



ШИПУЛИНА СОФЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ И ПРОФИЛЬ
МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ АНЕВРИЗМЕ ВОСХОДЯЩЕЙ
АОРТЫ И ЕЕ КОМОРБИДНОСТИ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ**

1.5.7 Генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», в Научно-исследовательском институте медицинской генетики, г. Томск.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Назаренко Мария Сергеевна

Официальные оппоненты:

Заклязьминская Елена Валерьевна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», научно-клинический центр №1, лаборатория медицинской генетики, заведующий (г. Москва).

Шахтшнейдер Елена Владимировна, доктор медицинских наук, филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины, лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, ведущий научный сотрудник (г. Новосибирск).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург).

Защита состоится «__» _____ 202__ года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу: г. Томск, Московский тракт, д. 3, Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <https://www.tnimc.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 202__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук



Назаренко Мария Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Аневризма восходящей аорты (АВА) и атеросклероз сосудов различной локализации имеют высокую медико-социальную значимость, поскольку являются относительно частыми патологическими состояниями, длительное время протекающими бессимптомно, что приводит к жизнеугрожающим и инвалидизирующим осложнениям [Rajbanshi B.G. et al., 2015; Wu L., 2018; Salameh M.J. et al., 2018]. Понимание общих механизмов развития данных заболеваний позволит разработать новые эффективные подходы к лечению и предикции их осложненного течения – острых сосудистых катастроф.

В единичных исследованиях высказано предположение о протективном эффекте АВА в отношении риска развития атеросклероза через оценку его ранних и поздних эндофенотипов (отношения толщины комплекса интимы-медии сонных артерий и степени кальцификации артерий различной локализации), а также более редкую регистрацию ишемической болезни сердца (ИБС) и инфаркта миокарда (ИМ) [Chau K.H. et al., 2014; Curtis A. et al., 2015; Waldron C. et al., 2023]. В то же время, есть работы и с противоположными результатами, где показано, что АВА, напротив, часто сочетается с атеросклерозом [Albini P.T. et al., 2013; Leone O. et al., 2020; Stejskal V. et al., 2022; Doppler C. et al., 2023; Stejskal V. et al., 2023; Huhta A. et al., 2025].

Аневризма восходящей аорты и атеросклероз имеют существенную генетическую составляющую, включающую как редкие патогенные варианты, являющиеся причинными для развития семейных или моногенных форм АВА, так и частые варианты с малым эффектом, которые повышают риск развития заболевания в течение жизни [LeMaire S.A. et al., 2011; Do R. et al., 2015; McPherson R., Tybjaerg-Hansen A., 2016; Guo D. et al., 2016; Renard M. et al., 2018; Caspar S.M. et al., 2019; Pinard A. et al., 2019; Koyama S. et al., 2020; Tcheandjieu C. et al., 2020; Ashvetiya T. et al., 2021; Dang T.A. et al., 2021; Roychowdhury T. et al., 2021; Waldron C. et al., 2024].

Эпигенетические факторы также могут вносить вклад в коморбидные отношения АВА и атеросклероза. В работах разных коллективов исследователей характеризуется метилирование ДНК при АВА [Shah A.A. et al., 2015; Pan S. et al., 2017; Liu P. et al., 2021; Maredia A. et al., 2021; Chen Y. et al., 2022], коронарных артерий у пациентов с ИБС [Nazarenko M. et al., 2015], атеросклеротически измененных сонных артерий и аорты [Zaina S. et al., 2014, 2015]. В то же время в доступных источниках не обнаружено исследований, в которых рассматривается метилирование в аорте при аневризме восходящей части и ее коморбидности с атеросклерозом.

Однако неясными остаются некоторые вопросы. Какие есть особенности частоты и спектра коморбидных заболеваний, в том числе связанных с атеросклерозом сосудов различной локализации у пациентов с АВА? Изменяется ли морфология восходящей аорты в разных отделах в случае ее атеросклеротического поражения у пациентов с АВА? И, наконец, какие генетические и эпигенетические факторы обеспечивают коморбидные отношения АВА и атеросклероза?

Степень научной разработанности темы исследования

Исследования генетических и эпигенетических основ развития многофакторных заболеваний, проводимые в рамках сформулированной академиком РАН, профессором В.П. Пузыревым концепции коморбидных синтропных и дистропных патологий [Пузырев В.П., Фрейдин М.Б., 2009; Пузырев В.П., 2015], относятся к числу актуальных и активно развиваемых направлений в области медицинской и клинической генетики [Брагина Е.Ю., Пузырев В.П., 2023].

В России проведены единичные исследования, посвященные характеристике частоты и спектра генетических вариантов, связанных с синдромальными и несиндромальными АВА [Семякина А.Н. и др., 2015; Жуков В.А. и др., 2016; Иртюга О.Б. и др., 2018; Гаврилюк Н.Д., 2021]. Молекулярно-генетические аспекты патогенеза АВА являются предметом изучения коллектива ученых из ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России [Костина А.С. и др., 2020; Irtuga O.B. et al., 2022; Успенский В.Е. и др., 2023; Пугина М.Ю. и др., 2023; Хованцева У.С. и др., 2024].

В настоящее время разработаны алгоритмы ведения пациентов с АВА, включающие тестирование по определенным панелям генов [De Backer J. et al., 2020; Milewicz D. et al., 2021; Isselbacher E.M. et al., 2022], однако данный подход направлен на выявление редких клинически значимых генетических вариантов и используется для пациентов из групп с максимальным риском развития АВА (синдромальные, семейные формы) [Odofin X. et al., 2021]. В свою очередь, спорадические формы АВА могут быть связаны как с редкими, так и с распространенными вариантами в генах, обеспечивающих жизнедеятельность ГМК и поддержание структуры внеклеточного матрикса. Кроме того, возможно возникновение мутаций *de novo* и в других генах, для которых связь с патологией менее очевидна. Однако работы, в которых выполнено молекулярно-генетическое обследование пациентов с несиндромальными АВА с использованием секвенирования экзома/клинического экзома, немногочисленны [Schubert J.A. et al., 2016; Elbitar S. et al., 2021; Butnariu L.I. et al., 2024].

Число публикаций, связанных с анализом метилирования ДНК при развитии АВА, также невелико – всего в доступной литературе обнаружено четыре исследования метилирования ДНК при спорадических АВА [Shah A.A. et al., 2015; Pan S. et al., 2017; Björck H.M. et al., 2018; Liu P. et al., 2021].

Противоречивость суждений о феномене коморбидности АВА и атеросклероза указывает на актуальность поиска общих и специфичных генетических и эпигенетических факторов, определяющих природу взаимоотношений между данными патологиями (синтропность или дистропность), что важно для понимания их патогенеза и разработки профилактических и лечебных мероприятий.

Цель исследования: идентификация генетических вариантов и паттернов метилирования ДНК в клетках аорты у пациентов с несиндромальной формой аневризмы восходящей части с учетом ее коморбидности с атеросклерозом сосудов различной локализации.

Задачи исследования:

1. Оценить частоту коморбидности аневризмы восходящей аорты с атеросклерозом аорты, коронарных и сонных артерий с помощью клинического и параклинического обследования.

2. Проанализировать морфологические особенности строения аортальной стенки в синотубулярном соединении, области аорты на уровне бифуркации легочного ствола и проксимальной части дуги аорты при ее аневризме с учетом коморбидности с атеросклерозом аорты.

3. Провести поиск клинически и функционально значимых вариантов в генах наследственных форм аневризмы восходящей аорты у пациентов с несиндромальной формой данной патологии.

4. В различных тканях пациентов с несиндромальной аневризмой восходящей аорты идентифицировать дифференциально метилированные гены, вовлеченные в развитие изолированной и коморбидной с атеросклерозом патологии аорты, и представить их функциональную аннотацию.

Научная новизна исследования

Впервые у пациентов Сибирского федерального округа (СФО) проведен анализ структуры коморбидности при АВА и дана оценка встречаемости атеросклероза и его клинических проявлений (ИБС, инфаркт миокарда, инсульт). Впервые охарактеризована степень кальцификации в трех различных областях восходящей аорты у пациентов с ее аневризмой при изолированной форме и коморбидности с атеросклерозом с помощью окрашивания ализариновым красным. У пациента с аневризмой восходящей аорты идентифицирован вариант с.2498A>T (p.Lys833Ile) в гене *COL3A1*, который является вариантом неопределенного клинического значения (по ACMG), не обозначен в популяционных базах данных gnomAD, RUSeq, ФМБА, а также имеет потенциальную функциональную значимость согласно предикции *in silico* (по SIFT, MetaLR, CADD, AlphaMissense). Впервые получен и охарактеризован профиль метилирования ДНК в цельной крови, коже и различных областях восходящей аорты у пациентов с ее аневризмой и нормальной морфологией клапана аорты, имеющих атеросклеротические бляшки в данном сосуде. Впервые показано, что у пациентов в клетках восходящей аорты изменения профиля метилирования ДНК затрагивают области энхансеров генов наследственных аневризм аорты (*NOTCH1* и *GATA5*) и некодирующих РНК, расположенных в 5'-регионах генов транскрипционных факторов *TBX20* и *NR2F1*, потенциально вовлеченных в коморбидное течение аневризмы и атеросклероза.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты расширяют существующие представления о клинических, морфологических и молекулярно-генетических особенностях коморбидности АВА и атеросклероза сосудов различной локализации. В работе показана важность проведения детального морфологического исследования с оценкой встречаемости и степени дегенерации, воспаления, кальцификации и атеросклероза в нескольких зонах восходящей аорты (синотубулярном соединении, на уровне бифуркации легочного ствола, проксимальном отделе дуги). Получены знания, дополняющие имеющиеся представления о генетической структуре несиндромальных АВА, связанные с вовлечением генов наследственных аневризм (*FBN1*, *NOTCH1*, *COL3A1*, *COL4A5*, *MYH11*, *PLOD3*), варианты которых представлены одной или несколькими миссенс-заменами неопределенного клинического значения. Апробированный в работе подход молекулярно-генетического обследования пациентов с АВА с использованием секвенирования клинического экзема может быть использован для улучшения качества медико-

