0,43 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,03$	$1,37 \times 10^{-7}$
<i>CCDC60</i>	cg02498063	12:118256960	12:118256646-118257076	$0,46 \pm 0,09$	$0,20 \pm 0,07$	$2,30 \times 10^{-7}$
<i>SLC22A12</i>	cg07220939	11:64115193	11:64115128-64115334	$0,56 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,06$	$2,75 \times 10^{-7}$
<i>C3orf35</i>	cg22286764	3:37403643	нет	$0,82 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,09$	$2,85 \times 10^{-7}$
<i>PAEP</i>	cg01055695	9:137592771	нет	$0,82 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,06$	$3,57 \times 10^{-7}$
<i>PLEKHG5</i>	cg22805308	1:6502502	нет	$0,47 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,07$	$4,55 \times 10^{-7}$
<i>FRMPD2</i>	cg05859842	10:49153362	нет	$0,48 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,11$	$7,15 \times 10^{-7}$
<i>FIP1L1</i>	cg19408398	4:53938085	нет	$0,54 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,05$	$7,71 \times 10^{-7}$
<i>GATA4</i>	cg13434842	8:11605305	8:11605055-11605961	$0,39 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,07$	$8,81 \times 10^{-7}$
<i>STAC3</i>	cg25189085	12:55930925	нет	$0,69 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,08$	$1,05 \times 10^{-6}$
<i>FAM83A</i>	cg24833277	8:124263542	8:124263343-124263618	$0,83 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,07$	$1,05 \times 10^{-6}$
<i>ANGPTL1</i>	cg07044282	1:177106760	нет	$0,51 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,04$	$1,10 \times 10^{-6}$
<i>CIQTNF3</i>	cg03934354	5:34078897	нет	$0,75 \pm 0,06$	$0,46 \pm 0,04$	$1,39 \times 10^{-6}$
<i>CIQTNF7</i>	cg24829483	4:14950739	нет	$0,66 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,09$	$1,41 \times 10^{-6}$
<i>FGF7</i>	cg23504246	15:47502634	нет	$0,49 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,05$	$1,41 \times 10^{-6}$
<i>MYL1</i>	cg12339029	2:210888147	нет	$0,86 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,08$	$1,42 \times 10^{-6}$
<i>SFTPB</i>	cg26394380	2:85749512	нет	$0,75 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,04$	$1,42 \times 10^{-6}$
<i>CHRNA10</i>	cg07484827	11:3649733	нет	$0,67 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,08$	$1,64 \times 10^{-6}$
<i>GAS2</i>	cg06493930	11:22646390	нет	$0,71 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,07$	$1,73 \times 10^{-6}$
<i>SLC22A14</i>	cg16558203	3:38322396	нет	$0,76 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,07$	$1,79 \times 10^{-6}$

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β КАБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>IGFALS</i>	cg05982504	16:1784963	16:1784796-1785119	$0,77 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,03$	$2,18 \times 10^{-6}$
<i>CORT</i>	cg04256470	1:10433052	1:10432949-10433150	$0,85 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,03$	$2,50 \times 10^{-6}$
<i>KCNMB3</i>	cg00862290	3:180467667	3:180467337-180467703	$0,79 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,07$	$2,55 \times 10^{-6}$
<i>HK1</i>	cg06323290	10:70699885	нет	$0,83 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,06$	$2,55 \times 10^{-6}$
<i>KIAA0367</i>	cg11880010	9:78518464	нет	$0,57 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,04$	$2,55 \times 10^{-6}$
<i>C6orf54</i>	cg11251877	6:168141830	нет	$0,76 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,09$	$2,69 \times 10^{-6}$
<i>KCNQ1DN</i>	cg01530101	11:2847674	11:2846828-2848015	$0,37 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,09$	$3,19 \times 10^{-6}$
<i>FLJ45983</i>	cg04765277	10:8134685	10:8130632-8134925	$0,58 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,05$	$3,34 \times 10^{-6}$
<i>C10orf82</i>	cg17349199	10:118419442	нет	$0,72 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,03$	$3,97 \times 10^{-6}$
<i>ACOT2</i>	cg25598083	14:73104646	нет	$0,58 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,11$	$5,62 \times 10^{-6}$
<i>P2RX3</i>	cg26128441	11:56861915	нет	$0,80 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,09$	$5,82 \times 10^{-6}$
<i>ELSPBP1</i>	cg08981777	19:53189549	нет	$0,39 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,04$	$6,85 \times 10^{-6}$
<i>MS4A2</i>	cg10414946	11:59612934	нет	$0,58 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,07$	$9,31 \times 10^{-6}$
<i>FLJ30294</i>	cg26514942	2:102744938	нет	$0,63 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,06$	$9,32 \times 10^{-6}$
<i>C1orf161</i>	cg09440340	1:116455938	нет	$0,42 \pm 0,06$	$0,21 \pm 0,08$	$1,07 \times 10^{-5}$
<i>OVGP1</i>	cg09558502	1:111772054	нет	$0,34 \pm 0,10$	$0,13 \pm 0,02$	$1,29 \times 10^{-5}$
<i>TBX22</i>	cg17205788	X:79163723	нет	$0,46 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,06$	$1,61 \times 10^{-5}$
<i>NGEF</i>	cg19485804	2:233586958	нет	$0,71 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,17$	$1,68 \times 10^{-5}$
<i>MAGEA9</i>	cg09607232	X:148670955	нет	$0,79 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,06$	$1,95 \times 10^{-5}$
<i>C11orf52</i>	cg08775230	11:111294703	нет	$0,65 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,04$	$2,23 \times 10^{-5}$
<i>PKD2</i>	cg26215428	4:89147275	нет	$0,75 \pm 0,05$	$0,47 \pm 0,13$	$2,75 \times 10^{-5}$
<i>SLC6A13</i>	cg15966757	12:242520	нет	$0,66 \pm 0,10$	$0,39 \pm 0,07$	$2,80 \times 10^{-5}$
<i>TNP1</i>	cg13980719	2:217433805	нет	$0,64 \pm 0,09$	$0,36 \pm 0,11$	$3,43 \times 10^{-5}$
<i>LGII</i>	cg00532335	10:95506851	нет	$0,53 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,02$	$3,44 \times 10^{-5}$
<i>PGRMC1</i>	cg05397738	X:118253599	X:118253585-118255522	$0,77 \pm 0,06$	$0,47 \pm 0,08$	$3,44 \times 10^{-5}$
<i>CLDN15</i>	cg02512860	7:100667471	нет	$0,69 \pm 0,07$	$0,41 \pm 0,07$	$3,65 \times 10^{-5}$
<i>AVIL</i>	cg06317209	12:56497145	нет	$0,53 \pm 0,07$	$0,33 \pm 0,04$	$3,70 \times 10^{-5}$
<i>FLJ45983</i>	cg00779924	10:8134647	10:8130632-8134925	$0,42 \pm 0,15$	$0,12 \pm 0,02$	$4,30 \times 10^{-5}$
<i>LEP</i>	cg19594666	7:127668516	7:127667928-127668724	$0,41 \pm 0,13$	$0,19 \pm 0,05$	$4,30 \times 10^{-5}$
<i>SLC35B3</i>	cg09548084	6:8381217	6:8380156-8381258	$0,62 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,05$	$4,53 \times 10^{-5}$

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β КАБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>DCT</i>	cg05256043	13:93929952	нет	$0,67 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,02$	$4,54 \times 10^{-5}$
<i>OLFML3</i>	cg17253459	1:114324193	нет	$0,68 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,05$	$4,60 \times 10^{-5}$
<i>USH2A</i>	cg27566805	1:214663431	нет	$0,66 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,06$	$7,71 \times 10^{-5}$
<i>CDH10</i>	cg01058368	5:24681244	нет	$0,48 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,05$	$8,48 \times 10^{-5}$
<i>HRH2</i>	cg14345676	5:175041704	5:175041676-175041898	$0,63 \pm 0,08$	$0,35 \pm 0,09$	$8,56 \times 10^{-5}$
<i>ZNF710</i>	cg01185080	15:88344817	15:88344274-88345300	$0,49 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,04$	$8,67 \times 10^{-5}$
<i>TDGF1</i>	cg27371741	3:46594162	3:46594072-46594386	$0,56 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,15$	$9,17 \times 10^{-5}$
<i>UTS2</i>	cg20625138	1:7836254	нет	$0,67 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,06$	$1,13 \times 10^{-4}$
<i>MMP20</i>	cg26757793	11:102001369	нет	$0,73 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,08$	$1,22 \times 10^{-4}$
<i>ABCB11</i>	cg00295325	2:169596178	нет	$0,78 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,07$	$1,23 \times 10^{-4}$
<i>IGSF9</i>	cg19111262	1:158182750	нет	$0,46 \pm 0,08$	$0,25 \pm 0,07$	$1,28 \times 10^{-4}$
<i>AP2S1</i>	cg23131950	19:52046470	19:52046359-52046702	$0,79 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,08$	$1,28 \times 10^{-4}$
<i>KRT7</i>	cg09522147	12:50913609	12:50912973-50913926	$0,59 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,07$	$1,34 \times 10^{-4}$
<i>PDLIM4</i>	cg01305625	5:131621711	5:131620858-131621718	$0,53 \pm 0,08$	$0,32 \pm 0,06$	$1,46 \times 10^{-4}$
<i>PLA2G3</i>	cg21274025	22:29865981	нет	$0,66 \pm 0,08$	$0,42 \pm 0,03$	$1,51 \times 10^{-4}$
<i>PII5</i>	cg04893119	8:75898856	нет	$0,47 \pm 0,11$	$0,23 \pm 0,07$	$1,63 \times 10^{-4}$
<i>LRTM1</i>	cg06470471	3:54936951	нет	$0,78 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,10$	$1,71 \times 10^{-4}$
<i>LOC220070</i>	cg02046017	11:70385054	нет	$0,71 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,13$	$1,97 \times 10^{-4}$
<i>CNTN6</i>	cg05209917	3:1109730	нет	$0,56 \pm 0,10$	$0,34 \pm 0,05$	$2,16 \times 10^{-4}$
<i>ALOX12</i>	cg08946332	17:6840612	17:6839463-6841283	$0,78 \pm 0,08$	$0,53 \pm 0,06$	$2,63 \times 10^{-4}$
<i>PRPH</i>	cg09595479	12:47975479	12:47975082-47977816	$0,60 \pm 0,10$	$0,32 \pm 0,05$	$2,81 \times 10^{-4}$
<i>F3</i>	cg01185754	1:94779317	1:94778962-94780728	$0,42 \pm 0,07$	$0,18 \pm 0,06$	$3,12 \times 10^{-4}$
<i>SLC6A6</i>	cg13763232	3:14418432	3:14418260-14418496	$0,44 \pm 0,16$	$0,20 \pm 0,09$	$3,50 \times 10^{-4}$
<i>SLMAP</i>	cg00002426	3:57718583	3:57716811-57718675	$0,69 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,06$	$4,02 \times 10^{-4}$
<i>RIS1</i>	cg27390220	3:45243527	3:45241257-45243590	$0,48 \pm 0,13$	$0,25 \pm 0,05$	$4,49 \times 10^{-4}$
<i>MYH4</i>	cg23400451	17:10314453	нет	$0,76 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,04$	$4,64 \times 10^{-4}$
<i>C10orf30</i>	cg23114594	10:13584654	нет	$0,79 \pm 0,06$	$0,58 \pm 0,06$	$5,24 \times 10^{-4}$
<i>ELSPBP1</i>	cg19404979	19:53189843	нет	$0,47 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,04$	$5,49 \times 10^{-4}$
<i>KISS1</i>	cg05606799	1:202431930	нет	$0,65 \pm 0,11$	$0,44 \pm 0,05$	$5,56 \times 10^{-4}$
<i>LOC161247</i>	cg22918700	14:23669907	нет	$0,70 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,08$	$5,57 \times 10^{-4}$

