

ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ КОМОРБИДНОСТИ АНЕВРИЗМЫ И АТЕРОСКЛЕРОЗА ВОСХОДЯЩЕЙ АОРТЫ

© 2024 г. И. А. Гончарова^{a, *}, А. А. Зарубин^a, С. А. Шипулина^a, Ю. А. Королёва^a, Д. С. Панфилов^b, Б. Н. Козлов^b, М. С. Назаренко^a^aНаучно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия^bНаучно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634012 Россия

*e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Атеросклероз и аневризма аорты — относительно частые патологические состояния, которые длительное время протекают бессимптомно и приводят к жизнеугрожающим и инвалидизирующим осложнениям. Представлены результаты анализа метилирования ДНК в различных участках восходящей аорты (дилатированном, в нерасширенной области и в атеросклеротической бляшке) у пациентов с аневризмой аорты. Метилирование ДНК определяли методом бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов (RRBS). Выявлены различия в уровне метилирования двух CpG-сайтов гена *NR2F1-AS1* ($|\Delta\beta| \geq 0.2$ и $FDR < 0.05$) в дилатированной и нормальной ткани аорты. В образцах атеросклеротических бляшек и тканях дилатированной/нормальной аорты обнаружено 586/480 дифференциально метилированных CpG-сайтов: в атеросклеротических бляшках гиперметилированы 323/234 и гипометилированы 263/246 CpG-сайтов. Дифференциально метилированные CpG-сайты локализованы в основном в интронах и межгенных регионах, 88.2% — в сайтах связывания факторов транскрипции, среди которых ZNF263, ZFP148, PATZ1, NRF1, TCF12, EGR1 связаны с патогенезом атеросклероза различных артерий, а ELK1, ETS1, KLF15 — с аневризмой аорты. Шестнадцать дифференциально метилированных CpG-сайтов локализованы в области генов *CMIP*, *RPH3AL*, *XRCC1*, *GATA5*, *EXD3*, *KCNC2*, *HIVEP3*, *ADCY9*, *CDCP2*, *FOLR1*, *WT1*, *MGMT*, *GAS2*, *CAI*, *PRSS16*, *ANK3*, белковые продукты которых вовлечены в развитие как расслоения аорты, так и атеросклероза сосудов различных бассейнов. Белковые продукты этих генов участвуют в различных биологических процессах, в том числе в развитии мезенхимы (GO:0060485, *FOLR1*, *WT1*, *GATA5*, *HIVEP3*, *KCNC2*) и регуляции метаболизма ДНК (GO:0051054, *MGMT*, *WT1*, *XRCC1*).

Ключевые слова: аневризма аорты, атеросклероз, метилирование ДНК, бисульфитное секвенирование

DOI: 10.31857/S0026898424030069, EDN: JCOUW

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз и аневризма аорты длительное время протекают бессимптомно и являются относительно частыми патологическими состояниями, которые приводят к жизнеугрожающим и инвалидизирующим осложнениям. Коморбидность атеросклероза и аневризмы грудной аорты варьирует в широких пределах. Обе патологии имеют одни и те же факторы риска (артериальная гипертензия, курение, мужской пол, возраст), а также некоторые патогенетические механизмы. Атеросклероз считается одной из причин возникновения аневризмы и расслоения аорты, однако данные, поддерживающие это предположение, противоречивы.

С одной стороны, атеросклеротическое поражение грудной аорты нередко возникает при мультифокальном атеросклерозе, и 87.6% пациентов

с атеросклерозом аорты имеют атеросклеротическое поражение других сосудов, а степень атеросклероза аорты коррелирует с количеством пораженных сосудов при ишемической болезни сердца (ИБС) [1]. С другой стороны, получены некоторые свидетельства в пользу гипотезы о существовании обратной коморбидности между аневризмой восходящего отдела аорты и атеросклерозом сосудов других бассейнов, поскольку пациенты с аневризмой восходящего отдела аорты имеют более низкие общие показатели толщины комплекса интима-медиа сонных артерий [2] и характеризуются более низкими значениями кальцификации коронарных артерий по сравнению с лицами без сердечно-сосудистых заболеваний независимо от других факторов риска атеросклероза [3]. Более того, у пациентов с аневризмой грудной аорты реже регистрировались такие клинические осложнения

атеросклероза коронарных артерий, как ИБС и инфаркт миокарда [4].

Несиндромальные спорадические случаи аневризмы и расслоения грудной аорты и атеросклеротическое поражение артерий различных бассейнов сопровождаются разнообразными структурными изменениями генома лейкоцитов и клеток сосудов [5–8]. Около 10% пациентов с ранним спорадическим расслоением грудной аорты имеют патогенные варианты генов наследственных форм аневризмы, а у 28% пациентов зарегистрированы генетические варианты с неизвестной клинической значимостью [9]. Однако в большинстве случаев при аневризме грудной аорты, как и при атеросклеротических поражениях артерий, не выявлено специфических генетических вариантов, которые можно рассматривать как потенциальные маркеры заболевания. Одним из перспективных направлений поиска молекулярных маркеров данных патологий считается изучение эпигенетического профиля клеток аорты в регионах, различающихся степенью дилатации/расслоения, и сосудов других бассейнов при их атеросклеротическом поражении.

К настоящему времени показано, что уровень и рисунок метилирования ДНК в пораженных атеросклерозом сосудах отличается от этих параметров в нормальных тканях артерий [10, 11]. Эпигенетическим механизмам атерогенеза посвящены многочисленные исследования, тогда как особенности метилирования ДНК в тканях аорты при аневризме и расслоении ее восходящего отдела описаны в единичных работах. Установлены различия в профиле метилирования ДНК в тканях аорты пациентов с аневризмой аорты с различным строением аортального клапана, а также в тканях аорты с расслоением и дилатацией [12, 13]. Наиболее существенные различия выявлены в уровне метилирования гена *PTPN22*, белковый продукт которого вовлечен в сигнальный путь рецептора Т-клеток.

Chen Y. и соавт. сравнили метилирование ДНК в тканях грудной аорты (расслоение/интактная ткань) и выявили 589 дифференциально метилированных CpG-сайтов (ДМС) в генах сигнальных путей MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы), TNF (фактор некроза опухолей), в генах, связанных с апоптозом, ангиогенезом, развитием сердца, ключевыми из которых являются гены *FAS*, *ANGPT2*, *DUSP6*, *FARP1* и *CARD6* [14].

Анализ метилирования ДНК эндотелиальных клеток у пациентов с дилатацией аорты и двусторонним аортальным клапаном выявил 681 кластер ДМС; при этом максимально различались уровни метилирования генов, продукты которых участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе и процессах развития [15].

Описаны попытки идентификации биомаркеров аортопатий, основанные на определении

специфичных для аорты паттернов метилирования внеклеточной ДНК, циркулирующей в сыворотке крови [16, 17]. Однако существенным ограничением этого подхода является низкая специфичность, обусловленная малым количеством метиломов аорты, полученных от пациентов и здоровых индивидов. К настоящему времени в доступной научной литературе нет работ, в которых анализируется профиль метилирования ДНК у пациентов с аневризмой аорты как в изолированной форме, так и в сочетании с ее атеросклеротическим поражением.