генетического консультирования семей с данной патологией, а также дооперационной стратификации пациентов. Данные о метиломах восходящей аорты при ее аневризме и в случае атеросклеротического поражения сосуда могут являться основой для поиска биомаркеров риска данной патологии, особенно когда у пациентов не выявлено клинически значимых генетических вариантов. Созданная коллекция биообразцов тканей (аорты, кожи и крови), полученных от пациентов с АВА, может быть использована для проведения других исследований в области кардиогенетики и генетики многофакторных заболеваний.

Методология и методы исследования

В работе использованы современные методы клинического и параклинического обследования пациентов с АВА, а также гистологического, молекулярно-генетического, биоинформатического и статистического анализа. Гистологическое исследование было проведено при помощи окрашивания гематоксилином и эозином, орсеином и ализариновым красным. Молекулярно-генетические методы включали массовое параллельное секвенирование и секвенирование по Сэнгеру.

Оценка патогенности выявленных генетических вариантов проводилась согласно стандартам и критериям по интерпретации вариантов секвенирования Американской Коллегии Медицинской Генетики/Ассоциации Молекулярной Патологии (ACMG/AMP), руководства по интерпретации данных секвенирования [Рыжкова О.П. и др., 2019], инструментов VarSome (<https://varsome.com/>), AlphaMissense (<https://alphamissense.hegelab.org/>), а также баз данных RUSeq, gnomAD и ФМБА России. Анализ метилирования ДНК в тканях выполнен с помощью бисульфитного секвенирования с уменьшенной репрезентативностью (англ. reduced-representation bisulfite sequencing, RRBS). Для сравнения полученных данных о метилировании ДНК в аорте у пациентов с аневризмой и атеросклерозом восходящей аорты были привлечены внешние данные по метилированию ДНК в тканях аорты при расслоении или атеросклерозе без аневризмы, находящиеся в открытом доступе в базе данных NCBI в категории GEO DataSets (GSE202047, GSE84274, GSE46394, GSE46401), а также коронарных и сонных артерий при атеросклерозе [Назаренко М.С., 2018].

Работа выполнена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ. Исследование было одобрено локальными этическими комитетами НИИ Медицинской генетики (протокол № 13 от 15.11.2021 г.) и НИИ Кардиологии (протокол № 213 от 12.05.2021 г.) Томского НИМЦ и проведено в соответствии с основополагающими этическими принципами Хельсинкской Декларации. Сбор и анализ информации выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-00701. Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Медицинская геномика» Томского НИМЦ и ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Для несиндромальной аневризмы восходящей аорты характерна клиническая и морфологическая гетерогенность в отношении коморбидности с атеросклерозом: меньшая частота атеросклероза коронарных, сонных артерий и

аорты у пациентов по сравнению с популяцией; зависимость частоты атеросклероза аорты от строения аортального клапана; преобладание отложений солей кальция у более молодых пациентов и неоангиогенез в дистальных областях восходящей аорты.

2. При несиндромальной аневризме восходящей аорты в генах наследственных аневризм отмечается накопление потенциально функционально значимых миссенс-вариантов неопределенного клинического значения, количество которых у одного пациента варьирует.

3. Энхансерные регионы генов наследственных аневризм *NOTCH1* и *GATA5* характеризуются изменениями уровня метилирования ДНК в клетках атеросклеротических бляшек восходящей аорты относительно ее нерасширенной части у пациентов с аневризмой аорты и трикуспидальным клапаном.

4. При аневризме и атеросклерозе восходящей аорты регистрируются разнонаправленные изменения уровня метилирования в области генов некодирующих РНК, расположенных в 5'-регионах генов транскрипционных факторов *TBX20* и *NR2F1*, белковые продукты которых обеспечивают процессы развития.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением методов клинического и параклинического обследования, адекватных поставленным задачам, а также такими молекулярно-генетическими технологиями, как массовое параллельное секвенирование, метод бисульфитного секвенирования с уменьшенной репрезентативностью, привлечением внешних данных из открытых источников (GSE202047, GSE84274, GSE46394, GSE46401) и баз (RUSseq, gnomAD, ФМБА, NCBI и др.), валидацией результатов массового параллельного секвенирования с помощью секвенирования по Сэнгеру, использованием современных методов статистики и биоинформатики.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на XII Международном конгрессе «Кардиология на перекрёстке наук» (Тюмень, 2022 г.; 2024 г.), XIII научной конференции «Генетика человека и патология» (Томск, 2022 г.), Четвертом Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (Томск, 2023 г.), X Съезде кардиологов Сибирского федерального округа (Иркутск, 2023 г.), 14th International Multiconference bioinformatics of Genome Regulation and Structure/System biology BGRS (Новосибирск, 2024 г.) и XI Съезде Российского общества медицинских генетиков с международным участием (Санкт-Петербург, 2025 г.).

Личный вклад автора

Работа выполнена в лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Аналитический обзор литературы по теме диссертации, статистическая обработка собственных результатов, а также последующая подготовка научных публикаций и докладов на научных конференциях, написание текста диссертационной работы выполнено лично автором. Автор участвовал во всех этапах обсуждения полученных результатов и их опубликования.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 7 статей в журналах перечня ВАК РФ, из них 6 статей в журналах, реферируемых в базе данных WoS и Scopus, 1 статья в журнале, индексируемом в базе данных РИНЦ; 3 тезиса в материалах всероссийских конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 195 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственного исследования и их обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, списка иллюстративного материала и 5 приложений. Библиографический указатель включает 484 источника, из них 28 – отечественных и 456 – зарубежных, а также 16 интернет-ресурсов. Работа содержит 16 таблиц и 29 рисунков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования представлен на Рисунке 1. Формирование выборок и клиническая характеристика пациентов с АВА производились на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ (г. Томск). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Формирование выборок для выполнения первых двух задач проводилось ретроспективно.

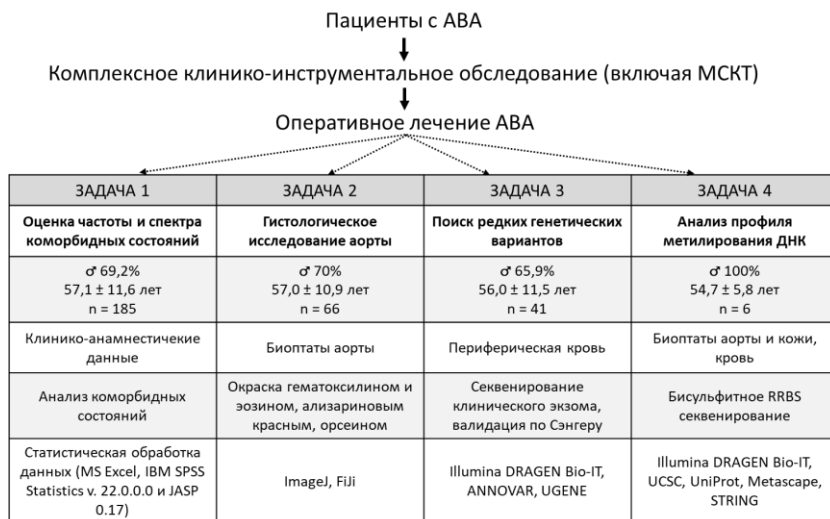


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Большим проводили комплексное клиничко-лабораторное обследование, а также медико-генетическое консультирование. Взятие биоптатов, соответствующих трем зонам восходящей аорты (1 – синотубулярное соединение; 2 – часть восходящей аорты на уровне бифуркации легочного ствола; 3 – проксимальная часть дуги аорты), а также кожи в месте стернотомии производилось интраоперационно. Объем каждого взятого образца не превышал 10 мм³. Каждый образец аорты был разделен на 2 равных фрагмента, схожих по

макроморфологической картине. Для гистологической пробоподготовки образцы аорты помещали в раствор 10% нейтрального буферного формалина. Для оценки метилирования ДНК биоптаты аорты и кожи помещали в пробирку, содержащую реагент для стабилизации РНК RNAlater, в 4°C на 24 часа с последующим переносом образцов в морозильную камеру (-80°C). Взятие венозной крови в объеме от 5 до 10 мл производили из подключичной вены интраоперационно в пробирки с ЭДТА; образцы крови хранились при температуре -20°C.