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β КАБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>CDCP2</i>	cg26185508	1:54392033	1:54391846-54392065	$0,51 \pm 0,10$	$0,30 \pm 0,09$	$5,81 \times 10^{-4}$
<i>JPH4</i>	cg06536578	14:23118395	нет	$0,67 \pm 0,10$	$0,45 \pm 0,05$	$7,92 \times 10^{-4}$
<i>LOC348645</i>	cg15149938	22:48404396	нет	$0,59 \pm 0,15$	$0,33 \pm 0,15$	$9,36 \times 10^{-4}$
<i>SLAMF1</i>	cg18881723	1:158883494	нет	$0,39 \pm 0,12$	$0,19 \pm 0,02$	$1,23 \times 10^{-3}$
<i>TGFBIII</i>	cg23910243	16:31392119	нет	$0,46 \pm 0,14$	$0,25 \pm 0,09$	$1,32 \times 10^{-3}$
<i>AXUD1</i>	cg02254461	3:39170908	3:39170826-39171090	$0,54 \pm 0,19$	$0,24 \pm 0,10$	$1,74 \times 10^{-3}$
<i>FLJ20273</i>	cg15967525	4:40212695	нет	$0,57 \pm 0,10$	$0,34 \pm 0,04$	$1,75 \times 10^{-3}$
<i>EDNRB</i>	cg12120741	13:77390307	13:77390197-77391989	$0,46 \pm 0,14$	$0,22 \pm 0,04$	$2,47 \times 10^{-3}$
<i>AATK</i>	cg13781408	17:76710295	17:76710126-76711293	$0,79 \pm 0,07$	$0,59 \pm 0,08$	$3,09 \times 10^{-3}$
<i>SH2D4B</i>	cg26391080	10:82287377	нет	$0,61 \pm 0,15$	$0,40 \pm 0,06$	$4,21 \times 10^{-3}$
<i>DHX38</i>	cg22337624	16:70683922	нет	$0,50 \pm 0,14$	$0,29 \pm 0,06$	$5,80 \times 10^{-3}$
<i>TCTEX1D1</i>	cg17819635	1:66990261	1:66990232-66990994	$0,43 \pm 0,18$	$0,17 \pm 0,08$	$5,88 \times 10^{-3}$
<i>RBP1</i>	cg13099330	3:140740489	3:140740275-140741996	$0,63 \pm 0,10$	$0,40 \pm 0,09$	$6,65 \times 10^{-3}$
<i>CRMP1</i>	cg03544320	4:5945592	4:5944246-5946191	$0,40 \pm 0,09$	$0,15 \pm 0,11$	$6,67 \times 10^{-3}$
<i>NPR2</i>	cg24194775	9:35781475	9:35781291-35782084	$0,36 \pm 0,23$	$0,14 \pm 0,07$	$7,46 \times 10^{-3}$

Примечание: * - сборка генома GRCh36/hg18.

Список CpG-сайтов, гипометилированных в КАБ по сравнению с ВГА

Ген	CpG-сайт	Локализация в геноме*	CpG-островок	β КАБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>HOXB5</i>	cg16495265	17:44026009	17:44025432-44027432	0,10 ± 0,01	0,32 ± 0,08	2,37×10 ⁻⁸
<i>ST6GALNAC1</i>	cg13015534	17:72151388	нет	0,22 ± 0,02	0,60 ± 0,05	2,37×10 ⁻⁸
<i>ARHGDIB</i>	cg19826026	12:15005660	нет	0,16 ± 0,03	0,54 ± 0,07	3,09×10 ⁻⁸
<i>S100A10</i>	cg10795646	1:150242190	нет	0,14 ± 0,02	0,60 ± 0,09	5,03×10 ⁻⁸
<i>GLRX</i>	cg03852144	5:95185395	нет	0,12 ± 0,03	0,52 ± 0,16	5,26×10 ⁻⁸
<i>FASLG</i>	cg10161121	1:170894643	нет	0,56 ± 0,02	0,76 ± 0,03	5,78×10 ⁻⁸
<i>CD3D</i>	cg24841244	11:117718540	нет	0,40 ± 0,04	0,74 ± 0,03	6,40×10 ⁻⁸
<i>MS4A3</i>	cg17173423	11:59580569	нет	0,28 ± 0,05	0,59 ± 0,05	8,09×10 ⁻⁸
<i>DEFB1</i>	cg24292612	8:6722882	нет	0,39 ± 0,04	0,62 ± 0,08	9,25×10 ⁻⁸
<i>SLC25A11</i>	cg22628926	17:4785445	нет	0,15 ± 0,03	0,39 ± 0,08	9,25×10 ⁻⁸
<i>HOXA7</i>	cg26511321	7:27163315	7:27162023-27163571	0,28 ± 0,05	0,62 ± 0,08	1,22×10 ⁻⁷
<i>TLR4</i>	cg05429895	9:119506461	нет	0,08 ± 0,01	0,33 ± 0,07	1,23×10 ⁻⁷
<i>HOXD4</i>	cg12127282	2:176722931	2:176722497-176722964	0,30 ± 0,04	0,82 ± 0,05	1,37×10 ⁻⁷
<i>ARHGDIB</i>	cg10925082	12:15005970	нет	0,14 ± 0,06	0,69 ± 0,11	1,37×10 ⁻⁷
<i>MGC35206</i>	cg22088368	22:35734834	нет	0,26 ± 0,05	0,61 ± 0,10	1,67×10 ⁻⁷
<i>TEX101</i>	cg21491308	19:48584666	нет	0,13 ± 0,03	0,54 ± 0,14	1,77×10 ⁻⁷
<i>HOXD4</i>	cg01152019	2:176723290	2:176723073-176723586	0,10 ± 0,03	0,69 ± 0,11	2,00×10 ⁻⁷
<i>DMRT3</i>	cg26489108	9:965856	9:965733-965960	0,26 ± 0,04	0,52 ± 0,07	2,38×10 ⁻⁷
<i>HOXD4</i>	cg14399060	2:176723316	2:176723073-176723586	0,10 ± 0,02	0,56 ± 0,10	2,41×10 ⁻⁷
<i>S100A8</i>	cg20070090	1:151630113	нет	0,29 ± 0,03	0,58 ± 0,05	2,75×10 ⁻⁷
<i>KLK10</i>	cg06130787	19:56215362	нет	0,09 ± 0,02	0,30 ± 0,02	3,44×10 ⁻⁷
<i>FAM91A1</i>	cg20283107	8:124858150	нет	0,21 ± 0,02	0,42 ± 0,04	9,17×10 ⁻⁷
<i>LRMP</i>	cg10150530	12:25096735	нет	0,14 ± 0,04	0,36 ± 0,06	1,66×10 ⁻⁶
<i>SLC17A4</i>	cg15916061	6:25862198	нет	0,41 ± 0,09	0,77 ± 0,06	1,66×10 ⁻⁶
<i>SH2D2A</i>	cg20839149	1:155053225	1:155053160-155053362	0,14 ± 0,05	0,53 ± 0,06	1,66×10 ⁻⁶
<i>MEST</i>	cg09872616	7:129913418	7:129912883-129914215	0,17 ± 0,04	0,42 ± 0,05	1,73×10 ⁻⁶

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β КАБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>PAX9</i>	cg00509670	14:36200064	14:36199815-36200327	0,18 ± 0,01	0,51 ± 0,07	1,73×10 ⁻⁶
<i>ABCA4</i>	cg12869058	1:94360460	нет	0,62 ± 0,07	0,88 ± 0,02	1,99×10 ⁻⁶
<i>SI00A8</i>	cg24898863	1:151630204	нет	0,17 ± 0,03	0,39 ± 0,07	2,09×10 ⁻⁶
<i>TCF21</i>	cg10771262	6:134251673	нет	0,31 ± 0,06	0,62 ± 0,08	2,54×10 ⁻⁶
<i>SLC17A4</i>	cg21627181	6:25862169	нет	0,44 ± 0,13	0,85 ± 0,03	3,18×10 ⁻⁶
<i>HOXD4</i>	cg00767581	2:176723371	2:176723073-176723586	0,29 ± 0,06	0,81 ± 0,08	3,46×10 ⁻⁶
<i>MEST</i>	cg09059945	7:129913254	7:129912883-129914215	0,18 ± 0,04	0,42 ± 0,05	4,08×10 ⁻⁶
<i>PAX9</i>	cg26620157	14:36200048	14:36199815-36200327	0,15 ± 0,02	0,54 ± 0,07	4,92×10 ⁻⁶
<i>SPACA3</i>	cg11161417	17:28343567	нет	0,40 ± 0,05	0,66 ± 0,09	6,05×10 ⁻⁶
<i>MFAP2</i>	cg08477744	1:17180619	нет	0,59 ± 0,04	0,83 ± 0,06	8,33×10 ⁻⁶
<i>TFR2</i>	cg10681065	7:100077108	нет	0,42 ± 0,06	0,68 ± 0,03	9,32×10 ⁻⁶
<i>ALX4</i>	cg19358442	11:44282263	11:44282161-44283221	0,24 ± 0,05	0,50 ± 0,03	9,32×10 ⁻⁶
<i>NAT8</i>	cg09172980	2:73723682	нет	0,15 ± 0,03	0,36 ± 0,05	9,55×10 ⁻⁶
<i>ADORA3</i>	cg02947253	1:111848223	нет	0,65 ± 0,04	0,85 ± 0,03	9,84×10 ⁻⁶
<i>HAPLN1</i>	cg06434428	5:83052386	нет	0,59 ± 0,12	0,88 ± 0,02	9,97×10 ⁻⁶
<i>VTCN1</i>	cg27446185	1:117555488	нет	0,43 ± 0,06	0,67 ± 0,05	1,05×10 ⁻⁵
<i>C6orf25</i>	cg14437986	6:31799014	6:31798937-31799213	0,38 ± 0,05	0,60 ± 0,04	1,12×10 ⁻⁵
<i>ZNF217</i>	cg00476577	20:51633815	нет	0,11 ± 0,06	0,32 ± 0,12	1,31×10 ⁻⁵
<i>HAPLN1</i>	cg09893305	5:83052940	нет	0,42 ± 0,11	0,66 ± 0,11	1,66×10 ⁻⁵
<i>SERPINB7</i>	cg17251713	18:59594018	нет	0,27 ± 0,06	0,48 ± 0,06	1,82×10 ⁻⁵
<i>UBASH3A</i>	cg00134539	21:42697140	нет	0,52 ± 0,12	0,85 ± 0,04	1,83×10 ⁻⁵
<i>ALX4</i>	cg18546622	11:44281605	11:44281312-44281846	0,22 ± 0,05	0,53 ± 0,05	2,23×10 ⁻⁵
<i>OLFML2A</i>	cg20789824	9:126602682	нет	0,41 ± 0,08	0,67 ± 0,04	2,40×10 ⁻⁵
<i>APOL6</i>	cg09432376	22:34374172	нет	0,30 ± 0,08	0,51 ± 0,15	2,72×10 ⁻⁵
<i>ADAM7</i>	cg05847038	8:24354716	нет	0,37 ± 0,06	0,58 ± 0,02	3,44×10 ⁻⁵
<i>UCN2</i>	cg05125838	3:48576589	нет	0,36 ± 0,06	0,59 ± 0,04	4,02×10 ⁻⁵
<i>PNLIP</i>	cg11812202	10:118295399	нет	0,45 ± 0,07	0,68 ± 0,05	4,54×10 ⁻⁵
<i>SCEL</i>	cg21063899	13:77007802	нет	0,30 ± 0,06	0,52 ± 0,08	5,61×10 ⁻⁵
<i>CST4</i>	cg25965576	20:23618089	нет	0,39 ± 0,07	0,64 ± 0,02	5,85×10 ⁻⁵
<i>KRT24</i>	cg23737768	17:36113623	нет	0,43 ± 0,10	0,75 ± 0,03	5,85×10 ⁻⁵

