

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

На правах рукописи



Королёва Юлия Александровна

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ МИКРОРНК И ИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ**

1.5.7 Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Назаренко Мария Сергеевна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Атеросклероз сонных артерий и его осложнения: определение, патогенез на молекулярном уровне	12
1.2 Стабильное и нестабильное состояние атеросклеротической бляшки	16
1.3 Изменение экспрессии микроРНК при нестабильном течении атеросклероза.....	23
1.4 Метилирование регуляторных элементов генов микроРНК при атеросклерозе артерий различной локализации	27
Заключение	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 Дизайн исследования	36
2.2 Характеристика включенных в исследование выборок	37
2.3 Формирование банка тканей и гистологическое исследование атеросклеротических бляшек сонных артерий.....	40
2.4 Анализ уровня метилирования в области генов микроРНК и их регуляторных элементов ..	43
2.4.1 Выделение ДНК.....	43
2.4.2 Бисульфитная модификация ДНК	43
2.4.3 Анализ метилирования ДНК (микрочипы).....	43
2.4.4 Выбор регуляторных элементов генов микроРНК – кандидатов в отношении формирования атеросклеротических бляшек с нестабильным течением для анализа уровня метилирования ДНК.....	46
2.4.5 Анализ метилирования ДНК (таргетное бисульфитное секвенирование).....	51
2.5 Методы исследования для анализа экспрессии микроРНК	55
2.5.1 Выделение РНК	55
2.5.2 Секвенирование микроРНК (miRNA-seq).....	55
2.5.3 Биоинформатический анализ данных.....	56
2.6 Статистический анализ	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	58
3.1 Уровень метилирования регуляторных элементов отдельных генов микроРНК в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах, а также в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий и контрольной группы	58
3.1.1 Анализ уровня метилирования CpG-островка гена <i>MIR10B</i>	58
3.1.2 Анализ уровня метилирования регуляторных элементов гена <i>MIR21</i>	70
3.1.2.1 Предполагаемый промоторный регион гена <i>MIR21</i>	70

3.1.2.2 CpG-островок в области гена <i>MIR21</i>	74
3.1.2.3 «Тело» гена <i>MIR21</i>	77
3.1.3 Анализ уровня метилирования регуляторного элемента E-box гена <i>MIR100</i>	85
3.1.4 Анализ уровня метилирования CpG-островка и гена <i>MIR127</i>	90
3.1.5 Анализ уровня метилирования гена <i>MIR143</i>	102
3.1.5.1 Предполагаемый промоторный регион <i>MIR143HG (CARMN)</i>	102
3.1.5.2 «Тело» гена <i>MIR143</i>	106
3.2 Сравнительный анализ уровня метилирования CpG-сайтов широкого спектра генов микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий в зависимости от степени их нестабильности с помощью метилочипов Illumina	114
3.3 Уровень метилирования CpG-сайтов генов микроРНК и экспрессия данных молекул в атеросклеротических бляшках сонных артерий	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	142
ВЫВОДЫ	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	155
ПРИЛОЖЕНИЕ А	176
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	182
ПРИЛОЖЕНИЕ В	186
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	191
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	203

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Атеросклероз представляет собой комплексное поражение артерий, характеризующееся хроническим воспалением и ремоделированием сосудистой стенки, которое, в итоге, приводит к возникновению атеросклеротических бляшек. На поздних стадиях атеросклеротического поражения формируется нестабильная уязвимая бляшка, разрыв или эрозия которой ведёт к адгезии тромбоцитов, формированию тромбов, окклюзии артерий и острым ишемическим нарушениям, среди которых – ишемическая болезнь сердца, острый инфаркт миокарда и ишемический инсульт, остающиеся ведущей причиной заболеваемости и смертности в мире [Cipollone F. et al., 2011; Volný O. et al., 2015; Puig N. et al., 2020; Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021; Björkegren J.L.M., Lusis A.J., 2022].

Показано, что практически во все биологические процессы на всех стадиях развития атеросклероза (от ранней дисфункции эндотелия до эрозии или разрыва нестабильной атеросклеротической бляшки) вовлечены микроРНК – малые регуляторные биомолекулы, которые представляют собой некодирующие одноцепочечные РНК длиной от 16 до 27 нуклеотидов [Madrigal-Matute J. et al., 2013; Andreou I. et al., 2015; Feinberg M.W., Moore K.J., 2016; Santovito D. et al., 2016; Laffont B., Rayner K.J., 2017; Кучер А.Н., Назаренко М.С., 2017; Lu Y. et al., 2018; Fasolo F. et al., 2019; Назаренко М.С. с соавт., 2022; Schober A. et al., 2022; Badacz R. et al., 2022; Vartak T. et al., 2022]. Механизм действия микроРНК заключается, преимущественно, в негативной регуляции экспрессии генов через подавление трансляции мРНК-мишеней или деградацию мРНК в цитоплазме клеток [Ji R. et al., 2007; Friedman R.C. et al., 2009; Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., 2011; Lu Y. et al., 2018].

Экспрессия самих микроРНК контролируется, в том числе, посредством эпигенетических механизмов, одним из которых является метилирование CpG-островков (скоплений CpG-динуклеотидов), перекрывающих промоторные участки генов или локализованных рядом с сайтом начала транскрипции микроРНК [Логинов В.И. с соавт., 2015; Morales S. et al., 2017]. Обычно CpG-островки гипометилированы, а их избыточное гиперметилирование подавляет транскрипцию и, следовательно, ингибирует экспрессию соответствующих генов [Chhabra R., 2014; Ma J. et al., 2014; Piletič K., Kunej T., 2016].

Большинство работ в отношении анализа метилирования ДНК в регуляторных элементах генов микроРНК выполнены в отношении онкологических заболеваний. Исследований, в которых анализируется связь изменения метилирования в области генов микроРНК при других многофакторных заболеваниях, в том числе при атеросклерозе, существенно меньше [Fernández-Sanlés A. et al., 2017; Tabaei S., Tabaei S.S., 2019; Huan T. et al., 2020; Sharma A.R. et al., 2020; Vancheri C. et al., 2023; Ciu C. et al., 2024]. При этом большая часть данных экспериментов

проведена *in vitro* на различных типах клеток и в моделях на животных. Клинические исследования, рассматривающие вариабельность экспрессии микроРНК при нестабильности атеросклеротических бляшек у человека немногочисленны, а анализ уровня метилирования регуляторных элементов генов микроРНК, выявленных в данных исследованиях, при атеросклеротическом поражении сонных артерий практически не проводился.

В связи с этим, актуальным представляется выявление регуляторных элементов генов микроРНК, экспрессия которых связана с нестабильностью атеросклеротических бляшек, и анализ их метилирования в атеросклеротических бляшках и лейкоцитах крови при осложненном течении атеросклероза сонных артерий. Выяснение молекулярных механизмов, приводящих к нестабильности атеросклеротических бляшек сонных артерий, может открыть новые возможности для профилактики и лечения острых сосудистых событий.

Степень научной разработанности темы исследования

В настоящее время многие обзоры и экспериментальные статьи посвящены изучению роли микроРНК в развитии и прогрессии атеросклероза [Cipollone F. et al., 2011; Raitoharju E. et al., 2011; Madrigal-Matute J. et al., 2013; Santovito D. et al., 2013; Kumar S. et al., 2014; Andreou I. et al., 2015; Volný O. et al., 2015; Feinberg M.W., Moore K.J., 2016; Santovito D. et al., 2016; Laffont B., Rayner K.J., 2017; Lu Y., et al., 2018; Collura S. et al., 2020; Назаренко М.С. с соавт., 2022; Schober A. et al., 2022; Badacz R. et al., 2022; Vartak T. et al., 2022]. Роль микроРНК при патологии заключается преимущественно в регуляции уровня синтезируемого белка во всех типах клеток, либо в опосредовании межклеточных коммуникаций [Madrigal-Matute J. et al., 2013; Volný O. et al., 2015; Laffont B., Rayner K.J., 2017]. В зависимости от их влияния на прогрессирование атеросклероза, микроРНК можно разделить на проатерогенные, антиатерогенные или обладающие двойственной ролью [Kumar S. et al., 2014; Volný O. et al., 2015].

Для отдельных микроРНК показано изменение уровня экспрессии в поражённых атеросклерозом сонных артериях относительно интактных артерий (miR-21, miR-145 и miR-221) [Raitoharju E. et al., 2011; Cao J. et al., 2014; Markus B. et al., 2016], а также связь с нестабильностью атеросклеротических бляшек у человека (miR-21, miR-100, -127, -133a/b, -143/145, -221) [Cipollone F. et al. 2011; Bazan H.A. et al., 2015; Maitrias P. et al., 2015; Markus B. et al., 2016; Jin H. et al., 2018; Katano H. et al., 2018; Wang H. et al., 2019].

Экспрессия микроРНК контролируется, в том числе, посредством метилирования скоплений CpG-динуклеотидов в области промоторов генов микроРНК или локализованных рядом с сайтом начала транскрипции микроРНК [Baer C. et al., 2013; Логинов В.И. с соавт., 2015; Morales S. et al., 2017]. В полногеномных исследованиях при атеросклерозе артерий различной локализации, как правило, анализируется уровень метилирования CpG-сайтов, расположенных в промоторах белок-кодирующих генов в клетках крови [Istas G. et al., 2017; Liu Y. et al., 2017;

Soriano-Tárraga C. et al., 2018; Sharma A. R. et al., 2020]. Меньшее внимание уделяется изменению метилирования ДНК в тканях артерий при их атеросклеротическом поражении [Castillo-Díaz S.A. et al., 2010; Fernandez A.F. et al., 2011; Zaina S. et al., 2014; Aavik E. et al., 2015; Nazarenko M.S. et al., 2015; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021]. В пораженных атеросклерозом тканях артерий относительно интактных тканей сосудов было выявлено как снижение уровня метилирования в области, охватывающих гены микроРНК [Марков А.В. с соавт., 2014; Nazarenko M. S. et al., 2015, Aavik E. et al., 2015], так и повышение [Ehrlich K.C. et al., 2019]. В то же время данные по анализу уровня метилирования регуляторных элементов генов микроРНК при нестабильности атеросклеротических бляшек сонных артерий человека в литературных источниках отсутствуют. Неясным остается вопрос о связи уровня метилирования генов микроРНК и экспрессии зрелых молекул. Выявление закономерностей изменения уровня метилирования генов микроРНК в клетках и тканях пациентов с клинически выраженным атеросклерозом может дать основу для установления потенциальных биомаркеров прогноза и диагностики осложненного течения данной патологии.

Цель исследования

Охарактеризовать метилирование в генах микроРНК и их регуляторных элементах при формировании и нестабильном течении клинически выраженного атеросклероза сонных артерий.

Задачи исследования

1. Проанализировать уровень метилирования CpG-сайтов отдельных генов микроРНК (miR-10b, miR-21, miR-143/-145, miR-100 и miR-127) и их регуляторных элементов в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах, а также в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий и контрольной группы с помощью массового параллельного секвенирования.
2. Оценить связь метилирования анализируемых регионов генов микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий и лейкоцитах крови индивидов с развитием клинически выраженного атеросклероза, а также с патогенетически значимыми клиническими и гистологическими параметрами нестабильности атеросклеротических бляшек.
3. Выявить дифференциально метилированные CpG-сайты в генах микроРНК и их регуляторных элементах в зависимости от клинической и гистологической нестабильности атеросклеротических бляшек сонных артерий с помощью метилочипов Illumina.

4. Проанализировать связь экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий и уровня метилирования анализируемых CpG-сайтов в генах микроРНК и их регуляторных элементах.

Научная новизна

Впервые оценена связь метилирования регуляторных регионов широкого спектра генов микроРНК с развитием и осложненным течением атеросклероза в отношении острых сосудистых событий и гистологических параметров нестабильной атеросклеротической бляшки сонных артерий. Получены новые данные о тканеспецифичности метилирования регуляторных элементов и «тел» генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR100*, *MIR127* и *MIR143* в сосудах (сонные артерии, большие подкожные вены) и лейкоцитах крови у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий. Установлены разнонаправленные корреляции между метилированием регуляторных регионов данных генов в клетках атеросклеротических бляшек и лейкоцитах крови с отдельными патогенетически значимыми признаками атеросклероза и его осложненного течения. Выявлена ассоциация атеросклеротического поражения и его нестабильного течения с преимущественным гипометилированием в области широкого спектра генов микроРНК и их регуляторных элементов в клетках сонных артерий. Показано, что микроРНК, в генах и/или регуляторных элементах которых изменяется уровень метилирования ДНК при нестабильном течении атеросклероза, взаимодействуют с транскрипционным фактором p53, а их мишени участвуют в регуляции процессов развития (в т.ч. программируемой клеточной гибели), транскрипции, ответе на эндогенные стимулы, фосфорилировании белка, метаболизме липидов, организации внеклеточного матрикса и фокальной адгезии. Установлена корреляция уровня метилирования в области генов микроРНК и экспрессии ближайших микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек — отрицательная для регуляторных элементов *MIR10B*, *MIR143*, *MIR23B*, но положительная для «тела» гена некодирующей РНК *CARMN (MIR143HG)*. В клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий в промоторах генов *MIR10B*, *MIR143*, *MIR23B* идентифицированы cis-miR-eQTMs, которые могут быть значимы в отношении формирования и нестабильного течения атеросклероза, действуя через регуляторные оси miR-10b-5p/KLF4, miR-10b-5p/NCOR2, miR-10b-5p/ABCA1 и miR-27b-3p/ABCA1, miR-27b-3p, а также miR-27b-3p/SEMA6A и miR-27b-3p/ROR1.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в результате выполнения диссертационного исследования фундаментальные знания расширяют имеющиеся представления о вариабельности метилирования регуляторных элементов генов микроРНК в атеросклеротических бляшках и

лейкоцитах периферической крови при осложненном течении атеросклероза сонных артерий. Выявленные корреляции между метилированием регуляторных регионов генов микроРНК, экспрессией микроРНК и гистологически/клинически значимыми признаками развития и осложненного течения атеросклероза дают основание для проведения дополнительных исследований с целью установления причинно-следственных взаимосвязей между ними и поиска биомаркеров развития острых сосудистых событий. Полученные данные о связи изменения уровня метилирования генов микроРНК и их регуляторных элементов с вариабельностью экспрессии этих микроРНК при формировании и нестабильном течении клинически выраженного атеросклеротического процесса, а также данные о предполагаемых молекулярных путях и регуляторных осях, в которых участвуют микроРНК и их мРНК-мишени, могут быть использованы в целях поиска новых мишеней для таргетной терапии атеросклероза. Сформированная коллекция биологического материала тканей сосудов и клеток крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий может быть использована для проведения дальнейших исследований в области генетики сердечно-сосудистых заболеваний.

Методологическая основа диссертационного исследования

Научная идея исследования заключается в выявлении регуляторных элементов генов микроРНК и установлении рисунка метилирования этих элементов при формировании и нестабильном течении клинически выраженного атеросклеротического процесса в сонных артериях. Молекулярно-генетическое исследование проведено в лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (руководитель – д.м.н., Назаренко М.С.). Перед началом работы было получено разрешение комитета по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

В работе использованы современные методы клинического и параклинического обследования пациентов, гистологического анализа тканей артерий, молекулярно-генетического, статистического и биоинформатического анализа. Молекулярно-генетические методы включали таргетное бисульфитное секвенирование, секвенирование микроРНК и гибридизацию на метилочипах. В ходе выполнения диссертационной работы использован широкий спектр методов биоинформатического и статистического анализа данных, реализованных в программной статистической среде R.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Тканеспецифичность метилирования генов микроРНК выражается в более высоком уровне метилирования *MIR21*, *MIR127*, регуляторных элементов *MIR100* и *MIR143* и в более низком уровне метилирования *MIR10B* и *MIR143* в лейкоцитах периферической крови по сравнению с тканями сосудов, независимо от наличия атеросклероза сонных артерий. В

пораженных атеросклерозом сонных артериях отмечается снижение метилирования в гене *MIR10B*, в «теле» *MIR21* и *MIR143*, а также в области регуляторного элемента E-box гена *MIR100* по сравнению с интактными сосудами.

2. Уровень метилирования ДНК в области регуляторных элементов и «тел» генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR143* и *MIR127* в атеросклеротической бляшке ассоциирован с отдельными параметрами гистологической нестабильности, а в лейкоцитах периферической крови пациентов – с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и его патогенетически значимыми признаками.

3. Клинически и гистологически нестабильные атеросклеротические бляшки сонных артерий по сравнению с интактными артериями характеризуются гипометилированием CpG-сайтов в области генов и регуляторных элементов микроРНК, которые взаимодействуют с транскрипционным фактором p53, а их мишени вовлечены в широкий спектр биологических процессов и сигнальных путей: процессы развития (в том числе программируемая клеточная гибель), транскрипция, ответ на эндогенные стимулы, фосфорилирование белка, метаболизм липидов, организация внеклеточного матрикса и фокальная адгезия.

4. В атеросклеротических бляшках сонных артерий в генах *MIR10B*, *MIR143*, *MIR143HG* (*CARMN*) и *MIR23B* выявлены cis-miR-eQTMс с отрицательной и положительной корреляцией уровня метилирования ДНК и экспрессии ближайших микроРНК, потенциально вовлеченных в формирование и нестабильное течение атеросклероза через регуляторные оси miR-10b-5p/KLF4, miR-10b-5p/NCOR2, miR-10b-5p/ ABCA1 и miR-27b-3p/ABCA1, а также miR-27b-3p/SEMA6A и miR-27b-3p/ROR1.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Высокая степень достоверности данных, полученных в ходе выполнения настоящей работы, обеспечивается применением современных молекулярно-генетических методов (таргетного бисульфитного секвенирования, метилочипов, секвенирования микроРНК), привлечением внешних данных из открытых источников и баз, использованием биоинформатических методов исследования с верификацией полученных данных, а также применением релевантных методов математической статистики при соблюдении необходимых требований к условиям их применения. Для выполнения работы привлечены такие базы данных и онлайн-инструменты как электронный репозиторий GEO, базы данных FANTOM5, miRDB, TRmir, TarBase v9.0, TargetScan v8.0, miRTarBase 2022, HMDD v3.0-4.0, онлайн-инструменты MethPrimer 2, BiSearch ePCR, TAM 2.0, Metascape, DIANA-miRPath v4.0, база данных Gene Ontology (GO), классификатор сигнальных и метаболических путей KEGG, портал GTEx v.8 и интерактивное веб-приложение PlaqView, содержащее наборы данных по транскриптому отдельных клеток.

Личный вклад автора

Основные результаты настоящего исследования получены автором самостоятельно. Изучение литературы по теме диссертации, выбор исследуемых регионов, проведение полимеразной цепной реакции, анализ и статистическая обработка результатов секвенирования, анализ внешних данных из открытых источников и баз выполнены лично автором. Соискатель участвовал на всех этапах обсуждения полученных результатов, их публикации и лично представлял результаты исследования на научных конференциях. Обобщение результатов и написание текста диссертации также проведено лично автором.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертационной работы были представлены на XI научной конференции «Генетика человека и патология», посвященной 35-летию НИИ медицинской генетики» (Томск, 2017); Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (Томск, 2018); XXV межрегиональной научно-практической конференции «Современные молекулярно-биологические и генетические технологии в медицинской практике» (Новосибирск, 2018); I Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2018); I Всероссийском конгрессе с международным участием «Физиология и тканевая инженерия сердца и сосудов: от клеточной биологии до протезирования» с сателлитным симпозиумом молодых ученых «Перспективы физиологии сердца и сосудов» (Кемерово, 2019), XII научной конференции «Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики» (Томск, 2019), II Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (онлайн участие, 2020), Втором Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (онлайн участие, 2021), III Всероссийском конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (онлайн участие, 2022), XIII научной конференции «Генетика человека и патология» (Томск, 2022), Четвёртом Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (онлайн участие, 2023).

Стендовый доклад на XI научной конференции «Генетика человека и патология» (2017 г.) оценен дипломом за I место; выступления на II и IV форумах «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (2021 и 2023 г., соответственно) отмечены дипломами за III место и I место в конкурсе молодых ученых.

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РНФ № 16-15-10150 и РФФИ № 16-04-01481 А.

Публикации

По теме исследования опубликовано 34 работы, в том числе 7 статей в журналах Перечня ВАК РФ, 8 статей в журналах, реферируемых в базе данных Web of Science и Scopus, 11 статей в журналах, индексируемых в базе данных РИНЦ, 23 публикации – статьи в сборниках и тезисы конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 203 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и обсуждение), выводы, список литературы и 5 приложений. Работа иллюстрирована 46 рисунками, 12 таблицами. Библиография включает 278 источников, из них 19 источников отечественной и 259 источников зарубежной литературы, а также 12 интернет-ресурсов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Атеросклероз сонных артерий и его осложнения:

определение, патогенез на молекулярном уровне

Атеросклероз (греч. *athere* - каша и *sclerosis* - уплотнение) – это системное заболевание, связанное с поражением крупных и средних артерий эластического и мышечного типа [Ross R. 1999]. Данный патологический процесс лежит в основе наиболее частых причин смертности и инвалидности, таких как ишемическая болезнь сердца, ишемический инсульт, хронические формы недостаточности кровоснабжения мозга, периферические тромбозы и др. [Захаров В.В., 2007].

Согласно определению ВОЗ, атеросклероз – это вариабельная комбинация изменений внутренней оболочки (интимы) артерий, включающая накопление липидов, сложных углеводов, фиброзной ткани, компонентов крови, кальцификацию и сопутствующие изменения средней оболочки (медии) [Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021]. В результате прогрессирования атеросклеротического поражения происходит постепенное стенозирование коронарных, церебральных и других артерий [Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021].

Из магистральных артерий головы наиболее часто атеросклероз поражает сонные артерии. Гемодинамически значимый атеросклеротический стеноз сонных артерий является одной из основных причин цереброваскулярных расстройств, таких как транзиторные ишемические атаки, ишемический инсульт и дисциркуляторная энцефалопатия [Захаров В.В., 2007]. Следует отметить, что в МКБ 11го пересмотра атеросклероз сонных артерий как отдельная нозология не рассматривается (в отличие от атеросклероза коронарных артерий под кодовым обозначением BA52). Однако выделяют асимптоматический стеноз внечерепного отдела сонной артерии (BD55) и ишемический инсульт, возникший в результате атеросклеротического поражения внутренней сонной артерии (8B11.0 и 8B11.1) [<https://icd.who.int/browse/2024-01/mms/ru>].

Ишемический инсульт, связанный с атеросклерозом магистральных артерий головы, возникает в результате их полной окклюзии или эмболии. Полная окклюзия крупной артерии часто развивается постепенно, в течение нескольких часов (так называемый прогрессирующий инсульт) и приводит к формированию крупных инфарктов коры головного мозга со значительной неврологической симптоматикой [Захаров В.В., 2007]. На ишемические инсульты приходится 80% от общего числа инсультов, при этом инсульт является основной причиной смертности, инвалидизации и деменции во всем мире [Puig N. et al., 2020; Björkegren J. L. M., Lüscher A. J., 2022] и второй по значимости причиной смертности в Российской Федерации [Какорина Е.П., Никитина С.Ю., 2019]. Ежегодно в России инсульт поражает более 450 тыс. человек. Из общего числа заболевших одна треть погибает, а ещё треть утрачивает трудоспособность и возможность вести активную социальную жизнь [Олейникова Т.А., 2020; Милосердов М.А. с соавт., 2022].

Транзиторная ишемическая атака (ТИА) – это преходящее нарушение мозгового кровообращения, в основе которого лежит локальная ишемия мозга, приводящая к формированию кратковременного неврологического дефицита. Симптомы ТИА проходят в течение 24 часов (самостоятельно или на фоне терапии); в противном случае речь идет об ишемическом инсульте. Риск ТИА увеличивается при сочетании гемодинамически значимого атеросклероза и системных гемодинамических расстройств (падение артериального давления, сердечного выброса), которые приводят к декомпенсации церебрального кровотока. Кроме того, ТИА могут развиваться в результате микроэмболии фрагментами атеросклеротической бляшки или тромботическими массами при нарушении целостности сосудистой стенки в области стеноза [Захаров В.В., 2007].

Наряду с острыми нарушениями атеросклероз является одной из основных причин хронической ишемии мозга (ХИМ), которая также обозначается терминами «дисциркуляторная энцефалопатия», «хроническая сосудистая мозговая недостаточность», «ишемическая болезнь мозга», «ангиоэнцефалопатия», «цереброваскулярная болезнь» [Захаров В.В., 2007; Кичерова О.А. с соавт., 2019]. Считается, что ХИМ – термин патофизиологический, который не отражает клинического аспекта патологического состояния, в то время как термин «дисциркуляторная энцефалопатия» является клиническим.

Дисциркуляторная энцефалопатия (ДЭП) – хроническое прогрессирующее очаговое или диффузное поражение головного мозга, проявляющееся неврологическими и психическими расстройствами, которое обусловлено хронической сосудистой мозговой недостаточностью и/или повторными острыми нарушениями мозгового кровообращения (ОНМК). Клиническая картина ДЭП характеризуется прогрессирующим развитием, и в течении данного заболевания выделяют три основных стадии. I стадия характеризуется рассеянными органическими церебральными микросимптомами и отсутствием отчетливых неврологических симптомов; для II стадии отмечаются постоянные субъективные симптомы, органические очаговые или рассеянные функционально значимые церебральные симптомы, а также умеренные когнитивные расстройства. На III стадии развиваются значительные двигательные нарушения, расстройства высших когнитивных функций нарастают, нередко до уровня деменции (т.н. сосудистая деменция) [Кичерова О.А. с соавт., 2019].

В настоящее время рассматривают шесть последовательных стадий развития атеросклеротической бляшки (АСБ), что совпадает с гистологической классификацией АСБ, предложенной Американской ассоциацией изучения сердечных заболеваний (American Heart Association, АНА) [Stary H.C. et al., 1995a; Stary H.C. et al., 1995b]. На начальных стадиях происходит постепенное накопление липидов (стадия 1), сначала внутриклеточно (стадия 2), затем – внеклеточно, с формированием липидного пятна/полоски, не возвышающихся над

поверхностью сосудистой стенки (стадия 3) [Захаров В.В., 2007; Рагино Ю.И. с соавт., 2013]. На стадии 4 формируется так называемая молодая атеросклеротическая бляшка с крупным, вязким липидным ядром, представляющим собой скопление липидно-белкового детрита [Stary H.C. et al., 1995a; Stary H.C. et al., 1995b; Рагино Ю.И. с соавт., 2013]. Затем следует стадия 5, характеризующаяся образованием фиброзной капсулы бляшки; далее развивается стадия 6 – нестабильная уязвимая бляшка, которая, при неблагоприятном исходе, осложняется трещиной, надрывом или разрывом фиброзной капсулы бляшки со стороны просвета сосуда и развитием тромбоза с острыми клиническими проявлениями [Рагино Ю.И. с соавт., 2013; Chiorescu R.M. et al., 2022].

Стенка сосуда состоит из монослоя клеток эндотелия (КЭ), граничащих с просветом сосуда. Под ним находится интима – в основном бесклеточный слой, состоящий из гликозаминогликанов и коллагена. Далее идут слои гладкомышечных клеток (ГМК) – медиа, и, наконец, слой фиброзных волокон – адвентиция [Björkegren J. L. M., Lusis A. J., 2022]. На стадии развития липидного пятна повышенный уровень липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в крови и другие факторы сердечно-сосудистого риска, такие как метаболический синдром или курение, способствуют утрате целостности эндотелия и активации КЭ. Это позволяет липидам накапливаться в интиме артерий, где они окисляются и поглощаются ГМК и макрофагами, вызывая образование пенистых клеток [Björkegren J. L. M., Lusis A. J., 2022; Gerhardt T. et al., 2022]. По мере прогрессирования патологического процесса ГМК в медию переходят из сократительного в пролиферативное состояние и мигрируют в интиму, где синтезируют коллаген и протеогликаны, изолируя липидное ядро от окружающих тканей фиброзной капсулой. Участок фиброзной капсулы бляшки, покрывающий ее со стороны просвета сосуда, получил название «фибровая крышка бляшки» [Рагино Ю.И. с соавт., 2013; Puig N. et al., 2020; Björkegren J. L. M., Lusis A. J., 2022]. Считается, что ГМК являются единственными клетками, способными синтезировать компоненты фиброзной крышки, отделяющей циркулирующую кровь от внутренней тромботической части бляшки [O'Sullivan J.F. et al., 2011].

Последующие апоптоз и некроптоз клеток, осложненные неэффективным эффероцитозом (удалением мертвых клеток фагоцитами), приводят к образованию богатого липидами некротического ядра и продукции тромботического тканевого фактора. Воспалительные процессы внутри АСБ вызывают кальцификацию бляшки, что снижает её механическую стабильность [Gerhardt T. et al., 2022]. Индуцируемые гипоксией факторы, которые вырабатываются клетками, содержащимися в некротическом ядре, способствуют патологической неоваскуляризации атеросклеротического очага. Вновь образующиеся сосуды отличаются повышенной проницаемостью и склонностью к образованию микротромбов и разрывам [Рагино Ю.И. с соавт., 2013; Puig N. et al., 2020; Gerhardt T. et al., 2022].

Накопление липидов в ядре АСБ сопровождается увеличением ее размеров, сужением просвета артерии и нарушением кровотока [Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021]. Закрытие просвета сосуда на 70% и более считается гемодинамически значимым стенозом, при котором риск ишемических осложнений очень высок [Захаров В.В., 2007]. При этом, в отличие от коронарных артерий, наличие атеросклеротической бляшки в сонных артериях всегда приводит к редуцированию просвета сосуда [Поморцев А.В. с соавт., 2020]. Степень стенозирования сосуда более 50%, вызывающая значимые локальные и системные гемодинамические нарушения является показанием к хирургическому лечению [Рагино Ю.И. с соавт., 2013].

Кроме того, при увеличении размеров АСБ её фиброзная покрышка под действием специфических энзимов (эластаз, металлопротеиназ) истончается и при определенных условиях может разорваться [Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021]. Разрыв бляшки сопровождается активацией коагуляционного каскада крови, агрегацией тромбоцитов с образованием тромба, блокирующего просвет сосуда, и появлением характерных клинических признаков ишемии органа, кровоснабжаемого пораженной артерией [Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021]. Также при разрыве АСБ происходит выход на поверхность потенциально эмбологенного материала (кристаллов холестерина, атероматозных масс, кальцификатов), следовательно, у таких пациентов намного выше риск развития нарушений мозгового кровообращения [Поморцев А.В. с соавт., 2020; Gerhardt T. et al., 2022].

1.2 Стабильное и нестабильное состояние атеросклеротической бляшки

Разрыв АСБ с последующим тромбообразованием и эмболией дистальных отделов сосуда является наиболее частым механизмом, участвующим в патогенезе осложнений атеросклеротического поражения сонных артерий [Puig N. et al., 2020]. В связи с этим, клинически пациенты подразделяются на симптоматических и бессимптомных (Таблица 1). Симптоматические пациенты имеют в анамнезе острое сосудистое событие (ишемический инсульт, транзиторная ишемическая атака), ипсилатерально анализируемой атеросклеротической бляшке сонных артерий, не ранее, чем за 6 месяцев до исследования [Bazan H.A. et al., 2015; Zaina S. et al., 2015; Markus B. et al., 2016; Li J, et al., 2019; Wang H. et al., 2019]. Бессимптомные пациенты не имеют острых сердечно-сосудистых событий или каких-либо других соответствующих симптомов в течение 6 месяцев до плановой операции – каротидной эндартерэктомии [Halliday A. et al., 2010].

Нестабильные, склонные к разрыву, АСБ обычно обладают специфическими морфологическими особенностями, которые можно выявить с помощью методов неинвазивной визуализации, включая ультразвуковое исследование (УЗИ), реже —компьютерную томографию, магнитно-резонансную томографию, в том числе, оптическую когерентную томографию (Таблица 1) [Puig N. et al., 2020].

Для клиницистов параметры стабильности/нестабильности АСБ, определяемые методом УЗИ, играют важную роль (не меньшую, а, по мнению отдельных авторов, даже более значимую, чем степень стенозирования артерии) при определении показаний к реконструктивному хирургическому вмешательству и выборе метода его выполнения, особенно в случае бессимптомных пациентов [Чечеткин А.О. с соавт., 2017, Поморцев А.В. с соавт., 2020].

При ультразвуковой диагностике АСБ определяется как локальная структура, выступающая в просвет артерии на 0,5 мм, или на 50% больше величины толщины комплекса интима-медия прилегающих участков артерий, или имеющая толщину более чем 1,5 мм, измеренную от границы медиа-адвентиция до границы интима-просвет. Увеличение толщины комплекса интима-медия более 1,0 мм, но менее 1,5 мм считается начальными признаками атеросклероза [Поморцев А.В. с соавт., 2020].

Таблица 1. Клинические, морфологические и биохимические маркеры нестабильности атеросклеротической бляшки сонных артерий

Показатель	Критерии /примеры
Клинические маркеры	Ишемический инсульт/ТИА в анамнезе (не ранее 6 месяцев до исследования), ипсилатерально анализируемой атеросклеротической бляшке сонных артерий.
Морфология (УЗИ)	• неоваскуляризация, • площадь атеросклеротической бляшки ($>90-95 \text{ мм}^2$), • площадь околопросветной гипоехогенной области (juxtaluminal black area) $>6-8 \text{ мм}^2$, • показатель медианы серой шкалы (Grey-scale median, GSM) <25, • индекс объема атеросклеротической бляшки (plaque volume index) $>0,6 \text{ см}^3$, • максимальное значение напряжения в покрышке АСБ $>300 \text{ кПа}$.
Морфология (гистология)	• фиброатерома с тонкой фиброзной покрышкой ($<20-200 \text{ мкм}$), • признаки воспаления: инфильтрация покрышки активированными Т-лимфоцитами и макрофагами, крупное липидное ядро ($>24-50\%$ от объема АСБ), пенистые клетки (макрофаги) в ядре, • снижение числа ГМК в фиброзной покрышке АСБ, • некротическое ядро, • обильная неоваскуляризация (высокая плотность микрососудов в АСБ), • внутрибляшечные кровоизлияния, • кальцификация, • тромбы на поверхности АСБ, • разрыв покрышки АСБ, • эрозия АСБ (оголенная поверхность интимы без разрыва атеросклеротической бляшки).
Биохимические сывороточные маркеры	• высокий уровень показателей воспаления: С-реактивный белок, интерлейкины, пентраксин-3 (PTX-3), фактор некроза опухоли (TNFα) и др., • высокий уровень показателей липидного обмена: oxLDL, липопротеин (а), липопротеинлипаза A2 (Lp-PLA2), • низкий уровень показателей липидного обмена: липопротеины высокой плотности (ЛПВП), триглицериды, • снижение уровня ингибитора активатора плазминогена (PAI-1), • высокий уровень металлопротеиназ, остеопротегерина, неоптерина, лептина, • низкий уровень анти-воспалительного адипокина оментин-1, • изменение уровня адипонектина (<i>данные противоречивы</i>), • повышение уровня микровезикул эндотелиального происхождения, • изменение экспрессии микроРНК (<i>в зависимости от конкретного типа молекул</i>).

Таблица составлена по источникам: [Golledge J. et al., 2000; Koenig W., Khuseynova N, 2007; Peeters W. et al., 2009; Sugioka K. et al. 2010; O'Sullivan J.F. et al., 2011; Pelisek J. et al., 2012; Salem M.K. et al., 2014; Ammirati E. et al., 2015; Bazan H.A. et al., 2015; Gijzen F.J. et al., 2015; Kolodgie F.D. et al., 2017; Maitrias P. et al., 2017; Pasterkamp G. et al., 2017; Katsiki N. et al. 2018; Li J. et al., 2019; Libby P. et al., 2019; Wang H. et al., 2019; Martinez E., et al., 2020; Puig N. et al., 2020; Raju S. et al., 2020; Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021; Fahed A.C., Jang I.K., 2021; Ignatyev I.M. et al., 2021; Nie P. et al., 2021; Chiorescu R.M. et al., 2022; Gerhardt T. et al., 2022].

Согласно А.В. Поморцеву с соавт., единственным объективным признаком нестабильности атеросклеротической бляшки при ультразвуковом исследовании является ее неоваскуляризация, т.е. высокая плотность микрососудов в АСБ. Неоваскуляризация коррелирует с наличием локального воспалительного процесса внутри бляшки, что повышает риск кровоизлияния и разрыва атеросклеротической бляшки [Поморцев А.В. с соавт., 2020]. В то же время, другие авторы указывают в качестве УЗИ-критериев нестабильности АСБ ее площадь, превышающую 90-95 мм², площадь околопросветной гипоехогенной области (juxtaluminal black area) превышающую 6-8 мм², показатель медианы серой шкалы (Grey-scale median, GSM) менее 25 и индекс объема бляшки более 0,6 см³ [Salem M.K. et al., 2014; Ignatyev et al., 2021], а также максимальное значение напряжения в покрышке бляшки >300 кПа [Gijssen F.J. et al., 2015].

Гистологически стабильность/нестабильность АСБ оценивается полуколичественным методом, включающим такие показатели как наличие кровоизлияний в бляшку, тромбов, кальцификации, наличие и размер липидного ядра, доля фиброзной ткани, число новых сосудов, пенистых клеток, воспалительных клеток (макрофагов или лимфоцитов), инфильтрацию фиброзной покрышки макрофагами или лимфоцитами и, наконец, наличие разрывов фиброзной покрышки [Golledge J. et al., 2000; Lovett J.K. et al., 2004; Salem M.K. et al., 2014; Kolodgie F.D. et al., 2017; Ignatyev I.M. et al., 2021]. Стабильные атеросклеротические бляшки характеризуются толстой, плотной фиброзной покрышкой, богатой коллагеном. При медленном росте в течение многих лет они могут не оказывать существенного влияния на кровоснабжение органов [Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021].

Нестабильные атеросклеротические бляшки сонных артерий преимущественно представляют собой фиброатеромы с тонкой (менее 20-200 мкм) фиброзной покрышкой и крупным липидным ядром (более 24–50% от объема АСБ). Липидное ядро заполнено пенистыми клетками макрофагального происхождения и дебрисом, накопленным в результате их гибели. Нередко в ядре АСБ отмечается воспаление или некроз. Также отмечают обильную неоваскуляризацию атеросклеротических бляшек, внутрибляшечные кровоизлияния и кальцификацию [Salem M.K. et al., 2014; Gijssen F.J. et al., 2015; Kolodgie F.D. et al., 2017; Pasterkamp G. et al., 2017; Libby P. et al., 2019; Puig N. et al., 2020; Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021; Ignatyev I.M. et al., 2021; Gerhardt T. et al., 2022]. В то же время отдельные авторы указывают, что неоваскуляризация и кальцификация не связаны с нестабильностью АСБ [Zheng H. et al., 2017].

Внутри нестабильной АСБ отмечается развитие воспаления – присутствие воспалительных клеток. Тонкая фиброзная покрышка также часто инфильтрирована активированными Т-клетками и макрофагами (≥ 50 воспалительных клеток в поле зрения при микроскопии), что свидетельствует о важной роли воспаления в разрыве бляшки [Salem M.K.

et al., 2014; Kolodgie F.D. et al., 2017; Puig N. et al., 2020; Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021; Fahed A.C., Jang I.K., 2021]. Однако в ряде работ отмечается, что воспалительная инфильтрация в АСБ чаще связана с их «заживлением», а не с разрывом [Virmani R. et al., 2006; Arbab-Zadeh A. and Fuster V., 2015; Nidorf et al., 2023]. В то же время АСБ с разрывом характеризуются «активным» воспалением, сопровождающим истончение фиброзной покрышки, а стабильные АСБ – хроническим воспалительным инфильтратом [Spagnoli L.G., 2007; Libby P., 2021]. Кроме того, в фиброзной покрышке АСБ отмечается снижение числа ГМК, что способствует ее истончению и разрыву [O'Sullivan J.F. et al., 2011]. Нестабильность АСБ намного увеличивает риск разрыва её покрышки, при котором тромбогенный материал, находящийся внутри бляшки, контактирует с кровью и факторами свёртывания в ней, в результате чего образуется тромб, который провоцирует ишемические осложнения [Libby P. et al., 2019].

В то же время, поскольку вышеописанный полуколичественный метод – «золотой стандарт» гистологической оценки нестабильности атеросклеротических бляшек – основан исключительно на визуальной оценке, Zheng с соавт. (2017, 2019) разработали новый количественный метод оценки характеристик АСБ, обеспечивающий большую точность и достоверность. В дополнение к 10 параметрам, оцениваемым полуколичественным методом, новый метод учитывает другие важные характеристики АСБ, включая глубину эрозии, среднюю и минимальную толщину фиброзной покрышки, лейкоциты субпопуляций CD68+ (макрофаги/пенистые клетки) и CD3+ (лимфоциты) как в фиброзной покрышке, так и в самой бляшке [Zheng et al., 2017; Zheng et al., 2019].

В последнее время, важной особенностью атеросклеротических бляшек считается неизвестная ранее клеточная гетерогенность как воспалительных, так и гладкомышечных клеток, оцененная с помощью анализа транскриптома отдельных клеток. В частности, при использовании этого метода установлено, что фенотипы клеток стенки артерий очень пластичны, они трансформируются и взаимодействуют друг с другом вместе с прогрессированием атеросклероза [Harman J.L., Jørgensen H.F., 2019; Yurdagul A., 2022; Grootaert M.O.J., Bennett M.R., 2021; Björkegren J.L.M., Lusis A.J., 2022; Ge P. et al., 2023; Weber C. et al., 2023]. Среди лейкоцитов наиболее многочисленной популяцией в очаге атеросклеротического поражения являются Th1-лимфоциты, которые секретируют интерферон γ , способствуют росту АСБ и снижению их стабильности. В сформировавшихся атеросклеротических бляшках сонных артерий человека показано снижение цитотоксичности CD4+ и CD8+ лимфоцитов, однако при наличии у пациентов симптомов инсульта или ОНМК, в АСБ выявлялась отдельная субпопуляция CD4+ Т-лимфоцитов в состоянии активации и дифференцировки. Макрофаги считаются клетками, которые способствуют дестабилизации АСБ, усиливая воспаление и вырабатывая протеазы, которые разрушают фиброзную покрышку

атеросклеротической бляшки. Нейтрофилы встречаются в АСБ сравнительно редко, однако способствуют эрозии эндотелия путём образования нейтрофильных ловушек и секреции матричных металлопротеиназ [Björkegren J.L.M., Lusis A.J., 2022].

В течение многих десятилетий в представлениях врачей и исследователей о механизмах осложнений атеросклеротического поражения (в частности, острого коронарного синдрома) доминировала концепция «уязвимой бляшки» (vulnerable plaque). Уязвимая АСБ определяется как бляшка с высоким риском разрыва. Гистологически типичная «уязвимая бляшка» представляет собой фиброатерому с тонкой покрышкой и крупным липидным ядром, содержащим тромбогенный и эмбологенный материал [O'Sullivan J.F. et al., 2011; Libby P. et al., 2019], т.е. соответствует вышеописанным характеристикам нестабильной АСБ.

Однако в последнее время (с 2015 года) критерии «уязвимости» и соответственно нестабильности атеросклеротических бляшек пересматриваются. Многочисленные исследования показывают, что тромбоз коронарных артерий нередко не сопровождается разрывом атеросклеротической бляшки — при ультразвуковом исследовании или аутопсии обнаруживают АСБ с интактной фиброзной покрышкой [Libby P., Pasterkamp G. et al., 2015]. В то же время поверхность таких АСБ обычно неровная, эрозированная, с обнажением эндотелия (endothelial denudation), но без явного разрыва, а их структура отличается от «уязвимой» фиброатеромы с тонкой покрышкой [Fahed A.C., Jang I.K., 2021]. АСБ с эрозией имеют относительно небольшое липидное ядро, они богаты ГМК и внеклеточным матриксом, включая гиалуроновую кислоту и протеогликан [Jia H. et al., 2013; Yamamoto E et al., 2019; Grégory F., 2021; Nidorf S.M. et al., 2023]. В подверженных эрозии АСБ реже выявляется инфильтрация макрофагами и Т-лимфоцитами [Sato Y. et al., 2005; Fang C. et al., 2021; Nidorf S.M. et al., 2023].

С другой стороны, новые данные ультразвукового исследования сосудов показали, что традиционный фенотип «уязвимой бляшки» не коррелирует с вероятностью клинической дестабилизации [Gerhardt T. et al., 2022]. Отмечено, что АСБ с тонкой покрышкой и крупным липидным ядром как минимум в течение 3-4 лет не вызывают клинических проявлений, а бляшки, послужившие причиной цереброваскулярных событий, демонстрируют более «стабильный» фенотип, чем в исследованиях, имевших место за 10 лет до этого. Libby с соавт. связывают подобные морфологические изменения бляшек с интенсивной терапией статинами, которая приводит к уменьшению липидного ядра и увеличению относительного количества фиброзной ткани в АСБ, а также другими мерами профилактики, модифицирующими течение заболевания [Libby P, Pasterkamp G. et al., 2015; Libby P. et al., 2019].

Несмотря на то, что кальцификация атеросклеротической бляшки считается признаком её нестабильности (Таблица 1), связь кальцификации АСБ сонных артерий с риском инсульта/ТИА окончательно не установлена [Kolodgie F.D. et al., 2017]. Считается, что гетерогенная

кальцификация АСБ увеличивает риск развития сердечно-сосудистых осложнений, в то время как при равномерном отложении кальциноз не увеличивает риск подобных осложнений [Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021]. Более того, есть данные, что кальцификация связана с «заживлением» бляшек, поскольку плотность кальцинатов обратно связана с риском ИБС, а применение статинов способствует кальцификации атеромы [Pasterkamp G. et al., 2017; Ignatyev et al., 2021].

Серийные исследования внутрисосудистой визуализации также показали, что морфология атером коронарных и сонных артерий человека может меняться со временем. Гистологические характеристики АСБ, связанные с «нестабильностью» (фиброатерома с тонкой покрышкой), способны изменяться в направлении «стабильных» бляшек с увеличением числа гладкомышечных клеток (ГМК) интимы и уменьшением числа пенистых макрофагов [Peeters W. et al., 2009; Kolodgie F.D. et al., 2017; Nuotio K. et al., 2018]. Следовательно морфологические характеристики бляшек (будь то «стабильные» или «нестабильные») представляют собой моментальный снимок процесса, протекающего во времени. При этом зависимый от времени сдвиг гистологических характеристик АСБ от связанных с «нестабильностью» к «стабильным» бляшкам, наблюдался как у пациентов с симптоматическим атеросклерозом, так и при бессимптомном течении заболевания [Pasterkamp G. et al., 2017; Libby P. et al., 2019; Aarli S.J. et al., 2021].

Вышеописанные наблюдения привели к отказу от классической концепции «уязвимой бляшки» [Libby P., Pasterkamp G., 2015; Libby P. et al., 2019; Gerhardt T. et al., 2022]. Так, внутрисосудистая визуализация атеросклеротической бляшки *in vivo* с высоким разрешением (10-15 мкм) с помощью оптической когерентной томографии, помимо хорошо изученного разрыва бляшки, выявила поверхностную эрозию с образованием тромба на неповрежденной фиброзной покрышке АСБ коронарных артерий у 25-40% пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС). Показано, что процент таких пациентов увеличивается с каждым годом, и поверхностная эрозия может стать доминирующей морфологией АСБ в обозримом будущем [Gerhardt T. et al., 2022].

Эрозия АСБ была описана и при тромбозе сонной артерии, хотя ее распространенность намного меньше, чем при ОКС, а клиническая применимость новой концепции «уязвимости» бляшек при атеросклерозе сонных артерий до сих пор остается невыясненной [Kolodgie F. D. et al., 2017; Nuotio K. et al., 2018]. Тем не менее, в настоящее время предлагается включить в число «уязвимых бляшек» не только нестабильные, склонные к разрыву, но и стабильные, склонные к эрозии АСБ [Nuotio K. et al., 2018].

Важным триггером атерогенеза и его осложненного течения выступает отложение в ядре АСБ кристаллов холестерина [Nidorf S.M. et al., 2023]. Несмотря на большое число исследований,

посвящённых изучению роли кристаллов холестерина в тканях и АСБ, относительно мало известно о механизмах, лежащих в основе кристаллизации холестерина. Некоторые предполагают, что это активный процесс, в котором участвуют липидные слои мембраны и клеточные органеллы ЭК, ГМК и макрофагов, в то время как другие считают, что это скорее пассивный процесс, который инициируется в некротическом ядре при избытке свободного (неэтерифицированного) холестерина [Baumer et al., 2020; Nidorf S.M. et al., 2020; Chapman and Mason, 2022].

В сонных артериях человека с помощью трехмерной электронной микроскопии были обнаружены игольчатые и пластинчатые кристаллы холестерина [Baumer et al., 2020]. Когда кристаллы холестерина образуются, продолжают расти и агрегировать в некротическом ядре, они растягивают АСБ, вызывая истончение, повреждение или разрыв ее фиброзной покрышки [Abela and Aziz, 2023]. Показано, что в некоторых случаях кристаллы холестерина, имеющие острые края, могут пробить даже плотную покрышку АСБ, не приводя к явному разрыву [Kalavakunta J.K. et al., 2017; Abela and Aziz, 2023]. Кристаллы холестерина способны привлекать и активировать нейтрофилы, что может обусловить эрозию поверхности АСБ [Singh P. et al., 2023; Nidorf S.M. et al., 2023]. Также кристаллы холестерина увеличивают проницаемость эндотелиального барьера дозо- и времязависимым образом [Mani et al., 2018]. Таким образом, АСБ с небольшим содержанием липидов, среди которых, тем не менее, значительную долю занимает свободный холестерол, могут стать уязвимыми для эрозии, если окружающая среда благоприятствует образованию кристаллов холестерина. Напротив, АСБ, богатые липидами, могут оставаться стабильными при незначительной доле свободного холестерина [Nidorf S.M. et al., 2023].

В качестве индикаторов, помогающих выявить наличие у пациента АСБ высокого риска, предлагаются не только клинические и морфологические критерии, но и биохимические сывороточные маркеры – показатели воспаления (С-реактивный белок, интерлейкины и др.), нарушений липидного обмена (липопротеины), тромбообразования и других процессов, связанных со снижением стабильности АСБ [Peeters W. et al., 2009; Martinez E. et al., 2020; Puig N. et al., 2020]. Кроме того, в качестве новых неинвазивных биомаркеров нестабильности атеросклеротических бляшек и сопутствующих ишемических нарушений рассматриваются такие малые регуляторные биомолекулы как микроРНК [Королёва Ю.А. с соавт., 2018; Martinez E. et al., 2020; Puig N. et al., 2020].

1.3 Изменение экспрессии микроРНК при нестабильном течении атеросклероза

МикроРНК представляют собой некодирующие одноцепочечные РНК длиной от 16 до 27 (чаще всего – 22) нуклеотидов [Fang Z. et al., 2013]. Механизм действия микроРНК заключается, преимущественно, в негативной регуляции экспрессии генов через связывание с гомологичной последовательностью (обычно в пределах 3'-нетранслируемой области) мРНК-мишени в цитоплазме клеток и запуск её расщепления или подавление трансляции мРНК [Friedman R.C. et al., 2009; Catalanotto C. et al., 2016; Lu Y. et al., 2018; Назаренко М.С. с соавт., 2022; Sum H., Brewer A.C., 2023]. Однако в ядре клетки отдельные микроРНК могут активировать транскрипцию генов, действуя как триггеры энхансеров [Lu Y. et al., 2018; Назаренко М.С. с соавт., 2022].

Канонический путь созревания микроРНК начинается со считывания с гена микроРНК (*MIR*) транскрипта (pri-miRNA). Кластеры микроРНК часто транскрибируются с образованием длинных, вплоть до нескольких тысяч нуклеотидов, полицистронных молекул, которые служат источником предшественников нескольких разных микроРНК. При-микроРНК обладают сложной вторичной структурой с множеством шпилек, которые отщепляются комплексом ферментов DGCR8/Drosha и формируют предшественники микроРНК (pre-miRNA). Двухцепочечный предшественник-шпилька экспортируется из ядра в цитоплазму, где расщепляется ферментом Dicer на 2 одноцепочечные зрелые микроРНК [Запорожченко И.А. с соавт., 2020; Moreau P.R. et al., 2021]. В зависимости от того, из какой цепи шпилечного предшественника происходит микроРНК, ей присваивается индикатор (-3p для 3'-цепи, и -5p для 5'). То, какая из цепей микроРНК (-3p или -5p) окажется преобладающей в клетке, зависит от ткани, фазы клеточного цикла, возраста и ряда факторов внешней среды, в том числе появление избытка мишени микроРНК [цит. по Запорожченко И.А. с соавт., 2020].

Согласно онлайн-базе данных miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>, обновление от 12 марта 2018), в тканях человека обнаружено 1917 предшественников и 2654 зрелых микроРНК (дата обращения: 14.05.2023) [Kozomara A. et al., 2019], которые могут регулировать экспрессию более чем 60% всех белок-кодирующих генов, тем самым участвуя во всех основных биологических процессах [Friedman R.C. et al., 2009; Laffont B., Rayner K.J., 2017; Sum H., Brewer A.C., 2023].

Изучению роли микроРНК в развитии и прогрессии атеросклероза посвящены многочисленные обзоры и экспериментальные статьи [Raitoharju E. et al., 2011; Santovito D. et al., 2013; Kumar S. et al., 2014; Andreou I. et al., 2015; Volný O. et al., 2015; Feinberg M.W., Moore K.J., 2016; Santovito D. et al., 2016; Laffont B., Rayner K.J., 2017; Lu Y., et al., 2018; Schiano C. et al., 2020; Vartak T. et al., 2022; Sum H., Brewer A.C., 2023]. Роль микроРНК при патологии заключается преимущественно в регуляции уровня синтезируемого белка во всех типах клеток,

либо в опосредовании межклеточных коммуникаций [Madrigal-Matute J. et al., 2013; Volný O. et al., 2015; Laffont B., Rayner K.J., 2017; Vartak T. et al., 2022]. В зависимости от их влияния на прогрессирование атеросклероза, микроРНК можно разделить на проатерогенные, антиатерогенные или обладающие двойственной ролью [Kumar S. et al., 2014; Volný O. et al., 2015; Vartak T. et al., 2022].

В базе данных HMDD v4.0: the Human microRNA Disease Database (<http://www.cuilab.cn/hmdd>, обновление от июня 2023) содержится информация о 227 различных экспериментально подтвержденных микроРНК, связанных с атеросклерозом (дата обращения: 22.06.2024) [Ciu C. et al., 2024]. Показано, что экспрессия микроРНК на каждой стадии развития атеросклероза регулируется различными стимулами, а сами микроРНК контролируют множество сигнальных путей, вовлечённых в формирование и дестабилизацию атеросклеротической бляшки [Cipollone F. et al., 2011; Madrigal-Matute J. et al., 2013; Andreou I. et al., 2015; Feinberg M.W., Moore K.J., 2016; Santovito D. et al., 2016; Laffont B., Rayner K.J., 2017, Collura S. et al., 2020; Назаренко М.С. с соавт., 2022].

На момент написания данной диссертационной работы экспрессия микроРНК хорошо изучена *in vitro* в различных типах клеток (ГМК, клетках эндотелия и макрофагах моноцитарного происхождения), непосредственно вовлечённых в атеросклеротическое поражение артерий [Andreou I. et al., 2015; Feinberg M.W., Moore K.J., 2016; Santovito D. et al., 2016; Lu Y., et al., 2018; Королёва Ю.А. с соавт., 2018; Moreau P.R. et al., 2021]. Охарактеризован профиль экспрессии генов микроРНК в АСБ сонных артерий модельных животных (грызунов) [Ji R. et al., 2007; Maitrias P. et al., 2017; Nie P. et al., 2021]. Тем не менее, следует учитывать, что процесс развития атеросклероза у модельных организмов и человека различается, хотя многие процессы могут в достаточной степени совпадать [Raitoharju E. et al., 2011; Björkegren J.L.M., Lusis A J., 2022]. Модели дестабилизации атеросклеротической бляшки на мышах, разработанные к настоящему времени, также недостаточно точно отражают процессы, происходящие в организме человека [Hartwig H. et al., 2015; Vedder V.L. et al., 2020]. Следовательно, данные, полученные на клеточных культурах и модельных животных, не следует однозначно переносить на патогенез атеросклероза у человека без хотя бы косвенного подтверждения их в клиническом исследовании.

В таблице 2 представлены 11 микроРНК (miR-21, miR-29b, miR-100, miR-127, miR-133a/b, miR-143/-145, miR-146a, miR-155 и miR-221), экспрессия которых связана с нестабильностью атеросклеротических бляшек сонных артерий у человека в двух или более исследованиях [Cipollone F. et al. 2011; Lovren F. et al., 2012; Nazari-Jahantigh M. et al., 2012; Cao J. et al., 2014; Bazan H.A. et al., 2015; Maitrias P. et al., 2015; Markus B. et al., 2016; Jin H. et al., 2018; Katano H. et al., 2018; Wang H. et al., 2019; González-López et al., 2022].

Таблица 2. Экспрессия микроРНК, связанных с нестабильностью атеросклеротических бляшек сонных артерий у человека

№	miR	Нестабильная vs стабильная атеросклеротическая бляшка	Источник	Атеросклеротическая бляшка vs интактные ткани	Источник
1	-21	↓ К (≤ 6 недель)	Markus B. et al., 2016	↑	Markus B. et al., 2016 Raitoharju E. et al., 2011 Cao J. et al., 2014
		↓ К (≤ 3 месяца), А (неровная поверхность), Г (тонкая покрывка, разрывы, тромбоз)	Wang H. et al., 2019		
		↓ К (>14 дней), Г (тонкая покрывка, разрывы)	Jin H. et al., 2018		
2	-29b	↓	Markus B. et al., 2016	↓	Markus B. et al., 2016
				↑	Raitoharju E. et al., 2011
3	-100	↑ К	Cipollone F. et al., 2011 Maitrias P. et al., 2015	НД	—
4	-127	↑ К	Cipollone F. et al., 2011 Maitrias P. et al., 2015	НД	—
5	-133a	↑ К	Cipollone F. et al., 2011 Maitrias P. et al., 2015	НД	—
6	-133b	↑ К	Cipollone F. et al., 2011	НД	—
		↑ Г (низкая степень кальцификации)	Katano H. et al., 2018		
7	-143	↓ К (≤ 6 недель)	Markus B. et al., 2016	↑	Markus B. et al., 2016
		↓ К (≤ 3 месяца), А (неровная поверхность), Г (тонкая покрывка, разрывы, тромбоз)	Wang H. et al., 2019	↓	González-López et al., 2022
8	-145	↑ К	Cipollone F. et al., 2011 Maitrias P. et al., 2015	↓	Lovren F. et al., 2012
9	-146a	НД	НД	↑	Raitoharju E. et al., 2011 Cao J. et al., 2014
10	-155	НД	НД	↑	Raitoharju E. et al., 2011 Nazari-Jahantigh M. et al., 2012
11	-221	↑ К	Maitrias P. et al., 2015	↑	Bildirici A.E. et al., 2018
		↓ К (< 5 дней)	Bazan H.A. et al., 2015		

Примечание. Нестабильная атеросклеротическая бляшка: клинически (К), гистологически (Г), ангиографически (А). НД – нет данных.

Нестабильные АСБ характеризуются увеличением экспрессии miR-100, miR-127, miR-133a/b и miR-145. Снижение экспрессии выявлено для miR-21, miR-29b и miR-143. Противоречивые результаты получены в отношении miR-221. В то же время, для АСБ относительно интактных артерий показано увеличение экспрессии miR-21, miR-143, miR-146a, miR-155 и miR-221, но снижение уровня экспрессии miR-143 и противоречивые данные относительно miR-29b (Таблица 2).

В данных работах определяли экспрессию микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий, полученных при эндартерэктомии. В большинстве исследований использовался клинический критерий нестабильности АСБ – пациенты с симптоматическим стенозом сонных артерий, которые имели острое нарушение мозгового кровообращения (транзиторные ишемические атаки / ипсилатеральный инсульт) менее чем за 6 месяцев до операции. Однако в отдельных исследованиях сроки от острого нарушения мозгового кровообращения до операции варьировали от менее 5 дней и до 3 месяцев [Bazan H.A. et al., 2015; Markus B. et al., 2016; Jin H. et al., 2018; Wang H. et al., 2019]. Лишь в единичных работах экспрессия микроРНК определялась в макрофагах, взятых из областей ангиографически (неровная поверхность), а также гистологически нестабильной атеросклеротической бляшки: атерома с тонкой покрывкой и разрывами, а также тромбозом [Wang H. et al., 2019], в атеросклеротических бляшках с низкой степенью кальцификации [Katano H. et al., 2018], в фиброзной покрывке атеросклеротических бляшек с истончением (<200 мкм) и разрывами [Jin H. et al., 2018].

Имеются обзорные работы, рассматривающие определение уровня микроРНК в плазме/сыворотке крови в качестве биомаркера атеросклероза сонных артерий (в оригинальных исследованиях наличие атеросклероза определялось путём ультразвукового исследования сонных артерий) [Maitrias P. et al., 2017; Collura S. et al., 2020; Puig N. et al., 2020; Sharma A.R. et al., 2020; Vartak T. et al., 2022]. При этом, у пациентов с наличием атеросклероза, но без проявлений ишемического инсульта, по сравнению с контрольной группой здоровых индивидов наблюдалось увеличение уровня miR-21 [Tsai P.C. et al., 2013; Maitrias P. et al., 2017]. У пациентов с симптоматическим атеросклерозом сонных артерий, то есть, после ишемического инсульта, по сравнению с пациентами с асимптоматическим атеросклерозом сонных артерий в сыворотке крови показано увеличение уровня как miR-21, так и микроРНК miR-133b и miR-143/145, а также снижение уровня miR-133a и miR-221 [Gan C.S. et al., 2012; Tsai P.C. et al., 2013; Bazan et al. 2017; Maitrias P. et al., 2017; Badacz R. et al., 2018; Collura S. et al., 2020; Puig N. et al., 2020; Sharma A.R. et al., 2020; Vartak T. et al., 2022].

При сравнении с Таблицей 2 можно отметить, что изменение уровня miR-21 и miR-143 было однонаправленным (наблюдалось увеличение) в сыворотке крови у пациентов по сравнению с контрольной группой здоровых людей, а также в пораженных атеросклерозом

тканях сонных артерий по сравнению с интактными тканями артерий [Raitoharju E. et al., 2011; Tsai P.C. et al., 2013; Cao J. et al., 2014; Markus B. et al., 2016; Bazan et al. 2017; Collura S. et al., 2020; Puig N. et al., 2020; Sharma A.R. et al., 2020; Vartak T. et al., 2022]. В то же время отмечено снижение уровня miR-143 в пораженных атеросклерозом тканях сонных артерий по сравнению с неизменёнными тканями сонных артерий здоровых доноров [González-López et al., 2022]. Разнонаправленные изменения показаны также для miR-133a (повышение уровня в тканях при дестабилизации АСБ, но снижение в сыворотке крови при ишемическом инсульте на фоне атеросклероза, т.е. при симптоматическом атеросклерозе сонных артерий) [Cipollone F. et al., 2011; Maitrias P. et al., 2015, Badacz R. et al., 2018; Puig N. et al., 2020; Sharma A.R. et al., 2020; Badacz R. et al., 2022] и miR-221, экспрессия которой снижается в сыворотке крови при симптоматическом атеросклерозе, в то время как сведения об изменении уровня экспрессии данной микроРНК в АСБ при её дестабилизации противоречивы (Таблица 2) [Bazan H.A. et al., 2015; Maitrias P. et al., 2015, Bazan et al. 2017; Puig N. et al., 2020; Sharma A.R. et al., 2020; Badacz R. et al., 2022].

Также имеются данные о специфичности изменения уровня микроРНК в периферической крови в зависимости от локализации атеросклеротического процесса [Teixeira A.R. et al., 2022]. Так, изменение экспрессии miR-143 и miR-146a характерно для атеросклеротического поражения сонных артерий, а изменение экспрессии miR-21 и miR-221 — как для атеросклеротического поражения сонных артерий, так и для атеросклероза артерий нижних конечностей. Для miR-145 показано изменение экспрессии как при атеросклерозе сонных, так и коронарных артерий. При этом, для miR-29b и miR-155 указана специфичность изменения уровня экспрессии в крови при поражении исключительно коронарных артерий. В то же время, авторы обзора указывают на его ограничения, связанные с возможным наличием у пациентов, участвовавших в исследованиях, атеросклеротического поражения нескольких артериальных русел одновременно [Teixeira A.R. et al., 2022].

1.4 Метилирование регуляторных элементов генов микроРНК при атеросклерозе артерий различной локализации

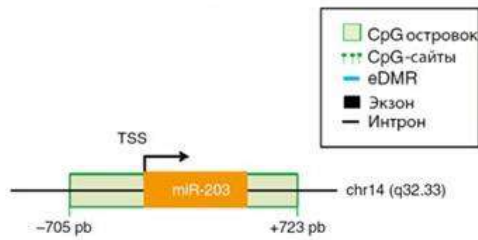
Считается, что гены микроРНК составляют около 1-5% нуклеотидной последовательности всех генов человека [Chakraborty C., Das S., 2016; Lu Y., et al., 2018]. Гены микроРНК могут располагаться либо в области экзонов/интронов так называемых генов-хозяев (host genes), либо в межгенных областях [Olena A.F., Patton J.G., 2010; Wong L.L. et al., 2016]. Среди 1881 микроРНК, открытых и изученных к 2017 году, число экзонных микроРНК составляет 169 (9%), интронных микроРНК – 988 (52,5%), а межгенных – 724 (38,5%). При этом число генов-хозяев составляло 984 [Hinske L.C. et al., 2017].

Транскрипция генов микроРНК, локализованных в межгенном пространстве идёт под контролем их собственных регуляторных элементов, в то время как микроРНК, расположенные в области белок-кодирующих генов, часто обладают общим промотором с геном-хозяином [Olena A.F., Patton J.G., 2010; Morales S. et al., 2017]. Тем не менее, примерно у 50% внутригенных микроРНК выявлен собственный промотор [Marsico A. et al., 2013].

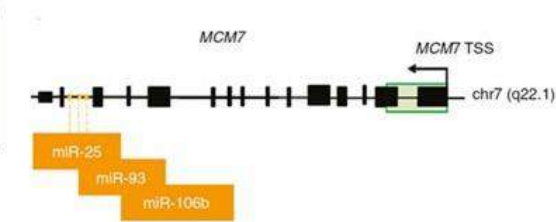
Экспрессия микроРНК контролируется, в том числе, посредством эпигенетических механизмов, одним из которых является метилирование CpG-островков (скоплений CpG-динуклеотидов), перекрывающих промоторные участки генов или локализованных рядом с сайтом начала транскрипции микроРНК [Логинов В.И. с соавт., 2015; Morales S. et al., 2017]. Считается, что характерными признаками CpG-островков является содержание CpG-динуклеотидов >50% и длина не менее 200 п.н. [Sum H., Brewer A.C., 2023]. Обычно CpG-островки гипометилированы, а их избыточное гиперметилирование подавляет транскрипцию и, следовательно, ингибирует экспрессию соответствующих генов [Chhabra R., 2014; Ma J. et al., 2014; Piletić K., Kunej T., 2016; Yao Q. et al., 2019]. В то же время показано, что наиболее сильная отрицательная корреляция с экспрессией наблюдается преимущественно в случае метилирования гена в области размером 2,4 тыс.п.н. «вокруг» TSS – точки старта транскрипции (в 1000 п.н. в 5'-направлении и 1400 п.н. в 3'-направлении от TSS). В области от 2 до 10 тыс.п.н. в 3'-направлении от TSS уровень метилирования и экспрессия генов коррелировали, напротив, положительно. По мнению авторов исследования это говорит о том, что активные гены обычно не метилированы вокруг TSS, но метилированы в «теле» гена [Deng J. et al., 2009].

Для генов микроРНК метилирование является более характерным эпигенетическим механизмом подавления экспрессии, чем для белок-кодирующих генов. По данным разных авторов, метилированию подвержено 11–30% генов микроРНК и только 1–2% белок-кодирующих генов [Kunej T. et al., 2011; Логинов В.И. с соавт., 2015; Morales S. et al., 2017]. Кроме того, примерно 50% генов микроРНК содержат CpG-островки, и, следовательно, могут подвергаться регуляции через метилирование ДНК [Baer C. et al., 2013; Wang Z., 2013; Yao Q. et al., 2019]. Также показана важность изолированных CpG-островков, которые действуют как энхансеры экспрессии микроРНК, несмотря на расположение на значительном расстоянии от генов микроРНК (Рисунок 1) [Morales S. et al., 2017].

МикроРНК обладает собственным промотором



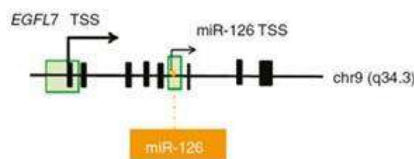
Экспрессию микроРНК регулирует промотор гена-хозяина (HG)



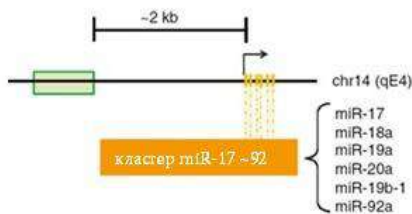
МикроРНК обладает близко-расположенным промотором



МикроРНК обладает собственным промотором, не совпадающим с промотором гена-хозяина (HG)



МикроРНК обладает дистантным промотором



Экспрессию микроРНК регулирует дистантный энхансер

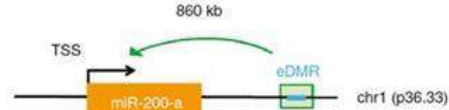


Рисунок 1. Схематичное представление регуляторных элементов, изменение уровня метилирования которых влияет на экспрессию генов микроРНК (адаптировано из Morales S. et al., 2017). Примечание: chr – хромосома, eDMR – энхансерный дифференциально метилированный регион, TSS (transcription start site) – точка старта транскрипции.

Однако регуляция экспрессии микроРНК посредством метилирования ДНК происходит и вне CpG-островков [Baer C. et al., 2013]. В частности, контроль экспрессии интронных микроРНК может осуществляться в области их собственных промоторов и обладать тканевой и клеточной специфичностью. Показано, что собственные промоторы интронных микроРНК – это непротяженные регионы генома с низким содержанием CpG-динуклеотидов, насыщенные такими элементами, как ТАТА-боксы и сайты связывания различных транскрипционных факторов [Marsico A. et al., 2013]. Кроме того, изменение метилирования ДНК в области энхансеров также может модулировать экспрессию микроРНК [Bell R.E. et al., 2016].

Дискутабельным остаётся вопрос о количественных значениях изменения уровня метилирования ДНК, достоверно влияющих на активность экспрессии гена. С одной стороны, малые различия могут быть биологически не значимыми: изменение метилирования на 5% может не оказывать эквивалентного влияния на экспрессию генов, а небольшие изменения могут находиться в пределах допустимого шума для биологических систем [Wreczycka K. et al., 2017]. С другой стороны, в клетках крови для дифференциально-метилированного региона (DMR) гена *IGF2* есть данные, что на каждый 1% снижения уровня метилирования ДНК (при среднем уровне

47,3%±4,5%) приходится примерно двукратное увеличение транскрипции *IGF2* [Murphy S. K. et al., 2012]. В то же время, при анализе данных по метилированию ДНК в тканях человека (сердца, лёгких и почек), полученных на микрочипах Illumina Infinium 27 K methylation arrays, было показано, что даже примерно одинаковое изменение уровня метилирования различных CpG-сайтов может приводить как к значительному усилению, либо ослаблению экспрессии соответствующих генов, так и к крайне небольшим изменениям [Xie L. et al., 2011]. Так, при разнице уровня метилирования ДНК между тканями в 30-40% изменение уровня экспрессии составляло от $\log_2(FC) = -0,04$ (ген *FCRL3*) до $\log_2(FC) = 8$ (ген *TFPI*), а при разнице уровня метилирования в 5% изменение экспрессии варьировало от $\log_2(FC) = -0,5$ (ген *GPC2*) до $\log_2(FC) = 7,4$ (ген *CD48*) [Xie L. et al., 2011]. Таким образом, влияние изменения уровня метилирования ДНК на экспрессию генов должно обсуждаться для каждого отдельного CpG-сайта и конкретного гена, с учётом возможной погрешности применяемого метода исследования.

Большая часть работ в отношении анализа метилирования ДНК в регуляторных элементах генов микроРНК выполнена в отношении онкологических заболеваний [Morales S. et al., 2017]. В них показана инактивация микроРНК с опухоль-супрессорными свойствами через избирательное гиперметилирование промоторных участков генов в области CpG-островков и вне их, а также активация онкогенных микроРНК из-за гипометилирования промоторов или энхансеров [Baer C. et al., 2013; Chhabra R., 2014; Логинов В.И. с соавт., 2015; Bell R.E. et al., 2016; Ali Syeda Z. et al., 2020; Назаренко М.С. с соавт., 2022; Saviana M. et al., 2023]. Менее изучена связь изменения метилирования в области генов микроРНК с их экспрессией при других многофакторных заболеваниях, в том числе при атеросклерозе и его клинических осложнениях [Fernández-Sanlés A. et al., 2017; Tabaei S., Tabaei S.S., 2019; Huan T. et al., 2020; Sharma A. R. et al., 2020; Назаренко М.С. с соавт., 2022; Saviana M. et al., 2023; Vancheri C. et al., 2023; Ciu C. et al., 2024].

В полногеномных исследованиях с помощью микрочипов Illumina (EWAS - Epigenome-wide association studies) обычно анализируется уровень метилирования CpG-сайтов, расположенных в промоторах белок-кодирующих генов в клетках крови при атеросклерозе артерий различной локализации [Istas G. et al., 2017; Liu Y. et al., 2017; Soriano-Tárraga C. et al., 2018; Sharma A. R. et al., 2020]. При анализе ассоциации метилирования более чем 400 000 CpG-сайтов с экспрессией 283 микроРНК в клетках цельной крови, полученных от 3 565 пациентов с ИБС в исследовании Framingham Heart Study, для 227 CpG-сайтов была установлена связь их дифференциального метилирования с экспрессией 40 близ-расположенных микроРНК на уровне значимости $p < 0,01$. Такие CpG-сайты рассматривались как локусы количественных признаков метилирования, связанные с экспрессией близрасположенных микроРНК (англ., cis-expression quantitative trait methylation, cis-eQTM). Чаще всего cis-eQTM располагались в промоторных регионах и областях с Polycomb-репрессированным состоянием; для 60% из них показана

обратная ассоциация метилирования с экспрессией близлежащей микроРНК. Среди данных cis-eQTM CpG-сайтов был cg18089426, изменение метилирования которого, по-видимому, влияет на экспрессию miR-127. Однако для метилирования CpG-сайтов, приходящихся на области «тела» генов микроРНК, напротив, показана активация транскрипции при повышении уровня метилирования. В частности, положительная связь метилирования и экспрессии наблюдается для cg06000878 и miR-100, а также для cg11682508 и miR-133a [Huan T. et al., 2020; Назаренко М.С. с соавт., 2022]. Для отдельных CpG-сайтов ассоциации уровня метилирования сохранялась и при учёте экспрессии гена-хозяина микроРНК [Huan T. et al., 2020]. В то же время, имеются единичные работы, посвящённые кандидатному анализу уровня метилирования в области регуляторных элементов генов микроРНК в клетках крови при осложнении атеросклероза. Так, Li Z. с соавт. выявили гипометилирование промотора гена *MIR233* у пациентов, перенесших ишемический инсульт на фоне атеросклероза по сравнению с контрольной группой здоровых индивидов [Li Z. et al., 2017].

Меньшее внимание уделяется изменению метилирования ДНК в клетках сонных, коронарных и бедренных артерий, а также аорты при их атеросклеротическом поражении [Castillo-Díaz S.A. et al., 2010; Fernandez A.F. et al., 2011; Zaina S. et al., 2014; Aavik E. et al., 2015; Nazarenko M.S. et al., 2015; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021]. Их основная масса анализирует уровень метилирования ДНК в клетках сосудов, пораженных атеросклерозом по сравнению с интактными тканями с помощью технологий метилочипов и полногеномного бисульфитного секвенирования, и лишь в одной работе Li J. с соавт. (2021) уделено внимание нестабильности сонных артерий. В вышеупомянутом исследовании, анализ профилей метилирования 90 368 дифференциально метилированных CpG-сайтов 14 657 генов выявил гипометилирование 67% CpG-сайтов в симптоматических атеросклеротических бляшках сонных артерий (т.е. после недавнего инсульта/ТИА) по сравнению с асимптоматическими бляшками. Из этих гипометилированных CpG-сайтов, 14 596 находились в CpG-островках промоторных регионов 7 048 генов, среди которых наиболее гипометилированным оказался белок-кодирующий ген *PLA2G7* [Li J. et al., 2021]. Массив данных, получаемый при микрочиповых исследованиях, как правило, включает и CpG-сайты, относящиеся к генам микроРНК. Однако к настоящему времени нет работ, где проанализирован уровень метилирования ДНК в области регуляторных элементов генов микроРНК в клетках артерий при их атеросклеротическом поражении и формировании нестабильности данного процесса.

Причем лишь в нескольких работах выявлено изменение уровня метилирования ДНК в области генов микроРНК в атеросклеротических бляшках сосудов различной локализации [Zaina S. et al., 2014; Aavik E. et al., 2015; Nazarenko M.S. et al., 2015]. В частности, в предыдущих исследованиях лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики выявлено

снижение уровня метилирования в области CpG-островка (расположенного в области промотора гена *HOXD4*) на который приходится кодирующий регион гена *MIR10B*, в клетках атеросклеротических бляшек коронарных и сонных артерий, а также лейкоцитах периферической крови больных атеросклерозом по сравнению с непораженными внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей [Марков А.В. с соавт., 2014; Nazarenko M. S. et al., 2015]. Однако в упомянутом исследовании не проводился анализ связи уровня метилирования гена *MIR10B* с экспрессией данной микроРНК, а также с морфологическими параметрами нестабильных атеросклеротических бляшек и острыми сосудистыми событиями в анамнезе пациентов, что отражает риск осложненного течения атеросклероза.

Показано изменение экспрессии miR-10b в цельных артериях человека при их поражении атеросклерозом [Berkan Ö. et al., 2019; Назаренко М.С. с соавт., 2022]. У мышей с нокаутом гена *Mir10b*, находившихся на богатой холестерином диете не развивался атеросклероз при частичном лигировании сонных артерий [Nakahara M. et al., 2018]. В исследованиях на культурах клеток показано, что увеличение экспрессии miR-10b в эндотелиальных клетках (ЭК), путём воздействия на гены-мишени *LTBP1* и *HOXD10* приводит к увеличению миграции ЭК и ангиогенезу, а также снижению анти-пролиферативной способности ЭК; в макрофагах, через гены-мишени *ABCA1* и *ABCG1*, miR-10b способствует уменьшению эффлюкса и обратного транспорта холестерина; в то время как при влиянии на мРНК-мишень *HTATIP2* (*TIP30*) в ГМК сосудов усиливается их пролиферация [Nakahara M. et al., 2018; Berkan Ö. et al., 2011; Wang D. et al., 2012; Yu X. et al., 2015].

Коллектив исследователей из Мексики и Испании сравнили уровень метилирования отдельных CpG-сайтов в клетках атеросклеротических бляшек аорты и сонных артерий с непораженными тканями аорты с использованием микрочипа Illumina HumanMethylation450 BeadChip. Причем образцы аорты были взяты у одних и тех же индивидов post mortem, а сонные артерии получены в результате каротидной эндатерэктомии и представляли собой стабильные бляшки III-VI морфогистологических типов. Среди дифференциально метилированных генов между бляшками и непораженной частью аорты был выявлен ген *MIR23B*. Изменение уровня метилирования ДНК в области данного гена в артериях подтверждено с помощью бисульфитного секвенирования, а изменение уровня экспрессии зрелой микроРНК — с помощью анализа транскриптома (RNA-seq) [Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Назаренко М.С. с соавт., 2022].