Пробоподготовку гистологических препаратов осуществляли по стандартной методике с обезвоживанием в растворах изопропилового спирта с последующей заливкой в парафин. Срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, ализариновым красным и орсеином. Подсчет морфометрических показателей производили при помощи программы ImageJ (США).

Для выделения ДНК был использован стандартный метод фенол-хлороформной экстракции. Пробоподготовку ДНК-библиотек выполняли с помощью набора Clinical Exome Solution (Sophia Genetics, Швейцария). Секвенирование ДНК-библиотек выполнено с помощью прибора NextSeq 500 (Illumina, США) с набором NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 согласно протоколу производителя. Валидацию идентифицированных вариантов в генах осуществляли при помощи секвенирования по Сэнгеру.

Метилирование ДНК оценивалось с помощью бисульфитного RRBS секвенирования. Подготовка библиотек для секвенирования ДНК была проведена с использованием набора NEBNext Ultra для Illumina (New England Biolabs, США) с последующим лигированием метилированных адаптеров (IDT, США). После контроля качества (Bioanalyzer 2100, Agilent) секвенирование библиотек выполнялось на приборе HiSeq 1500 (Illumina, США).

Аннотация найденных генетических вариантов выполнена с использованием программы ANNOVAR. Поиск редких генетических вариантов (частота минорного аллеля <1%) проводился в экзонах и прилегающих интронных областях 53 генов наследственных и синдромальных форм АВА (Таблица 1).

Таблица 1 – Кандидатные гены для поиска генетических вариантов

ACTA2	SMAD3	EFEMP2	CBS	MAT2A	SMAD4	COL18A1	COL9A1
COL3A1	TGFB2	FOXE3	COL4A5	NOTCH1	TGFB3	COL1A1	COL9A2
FBN1	TGFBR1	VCAN	ELN	PKD1	ACVRL1	COL1A2	EMILIN1
MYH11	TGFBR2	MFAP5	FBN2	PKD2	ADAMTS10	COL4A1	ENG
MYLK	LOX	SMAD2	FLNA	UPF3B	B3GAT3	COL5A1	GATA5
SLC2A10	PRKG1	BGN	HCN4	SKI	COL11A1	COL5A2	GJA1
JAG1	MED12	PLOD1	PLOD3	SMAD6			

Классификацию выявленных вариантов по степени патогенности проводили с использованием инструментов VarSome (<https://varsome.com/>), AlphaMissense (<https://alphamissense.hegelab.org/>), а также баз данных RUSeq (дата доступа 20.06.2024), gnomAD (v4.1.0, дата доступа 20.06.2024) и ФМБА России (версия 59.1, дата доступа 05.06.2025). Результаты RRBS секвенирования были обработаны с помощью DRAGEN Bio-IT v.3.9.5 (Illumina, США) и сопоставлены с геномом человека (сборка GRCh38), анализ дифференциального метилирования ДНК проводился с использованием пакетов methylKit (v.1.34.0) и limma (v.3.64.0).

Дифференциально метилированными считали CpG-сайты с разницей среднего уровня метилирования между группами образцов в 20% ($|\Delta\beta| \geq 0,2$ и $FDR < 0,05$). Аннотация регуляторных элементов транскрипционных факторов и CpG-островков проводилась в браузере UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>). Анализ обогащения метаболических путей и биологических процессов белковых продуктов дифференциально метилированных генов выполнен в браузерах Metascape (<https://metascape.org/gp>) и WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (<https://www.webgestalt.org/>), результаты считались значимыми при $pFDR < 0,05$.

Для сравнения полученных данных о метилировании ДНК в аорте у пациентов с аневризмой и атеросклерозом восходящей аорты были привлечены данные по метилированию ДНК в тканях аорты при расслоении или атеросклерозе без аневризмы, находящиеся в открытом доступе в базе данных NCBI в категории GEO DataSets (GSE202047, GSE84274, GSE46394, GSE46401), а также коронарных и сонных артерий при атеросклерозе [Назаренко М.С., 2018]. Статистический анализ данных производили при помощи MS Excel, SPSS Statistics v.22.0.0.0 и JASP v.0.17.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка спектра и частоты коморбидных состояний у пациентов с аневризмой восходящей аорты

По результатам анализа, среди сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с АВА наиболее часто встречается артериальная гипертензия (АГ – 69,2%), патологии аортального клапана (двустворчатый аортальный клапан, ДАК – 52,4%, недостаточность – 47,6%, стеноз – 36,2%), ишемическая болезнь сердца (ИБС, 31,9%), хроническая сердечная недостаточность (28,6%). Атеросклероз аорты, коронарных (КА) и сонных артерий (СА) встречается с частотой 9,2%, 24,3% и 10,3%, соответственно. Среди других форм патологий наиболее частыми являются ожирение (32,4%) и хроническая ишемия головного мозга (10,3%).

Согласно данным научной литературы, частота артериальной гипертензии варьировала в разных выборках от 45,2 до 83,1%, а у пациентов с АВА СФО составила 69,2%. Данный показатель находится в пределах указанного диапазона, но статистически значимо отличается от его минимума (58,2%) и максимума (80,9%) среди других групп АВА (пациенты с АВА США) [Davies R.R. et al., 2007; Mori M. et al., 2021].

При сравнении с популяционными выборками частота сахарного диабета 2 типа в изученной группе (4,9%) сопоставима с частотой распространенности данной патологии в Томской области (3,3%) и Германии (7,5%), но ниже, чем в других популяционных выборках [Kälsch H. et al., 2013; Chau K., Eleftheriades J.A., 2014; Mori M. et al., 2021; Максимов С.А. и др., 2024].

Предполагается, что АВА имеет обратную корреляционную связь с частотой атеросклероза сосудов других бассейнов, в особенности КА и СА [Achneck H. et al., 2005; Hung A. et al., 2012; Chau K., Eleftheriades J.A., 2014; Waldron C. et al., 2023]. Частота атеросклероза восходящей аорты по данным компьютерной томографии у пациентов АВА СФО (9,2%) отличалась от таковой у пациентов с АВА из штата Массачусетс, США (17,2%, $p=0,008$) (Рисунок 2А). Вместе с тем, в нашей выборке пациентов частота встречаемости атеросклероза восходящей аорты была значительно ниже, чем в популяционных выборках (24%, 42,9%, 58,6% и 62,8%, $p < 0,0001$).

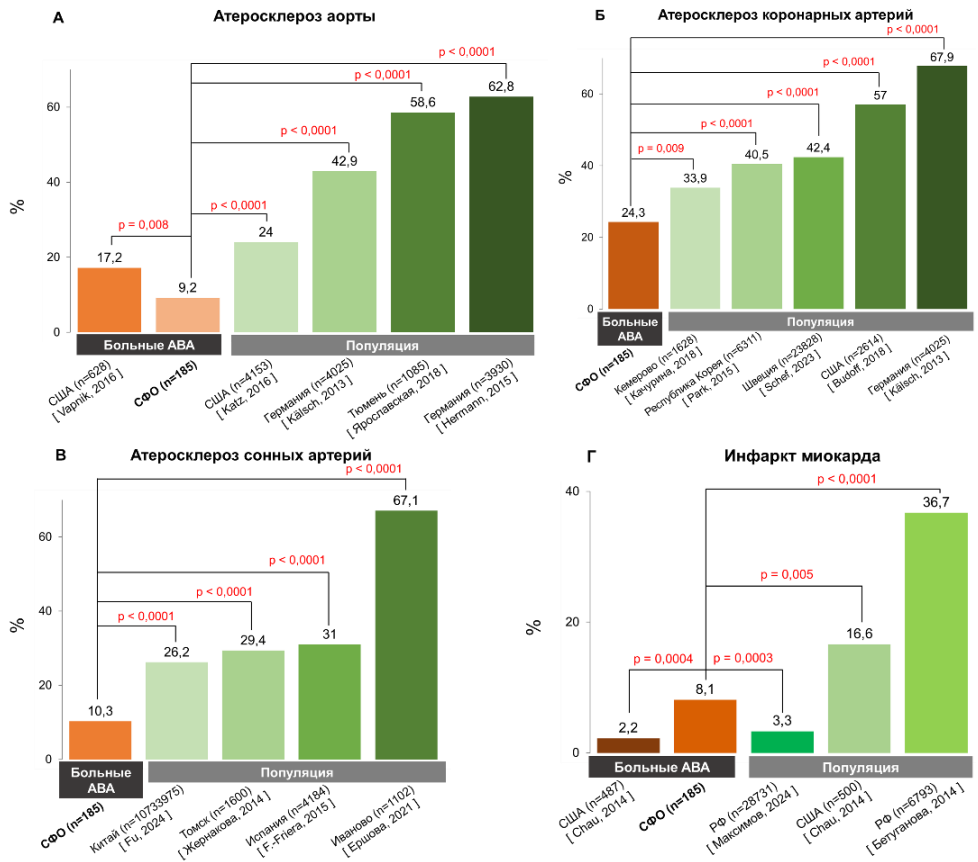


Рисунок 2 – Частоты встречаемости атеросклероза восходящей аорты (А), коронарных (Б) и сонных артерий (В), инфаркта миокарда (Г) у больных с АВА СФО, других групп с АВА и популяционных выборках: АВА – аневризма восходящей аорты, СФО – Сибирский федеральный округ

Распространенность атеросклероза КА по данным лучевых методов исследования у пациентов с АВА в исследуемой группе (24,3%) была снижена по сравнению с другими популяционными выборками РФ (33,9%, $p=0,009$), а также Республики Корея (40,5%, $p<0,0001$), стран Европы (Швеции – 42,4%, Германии – 67,9%, $p<0,0001$) и США (57%, $p<0,0001$; Рисунок 2Б).

