

На правах рукописи



МАРКОВ АНТОН ВЛАДИМИРОВИЧ

**ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК
ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

03.02.07 – генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Томск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», г. Томск

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, академик РАН, профессор
Пузырев Валерий Павлович

Официальные оппоненты:

Афанасьев Сергей Александрович, доктор медицинских наук, профессор; Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт кардиологии», руководитель лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики (г. Томск);

Ларионова Валентина Ильинична, доктор медицинских наук, профессор; Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры педиатрии и детской кардиологии (г. Санкт-Петербург).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск).

Защита состоится «__» _____ 2015 года в ____ час на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 001.045.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» при участии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и ФГБНУ «Томский НИИ онкологии» по адресу: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» (г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10) и на сайте института (<http://www.medgenetics.ru/>).

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

И.Ю. Хитринская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время основной причиной заболеваемости и смертности во многих странах мира являются болезни системы кровообращения. Одной из ведущих патологий в структуре болезней данной группы является атеросклеротическое поражение артерий, который приводит к таким тяжелым осложнениям как инфаркт миокарда, инсульт, внезапная смерть [Аронов Д.М., Лупанов В.П., 2011; Шальнова С.А., 2012]. Атеросклероз является мультифокальным заболеванием. 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 представляет собой многофакторный и динамичный процесс, значительный вклад в развитие которого вносит генетическая компонента [Дзизинский А.А., Пузырев В.П., 1977; Lusic 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 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. Факторы риска и биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний тесно взаимосвязаны с эпигенетическими паттернами [Baccarelli A. et al., 2010]. Наиболее изученным эпигенетическим механизмом является метилирование ДНК [Ванюшин Б.Ф., 2013; Khalil С.А., 2014]. 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]. Известно, что некоторые из локусов генома обладают свойством сохранять относительно стабильный уровень метилирования продолжительное время, и их статус метилирования коррелирует с наличием ряда клинических признаков, значимых для развития многофакторной патологии [Feinberg A.P., 2010; 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 [Feinberg A.P., 2010; Yuen R.K., Robinson W.P., 2011].

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 [Tigunen 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 variability 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, закономерным этапом в отношении многофакторных заболеваний является проведение эпигеномных исследований ассоциаций с использованием современных методов высокопроизводительного анализа [Rakyan V.K. et al., 2011]. Такой подход был применен для изучения variability уровня метилирования ДНК при атеросклерозе [Castillo-Diaz S.A., 2010; Назаренко М.С. и др., 2011; Aavik E. et al., 2014; Wang Z. et al., 2014; Yamada Y. et al., 2014; Zaina S. et al., 2014]. Возрастающий интерес 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 пока 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 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.

Практическая значимость. 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.

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*).

Апробация работы. 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», посвященной 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).

Декларация личного участия 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.

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 188 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.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследования был сформирован банк ДНК, выделенной из образцов тканей сосудистой стенки и лейкоцитов периферической крови (ЛПК), которые были получены от 85 пациентов в результате хирургического вмешательства (рис. 1). Набор материала осуществлялся на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