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β КАБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>MEST</i>	cg01888566	7:129913749	7:129912883-129914215	0,27 ± 0,07	0,49 ± 0,04	6,75×10 ⁻⁵
<i>MRGPRX2</i>	cg22051636	11:19038166	нет	0,32 ± 0,10	0,67 ± 0,16	7,13×10 ⁻⁵
<i>HOXB6</i>	cg18878432	17:44038408	17:44038335-44038975	0,30 ± 0,10	0,56 ± 0,02	7,46×10 ⁻⁵
<i>DARC</i>	cg23507131	1:157440780	нет	0,38 ± 0,10	0,65 ± 0,06	8,55×10 ⁻⁵
<i>FSHR</i>	cg17327492	2:49235663	нет	0,51 ± 0,09	0,74 ± 0,05	8,56×10 ⁻⁵
<i>P2RY10</i>	cg23079782	X:78087577	нет	0,35 ± 0,08	0,58 ± 0,05	1,01×10 ⁻⁴
<i>PDCD1</i>	cg00795812	2:242450682	2:242450515-242450972	0,15 ± 0,03	0,41 ± 0,04	1,02×10 ⁻⁴
<i>HSPB3</i>	cg11391732	5:53787676	5:53787529-53787747	0,54 ± 0,12	0,77 ± 0,09	1,19×10 ⁻⁴
<i>HNF4A</i>	cg19717150	20:42418292	20:42418188-42418589	0,41 ± 0,10	0,71 ± 0,05	1,22×10 ⁻⁴
<i>TMC05</i>	cg23254045	15:36013746	нет	0,40 ± 0,04	0,62 ± 0,06	1,28×10 ⁻⁴
<i>GPR143</i>	cg11325578	X:9693287	X:9692673-9694068	0,17 ± 0,02	0,41 ± 0,11	1,28×10 ⁻⁴
<i>SH2D2A</i>	cg12499211	1:155053267	1:155053160-155053362	0,35 ± 0,11	0,62 ± 0,10	1,28×10 ⁻⁴
<i>HOXD4</i>	cg18750960	2:176724663	2:176724528-176725909	0,12 ± 0,02	0,36 ± 0,07	1,34×10 ⁻⁴
<i>ALX4</i>	cg00061629	11:44281834	11:44281312-44281846	0,33 ± 0,11	0,72 ± 0,04	1,46×10 ⁻⁴
<i>HOXD3</i>	cg00005847	2:176737319	нет	0,21 ± 0,03	0,51 ± 0,09	1,65×10 ⁻⁴
<i>F13A1</i>	cg03440267	6:6266060	нет	0,20 ± 0,06	0,42 ± 0,08	1,93×10 ⁻⁴
<i>MLC1</i>	cg05861567	22:48865813	22:48865755-48865963	0,38 ± 0,10	0,59 ± 0,08	2,10×10 ⁻⁴
<i>HSPC065</i>	cg17170504	16:56840622	нет	0,60 ± 0,13	0,85 ± 0,02	2,16×10 ⁻⁴
<i>CCL2</i>	cg21109025	17:29604982	нет	0,58 ± 0,08	0,79 ± 0,03	2,39×10 ⁻⁴
<i>CD163</i>	cg12207371	12:7547070	нет	0,47 ± 0,06	0,68 ± 0,03	2,77×10 ⁻⁴
<i>HOXA3</i>	cg25426743	7:27132628	нет	0,6 ± 0,120	0,84 ± 0,02	3,09×10 ⁻⁴
<i>SPTBN1</i>	cg13618372	2:54607129	нет	0,56 ± 0,09	0,77 ± 0,03	3,55×10 ⁻⁴
<i>FSHR</i>	cg20613889	2:49234999	нет	0,39 ± 0,11	0,66 ± 0,03	3,85×10 ⁻⁴
<i>EVI2B</i>	cg05109049	17:26665459	нет	0,48 ± 0,16	0,74 ± 0,06	4,36×10 ⁻⁴
<i>RNF36</i>	cg05439368	15:42815390	нет	0,35 ± 0,14	0,57 ± 0,06	4,49×10 ⁻⁴
<i>C21orf29</i>	cg22991148	21:44955527	21:44955387-44955762	0,08 ± 0,02	0,32 ± 0,12	5,60×10 ⁻⁴
<i>TGM3</i>	cg21611708	20:2225040	нет	0,39 ± 0,13	0,60 ± 0,05	7,32×10 ⁻⁴
<i>MGC29671</i>	cg01138020	17:4283843	нет	0,41 ± 0,12	0,61 ± 0,07	8,31×10 ⁻⁴
<i>RUNX1</i>	cg04915566	21:35343342	нет	0,40 ± 0,15	0,65 ± 0,09	9,00×10 ⁻⁴
<i>WFDC1</i>	cg23865698	16:82885309	нет	0,29 ± 0,09	0,51 ± 0,05	1,07×10 ⁻³

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β КАБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>EVI2A</i>	cg23352695	17:26672937	нет	$0,43 \pm 0,14$	$0,66 \pm 0,05$	$1,25 \times 10^{-3}$
<i>HOXA2</i>	cg09871315	7:27109207	7:27108930-27109394	$0,17 \pm 0,05$	$0,37 \pm 0,07$	$1,40 \times 10^{-3}$
<i>CD53</i>	cg22325572	1:111217704	нет	$0,39 \pm 0,14$	$0,60 \pm 0,06$	$1,54 \times 10^{-3}$
<i>MRGPRX2</i>	cg13062935	11:19039090	нет	$0,47 \pm 0,19$	$0,74 \pm 0,07$	$1,62 \times 10^{-3}$
<i>BATF</i>	cg09937039	14:75058956	нет	$0,22 \pm 0,10$	$0,45 \pm 0,02$	$1,91 \times 10^{-3}$
<i>GCNT2</i>	cg26385286	6:10635801	нет	$0,33 \pm 0,09$	$0,57 \pm 0,06$	$1,94 \times 10^{-3}$
<i>EDARADD</i>	cg16240480	1:234624096	нет	$0,35 \pm 0,17$	$0,60 \pm 0,13$	$2,49 \times 10^{-3}$
<i>TRAF1</i>	cg15551881	9:122728536	нет	$0,40 \pm 0,11$	$0,64 \pm 0,05$	$2,94 \times 10^{-3}$
<i>TMEM71</i>	cg27159719	8:133841924	нет	$0,38 \pm 0,18$	$0,60 \pm 0,16$	$3,37 \times 10^{-3}$
<i>HOXC5</i>	cg15700739	12:52713967	12:52712802-52715131	$0,18 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,14$	$4,16 \times 10^{-3}$
<i>SEMA6B</i>	cg12941931	19:4510799	19:4510691-4510902	$0,43 \pm 0,18$	$0,66 \pm 0,05$	$4,45 \times 10^{-3}$
<i>PFC</i>	cg07688234	X:47374607	нет	$0,45 \pm 0,20$	$0,69 \pm 0,11$	$5,80 \times 10^{-3}$
<i>CHRNA6</i>	cg07906724	8:42743103	нет	$0,46 \pm 0,20$	$0,68 \pm 0,10$	$6,61 \times 10^{-3}$
<i>C7orf16</i>	cg23216015	7:31693179	нет	$0,33 \pm 0,10$	$0,53 \pm 0,08$	$9,29 \times 10^{-3}$
<i>CD28</i>	cg04098585	2:204279460	нет	$0,42 \pm 0,19$	$0,65 \pm 0,04$	$1,17 \times 10^{-2}$
<i>AIM2</i>	cg10636246	1:157313597	нет	$0,43 \pm 0,23$	$0,64 \pm 0,08$	$3,82 \times 10^{-2}$

Примечание: * - сборка генома GRCh36/hg18.

Список CpG-сайтов, гиперметилированных в САБ по сравнению с ВГА

Ген	CpG-сайт	Локализация в геноме*	CpG-островок	β САБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>KIAA0367</i>	cg19282250	9:78518342	нет	0,85 ± 0,01	0,53 ± 0,04	3,37×10 ⁻¹³
<i>ZNFN1A1</i>	cg06590610	7:50411811	7:50411750-50412000	0,80 ± 0,03	0,43 ± 0,07	8,41×10 ⁻⁸
<i>C11orf52</i>	cg08775230	11:111294703	нет	0,74 ± 0,05	0,38 ± 0,04	2,36×10 ⁻⁷
<i>ADPRHL1</i>	cg00463202	13:113155711	13:113155311-113155833	0,86 ± 0,02	0,64 ± 0,06	2,36×10 ⁻⁷
<i>FLJ20273</i>	cg15967525	4:40212695	нет	0,76 ± 0,05	0,34 ± 0,04	2,46×10 ⁻⁷
<i>AATK</i>	cg13781408	17:76710295	17:76710126-76711293	0,94 ± 0,02	0,59 ± 0,08	4,00×10 ⁻⁷
<i>FLJ30294</i>	cg26514942	2:102744938	нет	0,73 ± 0,04	0,37 ± 0,06	8,30×10 ⁻⁷
<i>GIF</i>	cg26970800	11:59370788	нет	0,91 ± 0,03	0,55 ± 0,08	9,04×10 ⁻⁷
<i>C10orf82</i>	cg17349199	10:118419442	нет	0,74 ± 0,06	0,45 ± 0,03	9,15×10 ⁻⁷
<i>USH2A</i>	cg27566805	1:214663431	нет	0,69 ± 0,04	0,43 ± 0,06	1,30×10 ⁻⁶
<i>CIDEC</i>	cg03604278	3:9897234	нет	0,58 ± 0,07	0,27 ± 0,03	2,28×10 ⁻⁶
<i>ZNF683</i>	cg10705251	1:26572192	нет	0,87 ± 0,01	0,65 ± 0,06	3,09×10 ⁻⁶
<i>LIPE</i>	cg14679230	19:47623519	нет	0,74 ± 0,03	0,50 ± 0,06	3,79×10 ⁻⁶
<i>UTS2</i>	cg20625138	1:7836254	нет	0,72 ± 0,03	0,44 ± 0,06	7,03×10 ⁻⁶
<i>ELSPBP1</i>	cg19404979	19:53189843	нет	0,69 ± 0,05	0,26 ± 0,04	1,17×10 ⁻⁵
<i>PAEP</i>	cg01055695	9:137592771	нет	0,81 ± 0,02	0,58 ± 0,06	1,17×10 ⁻⁵
<i>HOXA4</i>	cg24169822	7:27137519	7:27136060-27137536	0,51 ± 0,06	0,19 ± 0,04	1,44×10 ⁻⁵
<i>ASB4</i>	cg11554605	7:94953290	нет	0,76 ± 0,03	0,56 ± 0,04	1,44×10 ⁻⁵
<i>CNTN6</i>	cg05209917	3:1109730	нет	0,49 ± 0,07	0,23 ± 0,04	1,77×10 ⁻⁵
<i>KIAA0367</i>	cg11880010	9:78518464	нет	0,72 ± 0,07	0,34 ± 0,05	1,77×10 ⁻⁵
<i>CCL28</i>	cg23863670	5:43447686	нет	0,85 ± 0,03	0,59 ± 0,05	1,77×10 ⁻⁵
<i>TRIP10</i>	cg02085507	19:6690192	19:6690009-6691192	0,68 ± 0,03	0,40 ± 0,06	1,77×10 ⁻⁵
<i>CHRNA3</i>	cg22670733	15:76701339	15:76701258-76701471	0,69 ± 0,08	0,33 ± 0,04	1,77×10 ⁻⁵
<i>PAX8</i>	cg07403255	2:113752640	2:113750661-113752664	0,34 ± 0,06	0,13 ± 0,02	2,13×10 ⁻⁵
<i>OVGP1</i>	cg09558502	1:111772054	нет	0,66 ± 0,03	0,43 ± 0,05	2,13×10 ⁻⁵