Финские исследователи с помощью технологии полногеномного бисульфитного секвенирования оценили уровень и рисунок метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках бедренных артерий (n=22) и интактных образцах внутренних грудных артерий (n=9), а также сопоставили их с данными экспрессионных микрочипов [Aavik E. et al., 2015]. Более 140

областей генов микроРНК были гипометилированы в области атеросклеротических бляшек, включая микроРНК, ранее уже связанные с атеросклерозом (miR-10b, miR-27b и miR-758). Существенное гипометилирование выявлено в локусе 14q32, где содержится крупный кластер генов микроРНК. Увеличение экспрессии микроРНК данного кластера (miR-127, -136, -410, -431, -432 и -433) также показано в атеросклеротических бляшках. Таким образом, это одно из первых исследований, в котором установлена связь метилирования ДНК с экспрессией микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек у человека *in vivo* [Назаренко М.С. с соавт., 2022].

В работе Ehrlich с соавт. (2019), анализ данных полногеномного бисульфитного секвенирования трех образцов аорты выявил гиперметилирование региона энхансера гена *MIR143HG (CARMN)*, протяженностью 26 тыс. п.н., в клетках пораженной аорты по сравнению с непораженной аортой и другими тканями, а также потенциальную связь изменения метилирования анализируемой области с экспрессией miR-143 и miR-145 [Ehrlich K.C. et al., 2019]. Однако эти результаты нуждаются в экспериментальной проверке. Косвенное подтверждение обратной взаимосвязи уровня метилирования гена и экспрессии для miR-143 было показано и в одном из исследований *in vitro*. При обработке гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов гомоцистеином наблюдалось снижение уровня экспрессии miR-143 и при этом – значительное повышение уровня метилирования ДНК предполагаемого промоторного региона гена miR-143 в области chr5:148,807,345-148,807,558, приходящейся на четвертый интрон гена *MIR143HG (CARMN)* [Zhang H.P. et al., 2016].

С другой стороны, исследования отдельных кандидатных локусов микроРНК в отношении метилирования их генов и связи с экспрессией зрелых форм в сосудах разной локализации и степени поражения атеросклерозом у человека *in vivo* единичны. Лишь в одной из недавних работ показано, что экспрессия кластера микроРНК, расположенных в локусе 14q32, значительно различается между здоровыми тканями сосудов (артерий и вен) различной локализации (n=106) — сосудов конечностей (n=37), грудной (n=26) и брюшной полости (n=27), головы и шеи (n=16). При этом уровень метилирования ДНК трех регионов скоплений CpG-динуклеотидов (дифференциально метилированных регионов — DMR) в области генов *MEG3* и *MEG8* также сильно варьирует между разными сосудами и ассоциирован с их патологическими изменениями (в том числе атеросклерозом и ишемическими поражениями снабжаемых тканей), но он не связан с экспрессией при-микроРНК и зрелых микроРНК [Goossens E.A.C. et al., 2019].

Некоторые исследователи предполагают, что гиперэкспрессия miR-21 в атеросклеротической бляшке способствует поддержанию её стабильности [Jin H. et al., 2018; Li J., et al., 2019]. В исследованиях культуры ГМК аорты и образцов интимы, взятых из области атеросклеротических бляшек артерий, показано, что снижение уровня метилирования гена

микроРНК miR-21 приводит к усилению экспрессии зрелой формы miR-21; этот процесс опосредован длинной некодирующей РНК LncRNA-TCONS_00034812 [Lin D. et al., 2021].

Заключение

Атеросклероз сонных артерий лежит в основе ишемических инсультов, которые являются основной причиной смертности и инвалидизации во всем мире. Выяснение молекулярных механизмов, приводящих к нестабильности атеросклеротических бляшек сонных артерий, может открыть новые возможности для профилактики и лечения цереброваскулярных событий.

Наиболее частым механизмом, участвующим в патогенезе осложнений атеросклеротического поражения сонных артерий выступает разрыв фиброзной покрышки атеросклеротической бляшки с последующим развитием тромбоза/эмболии с острыми клиническими проявлениями ишемии. Пациенты, которые имели в анамнезе острое сосудистое событие (ишемический инсульт, транзиторная ишемическая атака) относятся к категории симптоматических. Нестабильные, склонные к разрыву, АСБ обычно обладают специфическими морфологическими особенностями, такими как наличие кровоизлияний в бляшку, тромбов, кальцификации, наличие и размер липидного ядра, доля фиброзной ткани, число новых сосудов, пенистых клеток, воспалительных клеток (макрофагов или лимфоцитов), инфильтрация фиброзной покрышки макрофагами или лимфоцитами и, наконец, разрыв фиброзной покрышки.

В последнее время происходит трансформация наших представлений в отношении «уязвимости» и нестабильности фенотипа АСБ. Показано, что использование статинов при лечении пациентов с атеросклерозом приводит к уменьшению липидного ядра и увеличению относительного количества фиброзной ткани в АСБ. Кроме АСБ с разрывом покрышки, описаны таковые с эрозией, которые характеризуются слущенным эндотелием, имеют относительно небольшое липидное ядро, богаты ГМК и внеклеточным матриксом, включая гиалуроновую кислоту и протеогликан. В АСБ, подверженных эрозии, реже выявляется инфильтрация воспалительными клетками.

В качестве индикаторов, помогающих выявить наличие у пациента бляшек высокого риска, предлагаются не только клинические и ультразвуковые критерии, но и биохимические сывороточные маркеры — показатели воспаления, нарушений липидного обмена, тромбообразования. В качестве новых неинвазивных биомаркеров нестабильности атеросклеротических бляшек и сопутствующих ишемических нарушений рассматриваются такие малые регуляторные биомолекулы как микроРНК.

В двух и более работах показано, что при дестабилизации атеросклеротических бляшек сонных артерий у пациентов наблюдается изменение экспрессии miR-21, -29b, -100, -127, -133a/b, -143/-145, -221 [Cipollone F. et al., 2011; Bazan H.A. et al., 2015; Maitrias P. et al., 2015;

Markus B. et al., 2016; Jin H. et al., 2018; Katano H. et al., 2018; Wang H. et al., 2019]. Две микроРНК (miR-21 и miR-143) характеризуются увеличением уровня экспрессии в пораженных атеросклерозом артериях по сравнению с интактными, однако при нестабильности происходит его снижение. В то же время, miR-145 демонстрирует обратную картину – в пораженных атеросклерозом артериях по сравнению с интактными происходит снижение экспрессии, в то время как при развитии нестабильности экспрессия усиливается. Данные по изменению уровня других микроРНК противоречивы или же отсутствуют в литературе.

Известно, что экспрессия микроРНК контролируется посредством эпигенетических механизмов, одним из которых является метилирование CpG-островков (скоплений CpG-динуклеотидов), перекрывающих промоторные участки генов или локализованных рядом с сайтом начала транскрипции микроРНК. В то же время, имеются немногочисленные данные об изменении уровня метилирования отдельных генов микроРНК (miR-10b, miR-23b, локус 14q32 (miR-127, -136, -410, -431, -432 и -433), miR-143 и miR-145) в тканях сосудов, так в норме, так и при их атеросклеротическом поражении [Zaina S. et al., 2014; Aavik E. et al., 2015; Zaina S. et al., 2015; Ehrlich K.C. et al., 2019; Назаренко М.С. с соавт., 2022]. Неясным остается вопрос о связи уровня метилирования генов этих микроРНК и экспрессии зрелых молекул. При этом исследования уровня метилирования ДНК в области регуляторных элементов как широкого спектра локусов микроРНК, так и отдельных кандидатных генов микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий при их нестабильности у человека на данный момент отсутствуют и представляют исследовательский интерес.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Дизайн работы включает несколько экспериментальных блоков (Рисунок 2). Этапы собственного исследования заключались в сборе материала — образцов тканей сосудов и периферической крови экспериментальной и контрольной группы, выделении и бисульфитной модификации ДНК, секвенировании и микрочиповом анализе с целью определения уровня метилирования генов микроРНК; параллельно проводилось гистологическое исследование АСБ, выделение РНК и анализ экспрессии микроРНК в данных образцах.

Для сравнения результатов по метилированию микроРНК были привлечены внешние данные из электронного репозитория GEO о метилировании ДНК в стенках кровеносных сосудов различных русел (идентификаторы доступа GSE46401 [Zaina S. et al., 2014], GSE66500 [Zaina S. et al., 2015], GSE62867 [Nazarenko M.S. et al., 2015], GSE149759 [Li J. et al., 2021]) и о метилировании ДНК в лейкоцитах периферической крови (GSE62867 [Nazarenko M.S. et al., 2015], GSE107143 [Istas G. et al., 2017], GSE69138 [Soriano-Tárraga C. et al., 2018]).

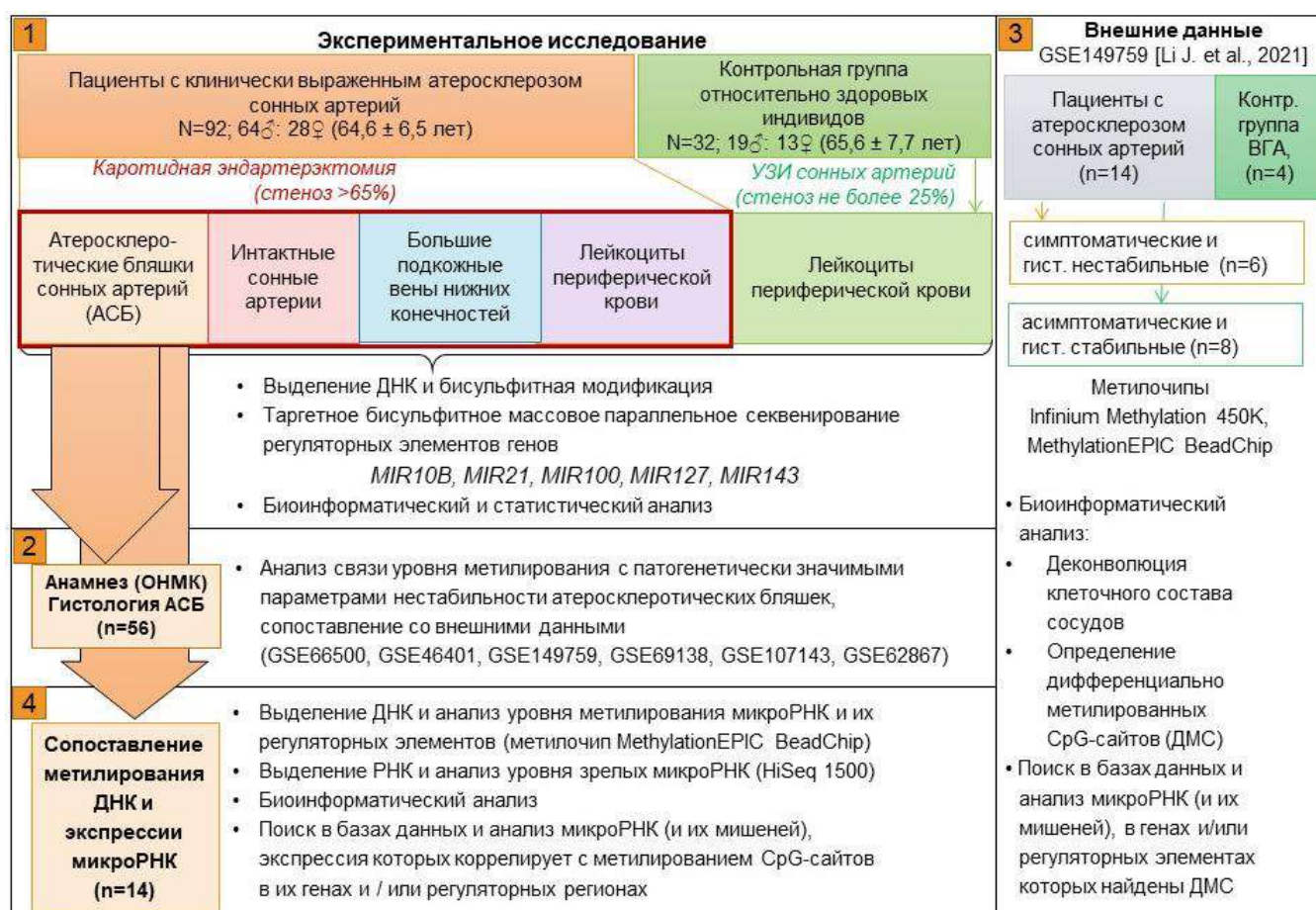


Рисунок 2. Дизайн исследования.

Кроме того, в рамках данного диссертационного исследования выполнен анализ внешних данных по уровню метилирования ДНК в гистологически нестабильных и стабильных атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов, перенесших ОНМК и без такового события в анамнезе, из электронного репозитория GEO, идентификатор доступа GSE149759 [Li J. et al., 2021]. При анализе и описании данных использовали биоинформатический алгоритм HEPiDISH и такие онлайн инструменты, как база данных TRmir, инструмент TAM 2.0, базы данных Gene Ontology (GO), классификатор сигнальных и метаболических путей KEGG, онлайн-инструмент Metascape, онлайн-инструмента DIANA-miRPath v4.0, базы данных miRDB, TarBase v9.0, TargetScan v8.0 и MirTarBase 2022.

Для сравнения результатов по экспрессии возможных мишеней микроРНК использовали портал GTEx v.8, и интерактивное веб-приложение PlaqView [Ma W.F. et al., 2021], из которого получены наборы данных по транскриптому отдельных клеток атеросклеротических бляшек сонных артерий под идентификаторами Alsaigh_2020 [Alsaigh T. et al., 2020], Pan_2020 [Pan H. et al., 2020] и Slenders_2021 [Slenders L. et al., 2021]. Кроме того, в работе была проанализирована экспрессия отдельных генов, белковые продукты которых являются мишенями микроРНК, в клетках кальцифицированных атеросклеротических бляшек из области ядра и проксимальных прилегающих частей сонных артерий у трех пациентов, перенесших каротидную эндартерэктомию (Alsaigh_2020, GSE159677), а также в клетках атеросклеротических бляшек, взятых у одного пациента с ОНМК в анамнезе и двух пациентов без такового события (Pan_2020, GSE155512). Ниже приводится подробное описание каждого из упомянутых этапов эксперимента.

Проведение диссертационного исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол № 4 от 25.11.2019 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в эксперименте. Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Медицинская геномика» Томского НИМЦ и ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

2.2 Характеристика включенных в исследование выборок

Формирование выборок и клиническая характеристика (осмотр, сбор анамнеза, жалоб и параклинических данных) пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий проходили на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (г. Кемерово) и Научно-исследовательского института кардиологии Томского научно-исследовательского медицинского центра (г. Томск). Группа пациентов с клинически

выраженным атеросклерозом составила 92 человека (медианный возраст 64 года), из них 64 мужчины и 28 женщин (Таблица 3). Степень стеноза сонной артерии у пациентов по данным УЗИ варьировала, составляя 85 [80;95]% (Q2 [Q1;Q3]). Контрольную группу составили 32 индивида без клинических признаков поражения сердечно-сосудистой системы (медианный возраст 67 лет) — 19 мужчин и 13 женщин (Таблица 3). Для всех индивидов было проведено УЗИ сосудов, выявившее начальные стадии атеросклероза сонных артерий, но без гемодинамически значимых изменений: степень стеноза была равной 28 [24; 45]% (Q2 [Q1; Q3]), толщина комплекса интима-медия составила 0,8 [0,7; 0,9] мм. От каждого индивида, включенного в контрольную группу, были получены образцы периферической крови (ЛКЗ).

Общими критериями для включения индивидов в исследование были отсутствие родственных связей между индивидами, этническая принадлежность к европеоидам; для группы пациентов — стеноз сонных артерий >60%. Критерии исключения из исследования: отказ пациента от участия в исследовании, возраст меньше 40 лет, наличие острой или хронической тяжелой сопутствующей соматической патологии; для контрольной группы — гемодинамически значимый стеноз сонных артерий >30% при УЗИ.

Таблица 3. Клиническая характеристика групп, включенных в исследование

Показатель	Пациенты с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (N=92)	Контрольная группа индивидов (N=32)	Уровень значимости p
Клинические параметры			
Мужчины : Женщины	64:28	19:13	0,402
Возраст, лет (Q2 [Q1;Q3])	64,0 [60,0; 69,0]	67,0 [58,8; 71,8]	0,196
Индекс массы тела, кг/м ² (Q2 [Q1;Q3])	28,4 [25,9; 31,6]	26,2 [23,4; 29,1]	0,012
Метаболический синдром [абс. (%)]	61 (66,3%)	<i>нет данных</i>	—
Окружность талии, см (Q2 [Q1;Q3])	101,0 [93,0; 113,0]	<i>нет данных</i>	—
Стенокардия в анамнезе [абс. (%)]	61 (66,3%)	0 (0,0%)	0,002
Функциональный класс стенокардии [абс. (%)]			
- I ФК	12 (13,0%)	<i>нет данных</i>	—
- II ФК	35 (38,0%)		
- III ФК	14 (15,2%)		
Инфаркт миокарда в анамнезе [абс. (%)]	36 (39,1%)	2 (6,3%)	<0,001
ИБС в анамнезе [абс. (%)]	75 (81,5%)	5 (15,6%)	<0,001
Длительность ИБС, лет (Q2 [Q1;Q3])	2,5 [1,0; 9,8]	<i>нет данных</i>	—
ХСН в анамнезе [абс. (%)]	76 (82,6%)	1 (3,1%)	<0,001
Функциональный класс ХСН [абс. (%)]			
I ФК	6 (6,5%)	<i>нет данных</i>	—
II ФК	63 (68,5%)		
III ФК	8 (8,7%)		

Примечание: АГ – артериальная гипертензия, АПФ – ангиотензин-превращающий фермент, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ЛПНП – липопротеиды низкой плотности, ЛПВП – липопротеиды высокой плотности, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, ТИА – транзиторная ишемическая атака, ФК – функциональный класс, ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, Q1 – 25% квартиль, Q2 – 50% квартиль (медиана), Q3 – 75% квартиль.

2.3 Формирование банка тканей и гистологическое исследование атеросклеротических бляшек сонных артерий

У всех пациентов в ходе оперативного вмешательства были получены образцы атеросклеротических бляшек (АСБ), макроскопически неизмененных подлежащих участков сонных артерий (САН) и больших подкожных вен (БПВ), используемых в качестве заплаты при каротидной эндартерэктомии. Каждый образец стенки кровеносного сосуда был осмотрен и тщательно очищен от масс кальцификации, отложений липидов и тромбов, отмыт в стерильном физиологическом растворе с целью удаления сгустков крови. Далее каждый образец АСБ был разделен на 3 равных фрагмента схожих по макроморфологической картине. Один фрагмент был использован для гистологического анализа, проводимого по единому протоколу, из второго фрагмента каждого образца АСБ была выделена геномная ДНК, а третий фрагмент был возвращен в пробирку с реагентом для стабилизации РНК и хранения образцов RNALater (Диаэм, Россия) для дальнейшего исследования. Образцы тканей сосудов были заморожены в жидком азоте и хранились при температуре -80°C вплоть до момента исследования. До оперативного вмешательства у каждого пациента были взяты образцы периферической крови (ЛКБ).

Для части образцов атеросклеротических бляшек сонных артерий (N=56, 60,7%) проведен гистологический анализ. Фрагменты пораженной ткани артерии помещали в пластиковую кассету для проводки материала и осуществляли фиксацию материала в растворе 10% нейтрального формалина в течение 24 часов. Далее выполняли гистологическую проводку фрагментов в автомате Shandon Exceisior ES Tissue Processor (Thermo Scientific, США) с использованием изопропилового спирта и парафиновой среды HistoMix (температура плавления $52-54^{\circ}\text{C}$). После проводки материала осуществляли оформление фрагментов на деревянные блоки проводили заливку материала в парафин. Приготовление гистологических срезов выполняли на микротоме Microm HM 430 (Thermo Scientific, США) толщиной 5-6 мкм.

Окраска полученных гистологических срезов проводилась двумя методами: 1) стандартная окраска гематоксилин-эозином для оценки основных морфологических структур на микропрепарате - с использованием аппарата для окрашивания The Shandon Varistain Gemini Slide Stainer (Thermo Scientific, США); 2) ручная окраска по Ван-Гизону для изучения структур соединительной ткани (коллагеновых волокон). Далее проводилось морфологическое исследование гистологических срезов с помощью светового микроскопа Axio Lab.A1 (Carl Zeiss, Германия). Фотографирование гистологических срезов осуществлялось с использованием гистосканера MIRAX MIDI (Carl Zeiss, Германия). Морфометрия проводилась с использованием компьютерной программы ImageJ (NIH, США).

В результате гистологического исследования для 62 образцов сонных артерий, пораженных атеросклерозом, были оценены параметры, характеризующие степень атеросклеротического поражения артерии и нестабильность АСБ (Таблица 4).

Таблица 4. Морфологическая характеристика атеросклеротических бляшек сонных артерий

Показатель	Атеросклеротические бляшки сонных артерий (N=62)
Оценка покрышки атеросклеротической бляшки	
Толщина покрышки, мкм (Q2 [Q1;Q3])	349,5 [221,4; 566,4]
Наличие истончений [абс. (%)]	41 (66,1%)
Наличие разрывов [абс. (%)]	32 (51,6%)
Наличие эрозии [абс. (%)]	25 (40,3%)
Наличие изъязвлений [абс. (%)]	20 (32,3%)
Наличие кальцификатов [абс. (%)]	18 (29,0%)
Оценка ядра атеросклеротической бляшки	
Размер ядра, мкм (Q2 [Q1;Q3])	1517,0 [982,9; 2136,9]
Наличие кальцификатов [абс. (%)]	35 (56,5%)
Оценка области плеча атеросклеротической бляшки	
Наличие разрывов [абс. (%)]	36 (58,1%)
Тромботические массы на поверхности бляшки [абс. (%)]	10 (16,1%)
Наличие кровоизлияний [абс. (%)]	25 (40,3%)
Наличие кальцификатов [абс. (%)]	17 (27,4%)
Оценка воспалительной инфильтрации в бляшке	
Лейкоцитарная инфильтрация [абс. (%)]	61 (98,4%)
Выраженность лейкоцитарной инфильтрации [абс. (%)]:	
+	39 (62,9%)
++	21 (33,9%)
+++	2 (3,2%)
Наличие макрофагов [абс. (%)]	49 (79,0%)
Количество макрофагов, шт. (Q2 [Q1;Q3])	2,0 [1,0; 4,0]
Наличие лимфоцитов [абс. (%)]	62 (100%)
Количество лимфоцитов, шт. (Q2 [Q1;Q3])	8,0 [4,0; 12,0]
Наличие нейтрофилов [абс. (%)]	21 (33,9%)
Количество нейтрофилов, шт. (Q2 [Q1;Q3])	2,0 [1,0; 2,0]
Наличие пенистых клеток [абс. (%)]	22 (35,5%)
Количество пенистых клеток, шт. (Q2 [Q1;Q3])	3,0 [2,0; 7,5]
Оценка участков неоваскуляризации	
Наличие неоваскуляризации [абс. (%)]	22 (35,5%)
Реканализация [абс. (%)]	7 (11,3%)
Реканализация + эндотелий [абс. (%)]	4 (6,5%)

Продолжение Таблицы 4. Морфологическая характеристика атеросклеротических бляшек сонных артерий

Показатель	Атеросклеротические бляшки сонных артерий (N=62)
Оценка развития фиброза	
Степень фиброза сосуда [абс. (%]):	
+	12 (19,3%)
++	39 (62,9%)
+++	10 (16,1%)
Степень фиброза липидного ядра [абс. (%]):	
+	28 (45,2%)
++	20 (32,3%)
+++	13 (21,0%)
Степень фрагментации коллагена [абс. (%]):	
+	20 (32,3%)
++	24 (38,7%)
+++	17 (27,4%)
Тип атеросклеротической бляшки по классификации Американской кардиологической ассоциации (American Heart Association, АНА) (Stary и др. 1995) [абс. (%]):	
III,	3 (4,8%)
IV,	19 (30,6%)
IV-V,	1 (1,6%)
V,	8 (12,9%)
в т.ч. Va,	1 (1,6%)
в т.ч. Vc,	4 (6,5%)
VI,	31 (50,0%)
в т.ч. VIa,	9 (14,5%)
VIb,	16 (25,8%)
VIc	6 (9,7%)

Таким образом, для абсолютного большинства АСБ наблюдается та или иная степень лейкоцитарной инфильтрации (инфильтрация лимфоцитами в 100% АСБ, инфильтрация макрофагами в 79% АСБ), что является одним из признаков нестабильности. Также более чем для 50% АСБ показано наличие истончений и разрывов фиброзной покрышки, в т.ч. в области «плеча» бляшки и наличие кальцификатов в ядре. Другие признаки нестабильности, такие как неоваскуляризация, внутрибляшечные кровоизлияния и кальцификация, тромбы на поверхности АСБ наблюдаются для меньшей доли атеросклеротических бляшек. В то же время, поскольку примерно для 75% АСБ толщина покрышки превышает 200 мкм (первый квартиль равен 221,4 мкм) – по показателю толщины фиброзной покрышки большинство исследуемых бляшек относятся к стабильным.

2.4 Анализ уровня метилирования в области генов микроРНК и их регуляторных элементов

2.4.1 Выделение ДНК

Материалом для работы служила ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной периферической крови и тканей сосудистой стенки. Геномная ДНК была выделена из тканей сосудов после предварительной гомогенизации на приборе Minilys (Bertin Tech, Франция) с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США) по протоколу производителя, а из образцов цельной периферической крови — стандартным фенол-хлороформным методом [Sambrook J., Russel D.W., 2001]. Далее ДНК подвергалась бисульфитной обработке.

2.4.2 Бисульфитная модификация ДНК

Бисульфитная модификация ДНК была проведена с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США) по стандартному протоколу производителя: ДНК в количестве 500-1000 нг инкубировали с конвертирующим реагентом (бисульфитом натрия) в амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия) в течение 16 часов при 50°C. Далее проводили отмывку конвертированной бисульфитом ДНК на специальных колонках из набора.

2.4.3 Анализ метилирования ДНК (микрочипы)

Оценка уровня метилирования ДНК выполнена с помощью микрочипов Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina) в образцах АСБ. Атеросклеротические бляшки сонных артерий были получены от 16 пациентов (10 мужчин и 6 женщин; медианный возраст пациентов составил 65 [63, 69] лет, Таблица А1, Приложение А). В зависимости от наличия инсульта или ТИА в анамнезе, выборка была разделена на группы симптоматических (n=5) и асимптоматических пациентов (n=11). По данным анамнеза 14 (87,5%) пациентов имели ИБС, 3 (18,8%) – перенесли инфаркт миокарда, 4 (25,0%) имели сахарный диабет 2 типа. У всех 16 пациентов в анамнезе наблюдалась гиперхолестеролемия и артериальная гипертензия, и, соответственно, все 16 пациентов принимали статины антигипертензивные препараты, и антикоагулянты/деагреганты. Степень стеноза сонной артерии у пациентов по данным УЗИ составила 90 [80; 95]% (Q2 [Q1; Q3]).

Биологический материал был разделен на несколько частей. Одна часть использовалась для гистологической верификации типа (стадии) атеросклеротической бляшки, оценки её стабильности и ряда патоморфологических параметров (Таблица А2, Приложение А).

Другая часть материала была использована для выделения ДНК с последующей обработкой бисульфитом натрия и анализом метилирования ДНК на микрочипах «Infinium MethylationEPIC BeadChip» (Illumina). Данные микрочипы содержат ДНК-зонды для оценки

уровня метилирования более 850000 CpG-сайтов в CpG-островках, белок-кодирующих генах (по RefSeq), в участках открытого хроматина по ENCODE, сайтах связывания факторов транскрипции по ENCODE и в области энхансеров по FANTOM5, включая промоторные регионы генов микроРНК. Среди общего числа CpG-сайтов, более 7000 расположены в области 1317 генов микроРНК, согласно аннотации производителя.

Интенсивности сигналов на микрочипах регистрировались с помощью сканера «iScan® System» («Illumina», США) и фиксировались в виде изображений и файлов специализированного формата (IDAT). Эти данные были использованы для анализа уровня метилирования ДНК с помощью пакетов Bioconductor (minfi, shinyMethyl, limma, GenomicFeatures, AnnotationHub) в программной статистической среде R [Aryee M.J. et al., 2014]. Полученные величины интенсивности сигналов были скорректированы на фоновый шум, оцененный по интенсивности сигналов отрицательных контрольных проб (Illumina background correction). CpG-пробы, локализованные на половых хромосомах, а также наблюдения с интенсивностью сигнала, не отличимой от фонового шума, были исключены из анализа.

Оценкой уровня метилирования служила величина β (индекс метилирования), которая рассчитывалась как отношение флуоресцентных сигналов метилированных аллелей к сумме флуоресцентных сигналов метилированных и неметилированных аллелей одного CpG-сайта (с известной геномной позицией) в образце [Du P. et al., 2010]. Индекс метилирования β варьировал от 0 (неметилированное состояние) до 1 (полное метилирование всех CpG-сайтов в данном положении). Данные о CpG-сайтах генов микроРНК, приведенные в аннотации производителя микрочипов («Illumina», США), были уточнены в соответствии с версией генома человека GRCh37/hg19 и дополнены информацией о регуляторных элементах генов микроРНК, согласно базе TRmir (<http://bio.liclab.net/trmir/index.html>) [Gao Y. et al., 2022].

Кроме того, были привлечены внешние данные из электронного репозитория Gene Expression Omnibus (GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) — 6 наборов данных, из которых 3 (GSE66500, GSE46401, GSE149759) содержали информацию о метилировании ДНК в стенках кровеносных сосудов различных русел, 2 (GSE69138, GSE107143) включали данные о метилировании ДНК в цельной крови и GSE62867 содержал информацию о метилировании как в тканях сосудов, так в лейкоцитах периферической крови.

Исследовательская группа Zaina S. с соавт. (Испания; идентификатор доступа GSE66500) [Zaina S. et al., 2015] проанализировала метилирование 38 образцов АСБ сонных артерий, от 27 (71%) мужчин и 11 женщин. Степень стеноза сонных артерий превышала 85%. Образцы были разделены на 2 равные группы (n=19): симптоматические (АСБ пациентов, перенесших нарушение мозгового кровообращения) и асимптоматические АСБ. Исследование было проведено на микрочипе Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450k array; Illumina),

позволяющем определить уровень метилирования более чем для 450000 CpG-сайтов, в том числе 3400 CpG-сайтов, расположенных в области 614 генов микроРНК, согласно аннотации производителя.

Также данной исследовательской группой (идентификатор доступа GSE46401) [Zaina S. et al., 2014] проводился анализ метилирования в образцах тканей аорты — поражённых атеросклерозом (n=15) и в интактных (n=15), полученных от здоровых доноров, сопоставимых с пациентами по полу (10 (67%) мужчин и 5 женщин) и возрасту. Набор данных GSE46401 также включал 19 образцов сонных артерий, полностью соответствующих подгруппе асимптоматических АСБ сонных артерий из вышеописанного набора данных GSE66500. Исследование было выполнено с помощью того же типа микрочипов, Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450k array; Illumina).

В исследовании Li Jingjin с соавт. (Китай, идентификатор доступа GSE149759) [Li J. et al., 2021] проведён анализ образцов АСБ сонных артерий 14 мужчин. У 6 пациентов наблюдался сахарный диабет 2 типа, по 9 пациентов имели в анамнезе ишемическую болезнь сердца и гипертензию. Образцы АСБ от пациентов были также разделены на 2 группы: симптоматические бляшки (n=6) пациентов, перенесших острое сердечно-сосудистое событие (инсульт, транзиторная ишемическая атака) за последние шесть месяцев. Асимптоматическими считались бляшки, полученные от пациентов, не имевших острых сердечно-сосудистых событий и соответствующих им симптомов в течение шести месяцев до плановой операции (n=8). Пациенты двух групп не различались по клиническим характеристикам. Кроме того, ещё у четырёх пациентов, перенесших операцию коронарного шунтирования (все они имели в анамнезе ишемическую болезнь сердца и гипертензию), были собраны образцы интактных тканей левой внутренней грудной артерии (n=4). В данном случае, анализ метилирования проводился как на микрочипе Infinium Methylation 450K, так и MethylationEPIC BeadChip (он же Methylation850 Beadchip); соответствие расположения CpG-сайтов генов Infinium Methylation 450K и MethylationEPIC BeadChip приведено в Таблице Б1 (Приложение Б). Особенностью данной работы является наличие гистологически нестабильных атеросклеротических бляшек сонных артерий у симптоматических пациентов и стабильных — у пациентов без инсульта в анамнезе.

Ранее в исследовании лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики ТНИМЦ (идентификатор доступа GSE62867) [Nazarenko M.S. et al., 2015] проведён анализ образцов тканей сосудов и лейкоцитов периферической крови 6 мужчин с атеросклерозом коронарных артерий. От каждого пациента были получены образцы поражённых коронарных артерий (n=6), интактных внутренних грудных артерий (n=6), интактных больших подкожных

вен (n=6) и лейкоцитов крови (n=6). Исследование проведено на микрочипе Illumina Infinium 27k Human Methylation Beadchip.

В исследовании Istas G. с соавт. (Бельгия, идентификатор доступа GSE107143) [Istas G. et al., 2017], проведён анализ метилирования в лейкоцитах периферической крови пациентов с выраженным атеросклерозом коронарных артерий (n=8, все мужчины) и сопоставимой по возрасту и группой относительно здоровых индивидов (n=8). Исследование было проведено на микрочипе Infinium HumanMethylation450 BeadChip.

Группа Roquer и Soriano-Tárraga с соавт. (Испания, идентификатор доступа GSE69138) [Soriano-Tárraga C. et al., 2018] проанализировала лейкоциты периферической крови 404 пациентов (229 (56%) мужчин, 175 женщин) с различным типом инсульта. Группа была разделена на 3 подгруппы – пациенты с кардиоэмболическим инсультом (n=127), с лакунарным инсультом (n=141) и с инсультом, вызванным атеросклерозом крупных артерий (n=132); для 4 пациентов тип инсульта установлен не был. Исследование было проведено на микрочипе Infinium HumanMethylation450 BeadChip.

2.4.4 Выбор регуляторных элементов генов микроРНК – кандидатов в отношении формирования атеросклеротических бляшек с нестабильным течением для анализа уровня метилирования ДНК

В качестве генов-кандидатов для анализа регуляторных элементов были выбраны гены miR-10b (*MIR10B*), miR-21 (*MIR21*) и miR-127 (*MIR127*), а также *MIR143HG* (*CARMN*) и *MIR100HG* — гены-хозяева miR-143/145 и miR-100, соответственно (Таблица 5). Основными критериями выбора генов были имеющиеся в литературе данные относительно связи экспрессии зрелой микроРНК в тканях артерий с атеросклеротическим поражением/нестабильностью атеросклеротических бляшек в двух и более исследованиях, а также эпигенетическая дисрегуляция (прежде всего через метилирование ДНК) активности данных генов микроРНК при патологии.

Для определения локализации регуляторных элементов выбранных микроРНК и их генов-хозяев были использованы базы данных FANTOM5 (<http://fantom.gsc.riken.jp/5/>) [De Rie D. et al., 2017] и TRmir (<http://bio.liclab.net/trmir/index.html>) [Gao Y. et al., 2022], а также литературные источники из баз данных HMDD v3.2: the Human microRNA Disease Database (<http://www.cuilab.cn/hmdd>) и NCBI: National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Таблица 5. Гены-кандидаты для анализа регуляторных элементов микроРНК, связанных с нестабильностью атеросклеротических бляшек сонных артерий

Микро-РНК	Ген (локус)		Координаты* гена микроРНК/ CpG-островка в гене микроРНК, (количество CpG-сайтов, при наличии)	ID и координаты* промотора FANTOM5	Координаты* выбранного для анализа уровня метилирования региона гена микроРНК		Локализация микроРНК / ген-хозяин/ кластер микроРНК
miR-10b	MIR10B	2q31.1	chr2:177,015,031-177,015,140 / chr2:177,014,949-177,015,214 (18 CpG-сайтов)	p1@HOXD3 chr2:177,001,291-177,001,315	MIR10B (2017)	chr2:177,014,909-177,015,253	Межгенная / кластер HOXD
					MIR10B (2019)	chr2:177,014,629-177,015,244	
miR-21	MIR21	17q23.1	chr17:57,918,627-57,918,698 / chr17:57,916,300-57,916,700 (16 CpG-сайтов)	p1@AK310806 chr17:57,915,282-57,915,332	MIR21 промотор	chr17:57,915,138-57,916,025	Внутригенная / интрон VMP1
					MIR21 CpG-островов	chr17:57,915,960-57,916,717	
					MIR21 «тело» гена	chr17:57,918,142-57,918,840	
miR-100	MIR100	11q24.1	chr11:122,022,937-122,023,016	p2@ENST00000533109 chr11:122,051,328-122,051,348	chr11:122,024,891-122,025,506		Внутригенная / интрон MIR100HG
miR-127	MIR127	14q32.2	chr14:101,349,316-101,349,412 / chr14:101,349,373-101,349,860 (36 CpG-сайтов)	p1@MEG3 chr14:101,292,449-101,292,462	chr14:101,349,259-101,349,884		Межгенная / импринтированный регион RTL1 / кластер miR-433/127
miR-143	MIR143	5q32	chr5:148,808,545-148,808,784	p1@MIR143HG chr5:148,786,424-148,786,453	chr5:148,786,304-148,786,864		Внутригенная / некодирующая РНК CARMN (MIR143HG) / кластер miR-143/145
miR-145	MIR145		chr5:148,810,209-148,810,296		chr5:148,808,001-148,808,583		

* Все координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19

Для межгенных микроРНК — *MIR10B* и *MIR127* — предполагаемые регуляторные элементы по базе данных FANTOM5 находились на значительном удалении от непосредственно самих генов микроРНК (~14 тыс.п.н. в случае *MIR10B* и ~57 тыс.п.н. в случае *MIR127*) (Таблица 5). При этом в литературных источниках было продемонстрировано, что при атеросклерозе артерий происходит изменение уровня метилирования регионов, включающих CpG-островки, расположенные в непосредственной близости от генов вышеупомянутых микроРНК [Aavik E. et al., 2014; Lacey M. et al., 2019b]. В связи с этим, в случае *MIR10B* и *MIR127* исследовательский интерес представлял анализ уровня метилирования регионов, охватывающих CpG-островки в области тела генов. Согласно браузеру UCSC, CpG-островок в области гена *MIR10B* занимает 266 п.н. (chr2:177,014,949-177,015,214; сборка генома GRCh37/hg19) и содержит 18 CpG-сайтов, а CpG-островок в области гена *MIR127* занимает 488 п.н. (chr14:101,349,373-101,349,860; сборка генома GRCh37/hg19) и содержит 36 CpG-сайтов.

Для таких внутригенных микроРНК, как *MIR21*, *MIR143* и *MIR145*, полученные из литературных источников данные по локализации регуляторных элементов были неоднозначны. В таком случае области расположения регуляторных участков визуализировались в браузере UCSC (UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly) и для исследования выбирался участок генома, охватывающий как можно больше обозначенных элементов.

На Рисунке 3 указано расположение регуляторных элементов гена *MIR21*, в том числе предполагаемых промоторов, рассмотренных в исследованиях транскрипционных факторов, поскольку предсказание расположения промоторов микроРНК важно для построения регуляторных сетей микроРНК [Zhao Y et al., 2017]. Таким образом, можно определить, что в большинстве исследований промотор гена *MIR21* указан в локусе chr17:57,914,850-57,915,900. Собственно ген *MIR21* располагается в регионе chr17:57,918,627-57,918,698 [<http://genome-euro.ucsc.edu>]. В публикации M.V. Iorio с соавт. в области chr17:57,916,300-57,916,700 (2,5 тыс. п.н. от гена *MIR21*) указано наличие CpG-островка, соответствующего критериям: содержание CpG-сайтов 50%, отношение наблюдаемого числа CpG-сайтов к ожидаемому (CpG O/E ratio) >0.6, длина >200 п.н. [Iorio et al., 2007]. Согласно вышеуказанной публикации, длина данного CpG-островка составляет 310 п.н., однако в браузере UCSC, использующем аналогичные критерии (содержание CpG-сайтов 50%, отношение наблюдаемого числа CpG-сайтов к ожидаемому (CpG O/E ratio) > 0.6, длина >200 п.н.) CpG-островок в пределах 2,5 тыс. п.н. от гена *MIR21* не определяется, а функция CpG island prediction в онлайн-инструменте для подбора праймеров MethPrimer (<https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) определяет CpG-островок с содержанием CpG-сайтов 40%, отношением наблюдаемого числа CpG-сайтов к ожидаемому (CpG O/E ratio) > 0.6 и длиной 132 п.н. в области chr17:57,916,335-57,916,466. Исходя из этого, для анализа уровня метилирования гена *MIR21* выбраны три региона:

предполагаемый промоторный регион гена *MIR21*, chr17:57,915,138-57,916,025 (888 п.н., 9 CpG-сайтов); CpG-островок в области гена *MIR21*, chr17:57,915,960-57,916,717 (758 п.н., 17 CpG-сайтов); «тело» гена *MIR21*, chr17:57,918,142-57,918,840 (699 п.н., 6 CpG-сайтов).

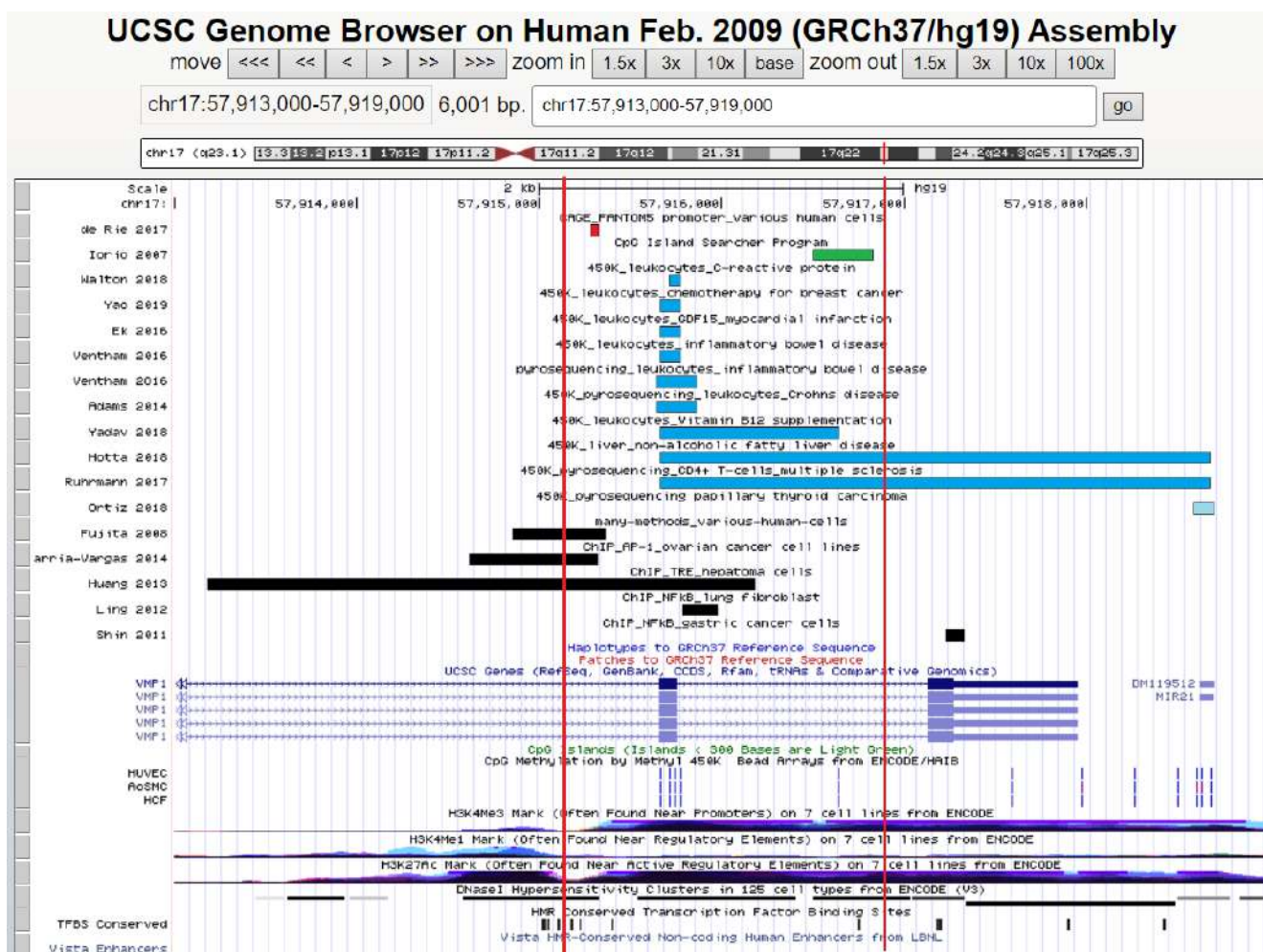


Рисунок 3. Расположение регуляторных элементов гена *MIR21*. Красным обозначен промоторный регион по базе данных FANTOM5 (<http://fantom.gsc.riken.jp/5/> [de Rie D. et al., 2017]), зелёным – CpG-островок [Iorio M.V. et al., 2007], синим – регионы, для которых изучался уровень метилирования ДНК в лейкоцитах крови и ткани печени при различных заболеваниях с помощью микрочиповых методов и пиросеквенирования [Adams A.T. et al., 2014; Ek W.E. et al., 2016; Ventham N.T. et al., 2016; Hotta K. et al., 2018; Ruhrmann S., et al., 2018; Walton E. et al., 2018; Yadav D.K et al., 2018; Yao S. et al., 2019], светло-синим – регион, для которого проводилось искусственное деметилирование 5-азацитидином в эксперименте на культуре клеток папиллярной карциномы щитовидной железы [Ortiz I.M.D.P. et al., 2018], черным – регионы предполагаемых промоторов на основе анализа характеристик последовательности генома [Fujita S. et al., 2008] и на основе данных хроматин-иммунопреципитационного секвенирования (ChIP-seq) исследованные при поиске транскрипционных факторов [Shin V.Y. et al., 2010; Ling M. et al., 2012; Huang Y.H. et al., 2013; Echevarría-Vargas I.M. et al., 2014].

Вертикальными линиями обозначен регион, выбранный для анализа.

Данные о наличии собственного промотора гена *MIR143* единичны, а предполагаемые регионы его локализации совпадают только в двух исследованиях, выполненных методом метил-чувствительной ПЦР на клетках студенистого ядра межпозвоночных дисков [Zhao K. et al., 2017] и ГМК сосудов [Zhang H.P. et al., 2016; Zhao K. et al., 2017] (Рисунок 4). Собственно ген *MIR143* располагается в области chr5:148,808,545-148,808,784 [http://genome-euro.ucsc.edu]. Считается, что экспрессия miR-143 регулируется промотором гена *MIR143HG* (*CARMN*), который приходится на область chr5:148,786,424-148,786,453 [Blick C. et al., 2015; Deng L. et al., 2015; de Rie D. et al., 2017; Riches K. et al., 2017].

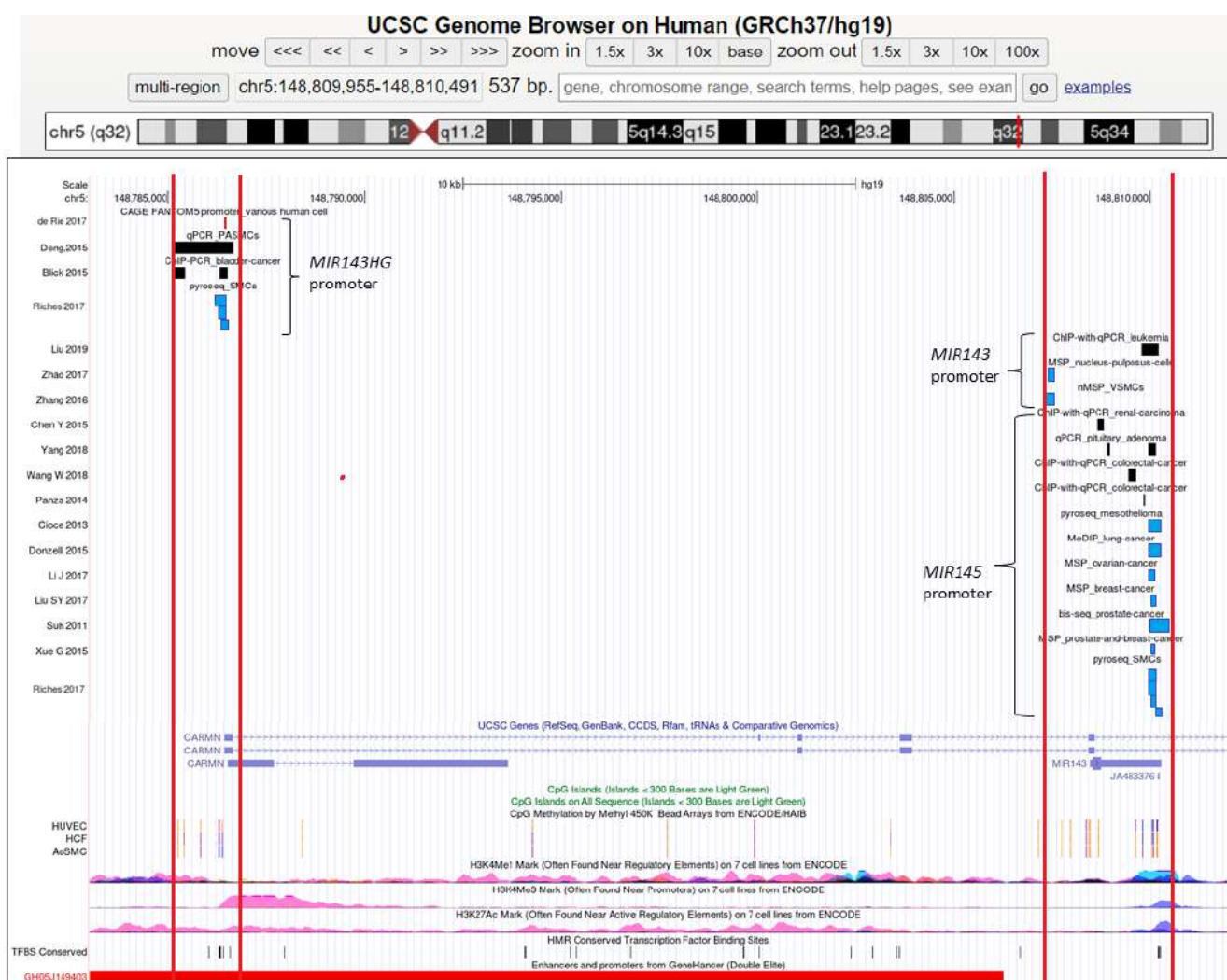


Рисунок 4. Расположение регуляторных элементов генов *MIR143* и *MIR145*. Красным обозначен промоторный регион по базе данных FANTOM5 (<http://fantom.gsc.riken.jp/5/> [de Rie D. et al., 2017]), синим – регионы, для которых изучался уровень метилирования в ГМК [Zhang H.P. et al., 2016; Riches K. et al., 2017], клетках студенистого ядра межпозвоночных дисков [Zhao K. et al., 2017] и в опухолевых клетках при различных заболеваниях [Suh S.O. et al., 2011; Cioce M. et al., 2013; Donzelli S. et al., 2015; Xue G. et al., 2015; Li J. et al., 2017; Liu J. et al., 2017; Liu S.Y. et al., 2017], черным – регионы, рассматриваемые в различных источниках как промоторные для *MIR143* или *MIR145*, в т.ч. на основе данных хроматин-иммунопреципитационного секвенирования (ChIP-seq) исследованные при поиске транскрипционных факторов [Panza A. et al., 2014; Blick C. et al., 2015; Chen Y. et al., 2015; Deng L. et al., 2015; Wang W. et al., 2018; Yang W. et al., 2018; Liu T. et al., 2019].

Вертикальными линиями обозначены регионы, выбранные для анализа.

В случае *MIR145*, участок, охватывающий как можно больше предполагаемых промоторных регионов из литературных источников (chr5:148,810,000-148,810,500), также захватывал и «тело гена» *MIR145* (chr5:148,810,209-148,810,296) (Рисунок 4). Для анализа уровня метилирования генов *MIR143* выбран промоторный регион гена-хозяина *MIR143HG* (*CARMN*) — chr5:148,786,304-148,786,864 (561 п.н., 10 CpG-сайтов), а также частично область «тела» гена *MIR143* — chr5:148,808,001-148,808,583 (583 п.н., 5 CpG-сайтов). В случае гена *MIR145* подобранные ПЦР-праймеры оказались нерезультативными, амплификация участка chr5:148,809,848-148,810,488 не происходила, независимо от вариаций условий ПЦР.

Для ещё одной внутригенной микроРНК, *MIR100*, литературных источников с указанием локализации промотора не обнаружено. В то же время, по данным Chen D. с соавт. (2014), предполагаемый промотор *MIR100* содержит ZEB1-связывающий сайт E-box, который представляет собой 6 нуклеотидов (CAGCTG) и расположен на расстоянии 2,2 тыс.п.н. от гена *MIR100* [Chen D. et al., 2014]. Согласно браузеру UCSC (<http://genome-euro.ucsc.edu>), ген *MIR100* располагается в регионе chr11:122,022,937-122,023,016, в то время как сайт E-box занимает участок chr11:122,025,183-122,025,188. В эксперименте Chen D. с соавт. (2014) на эпителио-подобных клетках линии НЕК293Т с помощью хроматин-иммуно-преципитационного секвенирования (ChIP-seq) и люциферазного метода установлено, что с сайтом E-box связывается транскрипционный фактор ZEB1, который усиливает экспрессию miR-100 [Chen D. et al., 2014]. Исходя из этого, для анализа уровня метилирования гена *MIR100* выбран регион chr11:122,024,891-122,025,506 (616 п.н., 8 CpG-сайтов), полностью охватывающий сайт E-box.

Таким образом, для 6 генов-кандидатов, уровень экспрессии которых изменялся при нарушении стабильности атеросклеротических бляшек сонных артерий, были подобраны 8 регионов для анализа уровня метилирования методом таргетного бисульфитного секвенирования. В случае межгенных микроРНК (*MIR10B* и *MIR127*) подобранные регионы охватывали CpG-островки, полностью или частично включающие сами гены микроРНК, в то время как для внутригенных микроРНК (*MIR21*, *MIR100* и *MIR143*) проанализированы предполагаемые промоторные регионы. Для гена *MIR21* также исследован регион предполагаемого CpG-островка и участок, включающий непосредственно сам ген *MIR21*.

2.4.5 Анализ метилирования ДНК (таргетное бисульфитное секвенирование)

Анализ метилирования ДНК (CpG-сайтов) в области целевых генов был осуществлен методом бисульфитного секвенирования ампликонов (Bisulfite Amplicon Sequencing, BSAS) с использованием технологии высокопроизводительного массового параллельного секвенирования (massive parallel sequencing, MPS) [Masser D.R. et al., 2015]. Чувствительность метода таргетного бисульфитного секвенирования многие исследователи определяют в 1-2 %

метилирования [Ju C. et al., 2019; Moser D.A. et al., 2020; Yusupov N. et al., 2023], хотя в некоторых источниках она принимается в диапазоне 5-10% [Kiselev et al. 2021].

Всего было проведено 4 запуска секвенатора MiSeq (Illumina, США) и суммарно в анализ были включены индивиды как исследуемой группы с атеросклерозом сонных артерий (n=87, Таблица А3, Приложение А), так и контрольной группы без признаков атеросклероза (n=31, Таблица А3, Приложение А). Гистологический анализ выполнен для 57 образцов атеросклеротических бляшек сонных артерий (Таблица А4, Приложение А).

Анализ метилирования ДНК методом высокопроизводительного массового параллельного секвенирования включал следующие этапы:

- (1) выбор целевых регионов генома и подбор праймеров,
- (2) амплификация целевых участков методом ПЦР,
- (3) эквимольное пулирование и очистка ампликонов,
- (4) приготовление и секвенирование ДНК-библиотек,
- (5) биоинформатическая обработка результатов.

Подбор праймеров для бисульфитного секвенирования ампликонов был проведен с помощью нескольких инструментов, доступных в сети Интернет. Для подбора праймеров на последовательность ДНК, содержащую целевой регион, был использован онлайн-инструмент MethPrimer 2 (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer.cgi>) и заданы следующие критерии: длина праймеров – 20-30 нуклеотидов, температура плавления праймеров – 58–65°C, длина амплифицируемой последовательности – 300–900 нуклеотидов. В том случае, если с помощью онлайн-инструмента MethPrimer 2 не удавалось подобрать подходящую пару праймеров, поиск осуществлялся в более ранней версии инструмента MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) [Li L.C., Dahiya R., 2002].

Расчет теоретической температуры денатурации и GC-состава олигонуклеотидной последовательности, а также возможности формирования вторичных структур и появления гомо- и гетеродимерных дуплексов подобранных праймеров, осуществлялся с помощью онлайн-инструмента IDT OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Определение соответствия последовательности, амплифицируемой в ПЦР с использованием подобранных праймеров, целевому региону осуществлялась методом ПЦР *in silico* с помощью онлайн-инструмента BiSearch ePCR (<http://bisearch.enzim.hu/?m=genomsearch>). Последовательности подобранных праймеров приведены в Таблице 6. Координаты исследованных CpG-сайтов приведены в Таблице Б1 (Приложение Б).

Таблица 6. Характеристика исследуемых регионов и структура праймеров

Регион	Локализация относительно гена	Категория CpG-региона**	Последовательность праймеров	Температура отжига праймеров	Число CpG-сайтов	Локализация ампликона *	Длина ПЦР-продукта (п.н.)
<i>MIR10B</i>	ген полностью	CpG-островок	F: GTAGTAGGAAAAGGAGTAGATATAGGATATT R: CCTCCTAAAATCCAAAATAATAAAACAAAA	62	23	chr2:177014629-177015244	616
			F: ATTTTGGTAGAAGAATGAGGGAATT R: TTCTTTTCAACACCCAAAAAATACT	62	20	chr2:177014868-177015332	465
Предполагаемый промотор <i>MIR21</i>	«выше по течению»	«открытое море»	F: TTTTGTGAGAAGAGGGGATAAGT R: TCAAAACAACAACCTCATTCATATAACAAA	58	9	chr17:57915138-57916025	888
CpG-островок <i>MIR21</i>	«выше по течению»	«открытое море»***	F: TTAAAAATAAGGGTAGAGTTAATGGAA R: TTAATCAACTAAAAACAACAAAAATCC	60	17	chr17:57915960-57916717	758
«Тело» гена <i>MIR21</i>	ген полностью	«открытое море»	F: GGGATTGGTTTATTTGGGGA R: CCTCCATACTACTACATTATAACACAAAAA	62	6	chr17:57918142-57918840	699
Предполагаемый регуляторный регион гена <i>MIR100</i> (E-box)	«выше по течению»	«открытое море»	F: TTGATAAAGGTATGGGGTTAGAGGTA R: AATTCTTACTTAATAAAACAAACCAAAAT	60	8	chr11:122024891-122025506	616
«Тело» гена <i>MIR127</i>	ген полностью	CpG-островок	F: TTTTGGTATTTATAGGTTTTTAAGG R: AATAAAAATAAACCCCTACCACAAC	60	40	chr14:101349259-101349884	626
Промотор <i>MIR143</i>	«выше по течению»	«открытое море»	F: GGGGTAGGTAAAGGTAAGGTAGTTA R: AAACCAACAAAACCATAAAACTAAAAC	60	10	chr5:148786304-148786864	561
«Тело» гена <i>MIR143</i>	5'-участок гена	«открытое море»	F: AGTATAAAGGTGGGGTATGGTATTTAAA R: ACAAACAACCTTCTCTCTCCTAAACT	60	5	chr5:148808001-148808583	583

Примечание – * – координаты приведены согласно сборке генома человека GRCh37/hg19; ** – категории в соответствии с плотностью расположения CpG-сайтов: CpG-островок (плотное скопление CpG-сайтов), единичные CpG-сайты на расстоянии, превышающем ± 4000 п.н. от CpG-островка – «открытое море».*** согласно браузеру UCSC

Амплификация целевых участков ДНК методом ПЦР. Амплификация ДНК с подобранными праймерами была проведена с использованием набора для ПЦР БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (БиоЛабМикс, Россия). Оптимальную температуру отжига определяли с помощью градиентной ПЦР, варьируя температуру в пределах $\pm 2^{\circ}\text{C}$ от расчётной для каждой пары праймеров. Амплификация ДНК была проведена на приборах ProFlex PCR System (ThermoFisher Scientific, США) и DTPRime4 (ДНК-Технология, Россия) по программе: 95°C – 5 мин., 40x (95°C – 30 сек., t отж. – 30 сек., 72°C – 60 сек.), 72°C – 5 мин.; температура отжига для каждой пары праймеров указана в Таблице 2.4.2. Результаты реакции оценивали с помощью электрофореза ДНК в 3 %-ном агарозном геле, подкрашенным бромистым этидием с последующей визуализацией фрагментов ДНК на гель-документирующих системах ChemiDoc XRS+ System и Gel Doc XR+ Imaging System (Bio-Rad, США).

Эквимольное пулирование и очистка ампликонов. Ампликоны, полученные после ПЦР одного и того же образца ДНК, были эквимольно смешаны (приблизительно по 200 миллиардов копий двуцепочечной ДНК каждого ампликона) и разведены до 200 мкл. Очистку пулированных ампликонов для подготовки библиотек осуществляли с помощью набора для очистки ПЦР-продуктов GeneJET NGS Cleanup Kit (ThermoFisher Scientific, США). Концентрацию очищенных ампликонов измеряли на флуориметре «Qubit 3.0» (ThermoFisher Scientific, США).

Приготовление и секвенирование ДНК-библиотек. После измерения концентрации ДНК на приборе Qubit, очищенные пулы ампликонов были использованы для приготовления ДНК-библиотек с использованием наборов Nextera XT DNA Library Prep Kit или Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina, США), согласно протоколу производителя. Секвенирование пулированной библиотеки ДНК было выполнено на приборе MiSeq (Illumina, США) с помощью набора MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles, Illumina, США) в режиме секвенирования по 150 п.н. с обоих концов фрагментов ДНК-библиотеки.

Биоинформатическая обработка результатов. Для автоматизации и стандартизации обработки результатов использован алгоритм methylseq, реализованный в Nextflow [Ewels P.A. et al., 2020]. Полученные прочтения фрагментов ДНК были автоматически рассортированы по образцам с удалением нуклеотидной последовательности адаптеров. Прочтения были отфильтрованы по качеству (не менее Q30) и длине (не менее 20 нуклеотидов) с использованием инструмента Trim Galore [Krueger F. et al., 2021] и выравнены на референсную сборку генома человека GRCh37/hg19 с помощью инструмента bwa-meth [Pedersen B.S. et al., 2014]. Информация о статусе метилирования CpG-сайтов из BAM-файлов экстрагирована с помощью инструмента Bismark [Krueger F., Andrews S.R., 2011]. Для контроля качества использованы инструменты FastQC, Qualimap, Preseq, MultiQC

(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) [Daley T., Smith A.D., 2013; Ewels P. et al., 2016; Okonechnikov K. et al., 2016].

Дальнейшая биоинформатическая обработка профилей метилирования ДНК в исследуемых локусах и статистический анализ данных были выполнены в свободно распространяемой программной среде R с помощью специализированного пакета methylKit [Akalin A. et al., 2012]. Уровень метилирования CpG-сайта определяли как долю прочтений, соответствующих метилированным остаткам цитозина, по отношению ко всем прочтениям цитозина в данной позиции генома, выраженную в процентах. CpG-сайты с менее чем 15-кратным покрытием из анализа исключались. Для манипуляций с данными, вывода графиков и таблиц использованы дополнительные программные пакеты R (ggplot2, reshape, RColorBrewer, Rtsne, xlsx), а также онлайн инструмент Methylation plotter (http://maplab.imppc.org/methylation_plotter/).

2.5 Методы исследования для анализа экспрессии микроРНК

2.5.1 Выделение РНК

Выделение РНК производилось из фрагментов тех же образцов сонных артерий 16 пациентов, которые были взяты в анализ уровня метилирования ДНК на микрочипах (Приложение А1). Тотальная РНК, включая микроРНК, была выделена после предварительной гомогенизации ткани на приборе Minilys (Bertin Tech, Франция) с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. Полученные образцы РНК проверяли на качество с использованием платформы Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Затем образцы были заморожены и хранились при температуре -80°C вплоть до момента исследования.

2.5.2 Секвенирование микроРНК (miRNA-seq)

Подготовка библиотек для секвенирования микроРНК была проведена с использованием набора NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs, США). Протокол включал следующие этапы: Лигирование 3'-SR-адаптера, гибридизацию праймера для обратной транскрипции, лигирование 5'-SR адаптера, обратную транскрипцию, амплификацию и отбор малых РНК. Амплификация с индексированными праймерами NEBNext SR была проведена на приборе ProFlex PCR System (ThermoFisher Scientific) по программе: 94°C – 30 сек., 12x (94°C – 15 сек., 62°C – 30 сек., 70°C – 15 сек.), 70°C – 5 мин. Очистка образцов проводилась с использованием набора Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (Illumina, США).

Отбор малых РНК проводили с помощью AMPure XP Bead (Beckman Coulter, США). Оценка качества приготовленных библиотек проводилась с помощью прибора Bioanalyzer 2100 (Agilent, США). Секвенирование кДНК-библиотек выполнялось на приборе HiSeq 1500 (Illumina, США).

Данный прибор осуществляет высокопроизводительный анализ, используя метод секвенирования путем синтеза и мостиковую ПЦР. Остановка синтеза происходит после присоединения каждого нуклеотида, что обеспечивает высокую точность прочтений. Данный подход позволяет получать большой объем информации, генерируя миллионы одновременных прочтений, покрывающих весь спектр последовательностей малых РНК. Запуск прибора осуществлялся в режиме однонаправленных прочтений с длиной в 50 нуклеотидов.

2.5.3 Биоинформатический анализ данных

Обработку данных секвенирования и оценку экспрессии микроРНК проводили с помощью пакета программ miARma-Seq [Andrés-León E. et al., 2018]. Оценка качества прочтений осуществлялась с помощью программы FastQC v0.11.5. Для удаления адаптеров и тримминга последовательностей использовался программный пакет Trim Galore [Krueger F. et al., 2021]. Выравнивание последовательностей осуществлялось на референсную сборку генома человека GRCh37/hg19 с помощью программного обеспечения BWA-MEM [Li H., 2013]. Для подсчёта количества прочтений микроРНК использовался алгоритм featureCounts [Liao Y. et al., 2014]. Оценка уровня экспрессии микроРНК проводилась с использованием пакета "edgeR" в программной среде R; экспрессию микроРНК оценивали как количество картированных прочтений на миллион (counts per million, CPM) в каждом образце. В качестве порогового значения было установлено не менее 10 CPM по крайней мере для 2 образцов. Информация о предшественниках (miRNA_primary_transcript) и зрелых микроРНК (miRNA) получена из базы miRbase v.22.1 [Kozomara A. et al., 2019].

2.6 Статистический анализ

Статистическая обработка полученных результатов была проведена с помощью стандартных пакетов в программной среде R (версия 4.1.2 и более ранние версии) [R Core Team]. Для оценки уровней метилирования были использованы непараметрические оценки распределения в виде: $M (Q1; Q3)$, где M – медиана, $Q1$ – 1-й квартиль (25-й перцентиль), $Q3$ – 3-й квартиль (75-й перцентиль).

Сравнение уровней метилирования в группах исследования также проводилось с использованием непараметрических критериев: критерия Уилкоксона – при сравнении связанных выборок разных тканей, полученных от одних и тех же пациентов, а также U-критерия Манна-Уитни – при сравнении независимых групп исследования (образцов лейкоцитов крови, полученных от пациентов и относительно здоровых индивидов). Корреляционный анализ проводился с применением критерия Спирмена.

Для анализа сходства профилей метилирования ДНК в исследуемых образцах использован алгоритм нелинейного снижения размерности данных t-SNE (t-distributed Stochastic

Neighbor Embedding) [van der Maaten L.J.P., Hinton G.E., 2008]. Для поиска дифференциального метилированных CpG-позиций применяли линейную регрессию, где зависимой переменной был уровень метилирования, а независимыми – порядковый номер эксперимента, биологический образец и тип ткани. Такой подход позволил отделить внутрииндивидуальную дисперсию от групповой и технической.

Дифференциально метилированными между группами образцов считались CpG-сайты с разницей среднего уровня метилирования по группам, превышающей погрешность измерения (для каждого региона рассчитывалась отдельно), что дополняет статистическую значимость различий биологически обоснованным критерием [Назаренко М.С. с соавт., 2017]. Для оценки погрешности измерения уровня метилирования ДНК использован метод Монте-Карло, поскольку он не требует нормального распределения анализируемой величины (в данном случае – уровня метилирования), в отличие, например, от «контрольных правил Вестгарда» [Farrance I, Frenkel R, 2014]. Алгоритм Монте-Карло описан в протоколе «Оценка соответствия методами Монте-Карло» [Van der Grinten, van der Spek, 2014]. В ходе процесса строились гистограммы плотности распределения вероятности, для каждой из которых площадь под графиком между любыми двумя выбранными значениями переменной — это вероятность того, что переменная может принимать любое значение в указанном интервале [Farrance I, Frenkel R, 2014]. По построенным гистограммам плотности распределения вероятности для каждого региона были определены границы, в пределах которых измеренные значения уровня метилирования с 95% вероятностью являются достоверными.

Статистически значимыми считались различия с достигнутым уровнем статистической значимости $p < 0,05$. Контроль ложноположительных результатов (False Discovery Rate, FDR) при множественном тестировании статистических гипотез был проведен по методу Бенджамини-Хохберга [Benjamini Y., Hochberg Y., 1995].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Уровень метилирования регуляторных элементов отдельных генов микроРНК в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах, а также в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий и контрольной группы

3.1.1 Анализ уровня метилирования CpG-островка гена *MIR10B*

Ген *MIR10B* расположен в локусе 2q31.1 в пределах CpG-островка в области кластера генов *HOXD* между генами *HOXD4* и *HOXD8* [<http://genome-euro.ucsc.edu>]. Есть данные, что в тканях аорты при атеросклерозе наблюдается aberrantное метилирование некоторых регионов, входящих в кластер генов *HOXD* [Lacey M. et al., 2019b]. Промоторный регион *MIR10B* указывается отдельными авторами как chr2:177,014,875-177,014,995 [Kim K. et al., 2011]. Исходя из этого, для анализа уровня метилирования гена *MIR10B* был выбран регион chr2:177,014,629-177,015,244 (616 п.н.; сборка генома GRCh37/hg19), охватывающий 23 CpG-сайта как гена микроРНК, так и его промотора по К. Kim с соавт. Локализация и эпигенетический контекст гена *MIR10B* приведены на Рисунке В1 (Приложение В).

Анализ уровня метилирования данного региона выполнен для 74 пациентов с атеросклерозом сонных артерий и 27 индивидов контрольной группы. Подробное описание выборок приведено в подразделе «2.2. Характеристика включенных в исследование выборок» и Таблице А3 (Приложение А). Морфологически атеросклеротические бляшки сонных артерий (АСБ, n=57) охарактеризованы в Таблице А4 (Приложение А).

Всего было осуществлено три отдельных запуска секвенатора для анализа образцов ДНК методом таргетного бисульфитного секвенирования. В первом и втором запуске был проанализирован уровень метилирования 20 CpG-сайтов в регионе chr2:177,014,909-177,015,253 (345 п.н.) для 51 пациента с атеросклерозом сонных артерий и 13 индивидов контрольной группы. В подгруппе пациентов были исследованы образцы АСБ (n=45) и лейкоциты периферической крови (n=51). По результатам третьего запуска секвенатора получены данные о метилировании 23 CpG-сайтов региона chr2:177,014,629-177,015,244 в 21 образцах АСБ, 19 образцах непораженных сонных артерий, 9 образцах больших подкожных вен, 22 образцах лейкоцитов периферической крови пациентов с атеросклерозом и 14 образцах лейкоцитов периферической крови контрольной группы. Уровни метилирования 23 CpG-сайтов в области гена *MIR10B* в сосудах и лейкоцитах крови приведены в Таблице Г1 (Приложение Г).

В результате tSNE-анализа наблюдается кластеризация образцов по номерам запуска секвенатора: образцы третьего запуска (Рисунок 5 А, справа) расположены отдельно от запусков 1 и 2 (Рисунок 5 А, слева). Подобная кластеризация сохранялась и в случае анализа исключительно «общих» 20 CpG-сайтов между двумя регионами.

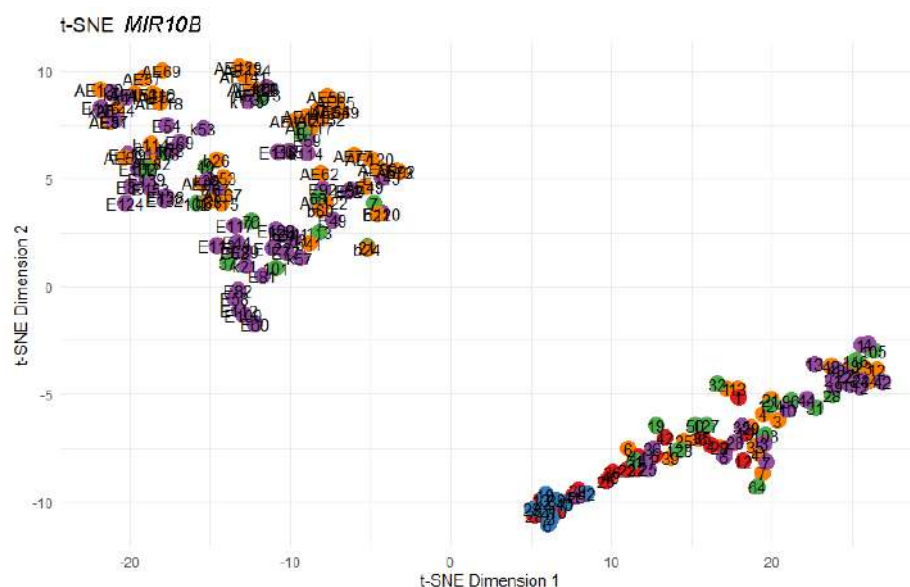
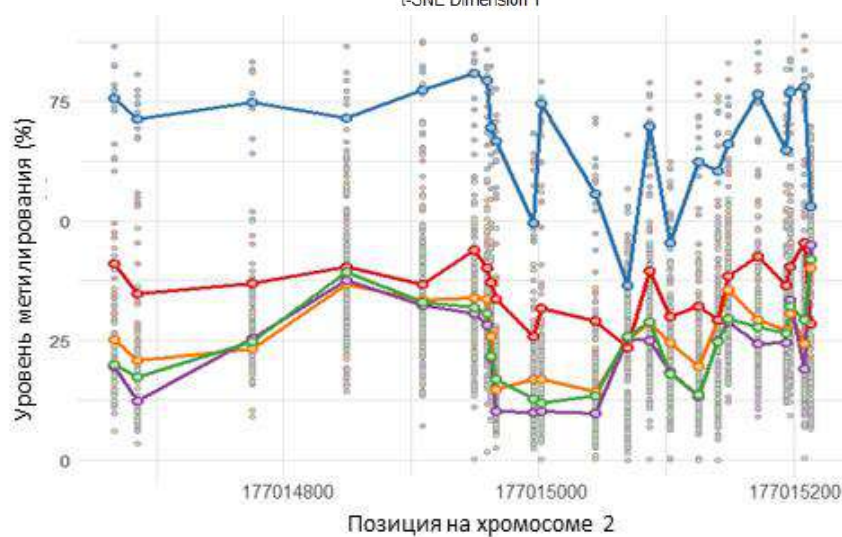
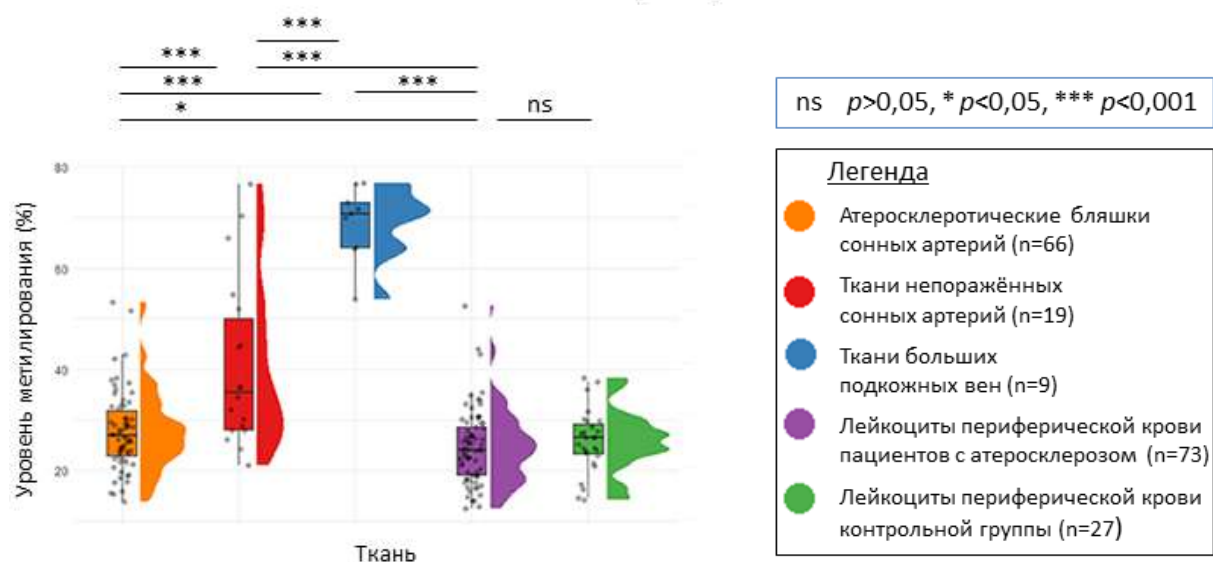
А**Б****В**

Рисунок 5. Анализ уровня метилирования CpG-сайтов в области гена *MIR10B* в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах, а также в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий и контрольной группы. (А) Взаимное расположение и кластеризация образцов (по методу tSNE) в зависимости от уровня метилирования CpG-сайтов. Профиль метилирования (Б) и медианный уровень метилирования CpG-сайтов (В) в сосудах и лейкоцитах крови. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Если же рассматривать кластер, в который сгруппированы образцы из запуска 3 (Рисунок 5 А, справа), можно отметить тенденцию кластеризации образцов больших подкожных вен, но вариабельность других образцов тканей сосудов и лейкоцитов по уровню метилирования CpG-сайтов в области гена *MIR10B*. Для учета вариабельности данных, полученных в разных запусках, результаты каждого запуска обрабатывались независимо, а при дальнейшем анализе порядковый номер запуска выступал в качестве одной из ковариант регрессионного анализа.

В целом по региону, включающему ген *MIR10B* и охватывающий его CpG-островок, уровень метилирования CpG-сайтов в поражённых атеросклерозом артериях (26,9 [22,9; 31,8]%) был ниже по сравнению как с непоражёнными артериями (35,4 [28,1; 50,1]%, $p=0,001$), так и с венами (70,8 [64,2; 73,1]%, $p<0,001$), показавшими наивысший уровень метилирования CpG-сайтов по сравнению со всеми остальными типами тканей (Рисунок 5 Б и В; Таблица Г1, Приложение Г). Погрешность измерения метилирования ДНК в поражённых и непоражённых артериях для данного региона составила $\pm 3,8\%$, что меньше обнаруженных различий в 8,5%, следовательно, мы можем говорить о наблюдаемом снижении уровня метилирования в поражённых атеросклерозом сонных артериях.