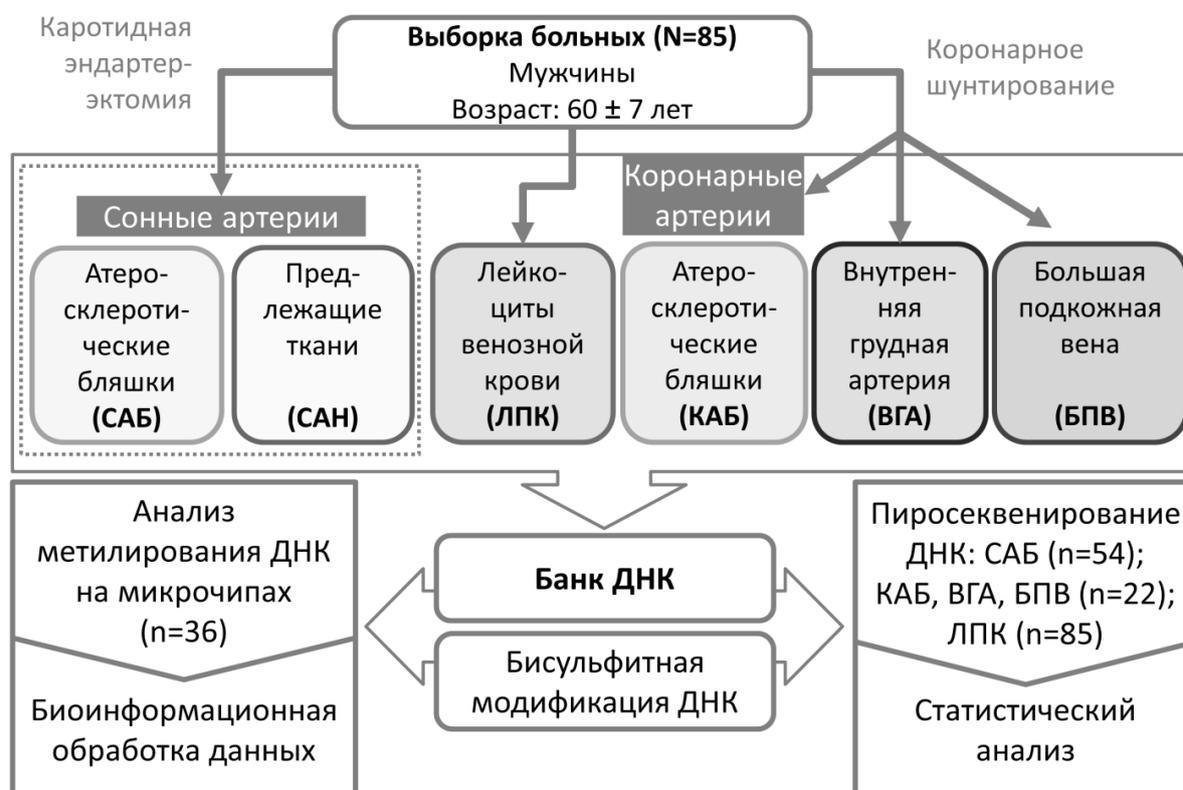


Рисунок 1. Дизайн исследования.

От 60 больных в результате каротидной эндартерэктомии были получены образцы атеросклеротических бляшек (САБ) и макроскопически неизмененных подлежащих тканей сонных артерий (САН). От 25 больных в результате коронарного шунтирования получены атеросклеротические бляшки правых коронарных артерий (КАБ), а также образцы редко поражаемой внутренней грудной артерии (ВГА) и большой подкожной вены нижней конечности (БПВ), которые используются в качестве шунтов. Всего для исследования было собрано 217 образцов. Весь биологический материал был заморожен в жидком азоте и хранился при температуре -80°C вплоть до исследования. Часть образцов была использована для проведения анализа метилирования ДНК на микрочипах, а остальные образцы – для подтверждения результатов микрочипового исследования методом бисульфитного пиросеквенирования.

Молекулярно-генетические методы. Для выделения ДНК использовался стандартный метод фенол-хлороформной экстракции [Sambrook J., Russel D.W., 2001]. При этом образцы сосудистой стенки были предварительно гомогенизированы и инкубированы с протеиназой К. Бисульфитная модификация ДНК была проведена с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research), микрочиповое исследование было проведено на платформе Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina), подтверждающее бисульфитное пиросеквенирование выполнено на приборе PyroMark Q24 (Qiagen) согласно стандартным протоколам производителей.

Биоинформатические и статистические методы. Обработка данных, описательный и сравнительный анализ результатов были проведены в программной среде R [R Development Core Team]. Оценкой уровня метилирования являлся индекс метилирования (β), отражающий относительное количество метилированных копий CpG-сайта в образце. Сравнительный анализ результатов микрочипового исследования был проведен с использованием обобщенных линейных моделей и эмпирического байесовского «смягчения» дисперсии [Smyth G.K. et al., 2004]. Дифференциально метилированными считались CpG-сайты с достигнутым уровнем значимости $P < 0,05$ и разницей средних уровней метилирования в группах сравнения $|\Delta\beta| \geq 0,2$. Функциональное аннотирование списков генов проводилось с помощью инструмента «WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit» [Zhang B., 2005]. Для описания и сравнения результатов пиросеквенирования использовались методы непараметрической статистики (критерии Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни), для оценки зависимости между переменными – коэффициент корреляции Пирсона (r). Поправка при множественной проверке статистических гипотез была проведена по методу Бенджамини-Хохберга (для микрочиповых данных) или Бонферрони (для результатов пиросеквенирования) [Benjamini Y., Hochberg Y., 1995; Кобзарь А.И., 2006].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика профилей метилирования ДНК по результатам микрочипового анализа

Микрочиповое исследование позволило оценить значения уровня метилирования 27373 CpG-сайтов 14425 генов в клетках сосудистой стенки и ЛПК больных с мультифокальным атеросклерозом. Распределение уровней метилирования ДНК имело бимодальный характер. Для всех групп тканей было характерно преобладание CpG-сайтов с низким уровнем метилирования, основная часть которых входила в состав CpG-островков. Причем средний уровень метилирования анализируемых CpG-сайтов уменьшался по мере их приближения к сайту инициации транскрипции. В образцах САН наблюдалось больше CpG-

сайтов с промежуточным уровнем метилирования (20-60%) по сравнению с другими группами ($P < 0,001$), вне зависимости от локализации CpG-островков.