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β САБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>C10orf30</i>	cg23114594	10:13584654	нет	$0,82 \pm 0,06$	$0,58 \pm 0,06$	$2,47 \times 10^{-5}$
<i>LOC161247</i>	cg22918700	14:23669907	нет	$0,76 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,08$	$2,57 \times 10^{-5}$
<i>MYL1</i>	cg12339029	2:210888147	нет	$0,87 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,08$	$3,30 \times 10^{-5}$
<i>SLC22A14</i>	cg16558203	3:38322396	нет	$0,73 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,07$	$3,35 \times 10^{-5}$
<i>JPH4</i>	cg06536578	14:23118395	нет	$0,78 \pm 0,09$	$0,45 \pm 0,05$	$4,31 \times 10^{-5}$
<i>EDNRB</i>	cg12120741	13:77390307	13:77390197-77391989	$0,55 \pm 0,09$	$0,22 \pm 0,04$	$4,46 \times 10^{-5}$
<i>LOC221091</i>	cg25620220	11:62213901	нет	$0,82 \pm 0,07$	$0,55 \pm 0,06$	$5,24 \times 10^{-5}$
<i>CIQTNF3</i>	cg03934354	5:34078897	нет	$0,72 \pm 0,05$	$0,46 \pm 0,04$	$5,65 \times 10^{-5}$
<i>WNT16</i>	cg04106190	7:120751404	нет	$0,72 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,02$	$5,65 \times 10^{-5}$
<i>CPA5</i>	cg11063110	7:129772441	7:129772246-129772458	$0,77 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,07$	$5,76 \times 10^{-5}$
<i>MGAT4C</i>	cg18344063	12:85756642	нет	$0,71 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,05$	$6,72 \times 10^{-5}$
<i>FRMD4A</i>	cg25464840	10:14412916	нет	$0,73 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,07$	$6,72 \times 10^{-5}$
<i>MAGEA9</i>	cg09607232	X:148670955	нет	$0,81 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,06$	$7,21 \times 10^{-5}$
<i>MMP20</i>	cg26757793	11:102001369	нет	$0,82 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,08$	$7,41 \times 10^{-5}$
<i>SH3BP5</i>	cg21283680	3:15359009	нет	$0,78 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,10$	$9,79 \times 10^{-5}$
<i>TBX1</i>	cg02887841	22:18124670	22:18123862-18124770	$0,45 \pm 0,16$	$0,08 \pm 0,01$	$1,11 \times 10^{-4}$
<i>GABRR2</i>	cg13903548	6:90081262	нет	$0,71 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,06$	$1,11 \times 10^{-4}$
<i>NPPA</i>	cg20202438	1:11830573	нет	$0,70 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,05$	$1,21 \times 10^{-4}$
<i>ABCB11</i>	cg00295325	2:169596178	нет	$0,79 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,07$	$1,40 \times 10^{-4}$
<i>SLC22A11</i>	cg09705062	11:64079466	нет	$0,76 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,05$	$1,43 \times 10^{-4}$
<i>RIS1</i>	cg27390220	3:45243527	3:45241257-45243590	$0,51 \pm 0,08$	$0,25 \pm 0,05$	$1,66 \times 10^{-4}$
<i>TBX22</i>	cg17205788	X:79163723	нет	$0,56 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,06$	$1,90 \times 10^{-4}$
<i>ALOX12</i>	cg08946332	17:6840612	17:6839463-6841283	$0,80 \pm 0,08$	$0,53 \pm 0,06$	$1,94 \times 10^{-4}$
<i>ANK3</i>	cg12354377	10:61819563	нет	$0,84 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,05$	$2,15 \times 10^{-4}$
<i>OLFML3</i>	cg17253459	1:114324193	нет	$0,73 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,05$	$2,21 \times 10^{-4}$
<i>FAM83A</i>	cg24833277	8:124263542	8:124263343-124263618	$0,86 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,07$	$3,11 \times 10^{-4}$
<i>SLC6A13</i>	cg15966757	12:242520	нет	$0,70 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,07$	$3,66 \times 10^{-4}$
<i>GTF2H3</i>	cg01110312	12:122682873	нет	$0,53 \pm 0,09$	$0,31 \pm 0,02$	$3,67 \times 10^{-4}$

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β САБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>CLDN15</i>	cg02512860	7:100667471	нет	0,62 ± 0,05	0,41 ± 0,07	4,24×10 ⁻⁴
<i>OFCC1</i>	cg27631817	6:10168924	нет	0,43 ± 0,09	0,18 ± 0,02	5,14×10 ⁻⁴
<i>SLC18A1</i>	cg22441882	8:20084934	нет	0,36 ± 0,11	0,12 ± 0,04	5,46×10 ⁻⁴
<i>SLMAP</i>	cg00002426	3:57718583	3:57716811-57718675	0,66 ± 0,10	0,44 ± 0,06	6,15×10 ⁻⁴
<i>FABP1</i>	cg19910382	2:88208676	нет	0,76 ± 0,05	0,34 ± 0,15	1,11×10 ⁻³
<i>LOC348645</i>	cg15149938	22:48404396	нет	0,75 ± 0,05	0,33 ± 0,15	1,12×10 ⁻³
<i>TBX1</i>	cg16722536	22:18124067	22:18123862-18124770	0,65 ± 0,13	0,37 ± 0,05	1,18×10 ⁻³
<i>IGFALS</i>	cg05982504	16:1784963	16:1784796-1785119	0,74 ± 0,08	0,53 ± 0,03	1,72×10 ⁻³
<i>MS4A2</i>	cg10414946	11:59612934	нет	0,56 ± 0,05	0,33 ± 0,07	1,81×10 ⁻³
<i>MC4R</i>	cg02037013	18:56190510	нет	0,59 ± 0,10	0,34 ± 0,05	1,88×10 ⁻³
<i>OR51E2</i>	cg25322008	11:4675714	нет	0,60 ± 0,07	0,35 ± 0,06	1,94×10 ⁻³
<i>HTR3B</i>	cg06531741	11:113280660	нет	0,52 ± 0,10	0,30 ± 0,07	1,95×10 ⁻³
<i>CAV3</i>	cg08365982	3:8750601	3:8750552-8750774	0,75 ± 0,10	0,47 ± 0,08	1,95×10 ⁻³
<i>KRTHB6</i>	cg04123507	12:50981537	12:50981438-50982407	0,72 ± 0,10	0,46 ± 0,05	1,97×10 ⁻³
<i>ASB2</i>	cg03389164	14:93493625	нет	0,82 ± 0,07	0,61 ± 0,04	2,03×10 ⁻³
<i>PLEKHA4</i>	cg08077345	19:54064085	нет	0,60 ± 0,12	0,32 ± 0,05	2,10×10 ⁻³
<i>PLA2G3</i>	cg21274025	22:29865981	нет	0,63 ± 0,08	0,42 ± 0,03	2,13×10 ⁻³
<i>CLEC10A</i>	cg21550483	17:6924830	нет	0,58 ± 0,08	0,36 ± 0,06	2,16×10 ⁻³
<i>MYR8</i>	cg18946226	13:108046504	нет	0,44 ± 0,06	0,22 ± 0,07	2,36×10 ⁻³
<i>C6orf54</i>	cg11251877	6:168141830	нет	0,75 ± 0,02	0,54 ± 0,09	2,44×10 ⁻³
<i>C19orf21</i>	cg04245402	19:702241	19:702077-702289	0,65 ± 0,12	0,40 ± 0,02	2,60×10 ⁻³
<i>SH2D4B</i>	cg26391080	10:82287377	нет	0,68 ± 0,10	0,40 ± 0,06	2,74×10 ⁻³
<i>MYF5</i>	cg26207503	12:79634880	12:79634686-79635423	0,54 ± 0,07	0,33 ± 0,05	2,90×10 ⁻³
<i>PRSS8</i>	cg13439730	16:31054500	16:31054357-31054558	0,68 ± 0,11	0,43 ± 0,06	3,08×10 ⁻³
<i>SCOC</i>	cg04457051	4:141397919	нет	0,81 ± 0,01	0,60 ± 0,06	3,21×10 ⁻³
<i>HIST1H1A</i>	cg14652095	6:26126164	6:26125429-26126270	0,51 ± 0,12	0,26 ± 0,05	3,67×10 ⁻³
<i>VDAC3</i>	cg17910564	8:42367859	8:42367847-42369205	0,54 ± 0,08	0,33 ± 0,05	3,68×10 ⁻³
<i>HSD17B2</i>	cg20373326	16:80626304	нет	0,51 ± 0,05	0,29 ± 0,09	4,73×10 ⁻³

Ген	CpG-сайт	Локализация в геноме*	CpG-островок	β САБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>Pfs2</i>	cg19890739	16:84281040	16:84280985-84281211	0,71 ± 0,09	0,43 ± 0,09	4,81×10 ⁻³
<i>ABCA6</i>	cg22081096	17:64649548	нет	0,49 ± 0,10	0,27 ± 0,05	4,93×10 ⁻³
<i>PRP2</i>	cg15518950	5:72451526	5:72451195-72452621	0,44 ± 0,10	0,19 ± 0,06	5,71×10 ⁻³
<i>SLC35B3</i>	cg09548084	6:8381217	6:8380156-8381258	0,64 ± 0,08	0,39 ± 0,05	6,20×10 ⁻³
<i>ZNF238</i>	cg23829949	1:242281302	нет	0,69 ± 0,16	0,45 ± 0,04	6,41×10 ⁻³
<i>SERPINI1</i>	cg18123677	3:168937033	нет	0,47 ± 0,07	0,26 ± 0,04	6,74×10 ⁻³
<i>KRT7</i>	cg09522147	12:50913609	12:50912973-50913926	0,49 ± 0,03	0,29 ± 0,07	6,74×10 ⁻³
<i>SLC22A12</i>	cg07220939	11:64115193	11:64115128-64115334	0,43 ± 0,11	0,22 ± 0,06	8,64×10 ⁻³
<i>NDUFS2</i>	cg07354440	1:159435513	нет	0,67 ± 0,09	0,46 ± 0,07	8,72×10 ⁻³
<i>TNP1</i>	cg13980719	2:217433805	нет	0,68 ± 0,06	0,36 ± 0,11	9,52×10 ⁻³
<i>OTOF</i>	cg26900154	2:26635235	нет	0,55 ± 0,11	0,35 ± 0,04	1,05×10 ⁻²
<i>FSD1</i>	cg25902889	19:4256090	нет	0,42 ± 0,17	0,17 ± 0,04	1,07×10 ⁻²
<i>CCNDBP1</i>	cg12113132	15:41264215	нет	0,56 ± 0,13	0,33 ± 0,05	1,11×10 ⁻²
<i>GPR133</i>	cg06550629	12:130005125	нет	0,84 ± 0,05	0,63 ± 0,08	1,55×10 ⁻²
<i>MAB21L2</i>	cg26218269	4:151722677	4:151722468-151723167	0,62 ± 0,11	0,41 ± 0,04	1,60×10 ⁻²
<i>P2RX3</i>	cg26128441	11:56861915	нет	0,79 ± 0,10	0,57 ± 0,09	1,69×10 ⁻²
<i>TMEM88</i>	cg23671708	17:7699016	17:7698629-7699147	0,58 ± 0,15	0,30 ± 0,10	2,40×10 ⁻²
<i>GATA2</i>	cg06490988	3:129694691	3:129693171-129695283	0,56 ± 0,09	0,35 ± 0,08	2,48×10 ⁻²
<i>NPR2</i>	cg24194775	9:35781475	9:35781291-35782084	0,40 ± 0,22	0,14 ± 0,07	2,52×10 ⁻²
<i>GARNL3</i>	cg00342530	9:129066841	нет	0,47 ± 0,10	0,26 ± 0,08	2,63×10 ⁻²
<i>PKD2L1</i>	cg05958582	10:102080356	нет	0,53 ± 0,06	0,32 ± 0,08	2,65×10 ⁻²
<i>HRH2</i>	cg14345676	5:175041704	5:175041676-175041898	0,64 ± 0,13	0,35 ± 0,09	2,78×10 ⁻²
<i>OPRK1</i>	cg01281904	8:54327310	8:54327302-54327509	0,52 ± 0,08	0,31 ± 0,09	3,18×10 ⁻²
<i>RBM24</i>	cg23207527	6:17391092	нет	0,76 ± 0,09	0,51 ± 0,15	4,03×10 ⁻²

Примечание: * - сборка генома GRCh36/hg18.