Таким образом, в настоящем исследовании изучен специфический профиль метилирования ДНК в различных участках восходящей аорты при коморбидности аневризмы и атеросклероза аорты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование включены пациенты с несиндромальными спорадическими формами аневризмы восходящей аорты. Всем пациентам проведено открытое хирургическое лечение в НИИ кардиологии г. Томска в период 2020–2023 гг. Интраоперационно проведено взятие биоптатов, соответствующих трем зонам восходящей аорты (дилатированная часть аорты в зоне максимального расширения; нерасширенный фрагмент из проксимальной части дуги аорты; атеросклеротическая бляшка, локализованная в дилатированной части аорты). Биоптаты помещали в RNAlater (“Termo Fisher Scientific”, США) и хранили при температуре -80°C .

Критериями включения пациентов в исследование были расширение восходящей аорты > 5.5 см без сочетанного поражения аортального клапана, расширение восходящей аорты > 4.5 см при выраженном стенозе аортального клапана или его недостаточности (2+ степень). Из исследования исключены пациенты с расслоением аорты, с ложными аневризмами аорты, а также пациенты, требующие повторных вмешательств на проксимальных отделах грудной аорты.

Уровень метилирования ДНК определен у шести пациентов с аневризмой аорты: у четырех из них в трех участках восходящей аорты (дилатированная часть, нерасширенная проксимальная часть дуги (нормальная ткань), атеросклеротическая бляшка, локализованная в дилатированной части); у двух пациентов в дилатированной части и нерасширенной проксимальной части дуги (нормальная ткань). Группа обследованных включала мужчин (возраст 48–64 г.) с аортальным клапаном нормального строения. У всех пациентов наблюдалась артериальная гипертензия, у трех — стенокардия, у четырех — ожирение, у одного пациента был сахарный диабет второго типа. Атеросклероз коронарных или сонных артерий (степень стеноза

больше 60%) выявлен у трех, в доклинической стадии (30%) — у двух пациентов. Атеросклеротические бляшки восходящей аорты находились на разных стадиях развития: стадия “липидных полос” (один пациент) и стадия фиброзных бляшек (три пациента).

Метилирование ДНК определяли с помощью бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов (RRBS). ДНК (100 мкг/образец) расщепляли рестриктазой *MspI* (“Сибэнзим”, Россия). Репарацию концов и поли(А)-последовательностей фрагментов осуществляли с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra для Illumina с последующим лигированием метилированных адаптеров (IDT) и очисткой продукта. Далее проводили отбор фрагментов по размеру (150–500 п.н.) при помощи магнитных шариков (Agencourt AMPure XP, “Beckman Coulter”, США). Лигированную с адаптером и очищенную ДНК обрабатывали бисульфитом натрия (D5001 EZ DNA Methylation Kit) и амплифицировали с помощью ПЦР (NEBNext Q5U Master Mix, “NEB”, США) с использованием универсальных и индексных праймеров (NEBNext Multiplex Oligos для Illumina). Продукт ПЦР очищали на магнитных шариках (Agencourt AMPure XP). После контроля качества (Bioanalyzer 2100, “Agilent”) библиотеку RRBS секвенировали на приборе Illumina HiSeq1500 (2 × 150 п.н.).

Результаты RRBS-секвенирования обрабатывали с помощью DRAGEN Bio-IT v.3.9.5 (“Illumina”) и сопоставляли с нуклеотидными последовательностями генома человека (сборка GRCh38). Для оценки качества использовали программу MultiQC v.1.11. На один образец приходилось 51.9 [47.45; 63.6] млн прочтений. Дифференциальное метилирование ДНК анализировали с использованием пакетов methylKit (версия 1.26.0) и limma (версия 3.56.2). Минимальное покрытие — ×10. Для анализа сохраняли позиции, представленные минимум в двух образцах каждой группы. Дифференциально метилированными считали CpG-сайты с разницей среднего уровня метилирования между группами образцов $|\Delta\beta| \geq 0.2$ и $FDR < 0.05$. Аннотацию регуляторных элементов транскрипционных факторов (ТФ) и CpG-островков проводили в браузере UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>), а биологических процессов и функций белковых продуктов дифференциально метилированных генов (ДМГ) — в браузере UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Анализ обогащения метаболических путей и биологических процессов, в которых задействованы белковые продукты ДМГ, выполнен в браузере Metascape (<https://metascape.org/gp>) с использованием следующих источников онтологий: KEGG Pathway, GO Biological Processes, Reactome Gene Sets, Canonical Pathways, CORUM, WikiPathways и PANTHER Pathway. Для проведения обогащения

использовали все гены, значимыми считали результаты при $p < 0.01$. Построение функциональных сетей белковых продуктов ДМГ выполнено в браузере STRING (<https://string-db.org/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В каждом из включенных в анализ образцов проанализировано 2322700 CpG-сайтов. Дифференциальное метилирование оценено путем попарного сравнения уровня метилирования каждого CpG-сайта в образцах (группах) тканей восходящей аорты (атеросклеротическая бляшка аорты/аневризма аорты (АБ/АА); аневризма аорты/нормальная ткань аорты (АА/НА); атеросклеротическая бляшка аорты/нормальная ткань аорты (АБ/НА)).

Сравнение групп АА и НА выявило 17 ДМС с разницей в уровне метилирования $\Delta\beta$ от 0.03 до 0.42. После установки фильтра $|\Delta\beta| \geq 0.2$ остаются два ДМС (chr5:93573113 и chr5:93573147, сборка GRCh38), локализованных в интронах гена длинной некодирующей РНК (днРНК) *NR2F1-AS1* в пределах CpG-островка (chr5:93570534–93573169). Оба эти сайта гипометилированы в дилатированной относительно нерасширенной части аорты. Средний уровень метилирования chr5:93573113 в дилатированной части аорты — $4.6 \pm 3.4\%$, в нерасширенной части — $34.9 \pm 7.6\%$, $\Delta\beta = -0.30$. Средний уровень метилирования chr5:93573147 в дилатированной — $10.1 \pm 4.1\%$, в нерасширенной части — $53.0 \pm 6.8\%$, $\Delta\beta = -0.43$. В целом в анализ включены 60 CpG-сайтов, локализованных в указанном CpG-островке (от chr5:93570861 до chr5:93573168). В дилатированной части аорты все эти сайты гипометилированы по сравнению с нерасширенной частью ($\Delta\beta$ от -0.19 до -0.43).

За последние годы показано, что днРНК регулируют экспрессию генов путем различных механизмов, модулируя развитие и прогрессию большого числа заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых [18]. В тканях аорты, пораженных при расслоении, выявлена aberrантная экспрессия днРНК, связанных с функционированием гладкомышечных клеток (ГМК) и деградацией внеклеточного матрикса [19]. В частности, *NR2F1-AS1* регулирует дифференцировку ГМК, модулируя уровень мРНК сократительных белков: сверхэкспрессия этой днРНК приводит к увеличению экспрессии маркеров сократительного фенотипа ГМК коронарных артерий [20]. Однако в тканях межпозвоночных дисков повышенная экспрессия *NR2F1-AS1* способствует апоптозу клеток студенистого ядра и деградации внеклеточного матрикса [21].