Коэффициент корреляции средних уровней метилирования всех анализируемых CpG-сайтов в сравниваемых группах был высок, что может объясняться общим мезодермальным происхождением анализируемых тканей. Наименьшее значение коэффициента корреляции было выявлено при оценке сходства профилей метилирования ДНК в ЛПК и образцах сосудистого русла ($r = 0,92-0,95$, $P < 0,05$). Наиболее сильная корреляция средних уровней метилирования анализируемых CpG-сайтов наблюдалась при сравнении различных участков сосудистого русла между собой ($r \geq 0,98$, $P < 0,05$).

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 (рис. 2).

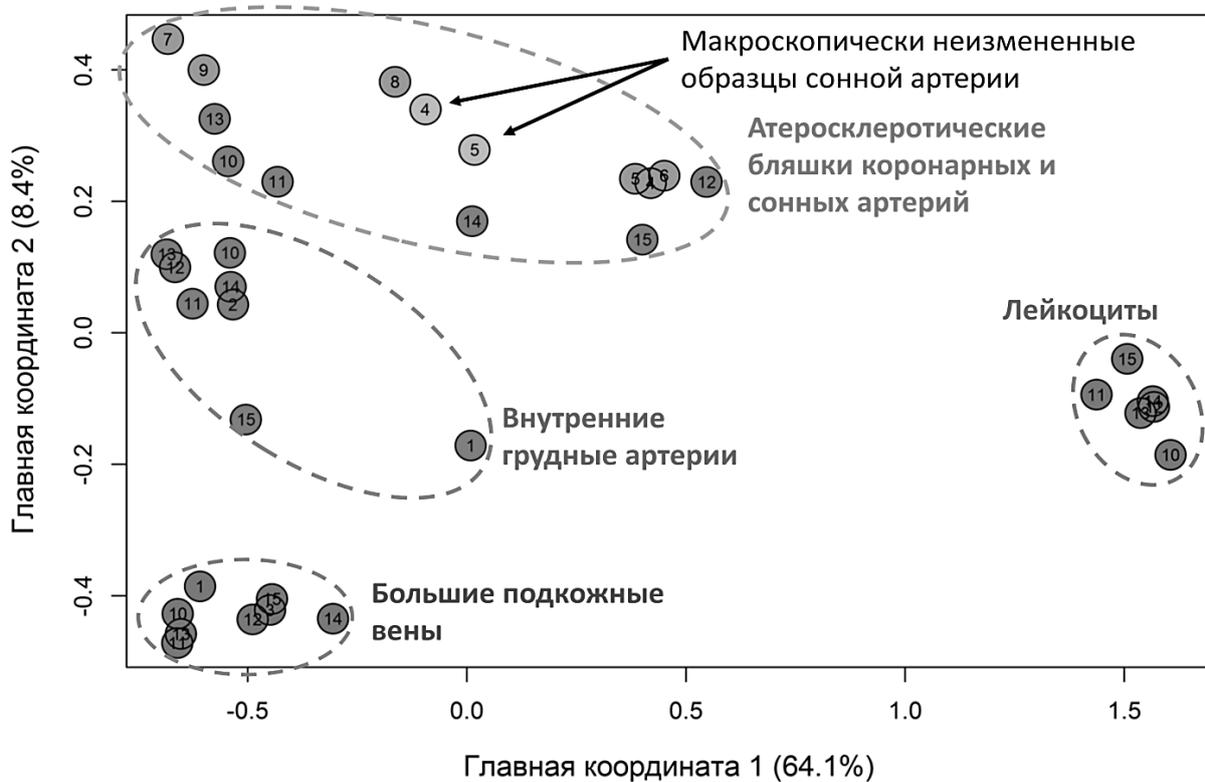


Рисунок 2. Диаграмма взаимного расположения образцов по данным микрочипового исследования в зависимости от профилей метилирования ДНК в их клетках.

По первой координате, объясняющей большую часть общей дисперсии данных, ЛПК четко дистанцировались от тканей сосудистой стенки и формировали плотный кластер. Этот результат можно объяснить с позиции тканевой специфичности эпигенетических паттернов. Некоторые образцы из кластера пораженных атеросклерозом артерий располагались ближе к ЛПК по сравнению с непораженными тканями сосудистой стенки. Это свидетельствует об изменениях в профиле метилирования пораженных артерий, которое может быть

связано с инфильтрацией лейкоцитами тканей сосудистой стенки – характерного компонента воспаления в очаге атеросклеротического поражения.

По второй координате 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. Высокая корреляция ($r=0,99$, $P<0,05$) и сходство профилей метилирования ДНК отмечались между тканями КАБ, САБ и САН.

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

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. При сравнительном анализе уровней метилирования ДНК образцов из групп КАБ и ВГА было выявлено статистически значимое дифференциальное метилирование 203 CpG-сайтов 185 генов, из которых 101 CpG-сайт 99 генов имел повышенный уровень метилирования в КАБ по сравнению с ВГА, а 102 CpG-сайта 86 генов оказались гипометилированы в атеросклеротических бляшках.