Список CpG-сайтов, гипометилированных в САБ по сравнению с ВГА

Ген	CpG-сайт	Локализация в геноме*	CpG-островок	β САБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>WT1</i>	cg25782229	11:32407268	11:32406516-32407359	0,19 ± 0,05	0,70 ± 0,02	3,24×10 ⁻¹⁰
<i>WT1</i>	cg06516124	11:32407167	11:32406516-32407359	0,10 ± 0,01	0,33 ± 0,04	3,45×10 ⁻¹⁰
<i>TLR4</i>	cg05429895	9:119506461	нет	0,07 ± 0,00	0,33 ± 0,07	2,46×10 ⁻⁷
<i>HOXD4</i>	cg18750960	2:176724663	2:176724528-176725909	0,08 ± 0,02	0,36 ± 0,07	2,46×10 ⁻⁷
<i>WT1</i>	cg05222924	11:32407062	11:32406516-32407359	0,08 ± 0,03	0,34 ± 0,08	9,04×10 ⁻⁷
<i>HOXD4</i>	cg01152019	2:176723290	2:176723073-176723586	0,13 ± 0,05	0,69 ± 0,11	9,64×10 ⁻⁶
<i>TRAF1</i>	cg15551881	9:122728536	нет	0,33 ± 0,07	0,64 ± 0,05	1,77×10 ⁻⁵
<i>HOXA7</i>	cg26511321	7:27163315	7:27162023-27163571	0,28 ± 0,06	0,62 ± 0,08	2,37×10 ⁻⁵
<i>PRG1</i>	cg17342283	10:70517888	нет	0,10 ± 0,04	0,32 ± 0,05	2,47×10 ⁻⁵
<i>ARHGDI B</i>	cg10925082	12:15005970	нет	0,17 ± 0,09	0,69 ± 0,11	2,47×10 ⁻⁵
<i>MEST</i>	cg09059945	7:129913254	7:129912883-129914215	0,17 ± 0,06	0,42 ± 0,05	3,30×10 ⁻⁵
<i>MID1</i>	cg20244073	X:10761548	нет	0,13 ± 0,03	0,37 ± 0,07	3,82×10 ⁻⁵
<i>HOXD4</i>	cg12127282	2:176722931	2:176722497-176722964	0,34 ± 0,12	0,82 ± 0,05	3,82×10 ⁻⁵
<i>ARHGDI B</i>	cg19826026	12:15005660	нет	0,20 ± 0,07	0,54 ± 0,07	4,35×10 ⁻⁵
<i>CXorf21</i>	cg01997953	X:30505611	нет	0,31 ± 0,08	0,66 ± 0,07	5,26×10 ⁻⁵
<i>HOXD4</i>	cg14399060	2:176723316	2:176723073-176723586	0,15 ± 0,05	0,56 ± 0,10	6,03×10 ⁻⁵
<i>LRMP</i>	cg10150530	12:25096735	нет	0,14 ± 0,03	0,36 ± 0,06	8,07×10 ⁻⁵
<i>HOXD4</i>	cg00767581	2:176723371	2:176723073-176723586	0,35 ± 0,09	0,81 ± 0,08	8,86×10 ⁻⁵
<i>UNC93A</i>	cg09682183	6:167625243	нет	0,24 ± 0,05	0,50 ± 0,05	1,07×10 ⁻⁴
<i>BATF</i>	cg09937039	14:75058956	нет	0,23 ± 0,07	0,45 ± 0,02	1,26×10 ⁻⁴
<i>HOXB5</i>	cg16495265	17:44026009	17:44025432-44027432	0,11 ± 0,01	0,32 ± 0,08	1,37×10 ⁻⁴
<i>TNFSF10</i>	cg11979312	3:173725407	нет	0,54 ± 0,11	0,76 ± 0,04	1,95×10 ⁻⁴
<i>MEST</i>	cg08077673	7:129913604	7:129912883-129914215	0,18 ± 0,03	0,42 ± 0,06	1,99×10 ⁻⁴
<i>UCN2</i>	cg05125838	3:48576589	нет	0,36 ± 0,07	0,59 ± 0,04	2,15×10 ⁻⁴
<i>MEST</i>	cg01888566	7:129913749	7:129912883-129914215	0,22 ± 0,08	0,49 ± 0,04	2,15×10 ⁻⁴
<i>WT1</i>	cg04456238	11:32406680	11:32406516-32407359	0,20 ± 0,09	0,45 ± 0,05	2,98×10 ⁻⁴

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β САБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>WT1</i>	cg16463460	11:32411294	11:32411271-32413831	0,40 ± 0,04	0,67 ± 0,07	2,98×10 ⁻⁴
<i>CHRM5</i>	cg22927134	15:32136544	нет	0,40 ± 0,09	0,68 ± 0,04	3,45×10 ⁻⁴
<i>SI00A10</i>	cg10795646	1:150242190	нет	0,30 ± 0,06	0,60 ± 0,09	4,07×10 ⁻⁴
<i>TNFRSF9</i>	cg08840010	1:7922901	нет	0,30 ± 0,02	0,51 ± 0,06	4,33×10 ⁻⁴
<i>WT1</i>	cg12006284	11:32406214	11:32404590-32406255	0,18 ± 0,05	0,39 ± 0,07	5,27×10 ⁻⁴
<i>ZNF366</i>	cg15037004	5:71839694	нет	0,22 ± 0,05	0,44 ± 0,08	6,75×10 ⁻⁴
<i>MEST</i>	cg09872616	7:129913418	7:129912883-129914215	0,17 ± 0,08	0,42 ± 0,05	6,84×10 ⁻⁴
<i>TBX5</i>	cg21907579	12:113330251	12:113330117-113332137	0,18 ± 0,05	0,52 ± 0,13	8,93×10 ⁻⁴
<i>MSR1</i>	cg16303562	8:16094704	нет	0,44 ± 0,06	0,65 ± 0,03	9,08×10 ⁻⁴
<i>SIGLEC7</i>	cg01193293	19:56336366	нет	0,39 ± 0,08	0,60 ± 0,06	1,03×10 ⁻³
<i>BMX</i>	cg24643262	X:15428783	X:15428757-15429114	0,39 ± 0,07	0,64 ± 0,06	1,18×10 ⁻³
<i>SI00A4</i>	cg24691453	1:151785008	нет	0,18 ± 0,05	0,47 ± 0,12	1,26×10 ⁻³
<i>WT1</i>	cg16501028	11:32406576	11:32406516-32407359	0,40 ± 0,09	0,61 ± 0,02	1,94×10 ⁻³
<i>HOXD3</i>	cg00005847	2:176737319	нет	0,26 ± 0,04	0,51 ± 0,09	2,10×10 ⁻³
<i>EMR3</i>	cg07072643	19:14646593	нет	0,34 ± 0,06	0,54 ± 0,05	2,20×10 ⁻³
<i>DMRT3</i>	cg26489108	9:965856	9:965733-965960	0,31 ± 0,05	0,52 ± 0,07	2,39×10 ⁻³
<i>ALX4</i>	cg18546622	11:44281605	11:44281312-44281846	0,23 ± 0,09	0,53 ± 0,05	2,39×10 ⁻³
<i>STAT5A</i>	cg16777510	17:37693548	17:37693440-37694596	0,30 ± 0,06	0,52 ± 0,07	2,63×10 ⁻³
<i>OPRD1</i>	cg09970593	1:29012109	1:29010989-29012442	0,47 ± 0,10	0,68 ± 0,04	3,86×10 ⁻³
<i>AIM2</i>	cg11003133	1:157313015	нет	0,54 ± 0,11	0,77 ± 0,08	5,40×10 ⁻³
<i>MARCO</i>	cg02431964	2:119416499	нет	0,54 ± 0,14	0,77 ± 0,03	5,60×10 ⁻³
<i>WT1</i>	cg13641903	11:32409184	11:32408563-32409903	0,40 ± 0,10	0,62 ± 0,04	7,25×10 ⁻³
<i>SPRR1A</i>	cg06101324	1:151222167	нет	0,19 ± 0,10	0,40 ± 0,04	8,06×10 ⁻³
<i>EVI2A</i>	cg23352695	17:26672937	нет	0,40 ± 0,15	0,66 ± 0,05	9,89×10 ⁻³
<i>LOC144501</i>	cg11051139	12:50866695	нет	0,37 ± 0,08	0,60 ± 0,07	9,99×10 ⁻³
<i>FGF23</i>	cg14119236	12:4359336	12:4359234-4359462	0,19 ± 0,04	0,41 ± 0,06	1,16×10 ⁻²
<i>TBX5</i>	cg10281002	12:113330782	12:113330117-113332137	0,17 ± 0,02	0,48 ± 0,17	1,52×10 ⁻²
<i>MFAP2</i>	cg08477744	1:17180619	нет	0,63 ± 0,08	0,83 ± 0,06	1,78×10 ⁻²
<i>EVI2B</i>	cg05109049	17:26665459	нет	0,45 ± 0,20	0,74 ± 0,06	2,38×10 ⁻²
<i>FLJ35695</i>	cg20678353	15:36775852	нет	0,30 ± 0,13	0,54 ± 0,07	3,12×10 ⁻²

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β САБ	β ВГА	P_{FDR}
<i>RNASE3</i>	cg07525077	14:20429783	нет	$0,49 \pm 0,15$	$0,71 \pm 0,06$	$3,63 \times 10^{-2}$
<i>CH13L2</i>	cg10045881	1:111571814	нет	$0,48 \pm 0,15$	$0,69 \pm 0,08$	$3,77 \times 10^{-2}$

Примечание: * - сборка генома GRCh36/hg18.