Нами показано, что при аневризме восходящей аорты уровень метилирования гена *NR2F1-AS1* в дилатированных тканях ниже, чем в нормальных, что косвенно может указывать на более высокую транскрипционную активность этого гена. Однако

Таблица 1. Локализация дифференциально метилированных CpG-сайтов (ДМС; $|\Delta\beta| \geq 0.2$) в клетках атеросклеротической бляшки аорты относительно дилатированной и нормальной тканей аорты

Локализация CpG-сайтов	Гиперметилированные ДМС, кол-во (%)		Гипометилированные ДМС, кол-во (%)	
	АБ/АА (323)	АБ/НА (234)	АБ/АА (263)	АБ/НА (246)
Экзон гена	25 (7.7)	10 (4.3)	10 (3.8)	19 (7.7)
Инtron гена	145 (44.9)	110 (47.0)	102 (38.7)	112 (45.5)
Межгенный регион	115 (35.6)	84 (35.9)	106 (40.3)	82 (33.3)
5'-UTR	4 (1.2)	2 (0.8)	1 (0.4) – <i>CNOT6</i> (chr5:180541732)	6 (2.4)
3'-UTR	3 (0.9)	5 (2.1)	7 (2.7)	2 (0.8)
“Выше” гена	12 (3.7)	3 (1.3)	5 (1.9)	7 (2.8)
“Ниже” гена	1 (0.3) – <i>MIR12118</i> chr5:173304804	4 (1.7)	4 (1.5)	4 (1.6)
Сайт сплайсинга	0	1 (0.4) – <i>PCYT2</i> , chr17:81906759	1 (0.4) – <i>PCYT2</i> , chr17:81906759	0
нкРНК, экзон	3 (0.9)	0	0	2 (0.8)
нкРНК, инtron	15 (4.6)	15 (6.4)	27 (10.3)	12 (4.9)
CpG-островок	36 (11.4)	5 (2.1)	15 (5.7)	5 (2.0)

Примечание. Дифференциальное метилирование оценено путем попарного сравнения уровня метилирования каждого CpG-сайта в образцах (группах) тканей (атеросклеротическая бляшка аорты/аневризма аорты (АБ/АА); атеросклеротическая бляшка аорты/нормальная ткань аорты (АБ/НА)).

для понимания механизмов связи между метилированием ДНК и экспрессией этой нкРНК необходимо детальное экспериментальное исследование уровня метилирования в области гена *NR2F1-AS1* и активности этой молекулы в клетках.

Выявлено 7508 CpG-сайтов, уровень метилирования которых различается в тканях атеросклеротически пораженной и дилатированной аорты (АБ/АА) ($\Delta\beta$ от 0.02 до 0.69). Более чем на 20% различаются 586 CpG-сайтов, из которых 323 гиперметилированы и 263 гипометилированы в клетках атеросклеротической бляшки по сравнению с дилатированной аортой (табл. 1). Основное количество как гипер-, так и гипометилированных ДМС локализовано в интронах генов и межгенных регионах (табл. 1). В экзонах генов атеросклеротической бляшки выявлено больше гиперметилированных CpG-сайтов (7.7% гиперметилированных и 3.8% гипометилированных; $p = 0.049$), а интроны генов некодирующих РНК (нкРНК) содержат больше гипометилированных CpG-сайтов (10.3% гипометилированных и 4.6% гиперметилированных; $p = 0.01$). Эти данные косвенно свидетельствуют в пользу активности нкРНК при формировании атеросклеротической бляшки аорты, что согласуется с результатами изучения роли этих регуляторных молекул в развитии атеросклероза сосудов различных бассейнов [22]. В атеросклеротических бляшках гиперметилированные ДМС чаще локализованы в CpG-островках (11.4% гиперметилированных, 5.7% гипометилированных; $p = 0.02$; табл. 1).

В клетках атеросклеротической бляшки аорты относительно нормальной ткани аорты (АБ/НА) выявлено 7189 CpG-сайтов с разницей в уровне метилирования $\Delta\beta$ от 0.01 до 0.6. К ДМС ($|\Delta\beta| \geq 0.2$) относятся 480 CpG-сайтов, из которых 234 гиперметилированы и 246 гипометилированы в атеросклеротических бляшках аорты. Локализация гипер- и гипометилированных CpG-сайтов в геноме клеток атеросклеротической бляшки не отличается от их распределения в нормальной ткани аорты (табл. 1).

Из всех ДМС, выявленных в настоящем исследовании, детально охарактеризованы CpG-сайты в генах, дифференциально метилированных в тканях грудной аорты при расслоении (*CMIP*, *RPH3AL*, *XRCC1*, *GATA5*, *EXD3*, *KCNC2*, *HIVEP3*, *ADCY9*) [13, 14] и в атеросклеротических бляшках коронарных (КА) и сонных (СА) артерий (*CDCP2*, *FOLR1*, *WT1*, *MGMT*, *GAS2*, *CAI*, *PRSSI6*, *ANK3*) [10, 23] (рис. 1, табл. 2). (Далее эти гены определены как общие).

Показано, что основная масса ДМС (АБ/АА и АБ/НА) в общих генах локализована в интронах (8 из 17 (47%)) и межгенных регионах (7 (41.2%)) и только четыре (23.5%) – в пределах CpG-островков (табл. 2). Девять (52.9%) ДМС располагаются непосредственно внутри регуляторных элементов (промотор, энхансер, инсультатор) или на расстоянии менее 1000 п.н. от них. Пятнадцать (88.2%) локализованы в сайтах связывания ТФ. Среди этих ТФ чаще всего встречаются факторы типа ZNF (белки, участвующие в регуляции транскрипции многих генов, в опосредуемой убиквитином деградации