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». Для генов, уровень метилирования CpG-сайтов которых повышен в КАБ по сравнению с ВГА, наиболее представленной оказалась категория биологических процессов, связанная с гомеостазом ионов цитозольного кальция (GO:0051480, $P=0,043$), и одна категория внеклеточно расположенных белков (GO:0044421, $P=0,036$). 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, $P=0,032$; GO:0006954, $P=0,015$),

эмбриогенезом и формированием паттернов развития (GO:0009790, $P=0,014$; GO:0007389, $P=0,016$), сигнальной регуляцией ответа на молекулы липидов (GO:0033993, $P=0,040$).

Сравнительный анализ уровней метилирования отдельных CpG-сайтов в группах САБ и ВГА выявил дифференциальное метилирование 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. 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.

При функциональном аннотировании генов, имеющих гиперметилированные CpG-сайты в САБ, было найдено три термина, связанных с функционированием рецепторных белков (GO:0004888, $P=0,038$ и GO:0017046, $P=0,038$), а также ионных транспортеров (GO:0015075, $P=0,038$). 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, $P=0,010$; GO:0007389, $P=0,003$; GO:0051093, $P=0,023$), апоптозом (GO:0012501, $P=0,046$), позитивной регуляцией клеточного ответа (GO:0048584, $P=0,046$; GO:0043123, $P=0,023$; GO:0045089, $P=0,034$) и депонированием липидов (GO:0019915, $P=0,023$). Единственная категория молекулярных функций включала гены, кодирующие сиквенс-специфичные ДНК-связывающие белковые факторы (GO:0043565, $P=0,001$). 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, $P=0,033$). 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, $P=0,038$).

Общими для списков дифференциально метилированных в КАБ и САБ по сравнению с ВГА, оказались 72 CpG-сайта 65 генов (рис. 3). 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. При этом не было выявлено локусов, для которых были бы зарегистрированы полярные значения уровня метилирования в сравниваемых группах.