Аналогичным образом, атеросклероз СА, оцененный ультразвуковым методом, встречался реже среди пациентов с АВА СФО, чем в популяционных выборках Китая и Испании (10,3% vs. 26,2% и 31%, соответственно), а также среди населения Томска (29,4%, $p<0,0001$) и Иваново (67,1%, $p<0,0001$; Рисунок 2В).

Закономерным осложнением атеросклероза КА является инфаркт миокарда. Частота встречаемости ИМ у больных с АВА СФО и у пациентов с АВА США (8,1% и 2,2%, соответственно) была значительно ниже, чем в некоторых популяционных выборках (Рисунок 2Г), что согласуется с результатами анализа

распространенности атеросклероза КА – основного звена в патогенезе ИМ. Частота инсульта в исследуемой выборке (3,2%) не отличалась от популяционной.

В нашей выборке ДАК был зарегистрирован более, чем в половине случаев АВА (52,4%). Медиана возраста пациентов с ДАК и трикуспидальным аортальным клапаном (ТАК) составила 56 [46; 63] лет и 62 [54; 75; 68] года, соответственно ($p < 0,001$). Различия в возрасте могут объясняться тем, что пациенты с ДАК и АВА требуют оперативного вмешательства на восходящей аорте в более раннем возрасте [Yang L.-T. et al., 2020]. Частота ДАК в исследуемой выборке была значимо выше, чем в популяционных группах (52,4% vs. 0,2%, 0,4%, 1%, 1,8%, $p < 0,0001$) [Glotzbach J.P. et al., 2023; Li Y. et al., 2017; Michelena H. et al., 2021; Irtyuga O. et al., 2022]. Частота ДАК в выборке пациентов с АВА, превышающая 50%, обнаружена только в одном исследовании [Amemiya K. et al., 2020]. Атеросклероз аорты чаще регистрировался у пациентов с ТАК (15,9% vs. 3,1%, $p = 0,004$). Частота артериальной гипертензии в нашей выборке была значительно выше у пациентов с ТАК (83,0% vs. 56,7%, $p < 0,001$). Стеноз аортального клапана чаще встречался у пациентов с АВА с ДАК (54,6% vs. 15,9%, $p < 0,001$).

Гистологические особенности в зоне синотубулярного соединения, области восходящей аорты на уровне бифуркации легочного ствола и проксимальной части дуги у пациентов с аневризмой восходящей аорты

Гистологически исследована стенка восходящей аорты 66 пациентов с несиндромальными АВА без расслоения. Атеросклероз аорты, КА и СА, выявленный при помощи лучевых исследований различной модальности на дооперационном этапе, был зарегистрирован у 13,6%, 25,8% и 18,2% пациентов, соответственно.

При гистологическом анализе препаратов оценивали признаки, соответствующие трем диагностическим группам по Leone O. et al. (2020): дегенеративные изменения в меди аорты; наличие воспалительного инфильтрата в меди (аортит) или адвентиции (периаортит); атеросклероз аорты [Leone O. et al., 2020]. Атеросклероз оценивался как легкий, умеренный или тяжелый с использованием упрощенной классификации AECVP/SCVP [Stone J.R. et al., 2015].

Во всех трех зонах отмечался неоангиогенез, а также очаговое истончение эластических мембран, нарушение ламеллярной структуры меди сосуда с расширением межмембранных пространств. Медиальная дегенерация была наиболее часто встречающимся морфологическим субстратом АВА и наблюдалась у 100% пациентов. Наиболее часто дегенеративные изменения меди встречались в аорте на уровне бифуркации легочного ствола (зона 2 – 95,2%). При исследовании биоптатов синотубулярном соединении (зона 1) и проксимальной части дуги аорты (зона 3) встречаемость данного признака составила 89,4% и 91,9%, соответственно. Среди морфологических признаков дегенерации меди во всех трех зонах превалировали фрагментация и частичная утрата эластических мембран (зона 1 – 86,4%, зона 2 – 90,5%, зона 3 – 82,3%), интраламеллярное (зона 1 – 81,8%, зона 2 – 79,4%, зона 3 – 79%) и трансламеллярное мукоидное набухание (зона 1 – 42,4%, зона 2 – 33,3%, зона 3 – 37,1%). Чаще всего проявление этих признаков имело легкую степень, а их распределение носило мультифокальный характер.

Атеросклероз хотя бы в одной из исследованных зон восходящей аорты присутствовал более, чем у половины пациентов с АВА (34 пациента, 51,5%); у

16 пациентов (24,2%) стадия поражения была умеренной или выраженной. Частота встречаемости атеросклероза аорты не зависела от локализации и составила 31,8%, 27,0% и 32,3% для зон 1, 2 и 3, соответственно ($p=0,650$). Выраженный атеросклероз встречался только у пациентов с ТАК.

Аортит встречался у 23 пациентов (34,8%), из них периаортит – у 17 человек (73,9%). Различий во встречаемости воспаления в исследованных зонах восходящей аорты выявлено не было.

Среди прочих признаков в медиі часто выявлялся неоангиогенез (зона 1 – 37,9%, зона 2 – 66,7%, зона 3 – 71%, $p=0,006$). Примечательно, что неоангиогенез статистически значимо чаще встречался в дистальной части восходящей аорты вблизи брахиоцефального ствола. Было показано, что локальный ангиогенез наружного медиального слоя указывает на активное ремоделирование стенки аорты, связанное с риском расслоения аневризмы [Niinimäki E. et al., 2018].

Атеросклероз на любой из стадий его развития чаще встречался у пациентов с ТАК, чем ДАК (65,9% vs. 28%, $p=0,003$). У пациентов с ДАК регистрировался только легкий и умеренный атеросклероз. Существуют данные о том, что роль атеросклероза как «драйвера» развития АВА может быть более значимой у пациентов с ТАК [Doppler C. et al., 2023].

Преципитаты кальция в восходящей аорте визуализировались преимущественно в медиі сосуда и имели диффузный характер распределения. Различия в среднем проценте кальцификации в различных зонах восходящей аорты (зона 1 – 7,85 [2,2; 15,4]%, зона 2 – 10,45 [3,83; 22,35]%, зона 3 – 10,95 [4,65; 18,63]%) не достигали статистически значимых величин ($p=0,216$).

Пациенты, у которых максимальный процент кальцификации регистрировался в зоне 3, были моложе (53 [41; 62] лет), чем пациенты с выраженной кальцификацией в проксимальных отделах восходящей аорты (зона 1 – 64 [58; 68] лет, зона 2 – 60 [55,25; 65] лет, $p = 0,035$). Поскольку у самых молодых пациентов процент кальцификации в дистальной части восходящей аорты выше, можно предположить, что первоначальная кальцификация восходящей аорты происходит дистальнее, рядом с брахиоцефальным стволом, и с возрастом распространяется в проксимальном направлении.

При анализе связи процента кальцификации аорты с другими клинико-морфологическими параметрами выявлена положительная корреляция с возрастом пациента ($p=0,350$, $p=0,004$) и отрицательная – со скоростью клубочковой фильтрации ($p= -0,378$, $p=0,009$).

Поиск редких вариантов в генах наследственных форм аневризмы восходящей аорты

В результате секвенирования клинического экзона в 53 генах синдромальных и наследственных АВА (Таблица 1) у пациентов не выявлено патогенных или вероятно патогенных вариантов по классификации ACMG. Идентифицированные варианты были классифицированы следующим образом: 34 доброкачественных (benign), 5 вероятно доброкачественных (likely-benign) и 6 вариантов неопределенного клинического значения (VUS).

У пациента №54 (мужчина, 48 лет, диаметр восходящей аорты – 5 см) выявлено три миссенс-варианта VUS в генах *FBN1*, *COL3A1* и *PLOD3* (Рисунок 3). По результатам инструментального обследования у пациента не выявлено

атеросклеротических бляшек в КА, СА или аорте. Среди других сопутствующих заболеваний у пациента диагностирована АГ, мочекаменная болезнь.