Список CpG-сайтов, гиперметилированных в ВГА по сравнению с БПВ

Ген	CpG-сайт	Локализация в геноме*	CpG-островок	β ВГА	β БПВ	P_{FDR}
<i>GLRX</i>	cg03852144	5:95185395	нет	0,52 ± 0,16	0,09 ± 0,01	1,46×10 ⁻⁷
<i>HNMT</i>	cg02906939	2:138437785	нет	0,82 ± 0,02	0,58 ± 0,05	2,65×10 ⁻⁷
<i>CAPN3</i>	cg19170321	15:40427608	нет	0,80 ± 0,01	0,53 ± 0,05	2,97×10 ⁻⁷
<i>KRT23</i>	cg06378617	17:36348667	нет	0,66 ± 0,05	0,19 ± 0,04	3,52×10 ⁻⁷
<i>HRG</i>	cg02097420	3:187866568	нет	0,86 ± 0,02	0,56 ± 0,07	7,17×10 ⁻⁷
<i>WT1</i>	cg01693350	11:32408763	11:32408563-32409903	0,55 ± 0,03	0,19 ± 0,04	7,99×10 ⁻⁷
<i>C1orf188</i>	cg15731815	1:6191847	1:6190892-6192286	0,54 ± 0,10	0,09 ± 0,04	1,22×10 ⁻⁶
<i>C7orf33</i>	cg26866014	7:147918645	нет	0,71 ± 0,04	0,48 ± 0,04	1,24×10 ⁻⁶
<i>TSPAN18</i>	cg09390792	11:44838020	нет	0,78 ± 0,04	0,45 ± 0,06	1,62×10 ⁻⁶
<i>PGBD5</i>	cg01671575	1:228580189	нет	0,84 ± 0,02	0,51 ± 0,06	1,78×10 ⁻⁶
<i>HNMT</i>	cg15441973	2:138437787	нет	0,72 ± 0,02	0,52 ± 0,05	1,86×10 ⁻⁶
<i>C18orf16</i>	cg00729275	18:22699132	нет	0,68 ± 0,10	0,27 ± 0,05	1,93×10 ⁻⁶
<i>POP2</i>	cg16739580	3:192661768	нет	0,78 ± 0,03	0,50 ± 0,08	1,93×10 ⁻⁶
<i>WT1</i>	cg15446391	11:32408946	11:32408563-32409903	0,44 ± 0,03	0,19 ± 0,03	2,42×10 ⁻⁶
<i>WT1</i>	cg13641903	11:32409184	11:32408563-32409903	0,62 ± 0,04	0,26 ± 0,05	2,46×10 ⁻⁶
<i>WT1</i>	cg05222924	11:32407062	11:32406516-32407359	0,34 ± 0,08	0,05 ± 0,01	2,49×10 ⁻⁶
<i>FLJ20647</i>	cg03005261	4:110700277	4:110700137-110701779	0,37 ± 0,09	0,13 ± 0,02	2,49×10 ⁻⁶
<i>WT1</i>	cg04456238	11:32406680	11:32406516-32407359	0,45 ± 0,05	0,09 ± 0,02	2,82×10 ⁻⁶
<i>CLCA1</i>	cg22181664	1:86706913	нет	0,60 ± 0,03	0,38 ± 0,03	2,82×10 ⁻⁶
<i>C18orf16</i>	cg15976539	18:22699316	нет	0,72 ± 0,09	0,42 ± 0,06	3,02×10 ⁻⁶
<i>ACVR1</i>	cg09499849	2:158403404	нет	0,27 ± 0,08	0,06 ± 0,01	3,37×10 ⁻⁶
<i>EMP1</i>	cg05885720	12:13239696	нет	0,66 ± 0,05	0,26 ± 0,05	3,39×10 ⁻⁶
<i>C8orf4</i>	cg17939444	8:40129600	нет	0,64 ± 0,06	0,34 ± 0,06	3,41×10 ⁻⁶
<i>C1orf188</i>	cg00030047	1:6191377	1:6190892-6192286	0,57 ± 0,08	0,19 ± 0,03	3,89×10 ⁻⁶
<i>RGAG1</i>	cg06338119	X:109548518	нет	0,56 ± 0,10	0,26 ± 0,05	5,40×10 ⁻⁶
<i>WT1</i>	cg25782229	11:32407268	11:32406516-32407359	0,70 ± 0,02	0,12 ± 0,01	5,45×10 ⁻⁶

Ген	СpG-сайт	Локализация в геноме*	СpG-островок	β ВГА	β БПВ	P_{FDR}
<i>HSPB3</i>	cg11391732	5:53787676	5:53787529-53787747	0,77 ± 0,09	0,42 ± 0,09	6,27×10 ⁻⁶
<i>DAPK1</i>	cg24754277	9:89303976	9:89301899-89304060	0,49 ± 0,07	0,24 ± 0,03	6,27×10 ⁻⁶
<i>WT1</i>	cg16463460	11:32411294	11:32411271-32413831	0,67 ± 0,07	0,27 ± 0,04	6,42×10 ⁻⁶
<i>HOXB6</i>	cg18878432	17:44038408	17:44038335-44038975	0,56 ± 0,02	0,23 ± 0,05	7,16×10 ⁻⁶
<i>CNTNAP4</i>	cg25383242	16:74901164	16:74901143-74901361	0,78 ± 0,05	0,54 ± 0,07	8,07×10 ⁻⁶
<i>TMC05</i>	cg23254045	15:36013746	нет	0,62 ± 0,06	0,33 ± 0,06	8,48×10 ⁻⁶
<i>PAX9</i>	cg00509670	14:36200064	14:36199815-36200327	0,51 ± 0,07	0,23 ± 0,05	8,57×10 ⁻⁶
<i>APOL6</i>	cg09432376	22:34374172	нет	0,51 ± 0,15	0,27 ± 0,03	8,57×10 ⁻⁶
<i>VAMP8</i>	cg23752985	2:85657082	нет	0,69 ± 0,04	0,39 ± 0,04	9,90×10 ⁻⁶
<i>KRTAP1-1</i>	cg02022375	17:36451247	нет	0,61 ± 0,04	0,41 ± 0,05	1,01×10 ⁻⁵
<i>WT1</i>	cg12006284	11:32406214	11:32404590-32406255	0,39 ± 0,07	0,14 ± 0,03	1,05×10 ⁻⁵
<i>FGF11</i>	cg13492227	17:7282160	17:7281849-7282696	0,50 ± 0,12	0,17 ± 0,02	1,10×10 ⁻⁵
<i>GDPD4</i>	cg13002506	11:76676469	нет	0,63 ± 0,05	0,36 ± 0,05	1,14×10 ⁻⁵
<i>OR7A5</i>	cg02124291	19:14800260	нет	0,71 ± 0,02	0,50 ± 0,08	1,14×10 ⁻⁵
<i>HOXC11</i>	cg22709192	12:52653176	12:52652893-52656105	0,27 ± 0,02	0,06 ± 0,02	1,32×10 ⁻⁵
<i>WT1</i>	cg06516124	11:32407167	11:32406516-32407359	0,33 ± 0,04	0,07 ± 0,00	1,45×10 ⁻⁵
<i>SULT1C1</i>	cg23163573	2:108271900	нет	0,49 ± 0,12	0,26 ± 0,03	1,47×10 ⁻⁵
<i>SLC7A11</i>	cg06690548	4:139382258	4:139382255-139382463	0,82 ± 0,07	0,48 ± 0,04	1,57×10 ⁻⁵
<i>SLC39A2</i>	cg05654163	14:20537342	нет	0,48 ± 0,05	0,23 ± 0,06	1,62×10 ⁻⁵
<i>SLC25A18</i>	cg18003231	22:16423745	22:16423630-16423844	0,63 ± 0,06	0,34 ± 0,05	1,69×10 ⁻⁵
<i>ELA2B</i>	cg25021182	1:15675181	нет	0,75 ± 0,05	0,54 ± 0,06	1,71×10 ⁻⁵
<i>CDKL1</i>	cg16077929	14:49932259	нет	0,67 ± 0,04	0,31 ± 0,06	1,85×10 ⁻⁵
<i>WT1</i>	cg04096767	11:32406026	11:32404590-32406255	0,34 ± 0,09	0,12 ± 0,02	2,01×10 ⁻⁵
<i>MFRP</i>	cg19560971	11:118723448	нет	0,54 ± 0,05	0,33 ± 0,05	2,18×10 ⁻⁵
<i>ARPM2</i>	cg04716261	1:2927859	нет	0,52 ± 0,08	0,29 ± 0,04	2,45×10 ⁻⁵
<i>C8orf34</i>	cg22199118	8:69513481	нет	0,59 ± 0,07	0,32 ± 0,04	2,99×10 ⁻⁵
<i>DMP1</i>	cg22416721	4:88789598	нет	0,71 ± 0,11	0,43 ± 0,05	3,03×10 ⁻⁵
<i>TRY1</i>	cg10466917	7:141604926	нет	0,67 ± 0,04	0,46 ± 0,05	3,32×10 ⁻⁵
<i>OLFML2A</i>	cg20789824	9:126602682	нет	0,67 ± 0,04	0,42 ± 0,05	3,40×10 ⁻⁵
<i>C11orf9</i>	cg22627427	11:61279074	нет	0,85 ± 0,07	0,54 ± 0,09	3,50×10 ⁻⁵

Ген	СpG-сайт	Локализация в геноме*	СpG-островок	β ВГА	β БПВ	P_{FDR}
<i>SCOC</i>	cg04457051	4:141397919	нет	$0,60 \pm 0,06$	$0,28 \pm 0,07$	$3,54 \times 10^{-5}$
<i>PAX9</i>	cg26620157	14:36200048	14:36199815-36200327	$0,54 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,09$	$3,56 \times 10^{-5}$
<i>MFAP5</i>	cg15815843	12:8706575	нет	$0,73 \pm 0,07$	$0,50 \pm 0,04$	$3,75 \times 10^{-5}$
<i>HAК</i>	cg15783800	18:54397977	18:54397786-54397992	$0,69 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,02$	$4,06 \times 10^{-5}$
<i>SHRM</i>	cg14898892	4:77575204	нет	$0,49 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,04$	$4,14 \times 10^{-5}$
<i>MFAP5</i>	cg06256735	12:8707161	нет	$0,64 \pm 0,10$	$0,33 \pm 0,06$	$4,27 \times 10^{-5}$
<i>CCRL2</i>	cg14754581	3:46423757	нет	$0,28 \pm 0,12$	$0,07 \pm 0,01$	$5,94 \times 10^{-5}$
<i>MMP27</i>	cg06259570	11:102081304	нет	$0,64 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,05$	$6,35 \times 10^{-5}$
<i>ENPP3</i>	cg08678755	6:131998704	нет	$0,82 \pm 0,02$	$0,59 \pm 0,06$	$7,33 \times 10^{-5}$
<i>ACRV1</i>	cg07153965	11:125057297	нет	$0,57 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,05$	$8,34 \times 10^{-5}$
<i>WT1</i>	cg16501028	11:32406576	11:32406516-32407359	$0,61 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,04$	$9,77 \times 10^{-5}$
<i>PLP1</i>	cg19481052	X:102918793	нет	$0,51 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,02$	$9,83 \times 10^{-5}$
<i>C9orf95</i>	cg05600174	9:76894357	нет	$0,43 \pm 0,15$	$0,18 \pm 0,03$	$9,98 \times 10^{-5}$
<i>FNDC7</i>	cg11481351	1:109066910	нет	$0,74 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,10$	$1,12 \times 10^{-4}$
<i>PDCD1LG2</i>	cg14440664	9:5499642	нет	$0,57 \pm 0,07$	$0,28 \pm 0,07$	$1,63 \times 10^{-4}$
<i>FLJ21908</i>	cg18216249	12:46387072	нет	$0,51 \pm 0,12$	$0,26 \pm 0,03$	$1,65 \times 10^{-4}$
<i>ARHGDIВ</i>	cg10925082	12:15005970	нет	$0,69 \pm 0,11$	$0,44 \pm 0,07$	$1,93 \times 10^{-4}$
<i>SI00A3</i>	cg06615154	1:151789177	нет	$0,44 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,03$	$1,99 \times 10^{-4}$
<i>ELA2B</i>	cg24030609	1:15675198	нет	$0,62 \pm 0,07$	$0,33 \pm 0,04$	$2,04 \times 10^{-4}$
<i>CARD11</i>	cg18321354	7:3051042	нет	$0,73 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,07$	$2,14 \times 10^{-4}$
<i>LAT2</i>	cg01318557	7:73262255	7:73261846-73262293	$0,51 \pm 0,11$	$0,29 \pm 0,03$	$2,18 \times 10^{-4}$
<i>COL16A1</i>	cg02989257	1:31941861	нет	$0,55 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,05$	$2,43 \times 10^{-4}$
<i>GPR133</i>	cg06550629	12:130005125	нет	$0,63 \pm 0,08$	$0,37 \pm 0,08$	$3,19 \times 10^{-4}$
<i>SLC43A3</i>	cg19881895	11:56952116	нет	$0,69 \pm 0,07$	$0,43 \pm 0,06$	$3,27 \times 10^{-4}$
<i>F13A1</i>	cg03440267	6:6266060	нет	$0,42 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,04$	$3,37 \times 10^{-4}$
<i>TRAK1</i>	cg24877842	3:42176902	нет	$0,29 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,04$	$4,79 \times 10^{-4}$
<i>JAG2</i>	cg27177839	14:104706814	14:104704480-104706946	$0,38 \pm 0,14$	$0,17 \pm 0,02$	$5,18 \times 10^{-4}$
<i>PITX1</i>	cg24495017	5:134398429	5:134396353-134398530	$0,49 \pm 0,16$	$0,23 \pm 0,05$	$6,14 \times 10^{-4}$
<i>IFI35</i>	cg08090640	17:38412815	нет	$0,51 \pm 0,16$	$0,26 \pm 0,05$	$7,02 \times 10^{-4}$
<i>C11orf9</i>	cg04237003	11:61278578	нет	$0,66 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,06$	$7,91 \times 10^{-4}$

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β ВГА	β БПВ	P_{FDR}
<i>HTR1D</i>	cg08872493	1:23394004	нет	$0,44 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,04$	$8,32 \times 10^{-4}$
<i>GUCY2C</i>	cg13131015	12:14740809	нет	$0,58 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,07$	$9,17 \times 10^{-4}$
<i>PDCD1</i>	cg00795812	2:242450682	2:242450515-242450972	$0,41 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,08$	$1,33 \times 10^{-3}$
<i>IGKV7-3</i>	cg00718513	2:88996387	нет	$0,58 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,06$	$1,40 \times 10^{-3}$
<i>ELK4</i>	cg26245202	1:203869487	нет	$0,50 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,04$	$1,71 \times 10^{-3}$
<i>HK3</i>	cg05119218	5:176260163	нет	$0,61 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,08$	$2,40 \times 10^{-3}$
<i>CHRNA3</i>	cg22670733	15:76701339	15:76701258-76701471	$0,59 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,06$	$4,04 \times 10^{-3}$
<i>SRPX2</i>	cg18727700	X:99785586	нет	$0,46 \pm 0,08$	$0,24 \pm 0,06$	$4,13 \times 10^{-3}$
<i>ABCA8</i>	cg21660392	17:64462140	нет	$0,62 \pm 0,10$	$0,37 \pm 0,11$	$4,79 \times 10^{-3}$
<i>WT1</i>	cg12781568	11:32408614	11:32408563-32409903	$0,69 \pm 0,09$	$0,45 \pm 0,11$	$6,03 \times 10^{-3}$

Примечание: * - сборка генома GRCh36/hg18.

Список CpG-сайтов, гипометилированных в ВГА по сравнению с БПВ

Ген	CpG-сайт	Локализация в геноме*	CpG-островок	β ВГА	β БПВ	P_{FDR}
<i>FGF6</i>	cg21902327	12:4425047	12:4425015-4425387	0,55 ± 0,07	0,80 ± 0,04	7,99×10 ⁻⁷
<i>SCGB3A2</i>	cg19530885	5:147238325	нет	0,31 ± 0,10	0,69 ± 0,05	1,03×10 ⁻⁶
<i>TCF3</i>	cg11170796	19:1601224	нет	0,46 ± 0,13	0,72 ± 0,03	1,19×10 ⁻⁶
<i>SOST</i>	cg22264436	17:39191949	17:39191915-39192117	0,48 ± 0,11	0,81 ± 0,02	1,19×10 ⁻⁶
<i>UNC84A</i>	cg22972055	7:838819	7:838536-838925	0,45 ± 0,11	0,75 ± 0,04	1,22×10 ⁻⁶
<i>CYP17A1</i>	cg09201719	10:104586880	нет	0,67 ± 0,10	0,91 ± 0,03	1,30×10 ⁻⁶
<i>MYO1C</i>	cg19731122	17:1343145	нет	0,35 ± 0,04	0,56 ± 0,03	1,36×10 ⁻⁶
<i>KRT4</i>	cg17667972	12:51494560	нет	0,58 ± 0,11	0,78 ± 0,02	1,53×10 ⁻⁶
<i>AVIL</i>	cg06317209	12:56497145	нет	0,33 ± 0,04	0,66 ± 0,04	1,53×10 ⁻⁶
<i>ZC3H7A</i>	cg14959707	16:11783892	16:11783829-11784227	0,49 ± 0,09	0,80 ± 0,04	1,55×10 ⁻⁶
<i>FRMPD2</i>	cg05859842	10:49153362	нет	0,24 ± 0,11	0,48 ± 0,06	1,55×10 ⁻⁶
<i>BNC1</i>	cg27169020	15:81745233	15:81742719-81745331	0,37 ± 0,05	0,68 ± 0,04	1,93×10 ⁻⁶
<i>P2RX3</i>	cg26128441	11:56861915	нет	0,57 ± 0,09	0,83 ± 0,02	2,42×10 ⁻⁶
<i>STAC3</i>	cg25189085	12:55930925	нет	0,40 ± 0,08	0,69 ± 0,05	2,49×10 ⁻⁶
<i>SLC22A12</i>	cg07220939	11:64115193	11:64115128-64115334	0,22 ± 0,06	0,48 ± 0,05	2,82×10 ⁻⁶
<i>TM4SF1</i>	cg08124030	3:150577973	3:150577836-150578057	0,24 ± 0,09	0,53 ± 0,07	2,84×10 ⁻⁶
<i>HOXA2</i>	cg26069745	7:27108725	7:27108167-27108756	0,26 ± 0,07	0,74 ± 0,06	3,27×10 ⁻⁶
<i>MYL1</i>	cg12339029	2:210888147	нет	0,61 ± 0,08	0,85 ± 0,03	3,37×10 ⁻⁶
<i>TCF1</i>	cg06444781	12:119900893	12:119900805-119901025	0,53 ± 0,13	0,87 ± 0,03	3,50×10 ⁻⁶
<i>ZC3H7A</i>	cg26521448	16:11783927	16:11783829-11784227	0,74 ± 0,08	0,94 ± 0,01	3,88×10 ⁻⁶
<i>C20orf55</i>	cg20289911	20:764362	нет	0,17 ± 0,08	0,39 ± 0,04	5,03×10 ⁻⁶
<i>HOXA2</i>	cg09871315	7:27109207	7:27108930-27109394	0,37 ± 0,07	0,79 ± 0,04	6,34×10 ⁻⁶
<i>SLC25A34</i>	cg16713727	1:15935307	нет	0,56 ± 0,05	0,79 ± 0,03	6,42×10 ⁻⁶
<i>IL9</i>	cg13842648	5:135259425	нет	0,51 ± 0,04	0,71 ± 0,02	6,72×10 ⁻⁶
<i>FLJ22655</i>	cg19229991	12:18133816	нет	0,56 ± 0,09	0,79 ± 0,02	7,16×10 ⁻⁶
<i>SOST</i>	cg14256699	17:39191552	17:39191384-39191613	0,64 ± 0,12	0,92 ± 0,01	7,16×10 ⁻⁶

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β ВГА	β БПВ	P_{FDR}
<i>KRT23</i>	cg22392708	17:36347296	нет	0,13 ± 0,04	0,37 ± 0,02	9,54 × 10 ⁻⁶
<i>HOXA5</i>	cg02248486	7:27149721	7:27147983-27152159	0,19 ± 0,08	0,79 ± 0,04	1,05 × 10 ⁻⁵
<i>SULF1</i>	cg04845579	8:70541227	нет	0,20 ± 0,07	0,59 ± 0,07	1,10 × 10 ⁻⁵
<i>PDCD1</i>	cg18096388	2:242449646	нет	0,34 ± 0,05	0,59 ± 0,04	1,21 × 10 ⁻⁵
<i>GSTA3</i>	cg02075593	6:52881670	нет	0,43 ± 0,13	0,71 ± 0,05	1,24 × 10 ⁻⁵
<i>MS4A2</i>	cg10414946	11:59612934	нет	0,33 ± 0,07	0,55 ± 0,05	1,53 × 10 ⁻⁵
<i>HOXA5</i>	cg12128839	7:27149961	7:27147983-27152159	0,09 ± 0,04	0,45 ± 0,07	1,79 × 10 ⁻⁵
<i>PON1</i>	cg07404485	7:94791589	нет	0,45 ± 0,06	0,66 ± 0,04	1,90 × 10 ⁻⁵
<i>PGBD3</i>	cg01982597	10:50403426	нет	0,40 ± 0,22	0,79 ± 0,05	1,91 × 10 ⁻⁵
<i>CEP170</i>	cg18184219	1:241455147	нет	0,39 ± 0,10	0,69 ± 0,05	1,92 × 10 ⁻⁵
<i>TG</i>	cg23427666	8:133949287	8:133949132-133949367	0,47 ± 0,08	0,74 ± 0,02	2,01 × 10 ⁻⁵
<i>TOM1L1</i>	cg27210390	17:50333582	17:50332762-50333678	0,26 ± 0,10	0,65 ± 0,08	2,15 × 10 ⁻⁵
<i>DIO1</i>	cg03886898	1:54131720	нет	0,54 ± 0,09	0,78 ± 0,04	2,31 × 10 ⁻⁵
<i>C8orf38</i>	cg21197871	8:96105979	8:96105896-96106919	0,24 ± 0,05	0,45 ± 0,04	2,51 × 10 ⁻⁵
<i>VNN2</i>	cg10044101	6:133125982	нет	0,28 ± 0,10	0,68 ± 0,06	2,53 × 10 ⁻⁵
<i>DAND5</i>	cg16854606	19:12941743	нет	0,33 ± 0,08	0,64 ± 0,04	2,78 × 10 ⁻⁵
<i>FLJ21657</i>	cg06597095	5:43516118	нет	0,42 ± 0,11	0,64 ± 0,03	2,78 × 10 ⁻⁵
<i>SNAI1</i>	cg26873164	20:48032382	20:48032014-48033196	0,17 ± 0,04	0,38 ± 0,01	2,84 × 10 ⁻⁵
<i>MSX1</i>	cg20588069	4:4911340	4:4908144-4911629	0,30 ± 0,03	0,52 ± 0,03	3,06 × 10 ⁻⁵
<i>C21orf84</i>	cg23732182	21:43722518	нет	0,45 ± 0,07	0,72 ± 0,05	3,10 × 10 ⁻⁵
<i>GPRC5A</i>	cg06776256	12:12934995	12:12934727-12935045	0,21 ± 0,07	0,50 ± 0,04	3,40 × 10 ⁻⁵
<i>MAGEA9</i>	cg09607232	X:148670955	нет	0,55 ± 0,06	0,76 ± 0,07	3,41 × 10 ⁻⁵
<i>RUNX1</i>	cg19836199	21:35343811	нет	0,29 ± 0,10	0,52 ± 0,05	3,41 × 10 ⁻⁵
<i>NTF3</i>	cg02554564	12:5473392	12:5473265-5473465	0,45 ± 0,11	0,74 ± 0,04	3,41 × 10 ⁻⁵
<i>C14orf139</i>	cg10145926	14:94945545	нет	0,27 ± 0,07	0,59 ± 0,05	4,59 × 10 ⁻⁵
<i>AQP1</i>	cg04551925	7:30918265	7:30918039-30918453	0,55 ± 0,08	0,78 ± 0,02	5,20 × 10 ⁻⁵
<i>RGS5</i>	cg24901474	1:161439664	нет	0,21 ± 0,10	0,43 ± 0,04	5,26 × 10 ⁻⁵
<i>RGPD5</i>	cg02148642	2:109906875	нет	0,43 ± 0,12	0,63 ± 0,03	5,29 × 10 ⁻⁵
<i>DLX5</i>	cg24115040	7:96490311	7:96489769-96490524	0,12 ± 0,04	0,34 ± 0,08	5,33 × 10 ⁻⁵
<i>GFAP</i>	cg21944455	17:40349795	нет	0,46 ± 0,11	0,72 ± 0,03	5,46 × 10 ⁻⁵

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β ВГА	β БПВ	P_{FDR}
<i>ALDH1A3</i>	cg26509022	15:99236819	15:99236455-99238833	0,22 ± 0,06	0,52 ± 0,03	5,92×10 ⁻⁵
<i>RGS5</i>	cg10604646	1:161439273	нет	0,28 ± 0,13	0,59 ± 0,07	6,14×10 ⁻⁵
<i>THSD4</i>	cg04616566	15:69807614	нет	0,28 ± 0,17	0,61 ± 0,10	6,28×10 ⁻⁵
<i>MARK2</i>	cg17998964	11:63412479	нет	0,30 ± 0,06	0,58 ± 0,03	6,53×10 ⁻⁵
<i>EGLN1</i>	cg16855929	1:229628037	нет	0,38 ± 0,06	0,61 ± 0,06	6,59×10 ⁻⁵
<i>ELA2</i>	cg01963696	19:802650	19:802526-803422	0,22 ± 0,08	0,63 ± 0,08	6,97×10 ⁻⁵
<i>EFEMP1</i>	cg25711779	2:56003329	2:56003158-56003360	0,14 ± 0,04	0,37 ± 0,07	7,07×10 ⁻⁵
<i>THRB</i>	cg08319404	3:24512439	3:24510366-24512597	0,36 ± 0,10	0,67 ± 0,03	7,07×10 ⁻⁵
<i>ALDH1A3</i>	cg19224278	15:99236540	15:99236455-99238833	0,30 ± 0,07	0,68 ± 0,05	7,56×10 ⁻⁵
<i>DLX5</i>	cg11500797	7:96490059	7:96489769-96490524	0,19 ± 0,09	0,57 ± 0,08	7,73×10 ⁻⁵
<i>F3</i>	cg01185754	1:94779317	1:94778962-94780728	0,18 ± 0,06	0,45 ± 0,08	8,66×10 ⁻⁵
<i>ALDH1A3</i>	cg27652350	15:99238512	15:99236455-99238833	0,26 ± 0,10	0,56 ± 0,04	9,79×10 ⁻⁵
<i>SLC6A13</i>	cg15966757	12:242520	нет	0,39 ± 0,07	0,62 ± 0,04	1,03×10 ⁻⁴
<i>DLX5</i>	cg13462129	7:96489217	7:96487969-96489640	0,30 ± 0,08	0,58 ± 0,09	1,10×10 ⁻⁴
<i>CA9</i>	cg20610181	9:35664000	нет	0,40 ± 0,09	0,66 ± 0,04	1,13×10 ⁻⁴
<i>SLC6A13</i>	cg20804101	12:242177	нет	0,22 ± 0,05	0,44 ± 0,04	1,17×10 ⁻⁴
<i>RDH12</i>	cg23350274	14:67258416	нет	0,44 ± 0,13	0,72 ± 0,04	1,26×10 ⁻⁴
<i>RLN3R2</i>	cg08403419	1:154177862	нет	0,22 ± 0,08	0,46 ± 0,03	1,26×10 ⁻⁴
<i>DAB2IP</i>	cg08128768	9:123502003	9:123500662-123502056	0,16 ± 0,09	0,42 ± 0,05	1,27×10 ⁻⁴
<i>RBP1</i>	cg13099330	3:140740489	3:140740275-140741996	0,40 ± 0,09	0,77 ± 0,06	1,28×10 ⁻⁴
<i>TNFRSF25</i>	cg02084087	1:6448636	1:6448532-6449318	0,28 ± 0,04	0,50 ± 0,03	1,33×10 ⁻⁴
<i>DLX5</i>	cg12041387	7:96488107	7:96487969-96489640	0,29 ± 0,07	0,57 ± 0,09	1,55×10 ⁻⁴
<i>LRRN6C</i>	cg04151683	9:28708459	нет	0,30 ± 0,06	0,54 ± 0,08	1,74×10 ⁻⁴
<i>P2RY2</i>	cg10287137	11:72606702	11:72606620-72607619	0,53 ± 0,05	0,76 ± 0,05	1,76×10 ⁻⁴
<i>DLX5</i>	cg00503840	7:96488445	7:96487969-96489640	0,44 ± 0,06	0,69 ± 0,06	1,91×10 ⁻⁴
<i>GP9</i>	cg16098726	3:130261428	3:130261348-130261588	0,42 ± 0,15	0,78 ± 0,06	2,10×10 ⁻⁴
<i>NFATC2</i>	cg10226546	20:49592403	20:49592243-49593041	0,29 ± 0,06	0,55 ± 0,05	2,98×10 ⁻⁴
<i>TCP11</i>	cg22407458	6:35217099	6:35216605-35217470	0,38 ± 0,07	0,67 ± 0,05	3,10×10 ⁻⁴
<i>DAB2IP</i>	cg24794433	9:123501993	9:123500662-123502056	0,16 ± 0,11	0,41 ± 0,03	3,51×10 ⁻⁴
<i>C1orf87</i>	cg09851465	1:60312259	1:60311832-60312293	0,32 ± 0,03	0,64 ± 0,05	3,51×10 ⁻⁴

Ген	СрG-сайт	Локализация в геноме*	СрG-островок	β ВГА	β БПВ	P_{FDR}
<i>DLX5</i>	cg27016494	7:96489522	7:96487969-96489640	0,39 ± 0,05	0,60 ± 0,07	3,63×10 ⁻⁴
<i>HOXA11</i>	cg15760840	7:27191747	7:27189699-27192279	0,16 ± 0,08	0,40 ± 0,13	3,64×10 ⁻⁴
<i>DLX5</i>	cg20080624	7:96489047	7:96487969-96489640	0,31 ± 0,06	0,59 ± 0,09	3,66×10 ⁻⁴
<i>KIAA0367</i>	cg19282250	9:78518342	нет	0,53 ± 0,04	0,74 ± 0,02	4,19×10 ⁻⁴
<i>MASP1</i>	cg20725021	3:188492269	нет	0,31 ± 0,11	0,54 ± 0,04	4,39×10 ⁻⁴
<i>PHLDA1</i>	cg27182761	12:74712860	12:74710025-74712942	0,33 ± 0,12	0,59 ± 0,08	5,01×10 ⁻⁴
<i>TCF8</i>	cg24861272	10:31647159	10:31647064-31650188	0,32 ± 0,05	0,58 ± 0,05	5,28×10 ⁻⁴
<i>ALDH1A3</i>	cg23191950	15:99236597	15:99236455-99238833	0,56 ± 0,05	0,78 ± 0,03	5,57×10 ⁻⁴
<i>SEPP1</i>	cg04502814	5:42847709	нет	0,15 ± 0,05	0,40 ± 0,10	6,26×10 ⁻⁴
<i>HTR3B</i>	cg06531741	11:113280660	нет	0,30 ± 0,07	0,51 ± 0,04	6,71×10 ⁻⁴
<i>ZNF536</i>	cg18680834	19:35555189	нет	0,36 ± 0,05	0,63 ± 0,08	7,09×10 ⁻⁴
<i>PRG1</i>	cg27208307	10:70517405	нет	0,24 ± 0,05	0,45 ± 0,09	7,39×10 ⁻⁴
<i>HPR</i>	cg09584711	16:70654445	нет	0,33 ± 0,08	0,57 ± 0,05	8,02×10 ⁻⁴
<i>KRT7</i>	cg09522147	12:50913609	12:50912973-50913926	0,29 ± 0,07	0,53 ± 0,06	8,59×10 ⁻⁴
<i>MARK2</i>	cg06204948	11:63412666	нет	0,47 ± 0,07	0,72 ± 0,05	1,01×10 ⁻³
<i>ASGR2</i>	cg26661623	17:6959986	нет	0,40 ± 0,18	0,61 ± 0,04	1,18×10 ⁻³
<i>C20orf175</i>	cg27214774	20:48687117	нет	0,35 ± 0,17	0,65 ± 0,03	1,26×10 ⁻³
<i>CD28</i>	cg02099418	2:204279391	нет	0,53 ± 0,07	0,75 ± 0,05	1,32×10 ⁻³
<i>TRIM63</i>	cg16051685	1:26266670	нет	0,34 ± 0,12	0,57 ± 0,06	1,51×10 ⁻³
<i>OPRK1</i>	cg01281904	8:54327310	8:54327302-54327509	0,31 ± 0,09	0,53 ± 0,05	1,76×10 ⁻³
<i>P2RX5</i>	cg03317245	17:3547263	нет	0,28 ± 0,07	0,49 ± 0,03	1,76×10 ⁻³
<i>PPL</i>	cg16213655	16:4927533	16:4926063-4927963	0,18 ± 0,07	0,38 ± 0,04	2,12×10 ⁻³
<i>MC4R</i>	cg02037013	18:56190510	нет	0,34 ± 0,05	0,56 ± 0,04	2,22×10 ⁻³
<i>HOXB3</i>	cg12910797	17:44006721	17:44006560-44006958	0,41 ± 0,13	0,63 ± 0,11	2,80×10 ⁻³
<i>ZIC3</i>	cg25410053	X:136475083	X:136475072-136477977	0,38 ± 0,03	0,59 ± 0,13	2,80×10 ⁻³
<i>CCL1</i>	cg17118262	17:29714682	нет	0,40 ± 0,07	0,65 ± 0,05	3,46×10 ⁻³
<i>7A5</i>	cg15749858	7:20223521	нет	0,26 ± 0,03	0,46 ± 0,08	3,49×10 ⁻³
<i>SP2</i>	cg14360917	17:43347121	нет	0,27 ± 0,06	0,47 ± 0,04	3,70×10 ⁻³
<i>MSX1</i>	cg24840099	4:4915331	4:4915141-4915899	0,56 ± 0,09	0,79 ± 0,04	4,04×10 ⁻³
<i>TCTEX1D1</i>	cg17819635	1:66990261	1:66990232-66990994	0,17 ± 0,08	0,38 ± 0,11	2,57×10 ⁻²

Примечание: * - сборка генома GRCh36/hg18.

Благодарность

Прежде всего, хочу поблагодарить своего научного руководителя Валерия Павловича Пузырева за предоставление возможности участия в интересной исследовательской работе, за формирование моих научных интересов, за мудрые советы и поддержку.

Выражаю сердечную благодарность нашей научной группе во главе с Назаренко Марией Сергеевной. Ее видение проблематики исследования, наставления, методическая осведомленность и опыт научной работы внесли неоценимый вклад в реализацию данной диссертации.

Хотел бы выразить признательность научным сотрудникам ФГБНУ «НИИ медицинской генетики», всегда готовым поделиться своими знаниями и дать ценные практические рекомендации, а также создающим комфортную обстановку доверительных профессиональных отношений.

Благодарю наших коллег из ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» за эффективное сотрудничество и любезно предоставленный ими материал для выполнения настоящего исследования.