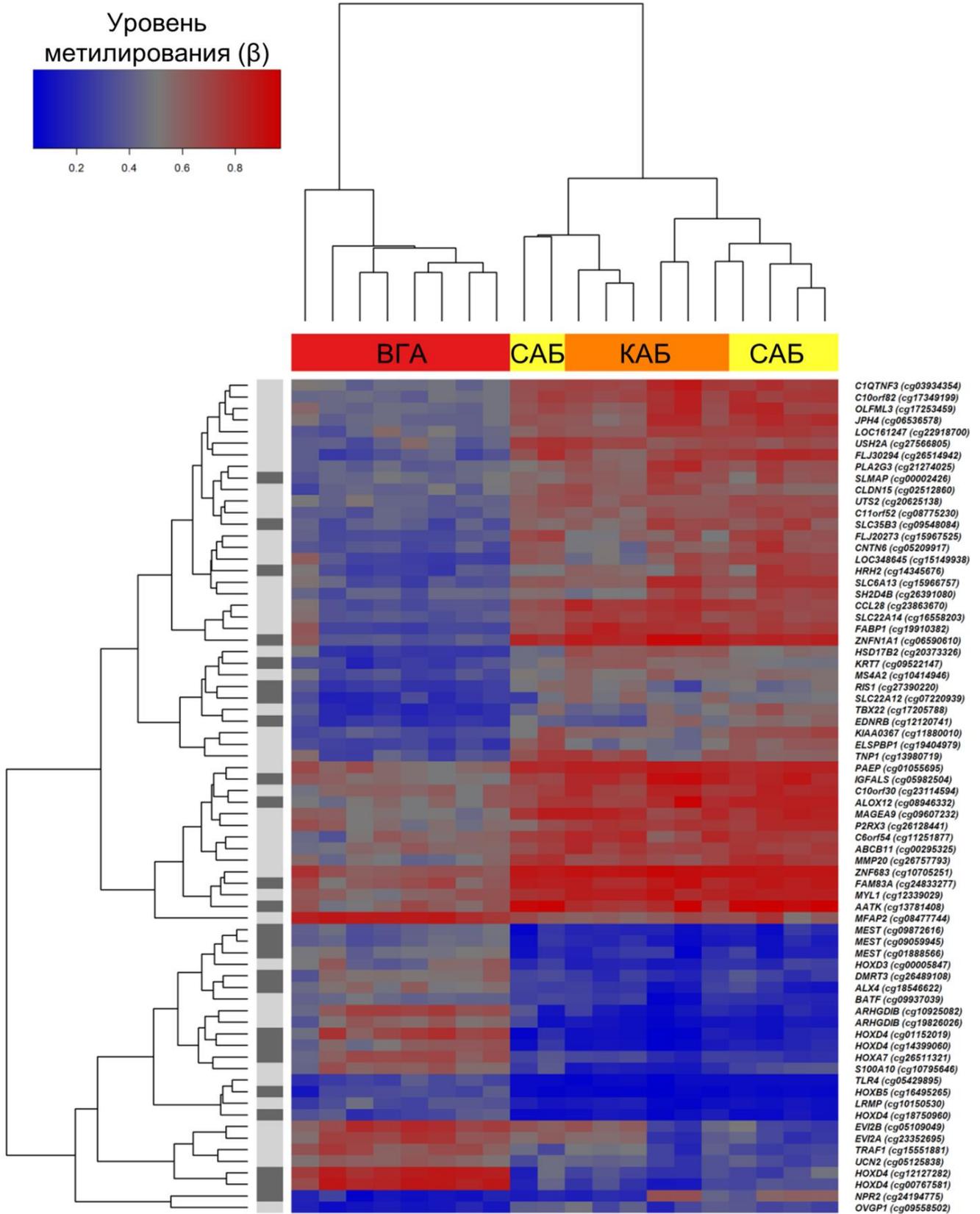


Рисунок 3. Тепловая карта уровней метилирования CpG-сайтов, дифференциально метилированных в тканях атеросклеротических бляшек из области коронарных (КАБ) и сонных (САБ) артерий по сравнению с образцами внутренних грудных артерий (ВГА). Темно-серым цветом слева от теплокарты указаны CpG-сайты, входящие в состав CpG-островков.

Согласно базе данных «CADgene», из идентифицированных 65 генов, дифференциально метилированных между атеросклеротическими бляшками и непораженными тканями артерий, лишь пять генов (*ALOX12*, *UTS2*, *NPR2*, *UCN2* и *TLR4*) рассматривались ранее в качестве кандидатов атеросклероза и его осложнений.

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 в 17 генах, 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. Важно, 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 участников неочевидных сигнальных путей 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 8 дифференциально метилированных CpG-сайтов. Для CpG-динуклеотидов, относящихся к генам *GPR109B*, *MAB21L2*, *C20orf186* и *HIPK3*, был характерен повышенный уровень метилирования в клетках атеросклеротических бляшек ($P < 0,05$), а CpG-сайты локусов *IGSF21*, *TANK*, *TP73L* и *C14orf105* были гипометилированы относительно макроскопически неизмененных участков сонных артерий. В составе CpG-островка был обнаружен всего один CpG-динуклеотид, принадлежащий гену *IGSF21*. Продукт данного гена относится к надсемейству иммуноглобулиновых рецепторных белков, который не был ранее ассоциирован с какой-либо многофакторной патологией.

Первые исследования по изучению метилирования ДНК *in vivo* в тканях артериальной стенки человека, пораженной атеросклерозом, были нацелены на изучение отдельных генов-кандидатов: *ALOX15*, *ESR1*, *ESR2*, *SLC16A8* и *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]. Результаты настоящего исследования не подтверждают дифференциальный характер метилирования данных генов. Однако, сопоставление с результатами других исследований в данной области, использующих широкогеномный подход, выявило некоторые общие гены. При сравнении списков дифференциально метилированных генов, полученных в данном исследовании и в работе S. Castillo-Diaz и соавт. (2010), выявлено совпадение результатов по двум генам – *HOXD4* и *GPR143* [Castillo-Diaz S.A. et al., 2010]. Сравнение с результатами S. Zaina и соавт. (2014) выявило общие CpG-сайты генов *NGEF*, *PKD2* и *HRH2*, для которых было показано гиперметилирование в атеросклеротических бляшках КАБ, САБ и аорты относительно непораженных артерий [Zaina S. et al., 2014]. По результатам настоящего исследования и работы E. Aavik и соавт. (2014), использовавшими метод полногеномного бисульфитного секвенирования, были найдены общие гены: 7 гипометилированных генов (*AIM2*, *ALX4*, *HOXB5*, *HOXD3*, *HOXD4*, *MEST*, *TRAF1*) и 6 гиперметилированных генов (*C1QTNF3*, *CCL28*, *IKZF1*, *RBM47*, *TMEM182*, *USH2A*) во всех пораженных атеросклерозом образцах [Aavik E. et al., 2014].