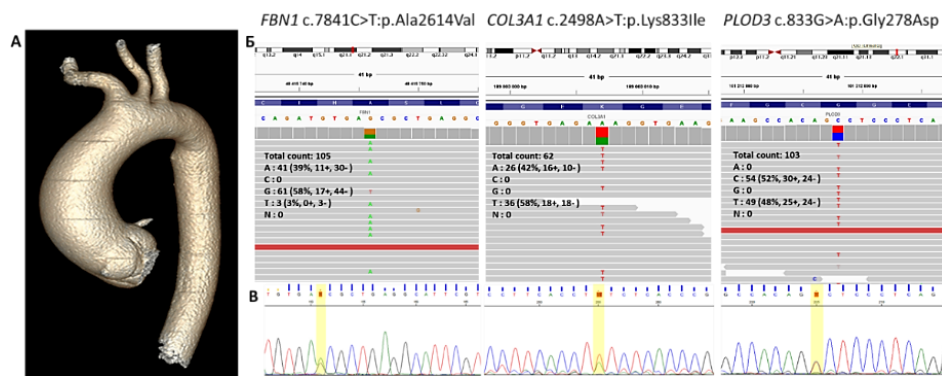


Рисунок 3 – Идентификация варианта с.7841C>T (p.Ala2614Val) в гене *FBN1*, варианта с.2498A>T (p.Lys833Ile) в гене *COL3A1* и варианта с.833G>A (p.Gly278Asp) в гене *PLOD3* у пациента №54: (А) мультиспиральная компьютерная томография грудного отдела аорты; (Б) молекулярно-генетическое тестирование пациента путем секвенирования клинического экзема; (В) валидация генетических вариантов секвенированием по Сэнгеру

Вариант с.7841C>T (p.Ala2614Val) в гене *FBN1* (Рисунок 3) у пациента с АБА идентифицирован впервые. Вариант зарегистрирован в базах gnomAD (частота аллеля – $6,8 \times 10^{-7}$) и ФМБА (частота аллеля – $5,8 \times 10^{-5}$). По оценкам VarSome этот вариант оценен как патогенный по данным только одного предиктора (MutPred), тогда как 7 предикторов (BLOSUM, DANN, FATHMM, FATHMM-MKL, MVP, PrimateAI, SIFT4G) оценивали вариант как VUS и 15 – как benign (доброкачественный). По шкале CADD (PHRED) данный вариант оценивается как патогенный (CADD Score – 23,6). Согласно инструменту AlphaMissense, замена p.Ala2614Val в белке FBN1 классифицируется как вероятно доброкачественная. По данным VarSome в той же позиции (chr15:48415746) описан другой вариант с.7841C>A p.(Ala2614Asp), который по шкалам предикции патогенности также отнесен к VUS. Для данного варианта нет информации о связи с заболеваниями.

Второй VUS у пациента №54 с.2498A>T (p.Lys833Ile) выявлен в гене *COL3A1* (Рисунок 3). Данный вариант с.2498A>T не представлен в популяционных базах gnomAD, RUSseq и ФМБА, его связь с патологией неизвестна. Шкала предикции патогенности VarSome по 8 предикторам относит этот вариант к патогенным (DEGEN2, FATHMM-MKL, SIFT, PROVEAN, M-CAP и др.), 12 предикторов характеризуют вариант как VUS, 3 – benign, и по CADD (PHRED) вариант также относится к патогенным (CADD Score – 28,5). Инструмент AlphaMissense классифицирует замену p.Lys833Ile в белке COL3A1 как вероятно патогенную. По данным ресурса ClinVar, в этой позиции (chr2:189003007) ранее описан rs371344739 (с.2498A>G, p.Lys833Arg, ID199701), частота которого для европеоидов составляет 0,00013 (gnomAD) и который также является VUS.

Третий VUS с.833G>A (rs1041461490, p.Gly278Asp) у пациента №54 идентифицирован в гене *PLOD3* (Рисунок 3). Вариант зарегистрирован в популяционных базах gnomAD (частота аллеля – $6,8 \times 10^{-6}$), RUSeq (частота аллеля – $5,9 \times 10^{-4}$) и ФМБА (частота аллеля – $1,2 \times 10^{-4}$), в базе ClinVar (ID1386463) обозначен как VUS, но о его связи с патологиями информации нет. Согласно VarSome, 11 предикторов относят данный вариант к патогенным (MutPred, DEOGEN2, FATHMM-MKL, EIGEN, PROVEAN и др.), 10 – к VUS и лишь 1 предиктор классифицирует данный вариант как доброкачественный (FATHMM). Шкала предикции патогенности CADD (PHRED) относит данный вариант к патогенным (CADD Score – 25,6). Инструмент AlphaMissense классифицирует замену аминокислот p.Gly278Asp в белке PLOD3 как неоднозначную (ambiguous).

У пациента №43 (мужчина, 72 года, диаметр восходящей аорты – 6,9 см) выявлен VUS с.4993C>T (rs768569707, p.Arg1665Cys) в гене *MYH11* (Рисунок 4). Помимо АВА, у пациента также диагностирована АГ, гиперлипидемия, атеросклероз КА и СА, ИБС и хроническая ишемия головного мозга. Наблюдается прогрессирующая кальцификация КА и аорты с индексами Агатстона 423 и 937, соответственно.

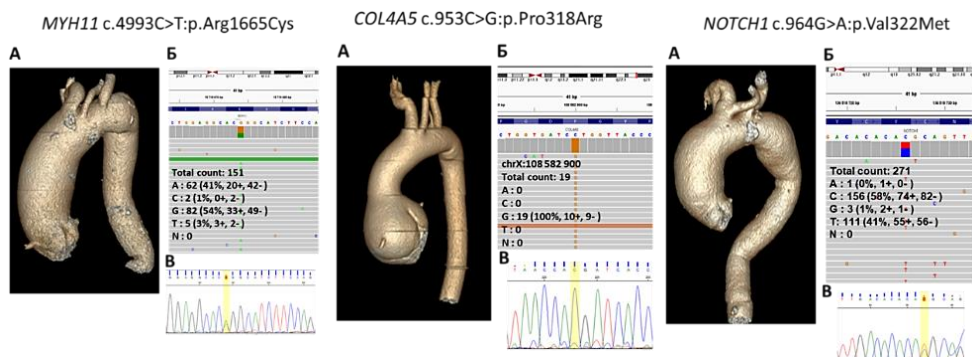


Рисунок 4 – Идентификация варианта с.4993C>T (p.Arg1665Cys) в гене *MYH11*, варианта с.953C>G (p.Pro318Arg) в гене *COL4A5* и варианта с.964G>A (p.Val322Met) в гене *NOTCH1*: (А) мультиспиральная компьютерная томография грудного отдела аорты; (Б) молекулярно-генетическое тестирование пациента путем секвенирования клинического экзоза; (В) валидация генетических вариантов секвенированием по Сэнгеру. Варианты идентифицированы у разных пациентов

Вариант rs768569707 встречается с частотой $4,4 \times 10^{-5}$ по данным gnomAD. Согласно шкале прогнозирования патогенности VarSome, 11 предикторов относят данный вариант к патогенным (LIST-S2, PROVEAN, DEOGEN2, EIGEN, EIGEN PC, FATHMM-XF и др.), 9 предикторов относят вариант к VUS и лишь по результатам одного предиктора данный вариант может быть классифицирован, как доброкачественный (MVP). По шкале CADD (PHRED) данный вариант также классифицирован, как патогенный (CADD Score – 32,0). Согласно инструменту AlphaMissense, замена p.Arg1665Cys в белке MYH11 классифицируется как вероятно доброкачественная. В базе данных ClinVar этот вариант (ID405480) описан

у пациентов с семейными формами АВА, а также у детей с некомпактным миокардом левого желудочка [Higono K. et al., 2020].

У пациента №13 (мужчина, 58 лет, диаметр восходящей аорты – 4,5 см) был обнаружен вариант с.953C>G (chrX:108582900, rs1449979085, p.Pro318Arg) в гене *COL4A5* (Рисунок 4). У пациента диагностированы АВА в области корня, ДАК, АГ, гиперлипидемия и ожирение, хроническая болезнь почек. Частота встречаемости rs1449979085 составляет $8,3 \times 10^{-6}$, а среди европейцев – $1,1 \times 10^{-5}$ (gnomAD); частота аллеля согласно ФМБА – $8,7 \times 10^{-5}$. VarSome определил этот вариант как патогенный на основании 3 предикторов, 4 предиктора классифицируют вариант, как VUS, 16 – как доброкачественный. По шкале CADD (PHRED) Score составил 16,9. Согласно инструменту AlphaMissense, замена p.Pro318Arg в белке *COL4A5* классифицируется как вероятно доброкачественная. Хотя VUS, выявленный у пациента №13, описан в ClinVar (ID2485585), его ассоциация с соответствующими патологиями, включая АВА, отсутствует в литературе и общедоступных базах данных.