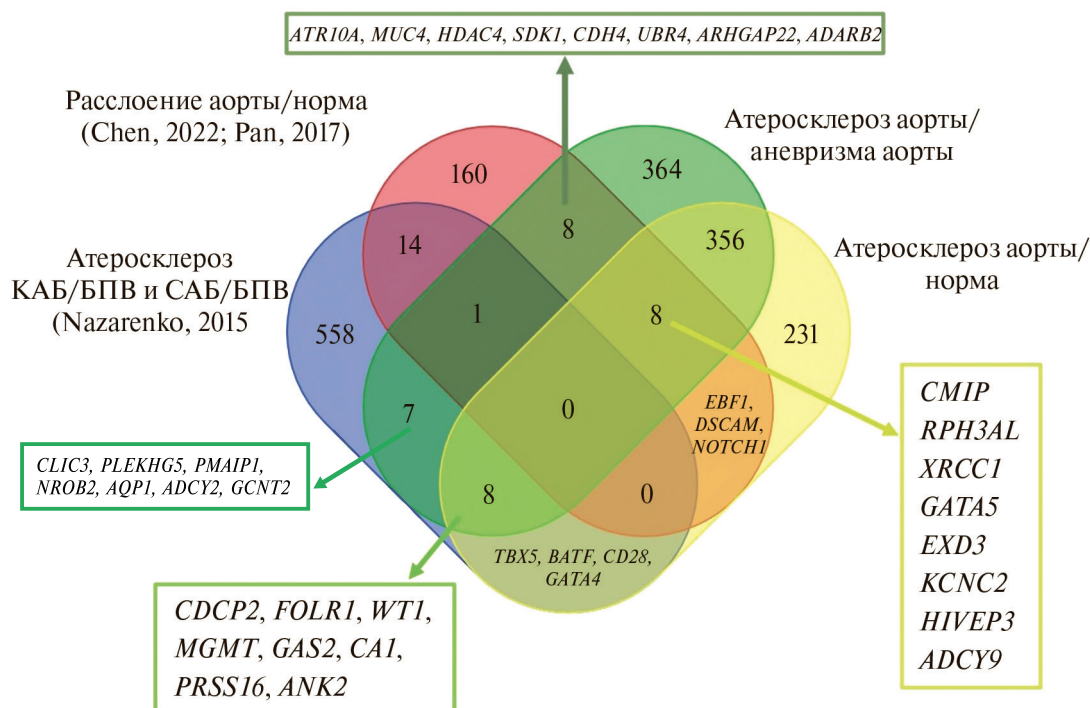


Рис. 1. Диаграмма Венна, показывающая общие ДМГ, выявленные в данной работе, при расслоении аорты относительно нормальной ткани аорты [13, 14], при атеросклерозе коронарных и сонных артерий относительно интактных сосудов [10, 23].

белков, передаче сигнала, репарации ДНК, миграции клеток) [24], из которых ZNF263 и ZFP148 являются репрессорами транскрипции и играют роль в формировании атеросклеротических поражений сонных артерий [25]. Кроме того, в патогенез атеросклероза различных артерий вовлечены такие ТФ, как PATZ1, NRF1, TCF12, EGR1 [25–28]; аневризмы аорты – ELK1, ETS1, KLF15 [29–31].

В атеросклеротической бляшке аорты 12 из 16 общих генов содержат CpG-сайты, гиперметилированные по сравнению с нормальной и дилатированной тканью аорты (табл. 2). Гипометилированные сайты локализованы в генах, белковые продукты которых вовлечены в репарацию ДНК (*XRCC1*), эмбриональное развитие (*CMIP*, *FOLR3/FOLR1*) и регуляцию экспрессии (*ANK3*) (табл. 2, табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/3/supp_Goncharova_rus.pdf).

CpG-сайты общих генов в сравниваемых исследованиях не перекрываются, поскольку метилирование ДНК в них определяли с помощью метилочипов Illumina [10, 13, 14]. В настоящем исследовании непосредственно в последовательности гена (восемь сайтов в интронах, один в экзоне) локализовано 50% ДМС. Значительная часть CpG-сайтов в атеросклеротических бляшках аорты находится в межгенных регионах общих генов (табл. 2), тогда как в атеросклеротических бляшках коронарных и сонных артерий ДМС генов *CDCP2*,

GAS2, *FOLR1*, *CA1*, *PRSS16* локализованы в 5'-нетранслируемой области (UTR), а *ANK3* – в промоторе [23, 32]. Вместе с тем в атеросклеротических бляшках аорты ДМС генов *CDCP2*, *FOLR1* и *CA1* локализованы на расстоянии менее 5000 п.н. от ДМС в атеросклеротических бляшках коронарных и сонных артерий, а ДМС гена *WT1* при атеросклерозе всех исследованных сосудов находятся в одном и том же интроне.

Сравнение направленности метилирования CpG-сайтов общих генов, выявленной в настоящем исследовании, с данными по метилированию в тканях грудной аорты при расслоении показало, что ДМС генов *RPH3AL*, *EXD3*, *HIVEP3*, *KCNC2* характеризуются однонаправленными изменениями и гиперметилированием как в клетках атеросклеротических бляшек восходящей аорты (табл. 2), так и в тканях аорты при остром расслоении [14]. ДМС генов *GATA5*, *XRCC1*, *CMIP*, *ADCY9* имеют разнонаправленный уровень метилирования: CpG-сайты генов *GATA5* и *ADCY9* гиперметилированы в атеросклеротической бляшке аорты (табл. 2) и гипометилированы при ее расслоении, а CpG-сайты генов *XRCC1*, *CMIP* гипометилированы в бляшке аорты (табл. 2), но гиперметилированы при ее расслоении [13, 14].

Анализ направленности метилирования CpG-сайтов общих генов при атеросклерозе аорты, коронарных и сонных артерий выявил однонаправленные изменения уровня метилирования CpG-сайтов в генах *WT1*, *CDCP2* и *GAS2*,

Таблица 2. Характеристика дифференциально метилированных CpG-сайтов, локализованных в области общих генов при расслоении аорты, атеросклерозе коронарных и сонных артерий*

Ген	CpG-сайт, локализация относительно генов (сборка GRCh38)	Промотор/ Энхансер	CpG-островок	Транскрипционный фактор	Средний уровень метилирования CpG-сайта (%) ± стандартное отклонение				Δβ	
					AB	AA	HA	AB/AA	AB/HA	
ДМГ общие в AB/AA, AB/HA* и при AA/HA**										
XRCC1	chr19:43558259, интронный	“Ниже” энхансера EN38E1956214 на 162 п.н.	Нет	Nrx2-1, ZNF135, ZNF263, ZNF460	75.1 ± 3.2	96.6 ± 2.4	95.5 ± 5.2	−0.22	−0.20	
	chr16:81668445, интронный	Энхансер EN38E1831623	Нет	ELF3, Iktf3	63.2 ± 6.2	88.9 ± 4.4	93.0 ± 4.4	−0.26	−0.30	
	chr17:365276, межгенный	“Ниже” энхансера EN38E1838974 на 454 п.н	Нет	ZNF93	39.1 ± 3.8	1.6 ± 2.7	1.3 ± 2.3	0.38	0.38	
EXD3	chr9:137417745, интронный	Энхансер EN38E2737961	chr9:137416443–137418005	TFAP2B, TFAP2E	24.4 ± 5.6	1.9 ± 2.8	0.7 ± 1.6	0.23	0.24	
HIVEP3	chr1:41516477, интронный	“Ниже” EN38E1341057 на 43 п.н.; “выше” EN38E1341058 на 308 п.н.	“Ниже” chr1:41516118–41516372 на 105 п.н.	PRDM9	29.2 ± 4.7	1.0 ± 1.1	6.2 ± 5.6	0.28	0.23	
ATXN7L3B; KCNC2	chr12:74666990, межгенный	“Ниже” EN38E1624895 на 929 п.н	Нет	ZNF530, Zfx	23.6 ± 3.6	2.9 ± 4.1	1.8 ± 2.5	0.21	0.22	
GAT45	chr20:62476553 “выше” гена	“Выше” промотора EN38E2128120 на 277 п.н.; “выше” энхансера EN38E2128121 на 33 п.н.	chr20:62474274–62476841	—	37.5 ± 12.5	7.2 ± 4.7	4.9 ± 3.2	0.30	0.33	
ADCY9	chr16:4114079, экзонный	Энхансер EN38E1798054	Нет	ZNF454	24.1 ± 5.9	0.7 ± 1.5	1.8 ± 3.6	0.23	0.22	
ДМГ, общие в AB/AA, AB/HA** и при атеросклерозе КАБ/БПВ и САБ/БПВ***										
CDCP2; CYB5RL	chr1:54155575, межгенный	Нет	Нет	PATZ1, ZNF135, ZNF148, ZNF460, MAZ, SP5	21.8 ± 8.2	0	0	0.22	0.22	
FOLR3; FOLR1	chr11:72185020, межгенный	Нет	Нет	HIC2	49.8 ± 19.2	75.0 ± 12.5	73.7 ± 11.4	−0.25	−0.24	
IT1	chr11:32430820, интрон	Промотор	chr11:32430599–32431162	Nrfl, TCF12, ZNF610	28.2 ± 5.1	5.1 ± 2.9	3.9 ± 3.7	0.23	0.24	
LINC02667; MGMT	chr10:128961129, межгенный	“Ниже” инсулятора EN38E1510564 на 112 п.н.	Нет	FEV, ELK1, ETS1, FL1, ETV4, ETV2, ETV5, ETV7	27.7 ± 2.7	2.2 ± 3.4	4.5 ± 5.3	0.26	0.23	
GAS2	chr11:22713003, интронный	Нет	Нет	ZBTB6	21.9 ± 23.1	1.2 ± 2.8	1.4 ± 2.8	0.21	0.21	
MIR3143; PRSS16	chr6:27225866, межгенный	Нет	Нет	Zfx, TFAP2A, EGR1, EGR3, CTCFL, PATZ1, KLF15, KLF16, ZNF281	21.9 ± 5.3	1.2 ± 2.7	0	0.21	0.22	
ANK3	chr10:60634817, интронный	Нет	Нет	TP73	71.4 ± 2.2	97.3 ± 2.7	98.9 ± 2.1	−0.26	−0.28	
CA1	chr8:85376555, интронный	Нет	Нет	ZNF460, ZNF135, ZNF148, MAZ, PATZ1, SP2, NKX2-1	24.3 ± 0.5	2.0 ± 3.3	0	0.22	0.24	