При сопоставлении результатов настоящего исследования с данными метилочипов по тканям сосудов различной локализации и степени поражения атеросклерозом [Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Nazarenko M.S. et al., 2015; Li J. et al., 2021], также отмечается снижение уровня метилирования CpG-сайтов анализируемого региона в АСБ сонных артерий по сравнению с интактными тканями (Рисунок 6). При этом сравнение сонных артерий, поражённых атеросклерозом, с непоражёнными участками сонных артерий проводилось только в данном диссертационном исследовании: в микрочиповых исследованиях в качестве контроля чаще использовались внутренние грудные артерии [Nazarenko M.S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

В предыдущих исследованиях лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики ТНИМЦ с использованием метилочипа HumanMethylation27k и пиросеквенирования выявлено снижение уровня метилирования в области CpG-островка, на который приходится кодирующий регион гена *MIR10B*, в клетках атеросклеротических бляшек коронарных и сонных артерий по сравнению с непоражёнными внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей (Рисунок 6) [Марков А.В. с соавт., 2014; Nazarenko M.S. et al., 2015]. В данном диссертационном исследовании, проведенном с использованием другого метода – таргетного бисульфитного секвенирования – эти результаты подтверждаются.

Более того, гипометилирование промотора *MIR10B* (chr2:177,014,775-177,015,253) показано в атеросклеротических бляшках бедренных артерий по сравнению с интактными внутренними грудными артериями [Aavik E. et al., 2015], а также в атеросклеротически изменённой аорте по сравнению с непоражёнными тканями аорты, несмотря на то, что в аорте,

независимо от наличия атеросклеротического поражения, наблюдается относительно высокий уровень метилирования ДНК анализируемого региона (Рисунок 6) [Zaina S. et al., 2014].

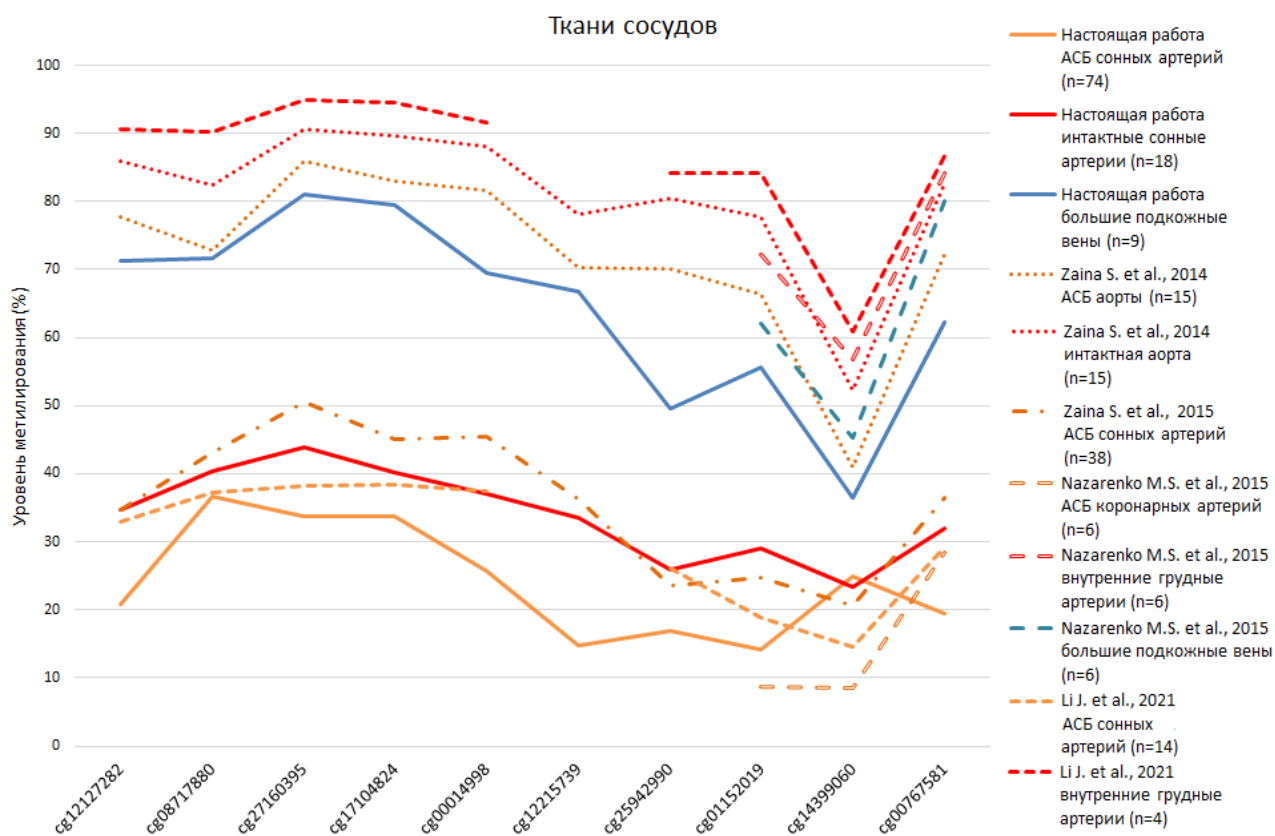


Рисунок 6. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов гена *MIR10B* в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах различной локализации [настоящее исследование; Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Nazarenko M.S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

Уровни метилирования гена *MIR10B* в лейкоцитах крови (независимо от наличия атеросклеротического поражения у пациента) были ниже, чем в тканях сосудов ($p < 0,016$; Рисунок 5 Б, В). Однако различия уровня метилирования гена *MIR10B* между лейкоцитами пациентов с атеросклерозом и лейкоцитами индивидов контрольной группы достигли статистической значимости только по трём CpG-сайтам региона: cg25942990 (chr2:177,014,996) (10,2 [7,7; 16,4]%) и 17,0 [10,7; 22,8]%, соответственно; $p = 0,016$), chr2:177,015,172 (24,3 [19,0; 30,4]%) и 27,7 [25,2; 31,5]%, соответственно; $p = 0,012$) и chr2:177,015,208 (19,1 [15,0; 27,9]%) и 29,4 [17,1; 33,3]%, соответственно; $p = 0,047$). Все значения различий превышали расчётную погрешность измерения метилирования ДНК в лейкоцитах, которая составила $\pm 2,3\%$. Различия медианного уровня метилирования гена по региону *MIR10B* в целом между лейкоцитами пациентов с атеросклерозом (24,3 [19,0; 28,5]%) и лейкоцитами индивидов контрольной группы (26,5 [23,2; 29,2]%) не достигли статистической значимости ($p = 0,270$).

При сравнении полученных данных с результатами микрочиповых исследований, можно отметить общее сходство рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов

гена *MIR10B* в лейкоцитах периферической крови у пациентов с атеросклерозом сонных и коронарных артерий, а также с инсультом (атеросклеротической этиологии, лакунарным или кардиоэмболическим – исследование Soriano-Tárraga с соавт. (2018)), так и у индивидов контрольной группы (Рисунок 7).

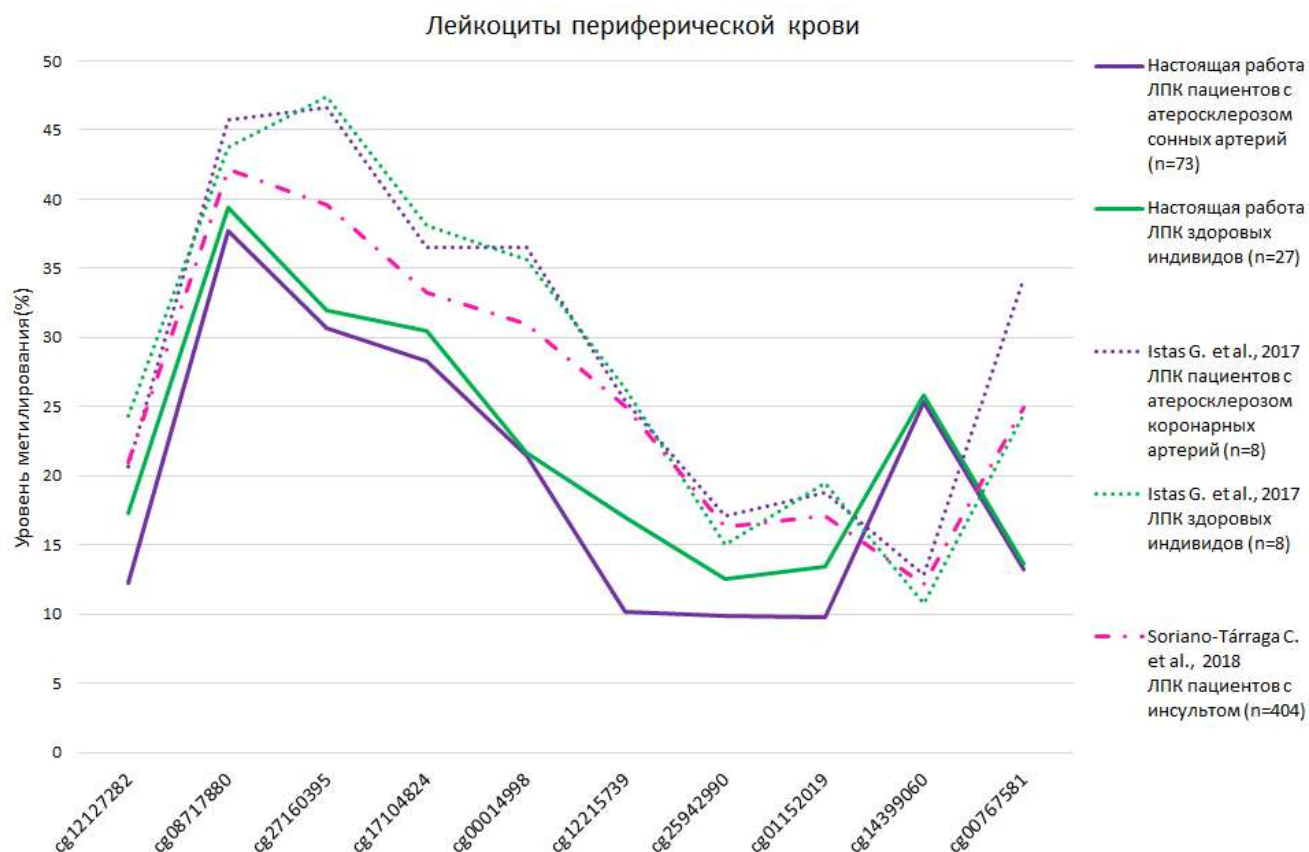


Рисунок 7. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов гена *MIR10B* в лейкоцитах периферической крови пациентов с атеросклерозом сонных и коронарных артерий, инсультом, а также индивидов контрольной группы [настоящее исследование; Istas G. et al., 2017; Soriano-Tárraga C. et al., 2018].

Таким образом, полученные в данном исследовании данные по уровню метилирования гена *MIR10B* согласуются с ранее опубликованными данными полногеномных исследований на микрочипах. В то же время средний уровень метилирования региона гена *MIR10B* в лейкоцитах периферической крови в данном диссертационном исследовании, за исключением cg14399060, примерно на 10% ниже, чем в микрочиповых исследованиях, что может быть обусловлено различиями в используемых методиках.

При сравнении уровня метилирования в АСБ между пациентами с ОНМК в анамнезе и пациентами без признаков ОНМК, различий ни по уровню метилирования региона в целом, ни по отдельным CpG-сайтам отмечено не было ($p=0,346$) (Рисунок 8 А, В).

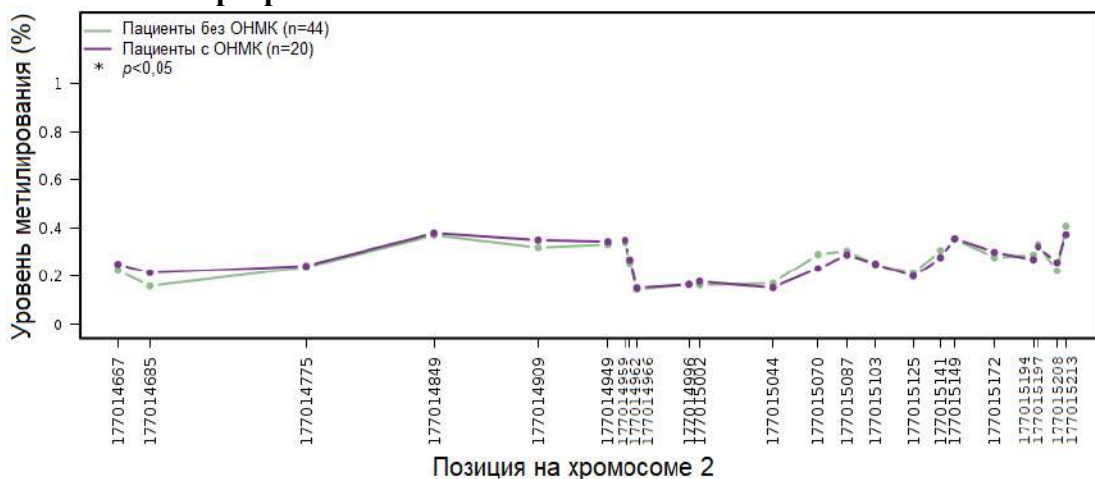
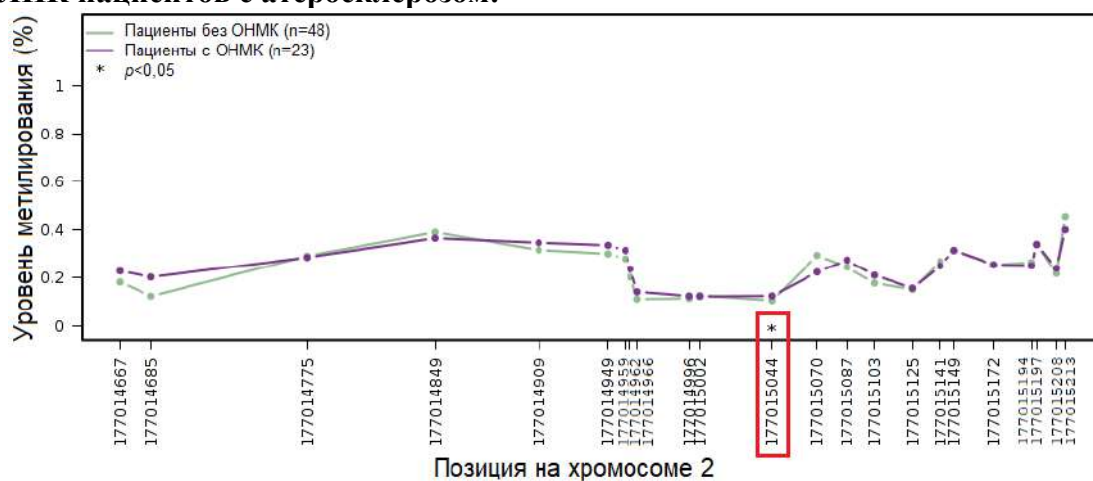
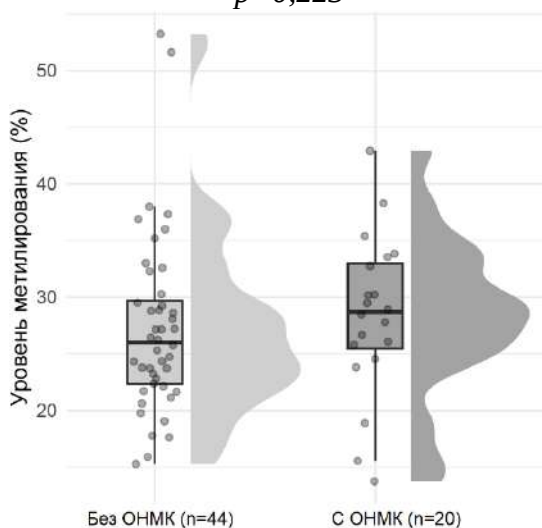
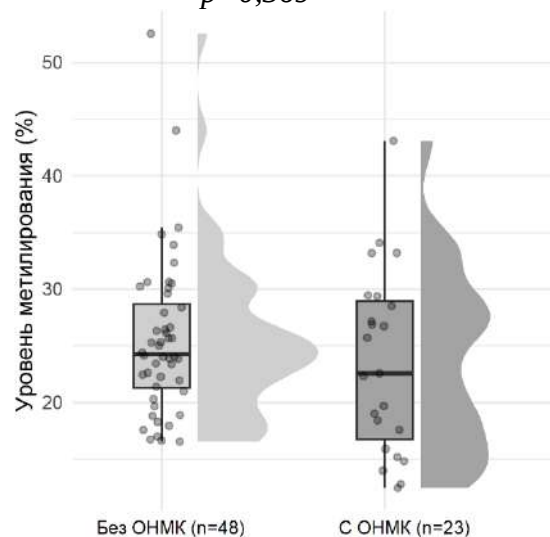
А**АСБ сонных артерий:****Б****ЛПК пациентов с атеросклерозом:****В****АСБ сонных артерий:** $p=0,223$ **Г****ЛПК пациентов с атеросклерозом:** $p=0,369$ 

Рисунок 8. Анализ уровня метилирования CpG-сайтов гена *MIR10B* у пациентов с атеросклерозом в зависимости от наличия ОНМК в анамнезе. Профиль метилирования CpG-сайтов в области гена *MIR10B* и медианный уровень метилирования по региону в сосудах (А, В) и лейкоцитах крови (Б, Г). Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Как и в настоящем исследовании, в работе S. Zaina с соавт. (2015) различий по уровню метилирования в области гена *MIR10B* в АСБ между пациентами с ОНМК в анамнезе и пациентами без такового события не обнаружено (Рисунок 9), хотя в данном диссертационном исследовании замечен более низкий уровень метилирования АСБ по сравнению с микрочиповым исследованием S. Zaina с соавт. (2015).

В то же время, в исследовании J. Li с соавт. (2021) по первым двум CpG-сайтам региона *MIR10B* уровень метилирования в АСБ пациентов с признаками ОНМК был значимо ниже, чем у асимптоматических пациентов и для cg12127282 составлял 26,85 [25,78; 30,69]% и 33,36 [31,05; 43,01]% ($p=0,043$), соответственно, а для cg08717880 — 31,78 [27,78; 36,46]% и 40,90 [37,30; 44,55]% ($p=0,039$), соответственно (Рисунок 9). По остальным CpG-сайтам различия не достигли статистической значимости ($p>0,1$).

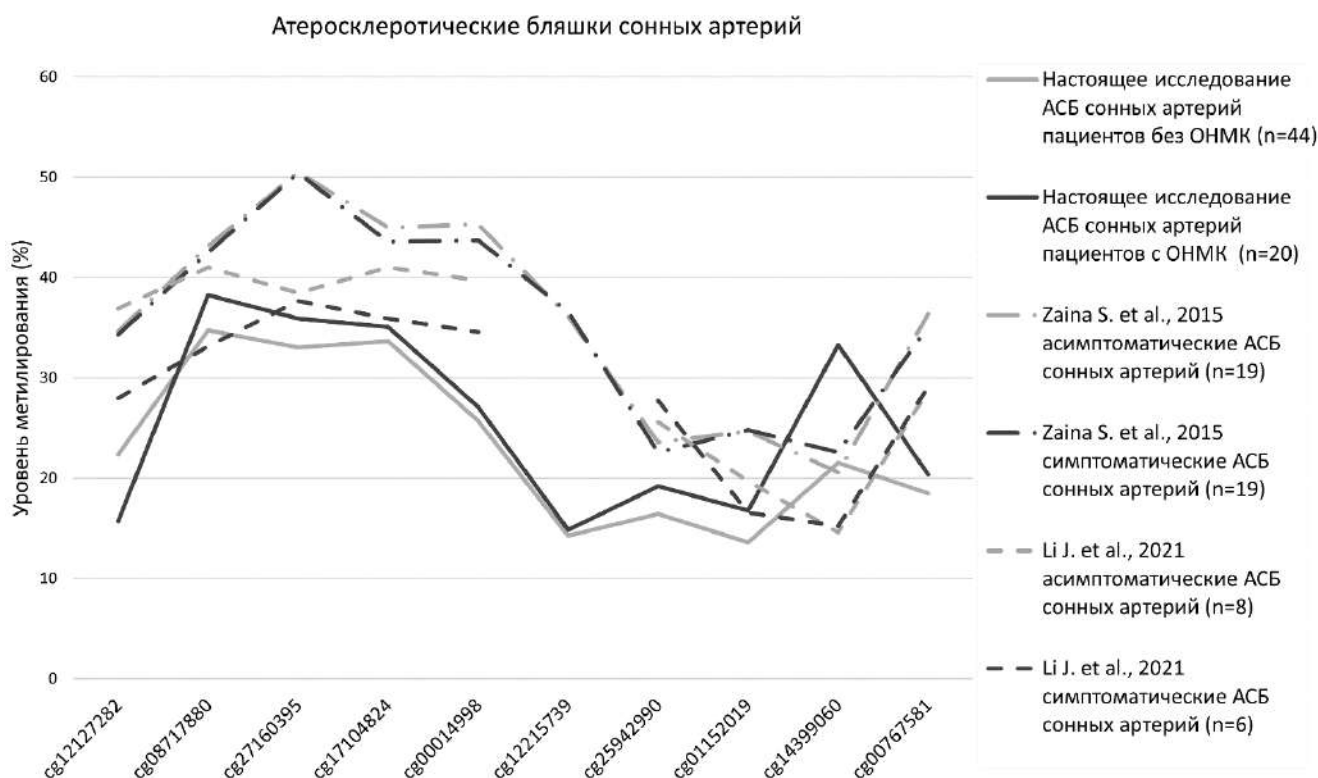


Рисунок 9. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов гена *MIR10B* в атеросклеротических бляшках сонных артерий пациентов в зависимости от ОНМК в анамнезе [настоящее исследование; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

При анализе ассоциаций уровня метилирования CpG-сайтов в области гена *MIR10B* в АСБ сонных артерий с ее гистологическими показателями обнаружено статистически значимое снижение уровня метилирования CpG-сайта cg14399060 (chr2:177,015,070) в АСБ имеющих тромботические массы на своей поверхности (8,60 [8,28; 10,74]%) по сравнению с бляшками, не имеющими тромботических отложений (28,57 [21,78; 38,02]%, $p<0,001$) (Рисунок 10). В то же время о наблюдаемых различиях следует говорить с осторожностью

из-за малого числа наблюдений в подгруппе атеросклеротических бляшек, имеющих тромботические массы на поверхности ($n=5$). Следует отметить, что ассоциаций уровня метилирования данного CpG-сайта с какими-либо другими показателями нестабильности АСБ, как количественными, так и качественными, обнаружено не было.

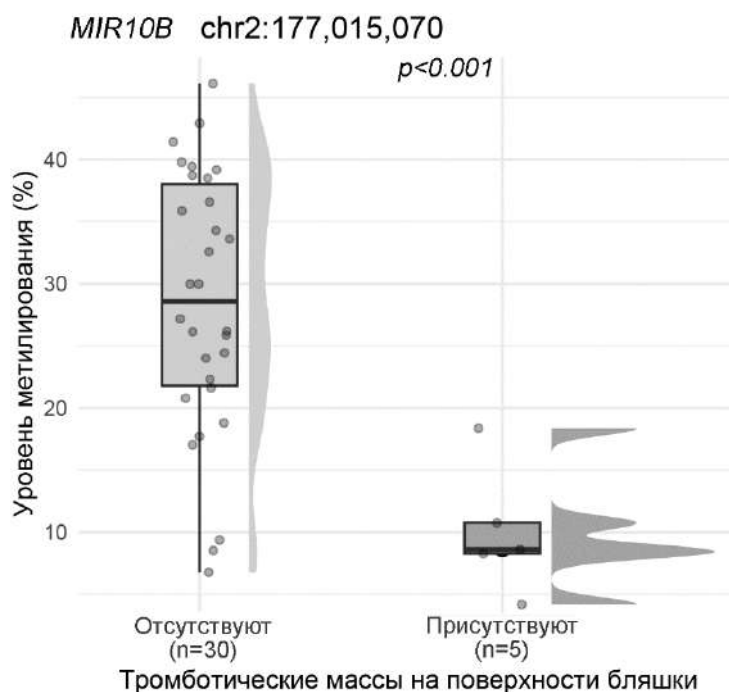


Рисунок 10. Уровень метилирования CpG-сайта chr2:177,015,070 в АСБ сонных артерий в зависимости от наличия тромботических масс на ее поверхности.

Кроме того, выявлены корреляции уровня метилирования отдельных CpG-сайтов в АСБ с такими количественными гистологическими показателями нестабильности атеросклеротической бляшки, как число воспалительных клеток в поле зрения в ядре АСБ при гистологическом исследовании. Так, для CpG-сайта chr2:177,015,149 обнаружена слабая отрицательная корреляция ($\rho = -0,345$, $p = 0,045$, Рисунок 11 А) с количеством макрофагов в ядре АСБ (ед. в поле зрения). Для CpG-сайтов chr2:177,015,172 и chr2:177,015,208 установлена положительная корреляция средней силы с количеством пенистых клеток в ядре АСБ (ед. в поле зрения) ($\rho = 0,538$, $p = 0,032$ (Рисунок 11 Б) и $\rho = 0,666$, $p = 0,005$ (Рисунок 11 В), соответственно). Значимых ассоциаций и корреляций метилирования в АСБ с какими-либо другими гистологическими показателями нестабильности атеросклеротической бляшки для вышеперечисленных CpG-сайтов и прочих сайтов в области гена *MIR10B* обнаружено не было ($p \geq 0,05$).

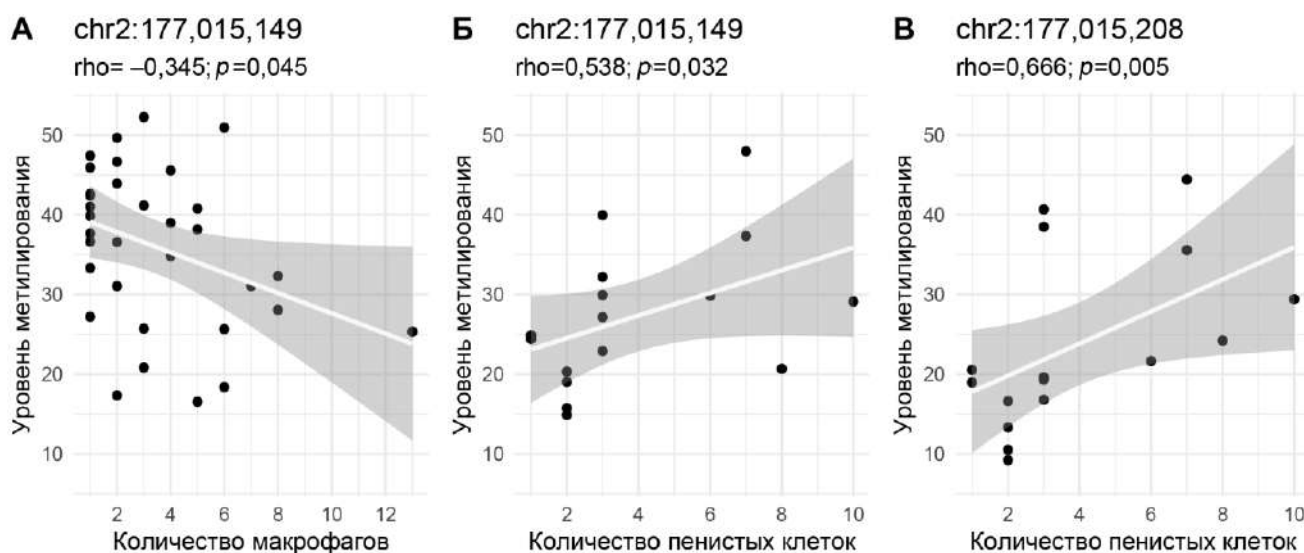


Рисунок 11. Значимые корреляции уровня метилирования в АСБ: количество макрофагов (ед. в поле зрения) в ядре обратно коррелирует с уровнем метилирования CpG-сайта chr2:177,015,049 (А); количество пенистых клеток (ед. в поле зрения) в ядре прямо коррелирует с уровнем метилирования CpG-сайтов chr2:177,015,172 (Б) и chr2:177,015,208 (В).

При сравнении уровня метилирования в ЛПК пациентов с атеросклерозом между пациентами с ОНМК в анамнезе и пациентами без такового события, отличия наблюдались только по одному CpG-сайту (Рисунок 8 Б). Уровень метилирования сайта cg01152019 (chr2:177,015,044), у пациентов с атеросклерозом, перенесших ОНМК был ниже (8,12 [6,79; 10,99]%), чем у пациентов без ОНМК в анамнезе (11,24 [8,27; 13,78]%, $p=0,044$). По уровню метилирования анализируемого региона в целом значимых различий не установлено ($p=0,220$; Рисунок 8 Г). Следует отметить отсутствие микрочиповых исследований, в которых бы анализировался уровень метилирования в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий в зависимости от наличия ОНМК в анамнезе либо от гистологической стабильности атеросклеротической бляшки.

В то же время, при анализе ассоциаций уровня метилирования CpG-сайтов в области гена *MIR10B* в ЛПК пациентов с атеросклерозом сонных артерий с патогенетически значимыми признаками установлены значимые корреляции для cg12215739 (chr2:177,014,966) и chr2:177,015,208 с показателями липидного обмена: уровнем общего холестерина ($\rho=-0,627$, $p<0,001$ (Рисунок 12 А) и $\rho=-0,701$, $p<0,001$ (Рисунок 12 Б), соответственно), липопротеинов низкой плотности ($\rho=-0,636$, $p=0,026$ (Рисунок 12 В) и $\rho=-0,643$, $p=0,024$ (Рисунок 12 Г), соответственно) и индексом атерогенности ($\rho=-0,789$, $p=0,002$ (Рисунок 12 Д) и $\rho=-0,772$, $p=0,003$ (Рисунок 12 Е), соответственно), а также со степенью стеноза сонных артерий ($\rho=-0,490$, $p=0,002$ (Рисунок 12 Ж) и $\rho=-0,470$, $p<0,001$ (Рисунок 12 З), соответственно). Кроме того, для chr2:177,014,966 показана значимая корреляция с уровнем глюкозы ($\rho=-0,313$, $p=0,024$; Рисунок 12 И).

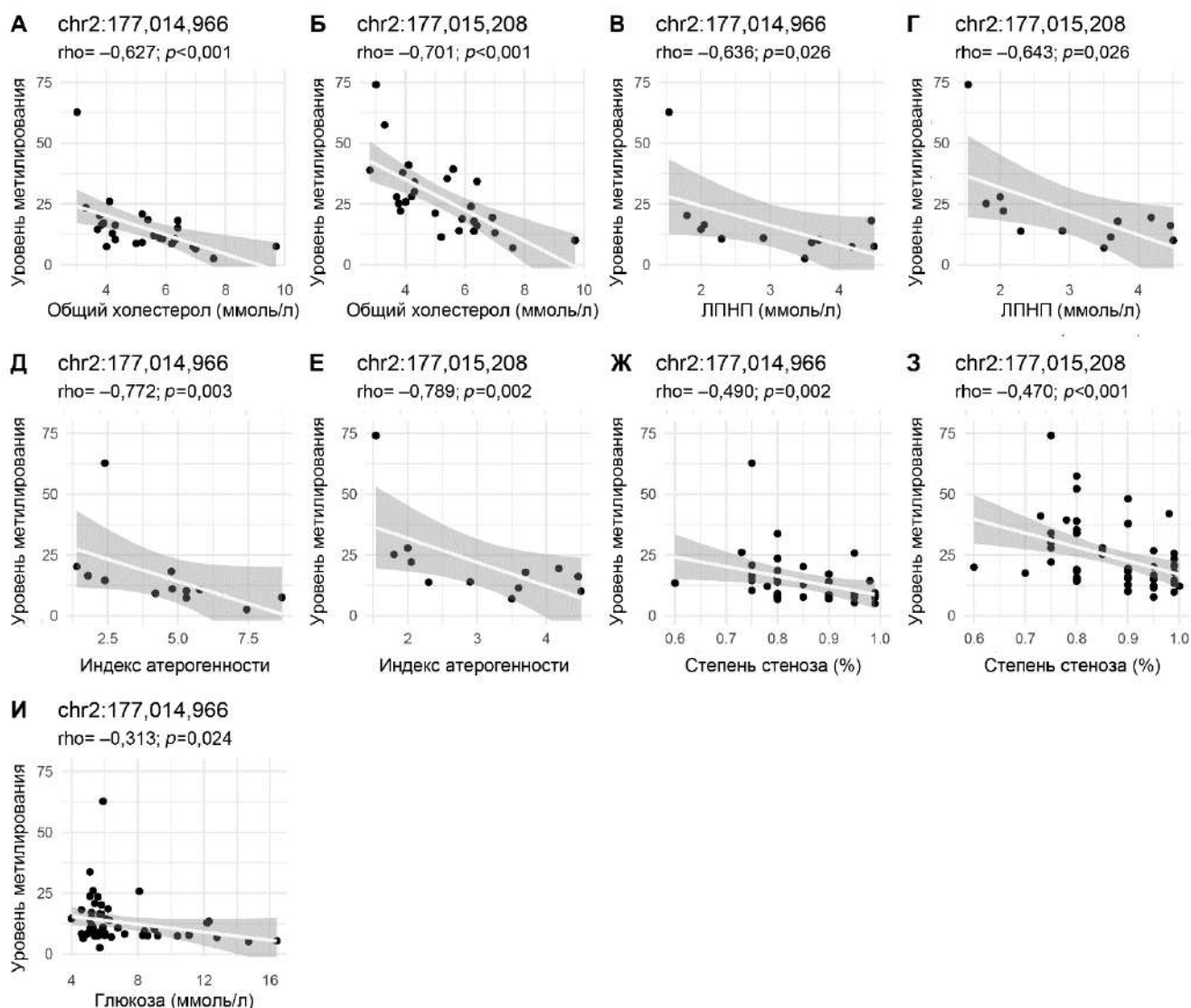


Рисунок 12. Значимые корреляции уровня метилирования в ЛПК пациентов с атеросклерозом сонных артерий CpG-сайтов cg12215739 (chr2:177,014,966) и chr2:177,015,208 с уровнем общего холестерина (А, Б), липопротеинов низкой плотности (В, Г), индексом атерогенности (Д, Е), степенью стеноза сонных артерий (Ж, З); а также cg12215739 (chr2:177,014,966) с уровнем глюкозы сыворотки крови (И).

Для подтверждения полученных ассоциаций требуется проспективное клиническое исследование, поскольку показатели липидного обмена у пациентов были проанализированы однократно при поступлении, у 16 пациентов (22%) в анамнезе отмечен сахарный диабет 2 типа, 15 пациентов (20%) принимали инсулин и/или метформин, а 54 пациента (73%) — статины, что влияет на уровень глюкозы и липидов крови соответственно. В контрольной группе не отмечено значимых корреляций уровней метилирования CpG-сайтов cg12215739 (chr2:177,014,966) и chr2:177,015,208 с показателями липидного обмена или уровнем глюкозы (стеноз сонных артерий в контрольной группе не превышал 45%).

Согласно литературным данным, изучение метилирования гена *MIR10B* проводится преимущественно при онкологических заболеваниях, в то время как подобные исследования в

тканях сосудов и лейкоцитах крови при атеросклерозе отсутствуют. При злокачественных новообразованиях желудка, молочной железы и печени, как правило, регистрируется гиперметилирование промотора гена *MIR10B*, сопровождающееся подавлением экспрессии miR-10b-3p и miR-10b-5p в опухолевой ткани по сравнению с нормальными тканями [Kim K. et al., 2011; Biagioni F. et al., 2012; Li Z. et al., 2015].

В исследовании 15 различных клеточных линий опухолей желудка методом пиросеквенирования K. Kim с соавт. (2011) показали повышение уровня метилирования в среднем на 10% в регионах chr2:177,014,650-177,014,704 (n=40, Регион 1) и chr2:177,014,946-177,014,995 (n=100, Регион 2) по сравнению с прилежащей нормальной тканью слизистой оболочки желудка [Kim K. et al., 2011]. Следует отметить, что оба данных региона входят в проанализированную в данном диссертационном исследовании область гена *MIR10B* — chr2:177,014,629-177,015,244. В работе K. Kim с соавт. (2011) также проводилось деметилирование азацитидином 6 CpG-сайтов обоих вышеупомянутых регионов: включающих chr2:177,014,667 и chr2:177,014,686 (Регион 1) и chr2:177,014,950, chr2:177,014,960, chr2:177,014,963 и chr2:177,014,967 (Регион 2), что приводило к восстановлению экспрессии микроРНК miR-10b [Kim K. et al., 2011].

В схожем исследовании, путём качественного анализа методом метил-специфичной ПЦР было показано повышение уровня метилирования региона chr2:177,015,002-177,015,181 (входит в область, проанализированную в данном диссертационном исследовании) при раке желудка. В опухолевых тканях также наблюдалась сниженная экспрессия miR-10b, которая восстанавливалась при обработке клеток азацитидином (конкретные деметилированные сайты в цитируемой статье не указаны) [Li Z. et al., 2015].

Исследовательский коллектив F. Biagioni с соавт. (2012) показал гиперметилирование промоторного региона *MIR10B* в области chr2:177,014,867-177,015,332 (частично пересекается с областью, проанализированной в данном диссертационном исследовании) в опухолевых клетках молочной железы по сравнению с прилежащей нормальной тканью. По отдельным сайтам уровень метилирования повышался более чем на 50% [Biagioni F. et al., 2012]. В то же время, изучение влияния изменения уровня метилирования в данном регионе на экспрессию miR-10b не проводилось. Хотя исследование включало деметилирование азацитидином региона chr2:177,012,377-177,012,482 (содержащего 9 CpG-сайтов), которое привело к значительному усилению экспрессии pri-miR-10b, указанный регион находится на расстоянии 1,5-2 тыс. п.н. от области, для которой показано гиперметилирование в той же работе F. Biagioni с соавт. [Biagioni F. et al., 2012], а также от области, проанализированной в данном диссертационном исследовании, и не пересекается с ними. Данных о связи метилирования ДНК в области других регионов гена *MIR10B* с экспрессией (pri-)miR-10b в работе F. Biagioni с соавт. не приводится.

Таким образом, на основании данного источника можно предположить наличие ещё одного регуляторного региона гена *MIR10B* (по крайней мере, в опухолевых клетках молочной железы), отличного от изучаемого в данной диссертационной работе.

В исследовании печёчно-клеточной карциномы с использованием микрочипа Infinium HumanMethylation27 J. Shen с соавт. выявили повышение уровня метилирования сайтов cg12127282 (chr2:177,014,686) на 20% и cg00767581 (chr2:177,015,125) на 16% в опухолевой ткани по сравнению с прилежащей нормальной тканью печени [Shen J. et al., 2012]. Оба сайта входят в проанализированный в данном диссертационном исследовании регион гена *MIR10B*. Однако исследовании J. Shen с соавт. не было отмечено изменения уровня экспрессии miR-10b [Shen J. et al., 2012]. К сожалению, ни в одном из вышеописанных исследований не изучались корреляции уровня метилирования ДНК промоторного региона *MIR10B* с клиническими показателями пациентов, поэтому провести сравнение полученных данных с литературными источниками не представляется возможным.

В то же время, имеющиеся данные позволяют говорить об отрицательной взаимосвязи уровня метилирования промоторного региона *MIR10B* в областях chr2:177,014,650-177,014,704, chr2:177,014,946-177,014,995 [Kim K. et al., 2011] и chr2:177,015,002-177,015,181 [Li Z. et al., 2015] с уровнем экспрессии miR-10b. Поскольку все указанные области входят в проанализированный в данном диссертационном исследовании регион гена *MIR10B* — chr2:177,014,629-177,015,244 — можно предполагать, что снижение уровня метилирования данного региона в атеросклеротических бляшках сонных артерий может быть связано с повышенной экспрессией микроРНК при патологии.

Таким образом, в данном диссертационном исследовании выявлена связь гипометилирования 23 CpG-сайтов как гена *MIR10B*, так и его промотора в клетках сонных артерий с их атеросклеротическим поражением. Отдельные CpG-сайты анализируемого региона (chr2:177,014,966; chr2:177,015,172 и chr2:177,015,208) также гипометилированы в лейкоцитах крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом по сравнению со здоровыми индивидами. Уровень метилирования двух CpG-сайтов (chr2:177,015,172 и chr2:177,015,208) положительно коррелирует с количеством пенистых клеток в ядре АСБ. В лейкоцитах периферической крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий уровень метилирования CpG-сайтов (chr2:177,014,966 и chr2:177,015,208) отрицательно коррелирует уровнем общего холестерина и липопротеинов низкой плотности, индексом атерогенности и степенью стеноза сонных артерий.

3.1.2 Анализ уровня метилирования регуляторных элементов гена *MIR21*

Ген *MIR21* расположен в локусе 17q23.1 на расстоянии примерно 1 тыс.п.н. от 12го экзона гена *VMP1*, который кодирует трансмембранный белок аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума и вовлечён в аутофагию и апоптоз [Adams A.T. et al., 2014]. В большинстве литературных источников расположение промоторного элемента гена *MIR21* указано в пределах области chr17:57,914,850-57,915,900 (сборка генома GRCh37/hg19), охватывающей 10й и 11й интрон (из 11) и 11й экзон (из 12) гена *VMP1*. Согласно публикации M.V. Iorio с соавт., в 11-м интроне гена *VMP1*, в области chr17:57,916,300-57,916,700, присутствует CpG-островок [Iorio M.V. et al., 2007]. Локализация и эпигенетический контекст гена *MIR21* приведены на Рисунке В2 (Приложение В).

В единственном на данный момент исследовании, рассматривающем взаимосвязь экспрессии miR-21 и метилирования гена *MIR21* при атеросклерозе у человека, обнаружено усиление экспрессии miR-21 при одновременном снижении уровня метилирования гена *MIR21* в культуре ГМК аорты [Lin D. et al., 2021], однако авторы не уточнили координаты проанализированного ими региона гена *MIR21*.

Для анализа уровня метилирования при атеросклерозе в данном исследовании были выбраны три региона гена *MIR21*: предполагаемый промоторный регион гена *MIR21*, CpG-островок по Iorio M.V. и «тело» гена *MIR21*.

3.1.2.1 Предполагаемый промоторный регион гена *MIR21*

Анализ метилирования региона chr17:57,915,138-57,916,025 (888 п.н.; сборка генома GRCh37/hg19), включающего предполагаемый промоторный регион гена *MIR21* (chr17:57,914,850-57,915,900), определённый в ходе аннотационного анализа регуляторных элементов генов микроРНК, проведён для 84 пациентов с атеросклерозом сонных артерий и 32 индивидов контрольной группы. Среди пациентов с атеросклерозом у 23 человек отмечены ОНМК в анамнезе. Подробное описание выборок приведено в подразделе «2.2. Характеристика включенных в исследование выборок» и Таблице А3 (Приложение А). Морфологически атеросклеротические бляшки сонных артерий (n=57) охарактеризованы в Таблице А4 (Приложение А).

Всего было осуществлено 4 отдельных запуска секвенатора для анализа образцов методом таргетного бисульфитного секвенирования. В каждом запуске проанализирован уровень метилирования 9 одних и тех же CpG-сайтов, однако в первом запуске проанализированный регион приходился на область chr17:57,915,172-57,915,888 (717 п.н.), а во втором и последующих – на область chr17:57,915,138-57,916,025 (888 п.н.). В результате всех запусков получены данные о метилировании 9 CpG-сайтов предполагаемого промоторного региона гена *MIR21* в 72

образцах АСБ, 31 образце непораженных сонных артерий, 18 образцах больших подкожных вен, 81 образце лейкоцитов периферической крови пациентов с атеросклерозом и 30 образцах лейкоцитов периферической крови контрольной группы. Полученные результаты анализа уровня метилирования 9 CpG-сайтов в области предполагаемого промоторного региона гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови приведены в Таблице Г2 (Приложение Г).

По данным tSNE-анализа (Рисунок 13 А) образцы тканей сосудов кластеризуются отдельно от образцов лейкоцитов, независимо от типа сосудов и наличия атеросклеротического поражения. Это позволяет говорить о тканеспецифичности метилирования предполагаемого промоторного региона гена *MIR21*.

Погрешность измерения метилирования ДНК в поражённых и непоражённых артериях для данного региона составила $\pm 3,2\%$; в венах $\pm 4,7\%$, в лейкоцитах $\pm 3,5\%$. Средний уровень метилирования двух «первых» CpG-сайтов (chr17:57,915,172 и chr17:57,915,371) не превышает погрешность измерения во всех типах тканей (Рисунок 13 Б), что не позволяет говорить о наблюдаемых различиях по метилированию, даже в случае преодоления порогового уровня значимости $p < 0,05$. Для всех последующих CpG-сайтов предполагаемого промоторного региона гена *MIR21* уровень метилирования в тканях сосудов снижен по сравнению с лейкоцитами, независимо от типа сосудов и наличия атеросклеротического поражения. Различия по уровню метилирования ДНК между атеросклеротическими бляшками (5,7 [1,7; 14,9]%) и непоражёнными сонными артериями (4,0 [2,2; 9,6]%) не достигают статистической значимости ($p = 0,448$), как и различия между непоражёнными артериями и венами (1,7 [0,7; 5,5]%, $p = 0,063$). Различия по уровню метилирования ДНК между атеросклеротическими бляшками (5,7 [1,7; 14,9]%) и большими подкожными венами (1,7 [0,7; 5,5]%) статистически значимы ($p = 0,021$), однако составляют 4,0%, что не превышает погрешность изменения уровня метилирования (4,7%).

Уровень метилирования предполагаемого промоторного региона гена *MIR21* в лейкоцитах превышает таковой в тканях сосудов, независимо от типа сосудов и наличия атеросклеротического поражения (Рисунок 13 Б, В). При этом уровень метилирования исследуемого региона в лейкоцитах пациентов с атеросклерозом (30,3 [21,8; 39,3]%) значимо ниже, чем в лейкоцитах контрольной группы (36,8 [28,8; 50,0]%, $p = 0,014$) за счёт CpG-сайтов chr17:57,915,172 и chr17:57,915,371 (сайты 1 и 2 исследуемого региона) и chr17:57,915,717 (сайт 5 исследуемого региона). Различия уровня метилирования ДНК в лейкоцитах (6,5%) превышают погрешность измерения (3,5%), следовательно, можно говорить о наблюдаемом снижении уровня метилирования в лейкоцитах пациентов с атеросклерозом.

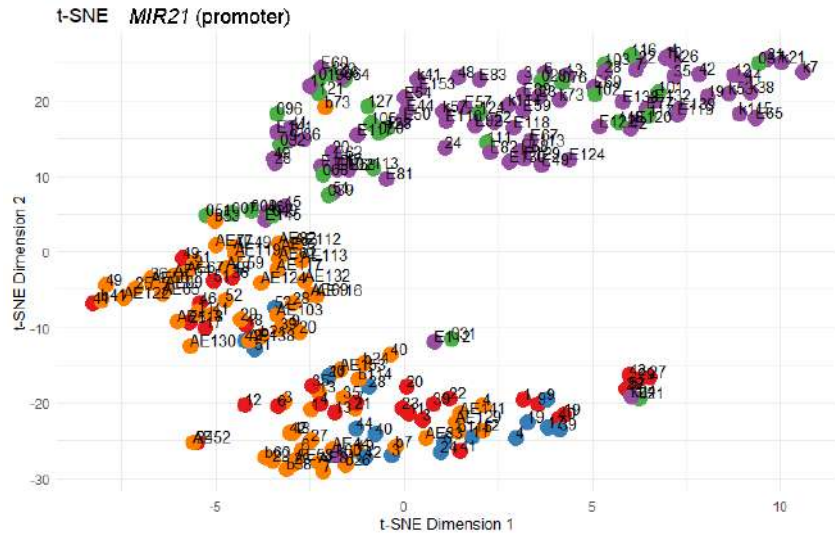
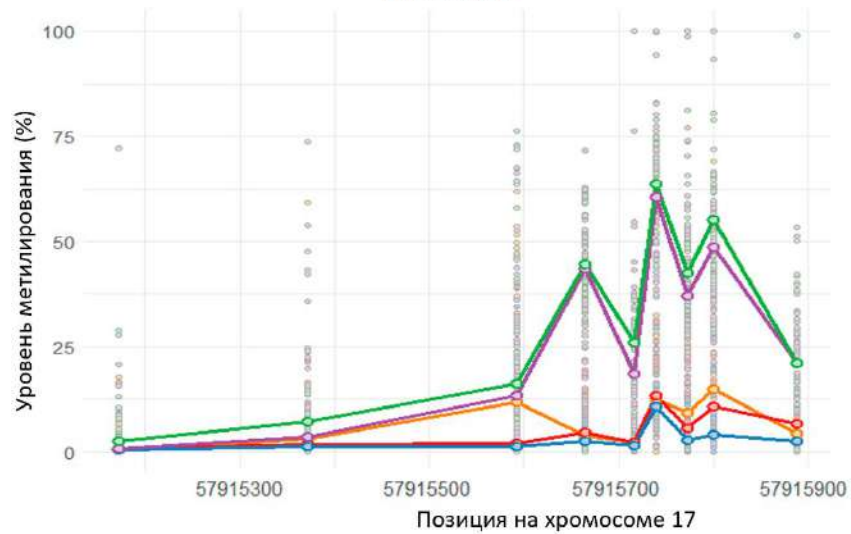
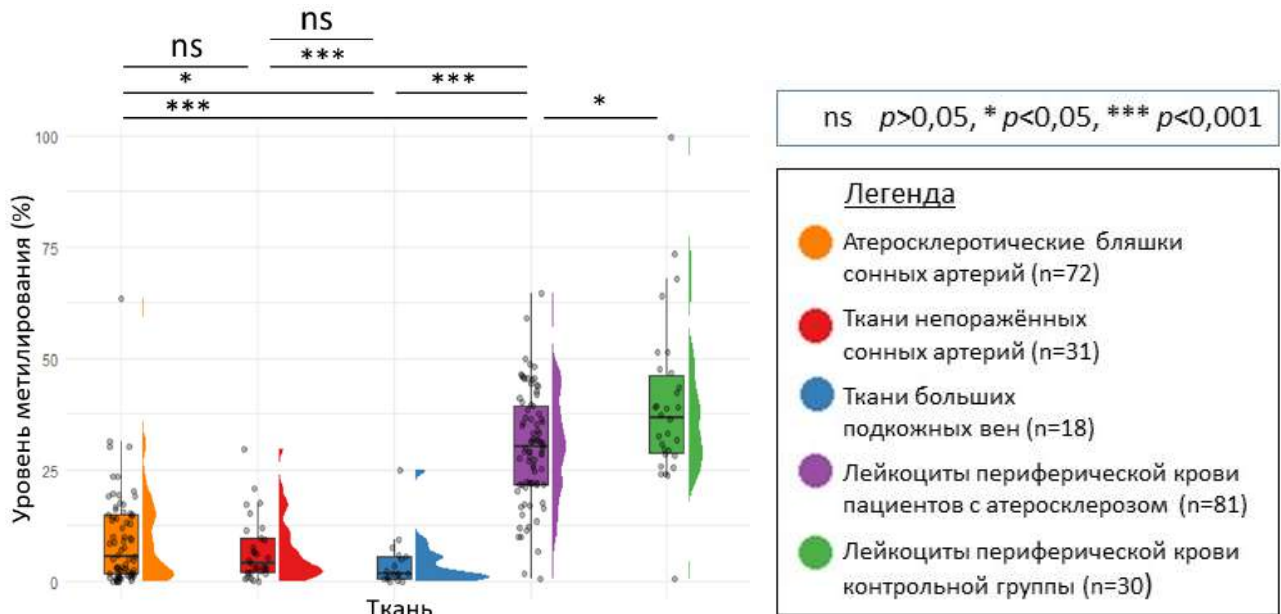
А**Б****В**

Рисунок 13. Анализ уровня метилирования предполагаемого промоторного региона гена *MIR21*. (А). Взаимное расположение и кластеризация сосудов и лейкоцитов крови (по методу tSNE) пациентов с атеросклерозом сонных артерий в зависимости от профилей метилирования CpG-сайтов. (Б) Профиль метилирования и (С) медианный уровень метилирования CpG-сайтов в сосудах и лейкоцитах крови. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

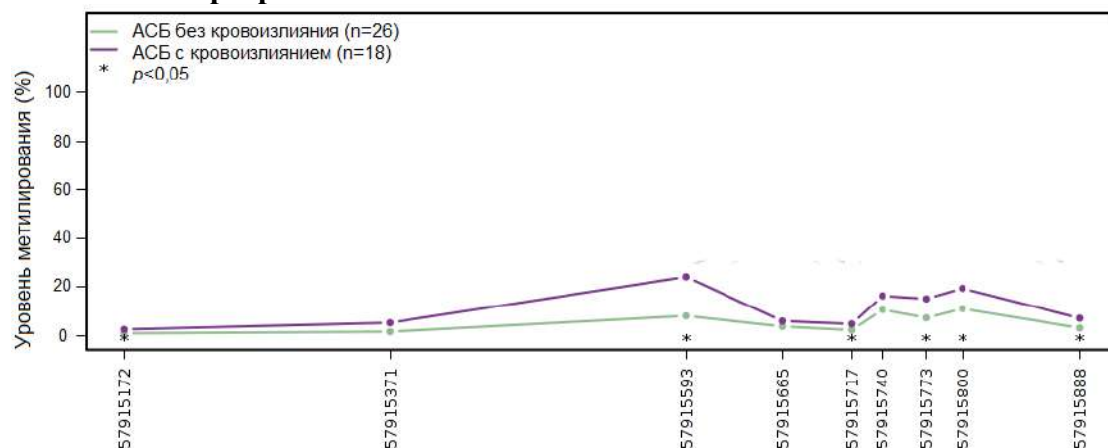
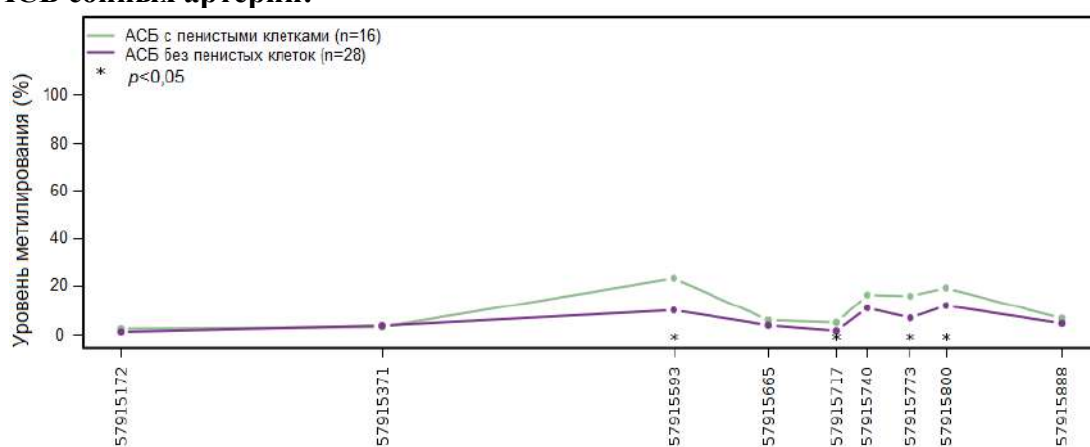
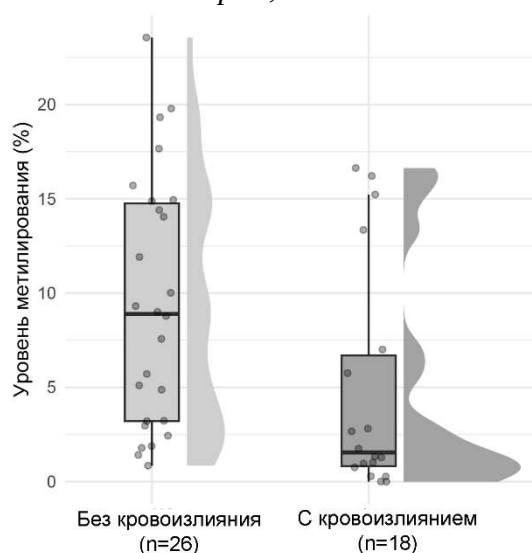
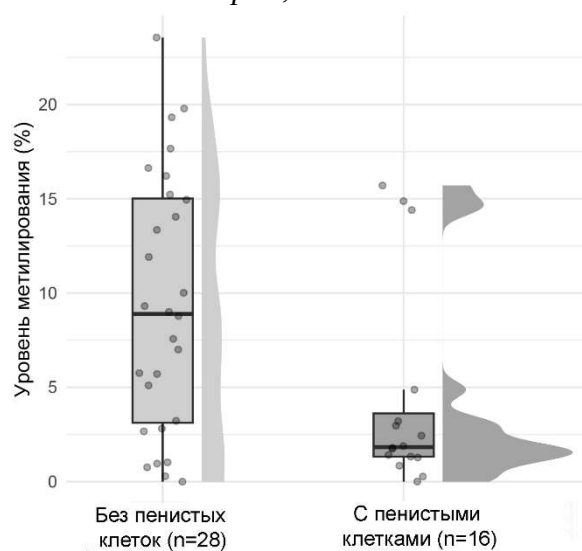
А**АСБ сонных артерий:****Б****АСБ сонных артерий:****В****АСБ сонных артерий:** $p=0,019$ **Г****АСБ сонных артерий:** $p=0,032$ 

Рисунок 14. Метилирование предполагаемого промоторного региона гена *MIR21* в атеросклеротических бляшках сонных артерий.

(А) Профиль метилирования в зависимости от наличия кровоизлияния в бляшке.

(Б) Профиль метилирования в зависимости от наличия пенистых клеток в бляшке.

(В) Медианный уровень метилирования по региону в зависимости от наличия кровоизлияния в бляшке. (Г) Медианный уровень метилирования по региону в зависимости от наличия пенистых клеток в бляшке. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

При анализе ассоциаций уровня метилирования CpG-сайтов предполагаемого промоторного региона гена *MIR21* в АСБ сонных артерий с ее гистологическими показателями обнаружено значимое снижение уровня метилирования трех CpG-сайтов (chr17:57,915,593, cg12054453 (chr17:57,915,717) и cg18942579 (chr17:57,915,773)), а также региона в целом, в тех АСБ, где произошло кровоизлияние (1,55 [0,82; 6,69]%) по сравнению с бляшками, в которых кровоизлияния не было (8,89 [3,21; 14,76]%, $p=0,019$) (Рисунок 14 А, В). Также для 4 CpG-сайтов из 9 (chr17:57,915,593, cg12054453 (chr17:57,915,717) и cg18942579 (chr17:57,915,773)), а также региона в целом, показано значимое снижение уровня метилирования в АСБ при наличии пенистых клеток (1,83 [1,32; 3,62]%) по сравнению с атеросклеротическими бляшками, в которых при гистологическом исследовании пенистые клетки не отмечались (8,89 [3,12; 15,02]%, $p=0,032$) (Рисунок 14 Б, Г). Все отмеченные различия (7,34% и 7,06%) превысили погрешность измерения уровня метилирования в АСБ (3,2%).

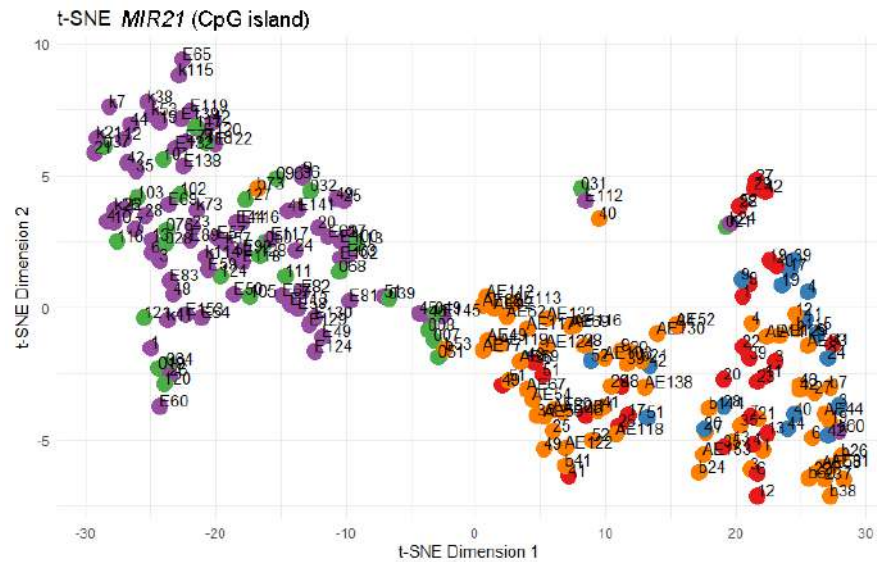
Ассоциаций для уровня метилирования CpG-сайтов предполагаемого промоторного региона гена *MIR21* в АСБ сонных артерий с какими-либо другими показателями их нестабильности не установлено. Также не выявлено корреляций между уровнем метилирования анализируемого региона в ЛПК и клиническими показателями, в т.ч. наличием ОНМК.

3.1.2.2 CpG-островок в области гена *MIR21*

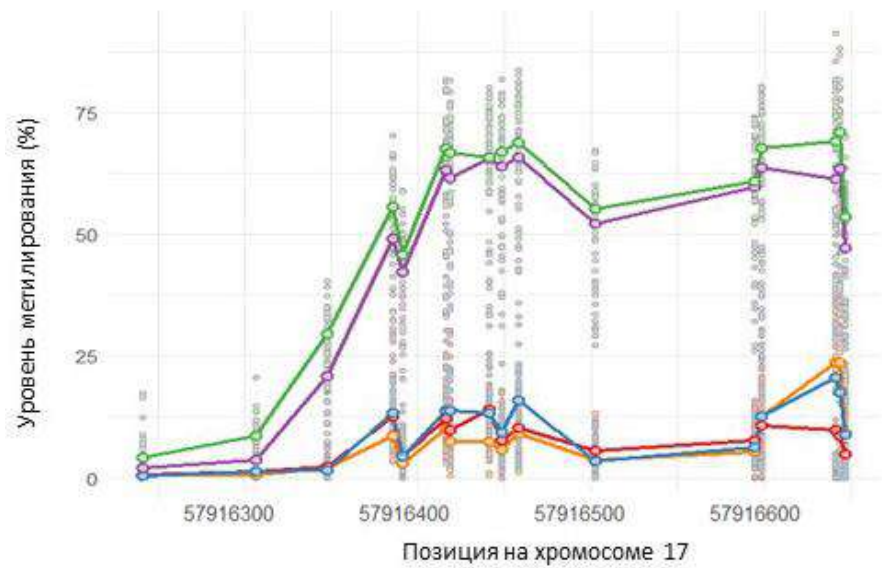
Анализ метилирования региона chr17:57,915,960-57,916,717 (758 п.н., сборка генома GRCh37/hg19), который охватывает указанный в публикации Iorio M.V. с соавт. (2007) CpG-островок в области гена *MIR21*, проведён для 35 пациентов с атеросклерозом сонных артерий и 19 индивидов контрольной группы. Среди пациентов с атеросклерозом у 5 человек отмечены ОНМК в анамнезе. Подробное описание выборок приведено в подразделе «2.2. Характеристика включенных в исследование выборок» и Таблице А3 (Приложение А). Морфологически атеросклеротические бляшки сонных артерий (n=57) охарактеризованы в Таблице А4 (Приложение А).

В результате таргетного бисульфитного секвенирования получены данные о метилировании 16 CpG-сайтов в области CpG-островка гена *MIR21* в 33 образцах АСБ, 33 образцах непораженных сонных артерий, 19 образцах больших подкожных вен, 35 образцах лейкоцитов периферической крови пациентов с атеросклерозом и 19 образцах лейкоцитов периферической крови контрольной группы. Полученные результаты анализа уровня метилирования 16 CpG-сайтов в области CpG-островка гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови приведены в Таблице Г3 (Приложение Г).

A



Б



В

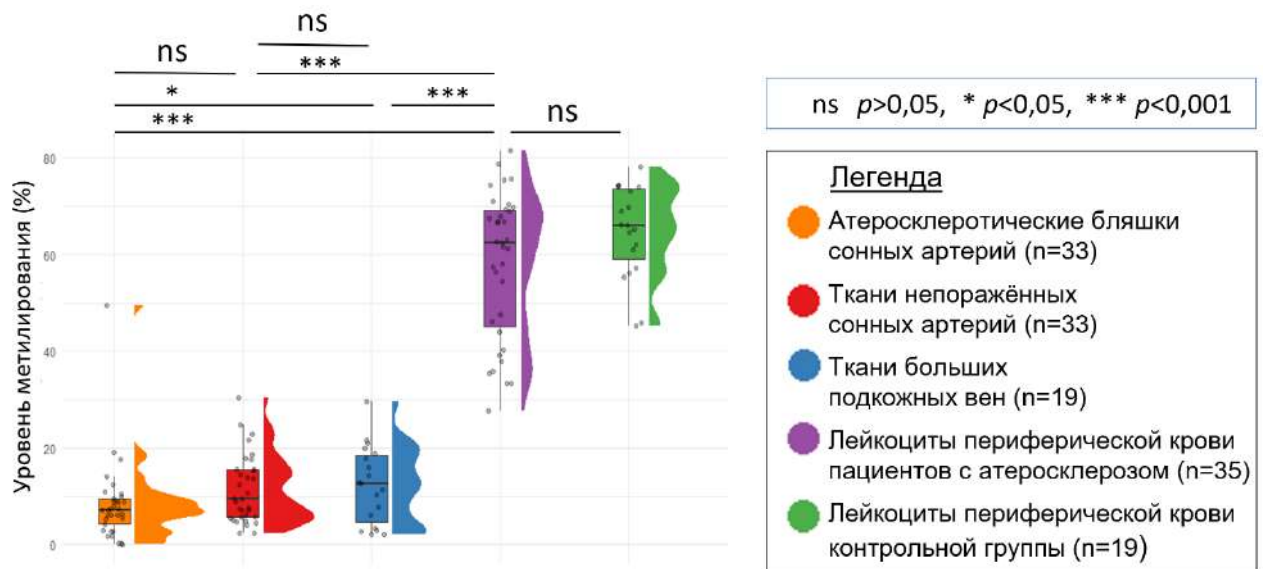


Рисунок 15. Анализ уровня метилирования в области CpG-островка гена *MIR21*. (А). Взаимное расположение и кластеризация сосудов и лейкоцитов крови (по методу tSNE) пациентов с атеросклерозом сонных артерий в зависимости от профилей метилирования CpG-сайтов. (Б) Профиль метилирования и (С) медианный уровень метилирования CpG-сайтов в сосудах и лейкоцитах крови. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

По данным tSNE-анализа (Рисунок 15 А) образцы тканей сосудов кластеризуются отдельно от образцов лейкоцитов, независимо от типа сосудов и наличия атеросклеротического поражения, что указывает на тканеспецифичность метилирования CpG-островка в области гена *MIR21*. Уровень метилирования анализируемого региона в тканях сосудов снижен по сравнению с лейкоцитами, независимо от типа сосудов и наличия атеросклеротического поражения (Рисунок 15 Б, В).

Погрешность измерения метилирования ДНК в поражённых и непоражённых артериях для области CpG-островка гена *MIR21* составила $\pm 1,6\%$; в венах $\pm 2,0\%$, в лейкоцитах $\pm 5,8\%$. Показана тенденция ($p=0,051$) к снижению в поражённых атеросклерозом сонных артериях (7,2 [4,2; 9,5]%) по сравнению с непоражёнными сонными артериями (9,4 [5,6; 15,5]%), однако различия между АСБ и венами (12,7 [4,7; 18,4]%) достигают статистической значимости ($p=0,037$) за счёт более низкого уровня метилирования в АСБ в шести последовательных CpG-сайтах (сайты с 4го по 9й исследованного региона: chr17:57,916,385, chr17:57,916,391, chr17:57,916,416, chr17:57,916,418, chr17:57,916,441 и chr17:57,916,448). При этом различия уровня метилирования ДНК (3,3%) превышают погрешность измерения (2,0%), следовательно, можно говорить о наблюдаемом снижении уровня метилирования в венах по сравнению с АСБ сонных артерий. В то же время различия по уровню метилирования анализируемого региона между непоражёнными артериями и венами статистически незначимы ($p=0,749$).

Что касается уровня метилирования в области CpG-островка гена *MIR21* в ЛПК – по первым семи последовательным CpG-сайтам выявлено статистически значимое снижение уровня метилирования у пациентов с атеросклерозом по сравнению с контрольной группой ($p<0,04$). Однако различия уровня метилирования превышали погрешность измерения (5,8%) только для 3го и 4го CpG-сайтов (8,7% для chr17:57,916,347 и 6,6% для chr17:57,916,385). Для последующих девяти CpG-сайтов различия уровня метилирования в двух рассматриваемых группах ЛПК оказались статистически незначимы ($p>0,05$). Медианный уровень метилирования в области CpG-островка гена *MIR21* в лейкоцитах пациентов с атеросклерозом (62,4 [45,0; 69,3]%) также не показал значимых различий с таковым в лейкоцитах контрольной группы (66,1 [59,1; 73,6]%; $p=0,207$).

Следует отметить, что уровень метилирования в регионе CpG-островка гена *MIR21* отличается отсутствием корреляций как с гистологическими параметрами поражённых атеросклерозом тканей сонных артерий, так и с клиническими показателями, в том числе ОНМК в анамнезе, в ЛПК больных атеросклерозом.

3.1.2.3 «Тело» гена *MIR21*

Анализ метилирования региона chr17:57,918,142-57,918,840 (699 п.н.; сборка генома GRCh37/hg19), охватывающего «тело» гена *MIR21*, проведён для 34 пациентов с атеросклерозом сонных артерий и 19 индивидов контрольной группы. Среди пациентов с атеросклерозом у 5 человек отмечены ОНМК в анамнезе. Подробное описание выборок приведено в подразделе «2.2. Характеристика включенных в исследование выборок» и Таблице А3 (Приложение А). Морфологически атеросклеротические бляшки сонных артерий (n=57) охарактеризованы в Таблице А4 (Приложение А).

В результате таргетного бисульфитного секвенирования получены данные о метилировании 5 CpG-сайтов в области «тела» гена *MIR21* в 33 образцах АСБ, 33 образцах непораженных сонных артерий, 20 образцах больших подкожных вен, 34 образцах лейкоцитов периферической крови пациентов с атеросклерозом и 19 образцах лейкоцитов периферической крови контрольной группы. Полученные результаты анализа уровня метилирования 5 CpG-сайтов в области «тела» гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови приведены в Таблице Г4 (Приложение Г).

Как и в случае двух других регионов гена *MIR21*, для «тела» гена установлена тканеспецифичность метилирования, поскольку по данным tSNE-анализа образцы тканей сосудов кластеризуются отдельно от образцов лейкоцитов, независимо от типа сосудов и наличия атеросклеротического поражения (Рисунок 16 А). При этом во всех CpG-сайтах области «тела» гена *MIR21* (Рисунок 16 Б), а также по региону в целом (Рисунок 16 В) уровень метилирования в тканях сосудов ниже, чем в лейкоцитах.

Погрешность измерения метилирования ДНК в поражённых и непоражённых артериях для области CpG-островка гена *MIR21* составила $\pm 3,4\%$; в венах $\pm 5,6\%$. В поражённых атеросклерозом сонных артериях (8,7 [6,4; 13,1]%) наблюдается значимое снижение уровня метилирования анализируемого региона по сравнению как с непоражёнными артериями (20,4 [18,1; 24,7]%, $p < 0,001$), так и с венами (24,5 [19,1; 27,8]%, $p < 0,001$). Между интактными сонными артериями и венами значимых различий по уровню метилирования не обнаружено ($p = 0,109$). Наблюдаемые различия ($> 11\%$), превышающие погрешность измерения уровня метилирования, позволяют говорить о возможной связи метилирования «тела» гена *MIR21* в сонных артериях с их атеросклеротическим поражением.

При этом различия уровня метилирования в анализируемой области гена *MIR21* в лейкоцитах пациентов с атеросклерозом (61,4 [55,4; 64,7]%) и в лейкоцитах контрольной группы (61,7 [53,7; 67,2]%) статистически не значимы ($p = 0,748$).

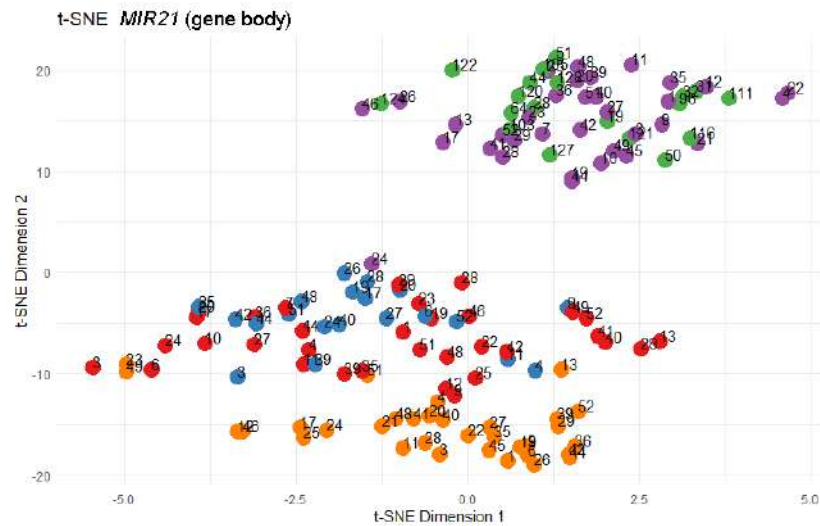
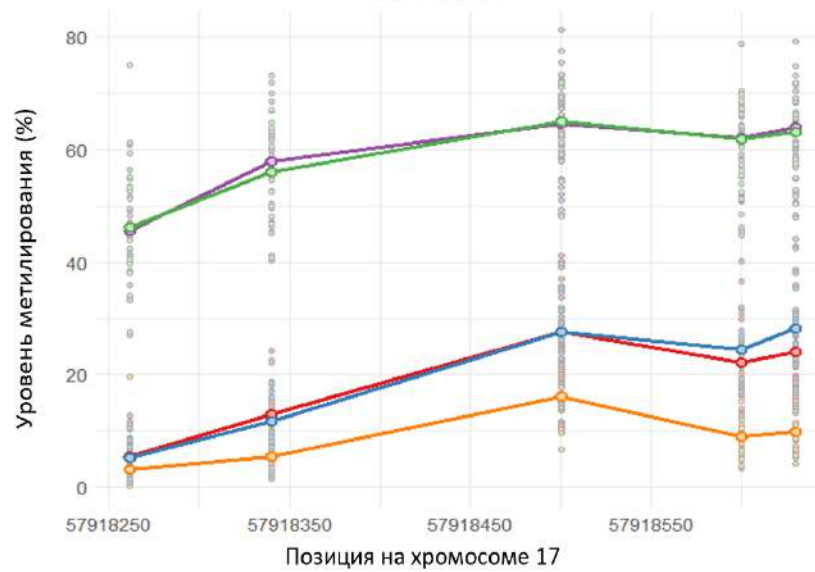
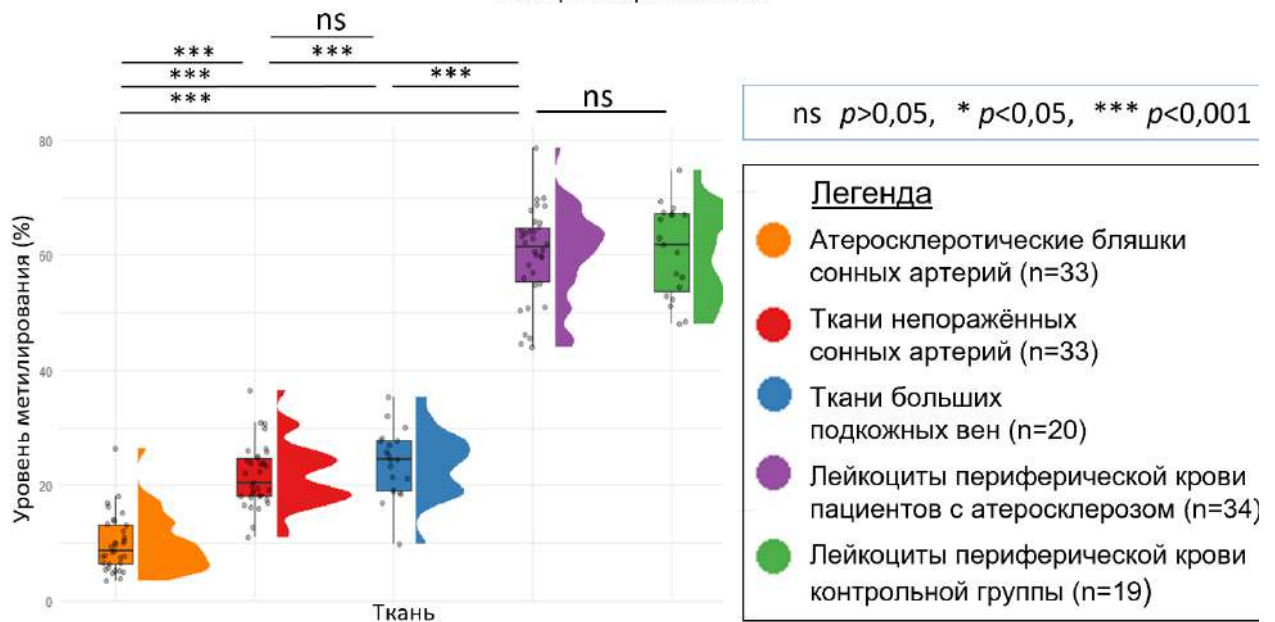
A**Б****В**

Рисунок 16. Анализ уровня метилирования «тела» гена *MIR21*.

(А). Взаимное расположение и кластеризация сосудов и лейкоцитов крови (по методу tSNE) пациентов с атеросклерозом сонных артерий в зависимости от профилей метилирования CpG-сайтов. (В) Профиль метилирования и (С) медианный уровень метилирования CpG-сайтов в сосудах и лейкоцитах крови. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

При анализе ассоциаций уровня метилирования CpG-сайтов в области «тела» гена *MIR21* в АСБ сонных артерий с их гистологическими показателями, обнаружено, что уровень метилирования CpG-сайта cg02515217 (chr17:57,918,601), а также медианный уровень по региону в целом значительно повышается при наличии разрыва фиброзной покрывки бляшки (Рисунок 17 А,Б) и кальцификатов в области «плеча» бляшки (Рисунок 17 В,Г). В то же время различия уровня метилирования между АСБ, претерпевшими разрыв и сохранившими целостность фиброзной покрывки, не превышают погрешность измерения в 3,4% как для cg02515217 (9,38 [5,67; 13,32]% и 6,68 [5,78; 7,86]%, соответственно, различия в 2,7%), так и для региона в целом (9,27 [7,60; 10,89]% и 6,32 [5,32; 8,31]%, соответственно, различия в 2,9%).

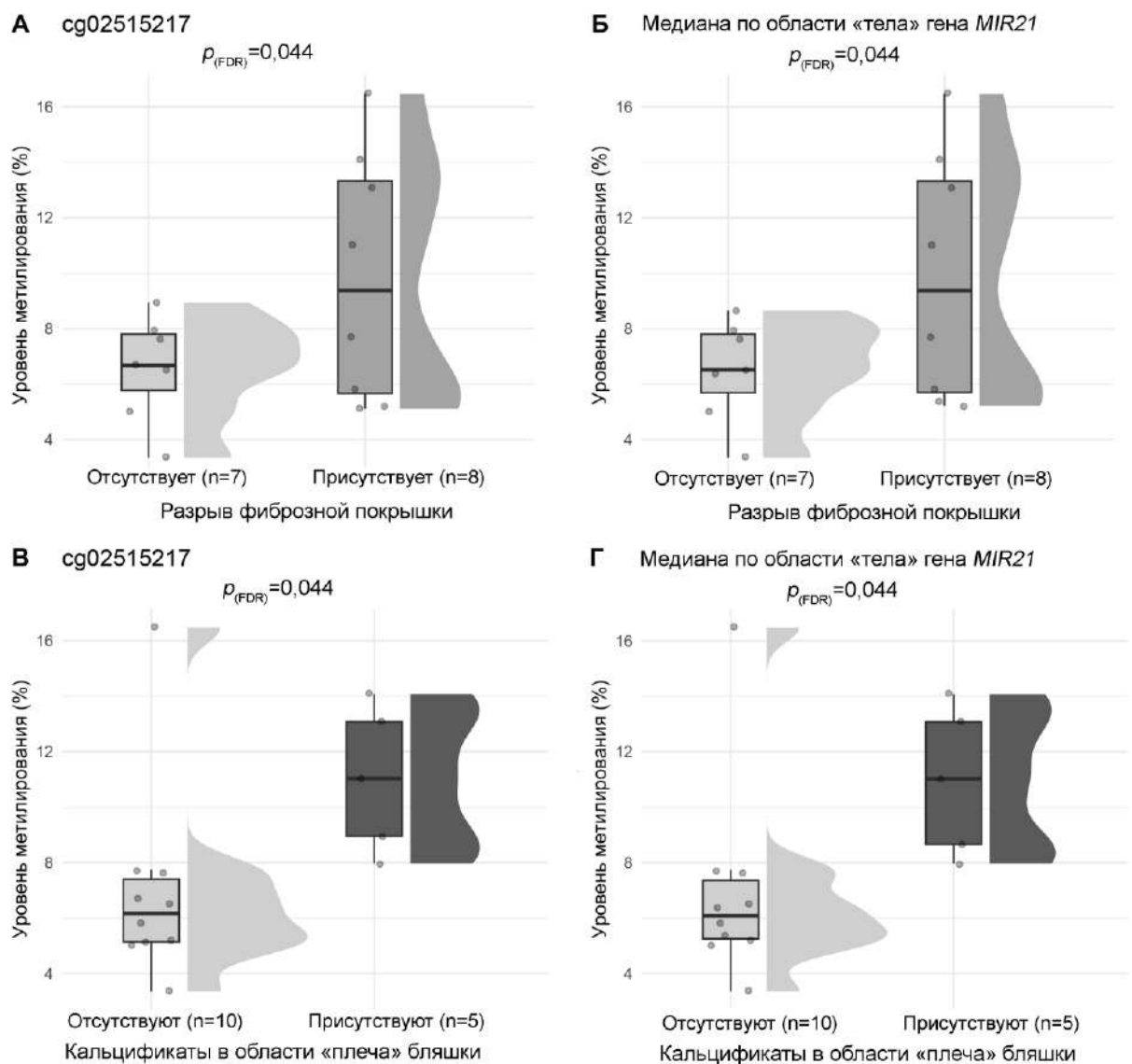


Рисунок 17. Уровень метилирования CpG-сайта chr17:59,841,239 (cg02515217) и медианный уровень метилирования региона «тела» гена *MIR21* в целом в АСБ сонных артерий в зависимости от разрыва фиброзной покрывки (А, Б) и наличия кальцификатов в области «плеча» атеросклеротической бляшки, соответственно (В, Г).

Различия уровня метилирования между АСБ с наличием и отсутствием кальцификатов в области «плеча» бляшки для cg02515217 достигают 4,8% (11,03 [8,96; 13,08]%, и 6,17 [5,14;

7,40]%, соответственно), превышая погрешность измерения, однако при расчёте медианного уровня метилирования по региону становятся менее выраженными (9,27 [8,76; 10,26]% и 6,84 [5,61; 8,80]%, соответственно, различия в 2,4%). Уровень значимости с поправкой на множественные сравнения (FDR) во всех случаях равен $p=0,044$. Ассоциаций для уровня метилирования CpG-сайтов «тела» гена *MIR21* с какими-либо другими показателями нестабильности АСБ не установлено. Также не выявлено корреляций между уровнем метилирования анализируемого региона в ЛПК и различными клиническими показателями пациентов, включая ОНМК в анамнезе.

При сопоставлении результатов настоящего исследования с данными метилочипов по тканям сосудов различной локализации и степени поражения атеросклерозом [Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021], во всех CpG-сайтах исследованных областей гена *MIR21* отмечается снижение уровня метилирования в поражённых сонных артериях относительно непоражённых внутренних грудных артерий (Рисунок 18).

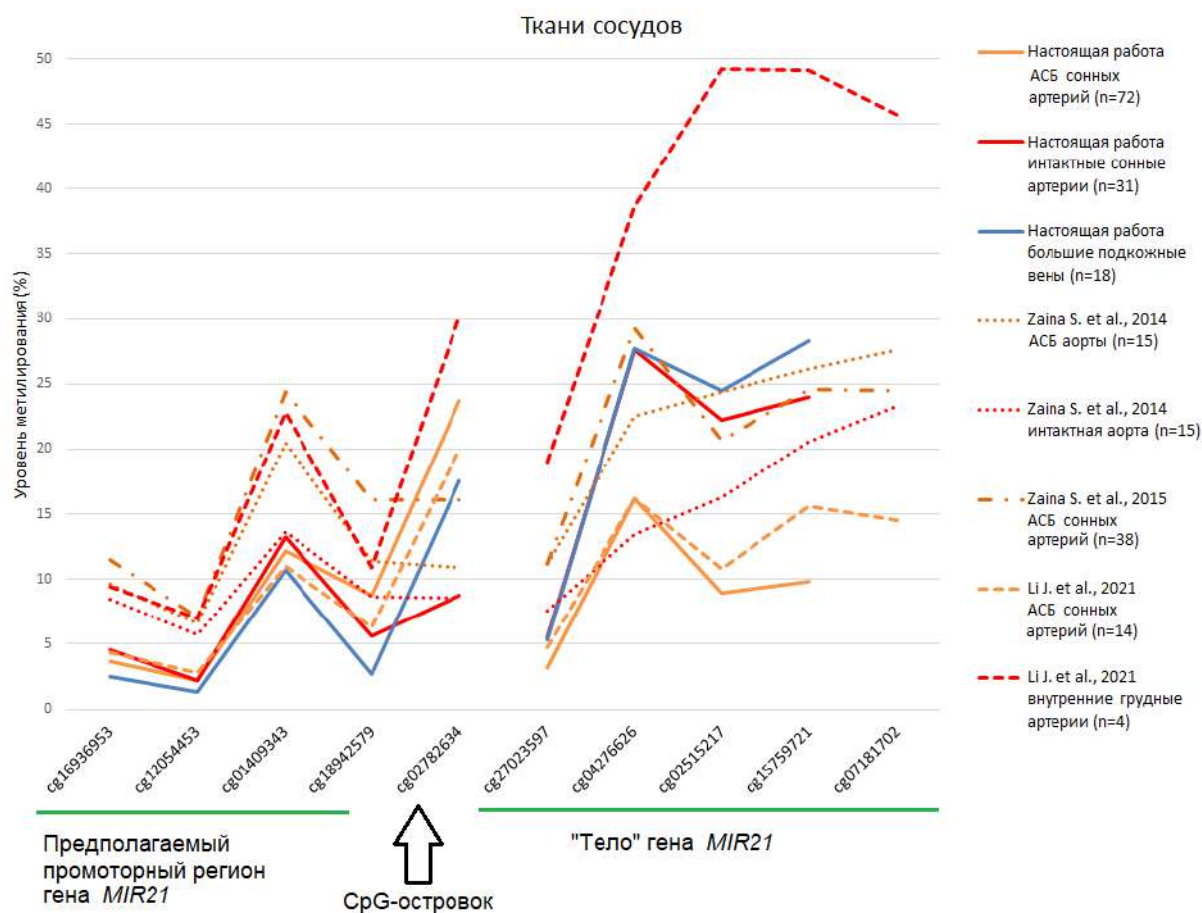


Рисунок 18. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов трёх регионов гена *MIR21* в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах различной локализации [настоящее исследование; Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

Однако в тканях аорты, по данным микрочипового исследования Zaina et al. (2014), напротив, наблюдалось повышение уровня метилирования всех рассматриваемых CpG-сайтов гена *MIR21* в атеросклеротической бляшке по сравнению с непоражёнными тканями [Zaina S. et al., 2014]. Уровень метилирования ACБ сонных артерий в исследовании Zaina et al. (2015), был сопоставим с ACБ аорты, однако в области «тела» гена *MIR21* рисунок метилирования CpG-сайтов в сонных артериях отличался от такового в аорте (как поражённой, так и непоражённой) и оказался более сходным с рисунком метилирования ACБ сонных артерий в микрочиповом исследовании J. Li et al. (2021) и данным диссертационном исследовании [Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021]. Это также может говорить о специфичности изменения уровня метилирования *MIR21* в отношении конкретного артериального русла при развитии атеросклеротического процесса.

В настоящем исследовании при сравнении уровня метилирования в ACБ между пациентами с ОНМК в анамнезе и пациентами без признаков ОНМК, различий ни по уровню метилирования трёх исследованных регионов в целом, ни по отдельным CpG-сайтам отмечено не было ($p > 0,400$). Отсутствие различий по уровню метилирования исследованных регионов гена *MIR21* между симптоматическими и асимптоматическими ACБ ($p > 0,123$) также показано в микрочиповых исследованиях S. Zaina с соавт. (для всех CpG-сайтов) и J. Li с соавт. (для 8 CpG-сайтов из 10; Рисунок 19) [Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

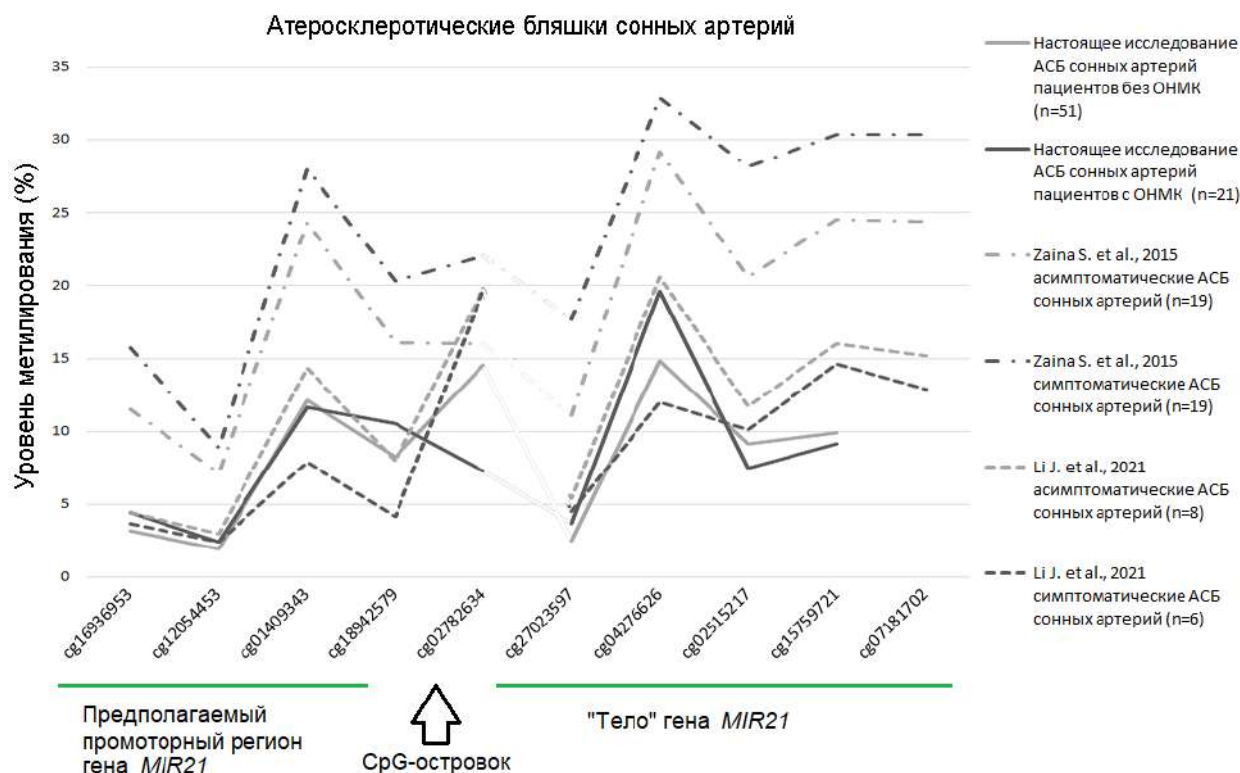


Рисунок 19. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов трёх регионов гена *MIR21* в атеросклеротических бляшках сонных артерий пациентов в зависимости от ОНМК в анамнезе [настоящее исследование; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

В то же время 2 CpG-сайта в исследовании J. Li с соавт. показали снижение уровня метилирования в нестабильных АСБ сонных артерий по сравнению со стабильными: cg01409343 в предполагаемом промоторном регионе *MIR21* (8,09 [7,96; 8,59]% и 13,86 [12,24; 16,37]% ($p=0,012$), соответственно) и cg04276626 в «теле» гена *MIR21* (19,49 [18,17; 22,73]% и 11,83 [11,03; 13,68]% ($p=0,012$), соответственно) [Li J. et al., 2021].

В то же время на Рисунке 19 для выборок J. Li с соавт. можно отметить тенденцию к снижению уровня метилирования по всем регионам *MIR21* в нестабильных АСБ сонных артерий по сравнению со стабильными, в то время как в исследовании S. Zaina с соавт. отмечается обратная тенденция — к повышению уровня метилирования *MIR21* в нестабильных АСБ сонных артерий по сравнению со стабильными. При этом значения метилирования CpG-сайтов трёх регионов гена *MIR21*, полученные в настоящем диссертационном исследовании, близки к результатам J. Li с соавт., в то время как у S. Zaina с соавт. уровень метилирования на 10-20% выше, при том, что рисунок метилирования, в целом, сохраняется (Рисунок 19).

В лейкоцитах периферической крови как пациентов с атеросклерозом, так и здоровых индивидов, рисунок метилирования гена *MIR21* в целом совпадает между различными исследованиями, включая данную работу (Рисунок 20) [Soriano-Tárraga et al., 2015; Istas G. et al., 2017]. Однако в настоящей работе лейкоциты пациентов с атеросклерозом характеризуются более низким уровнем метилирования отдельных CpG-сайтов в области предполагаемого промоторного региона *MIR21* и CpG-островка, чем лейкоциты контрольной группы.

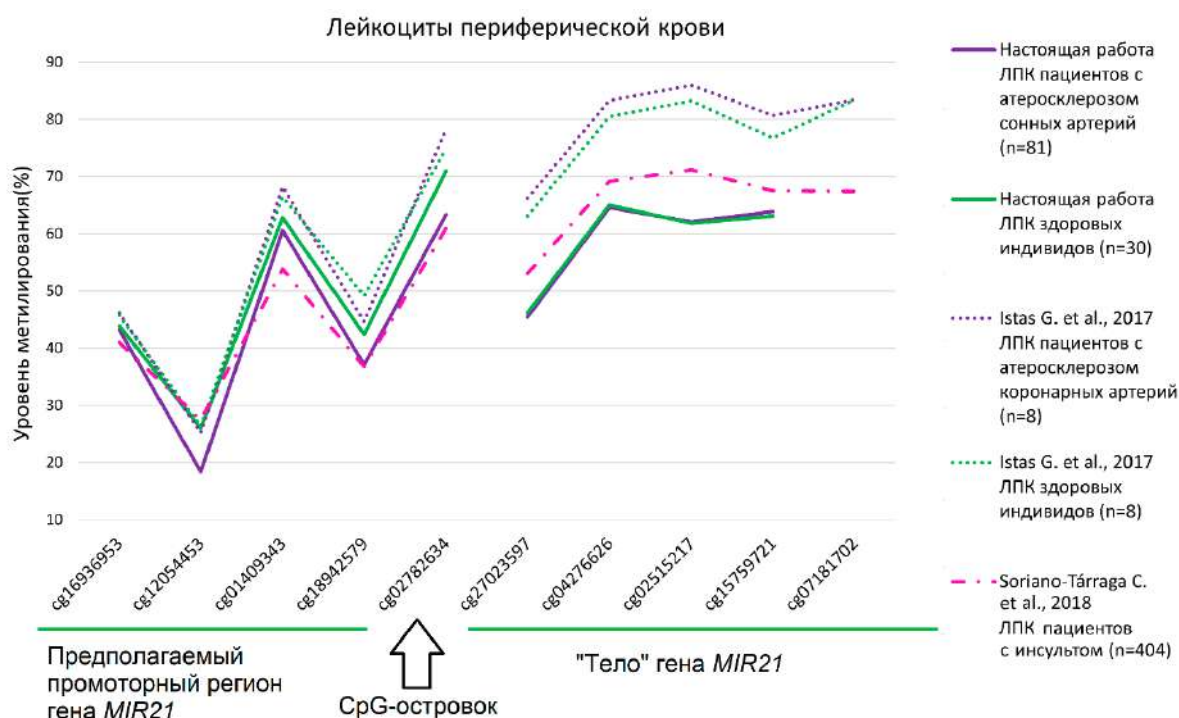


Рисунок 20. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов трёх регионов гена *MIR21* в лейкоцитах периферической крови пациентов с атеросклерозом сонных и коронарных артерий, инсультом, а также индивидов контрольной группы [настоящее исследование; Istas G. et al., 2017; Soriano-Tárraga C. et al., 2018].

МикроРНК miR-21 является одной из наиболее активно изучаемых. Метилирование гена *MIR21*, согласно литературным данным, преимущественно изучается при онкологических и аутоиммунных заболеваниях. В тканях сосудов и лейкоцитах крови при атеросклерозе анализ уровня метилирования гена *MIR21* не проводился.

В исследовании 8 клеточных линий злокачественных опухолей (молочной железы, мочевого пузыря, лёгких, печени, поджелудочной железы и почек) с использованием микрочипа Human Methylation450K показано значимое снижение уровня метилирования гена *MIR21* по сравнению с прилежащими нормальными тканями [Lu J. et al., 2020]. Из проанализированных в данной работе CpG-сайтов, три (cg04276626, cg02515217 и cg15759721) входили в изученную в данном диссертационном исследовании область «тела» гена *MIR21*. Также в данном исследовании было показано усиление экспрессии miR-21-5p в клеточной линии НЕК 293 (клетки эмбриональных почек человека) при обработке клеток азациитидином и снижение – при нокдауне деметилаз TET3 and TDG (конкретные деметилированные сайты в цитируемой статье не указаны) [Lu J. et al., 2020].

Искусственное деметилирование азациитидином вышеописанных трёх CpG-сайтов, входящих в область «тела» гена *MIR21*, проводилось и в исследовании Ortiz с соавт. (2018) на культуре клеток папиллярной карциномы щитовидной железы; уровень метилирования был изучен с применением микрочипа Human Methylation450 BeadChip [Ortiz I.M.D.P. et al., 2018]. В обоих исследованиях деметилирование региона «тела» гена *MIR21* приводило к усилению экспрессии микроРНК miR-21 [Ortiz I.M.D.P. et al., 2018; Lu J. et al., 2020].

В исследовании Ruhrmann S. с соавт. (2018), также с использованием микрочипа Human Methylation450 BeadChip, был показан более высокий уровень метилирования гена *MIR21* в Т-лимфоцитах у пациентов с рецидивирующим (но не вторично-прогрессирующим) подтипом рассеянного склероза по сравнению со здоровой контрольной группой. В этом исследовании также была отмечена значимая отрицательная корреляция уровня метилирования всех CpG-сайтов гена *MIR21* в Т-лимфоцитах с возрастом индивидов (в цитируемой статье приводятся коэффициент корреляции и уровень значимости для cg07181702: $\rho = -0,620$, $p < 0,001$) [Ruhrmann S. et al., 2018]. Тем не менее, несмотря на то что все CpG-сайты, проанализированные в данном диссертационном исследовании, рассматривались и Ruhrmann S. с соавт. (2018), в данной диссертационной работе не было выявлено корреляции с возрастом ни для одного из CpG-сайтов гена *MIR21*, как в группе пациентов с атеросклерозом, так и в контрольной группе.

При другом аутоиммунном заболевании, болезни Крона, Adams A.T. с соавт. (2014) с использованием микрочипа Human Methylation450K выявили в лейкоцитах снижение уровня метилирования в четырёх последовательных CpG-сайтах предполагаемого промоторного региона и cg02782634 CpG-островка гена *MIR21* у пациентов с болезнью Крона по сравнению с

контрольной группой. Однако, с увеличением возраста пациентов рисунок метилирования, специфичный для болезни Крона, сглаживался и становился неотличимым от наблюдаемого в контроле [Adams A.T. et al., 2014].

Анализ изменений уровня метилирования *MIR21* при сердечно-сосудистой патологии проводился в полногеномном исследовании на микрочипах Human Methylation450 BeadChip (Illumina, США). В лейкоцитах периферической крови пациентов с инфарктом миокарда была выявлена тенденция к снижению уровня метилирования CpG-сайта cg16936953, относящегося к предполагаемому промоторному региону гена *MIR21* ($p=0,049$), по сравнению со здоровыми индивидами. Однако при введении поправки на множественные сравнения (FDR) наблюдаемые различия утратили статистическую значимость [Ek W.E. et al., 2016].

Таким образом, в результате настоящего исследования показана тканеспецифичность метилирования гена *MIR21*: предполагаемого промоторного региона (9 CpG-сайтов), CpG-островка (16 CpG-сайтов) и «тела» (5 CpG-сайтов) гена *MIR21*. Во всех проанализированных регионах уровень метилирования ДНК в тканях сосудов снижен по сравнению с лейкоцитами, независимо от типа сосудов и наличия атеросклеротического поражения.

Полученные в данном диссертационном исследовании результаты показывают, что сниженный уровень метилирования гена *MIR21* в области CpG-островка и «тела» связан с подверженностью сонной артерии к развитию атеросклероза. Предполагаемый промоторный регион *MIR21*, наоборот, характеризуется гиперметилированием в АСБ по сравнению с непоражённой артерией. В области «тела» гена *MIR21* более высокий уровень метилирования отдельных сайтов связан с кальцификацией в области «плеча» АСБ, а снижение уровня метилирования предполагаемого промоторного региона данного гена в АСБ ассоциировано с наличием кровоизлияний и пенистых клеток.

Лейкоциты пациентов с атеросклерозом характеризуются более низким уровнем метилирования в области предполагаемого промоторного региона *MIR21*, чем лейкоциты контрольной группы. В случае CpG-островка гипометилирование выявлено в отдельных CpG-сайтах в лейкоцитах пациентов по сравнению с контрольной группой.

3.1.3 Анализ уровня метилирования регуляторного элемента E-box гена *MIR100*

Ген *MIR100* расположен в локусе 11q24.1 в регионе chr11:122,022,937-122,023,016 (сборка генома GRCh37/hg19) и находится в пределах гена-хозяина *MIR100HG*, [<http://genome-euro.ucsc.edu>]. Точная локализация промотора *MIR100* не установлена, однако согласно Chen D. с соавт (2014), на расстоянии 2,2 тыс.п.н. от гена *MIR100* (chr11:122,025,183-122,025,188) присутствует сайт E-box величиной в 6 нуклеотидов (CAGCTG). С сайтом E-box связывается транскрипционный фактор ZEB1, который усиливает экспрессию miR-100 [Chen D. et al., 2014]. Исходя из этого, для анализа уровня метилирования гена *MIR100* выбран регион chr11:122,024,891-122,025,506 (616 п.н., 8 CpG-сайтов), полностью охватывающий сайт E-box.

По результатам таргетного бисульфитного секвенирования региона *MIR100* получены данные о метилировании 7 из 8 CpG-сайтов, кроме chr11:122,025,042, что связано с его недостаточным покрытием при секвенировании. Локализация и эпигенетический контекст гена *MIR100* приведены на Рисунке В3 (Приложение В).

Анализ метилирования данного региона проведён для 20 пациентов с атеросклерозом сонных артерий и 18 индивидов контрольной группы. Среди пациентов с атеросклерозом только у 2 человек отмечены ОНМК в анамнезе, в связи с чем анализ связи уровня метилирования гена *MIR100* с наличием ОНМК в АСБ и ЛПК пациентов не проводился. Подробное описание выборок приведено в подразделе «2.2. Характеристика включенных в исследование выборок» и Таблице А3 (Приложение А).

Данные о метилировании предполагаемого регуляторного элемента E-box гена *MIR100* получены для 20 образцов АСБ, 18 образцов непораженных сонных артерий, 13 образцов больших подкожных вен, 18 образцов лейкоцитов периферической крови пациентов с атеросклерозом и 17 образцов лейкоцитов периферической крови контрольной группы. Полученные результаты анализа уровня метилирования 7 CpG-сайтов в области гена *MIR100* в сосудах и лейкоцитах крови приведены в Таблице Г5 (Приложение Г). Гистологическое исследование было проведено лишь для 5 образцов АСБ, поэтому анализ связи уровня метилирования анализируемого региона с гистологическими параметрами АСБ также не проводился.

В результате tSNE-анализа выявлено, что образцы кровеносных сосудов (артерий и вен), за исключением единичных случаев, кластеризуются отдельно от образцов лейкоцитов крови (Рисунок 21 А). Причем по профилю метилирования регуляторного элемента E-box гена *MIR100* пораженные атеросклерозом сонные артерии расположены в одной группе с интактными кровеносными сосудами, а лейкоциты крови пациентов сгруппированы с лейкоцитами крови здоровых индивидов. Таким образом, существует выраженная тканеспецифичность метилирования данного элемента для кровеносных сосудов и лейкоцитов крови.

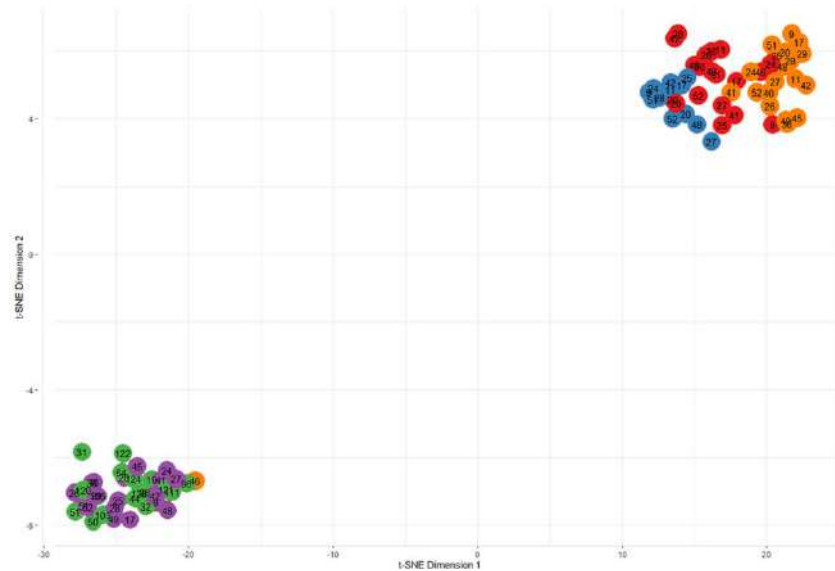
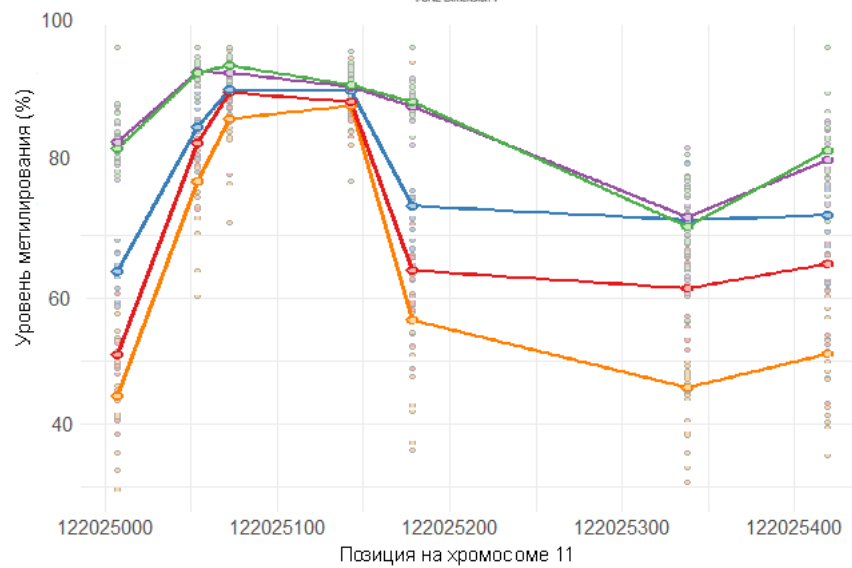
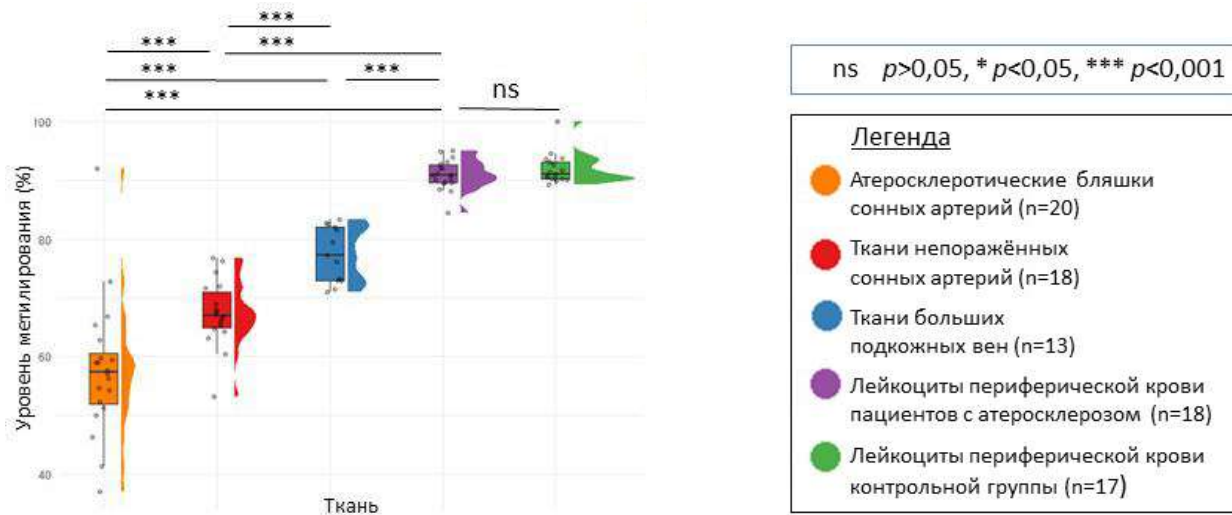
A**Б****В**

Рисунок 21. Анализ уровня метилирования гена *MIR100*.

(А) Взаимное расположение и кластеризация сосудов и лейкоцитов крови (по методу tSNE) в зависимости от профилей метилирования CpG-сайтов в области предполагаемого регуляторного элемента гена *MIR100* (E-box). (Б) Профиль метилирования и (С) медианный уровень метилирования CpG-сайтов в области предполагаемого регуляторного элемента гена *MIR100* (E-box) в сосудах и лейкоцитах крови.

Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

За исключением сайта chr11:122,025,143 (5й CpG-сайт исследованного региона), для которого уровень метилирования во всех тканях превышает 90%, а различия между тканями не достигают 3%, предполагаемый регуляторный элемент гена *MIR100* (E-box) демонстрирует характерный рисунок метилирования ДНК (Рисунок 21 Б). Уровень метилирования анализируемого региона в атеросклеротических бляшках (57,3 [52,0; 60,5]%) значимо снижен по сравнению со всеми тканями (Рисунок 21 В): непоражёнными артериями (67,0 [64,8; 70,9]%, $p < 0,001$), венами (77,2 [72,9; 82,0]%; $p < 0,001$) и лейкоцитами крови пациентов (90,9 [89,5; 92,6]%, $p < 0,001$). Погрешность измерения метилирования ДНК в поражённых и непоражённых артериях для данного региона составила $\pm 1,3\%$; в венах $\pm 3,5\%$, в лейкоцитах $\pm 3,7\%$. Наблюдаемые различия ($> 9,7\%$), превышающие погрешность измерения уровня метилирования во всех типах тканей, позволяют говорить о возможной связи метилирования регуляторного элемента E-box гена *MIR100* в сонных артериях с их атеросклеротическим поражением.

При попарном сравнении непоражённых тканей сосудов уровень значимости различий по уровню метилирования регуляторного элемента гена *MIR100* (E-box) не выходит за пределы $p < 0,001$. Это позволяет говорить как о тканеспецифичности метилирования ДНК исследованного региона гена *MIR100* (E-box), так и его о возможной связи с атеросклеротическим поражением сонных артерий.

Интересно, что вышеописанный паттерн тканеспецифичности ДНК в лейкоцитах и сосудах наиболее нагляден для CpG-сайта chr11:122,025,178 (6й CpG-сайт исследованного региона; Рисунок 21 Б), располагающегося в непосредственной близости от E-box (chr11:122,025,183-122,025,188). Снижение уровня метилирования ДНК в данном регионе в поражённых атеросклерозом сонных артериях согласуется с обозначенной Chen D. с соавт (2014) ролью E-box, как регуляторного региона гена *MIR100*.

При анализе ассоциаций уровня метилирования CpG-сайтов в области гена *MIR100* в АСБ сонных артерий с клиническими показателями пациентов обнаружено статистически значимое повышение уровня метилирования chr11:122,025,143 (5й CpG-сайт исследованного региона) в АСБ пациентов с метаболическим синдромом (92,2 [91,5; 92,6]%) по сравнению с пациентами без метаболического синдрома (89,1 [86,7; 90,9]%, $p = 0,021$) (Рисунок 22). При этом различия уровня метилирования ДНК (3,1%) превышают погрешность измерения метилирования в артериях (1,4%), следовательно, можно говорить о повышении уровня метилирования chr11:122,025,143 при метаболическом синдроме. Ассоциаций уровня метилирования данного CpG-сайта и остальных сайтов региона с какими-либо другими клиническими показателями пациентов обнаружено не было, в том числе из-за малого числа пациентов, оказывающихся в одной из групп сравнения.

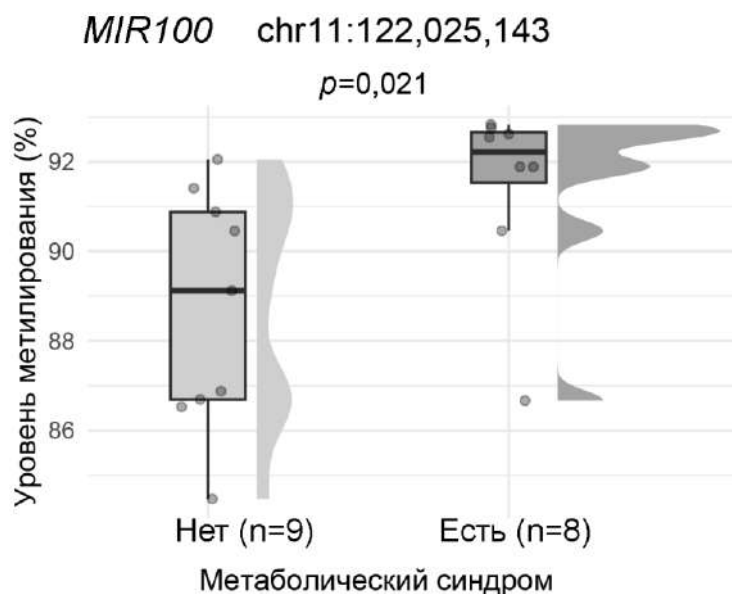


Рисунок 22. Уровень метилирования CpG-сайта chr11:122,025,143 предполагаемого регуляторного региона *MIR100* в АСБ сонных артерий в зависимости от наличия метаболического синдрома у пациентов.

Уровень метилирования ДНК предполагаемого регуляторного элемента *MIR100* в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом по всем исследованным CpG-сайтам не отличался от такового в лейкоцитах крови контрольной группы (90,9 [89,5; 92,6]% против 91,0 [90,3; 93,0]%; $p>0,05$; Рисунок 21 Б, В). Такой результат говорит о том, что анализ метилирования предполагаемого регуляторного элемента гена *MIR100* (E-box) в лейкоцитах крови нельзя применять в качестве диагностического биомаркера атеросклероза.

Проанализированный в работе регион гена *MIR100* (E-box) не содержит CpG-сайтов, аннотированных на микрочипах. Однако три CpG-сайта, которые присутствуют на микрочипах, расположены в области «тела» данного гена (Рисунок В3, Приложение В). Уровень метилирования АСБ сонных артерий в области «тела» гена *MIR100* в исследовании Li J. et al. (2021) и Zaina et al. (2015) был ниже, чем во внутренних грудных артериях (Рисунок 23).

Литературные данные по метилированию регуляторного элемента гена *MIR100* крайне ограничены. В неоднократно упомянутом в данном разделе исследовании Chen D. с соавт (2014) авторы показали, что при раке молочной железы происходит гиперметилирование гена-хозяина miR-100 *MIR100HG* [Chen D. et al., 2014]. Однако в данной публикации не указаны конкретные координаты гиперметилированного региона, поэтому сопоставить их с результатами данного диссертационного исследования не представляется возможным.

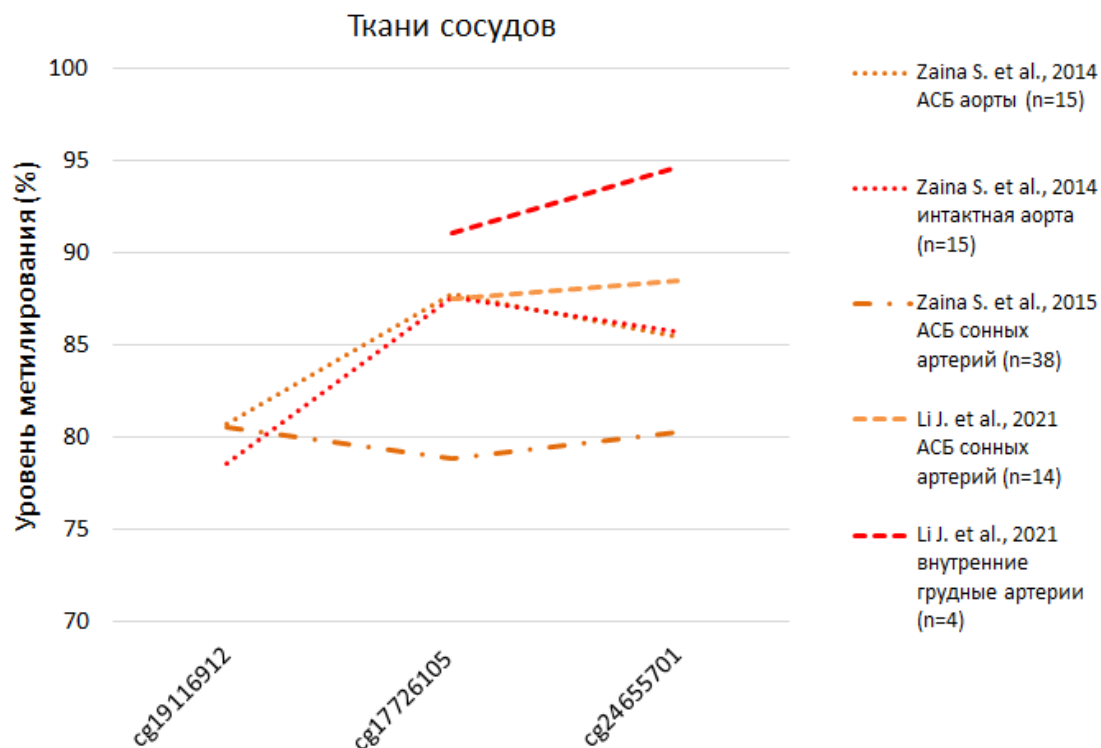


Рисунок 23. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов трёх CpG-сайтов гена *MIR100* в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах различной локализации [Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

С другой стороны, отсутствие в базах данных сведений по метилированию предполагаемого регуляторного элемента гена *MIR100* (E-box) даёт основание говорить, что метилирование данного региона изучается впервые и полученные в рамках данной диссертационной работы данные, по крайней мере, на момент работы над текстом рукописи, являются уникальными.

Таким образом, в результате настоящего исследования показана тканеспецифичность метилирования 7 CpG-сайтов предполагаемого регуляторного элемента гена *MIR100* (E-box): уровень метилирования ДНК в тканях сосудов снижен по сравнению с лейкоцитами. Гипометилирование проанализированного региона гена *MIR100* (E-box) связано с подверженностью сонной артерии к развитию атеросклероза. Однако у пациентов с сочетанием атеросклероза сонных артерий и метаболического синдрома уровень метилирования гена *MIR100* (E-box) в тканях атеросклеротических бляшек сонных артерий выше на 3% по сравнению с таковыми без метаболического синдрома.

3.1.4 Анализ уровня метилирования CpG-островка и гена *MIR127*

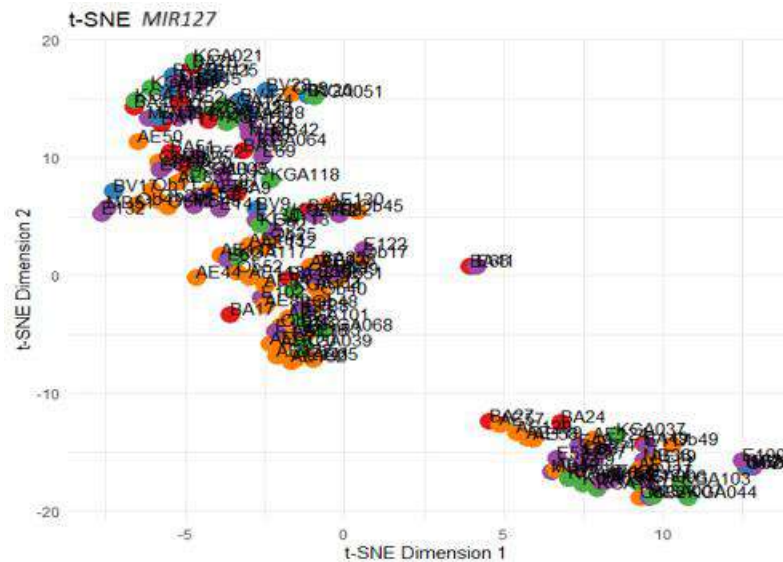
Ген *MIR127* находится в локусе 14q32.2 и относится к кластеру импринтированных генов данного локуса, включающего гены микроРНК miR-127, -136, -410, -431, -432, а также гены *RTL1* и *MEG3* [<http://genome-euro.ucsc.edu>]. Для генов данного кластера показано усиление экспрессии в поражённых атеросклерозом бедренных артериях по сравнению с непоражёнными внутренними грудными артериями [Aavik E. et al., 2014]. Ген *MIR127* (chr14:101,349,316-101,349,412; сборка генома GRCh37/hg19) частично пересекается с близлежащим CpG-островком (chr14:101,349,373-101,349,860) и праймеры были подобраны таким образом, чтобы ПЦР-продукт включал весь CpG-островок и «тело» гена *MIR127* полностью. Таким образом, для анализа уровня метилирования гена *MIR127* выбран регион chr14:101,349,259-101,349,884 (626 п.н.; сборка генома GRCh37/hg19), охватывающий 40 CpG-сайтов. Локализация и эпигенетический контекст гена *MIR127* приведены на Рисунке В4 (Приложение В).

Анализ метилирования данного региона проведён для 60 пациентов с атеросклерозом сонных артерий и 31 индивида контрольной группы. Среди пациентов с атеросклерозом у 19 человек отмечены ОНМК в анамнезе. Подробное описание выборок приведено в подразделе «2.2. Характеристика включенных в исследование выборок» и Таблице А3 (Приложение А). Морфологически атеросклеротические бляшки сонных артерий (n=57) охарактеризованы в Таблице А4 (Приложение А).

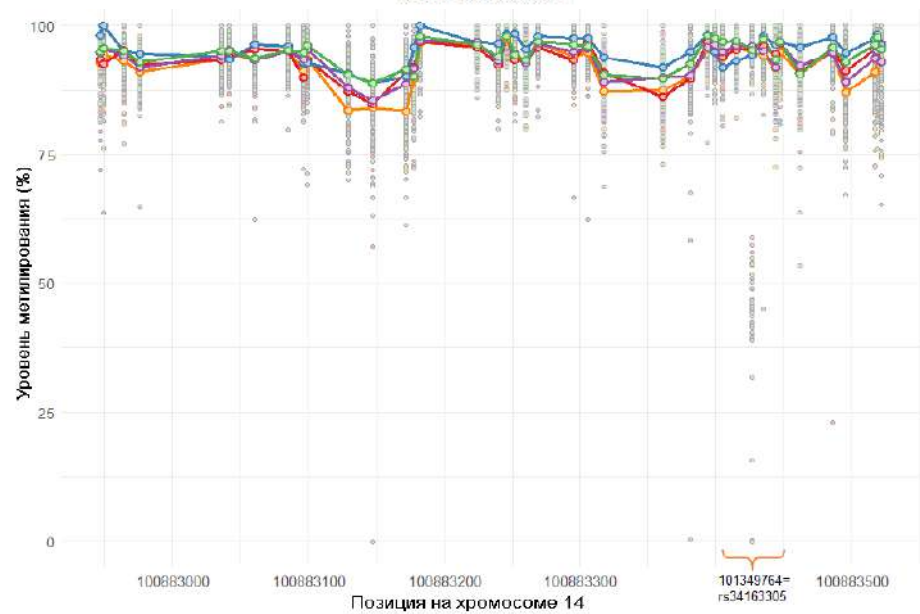
Всего было осуществлено 2 отдельных запуска секвенатора для анализа методом таргетного бисульфитного секвенирования. В обоих запусках получены данные о метилировании 40 CpG-сайтов исследуемого региона *MIR127* (chr14:101,349,259-101,349,884) суммарно в 51 образце АСБ, 17 образцах непораженных сонных артерий, 13 образцах больших подкожных вен, 54 образцах лейкоцитов периферической крови пациентов с атеросклерозом и 28 образцах лейкоцитов крови контрольной группы. Полученные результаты анализа уровня метилирования 40 CpG-сайтов в области гена *MIR127* в сосудах и лейкоцитах крови приведены в Таблице Г6 (Приложение Г).

В результате tSNE-анализа (Рисунок 24 А) наблюдается кластеризация образцов на три группы. При этом кластеризация образцов произошла не по типу тканей (сосудов либо лейкоцитов крови), а по уровню метилирования CpG-сайта chr14:101,349,764, показавшего значительный межиндивидуальный разброс уровня метилирования (от 0% до 100%). Остальные 39 CpG-сайтов региона гена *MIR127* из проанализированных сорока показали высокий уровень метилирования (>70%, за исключением единичных «выбросов») во всех тканях сосудов и в лейкоцитах периферической крови как исследуемой, так и контрольной группы (Рисунок 24 Б, В).

А



Б



В

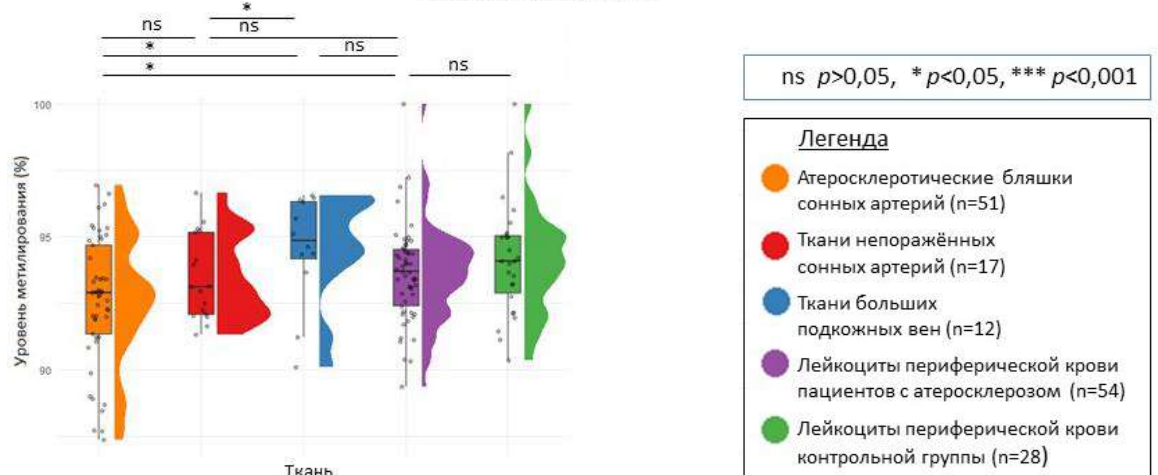


Рисунок 24. Анализ уровня метилирования региона, включающего CpG-островки и ген *MIR127*.

(А). Взаимное расположение и кластеризация сосудов и лейкоцитов крови (по методу tSNE) в зависимости от профилей метилирования CpG-сайтов исследованного региона.
 (Б) Профиль метилирования и (В) медианный уровень метилирования CpG-сайтов исследованного региона в сосудах и лейкоцитах крови.

Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

За единичными исключениями, самый крупный кластер ($n=119$) включал образцы с уровнем метилирования CpG-сайта chr14:101,349,764 от 87 до 100% (Рисунок 24 А, слева), менее крупный второй кластер ($n=37$) — образцы с уровнем метилирования данного CpG-сайта от 32 до 59% (Рисунок 24 А, справа) и наименьший третий кластер ($n=6$) — образцы с нулевым уровнем метилирования CpG-сайта chr14:101,349,764 (Рисунок 24 А, справа у края рисунка).

Объяснением значительного межиндивидуального разброса уровня метилирования CpG-сайта chr14:101,349,764 служит нахождение в данной точке генома однонуклеотидного полиморфизма rs34163305:C>T (Рисунок 24 Б). Альтернативный аллель Т в европейской популяции встречается с частотой 0,24 (согласно базе данных gnomAD v.4.1.0, <https://gnomad.broadinstitute.org/variant/14-100883427-C-T>). Его наличие в точке chr14:101,349,764 приведёт к исчезновению CpG-динуклеотида, следовательно, у гомозигот по минорному аллелю (ТТ) уровень метилирования будет равен 0%, а у гетерозигот (СТ) — не превышать 50%.

Поскольку генотипирование генов микроРНК, в том числе, гена *MIR127*, в данном диссертационном исследовании не проводилось, можно только предполагать генотипы rs34163305 у пациентов с атеросклерозом и представителей контрольной группы исходя из уровня метилирования chr14:101,349,764. На основании предположения, что уровень метилирования CpG-сайта chr14:101,349,764 от 87 до 100% соответствует генотипу СС rs34163305, от 32 до 59% — СТ, а 0% — ТТ, в выборке пациентов определяется следующее соотношение генотипов: 44 (73,3%) носителей гомозиготного генотипа СС, 14 (23,3%) носителей гетерозиготного генотипа СТ и 2 (3,3%) носителя гомозиготного генотипа ТТ. В контрольной группе — 17 (65,4%) носителей гомозиготного генотипа СС, 8 (30,8%) носителей гетерозиготного генотипа СТ и 1 (3,8%) носитель гомозиготного генотипа ТТ. Расчётная частота альтернативного аллеля Т в группе пациентов с атеросклерозом составила 0,19, в контрольной группе 0,15, а в общей выборке — 0,16. Эти значения несколько меньше вышеприведённой частоты альтернативного аллеля Т в европейской популяции (0,24), однако позволяют говорить о соответствии уровня метилирования chr14:101,349,764 генотипу rs34163305. Чтобы подтвердить или опровергнуть это соответствие, требуется проведение исследования с генотипированием rs34163305, например, методом масс-спектрометрии.

Погрешность измерения метилирования в поражённых и непоражённых артериях для области CpG-островка и гена *MIR127* составила $\pm 0,7\%$; в венах $\pm 0,9\%$, в лейкоцитах $\pm 0,6\%$. Различия уровня метилирования ДНК в проанализированной в сонных артериях, поражённых атеросклерозом (93,3 [92,1; 94,5]%) и в непоражённых сонных артериях (94,0 [93,2; 94,7]%) не достигли статистической значимости ($p=0,249$), причём такая картина наблюдалась для всех 40 проанализированных CpG-сайтов ($p>0,092$).

В то же время, установлено значимое снижение уровня метилирования в поражённых сонных артериях (93,3 [92,1; 94,5]%) как по сравнению с венами (95,4 [95,1; 96,5]%, $p<0,001$), так и с лейкоцитами крови пациентов (94,3 [93,3; 94,8]%, $p=0,014$; рисунок 24 В). При этом можно выделить регионы, где снижение уровня метилирования в поражённых сонных артериях по сравнению с венами наблюдается в нескольких последовательных CpG-сайтах: chr14:101,349,589-101,349,731 (с 19го по 27й сайт региона, за исключением 21го сайта, где различия не достигли статистической значимости) и chr14:101,349,772- 101,349,833 (с 32го по 37й сайт региона); оба региона входят в CpG-островок). В первом регионе разница уровней метилирования CpG-сайтов между поражёнными сонными артериями и большими подкожными венами составляет 2,21-5,47% ($\Delta\beta_{\min}$ - $\Delta\beta_{\max}$), во втором – 2,40-7,07% (Таблица Г6, Приложение Г).

Наблюдаемые различия ($>1,0\%$), превышают погрешность измерения уровня метилирования во всех типах тканей, следовательно, можно говорить о наблюдаемом снижении уровня метилирования *MIR127* в поражённых атеросклерозом сонных артериях по сравнению с венами и лейкоцитами периферической крови тех же пациентов в целом по региону и, в особенности, о снижении уровня метилирования двух участков CpG-островка *MIR127* в поражённых атеросклерозом сонных артериях по сравнению с большими подкожными венами.

Уровень метилирования по исследованному региону, включающему CpG-островок и ген *MIR127*, в венах достигал наибольших значений среди всех исследованных тканей (95,4 [95,1; 96,5]%), и значимо превышал таковой как в непоражённых сонных артериях (94,0 [93,2; 94,7]%, $p<0,001$), так и в лейкоцитах крови пациентов (94,3 [93,3; 94,8]%, $p=0,001$). При этом наблюдаемые различия ($>1,1\%$) превысили погрешность измерения уровня метилирования. Однако для различий между непоражёнными артериями и лейкоцитами крови пациентов статистическая значимость не установлена ($p=0,995$; Рисунок 24 В).

При сопоставлении результатов настоящего исследования с данными метилочипов по тканям сосудов различной локализации и степени поражения атеросклерозом [Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021], также заметно, что уровень метилирования региона CpG-островка и гена *MIR127* превышает 80% во всех исследованных тканях сосудов пациентов с атеросклерозом (Рисунок 25). При этом рисунок метилирования в АСБ сонных артерий между исследованиями не совпадает: в данном диссертационном исследовании и в работе J. Li с соавт. (2021) уровень метилирования cg25063505 (chr14:101,349,286) и cg18862502 (chr14:101,349,313) в тканях сосудов выше 90%, в то время как в более ранних исследованиях S. Zaina с соавт. (2014, 2015) определяется относительное снижение уровня метилирования двух этих сайтов в тканях сонных артерий и аорты (независимо от наличия атеросклеротического поражения) [Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021]. Также в данном диссертационном исследовании не отмечается явного сходства рисунка метилирования данного региона между поражёнными атеросклерозом и непоражёнными сонными артериями, в то время как в работе S. Zaina с соавт.

(2014, 2015) рисунок метилирования между АСБ аорты и сонных артерий, а также интактной аортой практически совпадает.

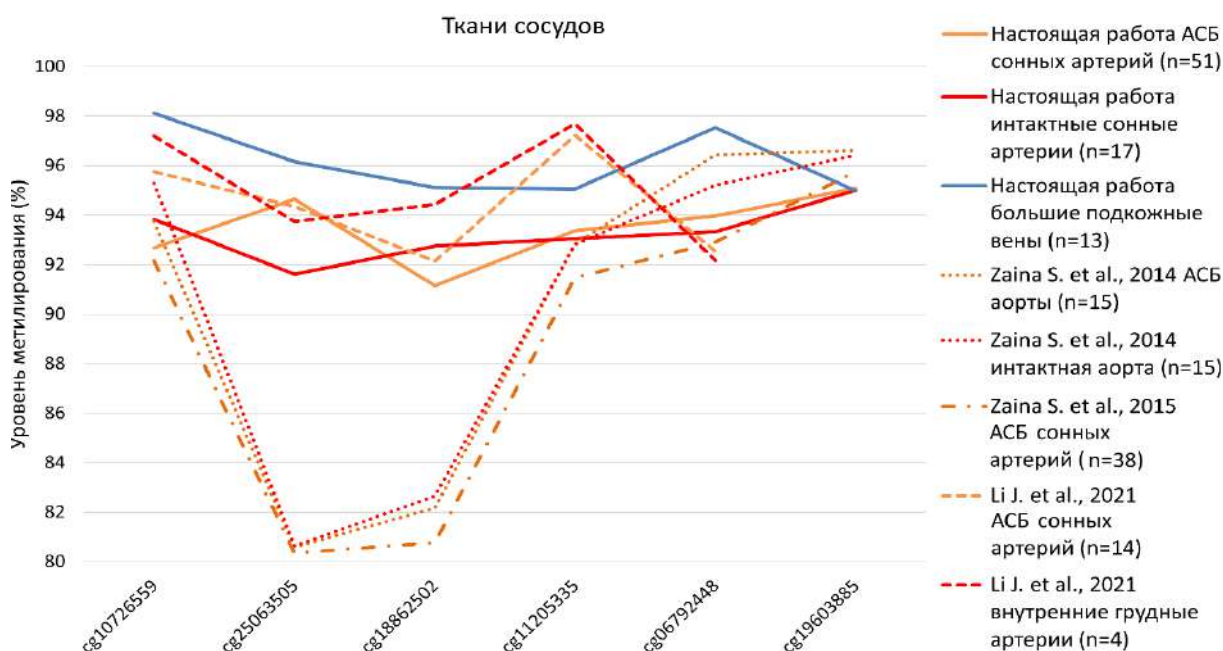


Рисунок 25. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов региона, включающего CpG-островок и ген *MIR127*, в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах различной локализации [настоящее исследование; Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

Уровень метилирования исследуемого региона, охватывающего CpG-островок и ген *MIR127*, в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом (94,3 [93,3; 94,8]%), не отличался от такового в лейкоцитах крови контрольной группы (94,4 [93,4; 95,2]%, $p=0,841$; Рисунок 24 В) и различия отсутствовали для всех 40 проанализированных CpG-сайтов ($p>0,356$; Рисунок 24 Б).

Несмотря на свою достаточную протяжённость и наличие CpG-островка, исследуемый регион гена *MIR127* включает всего 6 CpG-сайтов, аннотированных на микрочипах. При сравнении полученных в данном диссертационном исследовании результатов с микрочиповыми исследованиями, можно отметить сходство рисунка метилирования исследуемого региона как между лейкоцитами периферической крови у пациентов с атеросклерозом сонных артерий и контрольной группы в данном исследовании, так и между лейкоцитами пациентов с атеросклерозом коронарных артерий и контрольной группы в исследовании G. Istas с соавт. (2017) (Рисунок 26). Кроме того, в обоих исследованиях уровень метилирования региона CpG-островка и гена *MIR127* превышал 90%. Однако для лейкоцитов пациентов с инсультом (атеросклеротической этиологии, лакунарным или кардио-эмболическим) в исследовании C. Soriano-Tárraga с соавт. (2018) можно видеть более низкий уровень метилирования (примерно на 10%), хотя рисунок метилирования в некоторой степени сходен с таковым у G. Istas с соавт. (2017).

Лейкоциты периферической крови

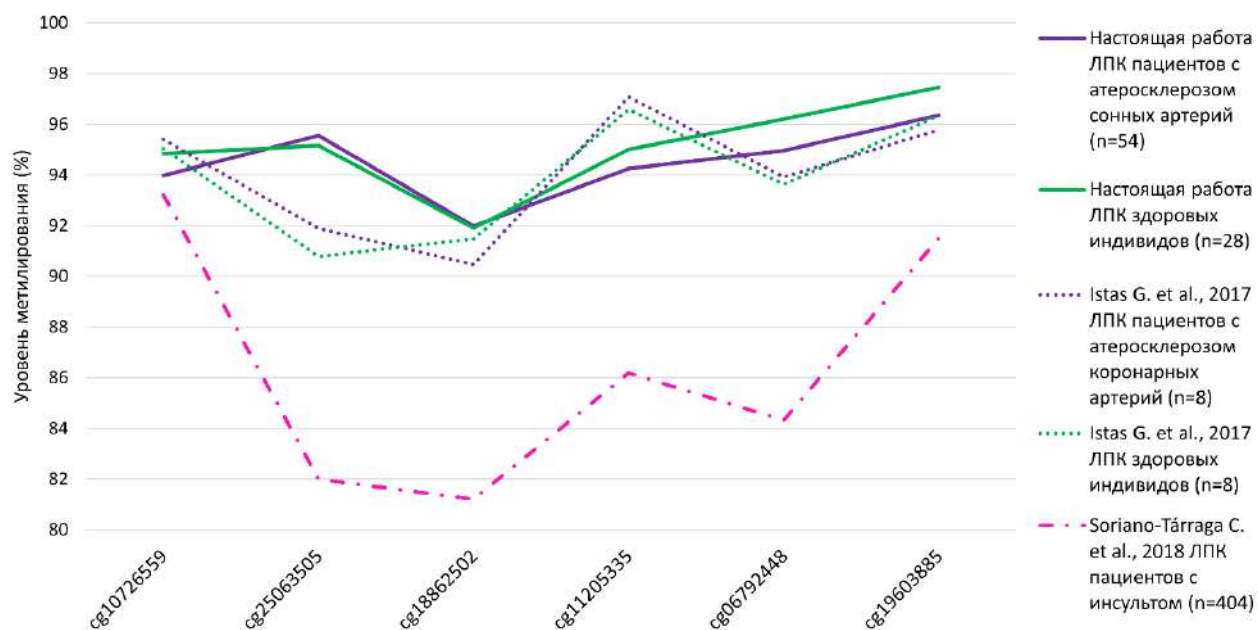


Рисунок 26. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов региона, включающего CpG-островок и ген *MIR127*, в лейкоцитах периферической крови пациентов с атеросклерозом сонных и коронарных артерий, инсультом, а также индивидов контрольной группы [настоящее исследование; Istas G. et al., 2017; Soriano-Tárraga C. et al., 2018].

В целом все рассмотренные микрочиповые исследования сходятся в том, что уровень метилирования региона CpG-островка и гена *MIR127* превышает 80% во всех исследованных тканях сосудов и лейкоцитах, как пациентов с атеросклерозом и осложнениями атеросклероза (инсультом), так и здоровых индивидов, хотя рисунок метилирования ДНК может различаться между различными исследованиями.

При сравнении уровня метилирования отдельных CpG-сайтов в области гена *MIR127* в АСБ с их гистологическими характеристиками обнаружены единичные корреляции слабой и средней силы (Таблица 7). Ни для одного из показателей нестабильности не определяется устойчивых закономерностей метилирования, которые бы наблюдались по всему исследованному региону гена *MIR127* или на протяжении нескольких последовательных CpG-сайтов. В то же время, для трёх CpG-сайтов показана однонаправленная корреляция с двумя показателями нестабильности АСБ: уровень метилирования chr14:101,349,509 отрицательно коррелировал с толщиной фиброзной покрышки и размером ядра атеросклеротической бляшки; для уровня метилирования chr14:101,349,643 и таких показателей как количество макрофагов и количество лимфоцитов в поле зрения при микроскопическом исследовании бляшки показана отрицательная корреляция, а для chr14:101,349,784 и тех же показателей — корреляция положительная (Таблица 7).

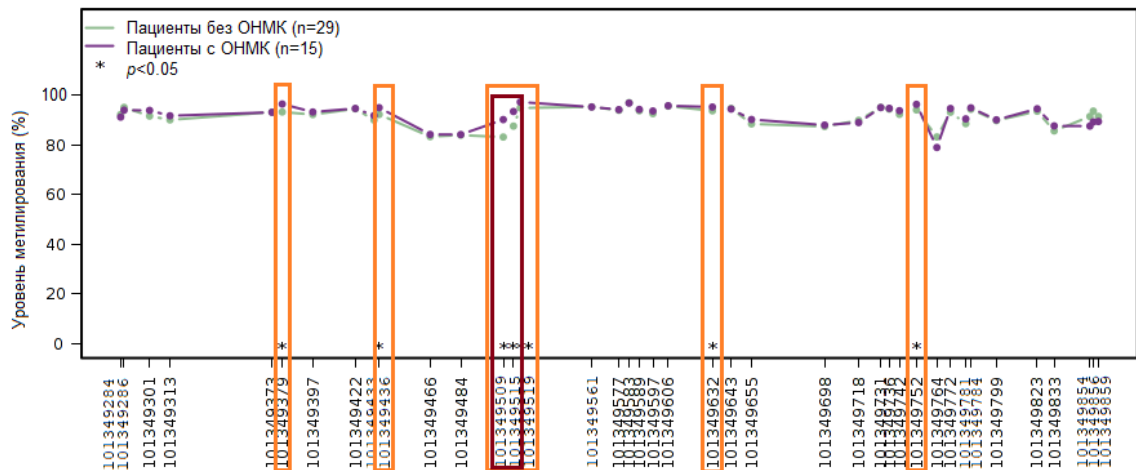
Таблица 7. Значимые корреляции уровня метилирования в АСБ CpG-сайтов региона, включающего CpG-островок гена *MIR127*, с некоторыми гистологическими показателями нестабильности атеросклеротической бляшки

	chr14:101, 349,286	chr14:101, 349,509	chr14:101, 349,515	chr14:101, 349,561	chr14:101, 349,643	chr14:101, 349,698	chr14:101, 349,718	chr14:101, 349,736	chr14:101, 349,784	chr14:101, 349,856
Толщина покрышки (мкм)	—	rho= -0,450 $p=0,016$	rho= -0,510 $p=0,008$	—	—	rho= -0,392 $p=0,043$	—	—	—	—
Размер ядра (мкм)	rho= -0,424 $p=0,035$	rho= -0,443 $p=0,018$	—	—	—	—	rho= -0,520 $p=0,002$	—	—	—
Количество макрофагов	—	—	—	—	rho= -0,571 $p=0,005$	—	—	—	rho= 0,410 $p=0,037$	—
Количество лимфоцитов	—	—	—	—	rho= -0,502 $p=0,006$	—	—	—	rho= 0,405 $p=0,018$	—
Количество нейтрофилов	—	—	—	rho= -0,767 $p=0,010$	—	—	—	rho= -0,673 $p=0,033$	—	—
Количество пенистых клеток	—	—	—	—	—	—	—	—	—	rho= 0,684 $p=0,042$

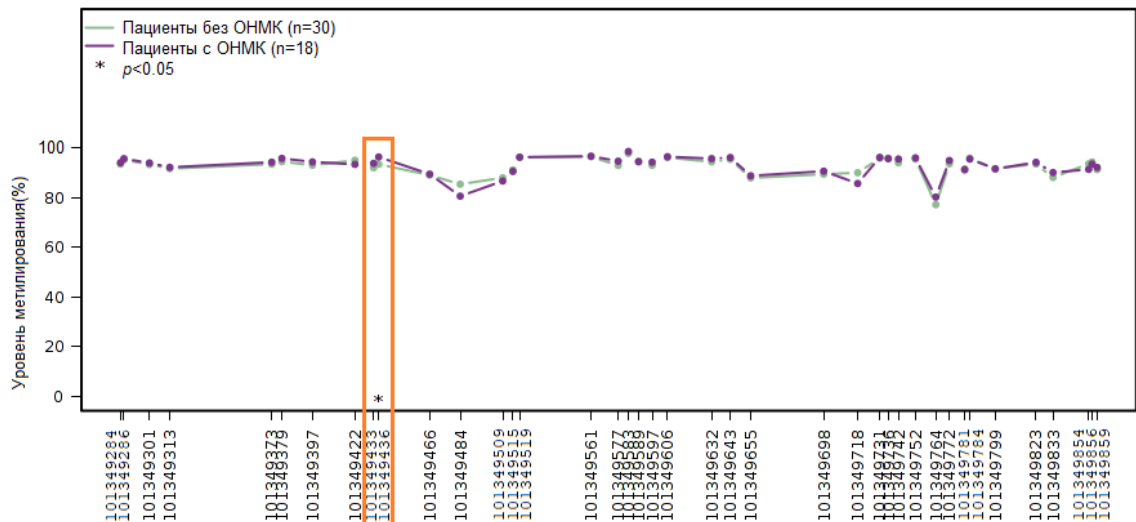
При сравнении уровня метилирования анализируемого региона в АСБ между пациентами с ОНМК в анамнезе и пациентами без признаков ОНМК, значимые различия были отмечены по 7 отдельным CpG-сайтам ($p<0,046$; Рисунок 27 А, оранжевые рамки), но не по региону в целом ($p=0,364$; Рисунок 27 В). Однако различия в медианном уровне метилирования составили 2-4%, с максимальным уровнем в 7% для двух соседних CpG-сайтов: chr14:101,349,509 и chr14:101,349,515 (Рисунок 27 А, красная рамка).

У пациентов с ОНМК в анамнезе наблюдался более высокий уровень метилирования сайтов chr14:101,349,509 и chr14:101,349,515 (89,79 [85,01; 94,95]% и 94,84 [91,28; 96,55]%, соответственно) по сравнению с пациентами без ОНМК (82,09 [77,01; 89,19]%, $p=0,001$; и 87,97 [84,09; 91,74]%, $p=0,046$, соответственно). Стоит отметить, что для этих же двух CpG-сайтов отмечена отрицательная корреляция с отдельными гистологическими показателями нестабильности АСБ, а именно с толщиной фиброзной покрышки (оба CpG-сайта) и размером ядра атеросклеротической бляшки (только chr14:101,349,509; Таблица 7).

А АСБ сонных артерий:



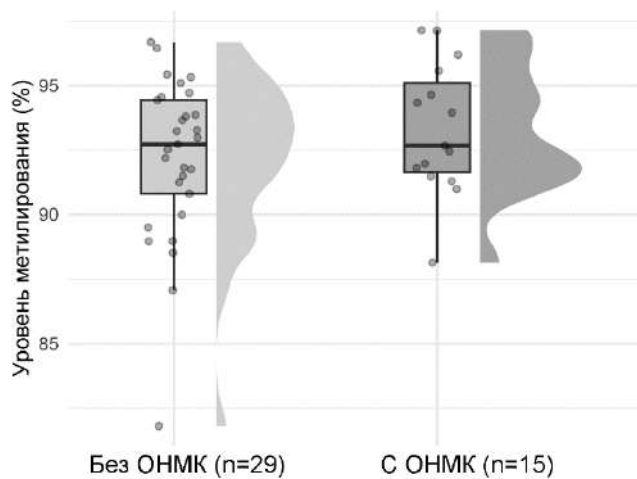
Б ЛПК пациентов с атеросклерозом:



В

АСБ сонных артерий:

$p=0,364$



Г

ЛПК пациентов с атеросклерозом:

$p=0,641$

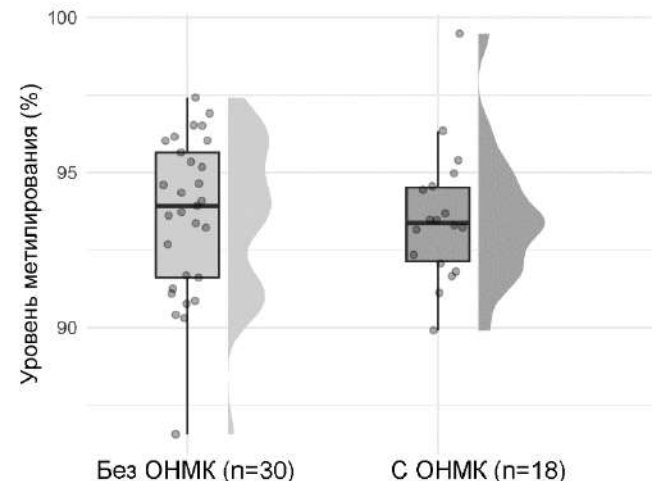


Рисунок 27. Анализ уровня метилирования региона, включающего CpG-островки и ген *MIR127*, у пациентов с атеросклерозом в зависимости от наличия ОНМК в анамнезе. Профиль метилирования CpG-сайтов в области исследуемого региона и медианный уровень метилирования по региону в сосудах (А, В) и лейкоцитах крови (Б, Г).

Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Из 6 CpG-сайтов, аннотированных на микрочипах, различия по уровню метилирования между АСБ пациентов с наличием и отсутствием ОНМК в данном исследовании показал лишь один сайт, cg06792448 (chr14:101,349,632). В микрочиповых исследованиях [Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021] также продемонстрировано значимое повышение уровня метилирования по данному сайту в АСБ сонных артерий пациентов с симптомами ОНМК по сравнению с бессимптомными пациентами, хотя различия не превышали 3% (Рисунок 28). В данном диссертационном исследовании у пациентов с симптомами ОНМК уровень метилирования cg06792448 в АСБ составил 95,59 [93,90; 96,37]%, а у пациентов без ОНМК в анамнезе — 93,58 [92,71; 95,42]%, $p=0,035$. В публикации S. Zaina с соавт. (2015) уровень метилирования cg06792448 у пациентов с симптомами ОНМК был равен 93,81 [94,32; 95,18]%, а у бессимптомных пациентов 90,89 [93,23; 94,49]% ($p=0,009$). В исследовании J. Li с соавт. уровень метилирования cg06792448 был равен 93,72 [93,16; 93,86]% при наличии инсульта и 91,48 [89,80; 91,89]% при его отсутствии ($p=0,008$).

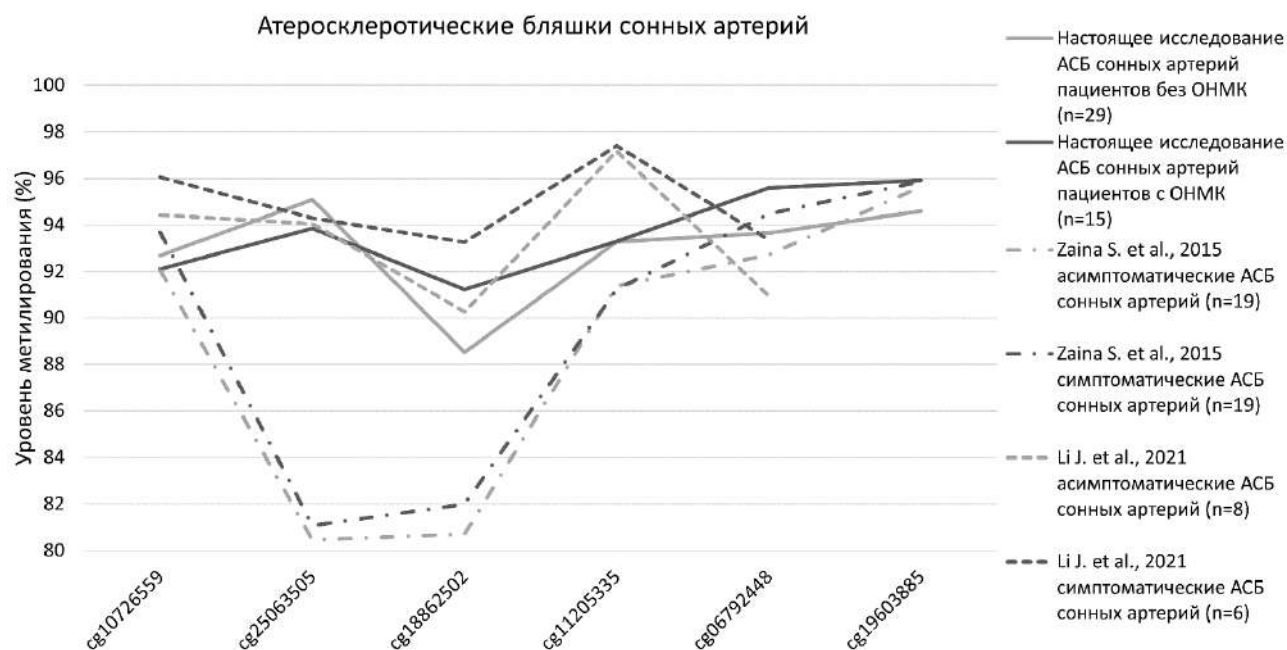


Рисунок 28. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов региона, включающего CpG-островок и ген *MIR127*, в атеросклеротических бляшках сонных артерий пациентов в зависимости от ОНМК в анамнезе [настоящее исследование; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

При сравнении уровня метилирования в ЛПК пациентов с атеросклерозом между пациентами с ОНМК в анамнезе и пациентами без такового события, отличия наблюдались только по одному CpG-сайту, chr14:101,349,436 (Рисунок 27 Б). Уровень метилирования данного сайта у пациентов с атеросклерозом, перенесших ОНМК, был выше (96,42 [94,98; 97,41]%), чем у пациентов без ОНМК в анамнезе (94,42 [92,16; 96,55]%, $p=0,033$). По уровню метилирования региона в целом значимых различий между ЛПК пациентов с ОНМК в анамнезе и ЛПК пациентов без ОНМК не установлено ($p=0,641$; Рисунок 27 Г).

При сравнении уровня метилирования отдельных CpG-сайтов в области CpG-островка и гена *MIR127* в ЛПК пациентов с атеросклерозом сонных артерий с патогенетически значимыми признаками атеросклероза обнаружены единичные корреляции слабой и средней силы с возрастом, уровнем глюкозы в крови и степенью стеноза сонных артерий (Таблица 8).

Таблица 8. Значимые корреляции уровня метилирования в ЛПК CpG-сайтов региона, включающего CpG-островок гена *MIR127*, с некоторыми патогенетически значимыми признаками атеросклероза

Показатель	chr14:101,349,561	chr14:101,349,606	chr14:101,349,655	chr14:101,349,731	chr14:101,349,742	chr14:101,349,823	chr14:101,349,856
Возраст пациента (лет)	—	—	rho=-0,465 p=0,008	—	—	—	rho=0,334 p=0,019
Уровень глюкозы сыворотки крови (ммоль/л)	rho=0,316 p=0,032	rho=-0,305 p=0,039	—	—	—	—	—
Степень стеноза сонной артерии (%)	—	—	—	rho=0,465 p=0,001	rho=0,385 p=0,023	rho=-0,319 p=0,035	—

Как и в случае АСБ и гистологической нестабильности, ни для одного из признаков не определяется устойчивых закономерностей метилирования, которые бы наблюдались по всему исследованному региону гена *MIR127* или на протяжении нескольких последовательных CpG-сайтов. Кроме того, полученные корреляции также оказались разнонаправленными: с уровнем глюкозы крови прямо коррелировал уровень метилирования chr14:101,349,561, но обратно — chr14:101,349,606 (Таблица 8). С возрастом пациента выявлена обратная корреляция для уровня метилирования chr14:101,349,655 и прямая — для chr14:101,349,854 (Таблица 8). Со степенью стеноза сонной артерии прямо коррелировал уровень метилирования двух CpG-сайтов: chr14:101,349,731 и chr14:101,349,742, и обратно — CpG-сайта chr14:101,349,823 (Таблица 8). Перечисленные CpG-сайты не обладают какими-либо особенностями локализации, которые позволили бы объяснить разнонаправленность корреляций: все они находятся в CpG-островке (chr14:101,349,373-101,349,860), но за пределами гена *MIR127* (chr14:101,349,316-101,349,412). Среди перечисленных CpG-сайтов, chr14:101,349,561 показал отрицательную корреляцию с количеством нейтрофилов в поле зрения при гистологическом анализе атеросклеротической бляшки. В то же время, ни одна из корреляций, показанных для ЛПК пациентов с атеросклерозом не подтверждается для контрольной группы ($p>0,084$).

Результаты данного исследования дополняют известные литературные данные о вариабельности метилирования *MIR127* между разными сосудами. В частности, обнаружено гиперметилирование региона, включающего CpG-островок и ген *MIR127*, в сонных артериях (пораженных и непораженных атеросклерозом). В исследовании атеросклеротических бляшек

бедренных артерий, по сравнению с интактными внутренними грудными артериями было выявлено напротив, гипометилирование региона, 14q32, включающего ген *MIR127* [Aavik E. et al., 2014]. В другом исследовании, показавшем ассоциацию метилирования ДНК в тканях сосудов с их патологическими изменениями [Goossens E.A.C. et al., 2019], анализ метилирования региона 14q32 проводился в артериях и венах нижних конечностей, больших подкожных венах и внутренних грудных артериях, но не в сонных артериях. Кроме того, регионы, проанализированные Goossens с соавт. (2019) также отличались по расположению от области, проанализированной в данном диссертационном исследовании, что делает невозможным сравнение данных по метилированию региона 14q32.

Изучение метилирования гена *MIR127* также проводится при онкологических заболеваниях. В статьях Е. А. Филипповой с соавт. (2017) и Е. В. Прониной с соавт. (2017) методом метил-специфичной ПЦР показано, что в опухолевых тканях молочной железы CpG-островки гена *MIR127* в области chr14:101,348,632-101,348,812 метилирован с частотой 26-30% по сравнению с ~1% частотой метилирования в прилежащих нормальных тканях молочной железы [Филиппова Е. А. с соавт., 2017; Pronina I. V. et al., 2017]. Ещё в одном исследовании того же коллектива авторов методом количественной реал-тайм ПЦР показано значительное повышение уровня метилирования той же области chr14:101,348,632-101,348,812 в опухолевой ткани яичника по сравнению с прилежащей нормальной тканью, где метилирование не превышает 20%. При метастазировании опухоли уровень метилирования вышеупомянутого региона повышался ещё значительно, составляя 50-100% [Loginov V. I. et al., 2022]. Низкий базовый уровень метилирования в области гена *MIR127* и значительное гиперметилирование при патологии противоречат результатам, полученным в данном диссертационном исследовании, однако в вышеперечисленных работах рассматривался соседний CpG-островок по отношению к проанализированному в данном исследовании (chr14:101,349,259-101,349,884).

Интересные результаты получены в исследовании W. Tan с соавт. (2015), проведённом при немелкоклеточном раке лёгких методом количественной реал-тайм ПЦР. Для участка chr14:101,349,002-101,349,097, который расположен относительно недалеко от региона chr14:101,349,259-101,349,884, проанализированного в данном диссертационном исследовании, показан уровень метилирования, превышающий 80%, в нормальных тканях лёгкого [Tan W. et al., 2015], что согласуется с высоким уровнем метилирования во всех нормальных тканях сосудов и в лейкоцитах, продемонстрированным в данном исследовании. Снижение уровня метилирования в области гена *MIR127*, причём в пределах региона chr14:101,349,340-101,349,695, полностью входящего в пределы проанализированной в данном диссертационном исследовании последовательности, показано для плоскоклеточного рака полости рта по сравнению с прилежащими нормальными тканями. При этом в прилежащем эпителии, а также

в эпителиальной и стромальной ткани полости рта здоровых доноров, уровень метилирования в области гена *MIR127* превышал 80% [Wiklund E. D. et al., 2011].

Как можно заметить, литературные данные об уровне метилирования региона, включающего CpG-островок и ген *MIR127*, при патологии достаточно разнородны, поэтому новые исследования вносят дополнительный вклад в накопление информации для выяснения возможных закономерностей изменения его уровня метилирования. Таким образом, в данном исследовании показан высокий (>80%) уровень метилирования региона (40 CpG-сайтов), включающего CpG-островок и ген *MIR127*, в тканях сосудов и лейкоцитах периферической крови. Не выявлено статистически значимых различий по уровню метилирования ДНК в проанализированном регионе как между сонными артериями, поражёнными и непоражёнными атеросклерозом, так и между лейкоцитами периферической крови пациентов с атеросклерозом и контрольной группы индивидов без признаков сердечно-сосудистых заболеваний. Однако наиболее высокий уровень метилирования анализируемого региона среди всех исследованных тканей зарегистрирован в больших подкожных венах (95,4 [95,1; 96,5]%), которые не подвержены атеросклеротическому поражению.

Для 7 из 40 CpG-сайтов наблюдается повышение уровня метилирования в поражённых атеросклерозом сонных артериях при наличии у пациента ОНМК в анамнезе, и для двух из этих CpG-сайтов (chr14:101,349,509 и chr14:101,349,515) отмечена отрицательная корреляция с толщиной фиброзной покрышки и размером ядра атеросклеротической бляшки. В то же время, корреляции уровня метилирования исследуемого региона в АСБ с её гистологическими показателями нестабильности единичны, как и корреляции уровня метилирования в ЛПК пациентов с атеросклерозом с патогенетически значимыми признаками. Только для CpG-сайта chr14:101,349,561 показана корреляция как в АСБ с гистологическим показателем (количество нейтрофилов в поле зрения, обратная), так и в ЛПК с клиническими признаками (уровень глюкозы сыворотки крови, прямая).

Несмотря на возможную перспективность анализа метилирования региона, включающего CpG-островок и «тела» ген *MIR127*, при атеросклерозе и его осложнениях, сложность применения такого подхода заключается в малой разнице по уровню метилирования между исследованными группами. Так, максимальная разница по метилированию CpG-сайтов исследованного региона при сравнении пациентов с наличием и отсутствием ОНМК не превышала 7%. Кроме того, подобные различия выявлены в труднодоступных для анализа тканях сонных артерий, а в лейкоцитах периферической крови разница по уровню метилирования наблюдалась лишь для одного CpG-сайта исследованного региона и составила всего 2%. Для решения вопроса о связи уровня метилирования CpG-островка и «тела» гена *MIR127* в сосудах и ЛПК с риском развития ОНМК необходимы дополнительные исследования с использованием больших по размеру выборок и функциональные работы на культурах клеток.

3.1.5 Анализ уровня метилирования гена *MIR143*

Ген *MIR143* расположен в локусе 5q32 в гене длинной некодирующей РНК *CARMN* в области chr5:148,808,545-148,808,784 (сборка генома GRCh37/hg19) [<http://genome-euro.ucsc.edu>]. Данные о наличии собственного промотора гена *MIR143* единичны и большее число исследований указывает, что экспрессия miR-143 регулируется промотором гена *MIR143HG (CARMN)*, который приходится на область chr5:148,786,424-148,786,453 [Blick C. et al., 2015; Deng L. et al., 2015; Zhang H.P. et al., 2016; de Rie D. et al., 2017; Riches K. et al., 2017; Zhao K. et al., 2017]. Локализация и эпигенетический контекст гена *MIR143* приведены на Рисунке В5 (Приложение В).

Для анализа уровня метилирования при атеросклерозе в данном исследовании были выбраны два региона гена *MIR143*: промоторный регион гена-хозяина *MIR143HG (CARMN)* — chr5:148,786,304-148,786,864 (561 п.н.), а также частично область «тела» гена *MIR143* — chr5:148,808,001-148,808,583 (583 п.н.).

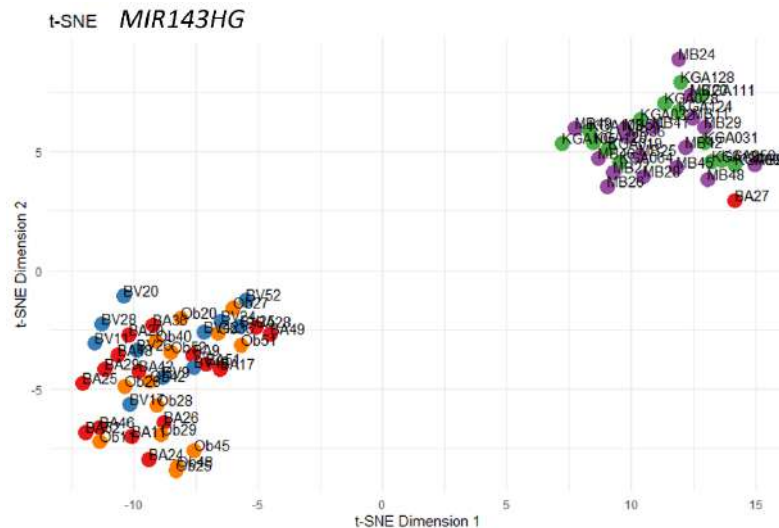
3.1.5.1 Предполагаемый промоторный регион *MIR143HG (CARMN)*

Анализ метилирования предполагаемого промоторного региона *MIR143HG (CARMN)* проведён для 19 пациентов с атеросклерозом сонных артерий и 14 индивидов контрольной группы. Подробное описание выборок приведено в подразделе «2.2. Характеристика включенных в исследование выборок» и Таблице А3 (Приложение А). Морфологически атеросклеротические бляшки сонных артерий (n=57) охарактеризованы в Таблице А4 (Приложение А).

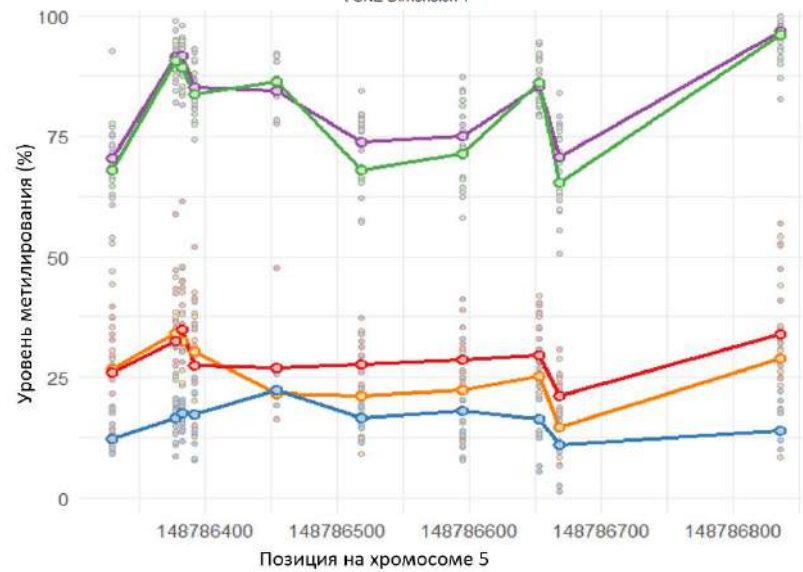
По результатам таргетного бисульфитного секвенирования получены данные о метилировании 10 CpG-сайтов в предполагаемом промоторном регионе *MIR143HG (CARMN)* для 14 образцов АСБ, 17 образцов непораженных сонных артерий, 11 образцов больших подкожных вен, 17 образцов лейкоцитов периферической крови пациентов с атеросклерозом и 14 образцов лейкоцитов периферической крови контрольной группы. Полученные результаты анализа уровня метилирования 10 CpG-сайтов в области гена *MIR143HG (CARMN)* в сосудах и лейкоцитах крови приведены в Таблице Г7 (Приложение Г).

В результате tSNE-анализа выявлено, что образцы кровеносных сосудов (артерий и вен), за исключением единичных случаев, кластеризуются отдельно от образцов лейкоцитов крови (Рисунок 29 А). По профилю метилирования ДНК АСБ расположены в одной группе с интактными кровеносными сосудами, а лейкоциты крови пациентов сгруппированы с лейкоцитами крови здоровых индивидов. Таким образом, существует выраженная тканеспецифичность метилирования данного региона для кровеносных сосудов и лейкоцитов крови.

А



Б



В

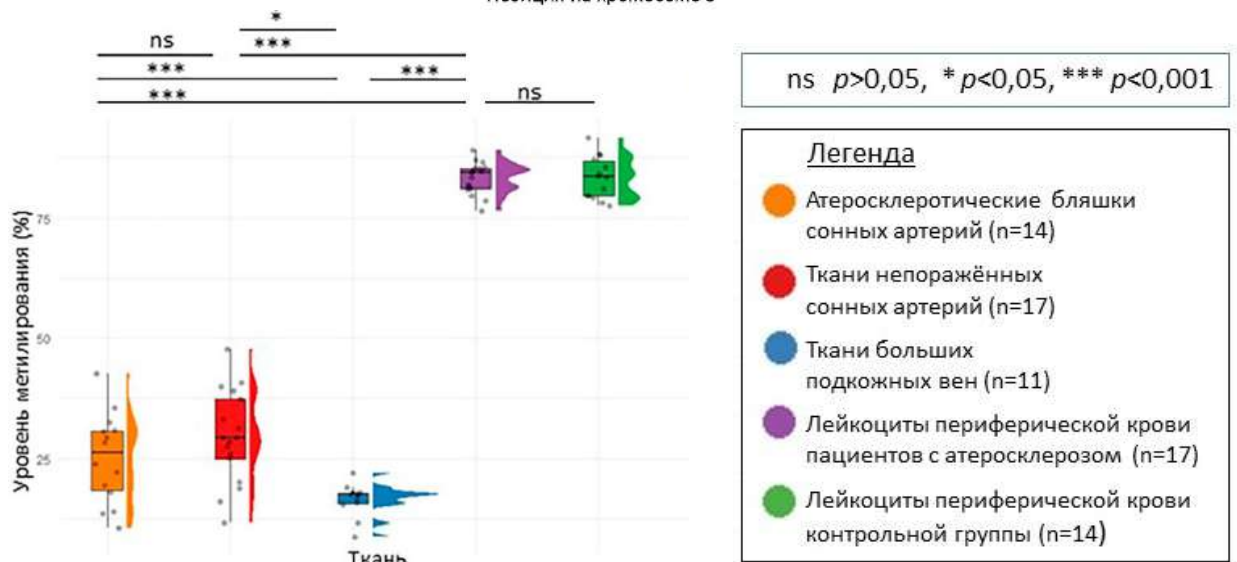


Рисунок 29. Анализ уровня метилирования предполагаемого промоторного региона *MIR143HG* (*CARMN*). (А) Взаимное расположение и кластеризация сосудов и лейкоцитов крови (по методу tSNE) в зависимости от профилей метилирования CpG-сайтов в области предполагаемого промоторного региона гена *MIR143HG*. (Б) Профиль метилирования и (В) медианный уровень метилирования CpG-сайтов в области предполагаемого промоторного региона гена *MIR143HG* в сосудах и лейкоцитах крови.

Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Значимых отличий уровня метилирования предполагаемого промоторного региона гена *MIR143HG* между поражёнными и интактными сонными артериями не выявлено (26,0 [18,4; 30,6]% против 29,3 [25,0; 37,4]%, $p=0,262$; Рисунок 29 В). Только для одного CpG-сайта (из 10 CpG-сайтов исследованного региона), chr5:148,786,595, установлено значимое снижение уровня метилирования в АСБ сонных артерий (22,3 [13,6; 26,4]%) по сравнению с непоражёнными тканями (28,6 [24,0; 33,7]%; $p=0,017$). Погрешность измерения метилирования ДНК в поражённых и непоражённых артериях для предполагаемого промоторного региона гена *MIR143HG* составила $\pm 6,1\%$, что меньше уровня наблюдаемых различий (6,3%).

Уровень метилирования предполагаемого промоторного региона гена *MIR143HG* в венах (17,4 [15,6; 17,7]%) снижен по сравнению с артериями вне зависимости от их поражения атеросклерозом ($p<0,011$; Рисунок 29 Б, В), и наблюдаемые различия ($>8,6\%$) превышают погрешность измерения метилирования ДНК в венах, которая составила $\pm 8,3\%$.

Среди образцов АСБ, для которых получены данные по уровню метилирования исследуемого региона, гистологический анализ был проведен лишь для 5 образцов, что недостаточно для формирования групп сравнения, поэтому анализ связи уровня метилирования промоторного региона гена *MIR143HG* с гистологическими параметрами АСБ не проводился. Также не был выполнен и анализ связи уровня метилирования с ОНМК, поскольку среди пациентов с атеросклерозом только у 2 человек были отмечены ОНМК в анамнезе.

Погрешность измерения метилирования ДНК в лейкоцитах составляет $\pm 7,7\%$. Уровень метилирования предполагаемого промоторного региона гена *MIR143HG* (*CARMN*) в лейкоцитах (вне зависимости от наличия заболевания у обследуемого) значимо выше ($p<0,001$), чем в тканях сосудов, при этом отличий между лейкоцитами пациентов с атеросклерозом и лейкоцитами контрольной группы не наблюдается (84,4 [81,1; 85,2]% против 83,5 [79,5; 86,7]%, $p=0,891$; Рисунок 29 Б, В). Различия не достигли статистической значимости ни по одному из 10 CpG-сайтов исследованного региона ($p=0,891$).

При анализе ассоциаций уровня метилирования CpG-сайтов в области предполагаемого промоторного региона гена *MIR143HG* (*CARMN*) в ЛПК пациентов с атеросклерозом с клиническими показателями выявлены единичные значимые корреляции отдельных CpG-сайтов с уровнем триглицеридов сыворотки крови (Рисунок 30 А, Б) и степенью стеноза сонных артерий (Рисунок 30 В, Г). При этом для CpG-сайта chr5:148,786,518 отмечена отрицательная корреляция как с уровнем триглицеридов ($\rho = -0,886$, $p=0,019$; Рисунок 30 Б), так и со степенью стеноза сонных артерий ($\rho = -0,764$, $p=0,046$; Рисунок 30 В).

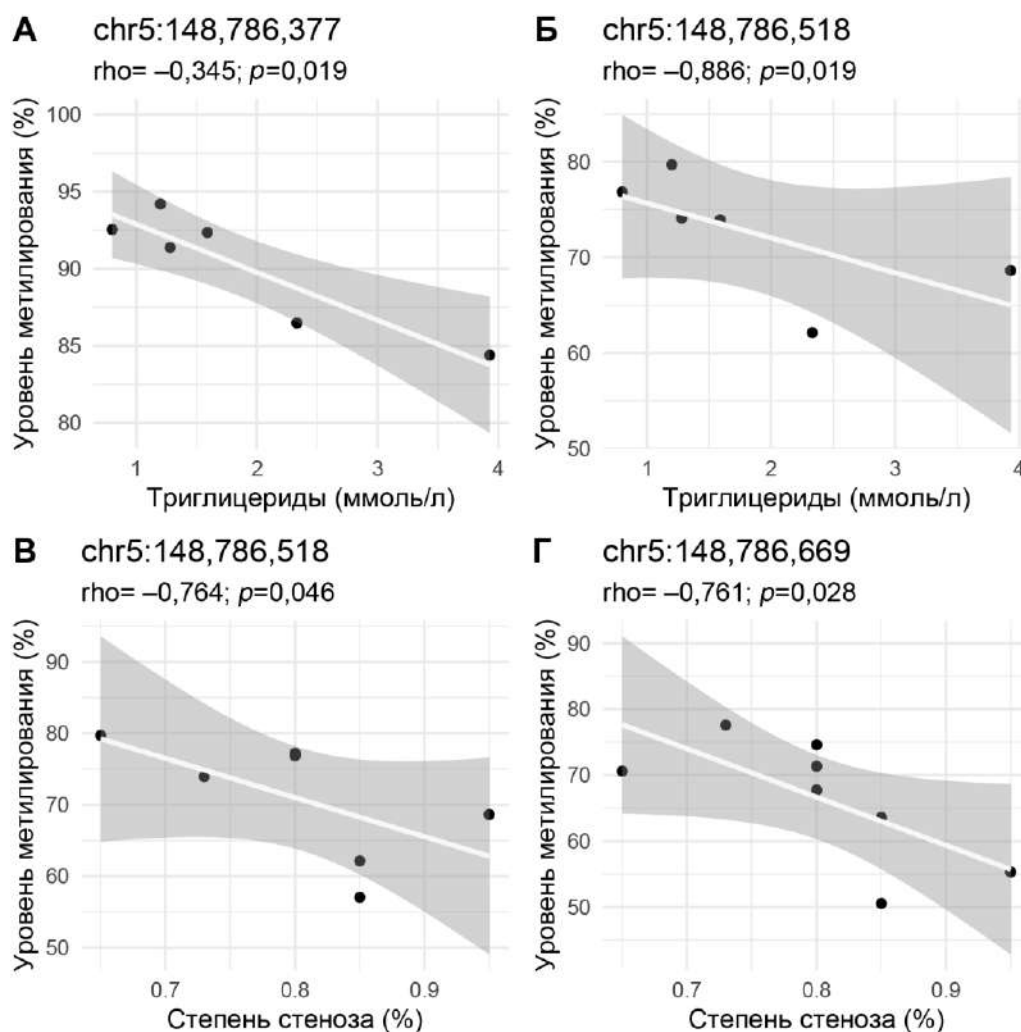


Рисунок 30. Значимые корреляции уровня метилирования CpG-сайтов предполагаемого промоторного региона *MIR143HG* (*CARMN*) в ЛПК пациентов с атеросклерозом: chr5:148,786,377 с уровнем триглицеридов сыворотки крови (А), chr5:148,786,518 с уровнем триглицеридов сыворотки крови (Б) и степенью стеноза сонных артерий (В); chr5:148,786,669 со степенью стеноза сонных артерий (Г).

В целом, о наблюдаемых корреляциях следует говорить с осторожностью. Во-первых, клинические данные были собраны для малого числа пациентов (для 6 пациентов известен уровень триглицеридов и для 9 – степень стеноза). Во-вторых, показатели липидного обмена у пациентов были проанализированы однократно при поступлении, то есть для подтверждения ассоциации с уровнем триглицеридов сыворотки крови требуется проспективное клиническое исследование. Кроме того, все 6 пациентов, у которых был измерен уровень триглицеридов, принимали статины, что влияет на уровень липидов крови. В заключение, в контрольной группе не отмечено значимых корреляций CpG-сайтов chr5:148,786,377 и chr5:148,786,518 с показателями липидного обмена (стеноз сонных артерий в контрольной группе не превышал 45%).

3.1.5.2 «Тело» гена *MIR143*

Анализ метилирования данного региона проведён для 20 пациентов с атеросклерозом сонных артерий и 18 индивидов контрольной группы. По результатам таргетного бисульфитного секвенирования региона «тела» гена *MIR143* получены данные о метилировании 5 CpG-сайтов для 20 образцов АСБ, 18 образцов непораженных сонных артерий, 15 образцов больших подкожных вен, 19 образцов лейкоцитов периферической крови пациентов с атеросклерозом и 18 образцов лейкоцитов периферической крови контрольной группы. Полученные результаты анализа уровня метилирования 5 CpG-сайтов в области «тела» гена *MIR143* в сосудах и лейкоцитах крови приведены в Таблице Г8 (Приложение Г).

В результате tSNE-анализа установлено, что образцы кровеносных сосудов (артерий и вен) кластеризуются отдельно от образцов лейкоцитов крови (Рисунок 31 А). По профилю метилирования ДНК сонные артерии, поражённые атеросклерозом, группируются с интактными кровеносными сосудами, а лейкоциты крови пациентов — с лейкоцитами крови здоровых индивидов. Следовательно, и в данном исследованном регионе наблюдается выраженная тканеспецифичность метилирования в отношении тканей кровеносных сосудов и лейкоцитов крови.

Погрешность измерения метилирования ДНК в поражённых и непоражённых артериях для «тела» гена *MIR143* составила $\pm 4,7\%$, в венах $\pm 4,0\%$. В поражённых артериях по сравнению с интактными сонными артериями наблюдается статистически значимое снижение уровня метилирования региона «тела» гена *MIR143* (67,8 [61,7; 72,0]% против 74,8 [66,9; 78,1]%, $p=0,019$) (Рисунок 31 Б, В). В то же время уровень метилирования данного региона в венах повышен (82,2 [80,1; 83,3]%) по сравнению с артериями, как поражёнными ($p<0,001$), так и непоражёнными атеросклерозом ($p=0,003$). Наблюдаемые различия ($>7,0\%$) превышают погрешность измерения метилирования в соответствующих тканях.

Поскольку гистологическое исследование было проведено лишь для 5 образцов АСБ, анализ связи уровня метилирования региона «тела» гена *MIR143* с гистологическими параметрами АСБ не проводился. Также только у 2 пациентов с атеросклерозом в анамнезе отмечены ОНМК, поэтому не проводился и анализ связи уровня метилирования «тела» *MIR143* с наличием ОНМК.

Уровень метилирования «тела» гена *MIR143* в лейкоцитах (вне зависимости от наличия заболевания) значимо ниже ($p<0,001$), чем в тканях сосудов, при этом отличий между лейкоцитами пациентов с атеросклерозом и лейкоцитами контрольной группы не наблюдается (27,5 [21,4; 32,5]% против 27,7 [21,9; 33,0]%, $p=0,999$). Погрешность измерения метилирования ДНК в лейкоцитах для исследуемого региона составила $\pm 4,4\%$.

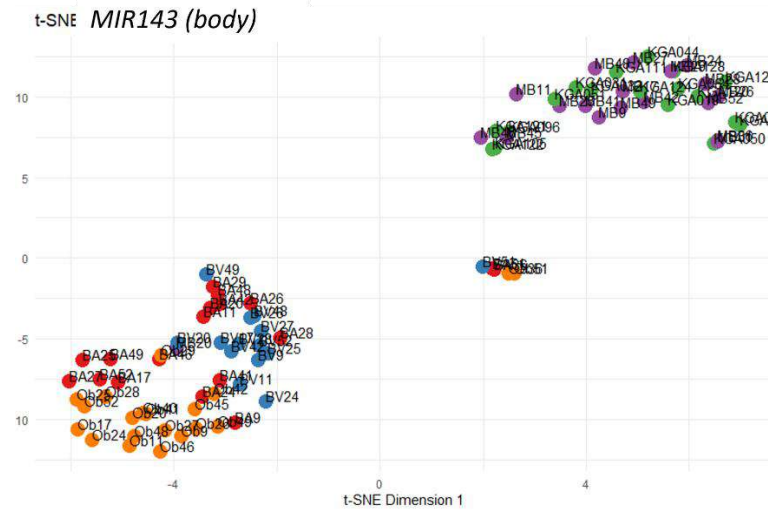
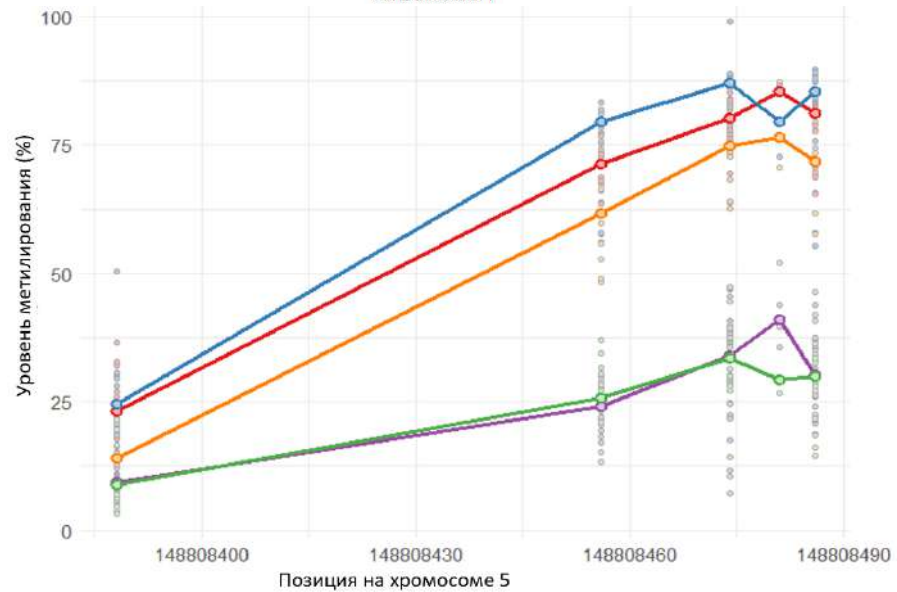
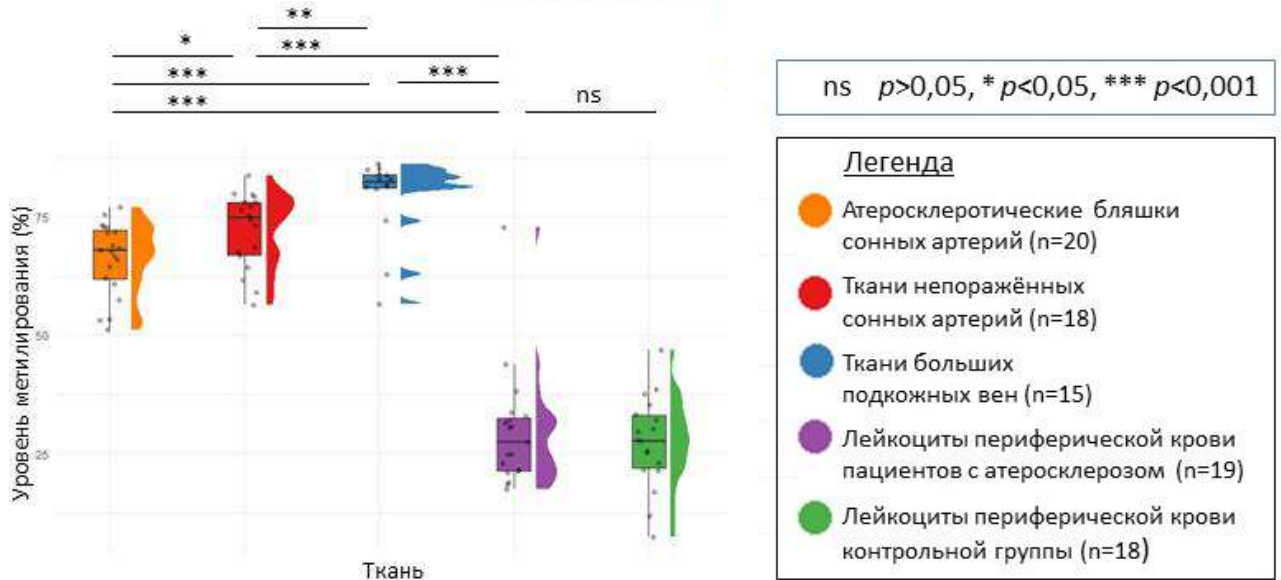
А**Б****В**

Рисунок 31. Анализ уровня метилирования «тела» гена *MIR143*. (А) Взаимное расположение и кластеризация сосудов и лейкоцитов крови (по методу tSNE) в зависимости от профилей метилирования CpG-сайтов в области «тела» гена *MIR143*. (Б) Профиль метилирования и (В) медианный уровень метилирования CpG-сайтов в области «тела» гена *MIR143* в сосудах и лейкоцитах крови. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Наблюдаемые на Рисунке 31 Б отклонения в рисунке метилирования по сайту chr5:148,808,481 (4й CpG-сайт исследованного региона) объяснимы тем, что по данному сайту во многих образцах тканей не была достигнута удовлетворительная глубина прочтений при секвенировании и такие образцы были исключены из статистического анализа.

При анализе ассоциаций уровня метилирования CpG-сайтов в области «тела» гена *MIR143* в ЛПК пациентов с атеросклерозом с клиническими показателями выявлены значимые корреляции отдельных CpG-сайтов: отрицательная корреляция с возрастом и положительные корреляции с показателями липидного обмена и со степенью стеноза сонных артерий (Рисунок 32 А-Ж).

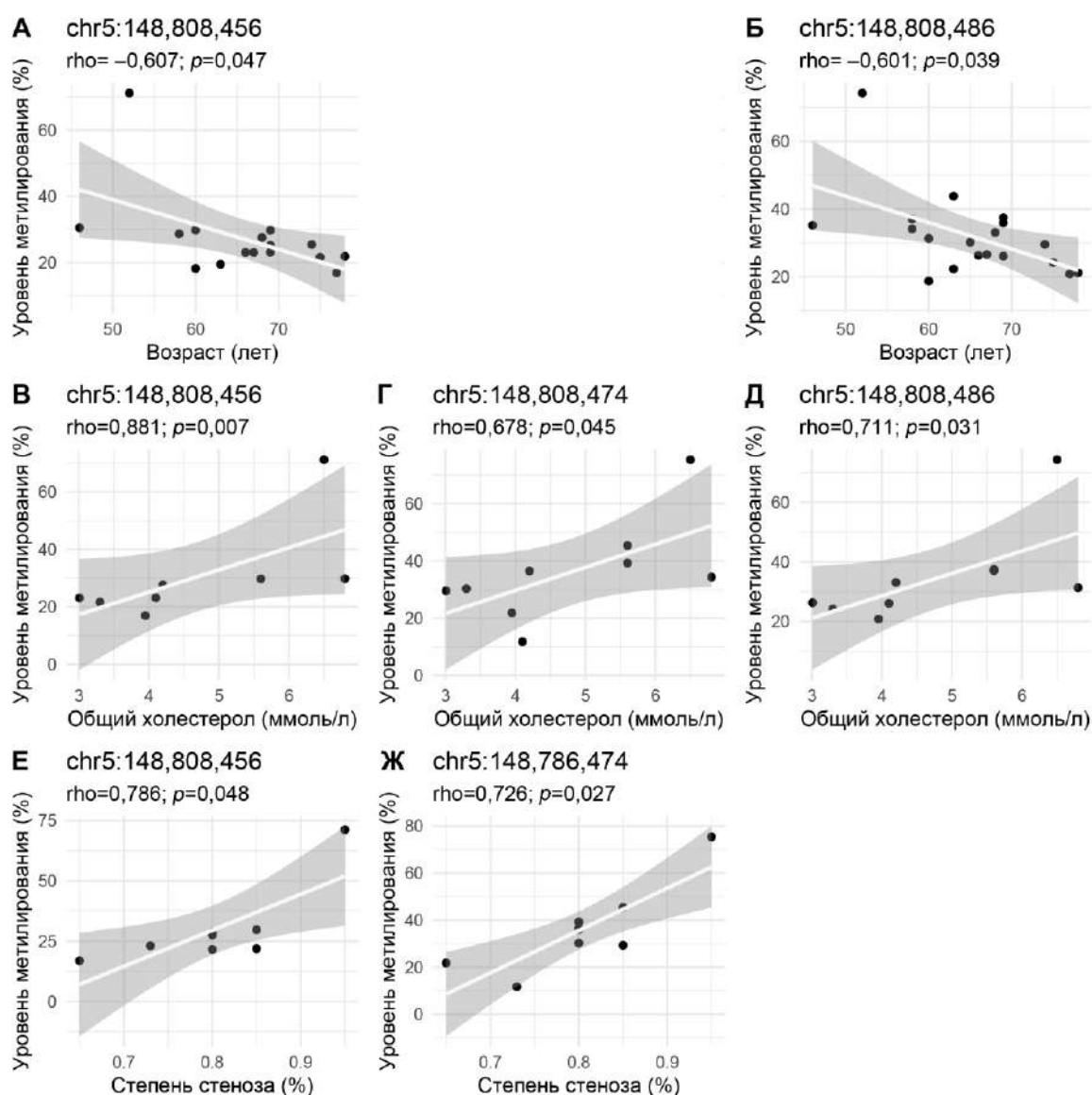


Рисунок 32. Значимые корреляции уровня метилирования CpG-сайтов в области «тела» гена *MIR143* в ЛПК пациентов с атеросклерозом: с возрастом пациентов коррелирует уровень метилирования chr5:148,808,456 и chr5:148,808,486 (А, Б), с уровнем общего холестерина сыворотки крови — chr5:148,808,456, chr5:148,808,474 и chr5:148,808,486 (В, Г, Д), с уровнем липопротеинов низкой плотности сыворотки крови — chr5:148,808,456 (Е), со степенью стеноза сонных артерий — chr5:148,808,474 (Ж).

С наибольшим числом показателей коррелировал уровень метилирования CpG-сайта chr5:148,808,456: с возрастом ($\rho = -0,607$, $p = 0,047$; Рисунок 32 А), уровнем общего холестерина ($\rho = 0,881$, $p = 0,007$; Рисунок 32 В) и уровнем липопротеинов низкой плотности сыворотки крови ($\rho = 0,786$, $p = 0,048$; Рисунок 32 Е). По два признака коррелировали с уровнем метилирования CpG-сайта chr5:148,808,474 — уровень общего холестерина ($\rho = 0,678$, $p = 0,045$; Рисунок 32 Г) и степень стеноза сонных артерий ($\rho = 0,726$, $p = 0,027$; Рисунок 32 Ж), и CpG-сайта chr5:148,808,486 — возраст ($\rho = -0,601$, $p = 0,039$; Рисунок 32 Б) и уровень общего холестерина ($\rho = 0,711$, $p = 0,031$; Рисунок 32 Д).

Однако малое количество пациентов, для которых были собраны клинические данные (для 7 пациентов известен уровень ЛПНП, для 9 пациентов — уровень холестерина и для 11 — возраст и степень стеноза артерий), а также однократность проведённого анализа показателей липидного обмена у пациентов и факт приёма статинов всеми пациентами, для которых исследован уровень метилирования, не позволяют однозначно подтвердить наблюдаемые корреляции. Таким образом, с уверенностью можно говорить только об отрицательной корреляции уровня метилирования chr5:148,808,456 и chr5:148,808,486 с возрастом. Однако в контрольной группе не отмечено значимых корреляций вышеупомянутых CpG-сайтов ни с возрастом, ни с показателями липидного обмена (стеноз сонных артерий в контрольной группе не превышал 45%).

В целом для обоих исследованных регионов гена *MIR143* наблюдается явная тканеспецифичность, хотя по региону *MIR143HG (CARMN)* уровень метилирования в лейкоцитах выше, чем в тканях сосудов, а по региону, включающему «тело» гена *MIR143* — ниже. Полученные в данном диссертационном исследовании результаты по метилированию генов *MIR143HG* и *MIR143* в тканях сосудов и лейкоцитах периферической крови в целом согласуются с результатами полногеномных микрочиповых исследований (Рисунок 33, слева) [Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021], хотя сопоставление данных осложняется тем, что предполагаемый промоторный регион гена *MIR143HG (CARMN)* содержит только один CpG-сайт, аннотированный на микрочипах, cg01558401 (chr5:148,786,377).

Для уровня метилирования cg01558401 предполагаемого промоторного региона гена *MIR143HG (CARMN)* в данном диссертационном исследовании отмечены очень близкие значения в атеросклеротических бляшках сонных артерий (34,1 [21,0; 37,4]%) и непоражённых артериях (32,6 [25,5; 38,0]%), разница по уровню метилирования не достигла статистической значимости, $p = 0,854$. В то же время уровень метилирования по сайту cg01558401 оказался значимо выше в атеросклеротических бляшках сонных артерий (34,1 [21,0; 37,4]%), чем в больших подкожных венах (16,7 [14,0; 18,9]%, $p = 0,001$).

В микрочиповых исследованиях при сравнении уровня метилирования между тканями сосудов, для cg01558401 региона *MIR143HG* выявлен наивысший уровень метилирования в АСБ

сонных артерий (55,1 [47,9; 54,4]%) и повышение уровня метилирования в АСБ аорты (23,2 [19,2; 22,7]%) по сравнению с непораженной тканью аорты (16,7 [14,0; 18,9]%, $p < 0,001$) [Zaina S. et al., 2015], а также не достигшее статистической значимости ($p = 0,127$) повышение уровня метилирования в АСБ сонных артерий (45,5 [31,3; 58,7]%) относительно непоражённых внутренних грудных артерий (26,6 [20,1; 34,0]%), несмотря на достаточно большую величину различий между тканями (Рисунок 33, слева) [Li J. et al., 2021]. Для «тела» гена *MIR143* паттерн изменяется на противоположный: уровень метилирования в АСБ снижается относительно непоражённых тканей сосудов (Рисунок 33, справа) [Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

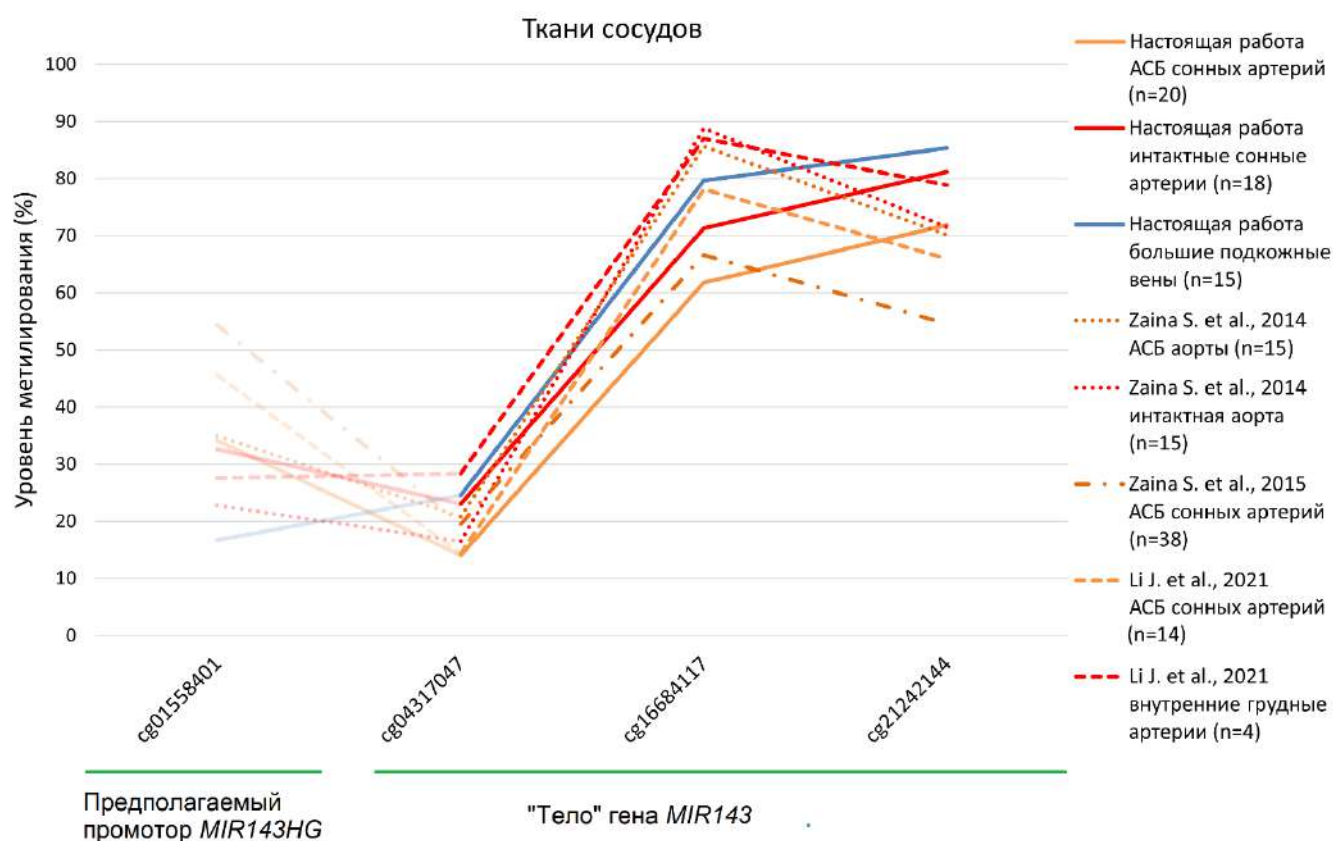


Рисунок 33. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов в области предполагаемого промотора и «тела» гена *MIR143* в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах различной локализации [настоящее исследование; Zaina S. et al., 2014; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

В лейкоцитах периферической крови рисунок метилирования обоих исследованных регионов соответствует результатам полногеномных микрочиповых исследований (Рисунок 34) [Istas G. et al., 2017; Soriano-Tárraga C. et al., 2018]. Незначительное отклонение паттерна для результатов данного диссертационного исследования наблюдается для третьего CpG-сайта «тела» гена *MIR143*, однако значения уровня метилирования не выходят за пределы установленных в микрочиповых исследованиях.

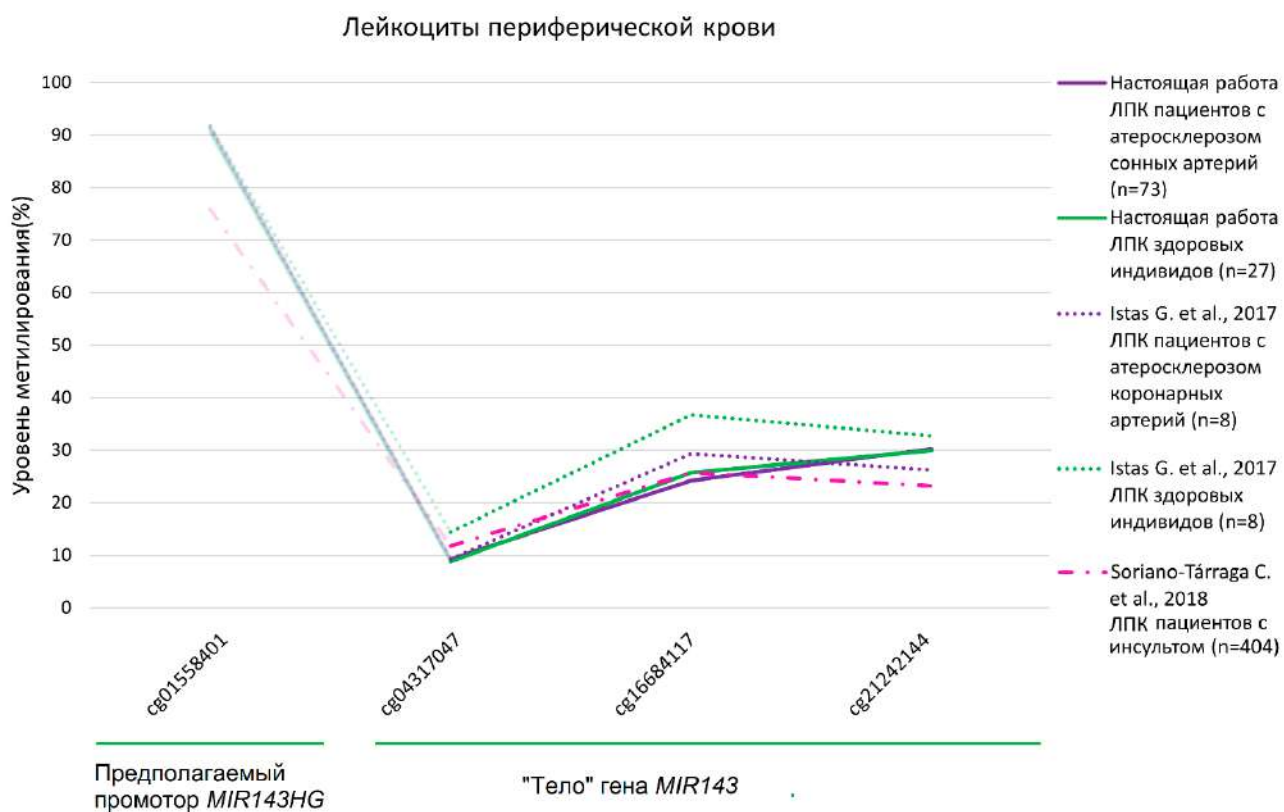


Рисунок 34. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов в области предполагаемого промотора и «тела» гена *MIR143* в лейкоцитах периферической крови пациентов с атеросклерозом сонных и коронарных артерий, инсультом, а также индивидов контрольной группы [настоящее исследование; Istas G. et al., 2017; Soriano-Tárraga C. et al., 2018].

Из-за недостаточного для формирования группы сравнения количества пациентов с ОНМК в анамнезе в данном исследовании, уровень и рисунок метилирования CpG-сайтов в области предполагаемого промотора и «тела» гена *MIR143* в атеросклеротических бляшках сонных артерий пациентов можно сопоставить только между микрочиповыми данными [Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021]. На Рисунке 35 можно заметить общее сходство паттерна метилирования ДНК как в асимптоматических, так и в симптоматических бляшках в обоих исследованиях. Однако для cg01558401 региона *MIR143HG* в исследовании J. Li с соавт. (2021) наблюдается значимое снижение уровня метилирования в симптоматических АСБ сонных артерий (30,7 [27,4; 29,0]%) по сравнению с асимптоматическими АСБ сонных артерий (56,1 [49,6; 55,6]%, $p < 0,001$) и данными S. Zaina с соавт. (2015).

В области «тела» гена *MIR143* между данными различных исследований наблюдаются расхождения. Если в работе J. Li с соавт. (2021) уровень метилирования в симптоматических АСБ повышен относительно асимптоматических, причём по сайтам cg16684117 и cg21242144 (3й и 4й сайт на графике) различия достигают статистической значимости ($p < 0,001$), то у S. Zaina с соавт. (2015) наблюдается незначимое снижение уровня метилирования в симптоматических АСБ относительно асимптоматических ($p > 0,369$) (Рисунок 35) [Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021]. Таким образом, уровень и рисунок метилирования CpG-сайтов в области предполагаемого промотора и «тела» гена *MIR143* изменяется в атеросклеротических бляшках сонных артерий пациентов в зависимости от ОНМК в анамнезе.

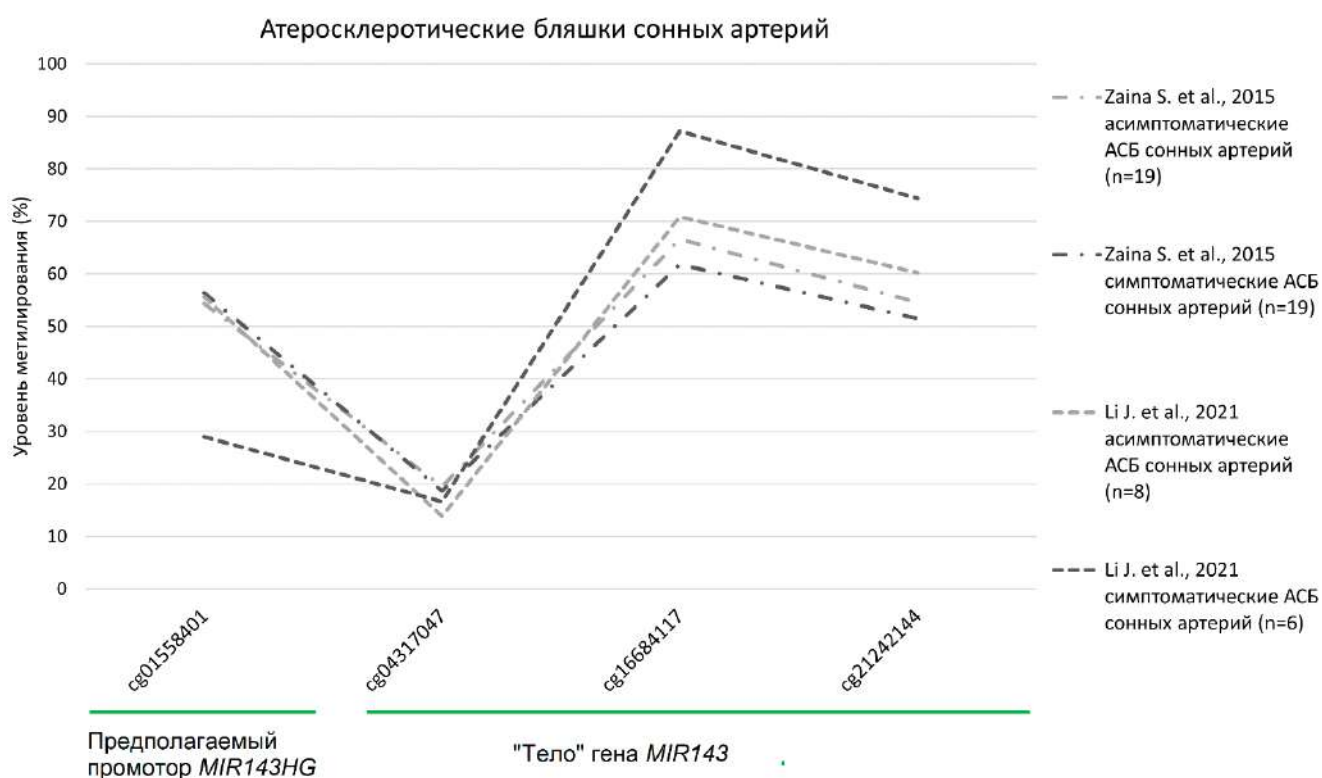


Рисунок 35. Сравнение уровня и рисунка метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов в области предполагаемого промотора и «тела» гена *MIR143* в атеросклеротических бляшках сонных артерий пациентов в зависимости от ОНМК в анамнезе [Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021].

Работы, связанные с анализом уровня метилирования предполагаемого промоторного региона и «тела» гена *MIR143* при различных патологиях, ограничены. В исследовании уровня метилирования как промотора, так и «тела» гена *MIR143*, методом пиросеквенирования в ГМК больших подкожных вен в зависимости от наличия у пациентов сахарного диабета 2 типа – фактора риска атеросклероза, различия не достигли статистической значимости ($p > 0,13$) [Riches K. et al., 2017]. В исследованиях уровня метилирования «тела» гена *MIR143* при онкологических заболеваниях преимущественно выявляется отсутствие статистически значимых различий между

опухолевой тканью и прилежащими неизменёнными тканями. Так, статистической значимости не достигло выявленное методом бисульфитного секвенирования повышение уровня метилирования в опухолевой ткани толстого кишечника по участку chr5:148,808,325-148,808,512, полностью входящему в проанализированный регион «тела» гена *MIR143* (73,8% в опухоли и 67,7% в неопухолевой ткани, $p=0.29$) [Pekow J. et al., 2015].

В исследовании рака мочевого пузыря методом пиросеквенирования также не установлено статистически значимых различий по уровню метилирования всех трёх аннотированных на микрочипах CpG-сайтов в области «тела» гена *MIR143* между опухолевой тканью и прилежащим неизменённым эпителием [Pilala K. M. et al., 2017]. Интересно, что в этом исследовании уровень метилирования cg04317047 был заметно ниже (~25%), чем cg16684117 и cg21242144 (~75%) — сходный рисунок по этим CpG-сайтам наблюдается и для тканей сосудов в данном диссертационном исследовании.

Таким образом, в результате настоящего исследования выявлена тканеспецифичность метилирования гена *MIR143*: предполагаемого промоторного региона *MIR143HG (CARMN)* (10 CpG-сайтов) и «тела» гена *MIR143* (5 CpG-сайтов). При этом уровень метилирования предполагаемого промоторного региона *MIR143HG (CARMN)* в тканях сосудов снижен по сравнению с лейкоцитами, независимо от типа сосудов и наличия атеросклеротического поражения, а уровень метилирования «тела» гена *MIR143* в тканях сосудов по сравнению с лейкоцитами, наоборот, повышен.

Полученные в данном диссертационном исследовании результаты показывают, что сниженный уровень метилирования в области «тела» гена *MIR143* связан с подверженностью сонной артерии к развитию атеросклероза. Не выявлено статистически значимых различий по уровню метилирования ДНК предполагаемого промоторного региона *MIR143HG (CARMN)* между сонными артериями, поражёнными и непоражёнными атеросклерозом, а также в обоих регионах гена *MIR143* между лейкоцитами периферической крови пациентов с атеросклерозом и контрольной группы индивидов без признаков сердечно-сосудистых заболеваний. Однако, уровень и рисунок метилирования CpG-сайтов в области предполагаемого промотора и «тела» гена *MIR143* изменяется в атеросклеротических бляшках сонных артерий пациентов в зависимости от ОНМК в анамнезе.

Выявлены единичные значимые корреляции уровня метилирования отдельных CpG-сайтов обоих регионов гена *MIR143* в лейкоцитах пациентов с возрастом, показателями липидного обмена и со степенью стеноза сонных артерий. В частности, CpG-сайт chr5:148,808,456 отрицательно коррелирует с возрастом пациента ($\rho=-0,61$; $p=0,047$), но положительно с уровнем общего холестерина и с уровнем липопротеинов низкой плотности сыворотки крови ($\rho=0,88$; $p=0,007$; $\rho=0,79$; $p=0,048$).

3.2 Сравнительный анализ уровня метилирования CpG-сайтов широкого спектра генов микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий в зависимости от степени их нестабильности с помощью метилочипов Illumina

В 2021 г. исследователи из Китая Li Jingjin с соавт. проанализировали на микрочипах Infinium Methylation 450K и MethylationEPIC BeadChip (он же Methylation850 Beadchip) метилирование ДНК в образцах сосудов, полученных от 18 мужчин в результате оперативного вмешательства [Li J. et al., 2021]. Нестабильными считались атеросклеротические бляшки сонных артерий (АСБ) пациентов (n=6), перенесших острое сердечно-сосудистое событие (инсульт, транзиторная ишемическая атака) в течение 6 месяцев до операции, стабильными – АСБ пациентов без инсульта в анамнезе (n=8). В данной работе нестабильность АСБ у симптоматических пациентов (и стабильность – у пациентов без инсульта в анамнезе) подтверждена гистологически. В качестве контроля использованы образцы тканей левой внутренней грудной артерии (ВГА, n=4), практически непоражаемой атеросклерозом, взятые у пациентов в результате аортокоронарного шунтирования. Все три группы сравнения были сопоставимы по основным клиническим параметрам: пол, возраст, факторы риска ССЗ и лекарственная терапия [Li J. et al., 2021].

Данные работы Li Jingjin с соавт. были загружены из электронного хранилища Gene Expression Omnibus (GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>), идентификационный номер GSE149759. На первом этапе работы проведена деконволюция клеточного состава сосудов с использованием биоинформатического алгоритма NEpiDISH [Zheng S.C. et al. 2021; Teschendorff and, Zheng, 2020] и ранее разработанного референса, адаптированного для стенки артерии, который ключал набор CpG-сайтов, индекс метилирования которых специфичен для эндотелиальных клеток (GSE84395, GSE122126, GSE82234, GSE40699), фибробластов (GSE40699), ГМК (GSE40699, GSE113061, PMID: 24282625, ENCSR420WUN) и иммунных клеток (GSE35069) [Зарубин А., 2022].

В результате использования разработанного алгоритма деконволюции клеточного состава выявлено, что существенную долю клеток в артериях составляют ГМК (21-84%) и лейкоцитарный компонент (9-65%), а ЭК сосудов (6-18%) и фибробласты (0-2%) представлены минорно (Рисунок 36). Из лейкоцитов существенную долю занимают моноциты (3-47%). Атеросклеротические бляшки сонных артерий, независимо от степени их стабильности, по сравнению с интактными ВГА характеризовались меньшим процентом ЭК (6-14% против 12-18%, $p=0,04$), но более высокой биоинформатически прогнозируемой долей моноцитов (6-47% против 3-7%, $p=0,01$), при этом в стабильных АСБ доля моноцитов была выше (25-47%), чем в нестабильных АСБ (6-14%, $p=0,001$). Также в нестабильных АСБ биоинформатически

не выявлено наличия фибробластов. Прогнозируемые доли других клеточных компонент, таких как Т-лимфоциты, нейтрофилы и эозинофилы, значимо не различались между группами.

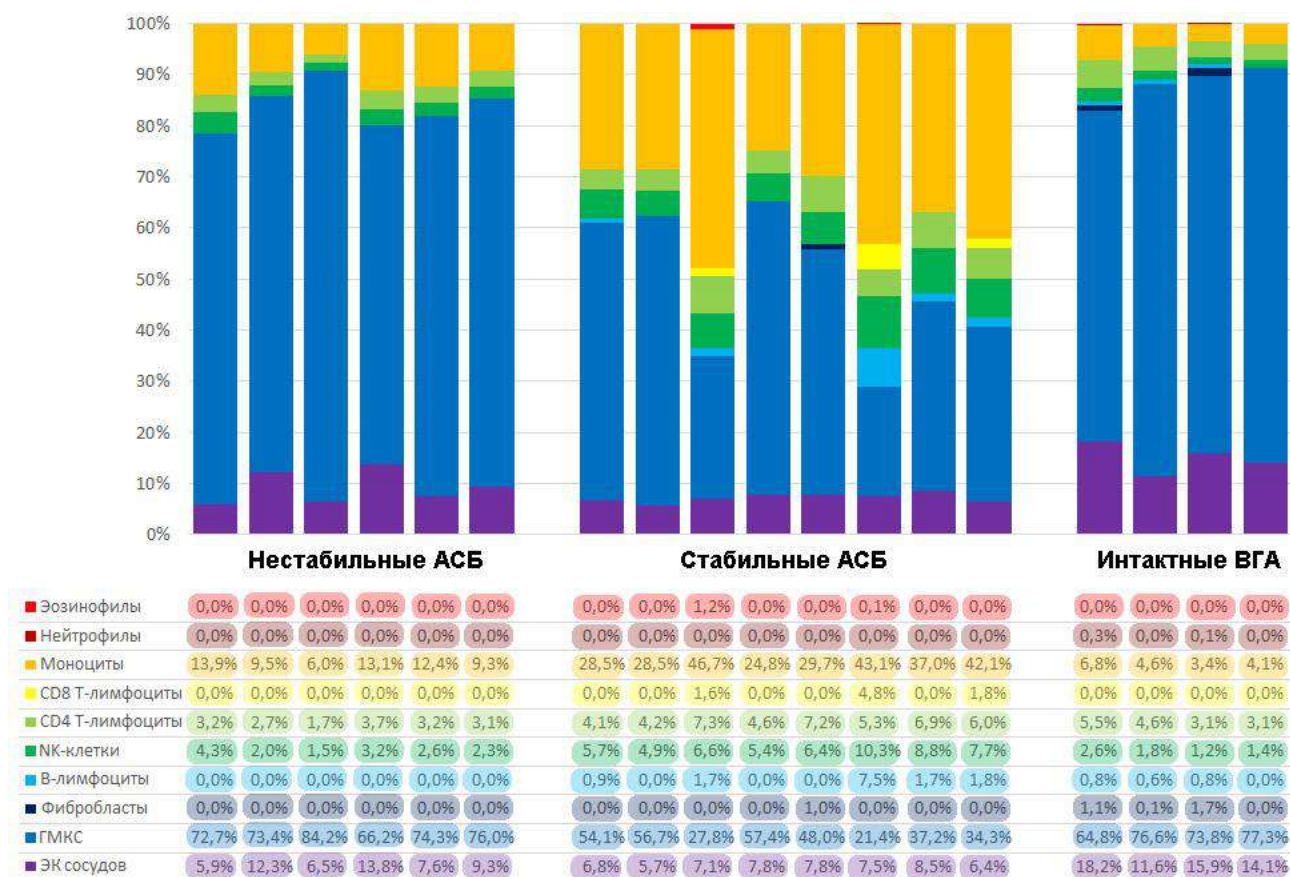


Рисунок 36. Относительные доли клеток в образцах атеросклеротических бляшек (АСБ) и интактных внутренних грудных артерий (ВГА),

определённые на основании алгоритма деконволюции клеточного состава.

Примечание: ГМКС - гладкомышечные клетки сосудов, ЭК - эндотелиальные клетки.

Для трех групп сравнения (Таблица 9) проводился анализ уровня метилирования CpG-сайтов (β) с поправкой на множественную проверку гипотез (FDR). Для дальнейшего анализа были выбраны CpG-сайты со значимыми отличиями по уровню метилирования ($|\Delta\beta| > 0,20$ и $FDR < 0,05$). Для данных CpG-сайтов проведен более детальный анализ и далее по тексту они обозначаются как «дифференциально метилированные CpG-сайты» (ДМС). Принадлежность CpG-сайтов к области микроРНК оценивалась согласно аннотации производителя метилочипа «Infinium MethylationEPIC BeadChip» [<https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/downloads/productfiles/methylationepic/MethylationEPIC%20v2%20Files.zip>]. Данные о CpG-сайтах генов микроРНК также были дополнены информацией о регуляторных элементах генов микроРНК (точка старта транскрипции (TSS), промоторный регион – в пределах 3 тыс.п.н. в 5'-направлении и 500 п.н. в 3'-направлении от TSS (границы выбраны согласно публикации [Marsico A. et al., 2013; Huan T. et al., 2020]), типичный энхансер (TE) и супер-

энхансер (SE)), полученных экспериментально для клеток крови и артерий, согласно базе TRmir (<http://bio.liclab.net/trmir/index.html>; дата обращения: 6.08.2023 года) [Gao Y. et al., 2022].

Поскольку клеточный состав тканей является значимым фактором для определения ДМС [Houseman et al., 2015; Houseman et al., 2016], при анализе данных проводилась биоинформатическая деконволюция тканей сосудов и вводилась поправка на клеточный состав.

Всего дифференциально метилированными между нестабильными и стабильными АСБ оказались 700 CpG-сайтов (Таблица 9). При этом согласно аннотации Illumina, для 148 ДМС в регионе их локализации находились гены микроРНК. Кроме того, 85, 339 и 270 ДМС локализовались в области промоторных регионов, типичных энхансеров (ТЕ) или супер-энхансеров (SE) генов микроРНК в клетках крови и артерий, согласно базе данных TRmir. При сравнении нестабильных АСБ с интактными ВГА получено 260 ДМС, из них 95, 13, 103 и 75 CpG-сайтов принадлежали к генам микроРНК и/или их регуляторным элементам (Таблица 9). Однако при введении поправки на клеточный состав артерий выявлены различия в уровне метилирования 111, 53, 3, 34 и 30 CpG-сайтов между нестабильными АСБ и интактными ВГА (Таблица 9). В нестабильных АСБ по сравнению со стабильными АСБ и интактными ВГА гипометилированные CpG-сайты составляли больший процент из всех ДМС генов микроРНК (76-87%) и/или их регуляторных элементов (59-93%) (Таблица 9).

Таблица 9. Общее количество дифференциально метилированных CpG-сайтов, в том числе в области генов микроРНК, между атеросклеротическими бляшками сонных артерий (нестабильные, стабильные) и интактными внутренними грудными артериями

Исследование GSE149759 [Li J. et al., 2021])		Количество дифференциально-метилированных CpG-сайтов ($ \Delta\beta > 0,20$, FDR $< 0,05$) всего / в области генов микроРНК по Illumina / промоторный регион по TRmir / ТЕ по TRmir / SE по TRmir	
		без поправки на клеточный состав	с поправкой на клеточный состав
Нестабильные АСБ сонных артерий (n=6) vs стабильные АСБ сонных артерий (n=8)	Всего	700 / 148 / 85 / 339 / 270	0
	Гипер-	239 / 35 / 18 / 124 / 111	0
	Гипо-	461 / 113 / 67 / 215 / 159	0
Нестабильные АСБ сонных артерий (n=6) vs интактные ВГА (n=4)	Всего	260 / 95 / 13 / 103 / 75	111 / 53 / 3 / 34 / 30
	Гипер-	63 / 13 / 1 / 20 / 20	19 / 5 / 0 / 4 / 8
	Гипо-	197 / 82 / 12 / 83 / 55	92 / 48 / 3 / 30 / 22
Стабильные АСБ сонных артерий (n=8) vs интактные ВГА (n=4)	Всего	916 / 225 / 114 / 425 / 335	20 / 0 / 0 / 8 / 9
	Гипер-	526 / 123 / 74 / 245 / 196	3 / 0 / 0 / 1 / 1
	Гипо-	390 / 102 / 40 / 180 / 139	17 / 0 / 0 / 7 / 8

Примечание: ТЕ - типичный энхансер, SE - супер-энхансер.

При сравнении ДМС генов микроРНК и/или их регуляторных элементов между атеросклеротическими бляшками сонных артерий (нестабильные, стабильные) и интактными внутренними грудными артериями выделено 44 общих CpG-сайта, из которых 19 представляли собой ДМС при введении поправки на клеточный состав (Таблица 10).

Таблица 10. CpG-сайты генов микроРНК и/или их регуляторных элементов, показавшие наибольшие различия по уровню метилирования между нестабильными, стабильными атеросклеротическими бляшками сонных артерий и интактными внутренними грудными артериями (для CpG-сайтов с $|\Delta\beta| > 0,20$, FDR < 0,05)

№	CpG-сайт	FDR	β нестабильная АСБ / стабильная АСБ / ВГА	$\Delta\beta$ нестабильная-стабильная АСБ	$\Delta\beta$ нестабильная АСБ-ВГА	Ген (микроРНК)
1	cg00006626	0,00021	0,54 / 0,75 / 0,83	-0,22	-0,29	NUP210L (miR-5698; miR-190b)
2	cg03352427	0,00023	0,45 / 0,74 / 0,72	-0,29	-0,27	
3	cg17167920	0,00021	0,42 / 0,73 / 0,76	-0,30	-0,34	
4	cg23236366	0,00055	0,42 / 0,67 / 0,75	-0,25	-0,33	NAV1, MIR1231 [#] (miR-1231)
5	cg10539122	0,00030	0,46 / 0,69 / 0,75	-0,23	-0,29	MIR29B2CHG (miR-29b-2; miR-29c)
6	cg22714290	0,00035	0,27 / 0,62 / 0,51	-0,34	-0,23	
7	cg22793142	0,00057	0,28 / 0,53 / 0,55	-0,24	-0,27	FOXP1, MIR1284 [#] (miR-1284)
8	cg07475026	0,00094	0,50 / 0,72 / 0,72	-0,22	-0,23	MIR548G, CMSS1, FILIP1L (miR-3921)
9	cg21589858	0,00137	0,47 / 0,67 / 0,67	-0,20	-0,20	FKBP5, MIR5690 [#] (miR-5690)
10	cg07061368	0,00132	0,28 / 0,61 / 0,57	-0,33	-0,29	MIR4462 [#] (miR-4462)
11	cg08766762	0,00024	0,28 / 0,56 / 0,71	-0,28	-0,43	DST (miR-548u)
12	cg00136547	0,00523	0,22 / 0,48 / 0,57	-0,26	-0,35	RGS22 (miR-1273a)
13	cg06569139	0,00031	0,37 / 0,65 / 0,70	-0,27	-0,33	
14	cg09093858	0,00030	0,35 / 0,64 / 0,58	-0,28	-0,23	
15	cg18061197	0,00260	0,16 / 0,42 / 0,42	-0,26	-0,25	CSMD3, MIR2053 [#] (miR-2053)
16	cg15943335	0,00033	0,23 / 0,51 / 0,51	-0,28	-0,28	
17	cg22679949	0,00062	0,37 / 0,59 / 0,74	-0,22	-0,37	AOPEP (C9orf3), MIR23B [#] , MIR3074 [#] (miR-23b/27b/24-1)
18	cg20355301	0,00025	0,28 / 0,57 / 0,54	-0,29	-0,26	
19	cg09951047	0,00035	0,38 / 0,69 / 0,88	-0,31	-0,51	
20	cg13972491	0,00065	0,40 / 0,65 / 0,66	-0,25	-0,26	MIR100HG [#] , MIR125B1 [#] (miR-125b-1; miR-100; let-7a-2)
21	cg05678526	0,00119	0,30 / 0,64 / 0,59	-0,34	-0,29	
22	cg27212940	0,00116	0,50 / 0,73 / 0,76	-0,23	-0,26	
23	cg07986666	0,00043	0,53 / 0,77 / 0,79	-0,24	-0,27	KRT8 (miR-6757)
24	cg03600605	0,00089	0,56 / 0,77 / 0,94	-0,21	-0,38	
25	cg09972881	0,00041	0,55 / 0,76 / 0,87	-0,21	-0,32	
26	cg21340733	0,00057	0,40 / 0,67 / 0,65	-0,27	-0,25	
27	cg20324165	0,00190	0,42 / 0,65 / 0,63	-0,23	-0,21	

Продолжение Таблицы 10. CpG-сайты генов микроРНК и/или их регуляторных элементов, показавшие наибольшие различия по уровню метилирования между нестабильными, стабильными атеросклеротическими бляшками сонных артерий и интактными внутренними грудными артериями (для CpG-сайтов с $|\Delta\beta| > 0,20$, FDR < 0,05)

№	CpG-сайт	FDR	β нестабильная АСБ / стабильная АСБ / ВГА	$\Delta\beta$ нестабильная- стабильная АСБ	$\Delta\beta$ нестабильная АСБ-ВГА	Ген (микроРНК)
28	cg18087803	0,00047	0,28 / 0,50 / 0,59	-0,22	-0,31	MED13L, MIR620 [#] (miR-620)
29	cg09230679	0,00094	0,26 / 0,50 / 0,55	-0,24	-0,29	
30	cg04565201	0,00042	0,23 / 0,51 / 0,44	-0,28	-0,21	MIR759 [#] (miR-759)
31	cg14983771	0,00078	0,50 / 0,75 / 0,77	-0,25	-0,26	(miR-5586)
32	cg27026695	0,00084	0,27 / 0,62 / 0,52	-0,34	-0,24	HSPA2 (miR-548h-1)
33	cg11134801	0,00033	0,53 / 0,73 / 0,93	-0,20	-0,41	MIR377 [#] (miR-377)
34	cg21190038	0,00035	0,31 / 0,61 / 0,54	-0,30	-0,23	SERF2, SERINC4, MIR1282 [#] (miR-1282)
35	cg22271113	0,00041	0,48 / 0,71 / 0,83	-0,23	-0,35	NDEL1 (miR-3183)
36	cg12403329	0,00052	0,52 / 0,78 / 0,85	-0,26	-0,32	
37	cg10432569	0,00350	0,24 / 0,48 / 0,60	-0,24	-0,36	MIR196A1 [#] (miR-196a-1)
38	cg11201447	0,00302	0,69 / 0,48 / 0,93	0,22	-0,24	PVT1, MIR1204 [#] (miR-1204)
39	cg13309012	0,00059	0,45 / 0,24 / 0,80	0,21	-0,35	MIR155HG (miR-155)
40	cg27278086	0,00809	0,66 / 0,44 / 0,37	0,22	0,29	ARHGAP25 (miR-3126)
41	cg15361661	0,00290	0,68 / 0,43 / 0,38	0,25	0,30	ARHGAP25 (miR-3128)
42	cg26238936	0,00449	0,74 / 0,48 / 0,46	0,26	0,28	ARHGAP25 (miR-3129)
43	cg08991742	0,00280	0,68 / 0,45 / 0,47	0,23	0,21	ARHGAP25 (miR-3127)
44	cg25898146	0,00910	0,74 / 0,54 / 0,50	0,20	0,24	(miR-7160)

Примечание: [#] обозначает расположение CpG-сайта в пределах промоторного региона указанного гена микроРНК. Жирным шрифтом выделены дифференциально метилированные CpG-сайты при введении поправки на клеточный состав. Градиентом серого цвета выделены CpG-сайты, входящие в CpG-остров (темно-серый), «CpG-берег» и «CpG-шelf» (светло-серый) соответственно.

Из 44 CpG-сайтов 37 (18 из 19 при введении поправки на клеточный состав) были гипометилированы в нестабильных атеросклеротических бляшках по сравнению как со стабильными АСБ сонных артерий, так и с интактными внутренними грудными артериями, 5 – гиперметилированы в нестабильных АСБ по сравнению с другими тканями, а 2 CpG-сайта (cg11201447 и cg13309012) в нестабильных АСБ были гиперметилированы по сравнению со стабильными АСБ сонных артерий, но гипометилированы по сравнению с интактными внутренними грудными артериями. В этой группе лишь cg13309012 представлял ДМС при

введении поправки на клеточный состав. Непосредственно в CpG-островке располагается один CpG-сайт (cg09951047, находящийся в 3 п.н. в 5'-направлении от TSS гена *MIR24-1* и в 70 п.н. в 3'-направлении от TSS гена *MIR3074*; Таблица 10). Пять CpG-сайтов находятся в пределах «CpG-берега» (± 2 тыс.п.н. от CpG-островка) и один – в «CpG-шельфе» (± 4 тыс.п.н. от CpG-островка).

Из 44 CpG-сайтов 34 находятся в «теле» генов – 17 белок-кодирующих генов, одной некодирующей РНК (*PVT1*) и 7 микроРНК. При этом на один ген может приходиться несколько CpG-сайтов – например, *KRT8* включает 5 сайтов (Таблица 10), а один CpG-сайт может находиться в нуклеотидной последовательности нескольких генов – так, cg21589858 приходится на белок-кодирующие гены *CMSS1*, *FILIP1L* и ген микроРНК *MIR548G*. 18 CpG-сайтов находятся в пределах промоторных регионов 15 генов микроРНК. При этом для трёх генов микроРНК (*MIR620*, *MIR1231*, *MIR2053*) в непосредственной близости от TSS, ± 500 п.н., находятся по два CpG-сайта. Рядом с TSS более чем одного гена микроРНК расположены также 3 CpG-сайта – cg20355301, cg09951047 и cg13972491 (*MIR24-1* и *MIR3074*). В полученном списке ДМС генов микроРНК выделяются три кластера, локализованных в локусах 1q32.2 (кластер miR-29b-2: miR-29b-2, miR-29c), 9q22.32 (кластер miR-6081: miR-6081, miR-23b, miR-27b, miR-3074, miR-24-1) и 11q24.1 (кластер miR-100: miR-100, miR-125b-1, let-7a-2).

CpG-сайты cg09951047 и cg10432569 были дифференциально метилированы при сравнении двух групп атеросклеротических бляшек сонных артерий с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией ($\Delta\beta=0,21$ и $0,24$ соответственно). Оба сайта характеризовались увеличением уровня метилирования в группе с высокой лейкоцитарной инфильтрацией [Зарубин, 2022]. Более того, в атеросклеротических бляшках аорты по сравнению с интактной ее частью ранее было показано гиперметилование регионов, в которые входили четыре CpG-сайта, гипометилированных в нестабильных АСБ – cg22793142 (miR-29b-2 и miR-29c), cg20355301 и cg09951047 (кластер miR-23b/27b/24-1) и cg27212940 (miR-125b-1; miR-100; let-7a-2) [Lacey et al., 2019].

В исследовании, проведённом Zaina S. с соавт. (Испания) [Zaina S. et al., 2015] при сравнении симптоматических АСБ (от пациентов, перенесших нарушение мозгового кровообращения, n=19) и асимптоматических АСБ (n=19) были выявлены 30 дифференциально метилированных CpG-сайтов. Исследование было проведено на микрочипе Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450k array; Illumina), позволяющем определить уровень метилирования более чем для 450000 CpG-сайтов, в том числе 3400 CpG-сайтов, расположенных в области 614 генов микроРНК, согласно аннотации производителя. Тем не менее, ни один из 30 ДМС, выявленных в исследовании Zaina S. с соавт. не приходился на область генов микроРНК,

либо их промоторный регион – в пределах 3 тыс. п.н. в 5'-направлении и 500 п.н. в 3'-направлении от TSS.

Анализ функционального обогащения микроРНК, в «телах» и/или регуляторных элементах которых выявлены 44 ДМС между АСБ и ВГА, проведён с помощью онлайн-инструмента TAM 2.0 [<http://www.lirned.com/tam2/>]. В результате обнаружена связь между четырьмя микроРНК (miR-29b-2, miR-29c, miR-125b-1 и miR-155) и транскрипционным фактором p53 (продукт гена *TP53*). Следует отметить, что в ЭК и ГМК транскрипционный фактор p53 может как влиять на экспрессию некоторых микроРНК, так и являться их мишенью, то есть в данном случае наблюдается взаимная регуляция [Bao M. et al., 2016; Haemmig and Feinberg, 2017]. Есть данные о том, что p53 вовлечен в ремоделирование сосудов, а также в осложненное течение атеросклеротического поражения артерий [Chan G.H. et al., 2022]. В модели на мышях линии apoE^{-/-} гиперэкспрессия p53 в клетках атеросклеротических бляшек была связана с апоптозом и большей частотой разрыва покрышки [von der Thüsen J.H. et al., 2002]. Также в ГМК мышей воздействие p53 приводило к развитию нестабильности атеросклеротических бляшек [Haemmig and Feinberg, 2017].

В то же время методом метил-специфичной ПЦР продемонстрировано, что метилированное состояние промотора *TP53* в лейкоцитах периферической крови пациентов, перенесших ишемический инсульт, связано с большей толщиной комплекса интима-медия сонных артерий, более тяжёлой степенью атеросклероза сонных артерий (по шкале Краузе, Crouse score) и повышенным уровнем гомоцистеина в периферической крови [Wei Y. et al., 2019]. В цитируемой работе предполагается, что гиперметилирование промотора *TP53* может снижать уровень экспрессии *TP53*, способствуя возникновению атеросклероза. Таким образом, данные о роли транскрипционного фактора p53 в развитии атеросклероза противоречивы, что может объясняться его различной ролью на разных стадиях атеросклероза, либо в различных клетках организма. Соответственно, различной, в том числе и способствующей дестабилизации атеросклеротических бляшек, может быть и роль микроРНК, мишенью либо регулятором которых выступает мРНК *TP53*, в том числе вышеупомянутых miR-29b-2, miR-29c, miR-125b-1 и miR-155.

Далее для генов-мишеней микроРНК, в «телах» и/или регуляторных элементах которых выявлены 44 ДМС между АСБ и ВГА, также был проведён анализ функционального обогащения. На первом этапе анализа в базе данных miRTarBase [mirtarbase.cuhk.edu.cn] выполнен поиск мишеней для микроРНК, представленных в Таблице 10. В результате для 20 микроРНК выявлено 204 мишени, подтверждённых с высоким уровнем доказательности (Validation with strong evidence) минимум в 2 публикациях. На втором этапе проведена функциональная аннотация белковых продуктов 204 мишеней микроРНК с помощью онлайн-инструмента Metascape [Zhou

et al., 2019]. Категории описываемых генов в терминах биологических процессов и молекулярных функций соответствуют классификатору базы данных Gene Ontology (GO), сигнальных и метаболических путей – KEGG.

По результатам анализа наиболее представленными оказались биологические процессы, которые, согласно базе данных Gene Ontology (GO), относят к трём крупным (родительским) категориям: регуляция биологических процессов (GO:0065007), процессы развития (GO:0032502) и ответ на эндогенные стимулы (GO:0009719).

Регуляция биологических процессов (GO:0065007) включает такие процессы как позитивная регуляция программируемой клеточной гибели (GO:0043068, $FDR = 2,56 \times 10^{-23}$), регуляция транскрипции микроРНК (GO:1902893, $FDR = 2,58 \times 10^{-23}$) и регуляция активности трансфераз (GO:0051338, $FDR = 1,19 \times 10^{-22}$).

К категории процессов развития (GO:0032502) относятся морфогенез трубчатых структур (GO:0035239, $FDR = 4,66 \times 10^{-28}$), развитие желёз (GO:0048732, $FDR = 1,30 \times 10^{-27}$), гемопоэз (GO:0030097, $FDR = 5,70 \times 10^{-26}$) и развитие сердца (GO:0007507, $FDR = 2,15 \times 10^{-23}$).

Такие категории, как негативная регуляция клеточной дифференцировки (GO:0045596, $FDR = 5,36 \times 10^{-30}$) и регуляция дифференцировки миелоидных клеток (GO:0045637, $FDR = 3,53 \times 10^{-22}$) входят в обе вышеупомянутые родительские категории, «регуляция биологических процессов» (GO:0065007) и «процессы развития» (GO:0032502).

Третья крупная категория, ответ на эндогенные стимулы (GO:0050896), включает ответ на фактор роста (GO:0070848, $FDR = 4,12 \times 10^{-28}$), клеточный ответ на азоторганические соединения (GO:0071417, $FDR = 4,70 \times 10^{-27}$) и ответ на уровень кислорода (GO:0070482, $FDR = 3,08 \times 10^{-22}$).

Практически все вышеописанные процессы в той или иной степени происходят при атерогенезе — в этом можно убедиться, рассмотрев дочерние категории процессов, согласно базе данных Gene Ontology (GO). Так, категория «негативная регуляция клеточной дифференцировки» включает дочернюю категорию «негативная регуляция дифференцировки макрофагов в пенистые клетки» (GO:0010745), морфогенез трубчатых структур — морфогенез кровеносных сосудов (GO:0048514) и т.д.

Согласно базе данных KEGG, наиболее значимыми молекулярными путями для мишеней микроРНК были пути при раке (hsa05200, $FDR = 4,31 \times 10^{-45}$), микроРНК при раке (hsa05206, $FDR = 4,63 \times 10^{-31}$), сигнальный путь AGE-RAGE при осложнениях диабета (hsa049330, $FDR = 4,99 \times 10^{-29}$), липиды и атеросклероз (hsa05417, $FDR = 8,34 \times 10^{-28}$) и сигнальный путь MAPK (hsa04010, $FDR = 1,88 \times 10^{-22}$) (Рисунок 37).

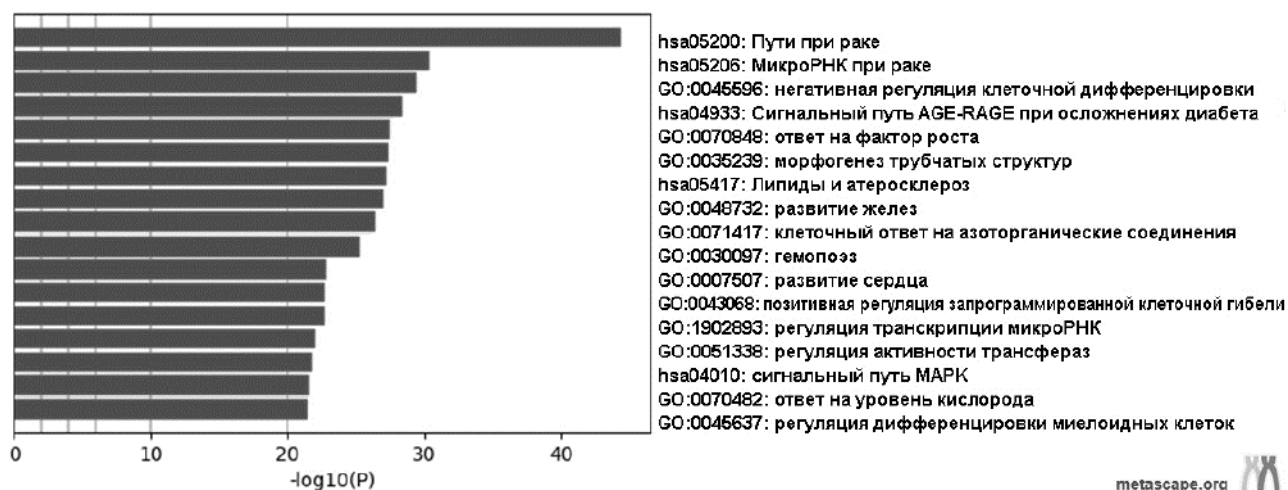


Рисунок 37. Биологические процессы и молекулярные функции наиболее представленные среди белковых продуктов 204 мишеней микроРНК, в «телах» и/или регуляторных регионах которых выявлены 44 ДМС между АСБ и ВГА.

Путь «липиды и атеросклероз» представляется наиболее очевидным для мишеней микроРНК, подвергающихся эпигенетической регуляции, в т.ч. посредством дифференциального метилирования генов и/или регуляторных элементов данных микроРНК. Однако в исследовании дифференциально экспрессирующихся микроРНК между уязвимыми АСБ ($n=3$) и стабильными АСБ сонных артерий ($n=3$) [Deng Y. et al., 2023] было показано также обогащение таких молекулярных путей, как пути при раке (hsa05200), микроРНК при раке (hsa05206), сигнальный путь AGE-RAGE при осложнениях диабета (hsa04933) и сигнальный путь MAPK (hsa04010). Более того, одним из наиболее представленных путей был hsa04115 (p53 signaling pathway), то есть путь с участием транскрипционного фактора p53, с которым взаимодействуют некоторые микроРНК, в генах и/или регуляторных элементах которых выявлены ДМС между АСБ и интактными ВГА. Кроме того, в исследовании Ying Deng с соавт. (2023) одной из наиболее представленных категорий была родительская категория «процессы развития» (GO:0032502), хотя её дочерние категории между упомянутым исследованием и данной работой не совпадали.

Всего Ying Deng с соавт. (2023) выявили 76 дифференциально экспрессирующихся микроРНК: экспрессия 53 из них была повышена в уязвимых АСБ по сравнению со стабильными, а экспрессия 23 микроРНК – снижена. Следовательно, большая часть микроРНК при нестабильности гиперэкспрессируется, что может быть связано с гипометилированием регуляторных элементов их генов. Однако для полученного списка микроРНК не обнаружено ни одного совпадения со списком микроРНК, гены и/или регуляторные элементы которых показали наибольшие различия по уровню метилирования ДНК между АСБ сонных артерий и интактными внутренними грудными артериями (Таблица 10). Среди микроРНК, рассмотренных в качестве генов-кандидатов для анализа регуляторных элементов в разделе 3.1, совпадение со списком микроРНК, приведённым в исследовании Ying Deng с соавт., было отмечено только для miR-10b-

3p и miR-10b-5p. Обе эти цепи микроРНК miR-10b в исследовании Ying Deng с соавт. (2023) демонстрировали повышенную экспрессию в уязвимых АСБ по сравнению со стабильными, однако при введении поправки на множественные сравнения различия становились незначимыми (FDR = 0,092 для miR-10b-3p и FDR = 0,190 для miR-10b-5p).

На следующем этапе работы с данными анализа функционального обогащения в онлайн-инструменте Metascape были извлечены все белок-белковые взаимодействия между продуктами генов-мишеней микроРНК и сформирована сеть взаимодействий. К данной сети был применен алгоритм MCODE для выявления областей, в которых белки имеют тесные связи. Для одной из таких областей с взаимодействиями между белками SPARC, COL3A1 и COL1A2, одним из определяющих терминов был «NABA CORE MATRISOME». Этот же термин был наиболее представленной категорией в анализе функционального обогащения дифференциально экспрессирующихся генов между АСБ с кровоизлияниями и АСБ, претерпевшими разрыв, в работе Zhu G. с соавт. [Zhu G. et al., 2023], где данные нескольких микрочиповых исследований транскриптома также были проанализированы с помощью инструмента Metascape.

При использовании онлайн инструмента DIANA-miRPath v4.0 [<http://62.217.122.229/app/miRPathv4>], который позволяет проводить поиск биологических путей для общих мишеней нескольких микроРНК в базах TarBase v9.0, TargetScan v8.0 и MirTarBase v9.0, выявлено, что белковые продукты мишеней 20 микроРНК, в «телах» и/или регуляторных элементах которых выявлены 44 ДМС между АСБ и ВГА, участвуют в таких процессах как пути при раке, протеогликаны при раке, убиквитин-опосредованный протеолиз, фокальная адгезия, регуляция транскрипции РНК-полимеразой II и важный для воспалительного процесса сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR (Таблица 11). Вовлеченность в нестабильность атеросклеротических бляшек сонных артерий данных биологических путей подтверждают исследования транскриптома и протеома [Jin H. et al., 2021; Qin W. et al., 2022; Deng Y. et al., 2023]. В частности, в исследовании Ying Deng с соавт. (2023), рассматривавшем дифференциально экспрессирующиеся микроРНК между уязвимыми АСБ (n=3) и стабильными АСБ сонных артерий (n=3) [Deng Y. et al., 2023] показано также обогащение таких молекулярных путей, как фокальная адгезия (hsa04510), пути при раке (hsa05200), протеогликаны при раке (hsa05205) и убиквитин-опосредованный протеолиз (hsa04120). Среди категорий Gene Ontology одной из наиболее представленных была категория «фосфорилирование белка» (GO:0006484) [Deng Y. et al., 2023].

Таблица 11. Биологические пути и процессы, наиболее представленные среди белковых продуктов генов-мишеней 20 микроРНК, в «телах» и/или регуляторных элементах которых выявлены 44 ДМС между АСБ и ВГА.

Биологический путь	Количество генов-мишеней (n) TarBase v9.0 / TargetScan v8.0 / MirTarBase v9.0	Количество микроРНК (n) TarBase v9.0 / TargetScan v8.0 / MirTarBase v9.0	p (FDR)
KEGG			
Фокальная адгезия	112 / 190 / 40	16 / 30 / 9	$< 2,85 \times 10^{-10}$
Пути при раке	230 / 490 / 83	21 / 30 / 11	$< 2,59 \times 10^{-11}$
Протеогликаны при раке	110 / 197 / 39	18 / 30 / 11	$< 4,88 \times 10^{-11}$
Убиквитин-опосредованный протеолиз	79 / 133 / –	15 / 29 / –	$< 6,00 \times 10^{-11}$
Сигнальный путь PI3K-Akt	– / 319 / 49	– / 30 / 9	$< 1,74 \times 10^{-11}$
Gene Ontology (GO)			
Положительная регуляция транскрипции РНК-полимеразой II	476 / 1089 / 476	20 / 30 / 20	$< 6,98 \times 10^{-19}$
Отрицательная регуляция транскрипции РНК-полимеразой II	383 / 775 / 383	19 / 30 / 19	$< 6,90 \times 10^{-26}$
Положительная регуляция транскрипции, опосредованная ДНК	283 / 5863 / 283	19 / 30 / 19	$< 1,62 \times 10^{-18}$
Фосфорилирование белка	268 / 568 / 269	19 / 30 / 19	$< 6,15 \times 10^{-15}$
Фосфорилирование	297 / 641 / 297	19 / 30 / 19	$< 5,26 \times 10^{-15}$
Фосфорилирование пептидил-серина	97 / – / 97	18 / – / 18	$3,93 \times 10^{-15}$
Клеточный цикл	288 / 596 / 288	20 / 30 / 20	$< 1,13 \times 10^{-17}$
Вирусные процессы	309 / – / 309	20 / – / 20	$1,32 \times 10^{-28}$
Транспорт белка	298 / – / 298	19 / – / 19	$6,08 \times 10^{-18}$
Организация хроматина	198 / – / 188	19 / – / 19	$8,34 \times 10^{-17}$

Таким образом, в данном диссертационном исследовании впервые выявлены CpG-сайты, дифференциально метилированные между гистологически нестабильными и стабильными АСБ сонных артерий, приходящиеся на область генов микроРНК и/или их регуляторных элементов (промоторный регион, типичный энхансер и супер-энхансер). При сравнении ДМС генов микроРНК и/или их регуляторных элементов между атеросклеротическими бляшками сонных артерий (нестабильные, стабильные) и интактными внутренними грудными артериями выделено 44 общих CpG-сайта, из которых 19 представляли собой ДМС при введении поправки на клеточный состав. Большая часть этих сайтов (37; 84%) гипометилирована в нестабильных АСБ по сравнению как со стабильными АСБ, так и с интактными ВГА.

Анализ функционального обогащения микроРНК, в генах и/или регуляторных элементах которых были выявлены 44 ДМС между АСБ и ВГА, выявил, что 4 микроРНК (miR-29b-2, -29c, -125b-1 и miR-155) взаимодействуют с транскрипционным фактором p53,

участвующим в развитии нестабильности атеросклеротической бляшки. Анализ функционального обогащения белковых продуктов мишеней микроРНК показал их участие в регуляции таких биологических процессов (по GO), как программируемая клеточная гибель и регуляция транскрипции, а также процессах развития, ответе на эндогенные стимулы, в молекулярных путях (по KEGG), связанных с метаболизмом липидов и атеросклерозом, организацией внеклеточного матрикса, фокальной адгезией, молекулярными путями при раке.

Существенную роль при формировании нестабильности АСБ играет клеточный состав артерий. ДМС не выявлено при сравнении нестабильных и стабильных АСБ при введении поправки на клеточный состав. По два и более гипометилированных CpG-сайта обнаружено в локусах *NUP210L* (miR-5698; miR-190b), *RGS22* (miR-1273a), а также в локусе, включающем ген *AOPEP* (*C9orf3*) и промоторы *MIR23B* и *MIR3074* (miR-23b/27b/24-1) в нестабильных АСБ по сравнению с интактными ВГА при учете клеточного состава.

3.3 Уровень метилирования CpG-сайтов генов микроРНК

и экспрессия данных молекул в атеросклеротических бляшках сонных артерий

Для анализа экспрессии зрелых микроРНК, оценки уровня метилирования в областях соответствующих им генов микроРНК и установления связи экспрессии микроРНК с метилированием ДНК, была сформирована выборка образцов сонных артерий, полученных у 16 пациентов. Подробное описание выборки и методы анализа приведены в подразделе «2.2. Характеристика включенных в исследование выборок», «2.5. Методы исследования для анализа экспрессии микроРНК» и в Таблице А1 (Приложение А). На этапе выделения РНК два образца показали неудовлетворительное качество, поэтому экспрессия зрелых микроРНК в клетках сонных артерий была проанализирована для 14 пациентов.

В результате высокопроизводительного секвенирования микроРНК на один образец в среднем приходилось 2,1-3,3 млн прочтений. На области генома, в которых расположены известные гены микроРНК, было выравнено от 165,5 тыс. до 7,7 млн. прочтений. Экспрессия на уровне больше 10 СРМ (количество прочтений данной микроРНК на миллион прочтений в образце) хотя бы в одном образце регистрировалась для 379 (20%) из 1917 известных микроРНК человека, описанных в базе miRbase v.22. В дальнейший анализ вошли микроРНК: а) рассмотренные в качестве генов-кандидатов для анализа регуляторных элементов в разделе 3.1 (miR-10b, miR-21, miR-100, miR-127 и miR-143/145); б) микроРНК, в генах и/или регуляторных элементах которых были выявлены ДМС между атеросклеротическими бляшками сонных артерий (нестабильные, стабильные) и интактными внутренними грудными артериями (см. раздел 3.2) (кластер miR-23b/27b/24-1, miR-29b-2, miR-29c, miR-125b-1, miR-155, miR-377).

В общей сложности анализ экспрессии был проведён для 23 зрелых микроРНК — 14 видов микроРНК, для 9 из которых была проанализирована экспрессия обеих цепей, -3р и -5р (Таблица Д1, Приложение Д). Далее уровень экспрессии микроРНК приводится в $\log_2\text{CPM}$. Наиболее высоко экспрессирующимися микроРНК во всех образцах были miR-143-3р (18,6 [18,2; 19,5]; Q2 [Q1; Q3]), miR-21-5р (17,1 [16,5; 17,7]), miR-100-5р (16,0 [15,5; 16,2]) и miR-27b-3р (15,0 [14,6; 15,7]; Рисунок 38). Уровень экспрессии остальных микроРНК не превышал 14,0 $\log_2\text{CPM}$ (Таблица Д1, Приложение Д).

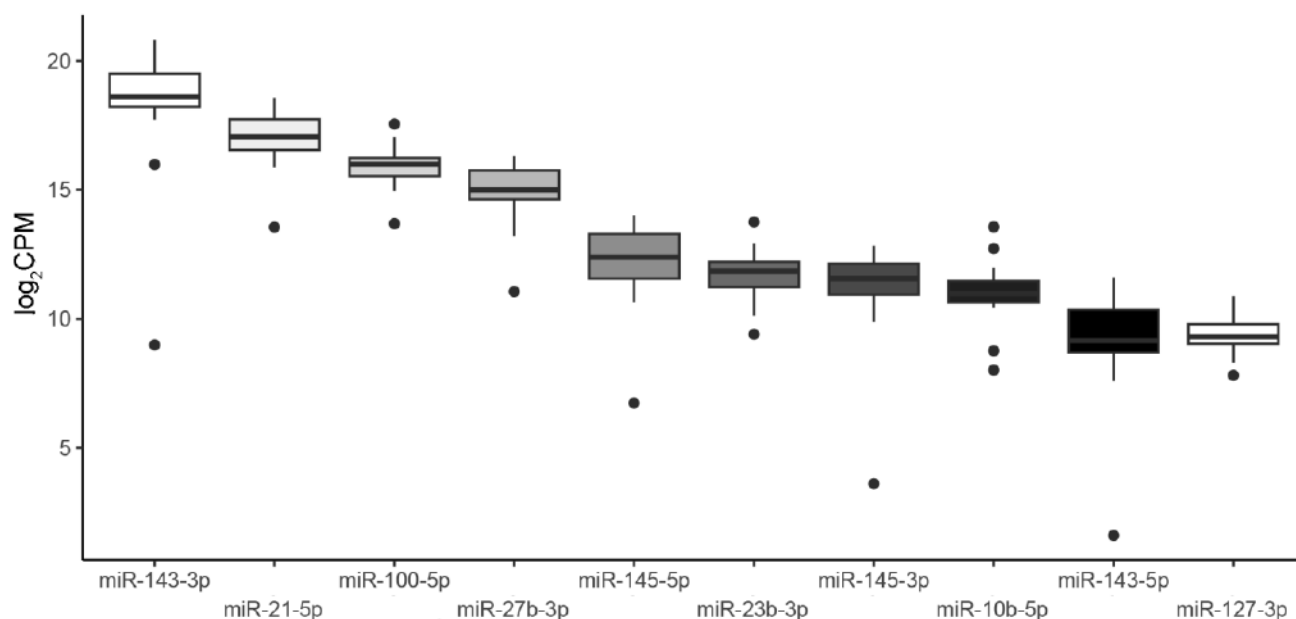


Рисунок 38. Десять микроРНК с наиболее высоким уровнем экспрессии в изученных образцах атеросклеротических бляшек сонных артерий (n=14).

Поскольку на микрочипах Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina) аннотировано больше CpG-сайтов (~850 000), чем на Infinium HumanMethylation450 BeadChip (~450 000), некоторые анализируемые регионы включали большее число аннотированных CpG-сайтов, чем описано при сопоставлении результатов данного диссертационного исследования с данными, полученными на Infinium HumanMethylation450 BeadChip (таблица Г1).

Для 8 CpG-сайтов и 7 микроРНК (miR-10b-3р, miR-10b-5р, miR-23b-3р, miR-24-1-5р, miR-27b-3р, miR-143-3р и miR-145-3р) выявлено 16 пар с обратной корреляцией метилирования и экспрессии (Таблица 12). При этом после введения поправки на множественные сравнения (FDR) корреляция между cg00014998 и miR-10b-5р утратила свою значимость. Для других микроРНК значимых корреляций между уровнем метилирования различных CpG-сайтов и экспрессией не установлено.

Таблица 12. Значимые корреляции между метилированием CpG-сайтов генов микроРНК, аннотированных на микрочипе Infinium HumanMethylation450 BeadChip и экспрессией микроРНК

Расположение в гене	CpG-сайт (Illumina ID)	микроРНК	Расстояние до микроРНК*	<i>rho</i> Спирмена	<i>p</i> (FDR)
промотор [#] <i>MIR10B</i>	cg27160395	miR-10b-3p	-82	-0,656	0,011
		miR-10b-5p		-0,653	0,014
<i>AOPEP (C9orf3), MIR23B[#], MIR3074[#]</i>	cg20355301	miR-23b-3p	618	-0,600	0,026
		miR-27b-3p	381	-0,749	0,003
	cg09951047	miR-23b-3p	816	-0,701	0,007
		miR-24-1-5p	3	-0,538	0,049
		miR-27b-3p	579	-0,807	<0,001
	cg13972491	miR-23b-3p	1 246	-0,723	0,005
		miR-27b-3p	1 009	-0,837	<0,001
промотор [#] <i>MIR143HG (CARMN)</i>	cg01726320	miR-143-3p	-22 152	-0,569	0,037
		miR-145-3p	-23 880	-0,705	0,006
	cg01558401	miR-143-3p	-22 104	-0,622	0,020
		miR-145-3p	-23 832	-0,749	0,003
1й экзон <i>MIR143HG (CARMN)</i>	cg26585864	miR-143-3p	-21 963	-0,622	0,020
		miR-145-3p	-23 691	-0,749	0,003
3й интрон <i>MIR143HG (CARMN)</i> , промотор [#] <i>MIR143</i>	cg04317047	miR-145-3p	-1 821	0,679	0,010
4й экзон <i>MIR143HG (CARMN)</i> , промотор [#] <i>MIR143</i>	cg16684117	miR-143-3p	-25	0,569	0,037
		miR-145-3p	-1 753	0,692	0,008
	cg21242144	miR-143-3p	6	0,631	0,018
		miR-145-3p	-1 722	0,811	<0,001

Примечание. * – расстояние до первого нуклеотида гена микроРНК, для которой показана корреляция экспрессии с метилированием соответствующего CpG-сайта; отрицательное число обозначает расположение CpG-сайта в 5'-направлении, положительное – в 3'-направлении; # обозначает расположение CpG-сайта в пределах промоторного региона, т.е. в пределах 3 тыс.п.н. в 5'-направлении и 500 п.н. в 3'-направлении от TSS гена микроРНК).

Наиболее сильные отрицательные корреляции показал уровень экспрессии miR-27b-3p с уровнем метилирования трёх CpG-сайтов – cg13972491 (Рисунок 39 А), cg09951047 (Рисунок 39 Б) и cg20355301 (Рисунок 39 В). Кроме того, метилирование этих же сайтов отрицательно коррелировало с экспрессией miR-23b-3p (Рисунок 39 Г, Д, Е), а для cg09951047 установлена корреляция средней силы ($p(\text{FDR}) = 0,049$) с экспрессией miR-24-1-5p (Рисунок 39 Ж, Таблица 12).

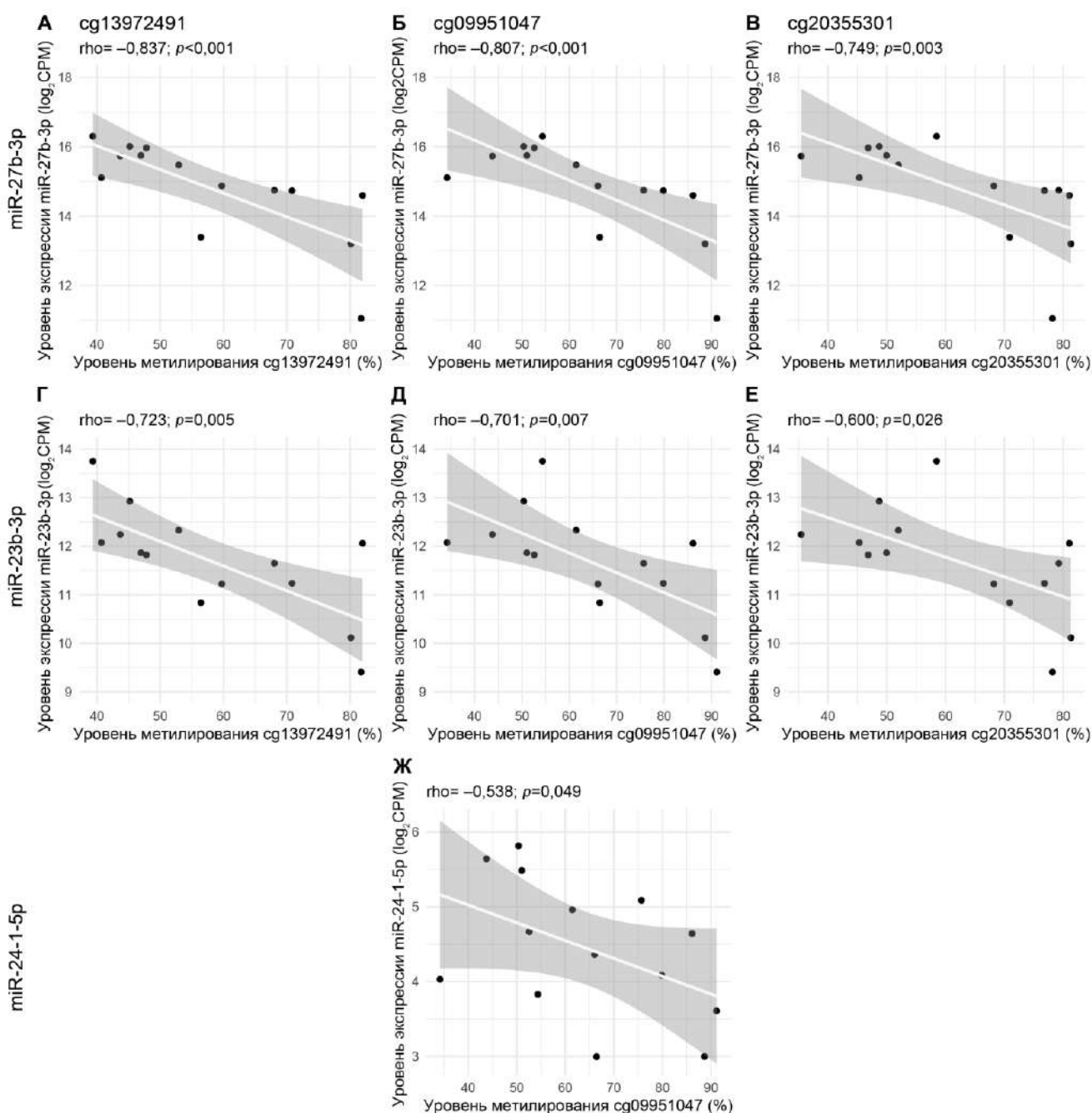


Рисунок 39. Корреляции уровней экспрессии miR-27b-3p, miR-23b-3p и miR-24-1-5p с уровнем метилирования cg13972491, cg09951047 и cg20355301. Показаны только значимые корреляции, уровень значимости p на графиках указан с поправкой на множественные сравнения.

Известно, что микроРНК кластера miR-23b/ -27b/ -24-1 транскрибируются независимо, но регулируются одним и тем же промотором, занимающим примерно 2 тыс. п.н. в 3'-направлении от TSS [Kim J. et al., 2016; Sun Wu et al., 2020]. Как miR-27b-3p, так и miR-23b-3p, являются ведущими цепями микроРНК miR-27b и miR-23b, соответственно. Уровень их экспрессии в данном исследовании измерялся в тысячах CPM, а miR-27b-3p входит в четвёрку наиболее высоко экспрессирующихся микроРНК. В отличие от них, miR-24-1-5p представляет собой «пассажирскую» цепь (ведущей цепью является miR-24-1-3p) и экспрессировалась на низком уровне, не превышая 5,8 log₂CPM (=56,4 CPM).

Все три CpG-сайта – cg20355301, cg09951047 и cg13972491 – располагаются в непосредственной близости от TSS гена *MIR24-1* (на расстоянии -195, +3 и +433 нуклеотидов, соответственно) и недалеко от TSS гена *MIR23B* (на расстоянии +618, +816 и +1246 нуклеотидов, соответственно), при этом cg09951047 локализуется в CpG-островке и непосредственно в гене *MIR24-1*. Таким образом, все три CpG-сайта приходятся на промоторный регион *MIR23B*, указанный в исследовании Sun Wu с соавт. [Sun Wu et al., 2020], следовательно, с большой вероятностью оказывают регуляторное влияние на экспрессию микроРНК кластера miR-23b/-27b/-24-1.

Для всего кластера miR-23b/-27b/-24-1 показана высокая экспрессия в клетках эндотелия и ГМК, с атеропротективной ролью данных микроРНК на ранних этапах развития атеросклеротического процесса [Boon et al., 2012; Iaconetti et al., 2015]. В частности, показано, что miR-23b является ключевым регулятором переключения фенотипа ГМК, а её сверхэкспрессия подавляет формирование неоинтимы после повреждения сосудов *in vivo* [Iaconetti et al., 2015]. В то же время, в эксперименте на мышах показано, что снижение уровня miR-27b в ЭК способствует поддержанию стабильности АСБ [Qun L. et al., 2015], то есть сама микроРНК, предположительно, участвует в процессе дестабилизации атеросклеротической бляшки. Повышенная экспрессия miR-27b-3p выявлена в экзосомах сыворотки крови пациентов с прогрессирующим асимптоматическим стенозом сонных артерий по сравнению с пациентами со стабильным стенозом [Dolz S. et al., 2017], что также указывает на роль этой микроРНК в прогрессировании атеросклероза.

Что касается связи метилирования ДНК в области гена *MIR23B* при атеросклерозе, имеются данные о гиперметилировании *AOPEP (C9orf3)*, гена-хозяина кластера miR-23b/-27b/-24-1 в области chr9:97,478,939-97,923,541, в поражённой атеросклерозом аорте по сравнению с её непоражённой областью [Lacey M. et al., 2019a]. Данный участок включает CpG-сайты, метилирование которых обратно коррелирует с экспрессией miR-23b-3p, miR-27b-3p и miR-24-1-5p в атеросклеротически изменённых сонных артериях в данном диссертационном исследовании (chr9:97,848,108, chr9:97,848,306 и chr9:97,848,736). При атеросклеротическом поражении аорты показана обратная корреляция экспрессии miR-23b и метилирования CpG-сайта cg00351472 (chr9:97,846,551) [Zaina S. et al., 2014], который находится в 2 тыс. п.н. от CpG-сайтов, коррелирующих с экспрессией в данном диссертационном исследовании. Обратная корреляция метилирования промоторного региона *MIR23B* и экспрессии другой микроРНК этого же кластера, miR-27b, характерна для злокачественных новообразований различной локализации. В частности при раке молочной железы, кишечника и желудка выявлено снижение экспрессии miR-27b-3p при гиперметилировании ее промоторного региона [Li X. et al., 2016; Zhang C. et al., 2019], однако исследованные в данных работах регионы находились в 2-4 тыс. п.н. от CpG-сайтов,

коррелирующих с экспрессией в данном диссертационном исследовании (chr9:97,848,108, chr9:97,848,306 и chr9:97,848,736). При раке желудка сниженная экспрессия miR-27b-3p в опухолевых тканях восстанавливалась при обработке клеток азацитидином (регион chr9:97,844,357-97,844,526) [Zhang C. et al., 2019].

Для установления наиболее вероятных мишеней miR-27b-3p был проведён поиск в трёх различных базах данных. В онлайн-базе данных miRDB (<https://mirdb.org/>, дата обращения: 9.02.2024) представлены мишени, предсказанные с помощью биоинформатических методов. Для каждой мишени вычислен расчётный показатель связывания (prediction score), и, по утверждению разработчиков базы данных miRDB, при его уровне > 80 предсказанная мишень с большой вероятностью является реальной. Для miR-27b-3p обнаружено 634 предсказанных мишени с расчётным показателем связывания > 80.

Во второй базе данных, TarBase v.9.0 (<https://dianalab.e-ce.uth.gr/tarbasev9/interactions>, дата обращения: 9.02.2024) собраны экспериментально подтвержденные взаимодействия между микроРНК и генами (мРНК). Каждому взаимодействию присваивается определённый балл «microT score» (от -1 до 1), при этом пороговым уровнем значимости взаимодействия отдельные авторы называют 0,7 [Tastsoglou S. et al., 2023]. Всего для miR-27b-3p выявлено 1613 мишеней с баллом «microT score» равным или превышающим 0,7.

В третьей базе данных, miRTarBase v.9.0 (mirtarbase.cuhk.edu.cn, дата обращения: 10.02.2024), для miR-27b-3p представлено 409 мишеней, из которых 33 экспериментально валидированы с высоким уровнем доказательности (Strong evidence) более чем в 2 исследованиях. При сопоставлении списков из трёх баз данных получено 14 общих мишеней miR-27b-3p (*KHSRP*, *SEMA6A*, *EYA4*, *ABCA1*, *ROR1*, *ADORA2B*, *CCNG1*, *PPARG*, *CREB1*, *NR5A2*, *CDH11*, *VAV3*, *FOXO1*, *NF1*).

При анализе экспрессии этих мишеней с помощью портала GTEx v.8 (Genotype-Tissue Expression) (<https://www.gtexportal.org/home/>, обновление 23 февраля 2023, дата обращения: 9.02.2024) преимущественная экспрессия в тканях артерий обнаружена только для гена трансмембранной рецепторной протеин-тирозинкиназы *ROR1*, однако уровень экспрессии был относительно невысоким (11,28, 9,21 и 18,25 TPM в аорте, коронарных и бедренных артериях, соответственно). Повышенную экспрессию *ROR1* при хроническом воспалении связывают с развитием фиброза и других возраст-зависимых заболеваний [Endo M. et al., 2022]. В общем списке мишеней miR-27b-3p также находились *ABCA1* и *PPARG*, повышенная экспрессия которых улучшает эффлюкс холестерина из макрофагов, что способствует снижению риска развития атеросклероза [Lee S.M. et al., 2013]. Кроме того, экспрессия *PPARG* отмечена и в клетках эндотелия, хотя и на низком уровне, а сайленсинг *PPARG* усиливал разрастание (sprouting) эндотелиальных клеток [Boon et al., 2012; Urbich C. et al., 2012]. Для ещё одной

мишени из списка, *FOXO1*, с одной стороны, в модели на мышах снижение экспрессии приводило к аутофагии ЭК [Yu F. et al., 2021], однако, у пациентов с атеросклерозом сонных артерий в нестабильных АСБ также выявлено снижение экспрессии *FOXO1* по сравнению со стабильными атеросклеротическими бляшками и высокая экспрессия *FOXO1* считается маркером стабильного состояния АСБ [Magenta A. et al., 2018]. Таким образом, различные мишени miR-27b-3p оказывают разнонаправленное влияние, поэтому подавляющая их микроРНК также может играть двойственную роль в атеросклеротическом процессе.

Для микроРНК miR-23b-3p также был проведён поиск наиболее вероятных мишеней в трёх различных базах данных (miRDB, TarBase v.9.0 и miRTarBase v.9.0) согласно вышеописанным критериям. Совпадение по всем трём спискам отмечено лишь для циклина *CCNG1*, для которого отмечена экспрессия в аорте, коронарных и бедренных артериях (77,17, 67,08 и 82,94 TPM), хотя наибольших значений экспрессия этого гена достигала в лимфоцитах, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр (193,9 TPM). Роль циклина *CCNG1* в развитии атеросклероза или его осложнений на данный момент не изучена, но имеются данные об ассоциации локуса rs982228, расположенного рядом с геном *CCNG1* с пролиферативным фенотипом ГМК [Aherrahrou et al., 2020]. Если предположить подобный эффект самого циклина *CCNG1*, то, подавляя его экспрессию, miR-23b-3p будет играть атеропротективную роль, что согласуется с литературными данными.

Для микроРНК miR-24-1-5p в базе данных miRTarBase v.9.0 (mirtarbase.cuhk.edu.cn, дата обращения: 10.02.2024) представлены 27 мишеней. Однако из них только одна, *FOXM1*, валидирована с высоким уровнем доказательности (Strong evidence) в 2 исследованиях. При анализе экспрессии *FOXM1* с помощью портала GTEx v.8 (Genotype-Tissue Expression) [https://www.gtexportal.org/home/, обновление 23 февраля 2023, дата обращения: 30.01.2024] преимущественная экспрессия этого белка была отмечена в лимфоцитах, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр (51,69 TPM), а в аорте, коронарных и бедренных артериях экспрессия *FOXM1* не превышала 2 TPM. В то же время, есть данные о важной роли *FOXM1* в пролиферации ГМК при повреждении артерий [Franco et al., 2020].

Если в случае кластера miR-23b/-27b/-24-1, отрицательная корреляция с уровнем метилирования в области предполагаемого общего промотора была показана только для одной цепи каждой микроРНК, то в случае miR-10b с уровнем метилирования сайта cg27160395 обратно коррелировал уровень экспрессии как ведущей цепи miR-10b-5p (Рисунок 40 А), так и пассажирской miR-10b-3p (Рисунок 40 Б). Сайт cg27160395 располагается на расстоянии - 80 нуклеотидов от TSS гена *MIR10B* в CpG-островке, следовательно, приходится на промоторный регион гена и способен оказывать регуляторное влияние на экспрессию miR-10b.

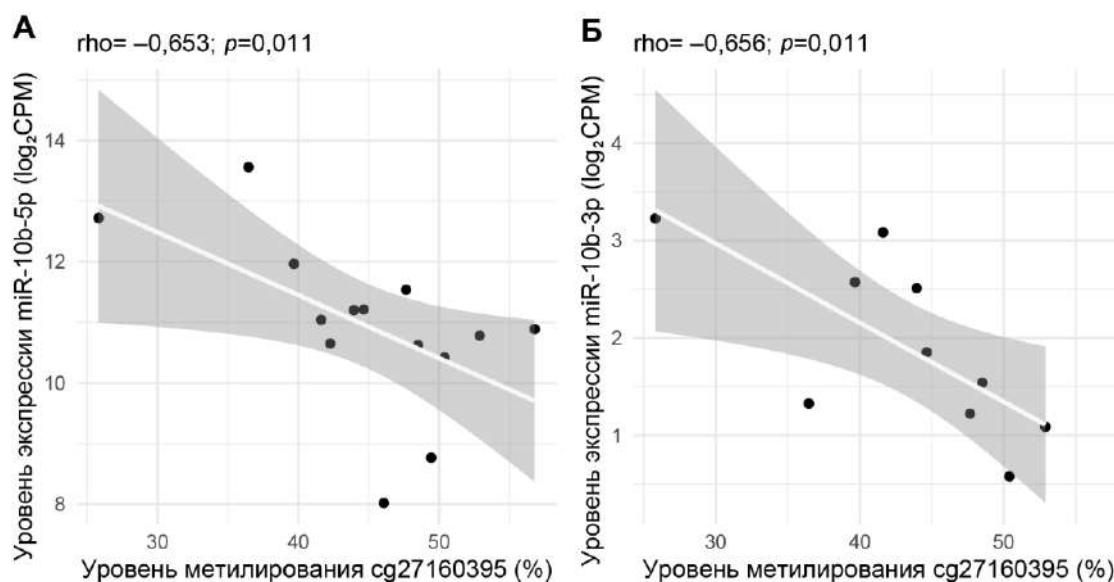


Рисунок 40. Корреляции уровней экспрессии miR-10b-5p (А) и miR-10b-3p (Б) с уровнем метилирования cg27160395. Уровень значимости p на графиках указан с поправкой на множественные сравнения.

Согласно литературным данным, снижение уровня метилирования промоторного региона гена *MIR10B* при патологии (преимущественно, онкологических состояниях) связано с повышенным уровнем экспрессии miR-10b [He C. et al., 2015; Lu Y.F. et al., 2018]. Так при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме отмечено снижение уровня метилирования региона chr2:177,014,317-177,014,559 [He C. et al., 2015], а при плоскоклеточной карциноме пищевода — снижение уровня метилирования региона chr2:177,014,867-177,015,331 [Lu Y.F. et al., 2018], частично совпадающего по локализации с рассмотренным в данном диссертационном исследовании (chr2:177,014,629-177,015,244).

В то же время, показано, что и повышенный уровень метилирования промоторного региона гена *MIR10B* сопровождается ослаблением экспрессии miR-10b [Kim K. et al., 2011; Li Z. et al., 2015], т.е. между метилированием и экспрессией наблюдается обратная корреляция. В данном диссертационном исследовании установлена обратная корреляция с экспрессией miR-10b-5p и miR-10b-3p уровня метилирования CpG-сайта cg27160395 ($\rho = -0.653$, FDR = 0,014 и $\rho = -0.656$, FDR = 0,011, соответственно). Сайт cg27160395 (chr2:177,014,950) приходится на один из регионов, рассмотренный Kim K. с соавт. – chr2:177,014,946-177,014,995 [Kim K. et al., 2011], регион, рассмотренный Lu Y.F. с соавт. – chr2:177,014,867-177,015,331 [Lu Y.F. et al., 2018], и на проанализированный в данном диссертационном исследовании регион гена *MIR10B* — chr2:177,014,629-177,015,244. Следовательно, можно утверждать о наличии взаимосвязи между выявленным в данном диссертационном исследовании снижением уровня метилирования промоторного региона гена *MIR10B* и повышенной экспрессией микроРНК в АСБ.

Поиск наиболее вероятных мишеней обеих цепей miR-10b был проведён также в трёх базах данных (miRDB, TarBase v.9.0 и miRTarBase v.9.0) согласно критериям, описанным для кластера miR-23b/-27b/-24-1. При сопоставлении списков из трёх баз данных получено 4 общих мишени для ведущей цепи miR-10b-5p: *HOXD10*, *KLF4*, *NCOR2* и *E2F7*, в то время как для пассажирской цепи miR-10b-3p совпадений не обнаружено. При анализе экспрессии этих мишеней с помощью портала GTEx v.8 ни для одной из них не выявлена преимущественная экспрессия в тканях артерий, либо в цельной крови. Уровень экспрессии выше 1 TPM (transcripts per million) в тканях артерий (аорте, коронарных и бедренной) показали только *KLF4* (72,98, 80,52 и 114,50 TPM, соответственно) и *NCOR2* (60,5, 60,31 и 71,28 TPM, соответственно).

В то же время, согласно литературным данным, *HOXD10* экспрессируется в ЭК сосудов и подавляя его экспрессию, miR-10b усиливает миграцию и ангиогенез клеток эндотелия, способствуя ремоделированию сосудов [Shen X. et al., 2011]. Транскрипционный фактор *KLF4*, выступающий мишенью не только miR-10b, но и многих других микроРНК, в здоровых кровеносных сосудах экспрессируется на очень низком уровне, однако его экспрессия индуцируется повреждением сосудов [Goikuria H. et al., 2018]. Предполагаемая роль *KLF4* в развитии и прогрессировании атеросклероза противоречива: *KLF4* связан с подавлением дифференцировки ГМК и переходом макрофагов в провоспалительный М1-фенотип, тем самым оказывая атеропротективный эффект [Riches K. et al. 2014; Tang R.Z. et al. 2019]. Однако было высказано предположение, что *KLF4* также играет проатерогенную роль благодаря участию в ингибировании цикла клеточной пролиферации. Кроме того, в ГМК атеросклеротических бляшек сонных артерий, как у симптоматических, так и у асимптоматических пациентов, отмечалось усиление экспрессии *KLF4* по сравнению с ГМК из макроскопически неизменённых участков артерий тех же пациентов [Goikuria H. et al., 2018]. Таким образом, miR-10b, связывающая *KLF4*, может оказывать как стимулирующий, так и протективный эффект в отношении развития и прогрессирования атеросклероза.

Как было показано, с использованием клеточных культур, увеличение экспрессии miR-10b в ЭК, действуя через мишени *LTBP1* и *HOXD10*, приводит к усилению их миграции и ангиогенезу, а также снижению анти-пролиферативной способности ЭК II типа в отношении ГМК; в макрофагах, через мишени *ABCA1* и *ABCG1*, уменьшается эффлюкс и обратный транспорт холестерина; усиление пролиферации ГМК происходит при влиянии на *HTATIP2* (*TIP30*) [Shen X. et al., 2011; Wang D. et al., 2012; Yu X. et al., 2015; Nakahara M. et al., 2018].

В то же время, отмеченные в данном диссертационном исследовании снижение уровня метилирования в области промотора гена *MIR10B* в АСБ и обратная корреляция метилирования и экспрессии согласуются с данными о преимущественно атерогенном влиянии miR-10b, а именно усиление экспрессии miR-10b, происходящее при снижении уровня метилирования

промоторного региона гена *MIR10B* в атеросклеротически изменённых тканях артерий, способствует дальнейшему развитию атеросклеротического процесса вплоть до дестабилизации атеросклеротической бляшки.

В отличие от вышеописанных микроРНК, для уровня экспрессии микроРНК miR-145-3p (пассажирская цепь) и miR-143-3p (ведущая цепь) показана не только отрицательная корреляция с тремя CpG-сайтами (6 пар «CpG-сайт – цепь микроРНК», Рисунок 41 А-Е), но и положительная (5 пар «CpG-сайт – цепь микроРНК», Рисунок 41 Ж-Л).

CpG-сайты cg01726320, cg01558401 и cg26585864 (показавшие отрицательную корреляцию с экспрессией как miR-145-3p, так и miR-143-3p) располагаются последовательно, на расстоянии -78, -30 и +78 нуклеотидов от TSS гена *MIR143HG (CARMN)*, соответственно. Сайты cg04317047, cg16684117 и cg21242144 (показавшие положительную корреляцию с экспрессией miR-145-3p и miR-143-3p, хотя для cg04317047 выявлена корреляция только с miR-145-3p) приходятся на «тело» гена *MIR143HG (CARMN)*. При этом сайт cg21242144, для которого выявлена наиболее сильная положительная корреляция с экспрессией miR-145-3p и положительная корреляция средней силы с экспрессией miR-143-3p располагается в экзоне как *MIR143HG (CARMN)*, так и *MIR143*. Сайты cg04317047 и cg16684117 находятся на расстоянии -93 и -24 нуклеотидов от TSS гена *MIR143*, соответственно; при этом cg16684117 также располагается в экзоне гена *MIR143HG (CARMN)*, а cg04317047 приходится на предшествующий интрон этого гена некодирующей РНК. Таким образом, показано, что для CpG-сайтов, расположенных в промоторном регионе гена *MIR143HG (CARMN)* характерна отрицательная корреляция с экспрессией miR-145-3p и miR-143-3p, а для CpG-сайтов, расположенных в «теле» гена *MIR143HG (CARMN)* – положительная. В то же время, литературные источники в доступных базах данных, не содержат информацию об отрицательной или положительной взаимосвязи уровня метилирования промоторного региона либо «тела» гена *MIR143* с экспрессией miR-143; и лишь в одной из публикаций на другом объекте исследования (опухолевые клетки толстого кишечника) показано отсутствие значимой корреляции между этими двумя показателями [Pekow J. et al., 2015].

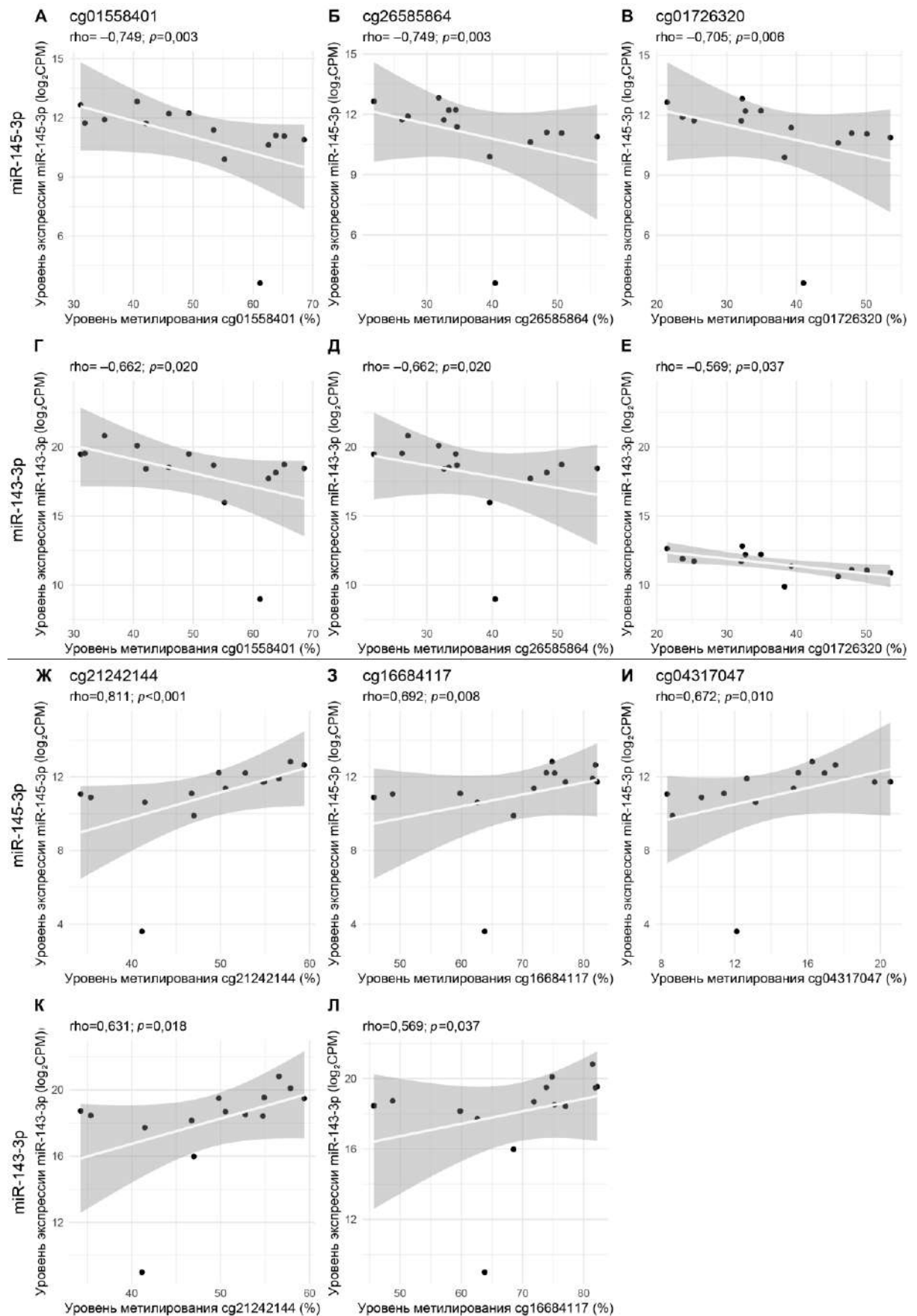


Рисунок 41. Корреляции уровней экспрессии miR-145-3p и miR-143-3p с уровнем метилирования cg01558401 (А, Г), cg26585864 (Б, Д), cg01726320 (В, Е), cg21242144 (Ж, К), cg16684117 (З, Л) и cg04317047 (И). Показаны только значимые корреляции, уровень значимости p на графиках указан с поправкой на множественные сравнения.

Согласно литературным данным, miR-143 и miR-145 на высоком уровне преимущественно экспрессируются в ГМК сосудов [см. обзор Королёва Ю.А. с соавт., 2018], следовательно — в аорте и других тканях, богатых ГМК [Ehrlich et al., 2019]. В результате поиска наиболее вероятных мишеней miR-145-3p и miR-143-3p в трёх базах данных (miRDB, TarBase v.9.0 и miRTarBase v.9.0) согласно критериям, описанным для кластера miR-23b/-27b/-24-1, для ведущей цепи miR-143-3p выявлена только одна мишень, присутствующая во всех базах данных — вазогибин *VASH1*. Согласно GTEx v.8, *VASH1* преимущественно экспрессируется в спинном мозге (36,77 TPM), но его экспрессия отмечена и в аорте, коронарных и бедренных артериях (16,82, 22,45 и 22,83 TPM, соответственно). Для пассажирской цепи miR-145-3p совпадений не обнаружено.

Есть данные о том, что экспрессия *VASH1* в АСБ сонных артерий значительно усиливается по сравнению с макроскопически неизменёнными участками артерий тех же пациентов; при этом *VASH1* преимущественно экспрессируется в эндотелиальных клетках микрососудов неинтими атеросклеротической бляшки. Авторы исследования считают, что уровень экспрессии *VASH1* отражает как усиленную неоваскуляризацию, так и воспалительные процессы, и может быть биомаркером нестабильности АСБ у пациентов с атеросклерозом сонных артерий и прогнозирования ишемического инсульта [Fukumitsu R. et al., 2015]. Таким образом, изменение уровня метилирования в области промотора и «тела» гена *MIR143* может приводить к нарушению экспрессии микроРНК miR-143 и ее мишеней, способствующих дестабилизации атеросклеротической бляшки.

В интерактивном веб-приложении PlaqView, предназначенном для изучения наборов данных по транскриптомам отдельных клеток сердца и сосудов человека и мыши [Ma W.F. et al., 2021] доступны исследования по транскриптому отдельных клеток АСБ сонных артерий (scRNA-seq), в том числе наборы данных Alsaigh_2020 [Alsaigh T. et al., 2020], Pan_2020 [Pan H. et al., 2020] и Slenders_2021 [Slenders L. et al., 2021].

В работе Alsaigh с соавт. (2020) рассматривали клетки из ядра атеросклеротических бляшек трёх пациентов, а также клетки из прилежащих участков ткани сосудов [Alsaigh T. et al., 2020]. При анализе 20 мишеней микроРНК, экспериментально валидированных с высоким уровнем доказательности в трех базах данных (miRDB, TarBase v.9.0 и miRTarBase v.9.0) наибольший уровень экспрессии отмечен для *ABCA1* (мишень miR-10b-5p и miR-27b-3p) в тучных клетках (мастоцитах) и *NCOR2* (мишень miR-10b-5p) в эритроцитах (Рисунок 42). В ГМК атеросклеротических бляшек наибольший уровень экспрессии продемонстрирован для *CREB1*, в эндотелиальных клетках — для *SEMA6A* (мишени miR-27b-3p).

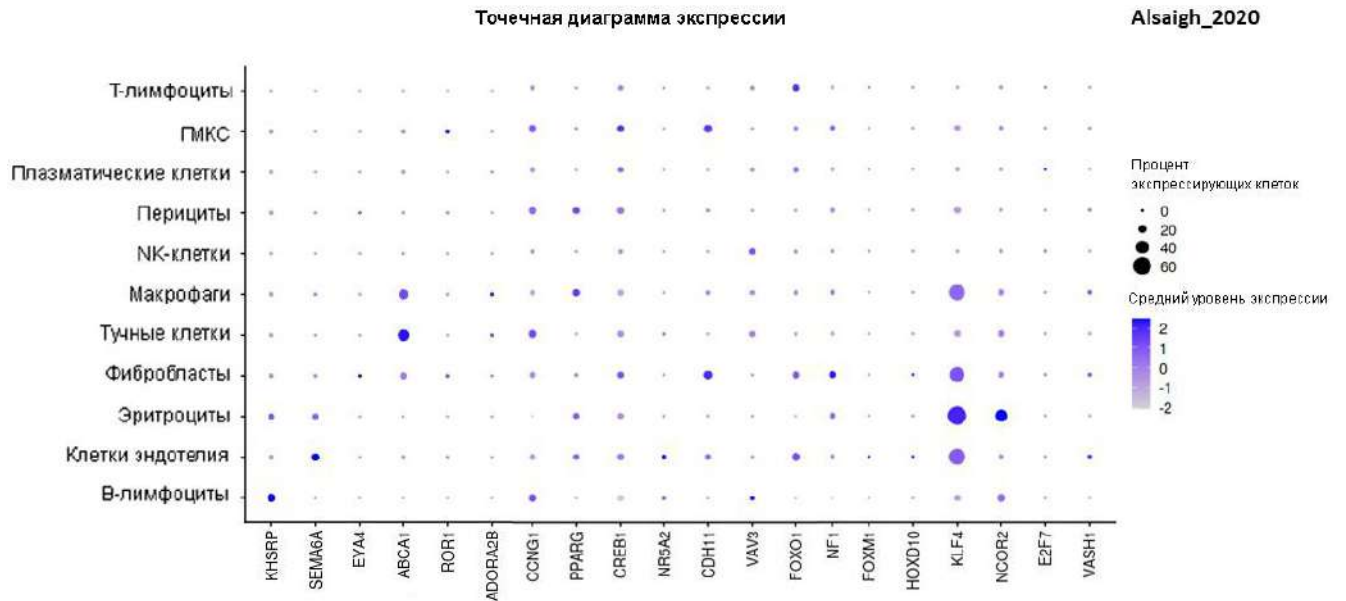


Рисунок 42. Точечная диаграмма экспрессии мишеней микроРНК, экспериментально валидированных с высоким уровнем доказательности в трех базах данных (miRDB, TarBase v.9.0 и miRTarBase v.9.0) в наборе данных Alsaigh_2020 в веб-приложении PlaqView.

В исследование Pan с соавт. (2020) были взяты клетки атеросклеротических бляшек от трех пациентов – двое человек были без ОНМК в анамнезе, а один имел данное событие в анамнезе [Pan H. et al., 2020]. Наибольший уровень экспрессии отмечен для *CCNG1* (мишень miR-23b-3p) в тучных клетках (мастоцитах) и *KLF4* (мишень miR-10b-5p) в макрофагах (Рисунок 43). В ГМКС атеросклеротических бляшек не было отмечено преобладание экспрессии какой-либо из мишеней микроРНК, в то время как в эндотелиальных клетках наибольший уровень экспрессии отмечен для *FOXO1* (мишени miR-27b-3p).

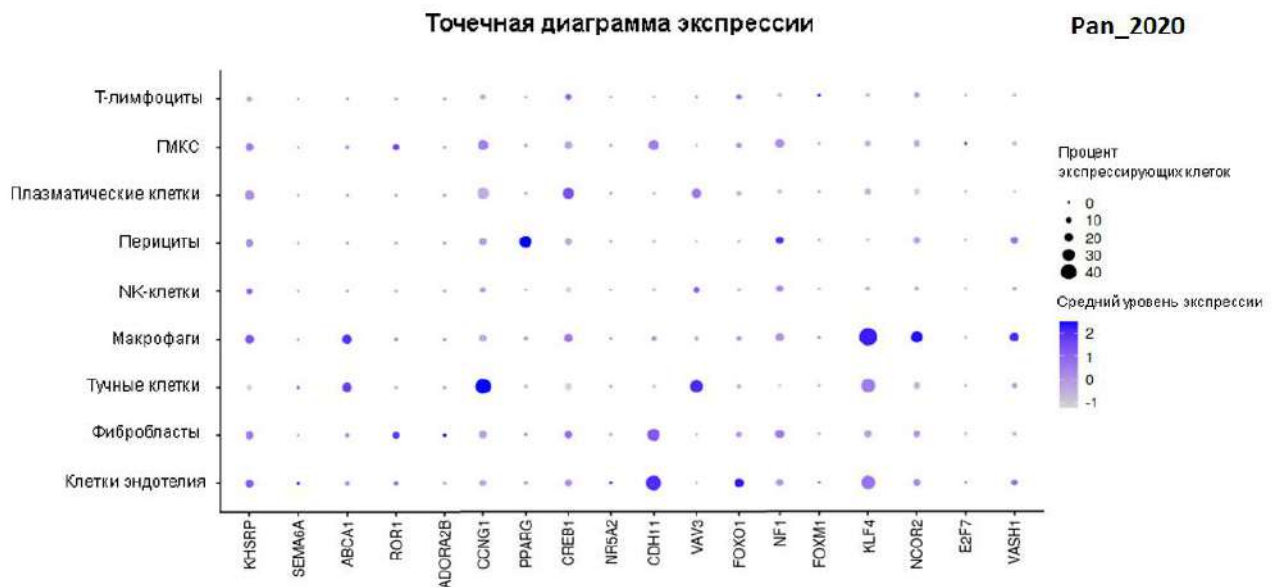


Рисунок 43. Точечная диаграмма экспрессии мишеней микроРНК, экспериментально валидированных с высоким уровнем доказательности в трех базах данных (miRDB, TarBase v.9.0 и miRTarBase v.9.0) в наборе данных Pan_2020 в веб-приложении PlaqView.

В данных Slenders с соавт. 2021, полученных при исследовании транскриптома отдельных клеток атеросклеротических бляшек 38 пациентов (26 мужчин и 12 женщин) [Slenders L. et al., 2021] наибольший уровень экспрессии отмечен для *FOXM1* (мишень miR-23b-3p) в эпителиальных клетках эпителия, *ABCA1* (мишень miR-10b-5p и miR-27b-3p) и *NCOR2* (мишень miR-10b-5p) в тучных клетках (мастоцитах) (Рисунок 44). Как и в вышеописанном исследовании, в ГМКС атеросклеротических бляшек также не было отмечено преобладание экспрессии какой-либо из мишеней микроРНК. В эндотелиальных клетках наибольший уровень экспрессии отмечен для *KLF4* (мишень miR-10b-5p).

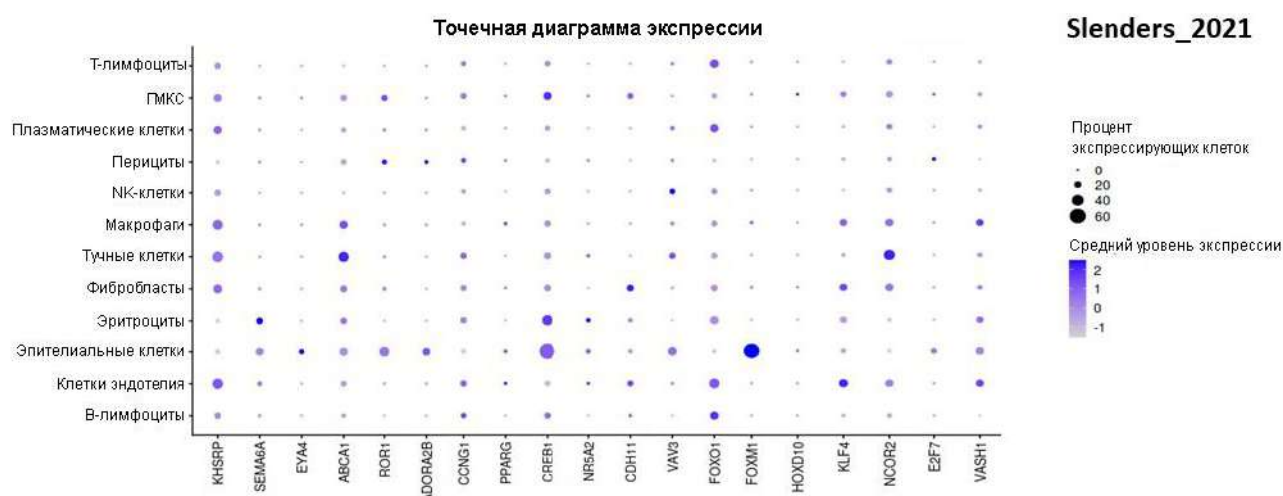


Рисунок 44. Точечная диаграмма экспрессии мишеней микроРНК, экспериментально валидированных с высоким уровнем доказательности в трех базах данных (miRDB, TarBase v.9.0 и miRTarBase v.9.0) в наборе данных Slenders_2021 в веб-приложении PlaqView.

Между вышеприведёнными исследованиями совпадают такие мишени микроРНК как *ABCA1* (мишень miR-10b-5p и miR-27b-3p), с наивысшим уровнем экспрессии, выявленным в тучных клетках в наборах данных Alsaigh_2020 и Slenders_2021 (Рисунок 45 А,В), *NCOR2* (мишень miR-10b-5p), высоко экспрессирующаяся в эритроцитах по данным Alsaigh_2020 (Рисунок 45 А) и в тучных клетках — по данным Slenders_2021 (Рисунок 45 В), а также *KLF4* (мишень miR-10b-5p) с наивысшим уровнем экспрессии в макрофагах по данным Pan_2020 (Рисунок 45 Б) и в эндотелиальных клетках по данным Slenders_2021 (Рисунок 45 В).

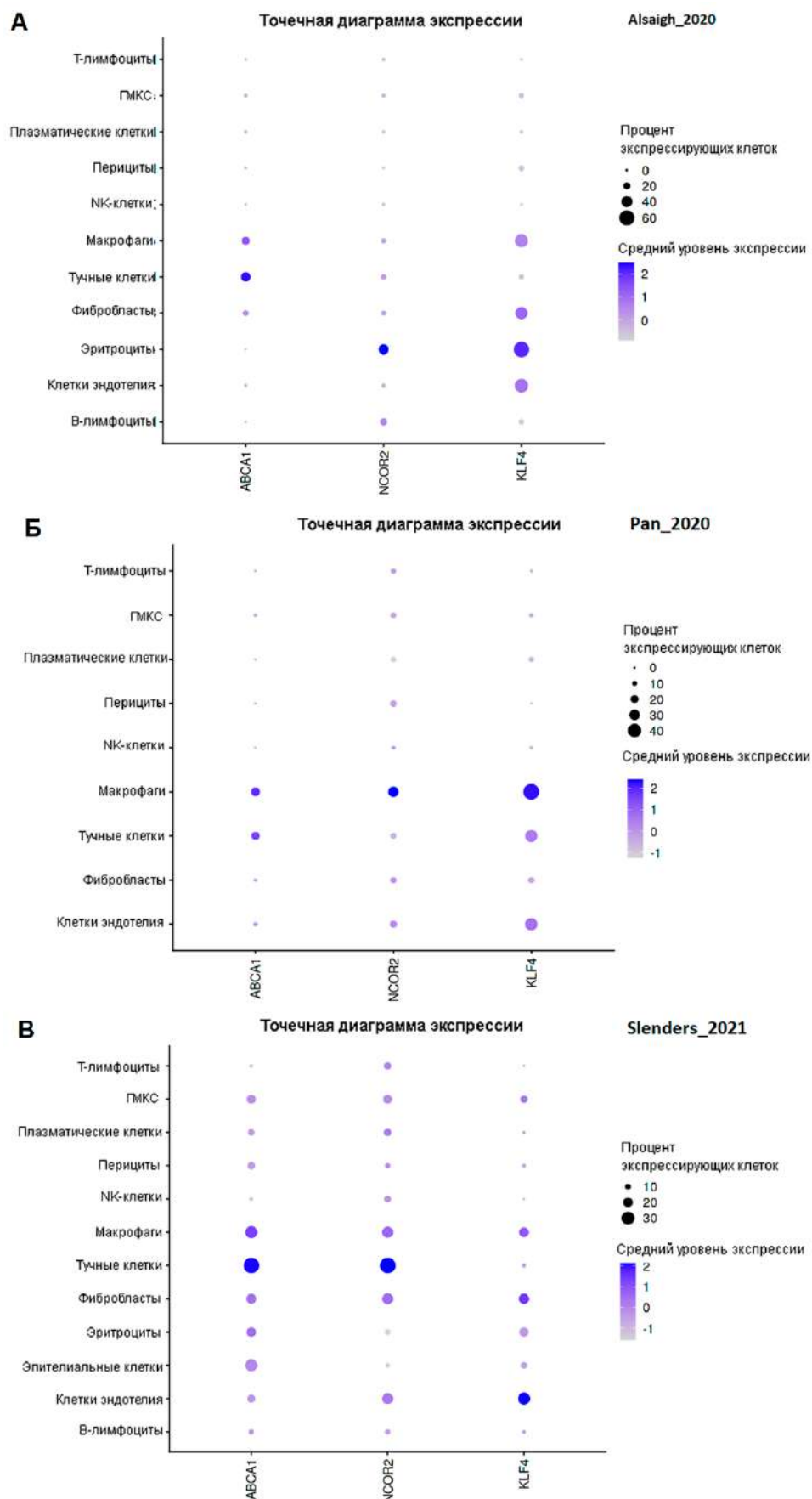


Рисунок 45. Точечные диаграммы экспрессии общих мишеней микроРНК с высоким уровнем экспрессии в наборах данных Alsaigh_2020 (А), Pan_2020 (Б) и Slenders_2021 (В) в веб-приложении PlaqView.

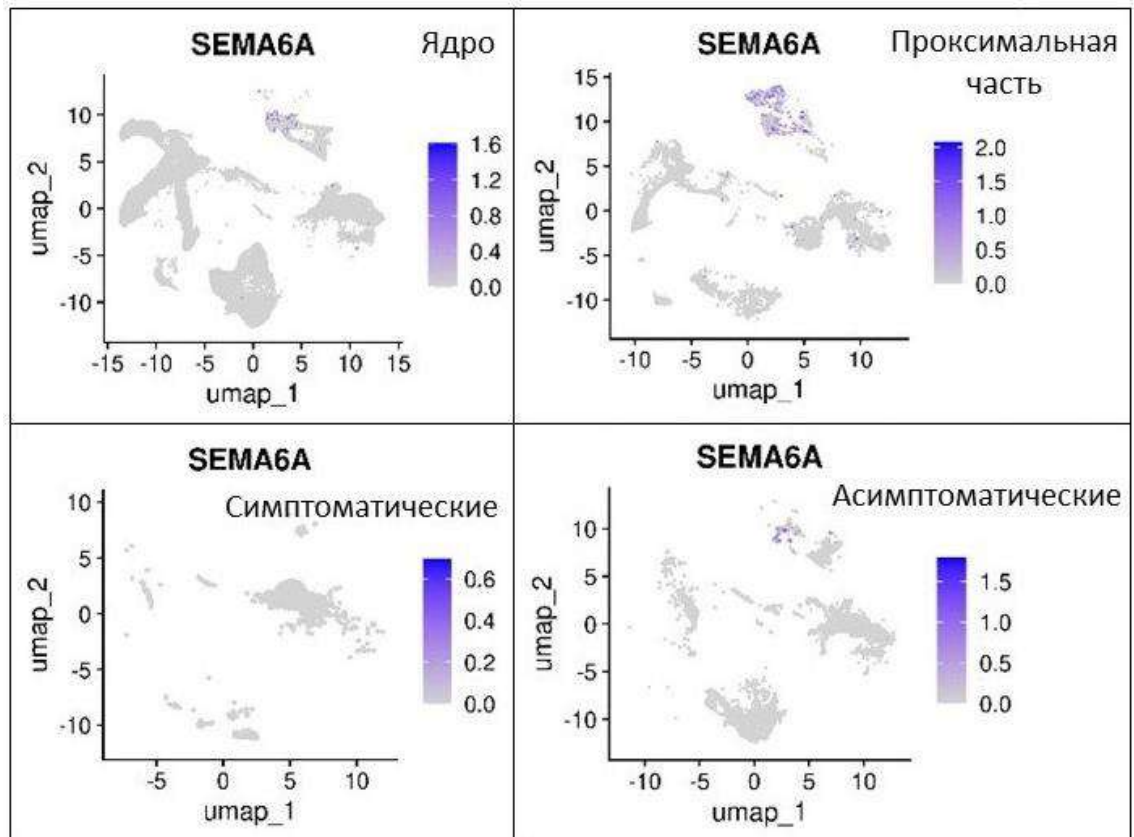
При сравнении уровня экспрессии мишеней микроРНК в наборе данных Alsaigh_2020 между клетками из ядра атеросклеротических бляшек и клетками из их проксимальной части, а также в наборе данных Pan_2020 между клетками атеросклеротических бляшек симптоматических и асимптоматических пациентов, дифференциальная экспрессия была отмечена для генов мишеней miR-27b-3p: генов семафорина *SEMA6A* в ЭК (Рисунок 46 А) и рецепторной протеин-тирозинкиназы *ROR1* в кластере ГМК-фибробласты (Рисунок 46 Б).

Следует отметить, что на модельных животных показано участие оси miR-27a/b / *SEMA6A* в ангиогенезе [Urbich C. et al., 2012], в то время как *ROR1* регулирует дифференцировку миофибробластов [Chavkin N.W. et al., 2021]. Данные мишени микроРНК miR-27b-3p, для которой показана значимая корреляция экспрессии и метилирования трех CpG-сайтов (cg20355301, cg09951047 и cg13972491), могут участвовать в процессах, происходящих при формировании и нестабильности атеросклеротической бляшки.

Таким образом, в данном диссертационном исследовании показана обратная корреляция уровня метилирования CpG-сайта cg27160395 в области CpG-островка гена *MIR10B* с экспрессией miR-10b-3p и miR-10b-5p, и CpG-сайтов cg20355301, cg09951047 и cg01726320 в области CpG-островка и CpG-берега промоторного региона гена *MIR23B* с экспрессией miR-27b-3p и miR-23b-3p. Уровень метилирования CpG-сайтов cg01558401, cg26585864 и cg01726320 в предполагаемом промоторном регионе гена *MIR143HG* обратно коррелирует с экспрессией miR-145-3p и miR-143-3p, в то время как метилирование CpG-сайтов cg16684117, cg21242144 и cg04317047, расположенных в «теле» гена *MIR143*, прямо коррелируют с экспрессией miR-145-3p и/или miR-143-3p. Значимая корреляция указывает на регуляторную роль областей, в которые входят проанализированные CpG-сайты, в отношении микроРНК — при этом для метилирования предполагаемых промоторных областей генов наблюдается обратная корреляция с экспрессией микроРНК, а для метилирования «тела» гена *MIR143* — корреляция прямая.

Поскольку для микроРНК miR-10b, miR-143/145 и кластера miR-23b/-27b/-24-1, а также некоторых их мишеней, показана роль в развитии атеросклероза (про- или антиатерогенная), можно говорить о том, что изменение метилирования генов микроРНК через сеть взаимодействия микроРНК и их мишеней, способно влиять на развитие атеросклероза на различных этапах, вплоть до дестабилизации атеросклеротической бляшки. Причем наибольший интерес для дальнейшего исследования в отношении формирования и нестабильного течения атеросклеротического поражения сонных артерий представляют оси miR-10b-5p (*KLF4*), miR-10b-5p (*NCOR2*), miR-10b-5p/*ABCA1* и miR-27b-3p/*ABCA1*, а также miR-27b-3p/*SEMA6A* и miR-27b-3p/*ROR1*.

А



Б

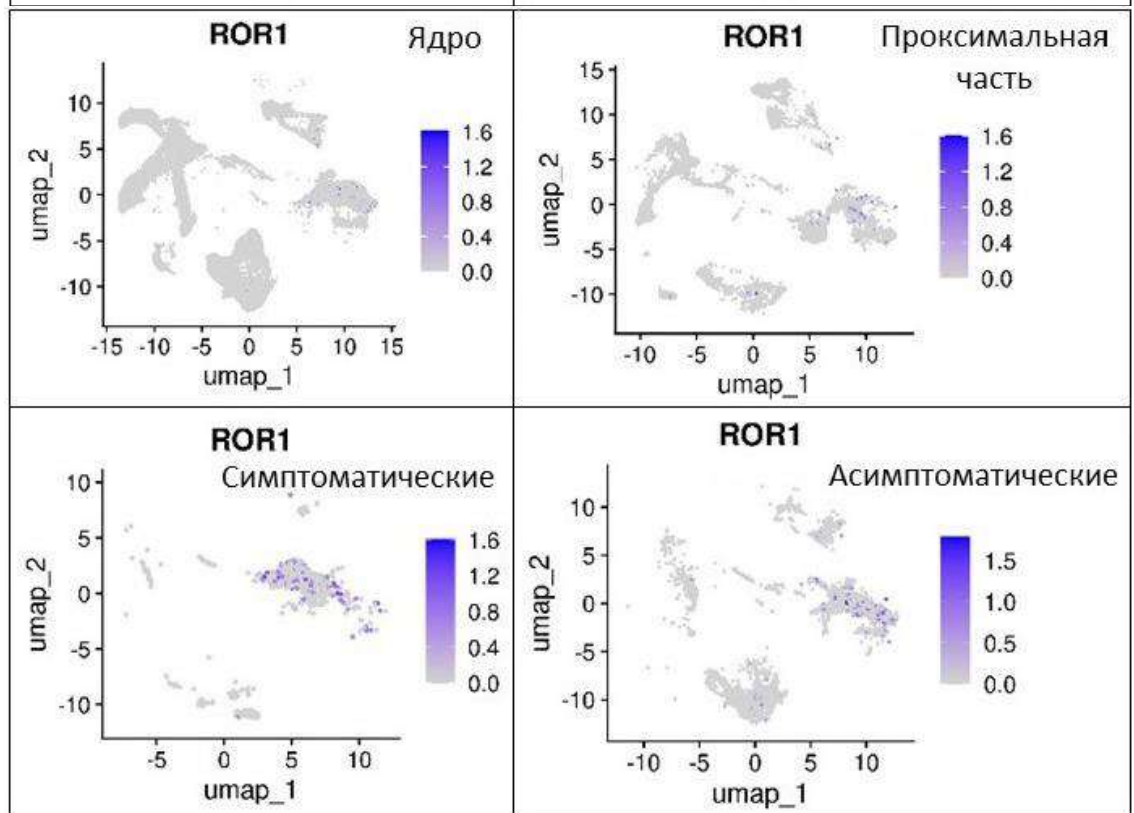


Рисунок 46. Экспрессия генов *SEMA6A* (А) и *ROR1* (Б) в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий в наборах данных *Alsaigh_2020* и *Pan_2020*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нестабильное состояние атеросклеротической бляшки сонных артерий лежит в основе наиболее частых причин смертности и инвалидности, таких как ишемический инсульт, хронические формы недостаточности кровоснабжения мозга и др. [Захаров В.В., 2007]. В настоящее время рассматриваются многочисленные маркеры нестабильности атеросклеротической бляшки сонных артерий, в числе которых микроРНК — малые регуляторные биомолекулы [Королёва Ю.А. с соавт., 2018; Martinez E. et al., 2020; Puig N. et al., 2020].

К настоящему времени имеется несколько десятков работ, в которых анализировалось изменение экспрессии микроРНК в клетках сонных артерий при их поражении атеросклерозом у человека *in vivo* с использованием различных групп сравнения, подходов и методов [Cipollone F. et al. 2011; Lovren F. et al., 2012; Nazari-Jahantigh M. et al., 2012; Cao J. et al., 2014; Bazan H.A. et al., 2015; Maitrias P. et al., 2015; Markus B. et al., 2016; Jin H. et al., 2018; Katano H. et al., 2018; Wang H. et al., 2019; Collura S. et al., 2021; González-López P. et al., 2022; Deng Y. et al., 2023].

Известно, что экспрессия микроРНК контролируется, в том числе, посредством метилирования скоплений CpG-динуклеотидов, перекрывающих промоторные участки генов или локализованных рядом с сайтом начала транскрипции микроРНК [Логинов В.И. с соавт., 2015; Morales S. et al., 2017]. В случае метилирования гена «вокруг» TSS точки старта транскрипции наблюдается преимущественно отрицательная корреляция с экспрессией, но уровень метилирования в «теле» гена и экспрессия генов коррелируют, напротив, положительно [Deng J. et al., 2009]. В то же время исследования, в которых оценивается связь изменения метилирования в области генов микроРНК с их экспрессией при атеросклерозе и его клинических осложнениях, немногочисленны. В данных работах, в основном, анализируется уровень метилирования ДНК в клетках сосудов, пораженных атеросклерозом по сравнению с интактными тканями. К настоящему времени нет исследований, где был бы проанализирован уровень метилирования ДНК в области регуляторных элементов генов микроРНК в клетках артерий при их атеросклеротическом поражении и развитии нестабильности данного процесса.

В связи с вышеизложенным, целью данного диссертационного исследования стала характеристика метилирования в области регуляторных элементов генов микроРНК как эпигенетического механизма контроля экспрессии данных молекул при формировании и нестабильном течении клинически выраженного атеросклеротического процесса в сонных артериях.

Согласно данным литературы, в более чем двух работах показано, что экспрессия miR-10b, miR-21, miR-143/-145, miR-100 и miR-127 изменяется в сонных артериях при формировании и нестабильном течении атеросклеротического процесса [Cipollone F. et al. 2011; Lovren F. et al., 2012; Nazari-Jahantigh M. et al., 2012; Cao J. et al., 2014; Bazan H.A. et al., 2015; Maitrias P. et al.,

2015; Markus B. et al., 2016; Jin H. et al., 2018; Katano H. et al., 2018; Wang H. et al., 2019; González-López et al., 2022]. В связи с этим, на первом этапе в диссертационном исследовании был проанализирован уровень метилирования CpG-сайтов регуляторных элементов генов данных микроРНК в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах, а также в лейкоцитах крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и контрольной группы. В качестве регуляторных элементов генов микроРНК для анализа их уровня метилирования выбраны восемь областей: CpG-островок *MIR10B*; предполагаемый промоторный регион, область CpG-островка и «тела» *MIR21*; E-бокс регион *MIR100*; CpG-островок *MIR127*; предполагаемый промоторный регион и «тело» *MIR143*. По каждому региону была рассчитана погрешность измерения метилирования ДНК в поражённых и непоражённых атеросклерозом сонных артериях, в больших подожных венах и в лейкоцитах периферической крови. Полученные результаты были сопоставлены с внешними данными анализа метилирования в области кандидатных генов микроРНК в тканях сосудов и ЛПК пациентов с атеросклерозом различной локализации (сонные, коронарные артерии и аорта), в том числе при развитии ОНМК и без такового события в анамнезе.

В результате исследования выявлено, что уровень метилирования ДНК во всех проанализированных регионах генов микроРНК (*MIR10B*, *MIR21*, *MIR100*, *MIR127* и *MIR143*) имеет тканеспецифичный характер между ЛПК индивидов (пациентов или контрольной группы) и тканями сосудов (атеросклеротическими бляшками сонных артерий, их интактными частями или большими подкожными венами). Более низкий уровень метилирования в ЛПК по сравнению с тканями сосудов отмечен в отношении CpG-островка гена *MIR10B* (24,0-26,5% vs. 26,9-70,8%, $p<0,016$) и «тела» гена *MIR143* (27,5-27,7% vs. 67,8-82,2%, $p<0,001$). Противоположная картина — значимое повышение уровня метилирования ДНК в лейкоцитах относительно тканей сосудов показана для всех регионов гена *MIR21* — промотора (30,3-36,8% vs. 1,7-5,7%, $p<0,001$), CpG-островка (62,4-66,1% vs. 7,2-12,7%, $p<0,001$) и «тела» (61,4-61,8% vs. 8,7-24,5%, $p<0,001$), *MIR100* (62-66% vs. 7-13%, $p<0,001$) и *MIR143HG* (*CARMN*) (83,5-84,4% vs. 17,4-29,3%, $p<0,001$).

Для CpG-островка гена *MIR127* во всех типах изучаемых тканей по абсолютному большинству CpG-сайтов выявлен высокий уровень метилирования (>80%). Исключение составил CpG-сайт, совпадающий с однонуклеотидным полиморфизмом rs34163305:C>T. В этом случае, альтернативный аллель Т приводит к отсутствию CpG-динуклеотида, следовательно, у гомозигот по минорному аллелю уровень метилирования равен 0%, а у гетерозигот находится в области 50%. Статистически значимыми были различия между ЛПК пациентов и поражёнными сонными артериями (94,3% vs 93,3%, $p=0,014$), а также между ЛПК как пациентов, как и контрольной группы и большими подкожными венами (94,3% vs 95,4%, $p=0,001$; 94,4% vs 95,4%, $p=0,034$). Наблюдаемые различия превысили максимальную

погрешность измерения метилирования для области CpG-островка и гена *MIR127*: $\pm 0,7\%$ в поражённых и непоражённых артериях; $\pm 0,9\%$ в венах. В нескольких последовательных CpG-сайтах в области CpG-островка гена *MIR127* установлено снижение уровня метилирования в поражённых сонных артериях по сравнению с венами: для региона chr14:101,349,589-101,349,731 минимальная и максимальная разница уровней метилирования между поражёнными сонными артериями и большими подкожными венами составила 2,21% и 5,47%, а для и chr14:101,349,772-101,349,833 – 2,40% и 7,07%.

Уровень метилирования CpG-сайтов в поражённых атеросклерозом сонных артериях был значимо снижен по сравнению с интактными сосудами в области CpG-островка *MIR10B* (на 8,5%, $p < 0,001$), в «теле» *MIR21* (на 11,7%, $p < 0,001$), в области регуляторного элемента E-box *MIR100* (на 9,6%, $p < 0,001$) и в «теле» *MIR143* (на 6,9%, $p = 0,019$). Все различия превысили максимальную погрешность измерения метилирования ДНК соответствующих регионов в сонных артериях ($\pm 3,8\%$ для *MIR10B*, $\pm 3,4\%$ для «тела» *MIR21*, $\pm 1,3\%$ для *MIR100* и $\pm 4,7\%$ для «тела» *MIR143*). Для предполагаемого промоторного региона гена *MIR143HG* также заметно снижение уровня метилирования в АСБ (на 3,2%), но различия не достигают статистической значимости ($p = 0,262$). Наиболее высокий уровень метилирования (достигающий 100% в отдельных CpG-сайтах) среди всех исследованных тканей сосудов в области CpG-островка и «тела» гена *MIR127* выявлен в больших подкожных венах, которые не подвержены атеросклеротическому поражению. Предполагаемый промоторный регион гена *MIR21*, наоборот, характеризуется гиперметилированием в АСБ по сравнению с непоражаемыми венами (5,7% vs. 1,7%, $p = 0,021$). Следовательно, для всех анализируемых регионов генов микроРНК есть связь уровня метилирования ДНК с формированием атеросклеротического процесса в сонных артериях. Причем, атеросклеротическое поражение сонных артерий преимущественно характеризуется гипометилированием регуляторных элементов и «тела» генов микроРНК по сравнению с интактными сосудами.

Из клинических патогенетически значимых для атеросклероза показателей, обнаружено умеренное увеличение уровня метилирования CpG-сайта (chr11:122,025,143) в области E-box гена *MIR100* (на 3,1%) в клетках АСБ у пациентов с наличием фактора риска атеросклероза – метаболического синдрома по сравнению с таковыми без него. В работе Pankratz с соавт. показано значительное подавление экспрессии miR-100 в АСБ, богатых макрофагами и характеризующихся большим содержанием липидов, в результате чего происходит mTOR- и NF- κ B-зависимая активация воспаления сосудов [Pankratz F. et al., 2018]. Пациенты с ожирением и сахарным диабетом 2 типа имеют более низкий уровень данной микроРНК в сыворотке и в жировой ткани [Pek S.L. et al., 2016]. Более того, в эксперименте на модельных животных

показано системное протективное влияние гиперэкспрессии miR-100 при метаболическом синдроме, вызванном диетой с высоким содержанием жиров [Smolka C. et al., 2021].

Особенностью данной диссертационной работы являлась морфологическая характеристика АСБ сонных артерий с учетом широкого спектра параметров, что позволило проанализировать связь метилирования анализируемых регионов генов микроРНК и гистологической нестабильности АСБ. В результате установлены ассоциации отдельных CpG-сайтов генов микроРНК и изучаемых параметров. Так, уровень метилирования CpG-сайтов гена *MIR10B* снижался при наличии тромботических масс на поверхности АСБ (на 20%, $p < 0,001$), обратно коррелировал с количеством макрофагов ($\rho = -0,345$, $p = 0,045$), и прямо – с количеством пенистых клеток в ядре АСБ ($\rho > 0,538$, $p < 0,032$). Для 8 CpG-сайтов в области CpG-островка гена *MIR127* показаны единичные обратные корреляции с такими отдельными показателями как толщина покрышки бляшки (3 CpG-сайта, $\rho < -0,392$, $p < 0,043$), размер ядра бляшки (3 CpG-сайта, $\rho < -0,424$, $p < 0,035$), количество макрофагов ($\rho = -0,571$, $p = 0,005$), лимфоцитов ($\rho = -0,502$, $p = 0,006$) и нейтрофилов (2 CpG-сайта, $\rho < -0,673$, $p < 0,033$). В то же время для двух CpG-сайтов гена *MIR127* отмечена прямая корреляция с количеством макрофагов ($\rho = 0,410$, $p = 0,037$), лимфоцитов ($\rho = 0,405$, $p = 0,018$) и пенистых клеток ($\rho = 0,684$, $p = 0,042$).

В отношении связи уровня метилирования ДНК и гистологической нестабильности АСБ показано изменение уровня метилирования не только отдельных CpG-сайтов, но и региона в целом для предполагаемого промоторного региона гена *MIR21*. Снижение уровня данного региона в АСБ ассоциировано с наличием кровоизлияний (на 7,3%, $p = 0,019$) и пенистых клеток (на 7,0% $p = 0,032$). Таким образом, взаимосвязь уровня метилирования в области генов микроРНК с количеством воспалительных клеток неоднозначна и разнонаправленная корреляция может наблюдаться не только для разных генов микроРНК, но и для сайтов в одном и том же гене микроРНК — в гене *MIR127* отмечена разнонаправленная корреляция разных сайтов с количеством макрофагов и лимфоцитов.

При анализе связи уровня метилирования ДНК в АСБ сонных артерий с ОНМК в анамнезе пациентов значимое повышение уровня метилирования отмечено только для 7 отдельных CpG-сайтов гена *MIR127*, максимальное для двух соседних CpG-сайтов: chr14:101,349,509 (7,7%) и chr14:101,349,515 (6,9%). Для этих же двух CpG-сайтов отмечена отрицательная корреляция с толщиной фиброзной покрышки атеросклеротической бляшки, а для chr14:101,349,509 — отрицательная корреляция с размером ядра атеросклеротической бляшки. Для других регионов либо не было отмечено различий (*MIR10B*, промотор и CpG-островок гена *MIR21*), либо анализ связи с ОНМК не проводился («тело» гена *MIR21*, *MIR100*, 2 региона *MIR143HG*).

Уровень метилирования *MIR21* (область «тела» гена), *MIR100* (E-box) и обоих регионов *MIR143* в ЛПК пациентов с атеросклерозом сонных артерий не отличается от такового у

относительно здоровых индивидов сопоставимого возраста. Однако в ЛПК пациентов по сравнению с контролем выявлено гипометилирование отдельных CpG-сайтов генов *MIR21* в области предполагаемого промоторного региона (на 1,5-7,5%, $p < 0,015$) и CpG-островок (на 2,0-8,7%, $p < 0,038$). Два CpG-сайта (chr2:177,014,966 и chr2:177,015,208) анализируемого региона гена *MIR10B* были гипометилированы в ЛПК пациентов по сравнению с контрольной группой (на 7%, $p = 0,019$ и 10%, $p = 0,047$, соответственно), а также их уровень метилирования отрицательно коррелировал с уровнем общего холестерина ($\rho = -0,627$, $p < 0,001$; $\rho = -0,701$, $p < 0,001$, соответственно) и липопротеинов низкой плотности ($\rho = -0,636$, $p = 0,026$; $\rho = -0,643$, $p = 0,024$, соответственно), индексом атерогенности ($\rho = -0,772$, $p = 0,003$; $\rho = -0,789$, $p = 0,002$, соответственно) и степенью стеноза сонных артерий ($\rho = -0,490$, $p = 0,002$; $\rho = -0,470$, $p < 0,001$, соответственно). В ЛПК пациентов с атеросклерозом сонных артерий в генах *MIR143* (в области предполагаемого промоторного региона *MIR143HG* и «тела») и *MIR127* (CpG-островок и «тела») обнаружены разнонаправленные корреляции умеренной и высокой силы уровня метилирования отдельных CpG-сайтов с возрастом и патогенетически значимыми признаками атеросклероза (показатели липидного обмена, уровень глюкозы в крови и степень стеноза сонных артерий). Причем с патогенетически значимыми признаками атеросклероза установлена умеренная отрицательная корреляция уровня метилирования CpG-сайтов в регуляторных элементах генов *MIR143* (промотор) и *MIR10B* (CpG-островок), высокая положительная корреляция для области «тела» гена *MIR143* и умеренная разнонаправленная в CpG-островке гена *MIR127*. Не исключено, что уровень метилирования этих регионов генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR127* и *MIR143* в ЛПК может быть биомаркером развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий.

При сравнении уровня метилирования анализируемых регионов генов микроРНК в ЛПК относительно здоровых индивидов, пациентов с атеросклерозом сонных артерий в сочетании с ОНМК в анамнезе и без такого события статистически значимых различий не выявлено. Однако наиболее перспективным биомаркером развития острых сосудистых событий, в том числе ОНМК у пациентов с атеросклерозом сонных артерий, является анализ уровня метилирования CpG-островка гена *MIR127*, который входит в импринтированный локус 14q32. Поскольку при сопоставлении результатов настоящего исследования и внешних данных Soriano-Tárraga С. (2018), показано изменение уровня метилирования его отдельных CpG-сайтов в ЛПК контроля и пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и с инсультом, в том числе атеросклеротического генеза. Для решения этого вопроса необходимо выполнить репликацию полученных ассоциаций в больших по размеру выборках, в том числе в дизайне проспективного клинического исследования.

Полученные результаты настоящего исследования по уровню метилирования в целом согласуются с таковыми микрочиповых исследований, причём рисунок метилирования

аннотированных на микрочипах CpG-сайтов генов микроРНК показывает большее сходство между различными исследованиями (вплоть до полного совпадения, см. Рисунки 20, 34) в ЛПК, чем в тканях сосудов. Это может быть отражением различий в методических подходах – метилочипы (внешние данные) и бисульфитное секвенирование ДНК (настоящая работа), а также существенной клеточной гетерогенности АСБ.

В связи с этим, на втором этапе исследования проведен анализ связи уровня метилирования CpG-сайтов широкого спектра генов микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий в зависимости от степени их нестабильности с учетом клеточного состава. Для проведения этого раздела работы были использованы данные, загруженные из электронного хранилища Gene Expression Omnibus (GSE149759). Li Jingjin с соавт. (2021) проанализировали на микрочипах Infinium Methylation 450K и MethylationEPIC BeadChip (он же Methylation850 Beadchip) метилирование ДНК в образцах нестабильных (n=6) и стабильных атеросклеротических бляшек сонных артерий (АСБ) (n=8), а также контрольных образцов тканей левой внутренней грудной артерии (ВГА, n=4), которая практически никогда не поражается атеросклерозом [Li J. et al., 2021].

Важным аспектом данной работы был учет как клинической нестабильности АСБ – острое сосудистое событие (ТИА или инсульт) в течение 6 мес. до операции, так и гистологический анализ образцов – «уязвимые» или нестабильные АСБ имели кристаллы холестерина, а стабильные – выраженный фиброз (фиброатерома). Между тремя группами сравнения были выявлены дифференциально метилированные CpG-сайты (ДМС), также при анализе данных проводилась биоинформатическая деконволюция тканей сосудов и вводилась поправка на их клеточный состав.

В результате при сравнении ДМС генов микроРНК и/или их регуляторных элементов между АСБ сонных артерий (нестабильные, стабильные) и интактными ВГА выделено 44 общих CpG-сайта. Большая часть этих CpG-сайтов (37-84%) гипометилирована в нестабильных АСБ по сравнению как со стабильными АСБ, так и с интактными ВГА.

Далее для мишеней микроРНК, в «телах» и/или регуляторных элементах которых выявлены 44 ДМС между АСБ и ВГА, был проведён анализ функционального обогащения. По его результатам наиболее представленными оказались регуляция таких биологических процессов (GO:0065007) как программируемая клеточная смерть и транскрипция, процессы развития (GO:0032502) и ответ на эндогенные стимулы (GO:0009719). Согласно базе данных KEGG и программе Metascape, наиболее значимыми молекулярными путями для мишеней микроРНК были метаболизм липидов и атеросклероз, организация внеклеточного матрикса, фокальная адгезия. Обнаружено, что четыре микроРНК (miR-29b-2, -29c, -125b-1 и miR-155)

взаимодействуют с транскрипционным фактором p53, участвующим в развитии нестабильности атеросклеротической бляшки.

Следует отметить, что клеточный состав артерий играет существенную роль при формировании нестабильности АСБ: ДМС не выявлено при сравнении нестабильных и стабильных АСБ при введении поправки на клеточный состав. По два и более гипометилированных CpG-сайта обнаружено в локусах *NUP210L* (miR-5698; miR-190b), *RGS22* (miR-1273a), а также в локусе, включающем ген *AOPEP* (*C9orf3*) и промоторы *MIR23B* и *MIR3074* (miR-23b/27b/24-1) в нестабильных АСБ по сравнению с интактными ВГА при учете клеточного состава.

В целом по результатам первого и второго этапов исследования можно предположить, что изменение уровня метилирования CpG-сайтов в «телах» и/или регуляторных элементах генов микроРНК приводит к изменению уровня их экспрессии (cis-miR-eQTM), что в свою очередь, отражается на взаимодействии микроРНК с мРНК-мишенями и на продукции соответствующих белков. В связи с этим, на третьем этапе работы был сопоставлен уровень метилирования анализируемых 44 CpG-сайтов генов микроРНК, выявленных на предыдущих этапах исследования, с экспрессией 23 зрелых микроРНК в одних и тех же АСБ сонных артерий (n=14), проанализированных с помощью метилочипа (Infinium MethylationEPIC BeadChip, Illumina) и бисульфитного секвенирования зрелых микроРНК (miRNA-seq).

В результате установлена высокая прямая корреляция между метилированием трёх CpG-сайтов и экспрессией miR-145-3p и/или miR-143-3p (всего 5 пар). Однако большинство – для 8 CpG-сайтов и 7 микроРНК (miR-10b-3p, miR-10b-5p, miR-23b-3p, miR-24-1-5p, miR-27b-3p, miR-143-3p и miR-145-3p) выявлено 16 пар с обратной корреляцией метилирования ДНК и экспрессии зрелых микроРНК.

Наиболее сильные отрицательные корреляции показаны для уровней экспрессии miR-27b-3p и miR-23b-3p с уровнем метилирования трёх CpG-сайтов в области промотора и «тела» гена *MIR23B* – cg13972491 ($\rho = -0,837$, $p < 0,001$; $\rho = -0,732$, $p = 0,005$), cg09951047 ($\rho = -0,807$, $p < 0,001$; $\rho = -0,701$, $p = 0,007$) и cg20355301 ($\rho = -0,749$, $p = 0,003$; $\rho = -0,600$, $p = 0,026$). Наличие только отрицательной корреляции обнаружено для экспрессии miR-10b-5p и miR-10b-3p и cg27160395 ($\rho = -0,653$, $p = 0,011$; $\rho = -0,626$, $p = 0,011$). Для уровня экспрессии микроРНК miR-145-3p и miR-143-3p показана отрицательная корреляция с уровнем метилирования cg01726320 ($\rho = -0,705$, $p = 0,006$; $\rho = -0,569$, $p = 0,037$), cg01558401 ($\rho = -0,749$, $p = 0,003$; $\rho = -0,662$, $p = 0,020$) и cg26585864 ($\rho = -0,749$, $p = 0,003$; $\rho = -0,662$, $p = 0,020$), располагающимися вблизи от TSS гена *MIR143HG* (*CARMN*). Напротив, положительная корреляция с уровнем экспрессии микроРНК miR-145-3p и miR-143-3p показана для CpG-сайтов, расположенных в «теле» гена *MIR143HG* (*CARMN*), cg04317047 ($\rho = 0,679$, $p = 0,010$), cg16684117 ($\rho = 0,692$, $p = 0,008$;

$\rho=0,059$, $p=0,037$) и *cg21242144* ($\rho=0,811$, $p<0,001$; $\rho=0,631$, $p=0,018$). Это отчасти согласуется с литературными данными о положительной связи метилирования CpG-сайтов, приходящихся на области «тела» генов микроРНК и экспрессии этих микроРНК в цельной крови участников Фремингемского исследования заболеваний сердца [Huan T. et al., 2020]. В то же время, следует подчеркнуть, что о данной закономерности можно говорить только в отношении гена-хозяина, *MIR143HG* (экспрессия которого, по некоторым данным, осуществляется с того же промотора, что и *MIR143*), в то время как для самих генов *MIR143* и *MIR145* нет явной взаимосвязи между дистанцией от дифференциально метилированного CpG-сайта до собственно гена микроРНК. Частично подтверждается в данном случае и наблюдение Huan с соавт. о преимущественном расположении CpG-сайтов, изменение уровня метилирования которых влияет на экспрессию генов, в 5'-направлении от гена микроРНК: большая часть (8 из 11) CpG-сайтов, прямо либо обратно коррелирующих с экспрессией микроРНК располагались в именно в 5'-направлении. Однако интересно отметить, что все три сайта, обратно коррелирующие с уровнем экспрессии *miR-23b-3p*, *miR-27b-3p* и *miR-24-1-5p*, располагались в 3'-направлении от соответствующих генов.

В данном диссертационном исследовании не обнаружено значимых корреляций уровня метилирования CpG-сайтов в области *MIR10B*, *MIR143HG* (*CARMN*) и *MIR143* в атеросклеротической бляшке с какими-либо клиническими признаками. Также не установлено значимых корреляций экспрессии *miR-21*, *miR-100* и *miR-127* с проанализированными CpG-сайтами. Не исключено, что за изменение экспрессии данных микроРНК при патологическом процессе может отвечать какой-либо другой регуляторный элемент, либо регуляция осуществляется не с помощью метилирования CpG-динуклеотидов ДНК, а каких-либо других генетических и эпигенетических механизмов.

Среди потенциальных мишеней 7 микроРНК (*miR-10b-3p*, *miR-10b-5p*, *miR-143-3p*, *miR-145-3p*, *miR-23b-3p*, *miR-27b-3p* и *miR-24-1-5p*), регулируемых через изменение уровня метилирования отдельных CpG-сайтов, было 20 генов (экспериментально валидированных с высоким уровнем доказательности в трех базах данных *miRDB*, *TarBase v.9.0* и *miRTarBase v.9.0* на разных объектах), в том числе и тех, белковые продукты которых связаны с регуляцией ангиогенеза (GO:0016525: *NF1*, *PPARG*, *KLF4*, *VASH1*, *SEMA6A*, *CDH11*, *CCNG1*, *ROR1*, *E2F7*, *VAV3*) и ответом на повреждение ДНК (GO:0006974: *CCNG1*, *EYA4*, *FOXO1*, *FOXO1*, *VAV3*, *E2F7*, *ADORA2B*, *KLF4*, *HOXD10*). Однако при сопоставлении уровня экспрессии данных генов в исследованиях *scRNA-seq* контрольных областей и АСБ сонных артерий, взятых у пациентов с/без ОНМК в анамнезе, наиболее перспективными для дальнейшего исследования в отношении формирования и нестабильного течения атеросклеротического поражения сонных артерий

являются miR-10b-5p/KLF4, miR-10b-5p/NCOR2, miR-10b-5p/ ABCA1 и miR-27b-3p/ABCA1, а также miR-27b-3p/SEMA6A и miR-27b-3p/ROR1.

Таким образом, в результате диссертационного исследования установлена тканеспецифичность метилирования ДНК в области регуляторных элементов и «тел» генов микроРНК в тканях сосудов (сонные артерии, большие подкожные вены) и лейкоцитах периферической крови у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий. Выявлена связь атеросклеротического поражения и формирования нестабильности атеросклеротической бляшки с гипометилированием регуляторных элементов и «тела» генов микроРНК в клетках сонных артерий. Идентифицированы новые кандидаты-гены микроРНК, изменение уровня метилирования которых происходит при формировании гистологической и клинической нестабильности атеросклеротической бляшки сонных артерий. Мишени эпигенетически регулируемых микроРНК вовлечены в широкий спектр биологических процессов и сигнальных путей: программируемая клеточная гибель, транскрипция, ангиогенез, метаболизм липидов и атеросклероз, организация внеклеточного матрикса, фокальная адгезия, молекулярные пути при раке, ответ на повреждение ДНК. Подчеркнута ключевая роль измененного клеточного состава сосудов, прежде всего воспалительных клеток, в отношении уровня метилирования в области генов микроРНК и их регуляторных элементов при развитии гистологической нестабильности атеросклеротического поражения сонных артерий. Показано, что сочетание у пациента атеросклероза сонных артерий и метаболического синдрома ассоциировано с изменением уровня метилирования регуляторных элементов генов микроРНК в клетках атеросклеротической бляшки. Предположено, что наиболее перспективным биомаркером развития острых сосудистых событий, в том числе ОНМК, у пациентов с атеросклерозом сонных артерий, является анализ в лейкоцитах периферической крови уровня метилирования CpG-островка гена *MIR127*, который входит в импринтированный локус 14q32.

Более того, данное исследование представляет собой важный этап на пути к более полному пониманию регуляции экспрессии микроРНК с помощью метилирования ДНК в клетках органов-мишеней при патологическом процессе на примере сонных артерий при их поражении атеросклерозом. Наиболее перспективными для дальнейшего исследования в отношении формирования и нестабильного течения клинически выраженного атеросклеротического поражения сонных артерий являются cis-miR-eQTMs в промоторах генов *MIR10B*, *MIR143HG* (*CARMN*) и *MIR143*, а также в локусе, включающем ген *AOPEP* (*C9orf3*), промоторы *MIR23B* и *MIR3074*, для которых выявлена высокая отрицательная корреляция уровня метилирования ДНК и экспрессии ближайших микроРНК (miR-10b-3p, miR-10b-5p, miR-143-3p, miR-145-3p, miR-23b-3p, miR-27b-3p и miR-24-1-5p). Однако больший уровень метилирования в CpG-сайтах «тела» гена *MIR143HG* (*CARMN*) ассоциирован, наоборот, с увеличением экспрессии

miR-145-3p и miR-143-3p в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий. Наконец, в результате настоящего исследования, принимая во внимание данные по валидированным мишеням эпигенетически регулируемых микроРНК и scRNA-seq сонных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом, обозначены регуляторные оси miR-10b-5p/KLF4, miR-10b-5p/NCOR2, miR-10b-5p/ABCA1 и miR-27b-3p/ABCA1, miR-27b-3p (SEMA6A и ROR1) которые могут быть значимы в отношении формирования и нестабильного течения атеросклеротического поражения сонных артерий.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий уровень метилирования в области регуляторных элементов и «тел» генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR100*, *MIR127* и *MIR143* различается между лейкоцитами периферической крови и тканями сосудов (сонных артерий, больших подкожных вен).
2. Атеросклеротическое поражение сонных артерий преимущественно характеризуется умеренным гипометилированием в промоторе и «теле» генов *MIR10B* и *MIR143*, CpG-островка и «тела» *MIR21*, а также E-box элемента *MIR100* по сравнению с интактными сосудами. Показано, что сочетание у пациента атеросклероза сонных артерий и метаболического синдрома ассоциировано с увеличением уровня метилирования E-box элемента гена *MIR100* в клетках атеросклеротической бляшки.
3. Уровень метилирования CpG-сайтов в промоторном регионе гена *MIR21*, а также в области CpG-островков генов *MIR10B* и *MIR127* разнонаправленно ассоциирован с отдельными параметрами гистологической нестабильности атеросклеротической бляшки сонной артерии (наличием тромботических масс, разрывом, кальцификатами, толщиной покрышки бляшки, размером ядра, количеством воспалительных клеток). Выявлено умеренное увеличение уровня метилирования CpG-островка гена *MIR127* в клетках атеросклеротической бляшки у пациентов с наличием ОНМК в анамнезе.
4. В лейкоцитах периферической крови пациентов установлена разнонаправленная корреляция с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и его патогенетически значимыми признаками (возрастом, показателями липидного обмена, уровнем глюкозы в крови и степенью стеноза сонных артерий) для уровня метилирования CpG-сайтов области регуляторных элементов и «тел» генов *MIR10B*, *MIR143* и *MIR127*.
5. Выявлено, что клинически и гистологически нестабильные атеросклеротические бляшки сонных артерий имеют больший процент гипометилированных CpG-сайтов в области генов микроРНК и их регуляторных элементов по сравнению с интактными артериями. При сравнении нестабильных и стабильных атеросклеротических бляшек с учетом поправки на клеточный состав дифференциально метилированных CpG-сайтов не обнаружено.
6. Анализ функционального обогащения микроРНК, в генах и/или регуляторных элементах которых были выявлены дифференциально метилированные сайты, ассоциированные с нестабильностью атеросклеротических бляшек, показал, что miR-29b-2, miR-29c, miR-125b-1 и miR-155 взаимодействуют с транскрипционным фактором p53. Мишени данных эпигенетически регулируемых микроРНК вовлечены в широкий спектр биологических процессов и сигнальных путей: процессы развития (в т.ч. программируемая клеточная гибель), транскрипция, ответ на

эндогенные стимулы, фосфорилирование белка, метаболизм липидов, организация внеклеточного матрикса и фокальная адгезия.

7. В клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий в промоторах генов *MIR10B*, *MIR143*, *MIR143HG* (*CARMN*) и *MIR23B* выявлены cis-miR-eQTMs с высокой отрицательной корреляцией уровня метилирования ДНК и экспрессии ближайших микроРНК (miR-10b-3p, miR-10b-5p, miR-143-3p, miR-145-3p, miR-23b-3p, miR-27b-3p и miR-24-1-5p). Большой уровень метилирования в CpG-сайтах «тела» гена *MIR143HG* (*CARMN*) ассоциирован, наоборот, с увеличением экспрессии miR-145-3p и miR-143-3p. В отношении формирования и нестабильного течения атеросклеротического поражения сонных артерий значимыми являются регуляторные оси: miR-10b-5p/KLF4, miR-10b-5p/NCOR2, miR-10b-5p/ABCA1 и miR-27b-3p/ABCA1, а также miR-27b-3p/SEMA6A и miR-27b-3p/ROR1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

cis-miR-eQTMс – (англ. cis-miR-expression quantitative trait methylation) – локусы количественных признаков метилирования, связанные с экспрессией близрасположенных микроРНК

CpG – (англ. cytosine-phosphate-guanine) – динуклеотид цитозин-гуанин

FDR – (англ. False Discovery Rate) – вероятность ложноположительного результата

miR – (англ. miRNA, microRNA) – микроРНК

TSS – (англ. Transcription Start Site) – точка старта транскрипции

АСБ – атеросклеротическая бляшка сонной артерии

БПВ – большие подкожные вены

ВГА – внутренняя грудная артерия

САН – макроскопически неизменённые участки стенки сонной артерии

ДМС – дифференциально метилированные CpG-сайты

ДЭП – дисциркуляторная энцефалопатия

ЛКБ – лейкоциты периферической крови пациентов с атеросклерозом

ЛКЗ – лейкоциты периферической крови контрольной группы

ЛПК – лейкоциты периферической венозной крови

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

САН – макроскопически неизменённые участки стенки сонных артерий

тыс.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

УЗИ – ультразвуковое исследование

ХИМ – хроническая ишемия мозга

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Запорожченко И. А. и др. Основы биологии микроРНК: строение, биогенез и регуляторные функции //Биоорганическая химия. – 2020. – Т. 46. – №. 1. – С. 3-17.
2. Зарубин А. А. Экспрессия микроРНК и метилирование ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий: дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2022. Режим доступа: https://www.tnimc.ru/dissertatsionnye-sovety/dissertatsionnyy-sovet-4/zashchity/%D0%97%D0%B0%D1%80%D1%83%D0%B1%D0%B8%D0%BD/dissertation_Zarubin.pdf
3. Захаров В. В. Атеросклероз церебральных и периферических артерий // Русский медицинский журнал. – 2007. – Т. 15. – №. 10. – С. 833-836.
4. Какорина Е. П., Никитина С. Ю. Особенности структуры смертности в Российской Федерации // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. – 2019. – Т. 27. – №. 5. – С.822-826.
5. Кичерова О. А. и др. Современные проблемы дисциркуляторной энцефалопатии // Медицинская наука и образование Урала. – 2019. – Т. 20. – № 3(99). – С. 173-176.
6. Королёва Ю. А., Назаренко М. С., Кучер А. Н. Роль микроРНК в формировании нестабильности атеросклеротической бляшки // Биохимия. – 2018. – Т. 83. – № 1. – С. 34-46.
7. Кучер А. Н., Бабушкина Н. П. Роль микро-РНК, генов их биогенеза и функционирования в развитии патологических состояний у человека // Медицинская генетика. – 2011. – №. 1. – С. 3-13
8. Кучер А. Н., Назаренко М. С. Роль микро-РНК при атерогенезе // Кардиология. – 2017. – Т. 57. – №. 9. – С. 65-76. DOI: 10.18087/cardio.2017.9.10022
9. Логинов В. И. и др. Метилирование генов микро-РНК и онкогенез // Биохимия. – 2015. – Т. 80. – №. 2. – С. 184-203.
10. Марков А. В. и др. Уровень метилирования промоторного региона гена *HOXD4* у больных атеросклерозом // Медицинская генетика. – 2014. – Т. 13. – № 1 (139). – С. 39-42.
11. Милосердов М. А. и др. Заболеваемость населения Смоленской области острыми нарушениями мозгового кровообращения: роль социально-экономических факторов и состояния системы здравоохранения // Здравоохранение Российской Федерации. – 2022. – Т. 66. – № 4. – С. 275-281.
12. Назаренко М. С. и др. Идентификация дифференциально метилированных генов, потенциально связанных с атеросклерозом у человека // Российский кардиологический журнал. – 2017. – Т. 10. – № 150. – С. 42-48.
13. Назаренко М. С. и др. Регулом микроРНК при различных фенотипах атеросклероза // Молекулярная биология. – 2022. – Т. 56. – № 2. – С. 227-243.

14. Олейникова Т. А. Структурный анализ ассортимента лекарственных препаратов в терапии ишемического инсульта с позиции оптимизации затрат // Региональный вестник (Курск). – 2020. – № 1 (40). – С. 71-72.
15. Поморцев А. В., Шевелев В. И., Багдасарян К. А. Ультразвуковая диагностика патологий сонных артерий // Russian Electronic Journal of Radiology. – 2020. – Т. 10. – № 2. – С. 195-204.
16. Рагино Ю. И., Волков А. М., Чернявский А. М. Стадии развития атеросклеротического очага и типы нестабильных бляшек - патофизиологическая и гистологическая характеристика // Российский кардиологический журнал. – 2013. – Т. 18. – № 5. – С. 88-95.
17. Сергиенко И. В., Аншелес А. А. Патогенез, диагностика и лечение атеросклероза: практические аспекты // Кардиологический вестник. – 2021. – Т. 16. – № 1. – С. 64-72.
18. Филиппова Е. А. и др. Группа гиперметилированных генов микроРНК при раке молочной железы: диагностический потенциал // Молекулярная биология. – 2019. – Т. 53. – № 3. – С. 421-429.
19. Чечеткин А. О. и др. Новые подходы к оценке признаков нестабильности атеросклеротической бляшки в сонных артериях // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2017. – Т. 11. – № 1. – С. 47-54.
20. Aarli S. J. et al. The course of carotid plaque vulnerability assessed by advanced neurosonology // Frontiers in neurology. – 2021. – V. 12. – P. 702657.
21. Aavik E. et al. Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster // European heart journal. – 2015. – V. 36. – N 16. – P. 993-1000.
22. Abela G. S., Aziz K. The role of cholesterol crystals in plaque rupture leading to acute myocardial infarction and stroke / Abela G. S., Nidorf S. M. (eds) // Cholesterol crystals in atherosclerosis and other related diseases. Contemporary cardiology. – Humana, Cham, 2023.
23. Adams A. T. et al. Two-stage genome-wide methylation profiling in childhood-onset Crohn's Disease implicates epigenetic alterations at the *VMP1/MIR21* and *HLA* loci // Inflammatory bowel diseases. – 2014. – V. 20. – N 10. – P. 1784-1793.
24. Aherrahrou R. et al. Genetic regulation of atherosclerosis-relevant phenotypes in human vascular smooth muscle cells // Circulation research. – 2020. – V. 127. – N 12. – P. 1552-1565.
25. Akalin A. et al. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles // Genome biology. – 2012. – V. 13. – N 10. – P. R87.
26. Ali Syeda Z. et al. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer // International journal of molecular sciences. – 2020. – V. 21. – N 5. – P. 1723.

27. Alsaigh T. et al. Decoding the transcriptome of atherosclerotic plaque at single-cell resolution // *bioRxiv* 2020.03.03.968123.
28. Andreou I. et al. miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture // *Trends in molecular medicine*. – 2015. – V. 21. – N 5. – P. 307-318.
29. Andrés-León E., Núñez-Torres R., Rojas A. M. miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – P. 25749.
30. Arbab-Zadeh A., Fuster V. The myth of the “vulnerable plaque”: transitioning from a focus on individual lesions to atherosclerotic disease burden for coronary artery disease risk assessment // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2015. – V. 65. – P. 846-855.
31. Aryee M. J. et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2014. – V. 30. – N 10. – P. 1363-1369.
32. Badacz R. et al. Circulating miRNA levels differ with respect to carotid plaque characteristics and symptom occurrence in patients with carotid artery stenosis and provide information on future cardiovascular events // *Advances in Interventional Cardiology/Postępy w Kardiologii Interwencyjnej*. – 2018. – V. 14. – N 1. – P. 75-84
33. Badacz R. et al. microRNAs associated with carotid plaque development and vulnerability: The clinician's perspective // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – V. 23. – N 24. – P. 15645.
34. Baer C. et al. Extensive promoter DNA hypermethylation and hypomethylation is associated with aberrant microRNA expression in chronic lymphocytic leukemia // *Cancer Research*. – 2012. – V. 72. – N 15. – P. 3775-3785.
35. Baer C., Claus R., Plass C. Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer // *Cancer Research*. – 2013. – V. 73. – N 2. – P. 473-477.
36. Bao M. H. et al. Effects of miR-590 on oxLDL-induced endothelial cell apoptosis: Roles of p53 and NF- κ B // *Molecular medicine reports*. – 2016. – V. 13. – N 1. – P. 867-873.
37. Baumer Y. et al. Cholesterol crystals and atherosclerosis // *European heart journal*. – 2020. – V. 41. – N 24. – P. 2236–2239. – P. 108237.
38. Bazan H. A. et al. Acute loss of miR-221 and miR-222 in the atherosclerotic plaque shoulder accompanies plaque rupture // *Stroke*. – 2015. – V. 46. – P. 3285-3287.
39. Bazan H. A. et al. Carotid plaque rupture is accompanied by an increase in the ratio of serum circr-284 to mir-221 levels// *Circulation. Cardiovascular genetics*. – 2017. – V. 10. – N 5. – P. e001720.
40. Bell R. E. et al. Enhancer methylation dynamics contribute to cancer plasticity and patient mortality // *Genome research*. – 2016. – V. 26. – N 5. – P. 601-611.

41. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. – 1995. – Vol. 57. – N 1. – P. 289-300.
42. Berkan Ö. et al. Regulation of microRNAs in coronary atherosclerotic plaque // *Epigenomics*. – 2019. – V. 11. – N 12. – P. 1387-1397.
43. Biagioni F. et al. miR-10b*, a master inhibitor of the cell cycle, is down-regulated in human breast tumours // *EMBO Molecular Medicine*. – 2012. – V. 4. – N 11. – P. 1214-1229.
44. Bildirici A. E. et al. MicroRNA-221/222 expression in atherosclerotic coronary artery plaque versus internal mammary artery and in peripheral blood samples // *Biomarkers*. – 2018. – V. 23. – N 7. – P. 670-675.
45. Björkegren J. L. M., Lusis A. J. Atherosclerosis: Recent developments // *Cell*. – 2022. – V. 185. – N 10. – P. 1630-1645.
46. Blick C. et al. Identification of a hypoxia-regulated miRNA signature in bladder cancer and a role for miR-145 in hypoxia-dependent apoptosis // *British Journal of Cancer*. – 2015. – V. 113. – N 4. – P. 634-644.
47. Boon R. A., Hergenreider E., Dimmeler S. Atheroprotective mechanisms of shear stress-regulated microRNAs // *Thrombosis and haemostasis*. – 2012. – V. 108. – N 4. – P. 616–620.
48. Cao J. et al. MicroRNA-146a and -21 cooperate to regulate vascular smooth muscle cell proliferation via modulation of the Notch signaling pathway // *Molecular medicine reports*. – 2015. – V. 11. – N 4. – P. 2889-2895.
49. Castillo-Díaz S. A. et al. Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries // *International journal of molecular medicine*. – 2010. – V. 26. – N 5. – P. 691-700.
50. Catalanotto C., Cogoni C., Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions // *International journal of molecular sciences*. – 2016. – V. 17. – N 10 – P. 1712.
51. Chakraborty C., Das S. Profiling cell-free and circulating miRNA: a clinical diagnostic tool for different cancers // *Tumor Biology*. – 2016. – V.37. – N 5. – P. 5705-5714.
52. Chan G. H. et al. The role of p53 in the alternation of vascular functions // *Frontiers in pharmacology*. – 2022. – V. 13. – P. 981152.
53. Chapman J. M., Mason P. R. Cholesterol crystals and atherosclerotic plaque instability: Therapeutic potential of Eicosapentaenoic acid // *Pharmacology & therapeutics*. – 2022. – V. 240. – P. 108237.
54. Chavkin N. W. et al. The cell surface receptors Ror1/2 control cardiac myofibroblast differentiation // *Journal of the American Heart Association*. – 2021. – V. 10. – N 13. – P. e019904

55. Chen D. et al. miR-100 induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses tumorigenesis, migration and invasion // *PLoS genetics*. – 2014. – V. 10. – N 2. – P. e1004177.
56. Chen Y. et al. Androgen receptor (AR) suppresses miRNA-145 to promote renal cell carcinoma (RCC) progression independent of VHL status // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6. – N 31. – P. 31203-31215.
57. Chhabra R. miRNA and methylation: a multifaceted liaison // *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. – 2015. – V.16. – N 2 – P. 195-203.
58. Chiorescu R. M. et al. Vulnerable atherosclerotic plaque: is there a molecular signature? // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – V. 23. – N 21 – P. 13638.
59. Cioce M. et al. Protumorigenic effects of mir-145 loss in malignant pleural mesothelioma // *Oncogene*. – 2014. – V. 33. – N 46. – P. 5319-5331.
60. Cipollone F. et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans // *Stroke*. – 2011. – V. 42. – N 9. – P. 2556-2563.
61. Cui et al. HMDD v4.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations // *Nucleic acids research*. – 2024. – V. 52. – N D1. – P. 1327–D1332.
62. Collura S. et al. The carotid plaque as paradigmatic case of site-specific acceleration of aging process: The microRNAs and the inflammaging contribution // *Ageing research reviews*. – 2020. – V. 61. – P. 101090.
63. Collura S. et al. MicroRNA profiles of human peripheral arteries and abdominal aorta in normal conditions: MicroRNAs-27a-5p, -139-5p and -155-5p emerge and in atheroma too // *Mechanisms of ageing and development*. – 2021. – V. 198. – P. 111541.
64. Daley T., Smith A. D. Predicting the molecular complexity of sequencing libraries // *Nature Methods*. – 2013. – V. 10. – N 4. – P. 325-327.
65. De Rie D. et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse // *Nature biotechnology*. – 2017. – V. 35. – N 9. – P. 872-878.
66. Deng J. et al. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming // *Nature biotechnology*. – 2009. – V. 27. – N 4. – P. 353-360.
67. Deng J. et al. Evaluation of serum cysteine-rich protein 61 levels in patients with coronary artery disease // *Biomarkers in medicine*. – 2018. – V. 12. – N 4. – P. 329-339.
68. Deng L. et al. MicroRNA-143 activation regulates smooth muscle and endothelial cell crosstalk in pulmonary arterial hypertension // *Circulation research*. – 2015. – V. 117. – N 10. – P. 870-883.
69. Deng Y. et al. Differential expression profile of miRNAs between stable and vulnerable plaques of carotid artery stenosis patients // *Genes & genetic systems*. – 2023. – V. 98. – N 1. – P. 25-33.

70. Dolz S. et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers of stenosis progression in asymptomatic carotid stenosis // *Genes & genetic systems*. – 2017. – V. 98. – N 1. – P. 25-33.
71. Donzelli S. et al. Epigenetic silencing of miR-145-5p contributes to brain metastasis // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6. – N 34. – P.35183-35201.
72. Du P. et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis // *BMC bioinformatics*. – 2010. – V. 11. – P.587.
73. Echevarría-Vargas I. M., Valiyeva F., Vivas-Mejía P. E. Upregulation of miR-21 in cisplatin resistant ovarian cancer via JNK-1/c-Jun pathway // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – N 5. – P. e97094.
74. Ehrlich K. C., Lacey M., Ehrlich M. Tissue-specific epigenetics of atherosclerosis-related *ANGPT* and *ANGPTL* genes // *Epigenomics*. – 2019. – V. 11. – N 2. – P. 169-186.
75. Ek W. E. et al. Genome-wide DNA methylation study identifies genes associated with the cardiovascular biomarker GDF-15 // *Human molecular genetics*. – 2016. – V. 25. – N 4. – P. 817-827.
76. Emre Y., Imhof B. A. Matricellular protein CCN1/CYR61: a new player in inflammation and leukocyte trafficking // *Seminars in immunopathology*. – 2014. – V. 36. – N 2. – P. 253-259.
77. Endo M., Kamizaki K., Minami Y. The Ror-family receptors in development, tissue regeneration and age-related disease // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2022. – V. 10. – P. 891763.
78. Ewels P. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report // *Bioinformatics*. – 2016. – V. 32. – N 19. – P. 3047-3048.
79. Ewels P. A. et al. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines // *Nature biotechnology*. – 2020. – V. 38. – N 3. – P. 276-278.
80. Fahed A. C., Jang I. K. Plaque erosion and acute coronary syndromes: phenotype, molecular characteristics and future directions // *Nature reviews. Cardiology*. – 2021. – V. 18. – N 10. – P. 724-734.
81. Fang C. et al. Morphological characteristics of eroded plaques with noncritical coronary stenosis: An optical coherence tomography study // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2021. – V. 29. – N 1. – P. 126-140.
82. Fang Z. et al. The sequence structures of human microRNA molecules and their implications // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – N 1. – P. e54215.
83. Farrance I., Frenkel R. Uncertainty in measurement: a review of monte carlo simulation using microsoft excel for the calculation of uncertainties through functional relationships, including uncertainties in empirically derived constants // *The Clinical Biochemist Reviews*. – 2014. – V. 35. – N 1. – P. 37-61.
84. Fasolo F. et al. Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis // *Cardiovascular Research*. – 2019. – V. 115. – N 12. – P. 1732-1756.

85. Feinberg M. W., Moore K. J. MicroRNA regulation of atherosclerosis // *Circulation research*. – 2016. – V. 118. – N 4. – P. 703-720.
86. Fernandez A. F. et al. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples // *Genome research*. – 2012. – V. 22. – N 2. – P. 407-419.
87. Fernández-Sanlés A. et al. Association between DNA methylation and coronary heart disease or other atherosclerotic events: A systematic review // *Atherosclerosis*. – 2017. – V. 263. – P. 325-333.
88. Franco S. et al. Role of FOXM1 in vascular smooth muscle cell survival and neointima formation following vascular injury // *Heliyon*. – 2020. – V. 6. – N 6. – P. e04028.
89. Friedman R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // *Genome research*. – 2009. – V. 19. – N 1. – P. 92-105.
90. Fujita S. et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism // *Journal of molecular biology*. – 2008. – V. 378. – N 3. – P. 492-504.
91. Fukumitsu R. et al. Expression of Vasohibin-1 in Human Carotid Atherosclerotic Plaque // *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. – 2015. – V. 22. – N 9. – P. 942-948.
92. Gan C. S., Wang C. W., Tan K. S. Circulatory microRNA-145 expression is increased in cerebral ischemia // *Genetics and molecular research : GMR*. – 2012. – V. 11. – N 1. – P. 147-152.
93. Gao Y. et al. TRmir: A Comprehensive Resource for Human Transcriptional Regulatory Information of MiRNAs // *Frontiers in genetics*. – 2022. – V. 13. – P. 808950.
94. Ge P. et al. Single-cell atlas reveals different immune environments between stable and vulnerable atherosclerotic plaques // *Frontiers in immunology*. – 2023. – V. 13. – P. 1085468.
95. Gerhardt T. et al. Immune mechanisms of plaque instability // *Frontiers in cardiovascular medicine*. – 2022. – V. 8. – P. 797046.
96. Gijssen F. J. et al. Carotid plaque morphological classification compared with biomechanical cap stress: Implications for a magnetic resonance imaging-based assessment // *Stroke*. – 2015. – V. 45. – N 8. – P. 2124-2128.
97. Goikuria H. et al. Characterization of carotid smooth muscle cells during phenotypic transition // *Cells*. – 2018. – V. 7. – N 3. – P. 23.
98. Golledge J., Greenhalgh R. M, Davies A. H. The symptomatic carotid plaque // *Stroke*. – 2000. – V. 31. – N 3. – P. 774-781.
99. González-López P. et al. Implication of miR-155-5p and miR-143-3p in the vascular insulin resistance and instability of human and experimental atherosclerotic plaque // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – V. 23. – N 18 – P. 10253.
100. Goossens E. A. C. et al. miRMap: Profiling of 14q32 microRNA expression and DNA methylation throughout the human vasculature // *Frontiers in cardiovascular medicine*. – 2019. – V. 6. – P. 113.

101. Grégory F. Role of mechanical stress and neutrophils in the pathogenesis of plaque erosion // *Atherosclerosis*. – 2021. – V. 318. – P. 60-69.
102. Grootaert M. O. J., Bennett M. R. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment // *Cardiovascular research*. – 2021. – V. 117. – N 11. – P. 2326-2339.
103. Guo W. et al. CGmapTools improves the precision of heterozygous SNV calls and supports allele-specific methylation detection and visualization in bisulfite-sequencing data // *Bioinformatics*. – 2018. – V. 34. – N 3. – P. 381-387.
104. Haemmig S., Feinberg M. W. MicroRNAs as harbingers of high-risk carotid artery atherosclerotic disease? // *Circulation research*. – 2017. – V. 120. – N 4. – P. 596-598.
105. Halliday A. et al. 10-year stroke prevention after successful carotid endarterectomy for asymptomatic stenosis (ACST-1): a multicentre randomised trial // *Lancet (London, England)*. – 2010. – V. 376. – N 9746. – P. 1074-1084.
106. Harman J. L., Jørgensen H. F. The role of smooth muscle cells in plaque stability: Therapeutic targeting potential // *British journal of pharmacology*. – 2019. – V. 176. – N 19. – P. 3741-3753.
107. Hartwig H. et al. Atherosclerotic plaque destabilization in mice: A comparative study // *PloS one*. – 2015. – V. 10. – N 10. – P. e0141019.
108. He C. et al. Demethylation of miR-10b plays a suppressive role in ccRCC cells // *International journal of clinical and experimental pathology*. – 2015. – V. 8. – N 9. – P. 10595-10604.
109. Hinske L. C. et al. MiRIAD update: using alternative polyadenylation, protein interaction network analysis and additional species to enhance exploration of the role of intragenic miRNAs and their host genes // *Database-The Journal of Biological Databases and Curation*. – 2017. – V. 2017. – P. bax053.
110. Hotta K. et al. Identification of the genomic region under epigenetic regulation during non-alcoholic fatty liver disease progression // *Hepatology Research*. – 2018. – V. 48. – N 3. – P. E320-E334.
111. Houseman E. A. et al. Cell-composition effects in the analysis of DNA methylation array data: a mathematical perspective // *BMC Bioinformatics*. – 2015. – V. 16. – P. 95.
112. Houseman E. A. et al. Reference-free deconvolution of DNA methylation data and mediation by cell composition effects. // *BMC Bioinformatics*. – 2016. – V. 17. – P. 259.
113. Huan T. et al. Epigenome-wide association study of DNA methylation and microRNA expression highlights novel pathways for human complex traits // *Epigenetics*. – 2020. – V. 15. – N 1-2. – P. 183-198.
114. Huang Y. H. et al. Thyroid hormone regulation of miR-21 enhances migration and invasion of hepatoma // *Cancer Research*. – 2013. – V. 73. – N 8. – P. 2505-2517.

115. Iaconetti C. et al. Down-regulation of miR-23b induces phenotypic switching of vascular smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo* // Cardiovascular research. – 2015. – V. 107. – N 4. – P. 522-533.
116. Ignatyev I. M., Gafurov M. R., Krivosheeva N. V. Criteria for carotid atherosclerotic plaque instability // Annals of vascular surgery. – 2021. – V. 72. – P. 340-349.
117. Iorio M. V. et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer // Cancer Research. – 2007. – V. 67. – N 18. – P. 8699-8707.
118. Istas G. et al. Identification of differentially methylated *BRCA1* and *CRISP2* DNA regions as blood surrogate markers for cardiovascular disease // Scientific reports. – 2017. – V. 7. – N 1. – P. 5120.
119. Ji R. et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation // Circulation research. – 2007. – V. 100. – N 11. – P. 1579-1588.
120. Jia H. et al. *In vivo* diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography // Journal of the American College of Cardiology. – 2013. – V. 62. – N 19. – P. 1748-1758.
121. Jin H. et al. Local delivery of miR-21 stabilizes fibrous caps in vulnerable atherosclerotic lesions // Molecular Therapy. – 2018. – V. 26. – N 4. – P. 1040-1055.
122. Jin H. et al. Integrative multiomics analysis of human atherosclerosis reveals a serum response factor-driven network associated with intraplaque hemorrhage // Clinical and translational medicine. – 2021. – V. 11. – N 6. – P. e458.
123. Ju C. et al. Integrated genome-wide methylation and expression analyses reveal functional predictors of response to antidepressants // Translational Psychiatry. – 2019. – V. 9. – N 1. – P. 254.
124. Kalavakunta J. K. et al. Role of cholesterol crystals during acute myocardial infarction and cerebrovascular accident // Cardiovascular Innovations and Applications. – 2017. – V. 2. – N 3. – P. 347-362.
125. Katano H. et al. Differential expression of microRNAs in severely calcified carotid plaques // Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2018. – V. 27. – N 1. – P. 108-117.
126. Kim J. et al. miR-27a and miR-27b regulate autophagic clearance of damaged mitochondria by targeting PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) // Molecular neurodegeneration. – 2016. – V. 11. – N 1. – P. 55.
127. Kim K. et al. Epigenetic regulation of microRNA-10b and targeting of oncogenic MAPRE1 in gastric cancer // Epigenetics. – 2011. – V. 6. – N 6. – P. 740-751.
128. Kiselev I. S. et al. DNA methylation as an epigenetic mechanism in the development of multiple sclerosis // Acta naturae. – 2021. – V. 13. – N 2. – P. 45-57.

129. Koenig W., Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2004. – V. 27. – N 1. – P. 15-26.
130. Kolodgie F. D. et al. High-risk carotid plaque: lessons learned from histopathology // *Seminars in vascular surgery*. – 2017. – V. 30. – N 6. – P. 31-43.
131. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function // *Nucleic acids research*. – 2019. – V. 47. – N D1. – P. D155-D162.
132. Krueger F., Andrews S. R. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications // *Bioinformatics*. – 2011. – V. 27. – N 11. – P. 1571-1572.
133. Krueger F. et al. FelixKrueger/TrimGalore: v0.6.7 - DOI via Zenodo (0.6.7) // *Zenodo*. – 2021.
134. Kumar S. et al. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2014. – V. 34. – P. 2206-2216.
135. Kumarswamy R., Volkmann I., Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease // *RNA Biology*. – 2011. – V. 8. – N 5. – P. 706-713.
136. Lacey M. et al. Atherosclerosis-associated differentially methylated regions can reflect the disease phenotype and are often at enhancers // *Atherosclerosis*. – 2019. – V. 280. – P. 183-191.
137. Lacey M. et al. Data showing atherosclerosis-associated differentially methylated regions are often at enhancers // *Data Brief*. – 2019. – V. 23. – P. 1603812.
138. Laffont B., Rayner K. J. MicroRNAs in the pathobiology and therapy of atherosclerosis // *Canadian Journal of Cardiology*. – 2017. – V. 33. – N 3. – P. 313-324.
139. Lee S.M. et al. Quercetin up-regulates expressions of peroxisome proliferator-activated receptor γ , liver X receptor α , and ATP binding cassette transporter A1 genes and increases cholesterol efflux in human macrophage cell line // *Nutrition research (New York, N.Y.)*. – 2013. – V. 33. – N 2. – P. 136-143.
140. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM // *ArXiv*. – 2013. – 1303.
141. Li J. et al. 20(S)-Rg3 blocked epithelial-mesenchymal transition through DNMT3A/miR-145/FSCN1 in ovarian cancer // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – N 32. – P. 53375-53386.
142. Li J., Li K., Chen X. Inflammation-regulatory microRNAs: Valuable targets for intracranial atherosclerosis // *Journal of neuroscience research*. – 2019. – V. 97. – N 10. – P. 1242-1252.
143. Li J. et al. DNA methylome profiling reveals epigenetic regulation of lipoprotein-associated phospholipase A2 in human vulnerable atherosclerotic plaque // *Clinical epigenetics*. – 2021. – V. 13. – N 1. – P. 161.

144. Li L. C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs // Bioinformatics (Oxford, England). – 2002. – V. 18. – N 11. – P. 1427-1431.
145. Li X. et al. MiR-27b is epigenetically downregulated in tamoxifen resistant breast cancer cells due to promoter methylation and regulates tamoxifen sensitivity by targeting HMGB3 // Biochemical and biophysical research communications. – 2016. – V. 477. – N 4. – P. 768-773.
146. Li Z. et al. DNA methylation downregulated mir-10b acts as a tumor suppressor in gastric cancer // Gastric Cancer. – 2015. – V. 18. – N 1. – P. 43-54.
147. Li Z. et al. Promoter hypomethylation of microRNA223 gene is associated with atherosclerotic cerebral infarction // Atherosclerosis. – 2017. – V. 263. – P. 237-243.
148. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features // Bioinformatics (Oxford, England). – 2014. – V. 30. – N 7. – P. 923-930.
149. Libby P., Pasterkamp G. Requiem for the 'vulnerable plaque' // European heart journal. – 2015. – V. 36. – N 43. – P. 2984-2987.
150. Libby P. et al. Reassessing the Mechanisms of Acute Coronary Syndromes // Circulation research. – 2019. – V. 124. – N 1. – P. 150-160.
151. Libby P. Inflammation during the life cycle of the atherosclerotic plaque // Cardiovascular research. – 2021. – V. 117. – N 13. – P. 2505-2536.
152. Lin D. et al. LncRNA-TCONS_00034812 is upregulated in atherosclerosis and upregulates miR-21 through methylation in vascular smooth muscle cells // Annals of translational medicine. – 2021. – V. 9. – N 12. – P. 1005.
153. Ling M. et al. Regulation of miRNA-21 by reactive oxygen species-activated ERK/NF- κ B in arsenite-induced cell transformation // Free Radical Biology and Medicine. – 2012. – V. 52. – N. 9. – P. 1508-1518.
154. Liu J. et al. Curcumin sensitizes prostate cancer cells to radiation partly via epigenetic activation of miR-143 and miR-143 mediated autophagy inhibition // Journal of drug targeting. – 2017. – V. 7. – P. 645-652.
155. Liu S. Y. et al. Demethylation of the *MIR145* promoter suppresses migration and invasion in breast cancer // Oncotarget. – 2017. – V. 8. – N 37. – P. 61731-61741.
156. Liu T. et al. Identification of diterpenoid compounds that interfere with Fli-1 DNA binding to suppress eukemogenesis inhibition // Cell death & disease. – 2019. – V. 10. – N. 2. – P. 117.
157. Liu Y. et al. Blood monocyte transcriptome and epigenome analyses reveal loci associated with human atherosclerosis // Nature communications. – 2017. – V. 8. – N 1. – P. 393.

158. Loginov V. I. et al. Aberrant methylation of 20 miRNA genes specifically involved in various steps of ovarian carcinoma spread: From primary tumors to peritoneal macroscopic metastases // International journal of molecular sciences. – 2022. – V. 23. – N 3. – P. 1300.
159. Lovett J. K. et al. Histological correlates of carotid plaque surface morphology on lumen contrast imaging // Circulation. – 2004. – V. 110. – N 15. – P. 2190-2197.
160. Lovren F. et al. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis // Circulation. – 2012. – V. 126. – N 11 Suppl 1. – P. S81-S90.
161. Lu J. et al. Hypomethylation causes *MIR21* overexpression in tumors // Molecular therapy oncolytics. – 2020. – V. 18. – P. 47-57.
162. Lu Y. et al. Impact of miRNA in atherosclerosis // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2018. – V. 38. – N 9. – P. e159-e170.
163. Lu Y. F. et al. Promoter hypomethylation mediated upregulation of MicroRNA-10b-3p targets FOXO3 to promote the progression of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) // Journal of experimental & clinical cancer research : CR. – 2018. – V. 37. – N 1. – P. 301.
164. Ma J. et al. Epigenetic regulation of microRNAs in gastric cancer // Digestive diseases and sciences. – 2014. – V. 59. – N 4. – P. 716-723.
165. Ma L., Teruya-Feldstein J., Weinberg R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer // Nature. – 2007. – V. 449. – N 7163. – P. 682-688.
166. Ma W. F. et al. Enhanced single-cell RNA-seq workflow reveals coronary artery disease cellular cross-talk and candidate drug targets // Atherosclerosis. – 2022. – V. 340. – P. 12-22.
167. Madrigal-Matute J. et al. MicroRNAs and atherosclerosis // Current atherosclerosis reports. – 2013. – V. 15. – N 5. – P. 322.
168. Magenta A. et al. Atherosclerotic plaque instability in carotid arteries: miR-200c as a promising biomarker // Clinical science (London, England : 1979). – 2018. – V. 132. – N 22. – P. 2423-2436.
169. Maitrias P. et al. MicroRNA deregulation in symptomatic carotid plaque // Journal of vascular surgery. – 2015. – V. 62. – N 5. – P. 1245-1250.e1.
170. Maitrias P. et al. The Involvement of miRNA in carotid-related stroke // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2017. – V. 37. – N 9. – P. 1608-1617.
171. Mani A. M. et al. Cholesterol crystals increase vascular permeability by inactivating SHP2 and disrupting adherens junctions // Free radical biology & medicine. – 2018. – V. 123. – P. 72-84.
172. Markus B. et al. Differential expression of MicroRNAs in endarterectomy specimens taken from patients with asymptomatic and symptomatic carotid plaques // PloS one. – 2016. – V. 11. – N 9. – P. e0161632.

173. Marsico A. et al. PROmiRNA: a new miRNA promoter recognition method uncovers the complex regulation of intronic miRNAs // *Genome biology*. – 2013. – V. 14. – N 8. – P. R84.
174. Martinez E., Martorell J., Rimbaut V. Review of serum biomarkers in carotid atherosclerosis // *BMC cardiovascular disorders*. – 2020. – V. 71. – N 1. – P. 329-341.
175. Masser D. R., Stanford D. R., Freeman W. M. Targeted DNA methylation analysis by next-generation sequencing // *Journal of visualized experiments*. – 2015. – V. 96. – P. 52488.
176. Morales S., Monzo M., Navarro A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression // *Biomolecular concepts*. – 2017. – V. 8. – N 5-6. – P. 203-212.
177. Moreau P. R. et al. Profiling of primary and mature miRNA expression in atherosclerosis-associated cell types // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2021. – V. 41. – N 7. – P. 2149-2167.
178. Moser D. A. et al. Targeted bisulfite sequencing: A novel tool for the assessment of DNA methylation with high sensitivity and increased coverage // *Psychoneuroendocrinology*. – 2020. – V. 120. – N 7. – P. 104784.
179. Murphy S. K. et al. Gender-specific methylation differences in relation to prenatal exposure to cigarette smoke // *Gene*. – 2012. – V. 494. – N 1. – P. 36-43.
180. Nakahara M. et al. miR-10b deficiency affords atherosclerosis resistance // *bioRxiv*. – 2018. – P. 397836.
181. Nazarenko M. S. et al. A comparison of genome-wide DNA methylation patterns between different vascular tissues from patients with coronary heart disease // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – N 4. – P. e0122601.
182. Nazari-Jahantigh M. et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages // *The Journal of clinical investigation*. – 2012. – V. 122. – N 11. – P. 4190-4202.
183. Nidorf S. M., Fiolet A., Abela G. S. Viewing atherosclerosis through a crystal lens: How the evolving structure of cholesterol crystals in atherosclerotic plaque alters its stability // *Journal of clinical lipidology*. – 2020. – V. 14. – N 5. – P. 619-630.
184. Nidorf S. M. et al. Atherosclerotic plaque morphology and the conundrum of the vulnerable plaque / Abela G.S., Nidorf S.M. (eds) // *Cholesterol crystals in atherosclerosis and other related diseases. Contemporary cardiology*. – Humana, Cham, 2023.
185. Nie P. et al. Analysis of microRNAs associated with carotid atherosclerotic plaque rupture with thrombosis // *Frontiers in genetics*. – 2021. – V. 12. – P. 599350.
186. Nuotio K. et al. Morphology and histology of silent and symptom-causing atherosclerotic carotid plaques - Rationale and design of the Helsinki Carotid Endarterectomy Study 2 (the HeCES2) // *Annals of medicine*. – 2018. – V. 50. – N 6. – P. 501-510.

187. O'Sullivan J. F., Martin K., Caplice N. M. Microribonucleic acids for prevention of plaque rupture and in-stent restenosis: "a finger in the dam" // Journal of the American College of Cardiology. – 2011. – V. 57. – N 4. – P. 383-389.
188. Okonechnikov K., Conesa A., Garcia-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data // Bioinformatics. – 2016. – V. 2. – N 2. – P. 292-294.
189. Olena A. F., Patton J. G. Genomic organization of microRNAs // Journal of cellular physiology. – 2010. – V. 222. – N 3. – P. 540-545.
190. Ortiz I. M. D. P. et al. Loss of DNA methylation is related to increased expression of miR-21 and miR-146b in papillary thyroid carcinoma // Clinical epigenetics. – 2018. – V. 10. – N 1. – P. 144.
191. Pan H. et al. Single-cell genomics reveals a novel cell state during smooth muscle cell phenotypic switching and potential therapeutic targets for atherosclerosis in mouse and human // Circulation. – 2020. – V. 142. – N 21. – P. 2060-2075.
192. Pankratz F. et al. MicroRNA-100 suppresses chronic vascular inflammation by stimulation of endothelial autophagy // Circulation research. – 2018. – V. 122. – N 3. – P. 417-432.
193. Panza A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated induction of microRNA-145 opposes tumor phenotype in colorectal cancer // Biochimica et Biophysica Acta. – 2014. – V. 1843. – N 6. – P. 1225-1236.
194. Pasterkamp G., den Ruijter H., Libby P. Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease // Nature reviews. Cardiology. – 2017. – V. 14. – P. 21-29.
195. Pedersen B. S. et al. Fast and accurate alignment of long bisulfite-seq reads // arXiv: Genomics. – 2014.
196. Peeters W. et al. Carotid atherosclerotic plaques stabilize after stroke: insights into the natural process of atherosclerotic plaque stabilization // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2009. – V. 29. – N 1. – P. 128-133.
197. Pek S. L. et al. Circulating and visceral adipose miR-100 is down-regulated in patients with obesity and Type 2 diabetes // Molecular and cellular endocrinology. – 2016. – V. 427. – P. 112-123.
198. Pekow J. et al. Tumor suppressors miR-143 and miR-145 and predicted target proteins API5, ERK5, K-RAS, and IRS-1 are differentially expressed in proximal and distal colon // American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology. – 2015. – V. 308. – N 3. – P. G179-G187.
199. Pelisek J. et al. Neovascularization and angiogenic factors in advanced human carotid artery stenosis // Circulation Journal. – 2012. – V. 76. – N 5. – P. 1274-1282.
200. Pilala K. M. et al. Epigenetic regulation of *MIR145* core promoter controls miR-143/145 cluster in bladder cancer progression and treatment outcome // Molecular therapy. Nucleic acids. – 2022. – V. 30. – P. 311-322.

201. Piletič K., Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease // Archives of toxicology. – 2016. – V. 90. – N 10 – P. 2405-2419.
202. Poznyak A. V. et al. Modulating mTOR signaling as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis // International journal of molecular sciences. – 2022. – V. 23. – N 3 – P. 1153.
203. Pronina I. V. et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression // Gene. – 2017. – V. 604 – P. 1-8.
204. Puig N. et al. Search for reliable circulating biomarkers to predict carotid plaque vulnerability // International journal of molecular sciences. – 2020. – V. 21. – N 21 – P. 8236.
205. Qin W. et al. Identification of monocyte-associated genes related to the instability of atherosclerosis plaque // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2022. – V. 2022. – P. 3972272.
206. Qun L. et al. miRNA-27b modulates endothelial cell angiogenesis by directly targeting Naa15 in atherogenesis // Atherosclerosis. – 2016. – V. 254. – P. 184-192.
207. Raitoharju E. et al. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study // Atherosclerosis. – 2011. – V. 219. – N 1. – P. 211-217.
208. Riches K. et al. Elevated expression levels of miR-143/5 in saphenous vein smooth muscle cells from patients with Type 2 diabetes drive persistent changes in phenotype and function // Journal of molecular and cellular cardiology. – 2014. – V. 74. – N 100. – P. 240-250.
209. Riches K. et al. Mapping the methylation status of the miR-145 promoter in saphenous vein smooth muscle cells from individuals with type 2 diabetes // Diabetes and Vascular Disease Research. – 2017. – V. 14. – N 2. – P. 122-129.
210. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease // The New England Journal of Medicine. – 1999. – V. 340. – P. 115-126.
211. Ruhrmann S. et al. Hypermethylation of *MIR21* in CD4⁺ T cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis associates with lower miRNA-21 levels and concomitant up-regulation of its targetgenes // Multiple Sclerosis Journal. – 2018. – V. 24, N 10. – P. 1288-1300.
212. Salem M. K. et al. Identification of patients with a histologically unstable carotid plaque using ultrasonic plaque image analysis // European journal of vascular and endovascular surgery. – 2014. – V. 48. – N 2. – P. 115-125.
213. Sambrook J., Russel D. W. Molecular cloning: a laboratory manual // New York : Cold Spring Harbour Laboratory Press. – 2001. – 3rd ed. – 2344 p.
214. Santovito D. et al. Overexpression of microRNA-145 in atherosclerotic plaques from hypertensive patients // Expert opinion on therapeutic targets. – 2013. – V. 17. – N 3. – P. 217-223.

215. Santovito D., Egea V., Weber C. Small but smart: MicroRNAs orchestrate atherosclerosis development and progression // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2016. – V. 1861. – N 12. – P. 2075-2086.
216. Sato Y. et al. Proportion of fibrin and platelets differs in thrombi on ruptured and eroded coronary atherosclerotic plaques in humans // *Heart*. – 2005. – V. 91. – P. 526-530.
217. Schiano C. et al. Epigenetic-sensitive pathways in personalized therapy of major cardiovascular diseases // *Pharmacology & therapeutics*. – 2020. – V. 210. – P. 107514.
218. Schober A, Maleki S. S, Nazari-Jahantigh M. Regulatory Non-coding RNAs in atherosclerosis // *Handbook of experimental pharmacology*. – 2022. – V. 270. – P. 463-492.
219. Sharma A. R. et al. Aberrant DNA methylation and miRNAs in coronary artery diseases and stroke: a systematic review // *Briefings in functional genomics*. – 2020. – V. 19. – N 4. – P. 259-285.
220. Shen J. et al. Genome-wide aberrant DNA methylation of microRNA host genes in hepatocellular carcinoma // *Epigenetics*. – 2012. – V. 7. – N 11. – P. 1230-1237.
221. Shen X. et al. Heparin impairs angiogenesis through inhibition of microRNA-10b // *The Journal of biological chemistry*. – 2011. – V. 286. – N 30. – P. 26616-26627.
222. Shin V. Y. et al. NF- κ B targets miR-16 and miR-21 in gastric cancer: involvement of prostaglandin E receptors // *Carcinogenesis*. – 2010. – V. 32. – N 2. – P. 240-245.
223. Singh P. et al. Neutrophil extracellular traps and NLRP3 Inflammasome: a disturbing duo in atherosclerosis, inflammation and atherothrombosis // *Vaccine*. – 2023. – V. 11. – N 2. – P. 261.
224. Slenders L. et al. Intersecting single-cell transcriptomics and genome-wide association studies identifies crucial cell populations and candidate genes for atherosclerosis // *European heart journal open*. – 2021. – V. 2. – N 1. – P. oeab043.
225. Smolka C. et al. *MiR-100* overexpression attenuates high fat diet induced weight gain, liver steatosis, hypertriglyceridemia and development of metabolic syndrome in mice // *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. – 2021. – V. 27. – N 1. – P. 101.
226. Soriano-Tárraga C. et al. Biological age is a predictor of mortality in ischemic stroke // *Scientific reports*. – 2018. – V. 8. – N 1. – P. 4148.
227. Spagnoli L. G. et al. Role of inflammation in atherosclerosis // *Journal of nuclear medicine*. – 2007. – V. 48. – N 11. – P. 1800-1815.
228. Stary H. C. et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 1995. – V. 15. – N 9. – P. 1512-1531.

229. Stary H. C. et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association // *Circulation*. – 1995. – V. 92. – N 5. – P. 1355-1374.
230. Suh S. O. et al. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer // *Carcinogenesis*. – 2011. – V. 32. – N 5. – P. 772-778.
231. Sun W. et al. The c-Myc/miR-27b-3p/ATG10 regulatory axis regulates chemoresistance in colorectal cancer // *Theranostics*. – 2020. – V. 10. – N 5. – P. 1981-1996.
232. Tabaei S., Tabaei S. S. DNA methylation abnormalities in atherosclerosis // *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. – 2019. – V. 47. – N 1. – P. 2031-2041.
233. Tan W. et al. Epigenetic analysis of microRNA genes in tumors from surgically resected lung cancer patients and association with survival // *Molecular carcinogenesis*. – 2015. – V. 54 Suppl 1. – P. E45–E51. DOI: 10.1002/mc.22149
234. Tang R. Z. et al. DNA methyltransferase 1 and Krüppel-like factor 4 axis regulates macrophage inflammation and atherosclerosis // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2019. – V. 128. – P. 11-24.
235. Tastsoglou S. et al. DIANA-microT 2023: including predicted targets of virally encoded miRNAs // *Nucleic acids research*. – 2023. – V. 51. – N W1. – P. W148-W153.
236. Teixeira A. R. et al. The role of miRNAs in the diagnosis of stable atherosclerosis of different arterial territories: A critical review // *Frontiers in cardiovascular medicine*. – 2022. – V. 9. – P. 1040971.
237. Teschendorff A. E., Zheng S. C. EpiDISH - Epigenetic Dissection of Intra-Sample Heterogeneity-R package. – 2020.
URL: <https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/EpiDISH/inst/doc/EpiDISH.html>
238. Urbich C. et al. MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A // *Blood*. – 2012. – V. 119. – N 6. – P. 1607-1616.
239. Van Der Grinten J. G. M., Van Der Spek A. M. Оценка соответствия методами Монте-Карло (перевод Н.И. Королёвой) // *Эталон. Стандартные образцы*. – 2014. – N 2. – P. 26–34.
240. van der Maaten L. J. P., Hinton G. E. Visualizing data using t-SNE // *Journal of Machine Learning Research*. – 2008. – V. 9. – P. 2579–2605.
241. Vancheri C. et al. Downregulation of circulating *hsa-miR-200c-3p* correlates with dyslipidemia in patients with stable coronary artery disease // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – V. 24. – N 2. – P. 1112.
242. Vartak T., Kumaresan S., Brennan E. Decoding microRNA drivers in atherosclerosis // *Bioscience reports*. – 2022. – V. 42. – N 7. – P. BSR20212355.
243. Vedder V. L., Aherrahrou Z., Erdmann J. Dare to compare. Development of atherosclerotic lesions in human, mouse, and zebrafish // *Frontiers in cardiovascular medicine*. – 2020. – V. 7. – P. 109.

244. Venthām N. T. et al. Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease // *Nature communications*. – 2016. – V. 7. – P. 13507.
245. Virmani R. et al. Pathology of the vulnerable plaque // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2006. – V. 47. – N 8_Supplement. – P. C13-8.
246. Volný O. et al. microRNAs in cerebrovascular disease // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2015. – V. 888. – P. 155-195.
247. von der Thüsen J.H. et al. Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E^{-/-} mice after adenovirus-mediated transfer of p53 // *Circulation*. – 2002. – V. 105. – N 17. – P. 2064-2070.
248. Walton E. et al. Systematic evaluation of the causal relationship between DNA methylation and C-reactive protein // *bioRxiv*. – 2018. – P. 397836.
249. Wang D. et al. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b // *Circulation research*. – 2012. – V. 111. – N 8. – P. 967-981.
250. Wang H., Liu D., Zhang H. Investigation of the underlying genes and mechanism of macrophage-enriched ruptured atherosclerotic plaques using bioinformatics method // *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. – 2019. – V. 26. – N 7. – P. 636-658.
251. Wang W. et al. Tumor-suppressive miR-145 co-repressed by TCF4- β -catenin and PRC2 complexes forms double-negative regulation loops with its negative regulators in colorectal cancer // *International Journal of Cancer*. – 2018. – V. 142. – N 2. – P. 308-321.
252. Wang Z. et al. Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs // *Cancer letters*. – 2013. – V. 331. – N 1. – P. 1–10. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.12.006
253. Weber C., Habenicht A. J. R., von Hundelshausen P. Novel mechanisms and therapeutic targets in atherosclerosis: inflammation and beyond // *European heart journal*. – 2023. – V. 44. – N 29. – P. 2672-2681.
254. Wei Y. et al. Methylation in the *TP53* promoter is associated with ischemic stroke // *Molecular medicine reports*. – 2019. – V. 20. – N 2. – P. 1404-1410.
255. Wiklund E. D. et al. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma // *PloS one*. – 2011. – V. 6. – N 11. – P. e27840.
256. Wong L.L. et al. MicroRNA and Heart Failure // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – V. 17. – N 4. – P. 502.
257. Wreczycka K. et al. Strategies for analyzing bisulfite sequencing data // *Journal of biotechnology*. – 2017. – V. 261. – P. 105-115.

258. Xie L et al. An integrative analysis of DNA methylation and RNA-Seq data for human heart, kidney and liver // *BMC Syst Biol.* – 2011. – V. 5. – N Suppl 3. – P. S4.
259. Xue G. et al. A feedback regulation between miR-145 and DNA methyltransferase 3b in prostate cancer cell and their responses to irradiation // *Cancer letters.* – 2015. – V. 361. – N 1. – P. 121-127.
260. Yadav D. K. et al. Vitamin B12 supplementation influences methylation of genes associated with type 2 diabetes and its intermediate traits // *Epigenomics.* – 2018. – V. 10. – N 1. – P. 71-90.
261. Yamamoto E. et al. Clinical and laboratory predictors for plaque erosion in patients with acute coronary syndromes // *Journal of the American Heart Association.* – 2019. – V. 8. – P. e012322.
262. Yang W. et al. Caveolin-1 promotes pituitary adenoma cells migration and invasion by regulating the interaction between EGR1 and KLF5 // *Experimental Cell Research.* – 2018. – V. 367. – N 1. – P. 7-14.
263. Yao Q., Chen Y., Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation // *Current opinion in chemical biology.* – 2019. – V. 51. – P. 11-17.
264. Yao S. et al. Impact of chemotherapy for breast cancer on leukocyte DNA methylation landscape and cognitive function: a prospective study // *Clinical epigenetics.* – 2019. – V. 11. – N 1. – P. 45.
265. Yu F. et al. Hsa_circ_0030042 regulates abnormal autophagy and protects atherosclerotic plaque stability by targeting eIF4A3 // *Theranostics.* – 2021. – V. 11. – N 11. – P. 5404-5417.
266. Yu X. et al. MicroRNA-10b induces vascular muscle cell proliferation through Akt pathway by targeting TIP30 // *Current vascular pharmacology.* – 2015. – V. 13. – N 5. – P. 679-686.
267. Yurdagul A. Jr. Crosstalk between macrophages and vascular smooth muscle cells in atherosclerotic plaque stability // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* – 2022. – V. 42. – N 4. – P. 372-380.
268. Yusupov N. et al. Extensive evaluation of DNA methylation of functional elements in the murine Fkbp5 locus using high-accuracy DNA methylation measurement via targeted bisulfite sequencing // *The European journal of neuroscience.* – 2023. – V. 58. – N 3. – P. 2662-2676.
269. Zaina S. et al. DNA methylation map of human atherosclerosis // *Circulation. Cardiovascular genetics.* – 2014. – V. 7. – N 5. – P. 692-700.
270. Zaina S. et al. DNA methylation dynamics in human carotid plaques after cerebrovascular events // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* – 2015. – V. 35. – N 8. – P. 1835-1842.
271. Zhang C., Zou Y., Dai D. Q. Downregulation of microRNA-27b-3p via aberrant DNA methylation contributes to malignant behavior of gastric cancer cells by targeting GSPT1 // *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* – 2019. – V. 119. – P. 109417.

272. Zhang H. P. et al. A regulatory circuit involving miR-143 and DNMT3a mediates vascular smooth muscle cell proliferation induced by homocysteine // *Molecular Medicine Reports*. – 2016. – V. 13. – N 1. – P. 483-490.
273. Zhao K. et al. Epigenetic silencing of miRNA-143 regulates apoptosis by targeting BCL2 in human intervertebral disc degeneration // *Gene*. – 2017. – V. 628. – P. 259-266.
274. Zhao Y. et al. Methods of MicroRNA promoter prediction and transcription factor mediated regulatory network // *BioMed research international*. – 2017. – V. 2017. – P. 7049406.
275. Zheng H. et al. New quantitative digital image analysis method of histological features of carotid atherosclerotic plaques // *European journal of vascular and endovascular surgery*. – 2019. – V. 58. – N 5. – P. 654-663.
276. Zheng S. C. et al. A novel cell-type deconvolution algorithm reveals substantial contamination by immune cells in saliva, buccal and cervix // *Epigenomics*. – 2018. – V. 10. – N 7. – P. 925-940.
277. Zhou Y. et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets // *Nature communications*. – 2019. – V. 10. – P. 1523.
278. Zhu G. et al. Comprehensive analysis of atherosclerotic plaques reveals crucial genes and molecular mechanisms associated with plaque progression and rupture // *Frontiers in cardiovascular medicine*. – 2023. – V. 10. – P. 951242.

Интернет-ресурсы:

1. База данных мишеней микроРНК miRTarBase [Электронный ресурс] : miRTarBase: The experimentally validated microRNA-target interactions database. URL: https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php (дата обращения: 17.04.2023).
2. База данных Gene Ontology (GO) [Электронный ресурс] : The Gene Ontology Resource. URL: <https://geneontology.org/> (дата обращения: 20.01.2024).
3. База данных TRmir [Электронный ресурс] : TRmir database. URL: <http://bio.liclab.net/trmir/index.html> (дата обращения: 16.06.2023).
4. Геномный браузер UCSC [Электронный ресурс] : UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly. URL: <http://genome-euro.ucsc.edu> (дата обращения: 12.03.2023).
5. Инструмент для анализа уровня экспрессии генов в различных тканях организма [Электронный ресурс] : GTEx Multi Gene Query. URL: <https://www.gtexportal.org/home/multiGeneQueryPage> (дата обращения: 18.04.2023).
6. Инструмент для анализа функциональных ассоциаций микроРНК или их ассоциаций с заболеваниями TAM 2.0 [Электронный ресурс] : TAM 2.0: A Tool for miRNA Set Analysis. URL: <http://www.lirmed.com/tam2/> (дата обращения: 20.01.2024).
7. Инструмент для подбора праймеров [Электронный ресурс] : MethPrimer 2. URL: <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer.cgi> (дата обращения: 26.02.2020).
8. Инструмент для подбора праймеров [Электронный ресурс] : MethPrimer. URL: <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi> (дата обращения: 26.02.2020).
9. Инструмент для анализа праймеров [Электронный ресурс] : IDT OligoAnalyzer. URL: <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (дата обращения: 26.02.2020).
10. Инструмент для проведения ПЦР *in silico* [Электронный ресурс] : BiSearch ePCR. URL: <http://bisearch.enzim.hu/?m=genompsearch> (дата обращения: 27.02.2020).
11. Интерактивное веб-приложение PlaqView для изучения наборов данных по транскриптомам отдельных клеток сердца и сосудов человека и мыши [Электронный ресурс] : PlaqView. URL: <http://plaqview.uvadcos.io/> (дата обращения: 15.03.2024).
12. Репозиторий Gene Expression Omnibus [Электронный ресурс] : Gene Expression Omnibus public functional genomics data repository (GEO). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> (дата обращения: 19.05.2023).

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование на микрочипе Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina)

	Пациенты с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (N=16)
<i>Клинические параметры</i>	
Мужчины : Женщины	10:6
Возраст, лет (Q2 [Q1;Q3])	65,0 [62,5; 69,0]
Индекс массы тела, кг/м ² (Q2 [Q1;Q3])	28,4 [26,6; 31,1]
Метаболический синдром [абс. (%)]	15 (93,8%)
Окружность талии, см (Q2 [Q1;Q3])	нет данных
Стенокардия в анамнезе [абс. (%)]	11 (68,8%)
Функциональный класс стенокардии [абс. (%)]	
- I ФК	2 (12,5%)
- II ФК	9 (56,3%)
- III ФК	0 (0,0%)
Инфаркт миокарда в анамнезе [абс. (%)]	3 (18,8%)
ИБС в анамнезе [абс. (%)]	14 (87,5%)
Длительность ИБС, лет (Q2 [Q1;Q3])	8,0 [5,8; 9,3]
ХСН в анамнезе [абс. (%)]	15 (93,8%)
Функциональный класс ХСН [абс. (%)]	
I ФК	0 (0,0%)
II ФК	13 (81,3%)
III ФК	0 (0,0%)
ОНМК (ТИА, инсульт) в анамнезе [абс. (%)]	5 (31,3%)
АГ [абс. (%)]	16 (100,0%)
Длительность АГ, лет (Q2 [Q1;Q3])	16,0 [10,0; 23,3]
Гиперхолестеролемия [абс. (%)]	16 (100,0%)
Курение [абс. (%)]	12 (75,0%)
в т.ч. бросивших	0 (0,0%)
Сахарный диабет [абс. (%)]	4 (25,0%)
ХИНК [абс. (%)]	3 (18,8%)
<i>Лабораторные данные</i>	
Глюкоза, ммоль/л [абс. (%)]	5,7 [5,3; 7,6]
Общий холестерол, ммоль/л [абс. (%)]	нет данных
Триглицериды, ммоль/л [абс. (%)]	нет данных
ЛПНП, ммоль/л [абс. (%)]	нет данных
ЛПВП, ммоль/л [абс. (%)]	нет данных
Индекс атерогенности	нет данных
<i>Приём лекарственных препаратов до госпитализации</i>	
Аспирин [абс. (%)]	16 (100,0%)
Клопидогрель [абс. (%)]	2 (12,5%)
Варфарин [абс. (%)]	0 (0,0%)
Бета-блокаторы [абс. (%)]	15 (93,8%)
Ингибиторы АПФ [абс. (%)]	9 (56,3%)
Блокаторы рецепторов ангиотензина II [абс. (%)]	5 (31,3%)
Блокаторы кальциевых каналов (дигидропиридиновые) [абс. (%)]	11 (68,8%)

Продолжение Таблицы А1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование на микрочипе Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina)

Пациенты с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (N=16)	
<i>Приём лекарственных препаратов до госпитализации</i>	
Блокаторы кальциевых каналов (недигидропиридиновые) [абс. (%)]	0 (0,0%)
Дигоксин [абс. (%)]	0 (0,0%)
Петлевые диуретики [абс. (%)]	0 (0,0%)
Тиазидные диуретики [абс. (%)]	2 (12,5%)
Спиринолактон [абс. (%)]	1 (6,3%)
Нитраты [абс. (%)]	0 (0,0%)
Статины [абс. (%)]	16 (100,0%)
Кордарон [абс. (%)]	0 (0,0%)
Инсулин [абс. (%)]	0 (0,0%)
Метформин [абс. (%)]	2 (12,5%)

Примечание: АГ – артериальная гипертензия, АПФ – ангиотензин-превращающий фермент, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ЛПНП – липопротеиды низкой плотности, ЛПВП – липопротеиды высокой плотности, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, ТИА – транзиторная ишемическая атака, ФК – функциональный класс, ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, Q1 – 25% квартиль, Q2 – 50% квартиль (медиана), Q3 – 75% квартиль.

Таблица А2. Морфологическая характеристика атеросклеротических бляшек сонных артерий (N=16), включенных в исследование на микрочипе Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina)

Оценка покрышки атеросклеротической бляшки	
Толщина покрышки, мкм (Q2 [Q1;Q3])	308,5 [236,2; 468,6]
Наличие истончений [абс. (%)]	11 (68,8%)
Наличие разрывов [абс. (%)]	8 (50,0%)
Наличие эрозии [абс. (%)]	6 (37,5%)
Наличие изъязвлений [абс. (%)]	5 (31,3%)
Наличие кальцификатов [абс. (%)]	1 (6,3%)
Оценка ядра атеросклеротической бляшки	
Размер ядра, мкм (Q2 [Q1;Q3])	1803,5 [1087,9; 2234,8]
Наличие кальцификатов [абс. (%)]	4 (25,0%)
Оценка области плеча атеросклеротической бляшки	
Наличие разрывов [абс. (%)]	7 (43,8%)
Тромботические массы на поверхности бляшки [абс. (%)]	3 (18,8%)
Наличие кровоизлияний [абс. (%)]	7 (43,8%)
Наличие кальцификатов [абс. (%)]	2 (12,5%)

Продолжение Таблицы А2. Морфологическая характеристика атеросклеротических бляшек сонных артерий (N=16), включенных в исследование на микрочипе Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina)

Оценка воспалительной инфильтрации в бляшке	
Лейкоцитарная инфильтрация [абс. (%)]	16 (100,0%)
Выраженность лейкоцитарной инфильтрации [абс. (%)]:	
+	8 (50,0%)
++	8 (50,0%)
+++	0 (0,0%)
Наличие макрофагов [абс. (%)]	12 (75,0%)
Количество макрофагов, шт. (Q2 [Q1;Q3])	3,0 [3,0; 4,0]
Наличие лимфоцитов [абс. (%)]	16 (100,0%)
Количество лимфоцитов, шт. (Q2 [Q1;Q3])	9,5 [6,0; 12,3]
Наличие нейтрофилов [абс. (%)]	8 (50,0%)
Количество нейтрофилов, шт. (Q2 [Q1;Q3])	2,0 [1,0; 2,0]
Наличие пенистых клеток [абс. (%)]	5 (31,3%)
Количество пенистых клеток, шт. (Q2 [Q1;Q3])	5,0 [3,0; 10,0]
Оценка участков неоваскуляризации	
Наличие неоваскуляризации [абс. (%)]	6 (37,5%)
Реканализация [абс. (%)]	1 (6,3%)
Реканализация + эндотелий [абс. (%)]	1 (6,3%)
Оценка развития фиброза	
Степень фиброза сосуда [абс. (%)]:	
+	3 (18,8%)
++	11 (68,8%)
+++	2 (12,5%)
Степень фиброза липидного ядра [абс. (%)]:	
+	7 (43,8%)
++	7 (43,8%)
+++	2 (12,5%)
Степень фрагментации коллагена [абс. (%)]:	
+	5 (31,3%)
++	6 (37,5%)
+++	5 (31,3%)
Тип атеросклеротической бляшки по классификации Американской кардиологической ассоциации (American Heart Association, АНА) (Stary и др. 1995) [абс. (%)]:	
III,	1 (6,2%)
IV,	6 (37,5%)
IV-V,	0 (0,0%)
V,	1 (6,2%)
в т.ч. Va,	1 (6,2%)
в т.ч. Vc,	0 (0,0%)
VI,	8 (50,0%)
в т.ч. VIa,	1 (6,2%)
VIb,	5 (31,2%)
VIc	2 (12,5%)

Таблица А3. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование методом таргетного бисульфитного секвенирования

	Больные клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (N=87)	Контрольная группа относительно здоровых пациентов (N=31)	Уровень значимости <i>p</i>
<i>Клинические характеристики</i>			
Мужчины : Женщины	62:25	19:13	0,269
Возраст, лет (Q2 [Q1;Q3])	64,0 [60,0; 68,5]	67,0 [58,8; 71,8]	0,180
Индекс массы тела, кг/м ² (Q2 [Q1;Q3])	28,9 [25,9; 32,0]	26,2 [23,4; 29,1]	0,009
Метаболический синдром [абс. (%)]	57 (65,5%)	нет данных	—
Окружность талии, см (Q2 [Q1;Q3])	101,5 [93,0; 114,0]	нет данных	—
Стенокардия в анамнезе [абс. (%)]	57 (65,5%)	0 (0,0%)	0,002
Функциональный класс стенокардии [абс. (%)]			
- I ФК	12 (13,8%)	нет данных	—
- II ФК	31 (35,6%)		
- III ФК	5 (5,7%)		
Инфаркт миокарда в анамнезе [абс. (%)]	35 (40,2%)	2 (6,3%)	<0,001
ИБС в анамнезе [абс. (%)]	70 (80,5%)	5 (15,6%)	<0,001
Длительность ИБС, лет (Q2 [Q1;Q3])	6,5 [2,0; 10,8]	нет данных	—
ХСН в анамнезе [абс. (%)]	72 (82,8%)	1 (3,1%)	<0,001
Функциональный класс ХСН [абс. (%)]			
I ФК	6 (6,9%)	нет данных	—
II ФК	57 (65,5%)		
III ФК	3 (3,4%)		
ОНМК (ТИА, инсульт) в анамнезе [абс. (%)]	25 (28,7%)	0 (0,0%)	<0,001
АГ [абс. (%)]	85 (97,7%)	15 (46,9%)	<0,001
Длительность АГ, лет (Q2 [Q1;Q3])	13 [7; 20]	нет данных	—
Гиперхолестеролемиа [абс. (%)]	58 (66,7%)	5 (15,6%)	<0,001
Курение [абс. (%)]	44 (50,6%)	11 (34,4%)	0,002
в т.ч. бросивших	13 (14,9%)	0 (0,0%)	<0,001
Сахарный диабет [абс. (%)]	18 (20,7%)	3 (9,4%)	0,185
ХИНК [абс. (%)]	18 (20,7%)	нет данных	—
<i>Лабораторные данные (при поступлении)</i>			
Глюкоза, ммоль/л [абс. (%)]	5,8 [5,3; 7,3]	5,4 [5,1; 5,7]	0,003
Общий холестерол, ммоль/л [абс. (%)]	5,3 [4,0; 6,3]	5,2 [4,7; 5,7]	0,898
Триглицериды, ммоль/л [абс. (%)]	1,5 [1,3; 2,0]	1,3 [1,0; 1,5]	0,077
ЛПНП, ммоль/л [абс. (%)]	2,9 [2,0; 3,7]	3,1 [2,9; 3,7]	0,641
ЛПВП, ммоль/л [абс. (%)]	1,0 [1,0; 1,1]	1,4 [1,1; 1,6]	0,029
Индекс атерогенности	4,8 [2,4; 5,3]	2,7 [2,3; 3,3]	0,140
<i>Приём лекарственных препаратов до госпитализации</i>			
Аспирин, абс. (%)	60 (69,0%)	0 (0,0%)	0,005
Клопидогрель, абс. (%)	25 (28,7%)	1 (3,1%)	<0,001
Варфарин, абс. (%)	10 (11,5%)	0 (0,0%)	0,032
Бета-блокаторы, абс. (%)	52 (59,8%)	5 (15,6%)	<0,001

Продолжение Таблицы А3. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование методом таргетного бисульфитного секвенирования

	Больные клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (N=87)	Контрольная группа относительно здоровых пациентов (N=31)	Уровень значимости <i>p</i>
<i>Приём лекарственных препаратов до госпитализации</i>			
Ингибиторы АПФ, абс. (%)	41 (47,1%)	2 (6,3%)	<0,001
Блокаторы рецепторов ангиотензина II, абс. (%)	25 (28,7%)	5 (15,6%)	0,001
Блокаторы кальциевых каналов (дигидропиридиновые), абс. (%)	42 (48,3%)	1 (3,1%)	<0,001
Блокаторы кальциевых каналов (недигидропиридиновые), абс. (%)	9 (10,3%)	0 (0,0%)	0,112
Дигоксин, абс. (%)	11 (12,6%)	0 (0,0%)	0,033
Петлевые диуретики, абс. (%)	14 (16,1%)	0 (0,0%)	0,011
Тиазидные диуретики, абс. (%)	18 (20,7%)	2 (6,3%)	0,060
Спиринолактон, абс. (%)	14 (16,1%)	0 (0,0%)	0,010
Нитраты, абс. (%)	9 (10,3%)	0 (0,0%)	0,112
Статины, абс. (%)	62 (71,3%)	1 (3,1%)	0,004
Кордарон, абс. (%)	17 (19,5%)	0 (0,0%)	0,003
Инсулин, абс. (%)	9 (10,3%)	0 (0,0%)	0,112
Метформин, абс. (%)	15 (17,2%)	1 (3,1%)	0,039

Примечание: АГ – артериальная гипертензия, АПФ – ангиотензин-превращающий фермент, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ЛПНП – липопротеиды низкой плотности, ЛПВП – липопротеиды высокой плотности, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, ТИА – транзиторная ишемическая атака, ФК – функциональный класс, ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, Q1 – 25% квартиль, Q2 – 50% квартиль (медиана), Q3 – 75% квартиль.

Таблица А4. Морфологическая характеристика атеросклеротических бляшек сонных артерий (N=57), включенных в исследование методом таргетного бисульфитного секвенирования

Оценка покрышки атеросклеротической бляшки	
Толщина покрышки, мкм (Q2 [Q1;Q3])	388,6 [220,1; 571,2]
Наличие истончений [абс. (%)]	36 (63,2%)
Наличие разрывов [абс. (%)]	28 (49,1%)
Наличие эрозии [абс. (%)]	22 (38,6%)
Наличие изъязвлений [абс. (%)]	17 (29,8%)
Наличие кальцификатов [абс. (%)]	17 (29,8%)
Оценка ядра атеросклеротической бляшки	
Размер ядра, мкм (Q2 [Q1;Q3])	1469,8 [943,0; 2094,5]
Наличие кальцификатов [абс. (%)]	33 (57,9%)
Оценка области плеча атеросклеротической бляшки	
Наличие разрывов [абс. (%)]	33 (57,9%)
Тромботические массы на поверхности бляшки [абс. (%)]	10 (17,5%)
Наличие кровоизлияний [абс. (%)]	22 (38,6%)
Наличие кальцификатов [абс. (%)]	16 (28,1%)

Продолжение Таблицы А4. Морфологическая характеристика атеросклеротических бляшек сонных артерий (N=57), включенных в исследование методом таргетного бисульфитного секвенирования

Оценка воспалительной инфильтрации в бляшке	
Лейкоцитарная инфильтрация [абс. (%)]	55 (96,5%)
Выраженность лейкоцитарной инфильтрации [абс. (%)]:	
+	36 (63,2%)
++	18 (31,6%)
+++	2 (3,5%)
Наличие макрофагов [абс. (%)]	44 (77,2%)
Количество макрофагов, шт. (Q2 [Q1;Q3])	2,0 [1,0; 4,0]
Наличие лимфоцитов [абс. (%)]	56 (98,2%)
Количество лимфоцитов, шт. (Q2 [Q1;Q3])	7,0 [4,0; 12,0]
Наличие нейтрофилов [абс. (%)]	19 (33,3%)
Количество нейтрофилов, шт. (Q2 [Q1;Q3])	2,0 [1,5; 2,5]
Наличие пенистых клеток [абс. (%)]	20 (35,1%)
Количество пенистых клеток, шт. (Q2 [Q1;Q3])	3,0 [2,0; 7,0]
Оценка участков неоваскуляризации	
Наличие неоваскуляризации [абс. (%)]	19 (33,3%)
Реканализация [абс. (%)]	6 (10,5%)
Реканализация + эндотелий [абс. (%)]	3 (5,3%)
Оценка развития фиброза	
Степень фиброза сосуда [абс. (%)]:	
+	10 (17,5%)
++	36 (63,2%)
+++	9 (15,8%)
Степень фиброза липидного ядра [абс. (%)]:	
+	25 (43,9%)
++	18 (31,6%)
+++	12 (21,1%)
Степень фрагментации коллагена [абс. (%)]:	
+	19 (33,3%)
++	23 (40,4%)
+++	13 (22,8%)
Тип атеросклеротической бляшки по классификации Американской кардиологической ассоциации (American Heart Association, АНА) (Stary и др. 1995) [абс. (%)]:	
III,	3 (5,3%)
IV,	18 (31,6%)
IV-V,	1 (1,8%)
V,	7 (12,3%)
в т.ч. Va,	0 (0,0%)
в т.ч. Vc,	4 (7,0%)
VI,	27 (47,4%)
в т.ч. VIa,	8 (14,0%)
VIb,	13 (22,8%)
VIc	6 (10,5%)

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б1. Соответствие расположения CpG-сайтов генов, исследованных методом таргетного бисульфитного секвенирования, и аннотации платформы Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Array и Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip

Регион	CpG-сайты, аннотированные на платформе Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Array	CpG-сайты, аннотированные на платформе Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip	Локализация CpG-сайтов, исследованных методом таргетного бисульфитного секвенирования (GRCh37/hg19)
MIR10B	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,014,667
	cg12127282	cg12127282	chr2:177,014,686
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,014,775
	cg08717880	cg08717880	chr2:177,014,849
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,014,909
	cg27160395	cg27160395	chr2:177,014,950
	cg17104824	cg17104824	chr2:177,014,960
	cg00014998	cg00014998	chr2:177,014,963
	cg12215739	не аннотирован	chr2:177,014,966
	cg25942990	cg25942990	chr2:177,014,996
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,015,002
	cg01152019	cg01152019	chr2:177,015,044
	cg14399060	cg14399060	chr2:177,015,070
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,015,087
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,015,103
	cg00767581	cg00767581	chr2:177,015,125
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,015,141
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,015,149
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,015,172
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,015,194
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,015,197
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,015,208
	не аннотирован	не аннотирован	chr2:177,015,213
Предполагаемый промоторный регион гена MIR21	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,915,172
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,915,371
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,915,593
	cg16936953	cg16936953	chr17:57,915,665
	cg12054453	cg12054453	chr17:57,915,717
	cg01409343	cg01409343	chr17:57,915,741
	cg18942579	cg18942579	chr17:57,915,774
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,915,800
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,915,888

Продолжение Таблицы Б1. Соответствие расположения CpG-сайтов генов, исследованных методом таргетного бисульфитного секвенирования, и аннотации платформы Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Array и Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip

Регион	CpG-сайты, аннотированные на платформе Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Array	CpG-сайты, аннотированные на платформе Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip	Локализация CpG-сайтов, исследованных методом таргетного бисульфитного секвенирования (GRCh37/hg19)
CpG островок гена <i>MIR21</i>	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,241
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,306
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,347
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,385
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,391
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,416
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,418
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,441
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,448
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,458
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,502
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,554
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,594
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,598
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,641
	cg02782634	cg02782634	chr17:57,916,643
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,916,647
Тело гена <i>MIR21</i>	cg27023597	cg27023597	chr17:57,918,262
	не аннотирован	не аннотирован	chr17:57,918,340
	cg04276626	cg04276626	chr17:57,918,500
	cg02515217	cg02515217	chr17:57,918,601
	cg15759721	cg15759721	chr17:57,918,630
	cg07181702	cg07181702	chr17:57,918,682
Предполагаемый регуляторный элемент гена <i>MIR100</i> (E-box)	не аннотирован	не аннотирован	chr11:122,025,007
	не аннотирован	не аннотирован	chr11:122,025,042
	не аннотирован	не аннотирован	chr11:122,025,054
	не аннотирован	не аннотирован	chr11:122,025,072
	не аннотирован	не аннотирован	chr11:122,025,143
	не аннотирован	не аннотирован	chr11:122,025,178
	не аннотирован	не аннотирован	chr11:122,025,338
	не аннотирован	не аннотирован	chr11:122,025,419

Продолжение Таблицы Б1. Соответствие расположения CpG-сайтов генов, исследованных методом таргетного бисульфитного секвенирования, и аннотации платформы Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Array и Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip

Регион	CpG-сайты, аннотированные на платформе Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Array	CpG-сайты, аннотированные на платформе Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip	Локализация CpG-сайтов, исследованных методом таргетного бисульфитного секвенирования (GRCh37/hg19)
Тело гена <i>MIR127</i>	cg10726559	cg10726559	chr14:101,349,284
	cg25063505	cg25063505	chr14:101,349,286
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,301
	cg18862502	cg18862502	chr14:101,349,313
	cg11205335	cg11205335	chr14:101,349,373
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,379
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,397
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,422
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,433
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,436
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,466
	не аннотирован	cg14937446	chr14:101,349,484
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,509
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,515
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,519
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,561
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,577
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,583
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,589
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,597
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,606
	cg06792448	cg06792448	chr14:101,349,632
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,643
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,655
	не аннотирован	cg02675985	chr14:101,349,698
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,718
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,731
	cg19603885	cg19603885	chr14:101,349,736
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,742
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,752
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,764
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,772
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,781
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,784
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,799
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,823
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,833
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,854
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,856
	не аннотирован	не аннотирован	chr14:101,349,859

Окончание Таблицы Б1. Соответствие расположения CpG-сайтов генов, исследованных методом таргетного бисульфитного секвенирования, и аннотации платформы Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Array и Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip

Регион	CpG-сайты, аннотированные на платформе Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Array	CpG-сайты, аннотированные на платформе Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip	Локализация CpG-сайтов, исследованных методом таргетного бисульфитного секвенирования (GRCh37/hg19)
Предполагаемый регуляторный элемент гена <i>MIR143HG</i>	<i>не аннотирован</i>	cg01726320	chr5:148,786,329
	cg01558401	cg01558401	chr5:148,786,377
	<i>не аннотирован</i>	<i>не аннотирован</i>	chr5:148,786,382
	<i>не аннотирован</i>	<i>не аннотирован</i>	chr5:148,786,392
	<i>не аннотирован</i>	<i>не аннотирован</i>	chr5:148,786,454
	<i>не аннотирован</i>	cg26585864	chr5:148,786,518
	<i>не аннотирован</i>	<i>не аннотирован</i>	chr5:148,786,595
	<i>не аннотирован</i>	<i>не аннотирован</i>	chr5:148,786,653
	<i>не аннотирован</i>	<i>не аннотирован</i>	chr5:148,786,669
	<i>не аннотирован</i>	<i>не аннотирован</i>	chr5:148,786,836
Тело гена <i>MIR143</i>	cg04317047	cg04317047	chr5:148,808,388
	cg16684117	cg16684117	chr5:148,808,456
	<i>не аннотирован</i>	<i>не аннотирован</i>	chr5:148,808,474
	<i>не аннотирован</i>	<i>не аннотирован</i>	chr5:148,808,481
	cg21242144	cg21242144	chr5: 148,808,486

ПРИЛОЖЕНИЕ В

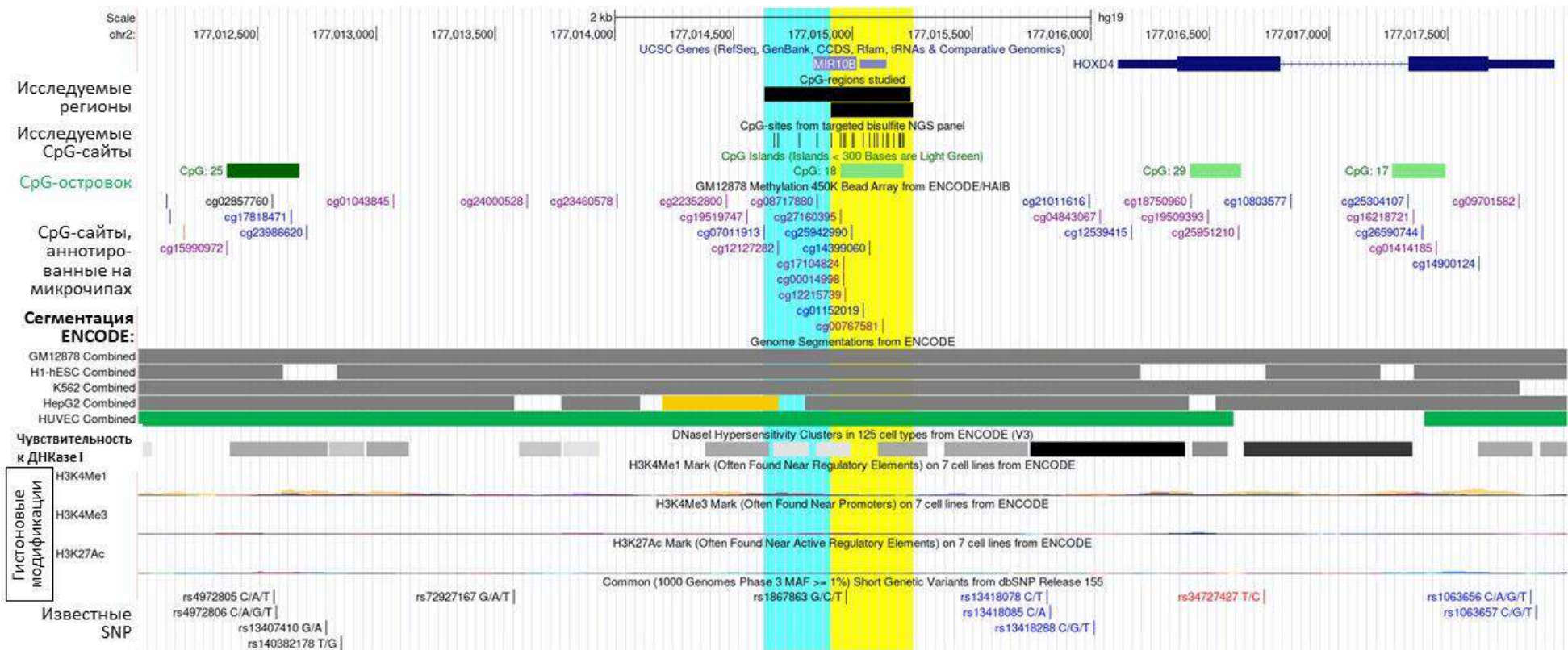


Рисунок В1. Локализация и эпигенетический контекст гена *MIR10B* (UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu/>). Жёлтым цветом обозначен регион chr2:177,014,909-177,015,253 (345 п.о., 20 CpG-сайтов), проанализированный в первом и втором запуске секвенатора, голубым – участок, *дополнительно* проанализированный в третьем запуске. Регион chr2:177,014,629-177,015,244 (616 п.о., 23 CpG-сайта), проанализированный в третьем запуске секвенатора, занимает сине-жёлтую область полностью. Сборка генома GRCh37/hg19.



Рисунок В2. Локализация и эпигенетический контекст гена *MIR21* (UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu/>). Голубым цветом слева обозначен проанализированный предполагаемый промоторный регион гена *MIR21*, chr17:57,915,138-57,916,025 (888 п.о., 9 CpG-сайтов); жёлтым цветом — проанализированный регион CpG-островов в области гена *MIR21*, chr17:57,915,960-57,916,717 (758 п.о., 17 CpG-сайтов); голубым цветом справа — проанализированный регион «тела» гена *MIR21*, chr17:57,918,142-57,918,840 (699 п.о., 6 CpG-сайтов). Сборка генома GRCh37/hg19.

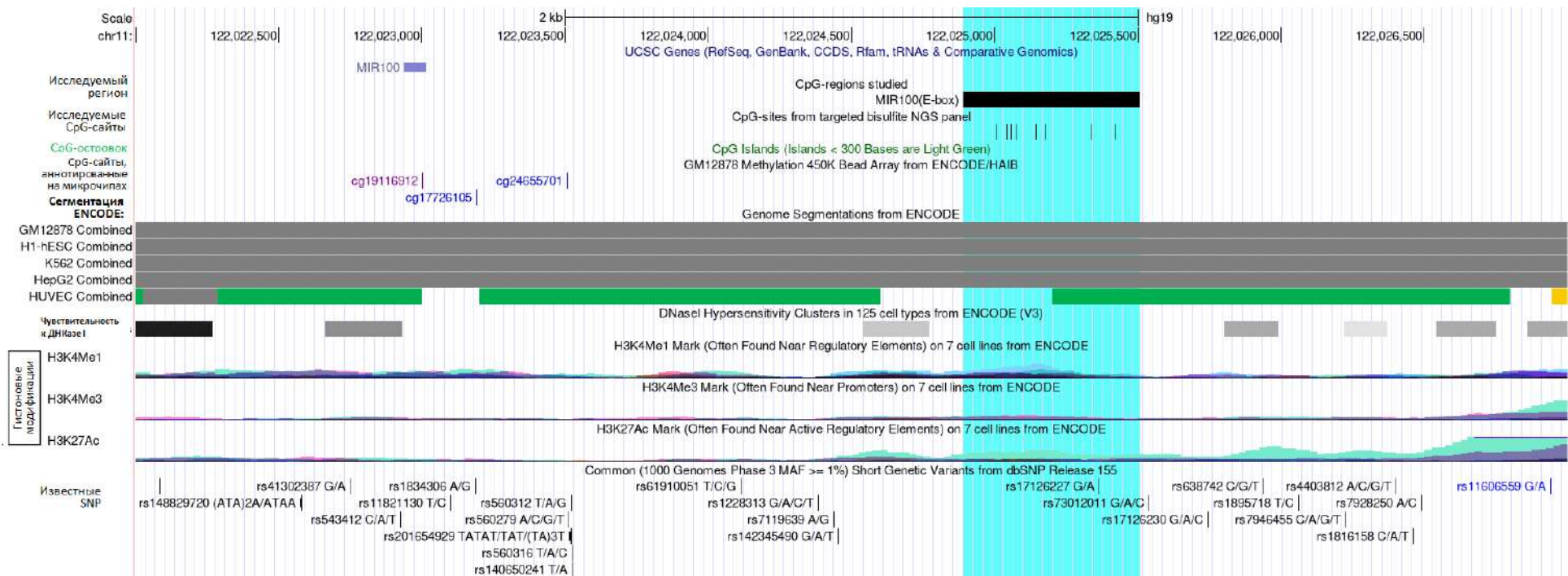


Рисунок В3. Локализация и эпигенетический контекст гена *MIR100* (UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu/>). Голубым цветом обозначен проанализированный регуляторный региона chr11:122,024,891-122,025,506 (616 п.о., 8 CpG-сайтов). Сборка генома GRCh37/hg19.

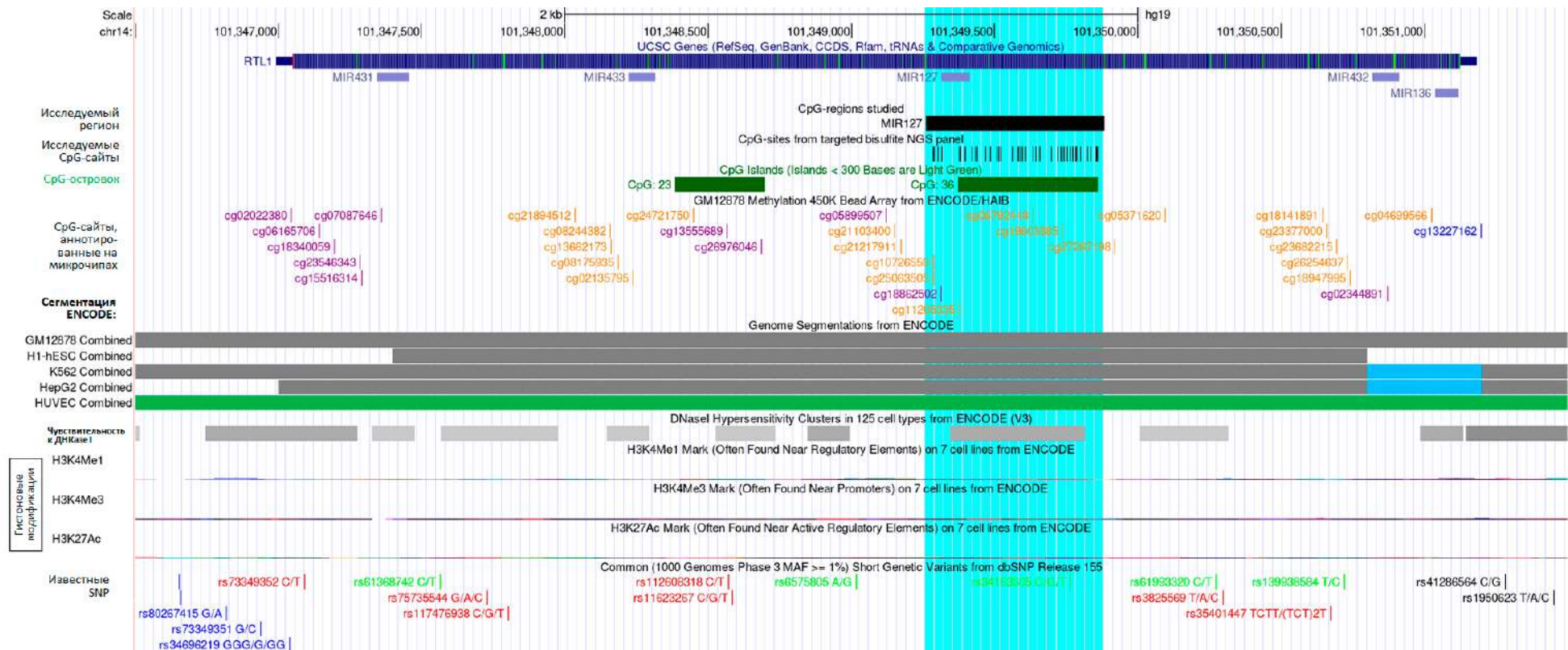


Рисунок В4. Локализация и эпигенетический контекст гена *MIR127* (UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu/>). Голубым цветом обозначен проанализированный регион chr14:101,349,259-101,349,884 (626 п.о., 40 CpG-сайтов). Сборка генома GRCh37/hg19.

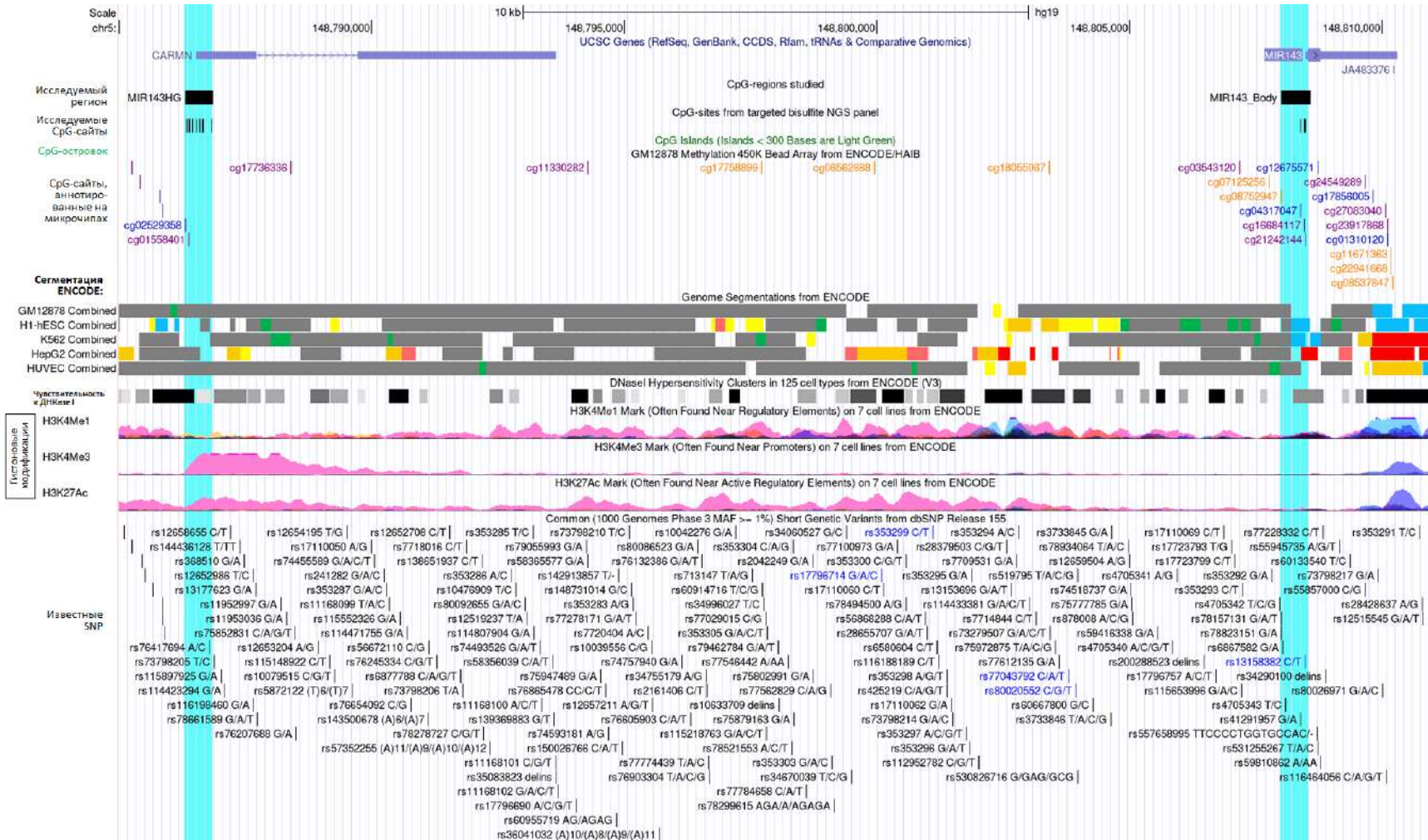


Рисунок В5. Локализация и эпигенетический контекст гена *MIR143* и его гена-хозяина *MIR143HG (CARMN)* (UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu/>). Голубым цветом обозначены проанализированные регионы: слева — промоторный регион *MIR143HG* chr5:148,786,304-148,786,864 (561 п.о., 10 CpG-сайтов), справа — область «тела» гена *MIR143* chr5:148,808,001-148,808,583 (583 п.о., 5 CpG-сайтов). Сборка генома GRCh37/hg19.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Таблица Г1. Уровни метилирования 23 CpG-сайтов в области гена *MIR10B* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		Медиана по региону	chr2:177,014,667 (CpG 1)	chr2:177,014,686 (CpG 2)	chr2:177,014,775 (CpG 3)	chr2:177,014,849 (CpG 4)	chr2:177,014,909 (CpG 5)	chr2:177,014,950 (CpG 6)	chr2:177,014,960 (CpG 7)	chr2:177,014,963 (CpG 8)	chr2:177,014,966 (CpG 9)	chr2:177,014,996 (CpG 10)	chr2:177,015,002 (CpG 11)
АСБ	β	26,91	25,18	20,86	23,12	36,74	33,42	33,81	33,66	25,74	14,71	16,87	16,99
ВГА	β	35,42	41,15	34,73	36,91	40,40	36,63	43,87	40,27	37,09	33,56	25,86	31,65
БПВ	β	70,83	75,80	71,31	74,85	71,61	77,34	80,96	79,45	69,51	66,67	49,50	74,55
ЛКБ	β	24,03	19,57	12,26	25,40	37,68	32,25	30,70	28,29	21,45	10,16	9,86	10,22
ЛКЗ	β	26,53	20,00	17,26	24,78	39,39	33,03	31,96	30,52	21,63	17,00	12,68	11,98
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	-8,51	-15,97	-13,87	-13,80	-3,67	-3,21	-10,06	-6,61	-11,35	-18,84	-8,99	-14,66
	p	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,068	0,088	0,002	0,014	<0,001	<0,001	0,001	<0,001
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	-43,92	-50,62	-50,44	-51,74	-34,87	-43,92	-47,15	-45,79	-43,78	-51,96	-32,63	-57,55
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	2,88	5,61	8,60	-2,28	-0,94	1,17	3,11	5,37	4,29	4,55	7,01	6,77
	p	0,016	0,091	0,066	0,241	0,897	0,542	0,174	0,002	<0,001	0,019	<0,001	<0,001
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	26,53	20,00	17,26	24,78	39,39	33,03	31,96	30,52	21,63	17,00	12,68	11,98
	p	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,003	<0,001
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	11,39	21,58	22,47	11,51	2,72	4,37	13,17	11,98	15,64	23,39	16,00	21,43
	p	<0,001	<0,001	<0,001	0,004	0,045	0,032	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	46,80	56,23	59,05	49,45	33,93	45,08	50,26	51,16	48,07	56,50	39,64	64,33
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-2,49	-0,43	-5,00	0,62	-1,71	-0,78	-1,26	-2,23	-0,19	-6,83	-2,82	-1,77
	p	0,270	0,987	0,597	0,532	0,283	0,545	0,744	0,944	0,222	0,016	0,092	0,655

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани, тёмно-серым - статистически значимому гиперметилированию.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости **$p < 0,05$** , полужирным курсивом — **$p < 0,01$** .

Продолжение Таблицы Г1. Уровни метилирования 23 CpG-сайтов в области гена *MIR10B* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		chr2:177,015,044 (CpG 12)	chr2:177,015,070 (CpG 13)	chr2:177,015,087 (CpG 14)	chr2:177,015,103 (CpG 15)	chr2:177,015,125 (CpG 16)	chr2:177,015,141 (CpG 17)	chr2:177,015,149 (CpG 18)	chr2:177,015,172 (CpG 19)	chr2:177,015,194 (CpG 20)	chr2:177,015,197 (CpG 21)	chr2:177,015,208 (CpG 22)	chr2:177,015,213 (CpG 23)
АСБ	β	14,20	24,93	28,63	24,43	19,43	29,13	35,71	29,28	27,22	30,59	24,38	40,20
ВГА	β	29,13	23,40	39,58	29,99	32,05	29,34	38,44	42,52	36,39	40,49	45,35	28,47
БПВ	β	55,68	36,56	69,92	45,39	62,31	60,47	66,18	76,67	64,80	76,96	78,05	52,99
ЛКБ	β	9,75	25,36	25,04	18,38	13,25	24,99	28,88	24,29	24,54	33,38	19,14	44,91
ЛКЗ	β	13,45	25,82	28,96	17,93	13,69	24,82	29,60	27,69	26,58	32,16	29,37	41,90
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	-14,92	1,53	-10,95	-5,57	-12,62	-0,20	-2,73	-13,24	-9,17	-9,90	-20,97	11,73
	p	<0,001	0,835	0,002	0,001	<0,001	0,482	0,084	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,311
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	-41,47	-11,63	-41,29	-20,96	-42,88	-31,33	-30,47	-47,39	-37,58	-46,37	-53,67	-12,79
	p	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,018
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	4,46	-0,43	3,58	6,05	6,18	4,14	6,83	4,99	2,67	-2,79	5,25	-4,71
	p	<0,001	0,643	0,040	<0,001	<0,001	0,079	0,003	0,001	0,062	0,328	0,088	0,172
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	13,45	25,82	28,96	17,93	13,69	24,82	29,60	27,69	26,58	32,16	29,37	41,90
	p	0,001	0,015	<0,001	0,085	0,005	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,004
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	19,38	-1,96	14,53	11,61	18,80	4,35	9,55	18,23	11,85	7,11	26,21	-16,44
	p	<0,001	0,647	<0,001	<0,001	<0,001	0,129	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,117
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	45,93	11,20	44,88	27,01	49,06	35,47	37,30	52,38	40,25	43,58	58,91	8,09
	p	<0,001	0,004	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,116
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-3,70	-0,46	-3,91	0,45	-0,44	0,17	-0,71	-3,40	-2,03	1,22	-10,23	3,01
	p	0,309	0,761	0,094	0,475	0,336	0,585	0,884	0,012	0,294	0,966	0,047	0,205

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани, тёмно-серым - статистически значимому гиперметилированию.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости **$p < 0,05$** , полужирным курсивом — **$p < 0,01$** .

Таблица Г2. Уровни метилирования 9 CpG-сайтов в области предполагаемого промоторного региона гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		Медиана по региону	chr17:57, 915,172	chr17:57, 915,371	chr17:57, 915,593	chr17:57, 915,665	chr17:57, 915,717	chr17:57, 915,740	chr17:57, 915,773	chr17:57, 915,800	chr17:57, 915,888
			(CpG 1)	(CpG 2)	(CpG 3)	(CpG 4)	(CpG 5)	(CpG 6)	(CpG 7)	(CpG 8)	(CpG 9)
АСБ	β	5,73	0,47	2,93	10,63	3,67	2,17	12,17	8,73	15,16	4,19
ВГА	β	4,00	0,73	1,61	2,00	4,53	2,22	13,28	5,67	10,69	6,49
БПВ	β	1,73	0,47	1,08	1,15	2,49	1,32	10,67	2,70	4,02	2,41
ЛКБ	β	30,30	0,67	3,59	13,42	43,23	18,40	60,50	37,08	48,64	21,15
ЛКЗ	β	36,82	2,15	6,96	15,24	43,91	25,95	62,76	42,37	53,44	20,78
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	1,73	-0,26	1,31	8,63	-0,86	-0,04	-1,12	3,06	4,47	-2,30
	p	0,448	0,976	0,974	0,096	0,398	0,800	0,330	0,202	0,354	0,722
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	4,00	0,00	1,84	9,48	1,18	0,85	1,50	6,02	11,14	1,78
	p	0,021	0,796	0,144	0,018	0,126	0,231	0,940	0,015	<0,001	0,324
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-24,57	-0,20	-0,67	-2,79	-39,57	-16,23	-48,33	-28,35	-33,48	-16,96
	p	<0,001	0,646	0,339	0,090	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	2,27	0,26	0,53	0,85	2,04	0,90	2,62	2,96	6,67	4,08
	p	0,063	0,482	0,087	0,231	0,091	0,150	0,036	0,043	0,003	0,111
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-26,30	0,06	-1,98	-11,42	-38,70	-16,18	-47,21	-31,42	-37,95	-14,66
	p	<0,001	0,650	0,047	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,007
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-28,57	-0,20	-2,51	-12,27	-40,74	-17,08	-49,83	-34,38	-44,62	-18,74
	p	<0,001	0,679	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,005
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-6,52	-1,48	-3,36	-1,82	-0,68	-7,54	-2,26	-5,29	-4,80	0,37
	p	0,014	0,005	0,012	0,134	0,613	0,015	0,147	0,065	0,052	0,423

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани, тёмно-серым - статистически значимому гиперметилированию.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости **$p < 0,05$** , полужирным курсивом — **$p < 0,01$** .

Таблица Г3. Уровни метилирования 16 CpG-сайтов CpG-островка в области гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		Медиана по региону	chr17:57, 916,241 (CpG 1)	chr17:57, 916,306 (CpG 2)	chr17:57, 916,347 (CpG 3)	chr17:57, 916,385 (CpG 4)	chr17:57, 916,391 (CpG 5)	chr17:57, 916,416 (CpG 6)	chr17:57, 916,418 (CpG 7)	chr17:57, 916,441 (CpG 8)	chr17:57, 916,448 (CpG 9)
АСБ	β	7,24	0,66	0,71	2,02	8,65	2,93	10,12	7,44	7,44	5,68
ВГА	β	9,42	0,57	1,25	2,18	12,53	4,45	12,15	9,86	14,04	7,64
БПВ	β	12,73	0,36	1,35	1,60	13,38	4,30	13,70	13,68	13,28	9,43
ЛКБ	β	62,40	2,14	3,64	20,85	49,04	42,17	63,33	61,54	65,67	63,98
ЛКЗ	β	66,11	4,19	8,67	29,56	55,61	45,81	67,75	66,70	65,86	66,97
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	-2,18	0,09	-0,54	-0,16	-3,88	-1,51	-2,03	-2,42	-6,60	-1,96
	p	0,051	0,812	0,227	0,174	0,002	0,014	0,017	0,014	<0,001	0,153
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	-5,49	0,30	-0,64	0,41	-4,73	-1,37	-3,58	-6,25	-5,84	-3,75
	p	0,037	0,262	0,166	0,518	<0,001	0,047	0,007	<0,001	<0,001	0,029
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-55,16	-1,49	-2,94	-18,83	-40,39	-39,24	-53,22	-54,10	-58,23	-58,30
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	-3,31	0,21	-0,10	0,57	-0,85	0,14	-1,55	-3,83	0,76	-1,79
	p	0,749	0,154	0,641	0,034	1,000	0,749	0,474	0,257	0,749	0,226
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-52,98	-1,57	-2,40	-18,67	-36,51	-37,73	-51,18	-51,68	-51,64	-56,33
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-49,66	-1,79	-2,29	-19,24	-35,66	-37,87	-49,63	-47,85	-52,40	-54,54
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-3,71	-2,04	-5,03	-8,72	-6,57	-3,64	-4,41	-5,16	-0,18	-3,00
	p	0,207	0,001	0,001	<0,001	0,025	0,036	0,038	0,030	0,138	0,082

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани, тёмно-серым - статистически значимому гиперметилированию.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости **$p < 0,05$** , полужирным курсивом — **$p < 0,01$** .

Продолжение Таблицы Г3. Уровни метилирования 16 CpG-сайтов CpG-островка в области гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		chr17:57, 916,458 (CpG 10)	chr17:57, 916,502 (CpG 11)	chr17:57, 916,594 (CpG 12)	chr17:57, 916,598 (CpG 13)	chr17:57, 916,641 (CpG 14)	chr17:57, 916,643 (CpG 15)	chr17:57, 916,647 (CpG 16)
АСБ	β	9,16	3,69	5,30	12,66	23,63	23,67	9,11
ВГА	β	10,26	5,54	7,75	10,74	9,72	8,70	4,81
БПВ	β	15,95	3,52	6,33	12,73	20,57	17,57	8,75
ЛКБ	β	65,70	52,20	59,69	63,63	61,22	63,34	47,32
ЛКЗ	β	68,95	55,15	60,82	67,60	69,19	70,96	53,46
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	-1,11	-1,84	-2,44	1,92	13,91	14,97	4,30
	p	0,175	0,010	0,002	0,693	0,913	0,753	0,608
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	-6,80	0,17	-1,03	-0,07	3,06	6,10	0,36
	p	0,054	0,494	0,146	0,365	0,386	0,486	0,162
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-56,55	-48,50	-54,39	-50,97	-37,59	-39,67	-38,21
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	-5,69	2,02	1,42	-1,99	-10,85	-8,87	-3,94
	p	0,326	0,084	0,134	0,510	0,336	0,265	0,210
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-55,44	-46,66	-51,95	-52,89	-51,50	-54,63	-42,51
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-49,75	-48,68	-53,36	-50,90	-40,64	-45,77	-38,57
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-3,24	-2,95	-1,13	-3,97	-7,98	-7,62	-6,14
	p	0,138	0,082	0,241	0,227	0,111	0,137	0,052

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости $p < 0,05$, полужирным курсивом — $p < 0,01$.

Таблица Г4. Уровни метилирования 5 CpG-сайтов в области гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		Медиана по региону	chr17:57,918,262 (CpG 1)	chr17:57,918,340 (CpG 2)	chr17:57,918,500 (CpG 3)	chr17:57,918,600 (CpG 4)	chr17:57,918,630 (CpG 5)
АСБ	β	8,66	3,15	5,58	16,20	8,96	9,80
ВГА	β	20,36	5,50	12,94	27,59	22,26	24,02
БПВ	β	24,50	5,31	11,70	27,69	24,47	28,31
ЛКБ	β	61,38	45,46	57,94	64,56	62,08	63,86
ЛКЗ	β	61,77	46,11	55,89	65,01	61,77	63,05
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	-11,70	-2,34	-7,36	-11,40	-13,31	-14,22
	p	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	-15,84	-2,16	-6,11	-11,49	-15,51	-18,51
	p	<0,001	0,011	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-52,71	-42,30	-52,35	-48,36	-53,12	-54,07
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	-4,14	0,18	1,24	-0,10	-2,20	-4,29
	p	0,109	0,883	0,530	0,554	0,205	0,109
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-41,01	-39,96	-44,99	-36,97	-39,81	-39,85
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-36,87	-40,14	-46,24	-36,87	-37,61	-35,56
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-0,40	-0,66	2,05	-0,45	0,30	0,81
	p	0,748	0,298	0,762	0,833	0,666	0,748

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости **$p < 0,05$** , полужирным курсивом — **$p < 0,01$** .

Таблица Г5. Уровни метилирования 7 CpG-сайтов в области регуляторного элемента E-бокс гена *MIR100* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		Медиана по региону	chr11:122,025,007 (CpG 1)	chr11:122,025,054 (CpG 2)	chr11:122,025,072 (CpG 3)	chr11:122,025,143 (CpG 4)	chr11:122,025,178 (CpG 5)	chr11:122,025,338 (CpG 6)	chr11:122,025,419 (CpG 7)
АСБ	β	57,34	44,49	78,58	88,57	90,67	56,59	45,78	51,18
ВГА	β	67,00	51,06	84,80	92,81	91,24	64,41	61,60	65,48
БПВ	β	77,19	64,28	87,32	93,25	93,04	74,69	72,53	73,27
ЛКБ	β	90,86	84,81	96,11	95,95	93,64	90,63	72,93	82,09
ЛКЗ	β	90,98	83,86	95,97	97,09	93,95	91,30	71,43	83,54
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	-9,65	-6,57	-6,22	-4,24	-0,57	-7,82	-15,81	-14,30
	p	<0,001	0,081	<0,001	<0,001	0,228	0,003	<0,001	<0,001
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	-19,85	-19,79	-8,74	-4,67	-2,37	-18,10	-26,74	-22,08
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-33,52	-40,32	-17,52	-7,37	-2,97	-34,04	-27,15	-30,91
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	-10,12	-13,20	-2,5	-0,44	-1,81	-10,28	-10,93	-7,79
	p	<0,001	<0,001	0,135	0,157	0,115	<0,001	<0,001	<0,001
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-23,86	-33,75	-11,30	-3,14	-2,41	-26,22	-11,35	-16,61
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,007	<0,001	<0,001	<0,001
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-13,67	-20,53	-8,79	-2,70	-0,60	-15,94	-0,40	-8,83
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,226	<0,001	0,489	<0,001
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-0,13	0,95	0,14	-1,15	-0,30	-0,67	1,50	-1,45
	p	0,483	0,823	0,684	0,041	0,909	0,192	0,961	0,935

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости **$p < 0,05$** , полужирным курсивом — **$p < 0,01$** .

Таблица Г6. Уровни метилирования 40 CpG-сайтов в области CpG-островка и гена *MIR127* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		Медиана по региону	chr14:101, 349,284	chr14:101, 349,286	chr14:101, 349,301	chr14:101, 349,313	chr14:101, 349,373	chr14:101, 349,379	chr14:101, 349,397	chr14:101, 349,422	chr14:101, 349,433	chr14:101, 349,436	chr14:101, 349,466	chr14:101, 349,484	chr14:101, 349,509
			(CpG 1)	(CpG 2)	(CpG 3)	(CpG 4)	(CpG 5)	(CpG 6)	(CpG 7)	(CpG 8)	(CpG 9)	(CpG 10)	(CpG 11)	(CpG 12)	(CpG 13)
АСБ	β	92,99	92,68	94,64	93,02	91,15	93,38	94,58	93,08	94,79	91,19	93,48	83,52	83,86	83,38
ВГА	β	95,04	93,83	91,62	95,29	92,74	93,05	93,90	95,31	94,99	89,91	92,75	87,33	84,74	88,33
БПВ	β	95,95	98,11	96,15	94,58	95,12	95,05	94,44	96,50	95,68	92,00	92,75	90,74	88,74	91,21
ЛКБ	β	93,83	93,98	95,55	94,20	91,99	94,24	95,16	93,37	95,08	93,49	95,35	88,02	86,14	88,76
ЛКЗ	β	94,75	94,84	95,15	95,00	91,91	95,01	94,94	93,88	95,08	94,37	96,12	90,14	87,57	90,09
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	-1,14	3,03	-2,27	-1,60	0,33	0,68	-2,23	-0,20	1,29	0,72	-3,81	-0,87	-4,96	-2,08
	p	0,895	0,868	0,267	0,301	0,975	0,901	0,186	0,895	0,774	0,994	0,092	0,895	0,502	0,774
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	-5,43	-1,51	-1,55	-3,97	-1,68	0,14	-3,42	-0,89	-0,81	0,72	-7,22	-4,87	-7,83	-5,17
	p	0,134	0,241	0,181	0,012	0,183	0,892	0,012	0,647	0,938	0,762	0,009	0,087	0,076	0,196
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-1,29	-0,91	-1,17	-0,84	-0,87	-0,59	-0,29	-0,30	-2,29	-1,88	-4,50	-2,27	-5,38	-1,33
	p	0,245	0,485	0,311	0,309	0,831	0,309	0,442	0,922	0,109	0,095	0,003	0,291	0,245	0,684
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	-4,29	-4,54	0,71	-2,37	-2,00	-0,54	-1,18	-0,69	-2,09	0,00	-3,41	-4,00	-2,87	-3,08
	p	0,126	0,436	1,000	0,227	0,436	1,000	0,388	0,921	0,436	0,742	0,421	0,394	0,662	0,436
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-0,15	-3,94	1,09	0,76	-1,20	-1,26	1,94	-0,10	-3,58	-2,60	-0,69	-1,40	-0,43	0,76
	p	0,520	0,519	0,519	0,691	0,741	0,416	0,416	0,856	0,295	0,416	0,990	0,736	0,904	0,856
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	4,14	0,60	0,38	3,13	0,81	-0,73	3,13	0,59	-1,49	-2,60	2,72	2,60	2,45	3,84
	p	0,182	0,453	0,488	0,033	0,326	0,326	0,033	0,746	0,214	0,400	0,302	0,351	0,326	0,317
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-0,87	0,40	-0,80	0,08	-0,77	0,22	-0,51	0,00	-0,88	-0,76	-2,12	-1,43	-1,33	2,95
	p	0,850	0,861	0,759	0,850	0,775	1,000	0,899	0,960	0,759	0,759	0,850	0,759	0,850	0,759

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани, тёмно-серым - статистически значимому гиперметилированию.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости $p < 0,05$, полужирным курсивом — $p < 0,01$.

Продолжение Таблицы Г6. Уровни метилирования 40 CpG-сайтов в области CpG-островка и гена *MIR127* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		chr14:101, 349,515	chr14:101, 349,519	chr14:101, 349,561	chr14:101, 349,577	chr14:101, 349,583	chr14:101, 349,589	chr14:101, 349,597	chr14:101, 349,606	chr14:101, 349,632	chr14:101, 349,643	chr14:101, 349,655	chr14:101, 349,698	chr14:101, 349,718	chr14:101, 349,731
		(CpG 14)	(CpG 15)	(CpG 16)	(CpG 17)	(CpG 18)	(CpG 19)	(CpG 20)	(CpG 21)	(CpG 22)	(CpG 23)	(CpG 24)	(CpG 25)	(CpG 26)	(CpG 27)
АСБ	β	89,92	96,03	96,09	93,88	97,29	93,74	92,76	96,63	93,96	94,58	88,30	87,42	89,73	95,19
ВГА	β	92,00	96,55	95,62	92,47	97,57	93,11	93,06	95,94	93,33	96,64	90,80	86,19	90,12	96,72
БПВ	β	95,08	100,00	96,88	96,59	98,44	98,40	94,97	98,04	97,53	97,57	93,77	91,90	94,95	98,29
ЛКБ	β	91,24	97,22	96,92	93,09	97,93	94,49	93,26	96,53	94,96	95,54	88,24	89,85	90,29	95,69
ЛКЗ	β	88,29	97,65	96,20	94,09	97,68	94,44	91,86	96,35	96,20	95,95	89,00	89,28	92,20	97,97
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	-1,14	-0,52	0,47	1,41	-0,28	0,63	-0,30	0,69	0,63	-2,05	-2,50	1,23	-0,38	-1,53
	p	0,895	0,604	0,937	0,186	0,521	0,774	0,994	0,832	0,472	0,366	0,213	0,895	0,975	0,434
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	-5,43	-3,97	-0,80	-2,70	-1,15	-4,66	-2,21	-1,41	-3,57	-2,99	-5,47	-4,48	-5,22	-3,10
	p	0,134	0,012	0,201	0,201	0,193	0,001	0,009	0,134	0,012	0,013	0,004	0,003	0,008	0,012
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-1,29	-1,19	-0,83	0,79	-0,63	-0,75	-0,50	0,10	-1,00	-0,96	0,06	-2,43	-0,55	-0,50
	p	0,245	0,504	0,274	0,390	0,291	0,458	0,429	0,831	0,309	0,194	0,942	0,109	0,848	0,684
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	-4,29	-3,45	-1,26	-4,11	-0,86	-5,29	-1,91	-2,10	-4,19	-0,94	-2,97	-5,71	-4,83	-1,57
	p	0,126	0,126	0,355	0,126	0,742	0,003	0,054	0,193	0,054	0,421	0,126	0,003	0,054	0,421
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-0,15	-0,67	-1,30	-0,62	-0,35	-1,38	-0,19	-0,59	-1,63	1,10	2,56	-3,66	-0,17	1,03
	p	0,520	0,856	0,519	0,520	0,950	0,519	0,786	0,519	0,295	0,856	0,383	0,295	0,930	0,691
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	4,14	2,78	-0,04	3,49	0,51	3,91	1,72	1,50	2,57	2,03	5,54	2,05	4,66	2,60
	p	0,182	0,033	0,543	0,124	0,495	0,003	0,033	0,124	0,099	0,122	0,004	0,074	0,010	0,033
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-0,87	-0,43	0,72	-1,00	0,24	0,04	1,40	0,18	-1,24	-0,41	-0,76	0,57	-1,92	-2,28
	p	0,850	0,850	0,775	0,775	0,850	0,759	0,759	0,850	0,775	0,850	0,775	0,960	0,356	0,356

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани, тёмно-серым - статистически значимому гиперметилированию.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости $p < 0,05$, полужирным курсивом — $p < 0,01$.

Окончание Таблицы Г6. Уровни метилирования 40 CpG-сайтов в области CpG-островка и гена *MIR127* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		chr14:101 ,349,736	chr14:101 ,349,742	chr14:101 ,349,752	chr14:101 ,349,764	chr14:101 ,349,772	chr14:101 ,349,781	chr14:101 ,349,784	chr14:101 ,349,799	chr14:101 ,349,823	chr14:101 ,349,833	chr14:101 ,349,854	chr14:101 ,349,856	chr14:101 ,349,859
		(CpG 28)	(CpG 29)	(CpG 30)	(CpG 31)	(CpG 32)	(CpG 33)	(CpG 34)	(CpG 35)	(CpG 36)	(CpG 37)	(CpG 38)	(CpG 39)	(CpG 40)
АСБ	β	95,09	93,46	95,73	94,98	94,22	91,59	94,89	90,77	94,84	86,98	92,01	93,55	92,96
ВГА	β	95,00	94,07	95,13	95,55	95,96	94,19	96,46	91,07	95,83	90,85	95,40	96,68	95,35
БПВ	β	94,98	91,91	93,10	95,14	97,92	96,38	97,30	95,78	97,21	94,05	95,04	98,28	96,46
ЛКБ	β	96,35	95,19	96,05	95,89	95,04	91,79	96,48	92,21	94,79	88,76	93,72	95,24	92,98
ЛКЗ	β	97,46	96,31	96,20	95,30	97,28	93,61	96,54	90,82	95,20	92,63	96,27	97,45	95,73
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	0,09	-0,61	0,60	-0,57	-1,74	-2,60	-1,56	-0,30	-1,00	-3,87	-3,40	-3,13	-2,38
	p	0,895	0,917	0,895	0,994	0,092	0,120	0,162	0,917	0,195	0,186	0,092	0,186	0,162
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	0,10	1,55	2,63	-0,16	-3,70	-4,79	-2,40	-5,01	-2,38	-7,07	-3,04	-4,73	-3,50
	p	0,547	0,512	0,119	0,892	0,004	0,002	0,012	0,011	0,039	0,002	0,153	0,066	0,152
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-1,26	-1,73	-0,32	-0,91	-0,82	-0,20	-1,58	-1,44	0,04	-1,78	-1,71	-1,69	-0,02
	p	0,109	0,147	0,309	0,989	0,390	0,299	0,040	0,390	0,899	0,095	0,147	0,397	0,899
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	0,02	2,16	2,03	0,41	-1,97	-2,19	-0,84	-4,71	-1,38	-3,20	0,36	-1,59	-1,11
	p	0,496	0,895	0,126	0,959	0,388	0,388	0,436	0,054	0,436	0,193	0,742	0,742	0,899
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-1,35	-1,12	-0,92	-0,34	0,92	2,40	-0,02	-1,14	1,04	2,09	1,69	1,44	2,37
	p	0,383	0,519	0,748	0,856	0,383	0,416	0,994	0,519	0,383	0,856	0,295	0,295	0,295
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-1,36	-3,28	-2,95	-0,74	2,89	4,59	0,82	3,57	2,42	5,28	1,33	3,04	3,48
	p	0,069	0,078	0,033	0,664	0,033	0,016	0,302	0,033	0,069	0,069	0,488	0,069	0,294
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-1,12	-1,12	-0,15	0,59	-2,25	-1,82	-0,07	1,39	-0,41	-3,86	-2,55	-2,21	-2,74
	p	0,759	0,850	0,759	0,850	0,356	0,759	0,850	0,850	0,850	0,759	0,759	0,759	0,722

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани, тёмно-серым - статистически значимому гиперметилированию.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости $p < 0,05$, полужирным курсивом — $p < 0,01$.

Таблица Г7. Уровни метилирования 10 CpG-сайтов в области предполагаемого промоторного региона гена *MIR143HG (CARMN)* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		Медиана по региону	chr5:148, 786,329	chr5:148, 786,377	chr5:148, 786,382	chr5:148, 786,392	chr5:148, 786,454	chr5:148, 786,518	chr5:148, 786,595	chr5:148, 786,653	chr5:148, 786,669	chr5:148, 786,836
			(CpG 1)	(CpG 2)	(CpG 3)	(CpG 4)	(CpG 5)	(CpG 6)	(CpG 7)	(CpG 8)	(CpG 9)	(CpG 10)
АСБ	β	26,06	26,81	34,11	32,56	30,38	21,63	21,09	22,28	25,24	14,51	28,96
ВГА	β	29,32	25,95	32,60	34,97	27,45	26,92	27,38	28,63	30,68	20,92	33,97
БПВ	β	17,42	13,81	16,67	17,42	17,19	22,47	16,67	17,95	16,36	11,06	15,75
ЛКБ	β	84,40	70,34	91,59	91,67	85,23	85,54	73,86	74,95	85,49	70,63	96,67
ЛКЗ	β	83,53	68,20	90,64	89,34	83,80	86,26	67,94	71,49	86,06	65,28	95,28
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	-3,25	0,85	1,51	-2,41	2,92	-5,29	-6,28	-6,36	-5,44	-6,41	-5,01
	p	0,262	0,451	0,854	0,552	0,854	0,800	0,059	0,017	0,149	0,154	0,193
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	8,64	13,00	17,44	15,14	13,19	-0,83	4,43	4,33	8,88	3,44	13,21
	p	0,011	0,016	0,001	<0,001	0,008	1,000	0,277	0,392	0,025	0,202	0,013
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-58,33	-43,53	-57,48	-59,11	-54,86	-63,91	-52,77	-52,67	-60,25	-56,12	-67,71
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,056	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	11,89	12,14	15,93	17,55	10,27	4,46	10,71	10,68	14,32	9,86	18,23
	p	<0,001	0,007	<0,001	<0,001	<0,001	0,800	0,001	0,004	<0,001	0,003	<0,001
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-55,08	-44,38	-59,00	-56,70	-57,78	-58,61	-46,48	-46,32	-54,81	-49,71	-62,69
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,017	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	-66,97	-56,53	-74,93	-74,25	-68,05	-63,07	-57,19	-57,00	-69,13	-59,56	-80,92
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,056	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	0,86	2,14	0,95	2,33	1,43	-0,73	5,92	3,46	-0,57	5,35	1,39
	p	0,891	0,611	0,351	0,071	0,217	0,639	0,809	0,212	0,886	0,759	0,957

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани, тёмно-серым - статистически значимому гиперметилированию.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости $p < 0,05$, полужирным курсивом — $p < 0,01$.

Таблица Г8. Уровни метилирования 5 CpG-сайтов в области гена *MIR143* в сосудах и лейкоцитах крови, исследованные методом таргетного бисульфитного секвенирования. Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Локализация CpG-сайта		Медиана по региону	chr5:148,786,329 (CpG 1)	chr5:148,786,377 (CpG 2)	chr5:148,786,382 (CpG 3)	chr5:148,786,392 (CpG 4)	chr5:148,786,454 (CpG 5)
АСБ	β	67,81	14,00	61,78	74,96	76,55	71,85
ВГА	β	74,73	23,05	71,31	80,23	85,46	81,19
БПВ	β	82,22	24,54	79,65	86,99	79,63	85,34
ЛКБ	β	27,51	9,25	24,17	33,98	40,94	30,20
ЛКЗ	β	27,70	8,80	25,73	33,49	29,26	29,94
АСБ vs ВГА	$\Delta\beta$	-6,92	-9,05	-9,54	-5,27	-8,90	-9,35
	p	0,019	<0,001	0,001	0,010	1,000	0,020
АСБ vs БПВ	$\Delta\beta$	-14,41	-10,54	-17,87	-12,03	-3,08	-13,49
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	<0,001
АСБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	40,30	4,75	37,61	40,97	35,61	41,65
	p	<0,001	0,012	<0,001	<0,001	0,100	<0,001
ВГА vs БПВ	$\Delta\beta$	-7,49	-1,49	-8,33	-6,76	5,83	-4,15
	p	0,003	0,338	<0,001	0,002	1,000	0,002
ВГА vs ЛКБ	$\Delta\beta$	47,22	13,80	47,15	46,24	44,52	50,99
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,500	<0,001
БПВ vs ЛКБ	$\Delta\beta$	54,71	15,29	55,48	53,00	38,69	55,14
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,200	<0,001
ЛКБ vs ЛКЗ	$\Delta\beta$	-0,19	0,45	-1,56	0,50	11,68	0,26
	p	1,000	1,000	0,779	0,988	0,393	0,707

Светло-серым цветом отмечены ячейки, соответствующие статистически значимому гипометилированию в ткани, тёмно-серым - статистически значимому гиперметилированию.

Полужирным шрифтом выделен уровень значимости **$p < 0,05$** , полужирным курсивом — **$p < 0,01$** .

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Таблица Д1 – Уровень экспрессии зрелых микроРНК ($\log_2\text{CPM}$) в 14 образцах атеросклеротических бляшек сонных артерий

МикроРНК/ образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Итого Q2 [Q1; Q3]
miR-143-3p	19,5	19,5	9,0	18,5	20,8	16,0	18,5	18,7	18,4	18,2	19,5	17,7	20,1	18,7	18,6 [18,2; 19,5]
miR-21-5p	16,9	16,8	15,9	16,5	18,6	16,8	17,2	17,9	17,8	17,5	17,5	18,1	15,9	13,6	17,1 [16,5; 17,7]
miR-100-5p	17,5	16,3	13,7	16,0	17,0	14,9	16,9	15,8	16,0	15,6	16,1	15,1	16,1	15,5	16,0 [15,5; 16,2]
miR-27b-3p	15,1	16,0	11,1	14,6	16,3	13,4	16,0	14,9	15,5	14,7	15,7	14,7	15,8	13,2	15,0 [14,6; 15,7]
miR-145-5p	12,7	14,0	6,7	13,3	12,8	11,4	11,7	11,5	12,1	12,1	13,3	10,6	13,8	13,6	12,4 [11,6; 13,3]
miR-23b-3p	12,1	12,9	9,4	12,1	13,8	10,8	11,8	11,2	12,3	11,2	12,2	11,6	11,9	10,1	11,8 [11,2; 12,2]
miR-145-3p	11,7	12,2	3,6	10,9	11,9	9,9	12,2	11,4	11,7	11,1	12,6	10,6	12,8	11,1	11,6 [10,9; 12,1]
miR-10b-5p	11,5	10,9	8,8	12,7	13,6	11,2	11,0	10,7	11,2	12,0	10,6	10,8	10,4	8,0	11,0 [10,6; 11,5]
miR-143-5p	8,4	10,9	1,6	8,7	8,8	7,6	10,1	8,9	9,9	9,4	10,8	8,8	11,6	10,4	9,2 [8,7; 10,4]
miR-127-3p	10,4	9,1	9,7	7,8	10,3	9,8	9,8	9,0	9,0	9,2	9,0	8,3	9,4	10,9	9,3 [9,0; 9,8]
miR-21-3p	8,6	7,9	6,5	9,9	9,3	8,8	8,4	10,2	9,7	10,1	10,0	10,0	9,9	10,1	9,8 [8,7; 10,0]
miR-29c-3p	8,0	9,5	5,9	8,8	9,0	7,0	7,0	8,0	8,5	8,2	8,7	7,6	9,0	7,2	8,1 [7,3; 8,8]
miR-155-5p	7,7	7,3	7,7	7,4	7,7	9,5	8,6	8,9	8,1	8,3	7,8	9,1	5,6	4,0	7,8 [7,5; 8,6]
miR-125b-1-3p	8,0	7,1	4,8	6,1	8,2	7,2	7,2	7,4	7,6	7,4	7,8	7,2	8,4	8,2	7,4 [7,2; 8,0]
miR-127-5p	5,8	5,6	3,9	5,3	6,3	6,0	6,5	5,7	5,8	6,3	6,2	5,6	7,0	8,0	5,9 [5,6; 6,3]
miR-29c-5p	3,8	6,6	3,9	6,2	6,2	5,7	5,3	6,2	6,2	6,3	6,5	5,6	6,9	6,6	6,2 [5,6; 6,5]
miR-27b-5p	5,0	6,2	1,6	5,5	7,0	3,2	5,4	5,4	5,9	5,6	6,2	5,1	6,2	6,3	5,6 [5,2; 6,2]
miR-23b-5p	5,0	5,3	-	4,8	4,8	4,4	4,1	4,2	5,0	4,1	5,0	3,7	6,1	6,3	4,8 [4,2; 5,0]
miR-24-1-5p	4,0	5,8	3,6	4,6	3,8	3,0	4,7	4,4	5,0	4,1	5,6	5,1	5,5	3,0	4,5 [3,9; 5,1]
miR-29b-2-5p	3,2	5,0	3,2	3,2	2,3	3,9	4,3	3,6	4,1	3,7	4,3	4,4	3,7	3,0	3,7 [3,2; 4,2]
miR-377-3p	-	1,5	-	3,2	-1,3	0,2	3,6	3,4	3,2	2,9	3,1	2,9	3,6	3,0	3,1 [2,6; 3,3]
miR-10b-3p	1,2	-	-	3,2	1,3	2,5	3,1	-	1,9	2,6	1,5	1,1	0,6	-	1,7 [1,2; 2,6]
miR-377-5p	-	-0,1	-	-	-0,3	3,2	-	-	1,7	-0,2	1,8	0,7	1,9	4,0	1,7 [-0,1; 1,9]

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность научному руководителю Томского НИМЦ, академику РАН, д.м.н., профессору, Пузырёву Валерию Павловичу за предоставленную возможность участия в интересных исследовательских работах, а также мудрые советы и замечания.

Автор выражает особую благодарность своему научному руководителю – руководителю лаборатории популяционной генетики, д.м.н., Назаренко Марии Сергеевне за неоценимую помощь на всех этапах выполнения исследования, терпение, ценные советы и рекомендации при обсуждении работы.

Автор благодарит научный коллектив лаборатории популяционной генетики за поддержку в освоении методик, проведении экспериментов, интерпретации полученных результатов, а также дружественную рабочую атмосферу.

Автор выражает признательность научным сотрудникам НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ за внимание, оказанное данной научной работе, в том числе за участие в обсуждении результатов диссертационной работы на заседаниях ученого совета.

Автор благодарит сотрудников отделения сердечно-сосудистой хирургии НИИ кардиологии Томского НИМЦ и НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (г. Кемерово) за помощь в обследовании пациентов и сборе биологического материала для выполнения данного исследования. За помощь в проведении гистологического исследования автор выражает благодарность старшему научному сотруднику отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, к.м.н. Крахмаль Надежде Валерьевне.

Автор особенно признательна своей семье за понимание, терпение, заботу и безграничную поддержку.