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

Сравнительный анализ уровней метилирования ДНК образцов в группах ВГА и БПВ выявил статистически значимое дифференциальное метилирование 213 CpG-сайтов 175 генов. 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. Статистически значимая сверхпредставленность в терминах биологических процессов и молекулярных функций базы данных «Gene Ontology» была характерна только для списка генов, гипометилированных в образцах ВГА относительно БПВ. Основные термины со сверхпредставленными генами включали категории биологических процессов, связанные с развитием (GO:0032502, $P=0,003$) и детерминацией различных характеристик организма (GO:0065008, $P=0,005$), а также молекулярные функции, включающие активность ДНК-связывающих транскрипционных факторов (GO:0003700, $P=0,022$), рецепторов (GO:0004872, $P=0,049$) и факторов роста (GO:0008083, $P=0,047$). Список генов в категории процессов развития разделялся на множество более мелких и пересекающихся списков, насыщающих дочерние термины биологических процессов, включающих развитие тканей (GO:0009888, $P=0,001$), органов (GO:0048513, $P=0,003$) и их систем (GO:0048731, $P=0,001$). Сверхпредставленность наблюдалась и в их подкатегориях, связанных с развитием соединительной ткани (GO:0061448, $P=0,002$), скелетной системы

(GO:0001501, $P=0,002$), и хрящей (GO:0051216, $P=0,001$), а также морфогенезом органов (GO:0009887, $P=0,002$) 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. Прежде всего, это относилось к «островковым» CpG-сайтам генов *ALDH1A3*, *RNF207*, *DAB2IP*, *DLX5*, *HOXA2*, *HOXA5*, *MSX1*, *PAX9*, *SOST*, *WT1* и *ZC3H7A*. Для онкосупрессорных генов *DAB2IP* и *WT1*, контролирующих воспаление и пролиферацию эндотелия, ранее была найдена связь с атеросклеротическим ремоделированием шунтов и коронарным атеросклерозом [Wagner K.D. et al., 2002; Min W., Pober J.S., 2011].

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

По результатам микрочипового исследования 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 несколько генов, в том числе *HOXD4* и *MEST* (рис. 3). Другой кандидатный ген *AATK* включал один гиперметилированный CpG-сайт, показатель $\Delta\beta$ которого был высок в обоих сравнениях КАБ-ВГА и САБ-ВГА. Данные гены были выбраны в качестве кандидатных для подтверждающего анализа метилирования.

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

Анализируемый регион гена *HOXD4* локализован на 1 Кб выше сайта старта его транскрипции и в области предшественника малой некодирующей РНК (*MIR10B*). Регион включал 4 CpG-сайта, в том числе CpG-сайты микрочипов *cg01152019* и *cg14399060*. В результате бисульфитного пиросеквенирования выявлено статистически значимое снижение уровня метилирования как отдельных CpG-сайтов (табл. 1), так и общее гипометилирование данного региона ДНК в образцах пораженных атеросклерозом артерий, а также ЛПК по сравнению с неизменными артериями и венами ($P<0,01$).

Ген *HOXD4* относится к категории гомеобокс-содержащих генов, которые кодируют семейство высоко консервативных транскрипционных факторов, регулирующих эмбриональное развитие и дифференцировку клеток. Кроме того, все анализируемые CpG-сайты входят в последовательность гена микроРНК *MIR10B*. Увеличение экспрессии *MIR10B* было показано в клетках САБ по сравнению с ВГА [Bidzhekov K. et al., 2012]. Данная микроРНК индуцирует миграцию эндотелиальных клеток и ангиогенез с помощью различных

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 липопротеиды, и поэтому является мишенью для таргетной фармакотерапии атеросклероза [Wang D. et al., 2012].

Таблица 1

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)
Средний уровень по региону	18 (13 - 27)	18 (13 - 25)	16 (11 - 25)	61 (52 - 69)	59 (47 - 67)

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).

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

Ген *PEG1/MEST* является импринтированным. С альтернативного промотора и экзона 1a данного гена считывается транскрипт, экспрессия которого носит тканеспецифический характер. В диссертационном исследовании был проанализирован регион, охватывающий 5 сайтов CpG-островка в области промотора/экзона 1a, в том числе cg09872616 (табл. 2). Уровни метилирования CpG-сайтов во всех сравниваемых группах статистически значимо различались ($P < 0,001$), отражая тканеспецифический характер метилирования экзона 1a гена *PEG1/MEST*.

Поскольку анализируемый регион расположен в области CpG-островка промотора и экзона 1a, возможно, изменение его уровня метилирования связано с регуляцией функциональной активности гена *PEG1/MEST*. Данный ген ассоциирован с ростом клеток мезодермального происхождения [Moon Y.S. et al., 2010]. Поэтому изменение метилирования экзона 1a гена *PEG1/MEST* при

атеросклерозе может быть связано с пролиферацией клеточного компонента стенки артерии и ее ремоделированием.

Таблица 2

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)
Средний уровень по региону	12 (9 - 18)	8 (6 - 12)	4 (3 - 7)	21 (16 - 24)	34 (25 - 40)

Примечание: * - локализация сайтов указана по сборке генома GRCh37/hg19;

** - оценками распределения уровней метилирования являлись медиана, а также первый и третий квартили (указаны в скобках).

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

Ген *AATK* кодирует белок с тирозинкиназной активностью, экспрессирующийся при апоптозе. Данный ген является супрессором опухолей и часто инактивируется при онкологических заболеваниях [Naag T. et al., 2014]. В настоящей работе были проанализированы уровни метилирования 7 сайтов CpG-островка 11 экзона гена *AATK*, включая cg13781408 (табл. 3).

Статистически значимые различия в уровне метилирования между КАБ и ЛПК наблюдалась только для четвертого CpG-сайта ($P=0,043$). В то же время для каждого CpG-сайта в отдельности, как и для анализируемого региона в целом, сохранялось гиперметилирование в образцах КАБ, САБ и ЛПК по сравнению с тканями ВГА и БПВ ($P<0,001$), что повторяло результаты микрочипового исследования. Функциональная значимость изменений метилирования ДНК в изученном регионе гена *AATK* является предметом дискуссий. Данный регион подвергается альтернативному сплайсингу [Baker S.J. et al., 2001]. 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.

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)
Средний уровень по региону	84 (75 - 90)	62 (54 - 70)	81 (66 - 90)	28 (20 - 40)	14 (11 - 17)

Примечание: * - локализация сайтов указана по сборке генома GRCh37/hg19;

** - оценками распределения уровней метилирования являлись медиана, а также первый и третий квартили (указаны в скобках).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании проведена оценка профилей метилирования ДНК в клетках сосудистой стенки, а также лейкоцитах периферической крови у больных с мультифокальным атеросклерозом. Анализ метилирования 27373 CpG-сайтов, локализованных в 14425 генах, проведен на микрочипах фирмы «Illumina». В результате было показано, что ткани сосудистой стенки и лейкоциты периферической крови больных атеросклерозом дифференцируются по уровню метилирования изученных CpG-сайтов. И наоборот, существенное сходство профилей метилирования ДНК между тканями сосудистой стенки из области атеросклеротических бляшек (КАБ, САБ) и подлежащих тканей без макроскопически выраженного атеросклероза (САН) 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.

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. 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. Большая часть дифференциально метилированных CpG-динуклеотидов была сконцентрирована в районе сайта инициации транскрипции, что может указывать на вовлеченность aberrантного метилирования cis-регуляторных элементов, локализованных в данной области.

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]. Функциональная аннотация дифференциально метилированных генов между анализируемыми образцами артерий и вен выявила большую категорию биологических процессов, связанных с развитием организма. Такое обилие терминов, касающихся развития, указывает на регионарную и тканевую детерминированность их профилей метилирования ДНК. Возможно, что эти особенности проявляются и при использовании данных сосудов в качестве шунтов.

Уровни метилирования отдельных CpG-сайтов кандидатных генов *HOXD4* (*MIR10B*), *PEG1/MEST* и *AATK* были подтверждены 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. Уровни метилирования CpG-сайтов экзона 1а гена *PEG1/MEST* статистически значимо различались во всех анализируемых тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови. Высокий уровень метилирования в области 11 экзона гена *AATK* выявлен в правых коронарных и сонных артериях, лейкоцитах периферической крови, а внутренние грудные артерии и большие подкожные

вены нижних конечностей, напротив, проявляли гипометилирование в анализируемом регионе.

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 непораженными внутренними грудными артериями изменения в уровне метилирования более 20% имеют 72 CpG-сайта, входящих в состав 65 генов ($P < 0,05$).
5. При сравнении внутренних грудных артерий и больших подкожных вен нижних конечностей показано дифференциальное метилирование 213 CpG-сайтов, входящих в состав 175 генов ($P < 0,05$ 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%; $P < 0,001$).
7. Показано, что уровень метилирования в области промотора/экзона 1a гена *PEG1/MEST* варьирует во всех анализируемых тканях ($P < 0,001$): 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 ($P < 0,001$).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах и сборниках

1. Назаренко М.С., Марков А.В., Лебедев И.Н., Слепцов А.А., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. Профиль метилирования ДНК в тканях сосудистого русла при атеросклерозе // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47. – № 3. – С. 398-404.
2. Назаренко М.С., Марков А.В., Лебедев И.Н., Слепцов А.А., Королева Ю.А., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. Профиль метилирования локуса *INK4b-ARF-INK4a* при атеросклерозе // Генетика. – 2013. – Т. 49. – № 6. – С. 783-787.
3. Назаренко М.С., Марков А.В., Лебедев И.Н., Слепцов А.А., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. Статус метилирования генов клеточной пролиферации при атеросклерозе // Атеросклероз. – 2013. – Т. 9. – № 1. – С. 5-13.
4. Марков А.В., Назаренко М.С., Королева Ю.А., Лебедев И.Н., Слепцов А.А., Фролов А.В., Попов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. Уровень метилирования гена *HOXD4* в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови у больных атеросклерозом // Медицинская генетика. – 2014. – № 1. – С. 39-42.
5. Марков А.В., Назаренко М.С. Метилирование ДНК и атеросклероз // Генетика человека и патология. Проблемы эволюционной медицины: сб. науч. трудов / под ред. В.А. Степанова. – Вып. 10. – Томск: «Печатная мануфактура», 2014. – С. 133-136.
6. Пузырев В.П., Назаренко М.С., Лебедев И.Н., Марков А.В., Слепцов А.А., Кашеварова А.А., Толмачева Е.Н., Фролов А.В., Попов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Феномен парадоминантного наследования при атеросклерозе // Медицинская генетика. – 2014. – № 10. – С. 41-48.
7. Nazarenko M.S., Markov A.V., Lebedev I.N., Freidin M.B., Sleptcov A.A., Koroleva I.A., Frolov A.V., Popov V.A., Barbarash O.L., Puzyrev V.P. A comparison of genome-wide DNA methylation patterns between different vascular tissues from patients with coronary heart disease // PLoS One. – 2015. – № 10. – V. 4. – e0122601.

Тезисы

8. Марков А.В., Назаренко М.С., Фролов А.В. Использование микрочиповых технологий для скрининга профиля метилирования ДНК тканей сосудистой стенки у больных атеросклерозом // Актуальные вопросы клинической и

- экспериментальной кардиологии: материалы Всероссийской конф. молодых ученых. – Томск, 2013. – С. 75-76.
9. Назаренко М.С., Марков А.В., Лебедев И.Н., Слепцов А.А., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. Использование микрочиповых технологий для оценки уровня метилирования ДНК тканей сосудистой стенки у больных атеросклерозом // Высокопроизводительное секвенирование в геномике: материалы международной конф. – Новосибирск, 2013. – С. 77.
 10. Марков А.В., Назаренко М.С., Слепцов А.А., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. Метилирование гомеобоксных генов при атеросклерозе // VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы: тезисы докладов. – Ростов н/Д, 2014. – С. 112-113.
 11. Markov A.V., Nazarenko M.S., Lebedev I.N., Frolov A.V., Popov V.A., Barbarash O.L., Puzyrev V.P. DNA methylation patterns in coronary heart disease // European Human Genetics Conference 2014. – Milan, Italy, 2014 / European Journal of Human Genetics. – 2014. – V. 22. – Suppl. 1. – P. 411.
 12. Назаренко М.С., Марков А.В., Слепцов А.А., Лебедев И.Н., Скрыбин Н.А., Фролов А.В., Пузырев В.П. Молекулярное профилирование тканей сосудистой стенки у больных атеросклерозом с использованием микрочиповых технологий // Молекулярная диагностика – 2014: сб. тр. VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / под ред. акад. РАН В.И. Покровского. – М.: ООО «Издательство МБА», 2014. – Т. 2. – С. 386-387.
 13. Назаренко М.С., Марков А.В., Слепцов А.А., Лебедев И.Н., Скрыбин Н.А., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. Вариабельность генома в тканях сосудистой стенки различной локализации у больных атеросклерозом // VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы: тезисы докладов. – Ростов н/Д, 2014. – С. 113.
 14. Nazarenko M.S., Markov A.V., Lebedev I.N., Frolov A.V., Popov V.A., Barbarash O.L., Puzyrev V.P. DNA methylation profile of coronary artery bypass grafts // European Human Genetics Conference 2014. – Milan, Italy, 2014 / European Journal of Human Genetics. – 2014. – V. 22. – Suppl. 1. – P. 412.
 15. Nazarenko M.S., Markov A.V., Sleptcov A.A., Lebedev I.N., Skryabin N.A., Kashevarova A.A., Frolov A.V., Barbarash O.L., Puzyrev V.P. Genome-wide profiling of DNA copy number and methylation in atherosclerosis // International Symposium «Human Genetics»: abstracts. – Novosibirsk, 2014. – P. 43.
 16. Марков А.В., Назаренко М.С., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. Метилирование ДНК при атеросклеротическом поражении артерий у человека // Медицинская генетика. – 2015. – № 2. – С. 39.
 17. Назаренко М.С., Марков А.В., Слепцов А.А., Лебедев И.Н., Саженова Е.А., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. Феномен парадоминантного наследования при многофакторных заболеваниях человека // Медицинская генетика. – 2015. – № 2. – С. 49.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БПВ	Большая подкожная вена
ВГА	Внутренняя грудная артерия
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
КАБ	Атеросклеротическая бляшка коронарной артерии
Кб	Килобаза (1000 пар нуклеотидов)
ЛПК	Лейкоциты периферической венозной крови
РНК	Рибонуклеиновая кислота
САБ	Атеросклеротическая бляшка сонной артерии
САН	Макроскопически нормальный образец сонной артерии

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:
ФГБНУ «НИИ медицинской генетики»
634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10
Ученому секретарю Диссертационного Совета ДМ 001.045.01
канд. биол. наук Хитринской И.Ю.
Факс +7(3822)51-37-44
E-mail: i.khitrinskaya@medgenetics.ru