У пациента №36 (женщина, 67 лет, диаметр восходящей аорты – 6,2 см) идентифицирован вариант с.964G>A (p.Val322Met) в гене *NOTCH1* (Рисунок 4). Помимо основного диагноза, у пациентки наблюдалось расширение нисходящей аорты, АГ, пароксизмальная тахикардия, ИБС, атеросклероз СА и хроническая ишемия головного мозга. Аортальный клапан нормального строения. Примечательно, что в КА наблюдается низкая, а в аорте высокая степень кальцификации (индекс Агатстона 49 и 237, соответственно). Согласно популяционным базам gnomAD и ФМБА, вариант с.964G>A в гене *NOTCH1* встречается с частотой $2,1 \times 10^{-6}$ и 8×10^{-6} , соответственно. Восемь шкал предсказания патогенности VarSome однозначно классифицируют этот вариант как патогенный (DEOGEN2, EIGEN PC, FATHMM-MKL, LIST-S2, LRT, M-CAP, PrimateAI, SIFT4G), 10 – как VUS, в то время, как только один предиктор классифицирует его, как доброкачественный (Mutation assessor). Оценка CADD (PHRED) в 25,0 баллов подтверждает патогенность этого варианта. Инструмент AlphaMissense классифицирует замену аминокислот p.Val322Met в белке *NOTCH1* как неоднозначную (ambiguous). Нет никаких доказательств, связывающих его с каким-либо заболеванием. В настоящее время нет подтверждения и связи варианта с.964G>A (p.Val322Met) в гене *NOTCH1* с какой-либо патологией, в т.ч. и с АВА.

Гены *FBN1*, *COL3A1* и *MYH11* входят в категорию генов с доказанной максимальной связью с АВА; *NOTCH1* потенциально вовлечен в патогенез АВА; *COL4A5* относится к генам с ограниченными доказательствами связи с АВА, а *PLD3* ассоциирован с заболеваниями восходящей аорты по данным экспериментальных исследований [Renard M. et al., 2018]. Наибольшее влияние на развитие АВА могут иметь варианты в «структурных» генах, белковые продукты которых формируют основу аортальной стенки – *FBN1*, *COL3A1* и *MYH11* [Guo D. et al., 2017; Li Y. et al., 2021; Li J. et al., 2021].

Анализ метилирования ДНК у пациентов с аневризмой восходящей аорты

Уровень метилирования ДНК оценивался в аорте (нерасширенная аорта из проксимальной части дуги (НА, n=6), аневризма аорты на уровне бифуркации легочного ствола (АА, n=6), атеросклеротическая бляшка аорты (АБ, n=4)), коже (КЖ, n=5) и клетках крови (КВ, n=6) у шести мужчин с несиндромальными АВА без патологии аортального клапана. У этих пациентов по результатам секвенирования

клинического экзема не было найдено патогенных, вероятно патогенных вариантов и VUS в генах наследственных АБА. По характеру метилирования ДНК отмечается кластеризация образцов аорты, кожи и крови пациентов, что подтверждает тканеспецифичность метилирования ДНК у пациентов с АБА (Рисунок 5).

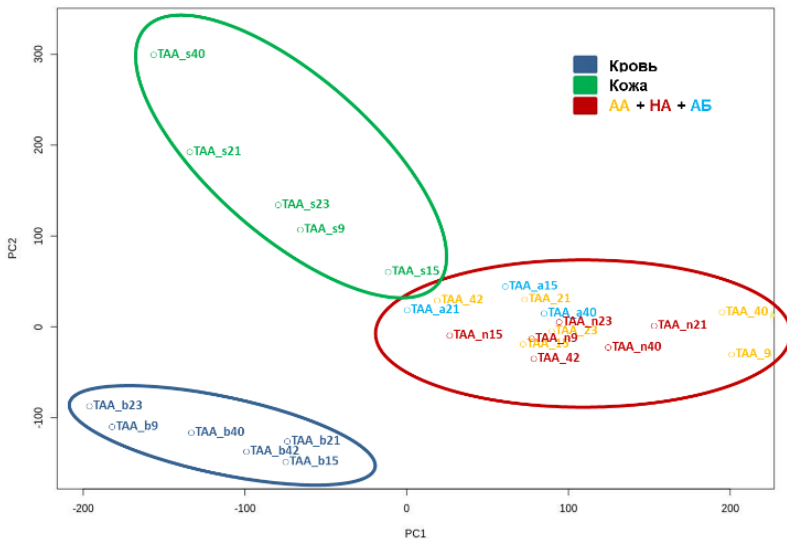


Рисунок 5 – Распределение образцов восходящей аорты, кожи и крови пациентов с АБА в зависимости от уровня метилирования ДНК в пространстве главных компонент: АА – аневризма аорты, НА – нерасширенная аорта, АБ – атеросклеротическая бляшка аорты

Было проанализировано 2322700 CpG-сайтов. Большинство как гипер-, так и гипометилированных дифференциально метилированных сайтов (ДМС) локализовано в интронах и межгенных регионах. Максимальное количество ДМС наблюдается между аневризмой аорты (АА) / клетками крови (КВ) – 126502 и атеросклеротическими бляшками (АБ) / КВ – 49240, а минимальное – между дилатированной (АА) и нерасширенными частями аорты (НА) – 2 сайта (chr5:93573113 и chr5:93573147, GRCh38). Данные ДМС локализованы в интроне 1 гена длинной некодирующей РНК (днРНК) *NR2F1-AS1* в области CpG-островка (Рисунок 6). Оба эти сайта гипометилированы в дилатированной аорте относительно ее нерасширенной части. В исследовании Lacey M. et al. (2019) при атеросклерозе восходящей аорты без аневризмы в гене *NR2F1-AS1* выявлено пять гиперметилированных регионов [Lacey M. et al., 2019], в том числе и те, в последовательности которых в настоящем исследовании обнаружены гипометилированные сайты между АА/АБ и НА. Разнонаправленный характер метилирования гена *NR2F1-AS1* также наблюдается при расслоении и атеросклерозе аорты (Рисунок 6).

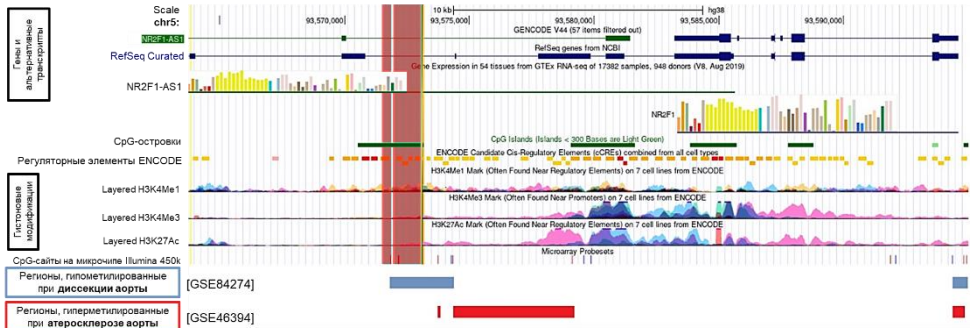


Рисунок 6 – Локализация и эпигенетический контекст в области генов *NR2F1/NR2F1-AS1*

Недавние исследования показали, что днРНК могут участвовать в регуляции экспрессии генов [Sun J. et al., 2018; Zhang H. et al., 2021]. Нокадаун *NR2F1-AS1* в сосудистых ГМК приводил к снижению экспрессии генов-маркеров сократительной активности ГМК [Lim Y.-H. et al., 2020]. В другом исследовании было показано, что в пульпозном ядре пациентов с дегенерацией межпозвоночного диска наблюдалась повышенная экспрессия *NR2F1-AS1*, что способствовало деградации внеклеточного матрикса [Du L. et al., 2022]. В нашем исследовании в АБ аорты относительно НА отмечено снижение метилирования гена *NR2F1-AS1*, что косвенно может указывать на его повышенную экспрессию.

В последовательности генов, структурные варианты которых предрасполагают к развитию наследственных и синдромальных форм АВА (Таблица 1), не выявлено ДМС между образцами АА и НА. В АБ у пациентов с аневризмой обнаружены ДМС в генах *NOTCH1* и *GATA5* относительно НА.

Один гиперметилированный CpG-сайт chr9:136516253 (GRCh38/hg38; $\Delta\beta=0,4$) выявлен в 9 интроне гена *NOTCH1*, в области энхансера EN38E2736741, в АБ относительно НА. Согласно внешним данным, другие позиции в данном гене – chr9:136511900 (cg14065526; 15 интрон) и chr9:136543838 (cg01909856; 2 интрон) – были гиперметилированы ($\Delta\beta=0,44$ и $0,27$) в восходящей аорте при ее диссекции относительно интактной ткани (GSE202047). Последний CpG-сайт был умеренно гипометилирован в АБ восходящей аорты у пациентов с атеросклерозом по сравнению с ее интактными областями ($\Delta\beta=-0,06$; GSE46401).

В 5'-области гена *GATA5* выявлен CpG-сайт chr20:62476553, гиперметилированный в АБ как относительно НА ($\Delta\beta=0,33$), так и АА ($\Delta\beta=0,30$). В данном регионе, содержащем энхансер EN38E2128121, также зарегистрировано умеренное гипометилирование при диссекции ($\Delta\beta=-0,06$ – $(-0,08)$; GSE202047, GSE84274), но гиперметилирование при атеросклерозе ($\Delta\beta=0,08$; GSE46401).