*Настоящее исследование.

**Данные [13, 14].

***Данные [10, 23].

Примечание. AB – атеросклеротическая бляшка аорты; AA – аневризма аорты; HA – нормальная ткань аорты; КАБ – атеросклеротические бляшки коронарных артерий; САБ – атеросклеротические бляшки сонных артерий; БПВ – большие подкожные вены нижних конечностей; Δβ – разница между средним уровнем метилирования CpG-сайта в сравниваемых группах.

гиперметилированных в атеросклеротических бляшках этих сосудов, а *MGMT* и *PRSS16* – в атеросклеротических бляшках сонных артерий и аорты (табл. 2) [23]. Выявлено разнонаправленное метилирование CpG-сайтов генов *ANK3*, *FOLR1* и *CA1* в бляшках аорты и коронарных/сонных артерий, где *ANK3*, *FOLR1* гиперметилированы в бляшках сонных артерий и гипометилированы в атеросклеротических бляшках аорты, а *CA1* гипометилирован в атеросклеротических бляшках сонных артерий и гиперметилирован в бляшках аорты (табл. 2) [10, 23].

Анализ сетей белковых продуктов, кодируемых общими генами, в браузере STRING показал, что они не объединяются одной функциональной сетью. Аннотация биологических процессов и молекулярных функций в браузере UniProt показала, что белки, кодируемые генами *RPH3AL*, *EXD3*, *HIVEP3*, *KCNC2*, *CA1*, вовлечены в связывание или трансмембранный транспорт ионов металлов (GO:0046872; GO:0071805; GO:0008270; табл. S1, см. Дополнительные материалы).

Известно, что метаболизм ионов металлов, в том числе калия и кальция, обеспечивает функционирование кальций-активируемых калиевых каналов, являющихся компонентом проводящей системы миокарда, нарушение которой приводит к развитию аритмии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности и инфаркта миокарда [33]. При атеросклерозе грудной и брюшной аорты содержание ионов различных металлов, в том числе кальция и цинка, коррелирует со стадией атеросклеротического поражения сосуда [34]. Однако можно отметить, что в число общих ДМГ входят гены, белковые продукты которых вовлечены в регуляцию экспрессии генов (*GATA5*, *HIVEP3*, *WT1*, *ANK3*), в эмбриональное развитие (*CMIP*, *ADCY9*, *FOLR1*) и репарацию ДНК (*XRCC1*, *MGMT*).

Проведенный в браузере Metascape анализ обогащения метаболических путей и биологических процессов, в которые вовлечены белковые продукты ДМГ, показал, что основными процессами, в которых участвуют белковые продукты общих генов, являются развитие мезенхимы (GO:0060485, *FOLR1*, *WT1*, *GATA5*, *HIVEP3*, *KCNC2*) и регуляция метаболизма ДНК (GO:0051054, *MGMT*, *WT1*, *XRCC1*).

Как показано в ассоциативных и экспериментальных исследованиях, мутации, структурные полиморфизмы, изменение функциональной активности большинства общих генов или уровня кодируемых ими белков ассоциированы с развитием аневризмы аорты или ИБС. В частности, патогенные варианты в гене *GATA5* приводят к наследственному формам аневризмы грудной аорты [35]. Полиморфизм генов *XRCC1* и *CDCP2* ассоциирован с риском развития ИБС [36, 37].

Однонуклеотидные варианты (SNP) в генах *KCNC2* и *HIVEP3* связаны с уровнем артериального давления [38, 39], в генах *ADCY9* и *CMIP* – с уровнем и функционированием липопротеинов высокой плотности [40, 41], в гене *RPH3AL* – с уровнем триглицеридов, циркулирующих в сыворотке крови [42].

Изменение уровня белков *Wt1* и *Gas2* обнаружено в коронарных артериях или кардиомиоцитах экспериментальных животных при инфаркте миокарда [43–45]. Экспрессия гена *CA1* в клетках цельной крови изменяется при остром коронарном синдроме [46]. В доступной нам научной литературе отсутствуют данные о связи гена *ANK3* с развитием сердечно-сосудистых заболеваний. Однако анкирины являются важнейшими компонентами ионных каналов и сигнальных комплекс-транспортеров в сердечно-сосудистой системе [47], а *ANK3* и *LAMA2* маркируют один из двух различных фенотипов ГМК сонных артерий при атеросклерозе [48].

Вместе с тем ни один из генов, определенных ранее как ключевые ДМГ при расслоении аорты [12–14], а также как наиболее частые при различных сердечно-сосудистых заболеваниях [11], не входит в число ДМГ в изученных в настоящем исследовании участках аорты при аневризме. Причиной низкой воспроизводимости результатов различных исследований могут быть различия клеточного состава использованных участков сосудов, гетерогенность, обусловленная этнотерриториальными особенностями (стиль питания, распределение частот SNP-маркеров, воздействие внешнесредовых факторов), влияющими на метилирование ДНК, а также применение разных методов и технических платформ. Кроме того, в разных исследованиях, привлеченных нами к проведению сравнительного анализа, показано дифференциальное метилирование разных CpG-сайтов в одних и тех же генах, поэтому в настоящий момент не представляется возможным провести корректный сравнительный анализ, оценить характер и выявить особенности метилирования гена при различных патологических фенотипах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при аневризме аорты выявлено сходство профиля метилирования ДНК в дилатированной и нормальной тканях аорты, за исключением CpG-сайтов гена *NR2F1-AS1*. В клетках атеросклеротической бляшки аорты по сравнению с ее дилатированной и нормальной областями большее число гиперметилированных CpG-сайтов обнаружено в экзонах генов и CpG-островках, а большее число гипометилированных – в интронах генов нкРНК.

В атеросклеротической бляшке, в дилатированной и нормальной тканях аорты 52.9% ДМС располагаются непосредственно внутри регуляторных элементов (промотор, энхансер, инсультатор) или на расстоянии менее 1000 п.н. от них, а 88.2% локализованы в сайтах связывания ТФ, в том числе в ZNF263 и ZFP148 PATZ1, NRF1, TCF12, EGR1, вовлеченных в патогенез атеросклероза различных артерий, а ELK1, ETS1, KLF15 — аневризмы аорты.

Сравнительный анализ спектра ДМГ в атеросклеротических бляшках аорты и тканях аорты при ее аневризме/расслоении, а также в атеросклеротических бляшках коронарных и сонных артерий выявил общие гены (*CMIP, RPH3AL, XRCC1, GATA5, EXD3, KCNC2, HIVEP3, ADCY9, CDCP2, FOLR1, WT1, MGMT, GAS2, CA1, PRSS16, ANK3*), вовлеченные в развитие как расслоения аорты, так и атеросклероза сосудов различных бассейнов. Показано преимущественное гиперметилование ДМС общих генов в атеросклеротической бляшке по сравнению с дилатированными и нормальными участками аорты. Эти ДМС локализируются в интронах и межгенных регионах вблизи регуляторных элементов или в сайтах связывания ТФ. Белки, кодируемые общими генами, участвуют в широком спектре биологических процессов, в том числе в развитии мезенхимы (*GO:0060485, FOLR1, WT1, GATA5, HIVEP3, KCNC2*) и регуляции метаболизма ДНК (*GO:0051054, MGMT, WT1, XRCC1*).

Ограничением нашего исследования является невозможность введения поправки на клеточный состав в связи с низким и неоднородным покрытием участков генома, специфичных для типа клеток, которое наблюдается при анализе метилирования с помощью RRBS, что затрудняет использование классических алгоритмов деконволюции, построенных на основании данных метилоципов.

Вместе с тем следует отметить, что это первое исследование, в котором определен профиль метилирования ДНК у пациентов со спорадической формой аневризмы восходящего отдела грудной аорты — в трех ее участках с разной степенью поражения — в непораженном сосудае, дилатированной области и в атеросклеротической бляшке.

Работа получила финансовую поддержку Российского научного фонда (грант № 22-25-00701).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех участников получено информированное письменное согласие на обследование. Исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального

исследовательского медицинского центра Российской академии наук (Регистрационный номер 191, протокол № 13 от 15.11.2021 г.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kim H.Y., Kim C.J., Rho T.H., Youn H.J., Jin S.W., Rhim H.Y., Park J.W., Jeon H.K., Chae J.S., Kim J.H., Hong S.J., Choi K.B. (1999) Transesophageal echocardiographic detection of thoracic aortic plaque could noninvasively predict significant obstructive coronary artery disease. *Korean J. Intern. Med.* **14**(2), 20–26.
- Hung A., Zafar M., Mukherjee S., Tranquilli M., Scoutt L.M., Elefteriades J.A. (2012) Carotid intima-media thickness provides evidence that ascending aortic aneurysm protects against systemic atherosclerosis. *Cardiology.* **123**(2), 71–77.
- Achneck H., Modi B., Shaw C., Rizzo J., Albornoz G., Fusco D., Elefteriades J. (2005) Ascending thoracic aneurysms are associated with decreased systemic atherosclerosis. *Chest.* **128**(3), 1580–1586.
- Curtis A., Smith T., Ziganshin B.A., Elefteriades J.A. (2015) Ascending Aortic Proaneurysmal Genetic Mutations with Antiatherogenic Effects. *Int. J. Angiol.* **24**(3), 189–197.
- Prakash S.K., LeMaire S.A., Guo D.C., Russell L., Regalado E.S., Golabbakhsh H., Johnson R.J., Safi H.J., Estrella A.L., Coselli J.S., Bray M.S., Leal S.M., Milewicz D.M., Belmont J.W. (2010) Rare copy number variants disrupt genes regulating vascular smooth muscle cell adhesion and contractility in sporadic thoracic aortic aneurysms and dissections. *Am. J. Hum. Genet.* **87**(6), 743–756.
- Слепцов А.А., Назаренко М.С., Лебедев И.Н., Скрябин Н.А., Фролов А.В., Попов В.А., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. (2014) Соматическая вариативность генома в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови при атеросклерозе. *Генетика.* **50**(8), 986–995.
- Prakash S., Kuang S.Q., GenTAC Registry Investigators, Regalado E., Guo D., Milewicz D. (2016) Recurrent rare genomic copy number variants and bicuspid aortic valve are enriched in early onset thoracic aortic aneurysms and dissections. *PLoS One.* **11**(4), e0153543.
- Overwater E., Marsili L., Baars M.J.H., Baas A.F., van de Beek I., Duffer E., van Hagen J.M., Hilhorst-Hofstee Y., Kempers M., Krapels I.P., Menke L.A., Verhagen J.M.A., Yeung K.K., Zwijsenburg P.J.G., Groenink M., van Rijn P., Weiss M.M., Voorhoeve E., van Tintelen J.P., Houweling A.C., Maugeri A. (2018) Results of next-generation sequencing gene panel diagnostics including copy-number variation analysis in 810 patients suspected of heritable thoracic aortic disorders. *Hum. Mutat.* **39**(9), 1173–1192.
- Ostberg N.P., Zafar M.A., Ziganshin B.A., Elefteriades J.A. (2020) The genetics of thoracic aortic aneurysms and dissection: a clinical perspective. *Biomolecules.* **10**(2), 182.
- 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. (2015) A comparison of genome-wide DNA methylation patterns between different vascular tissues from patients with coronary heart disease. *PLoS One.* **10**(4), e0122601.

11. Krolevets M., Cate V.T., Prochaska J.H., Schulz A., Rapp S., Tenzer S., Andrade-Navarro M.A., Horvath S., Niehrs C., Wild P.S. (2023) DNA methylation and cardiovascular disease in humans: a systematic review and database of known CpG methylation sites. *Clin. Epigenet.* **15**(1), 56.
12. Shah A.A., Gregory S.G., Krupp D., Feng S., Dorogi A., Haynes C., Grass E., Lin S.S., Hauser E.R., Kraus W.E., Shah S.H., Hughes G.C. (2015) Epigenetic profiling identifies novel genes for ascending aortic aneurysm formation with bicuspid aortic valves. *Heart Surg. Forum.* **18**(4), E134–E139.
13. Pan S., Lai H., Shen Y., Breeze C., Beck S., Hong T., Wang C., Teschendorff A.E. (2017) DNA methylome analysis reveals distinct epigenetic patterns of ascending aortic dissection and bicuspid aortic valve. *Cardiovasc. Res.* **113**(6), 692–704.
14. Chen Y., Xu X., Chen Z., Huang B., Wang X., Fan X. (2022) DNA methylation alternation in Stanford-A acute aortic dissection. *BMC Cardiovasc. Disord.* **22**(1), 455.
15. Björck H.M., Du L., Pulignani S., Paloschi V., Lundströmer K., Kostina A.S., Österholm C., Malashicheva A., Kostareva A., Evangelista A., Teixidó-Tura G., Maleki S., Franco-Cereceda A., Eriksson P.; Mechanistic interrogation of bicuspid aortic valve associated aortopathy (MIBAVA) Leducq Consortium. (2018) Altered DNA methylation indicates an oscillatory flow mediated epithelial-to-mesenchymal transition signature in ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve. *Sci. Rep.* **8**(1), 2777.
16. Liu P., Zhang J., Du D., Zhang D., Jin Z., Qiu W., Zhou X., Dong S., Zhou M., Zhao H., Zhang W., Ma J., Sun S., Fu W., Liu Y., Wang L. (2021) Altered DNA methylation pattern reveals epigenetic regulation of *Hox* genes in thoracic aortic dissection and serves as a biomarker in disease diagnosis. *Clin. Epigenet.* **13**(1), 124.
17. Maredia A., Guzzardi D., Aleinati M., Iqbal F., Khaira A., Madhu A., Wang X., Barker A.J., McCarthy P.M., Fedak P.W.M., Greenway S.C. (2021) Aorta-specific DNA methylation patterns in cell-free DNA from patients with bicuspid aortic valve-associated aortopathy. *Clin. Epigenet.* **13**(1), 147.
18. Zhang H., Liu B., Shi X., Sun X. (2021) Long noncoding RNAs: potential therapeutic targets in cardiocerebrovascular diseases. *Pharmacol. Ther.* **221**, 107744.
19. Sun J., Chen G., Jing Y., He X., Dong J., Zheng J., Zou M., Li H., Wang S., Sun Y., Liao W., Liao Y., Feng L., Bin J. (2018) LncRNA expression profile of human thoracic aortic dissection by high-throughput sequencing. *Cell Physiol. Biochem.* **46**(3), 1027–1041.
20. Lim Y.H., Ryu J., Kook H., Kim Y.K. (2020) Identification of long noncoding RNAs involved in differentiation and survival of vascular smooth muscle cells. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **22**, 209–221.
21. Du L., Li X., Gao Q., Yuan P., Sun Y., Chen Y., Huang B., Deng Y., Wang B. (2022) LncRNA nuclear receptor subfamily 2 group F member 1 antisense RNA 1 (NR2F1-AS1) aggravates nucleus pulposus cell apoptosis and extracellular matrix degradation. *Bioengineered.* **13**(2), 2746–2762.
22. Fasolo F., Di Gregoli K., Maegdefessel L., Johnson J.L. (2019). Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis. *Cardiovascular Res.* **115**(12), 1732–1756.
23. Назаренко М.С., Марков А.В., Королева Ю.А., Слепцов А.А., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. (2021) Идентификация дифференциально метилированных генов, потенциально связанных с атеросклерозом у человека. *Росс. кардиологический журнал.* **10**, 42–48.
<https://doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-42-48>
24. Cassandri M., Smirnov A., Novelli F., Pitolli C., Agostini M., Malewicz M., Melino G., Raschellà G. (2017) Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov.* **3**, 17071.
25. Dhaouadi N., Li J.Y., Feugier P., Gustin M.P., Dab H., Kacem K., Bricca G., Cerutti C. (2014) Computational identification of potential transcriptional regulators of TGF- β 1 in human atherosclerotic arteries. *Genomics.* **103**(5–6), 357–370.
26. Albrecht C., Preusch M.R., Hofmann G., Morris-Rosenfeld S., Blessing E., Rosenfeld M.E., Katus H.A., Bea F. (2010) Egr-1 deficiency in bone marrow-derived cells reduces atherosclerotic lesion formation in a hyperlipidaemic mouse model. *Cardiovasc. Res.* **86**(2), 321–329.
27. Karunakaran D., Thrush A.B., Nguyen M.A., Richards L., Geoffrion M., Singaravelu R., Ramphos E., Shangari P., Ouimet M., Pezacki J.P., Moore K.J., Perisic L., Maegdefessel L., Hedin U., Harper M.E., Rayner K.J. (2015) Macrophage mitochondrial energy status regulates cholesterol efflux and is enhanced by anti-mir33 in atherosclerosis. *Circ. Res.* **117**(3), 266–278.
28. Nurnberg S.T., Cheng K., Raiesdana A., Kundu R., Miller C.L., Kim J.B., Arora K., Carcamo-Oribe I., Xiong Y., Tellakula N., Nanda V., Murthy N., Boisvert W.A., Hedin U., Perisic L., Aldi S., Maegdefessel L., Pjanic M., Owens G.K., Tallquist M.D., Quertermous T. (2015) Coronary artery disease associated transcription factor TCF21 regulates smooth muscle precursor cells that contribute to the fibrous cap. *PLoS Genet.* **11**(5), e1005155.
29. Haldar S.M., Lu Y., Jeyaraj D., Kawanami D., Cui Y., Eapen S.J., Hao C., Li Y., Doughman Y.Q., Watanabe M., Shimizu K., Kuivaniemi H., Sadoshima J., Margulies K.B., Cappola T.P., Jain M.K. (2010) Klf15 deficiency is a molecular link between heart failure and aortic aneurysm formation. *Sci. Transl. Med.* **2**(26), 26ra26.
30. Branchetti E., Poggio P., Sainger R., Shang E., Grau J.B., Jackson B.M., Lai E.K., Parmacek M.S., Gorman R.C., Gorman J.H., Bavaria J.E., Ferrari G. (2013) Oxidative stress modulates vascular smooth muscle cell phenotype via CTGF in thoracic aortic aneurysm. *Cardiovasc. Res.* **100**(2), 316–324.
31. Freiholtz D., Bergman O., Pradhananga S., Lång K., Poujade F.A., Granath C., Olsson C., Franco-Cereceda A., Sahlén P., Eriksson P., Björck H.M. (2023) SPP1/osteopontin: a driver of fibrosis and inflammation in degenerative ascending aortic aneurysm? *J. Mol. Med. (Berl)*. **101**(10), 1323–1333.
32. Nassar L.R., Barber G.P., Benet-Pagès A., Casper J., Clawson H., Diekhans M., Fischer C., Gonzalez J.N., Hinrichs A.S., Lee B.T., Lee C.M., Muthuraman P., Nguy B., Pereira T., Nejad P., Perez G., Raney B.J., Schmelter D., Speir M.L., Wick B.D., Kent W.J. (2023) The UCSC Genome Browser database: 2023 update. *Nucl. Acids Res.* **51**(D1), D1188–D1195.
33. Weisbrod D. (2020) Small and intermediate calcium activated potassium channels in the heart: role and strategies in the treatment of cardiovascular diseases. *Front. Physiol.* **11**, 590534.

34. Kuzan A., Wujczyk M., Wiglusz R.J. (2021) The study of the aorta metallomics in the context of atherosclerosis. *Biomolecules*. **11**(7), 946.
35. Renard M., Francis C., Ghosh R., Scott A.F., Witmer P.D., Adès L.C., Andelfinger G.U., Arnaud P., Boileau C., Callewaert B.L., Guo D., Hanna N., Lindsay M.E., Morisaki H., Morisaki T., Pachter N., Robert L., Van Laer L., Dietz H.C., Loeys B.L., Milewicz D.M., De Backer J. (2018) Clinical validity of genes for heritable thoracic aortic aneurysm and dissection. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**(6), 605–615.
36. Wild P.S., Zeller T., Schillert A., Szymczak S., Sinning C.R., Deiseroth A., Schnabel R.B., Lubos E., Keller T., Eleftheriadis M.S., Bickel C., Rupprecht H.J., Wilde S., Rossmann H., Diemert P., Cupples L.A., Perret C., Erdmann J., Stark K., Kleber M.E., Blankenberg S. (2011) A genome-wide association study identifies LIPA as a susceptibility gene for coronary artery disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **4**(4), 403–412.
37. Hoseini S.M., Bijanzadeh M., Seyedian S.M. (2021) A DNA repair pathway polymorphism (rs25487) and angiographically proven coronary artery patients in a population of Southern Iran. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **19**(1), 76–82.
38. Ehret G.B., Ferreira T., Chasman D.I., Jackson A.U., Schmidt E.M., Johnson T., Thorleifsson G., Luan J., Donnelly L.A., Kanoni S., Petersen A.K., Pihur V., Strawbridge R.J., Shungin D., Hughes M.F., Meirelles O., Kaakinen M., Bouatia-Naji N., Kristiansson K., Shah S., Munroe P.B. (2016) The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342415 individuals. *Nat. Genet.* **48**(10), 1171–1184.
39. Aragane Y., Higashino T., Kinoshita K., Ashenagar M.S., Higashino H. (2022) Hypertension-associated genes in the mesenteric artery of three spontaneously hypertensive rat substrains identified using a DNA array method. *Front. Biosci.* **27**(6), 191.
40. Niesor E.J., Benghozi R., Amouyel P., Ferdinand K.C., Schwartz G.G. (2015) Adenylyl cyclase 9 polymorphisms reveal potential link to HDL function and cardiovascular events in multiple pathologies: potential implications in sickle cell disease. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **29**(6), 563–572.
41. Sayols-Baixeras S., Hernáez A., Subirana I., Lluís-Ganel·la C., Muñoz D., Fitó M., Marrugat J., Elosua R. (2017) DNA methylation and high-density lipoprotein functionality – brief report: The REGICOR Study (Registre Gironi del Cor). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**(3), 567–569.
42. Rönn T., Perfilyev A., Jönsson J., Eriksson K.F., Jørgensen S.W., Brøns C., Gillberg L., Vaag A., Stener-Victorin E., Ling C. (2023) Circulating triglycerides are associated with human adipose tissue DNA methylation of genes linked to metabolic disease. *Hum. Mol. Genet.* **32**(11), 1875–1887.
43. Wagner K.D., Wagner N., Bondke A., Nafz B., Flemming B., Theres H., Scholz H. (2002) The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J.* **16**(9), 1117–1119.
44. Fittipaldi S., Vasuri F., Degiovanni A., Pini R., Mauro R., Faggioli G., D'Errico-Grigioni A., Stella A., Pasquinelli G. (2014) Nestin and WT1 expression in atheromatous plaque neovessels: association with vulnerability. *Histol. Histo-pathol.* **29**(12), 1565–1573.
45. Cruz-Topete D., Oakley R.H., Cidlowski J.A. (2020) Glucocorticoid signaling and the aging heart. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, 347.
46. Silbiger V.N., Luchessi A.D., Hirata R.D., Lima-Neto L.G., Cavichioli D., Carracedo A., Brión M., Dopazo J., García-García F., dos Santos E.S., Ramos R.F., Sampaio M.F., Armaganjian D., Sousa A.G., Hirata M.H. (2013) Novel genes detected by transcriptional profiling from whole-blood cells in patients with early onset of acute coronary syndrome. *Clin. Chim. Acta.* **421**, 184–190.
47. Hashemi S.M., Hund T.J., Mohler P.J. (2009) Cardiac ankyrins in health and disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* **47**(2), 203–209.
48. Chou E.L., Lino Cardenas C.L., Chaffin M., Arduini A.D., Juric D., Stone J.R., LaMuraglia G.M., Eagleton M.J., Conrad M.F., Isselbacher E.M., Ellinor P.T., Lindsay M.E. (2021) Vascular smooth muscle cell phenotype switching in carotid atherosclerosis. *JVS Vasc. Sci.* **3**, 41–47.

DNA METHYLATION PROFILE IN COMORBIDITY OF ANEURYSM AND ATHEROSCLEROSIS OF THE ASCENDING AORTA

I. A. Goncharova^{1,*}, A. A. Zarubin¹, S. A. Shipulina¹, Iu. A. Koroleva¹,
D. S. Panfilov², B. N. Kozlov², M. S. Nazarenko¹

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

²Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634012 Russia

*e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

This study presents the results of DNA methylation analysis in different regions of the ascending aorta (dilated, non-dilated area, atherosclerotic plaque) in patients with aortic aneurysm. DNA methylation was analyzed by reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). Differences in methylation levels between dilated and normal aortic tissues were detected for two CpG sites of the *NR2F1-AS1* gene ($|\Delta\beta| \geq 0.2$ and $FDR < 0.05$). Between atherosclerotic plaque samples and dilated/normal aortic tissues, 586/480 differentially methylated CpG sites (DMSs) were identified, among which 323/234 were hypermethylated and 263/246 were hypomethylated in atherosclerotic plaques. DMSs were located mainly in introns and intergenic regions, 88.2% in the binding sites of TFs, among which ZNF263, ZFP148, PATZ1, NRF1, TCF12, EGR1 play a role in the pathogenesis of atherosclerosis of various arteries, and ELK1, ETS1, KLF15 play a role in aortic aneurysms. Sixteen DMSs are located in the region of genes (*CMIP*, *RPH3AL*, *XRCC1*, *GATA5*, *EXD3*, *KCNC2*, *HIVEP3*, *ADCY9*, *CDCP2*, *FOLR1*, *WT1*, *MGMT*, *GAS2*, *CA1*, *PRSS16*, *ANK3*) whose protein products are involved in the development of both aortic dissection and atherosclerosis in different arterial circulation regions. The protein products of these genes are involved in a wide range of biological processes, including mesenchyme development (GO:0060485, *FOLR1*, *WT1*, *GATA5*, *HIVEP3*, *KCNC2*) and positive regulation of DNA metabolic process (GO:0051054, *MGMT*, *WT1*, *XRCC1*).

Keywords: aortic aneurysm, atherosclerosis, DNA methylation, RRBS