Белковые продукты генов *NOTCH1* и *GATA5* важны для процессов развития сердечно-сосудистой системы. Мутации в *NOTCH1* связывают с врожденными аномалиями аортального клапана и аорты [Malashicheva A. et al., 2020]. Патологические варианты в гене *GATA5* связывают с ДАК, АГ, аритмией и др. [Verhagen J.M.A. et al., 2018; Song Z.P., Yan B., 2020]. Кроме того, *NOTCH1* и *GATA5* вовлечены в развитие и прогрессирование атеросклероза сосудов различной

локализации и АВА [Hong O.K. et al., 2016; Meester J.A.N. et al., 2019; Malashicheva A. et al., 2020; Peng X. et al., 2023]. Функциональные последствия дифференциального метилирования ДНК в области энхансеров в отношении регуляции экспрессии генов остаются в настоящее время дискуссионными.

В настоящем исследовании между АА и АБ выявлено 752 дифференциально метилированных гена (ДМГ), АА и КВ – 16350 ДМГ, АА и КЖ – 9172 гена. Среди всех пар сравнений идентифицирован 531 «общий» ген. Данные гены отличаются дилатированную аорту от других изученных тканей пациентов с АВА. Между атеросклеротической бляшкой аорты и нормальной тканью выявлено 612 ДМГ, АБ и КВ – 11751, АБ и КЖ – 3526 ДМГ. Среди пар сравнений АБ с другими тканями выявлено 387 генов, которые отличают атеросклеротическую бляшку аорты от всех других тканей пациентов с аневризмой.

Функциональная аннотация белковых продуктов «общих» ДМГ между всеми группами сравнений показала, что среди первых десяти наиболее представленных биологических процессов по Gene Ontology (<https://metascape.org/>) присутствуют «развитие сердца» (GO:0007507, 42/531 и 40/387 генов, $pFDR < 0,001$) и «развитие клапанов сердца» (GO:0003170, 23 гена, $pFDR < 0,001$).

Для установления роли выявленных ДМГ в развитии АВА и атеросклероза проведен сравнительный анализ спектра ДМГ с группами генов, показавших ассоциации с диаметром аорты или АВА (229 генов), атеросклерозом аорты, КА и СА, ИБС, инфарктом миокарда, ишемическим инсультом (2119 генов; Рисунок 7).

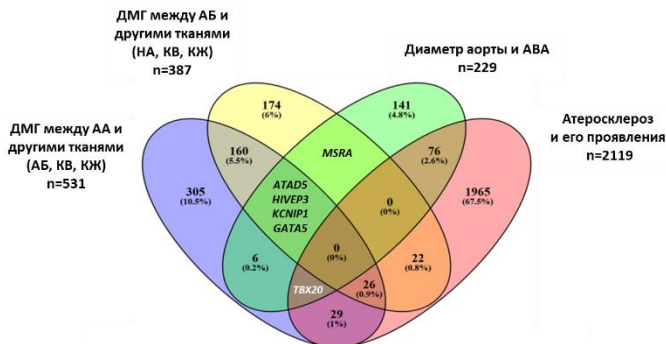


Рисунок 7 – «Общие» гены при сравнении спектра ДМГ, полученного в настоящем исследовании, с группами генов, показавших ассоциации GWAS с атеросклерозом и его клиническим проявлениями и с аневризмой/расслоением и диаметром восходящей аорты

Общих генов между всеми четырьмя группами сравнения выявлено не было (Рисунок 7). Особый интерес среди локусов, ассоциированных с АВА и атеросклерозом сосудов различной локализации, представляет ген *TBX20*, который является общим между ДМГ АА и другими тканями, генами, ассоциированными с атеросклерозом и АВА по результатам GWAS (Рисунок 7). *Tbx20* важен для развития сердечно-сосудистой системы и участвует в ремоделировании сердца в ответ на патофизиологические триггеры [Chen Y. et al., 2021].

Выявлено гипометилирование пяти CpG-сайтов в 5'-регионе гена *TBX20* (локус 7p14.2), расположенных на расстоянии 5179-7757 п.н. от 5'UTR гена *TBX20* в области гена нкРНК *ENSG00000226063*, в АБ по сравнению с АА у больных с АБА. Уровень метилирования в АБ по сравнению с АА снижен на 44,1-58,4% ($pFDR < 0,05$). Два CpG-сайта локализованы непосредственно в последовательности энхансера EN38E2547742 и три – в области гена нкРНК *ENSG00000226063* (Рисунок 8).

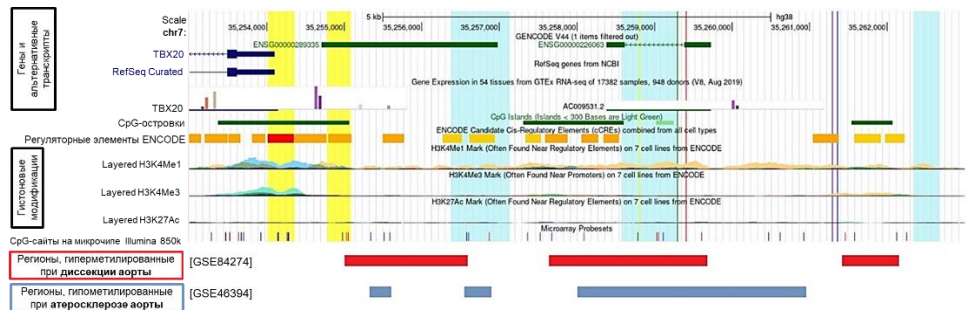


Рисунок 8 – Локализация и эпигенетический контекст исследуемой 5'-области гена *TBX20*

При расслоении аорты в отдельных CpG-сайтах региона chr7:35253926-35262250 выявлено статистически значимое гиперметилирование (разница уровня метилирования по сравнению с непораженной тканью составляла от 1,4% до 17,7%), при этом гиперметилированные сайты группировались в 3 региона (GSE84274; Рисунок 8). При атеросклерозе аорты, напротив, выявлены 3 региона, в которых CpG-сайты были гипометилированы (разница уровня метилирования от -3,2% до -15,5%) по сравнению с интактной аортой (GSE46394; Рисунок 8). Таким образом, при расслоении и атеросклерозе аорты уровень метилирования ДНК региона chr7:35253926-35262250 (в области генов нкРНК *ENSG00000228935* и *ENSG00000226063*) изменяется разнонаправленно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структура коморбидности при АБА включает как патологию аорты, так и другие сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания и их осложнения. У больных СФО при АБА реже, чем в популяционных выборках, регистрируется атеросклероз аорты, коронарных и сонных артерий и инфаркт миокарда, что соответствует литературным данным о наличии обратной коморбидности между АБА и атеросклерозом [Achneck H. et al., 2005; Hung A. et al., 2012; Chau K., Eleftheriades J.A., 2014; Grewal N. et al., 2022; Weininger G. et al., 2022; Waldron C. et al., 2023]. У пациентов с ДАК чаще встречается его стеноз, а у пациентов с ТАК – сопутствующие атеросклероз аорты и артериальная гипертензия.

Гистологический анализ стенки восходящей аорты выявил в медиальном слое преобладание дегенеративных изменений, встречающихся у всех пациентов, зачастую в сочетании с атеросклерозом и/или воспалением. Дегенерация медики в основном представлена фрагментацией и утратой эластических мембран, мукоидным набуханием и неоангиогенезом, который преобладает в проксимальных

отделах дуги аорты. Аневризма восходящей аорты характеризуется диффузной кальцификацией меди сосуда, процент которой коррелирует со скоростью клубочковой фильтрации и возрастом. Предполагается, что отложения кальция у пациентов с АВА возникают в дистальных отделах восходящей аорты, что дополняет сведения о патогенезе заболевания.

У 9,8% (4 из 41) пациентов обнаружено 6 потенциальных функционально значимых миссенс-вариантов неопределенного клинического значения в генах наследственных аневризм (*FBN1*, *COL3A1*, *PLOD3*, *MYH11*, *COL4A5*, *NOTCH1*). Несиндромальные АВА развиваются с вовлечением тех же патогенетических путей, что наследственные и синдромальные формы, однако паттерн найденных генетических вариантов при спорадических случаях уникален.

У пациентов с АВА и ТАК наблюдаются выраженные межтканевые различия в уровне метилирования ДНК, где максимальное количество ДМС выявлено между дилатированной частью восходящей аорты и кровью. Белковые продукты ДМГ между дилатированной частью, атеросклеротической бляшкой, нерасширенной аортой, кровью и кожей пациентов с АВА участвуют в процессах развития (GO:0051094, $pFDR=0,003$), развитии сердечно-сосудистой системы (GO:0072359, $pFDR=0,005$), подвижности клеток (GO:0048870, $pFDR=0,024$), регуляции внутриклеточной передачи сигналов (GO:1902531, $pFDR=0,028$), адгезии клеток (GO:0007155, $pFDR=0,031$).

У пациентов с АВА и ТАК дифференциальное метилирование затрагивает области энхансеров генов *NOTCH1* и *GATA5* в атеросклеротической бляшке относительно нерасширенной аорты. При сопоставлении результатов, полученных в нашей работе, с внешними данными, выявлен разнонаправленный характер метилирования регионов генов *NOTCH1* и *GATA5* при коморбидности аневризмы/атеросклероза восходящей аорты и изолированных патологиях аорты (расслоение и атеросклероз).

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о разнонаправленном изменении уровня метилирования в области генов нкРНК, расположенных в области генов *NR2F1-AS1* и *NR2F1*, а также *ENSG00000289335*, *ENSG00000226063* и *TBX20*, как при АВА, так и при атеросклерозе восходящей аорты, что подтверждает важность нкРНК при формировании данных патологий. Эти результаты получены впервые, поскольку до сих пор не было работ, в которых анализировался профиль метилирования ДНК в клетках аорты в дилатированной и нерасширенной областях, а также в атеросклеротических бляшках у пациентов с несиндромальной формой аневризмы восходящей аорты.

ВЫВОДЫ

1. В структуре коморбидности несиндромальной аневризмы восходящей аорты у пациентов Сибирского федерального округа наиболее частыми заболеваниями сердечно-сосудистой системы являются артериальная гипертензия (69,2%), двустворчатый аортальный клапан (52,4%) и его патологии, ишемическая болезнь сердца (31,9%). У пациентов с аневризмой восходящей аорты реже, чем в популяционных выборках, регистрируется атеросклероз аорты (9,2%), коронарных (24,3%), сонных артерий (10,3%) и инфаркт миокарда (8,1%).

2. Дегенерация меди является преобладающей морфологической характеристикой у пациентов с аневризмой восходящей аорты (100%), а

атеросклероз выявляется чаще в случае сочетания аневризмы и аортального клапана нормального строения (65,9%) по сравнению с теми, кто имеет бicuspidальный клапан (28%, $p=0,003$). Неоангиогенез чаще регистрируется в проксимальном отделе дуги аорты (71%) по сравнению с синотубулярным соединением (37,9%) и частью восходящей аорты на уровне бифуркации легочного ствола (66,7%, $p=0,006$).

3. При несиндромальной форме аневризмы восходящей аорты отложения солей кальция диффузно распределены в меди аорты и имеют положительную корреляцию с возрастом ($p=0,350$, $p=0,004$) и отрицательную ($p=-0,378$, $p=0,009$) – со скоростью клубочковой фильтрации. Пациенты с максимальной кальцификацией в дистальных областях восходящей аорты отличаются более молодым возрастом (53 [41; 62] лет) по сравнению с теми, у кого максимальная кальцификация регистрируется на уровне синотубулярного соединения (64 [58; 68] лет) и в восходящей аорте на уровне бифуркации легочного ствола (60 [55,25; 65] лет, $p=0,035$).

4. У пациентов с несиндромальной формой аневризмы восходящей аорты не обнаружены патогенные и вероятно патогенные варианты в генах наследственных аневризм аорты. В 9,8% случаев идентифицированы генетические варианты неопределенного клинического значения (VUS) в генах *FBN1* c.7841C>T (p.Ala2614Val); *COL3A1* c.2498A>T (p.Lys833Ile); *MYH11* c.4993C>T (rs768569707, p.Arg1665Cys); *NOTCH1* c.964G>A (p.Val322Met); *COL4A5* c.953C>G (rs1449979085, p.Pro318Arg); *PLOD3* c.833G>A (rs1041461490, p.Gly278Asp).

5. У пациентов с аневризмой и аортальным клапаном нормального строения дифференциально метилированные гены между клетками восходящей аорты, крови и кожи участвуют в процессах развития (GO:0051094, $pFDR=0,003$), развитии сердечно-сосудистой системы (GO:0072359, $pFDR=0,005$), подвижности клеток (GO:0048870, $pFDR=0,024$), регуляции внутриклеточной передачи сигналов (GO:1902531, $pFDR=0,028$), адгезии клеток (GO:0007155, $pFDR=0,031$). Атеросклеротические бляшки, локализованные вблизи брахиоцефального ствола восходящей аорты, характеризуются изменением метилирования ДНК в области энхансеров генов наследственных аневризм *NOTCH1* и *GATA5* относительно нерасширенной ее части.

6. Установлены различия уровня метилирования гена нкРНК *NR2F1-AS1* при изолированных и сочетанных формах аневризмы и атеросклероза восходящей аорты: гипометилирование в дилатированной области и атеросклеротической бляшке аорты у пациентов с аневризмой, гиперметилирование в области атеросклеротической бляшки при атеросклерозе аорты без аневризмы.

7. В генах *TBX20*, *ENSG00000289335* и *ENSG00000226063* выявлены регионы с разнонаправленным метилированием ДНК, которые гипометилированы в атеросклеротической бляшке как при изолированном атеросклерозе аорты, так и в сочетании с аневризмой, и гиперметилированы при расслоении восходящей аорты.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Goncharova I.A., Shipulina S.A., Sleptcov A.A., Zarubin A.A., Valiakhmetov N.R., Panfilov D.S., Lelik E.V., Saushkin V.V., Kozlov B.N., Nazarenko L.P., Nazarenko M.S. Identification of variants of uncertain significance in the genes associated with thoracic aortic disease in russian patients with nonsyndromic sporadic subtypes of the

disorder // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25. – № 15. – С. 8315. DOI: 10.3390/ijms25158315 (РИНЦ, УБС1, Scopus Q1, WoS Q2, BAK K1)

2. **Шипулина С.А.**, Гончарова И.А., Слепцов А.А., Панфилов Д.С., Лелик Е.В., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Новые варианты в генах компонентов соединительной ткани у пациента с аневризмой восходящего отдела аорты // Медицинская генетика. – 2024. – Т. 23. – № 6. – С. 35-43. DOI: 10.25557/2073-7998.2024.06.35-43 (РИНЦ, УБС4, BAK K2)

3. Королёва Ю.А., Гончарова И.А., Зарубин А.А., **Шипулина С.А.**, Слепцов А.А., Панфилов Д.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Разнонаправленное изменение уровня метилирования CpG-сайтов в 5' регионе гена *TBX20* в восходящей аорте при атеросклерозе и аневризме // Генетика. – 2024. – №7 (60). – С. 100-106. DOI: 10.31857/S0016675824070091 (РИНЦ, УБС3, Scopus/WoS Q4, BAK K2)

4. Кучер А.Н., **Шипулина С.А.**, Гончарова И.А., Назаренко М.С. Метилирование ДНК при аневризме аорты различной локализации // Генетика. – 2024. – Т. 60. – № 6. – С. 3-21. DOI: 10.31857/S0016675824060018 (РИНЦ, УБС3, Scopus/WoS Q4, BAK K2)

5. Гончарова И.А., Зарубин А.А., **Шипулина С.А.**, Королёва Ю.А., Панфилов Д.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Профиль метилирования ДНК при коморбидности аневризмы и атеросклероза восходящей аорты // Молекулярная биология. – 2024. – Т. 58. – № 3. – С. 414-424. DOI: 10.31857/S0026898424030069 (РИНЦ, УБС3, Scopus Q3, WoS Q4, BAK K2)

6. **Шипулина С.А.**, Гончарова И.А., Панфилов Д.С., Козлов Б.Н., Суходоло И.В., Назаренко М.С. Особенности кальцификации стенки аорты у пациентов с аневризмой восходящего отдела // Якутский медицинский журнал. – 2023. - №4 (84). - С.13-16. DOI: 10.25789/YMJ.2023.84.03 (РИНЦ, УБС4, WoS Q4, BAK K2)

7. Гончарова И.А., Панфилов Д.С., **Беляева С.А.**, Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Структура коморбидности при аневризме восходящей аорты // Российский кардиологический журнал. – 2022. - 27(12):5102. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2022-5102> (РИНЦ, УБС2, Scopus Q4, BAK K1)

Статьи в сборниках и материалах конференций:

8. Гончарова И.А., Зарубин А.А., **Шипулина С.А.**, Панфилов Д.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Метилирование генов некодирующих РНК при аневризме и атеросклерозе восходящей аорты // Тезисы докладов Четырнадцатой международной мультikonференции. – Новосибирск. – 2024. – С. 776-780.

9. **Шипулина С.А.**, Гончарова И.А., Панфилов Д.С., Козлов, Б.Н., Суходоло И.В., Назаренко М.С. Анализ кальцификации стенки аорты у пациентов с аневризмой восходящего отдела // В сборнике материалов Четвертого Всероссийского научно-образовательного форума «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал: материалы». – Томск, 2023. – С. 32.

10. Гончарова И.А., Зарубин А.А., **Шипулина С.А.**, Марков А.В., Назаренко М.С. Связь эпигенетического возраста сосудов и хронологического возраста пациентов, умерших от сердечно-сосудистых заболеваний // В сборнике материалов Четвертого Всероссийского научно-образовательного форума «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал: материалы». – Томск, 2023. – С. 115.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

RRBS – бисульфитное секвенирование с уменьшенной репрезентативностью
VUS – variant of uncertain significance (вариант неопределенного значения)
АВА – аневризма восходящей аорты
АГ – артериальная гипертензия
ГМК – гладкомышечные клетки
ДАК – двустворчатый (бикуспидальный) аортальный клапан
ДМГ (ДМС) – дифференциально метилированные гены (сайты)
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИМ – инфаркт миокарда
КА – коронарные артерии
СА – сонные артерии
СФО – Сибирский федеральный округ
ТАК – трехстворчатый аортальный клапан

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ

634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

Ученому секретарю диссертационного совета 24.1.215.03

д-ру мед. наук Назаренко М.С.

e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru