

лительных и опухолевых заболеваний тонкой кишки: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н.Ю. Петухова. – М., 2002. – 28 с.

Petoukhova N.Y. Modern possibilities of x-ray diagnostics of inflammatory and neoplastic diseases of the intestine: avtoref. dis. ... PhD / H.S. Petukhova. – M., 2002. – 28 p.

16. Портной Л. М. Современная лучевая диагностика в гастроэнтерологии и в гастроэнтеронкологии / Л.М.Портной, Н.Ю. Петухова. – М.: Видар, 2001. – 302 с.

Portnoy L.M. Modern x-ray diagnosis in gastroenterology and gastroenter oncology / L.M. Portnoy, N.Y. Petukhova. – M.: Vidar, 2001. – 302 p.

17. Портной Л.М. Современная лучевая диагностика болезни Крона тонкой кишки / Л.М. Портной, В.А. Исаков, И.А. Казанцева // Вестник рентгенологии, радиологии. – 2001. – №5. – С. 10-16.

Portnoy L.M. Modern radiological diagnosis of Crohn's disease of the small intestine / L. Portnoi, V.A. Isakov, I. Kazantsev // Herald of rontgenology and radiology. – 2001. – №5. – P. 10-16.

18. Портной Л.М. К вопросу о современных возможностях рентгенологической диагностики заболеваний тонкой кишки с помощью препарата «Энтеро-Вью» / Л.М.Портной, Н.Ю.Петухова, Г.А. Сташук // Вестник рентгенологии и радиологии. – 2001. – №1. – С. 10-19.

Portnoy L.M. To the question of modern possibilities of x-ray diagnostics of diseases of the small intestine with the help of the drug «Entero-View» / L.M. Portnoy, N.Y. Petukhova, G.A. Stashuk // Herald of Rontgenology and radiology. – 2001. – №1. – P. 10-19.

19. Ситкин С.И. Месалазин в терапии воспалительных заболеваний кишечника. Фармакокинетика и клиническая эффективность / С.И. Ситкин // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2002. – №1. – С. 15-19.

Sitkin S.I. Mesalazine in the treatment of inflammatory bowel disease. Farmacokinetics and clinical efficacy / S.I. Sitkin // Gastroenterology St. Petersburg. – 2002. – №1. – P. 15-19.

20. Федуллова Э.Н. Прогноз течения и оценка эффективности лечения неспецифического язвенного колита у детей: автореф. дисс. ... канд. мед. наук / Э.Н. Федуллова – М., 2003. – 25 с.

Fedulova E.N. Prognosis of effectiveness evaluation and treatment of ulcerative colitis in children: Avtoref. Diss. ... PhD / E.N. Fedulova. – M., 2003. – 25 p.

21. Чижикова М.Д. Болезнь Крона (терминальный илеит): клинко-рентгенологическая диагностика и лечение / М.Д. Чижикова, Э.С. Сиваш, А.И. Парфенов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2002. – №1. – С. 91-93.

Chizhikova M.D. Crohn's Disease (terminal

ileitis): clinical and x-ray diagnostics and treatment / M.D. Chizhikova, A.S. Sivash, A.I. Parfenov // Experimental and clinical gastroenterology. – 2002. – №1. – P. 91-93.

22. Щербakov П.Л. Воспалительные заболевания кишечника у детей. Болезнь Крона и неспецифический язвенный колит / П.Л. Щербakov // Детский доктор. – 2000. – №4. – С. 22-26.

Shcherbakov P.L. Inflammatory bowel disease in children. Crohn's disease and ulcerative colitis / P.L. Shcherbakov // Children's doctor. – 2000. – №4. – 22-26 p.

23. Ali S.I. Paediatric Crohn's disease: a radiological review / S.I. Ali, H.M.L. Carty // European radiology. – 2000. – Vol. 10. – P. 1085-1094.

24. Accuracy of enteroclysis in Crohn's Disease of the small bowel: a retrospective study / L.C. Cirillo, L. Camera, M. Della-Noce [et al.] // Europe Radiology – 2000. – №10. – P. 1894-1898.

25. Endoscopic and bioptic findings in the upper gastrointestinal tract in patients with Crohn's disease/ M. Alcantara, R. Rodriguez, L.M. Potenciano [et al.] // Endoscopy. – 1993. – Vol. 25, № 4. – P. 282-286.

26. Paerregaard A.H. // Chronic inflammatory bowel disease in children. An epid study from eastern Denmark 1998-2000 / A.H. Paerregaard // UgeskrLaeger. – Denmark, 2002. – №23 – P.34-45.

ГЕНЕТИКА МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

М.С. Назаренко, А.В. Марков, Ю.А. Королёва, И.Н. Лебедев, А.А. Слепцов, А.В. Фролов, О.Л. Барбараш, В.П. Пузырёв

СТАТУС МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В ТКАНЯХ СОННЫХ АРТЕРИЙ У БОЛЬНЫХ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

УДК 612.143; 613.25

Проведен анализ статуса метилирования промоторов и первых экзонов генов *CDKN2A* (*p16INK4a*, *p14ARF*), *CDKN2B* (*p15INK4b*) и *RB1* в 120 образцах сонных артерий с применением двух различных технологий: метилчувствительной полимеразной цепной реакции (МЧ-ПЦР) и метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР). Метилирование ДНК не было выявлено в выраженных атеросклеротических бляшках или прилежащих макроскопически неизменённых тканях сосудистой стенки тех же самых больных. Установлено, что статус метилирования генов *CDKN2A*, *CDKN2B* и *RB1* не может быть использован в качестве маркера атеросклероза в сонных артериях человека.

Ключевые слова: метилирование ДНК, атеросклероз, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *RB1*.

We tested the hypothesis that the aberrant methylation of the promoters and first exons of *CDKN2A* (*p16INK4a*, *p14ARF*), *CDKN2B* (*p15INK4b*) and *RB1* genes was associated with carotid atherosclerosis. The DNA methylation status of these cell cycle control-associated genes was analysed in 120 samples of carotid arteries using two different techniques: methylation-sensitive polymerase chain reaction (MS-PCR) and methylation-specific PCR (MSP-PCR). DNA methylation was not detected in advanced atherosclerotic plaques or nearby macroscopically intact tissues of the vascular wall from the same patients. The methylation status of *CDKN2A*, *CDKN2B* and *RB1* genes does not appear to be a marker of human carotid atherosclerosis.

Keywords: DNA methylation, atherosclerosis, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *RB1*.

НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск): **НАЗАРЕНКО Мария Сергеевна** – н.с., **МАРКОВ Антон Владимирович** – аспирант, **КОРОЛЁВА Юлия Александровна** – ординатор, **ЛЕБЕДЕВ Игорь Николаевич** – д.б.н., зав. лаб., **СЛЕПЦОВ Алексей Анатольевич** – аспирант, **ПУЗЫРЁВ Валерий Павлович** – акад. РАМН, проф., директор; **ФРОЛОВ Алексей Витальевич** – к.м.н., н.с. НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (г. Кемерово); **БАРБАРАШ Ольга Леонидовна** – д.м.н., проф., директор НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН.

Введение. Атеросклероз и связанные с ним случаи ишемии головного мозга остаются главной причиной заболеваемости и смертности во всём мире, включая Россию. В последние годы понимание молекулярных механизмов патогенеза этих заболеваний достигло значительного прогресса.

В настоящее время самым надёжным генетическим маркером атеро-

склеротических сосудистых заболеваний считается локус 9p21 [9]. SNP, ассоциированные с этими заболеваниями, расположены в непосредственной близости от генов *CDKN2A* (кодирует ингибитор циклин-зависимой киназы *p16INK4a* и его транскрипционные варианты при изменении рамки считывания – *p14ARF* у человека и *p19ARF* у мыши) и *CDKN2B* (кодирует ингибитор

циклин-зависимой киназы *p15INK4b*). Белковые продукты этих генов вовлечены в регуляцию клеточного цикла и апоптоз. Делеции и aberrантное метилирование ДНК в локусе *INK4b-ARF-INK4a* часто наблюдаются при опухолях. Последние исследования на модельных животных показали, что потеря белков, связанных с контролем клеточного цикла, таких как *p19ARF* и *Rb*, обуславливает прогрессию атеросклеротического поражения, которое совпадает с изменением клеточного состава [10,13].

Кроме того, aberrантная эпигенетическая регуляция локуса *9p21* посредством антисмысловой некодирующей РНК, названной *ANRIL*, также способствует развитию атеросклероза [9]. Вполне возможно, что этот механизм функционирует не изолированно, а в тесной связи с другими эпигенетическими модификациями, такими как метилирование ДНК. Aberrантное метилирование промоторов приводит к транскрипционной инактивации генов, вовлечённых в клеточный цикл регуляторным *p15INK4b-p16INK4a*-циклин *D/CDK4-RB1*-опосредованным путём (*RB1*-путём) в злокачественных опухолях человека. В то же время статус метилирования этих генов при атеросклерозе не был исследован ранее.

Цель исследования: оценить статус метилирования промоторов и первых экзонов генов *CDKN2A (p16INK4a, p14ARF)*, *CDKN2B (p15INK4b)* и *RB1* в образцах сонных артерий у пациентов с атеросклерозом.

Материалы и методы. В группу исследования включено 60 мужчин (средний возраст 62,3±6,7 лет) с диагнозом стеноза >70% сонной артерии (критерий NASCET), отобранных для хирургического лечения тяжёлого стеноза сонной артерии в ФГБУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний». Ишемические инсульты головного мозга были зарегистрированы в анамнезе у 21 пациента (35%). У всех пациентов были обнаружены ишемическая болезнь сердца и артериальная гипертензия. У 26 мужчин (43,3%) наблюдался атеросклероз периферических артерий, 53 пациента (88,3%) имели гиперлипидемию. Сахарный диабет 2 типа выявлен у 50% больных. На момент операции были зарегистрированы факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и истории болезни. Данное исследование одобрено местным этическим комитетом, и от всех пациентов было получено письменное информированное

согласие.

Образцы сосудов были получены из выраженных атеросклеротических бляшек и прилежащей макроскопически неизменённой ткани у одних и тех же пациентов. Сразу же после эндартерэктомии образцы были осмотрены, тщательно очищены от масс кальцификации, отложений липидов, тромбов и отмыты в стерильном физиологическом растворе. Все образцы, содержащие интиму и внутреннюю мышечную оболочку, замораживались в жидком азоте и хранились при температуре -80°C до проведения молекулярного анализа.

Геномная ДНК выделена при помощи стандартной обработки протеиназой K и последующей экстракции фенол/хлороформным методом.

Статус метилирования промоторов генов *CDKN2A (p16INK4a, p14ARF)* и *RB1* был определён методом метилчувствительной полимеразной цепной реакции (МЧ-ПЦР) [1]. Перед проведением ПЦР образцы геномной ДНК были обработаны рестриктазой *HpaII* (Fermentas, Литва). Фрагмент промотора *CDKN2A (p16INK4a)* размером 351 п.о. содержит 4 сайта рестрикции *HpaII*, фрагмент промотора *CDKN2A (p14ARF)* размером 283 п.о. содержит 6 сайтов рестрикции *HpaII* и фрагмент промотора *RB1* размером 239 п.о. содержит 4 сайта рестрикции *HpaII*, амплифицируемых в ПЦР. В качестве внутреннего ПЦР-контроля были использованы фрагменты экзона 8 *EXT2* (253 п.о.) и микросателлит *D9S145* (144 п.о.).

В дополнение к МЧ-ПЦР для анализа статуса метилирования экзона 1 генов *CDKN2A (p16INK4a, p14ARF)* и *CDKN2B (p15INK4b)* был использован другой подход – метил-специфичная ПЦР (МС-ПЦР). Первоначально проводилась бисульфитная обработка ДНК с использованием набора «EZ DNA Methylation™ Kit» («Zymo Research», США). Модифицированная бисульфитом ДНК амплифицировалась в ПЦР с двумя наборами праймеров, специфичных для метилированной последовательности ДНК и

двумя наборами праймеров, специфичных для неметилированной последовательности, как описано в работах Herman с соавт. (1996) [12] и Amatyа с соавт. (2004) [2]. В общей сложности с помощью МС-ПЦР было изучено 23 CpG-динуклеотида в экзоне 1 генов *CDKN2A (p16INK4a, p14ARF)* и *CDKN2B (p15INK4b)*.

Результаты и обсуждение. Метилирование *CDKN2A, CDKN2B* и *RB1* было проанализировано в 120 образцах сонных артерий пациентов, больных атеросклерозом, двумя различными методами: МЧ-ПЦР и МС-ПЦР. В обработанных *HpaII* образцах ДНК из атеросклеротических бляшек (AP) и макроскопически неизменённой ткани (IT) сонных артерий продуктов ПЦР не наблюдалось (рис.1). В эксперименте с использованием МС-ПЦР для всех образцов определялось наличие только неметилированных аллелей (рис.2).

Атеросклероз является распространённым заболеванием, в патогенезе которого важную роль играет клеточная пролиферация. Этот биологический процесс лежит в основе прогрессии поражения на всех этапах: от отложения липидов до осложнений атеросклеротической бляшки [4]. Уникальная роль генов *CDKN2A (p16INK4a, p14ARF)*, *CDKN2B (p15INK4b)* и *RB1* в клеточной пролиферации позволяет предположить их возможную роль и в атерогенезе.

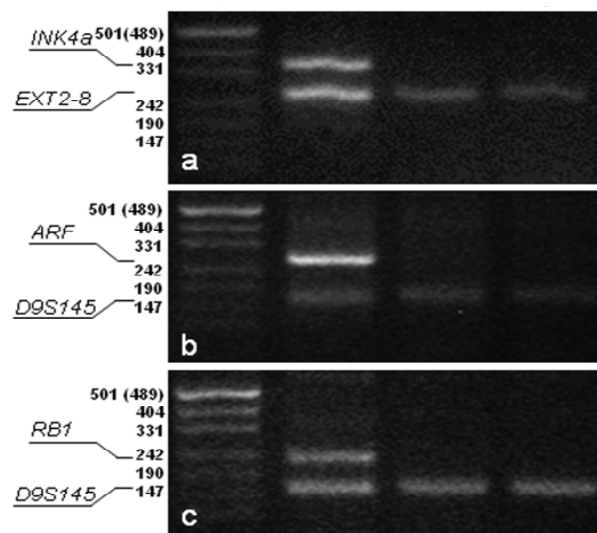


Рис. 1. Анализ МЧ-ПЦР метилирования промотора генов *CDKN2A (p16INK4a – a, p14ARF – b)* и *RB1 (c)* в атеросклеротической бляшке (AP) и макроскопически неизменённой ткани (IT) сонных артерий пациентов, больных атеросклерозом. Показана метилчувствительная рестриктаза (*HpaII*), использованная для МЧ-ПЦР; необработанная ДНК (Control) взята в качестве положительного контроля; фрагменты экзона 8 *EXT2* и *D9S145* использованы как внутренний контроль ПЦР

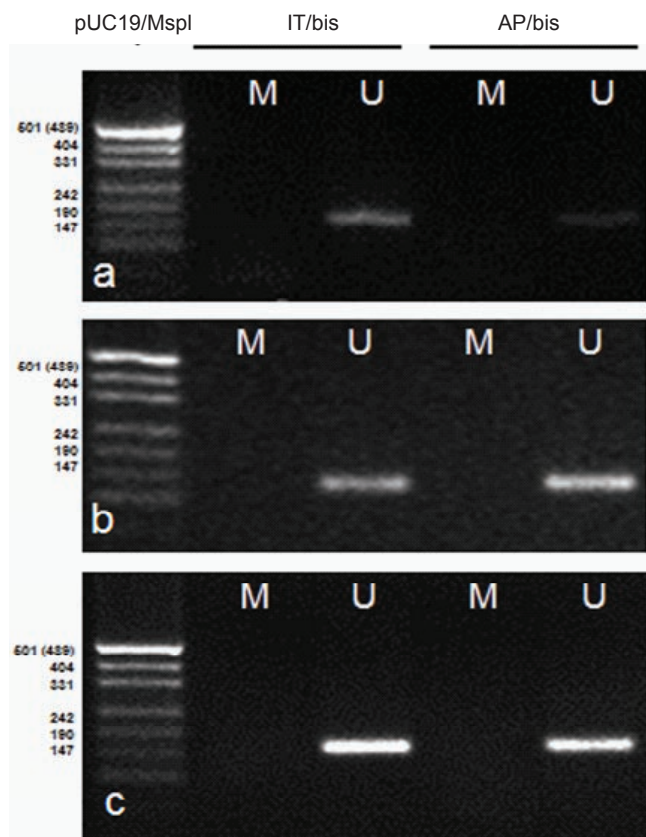


Рис. 2. Анализ МС-ПЦР метилирования 1 экзона генов *CDKN2A* (*p16INK4a* – а, *p14ARF* – б) и *CDKN2B* (*p15INK4b* – в) в атеросклеротической бляшке (АР) и макроскопически неизменённой ткани (ИТ) сонных артерий пациентов, больных атеросклерозом. ДНК, обработанная бисульфитом (bis), амплифицирована со специфичными праймерами, соответствующими метилированному (М) и неметилированному (U) состоянию интересующего локуса

Многочисленные исследования подчёркивают важность изменений состояния метилирования ДНК при атеросклерозе [3, 6]. Тем не менее на сегодняшний день лишь некоторые исследования сообщили об изменениях метилирования ДНК в сосудистых тканях пациентов с атеросклерозом, используя подход «кандидатных генов» [5,7,11,14,15] и полногеномный анализ на основе микрочипов [8].

Основным результатом данного исследования является то, что промоторы и/или первые экзоны генов *CDKN2A* (*p16INK4a*, *p14ARF*), *CDKN2B* (*p15INK4b*) и *RB1* в атеросклеротических бляшках и близлежащих макроскопически неизменённых тканях сонных артерий у одних и тех же пациентов являются неметилированными.

Метилирование ДНК в пределах промоторов генов позволяет предположить наличие его наибольшего функционального отношения к контролю экспрессии генов. Результат нашей работы согласуется с данными других авторов, показавших, что *CDKN2A* (*p16INK4a*,

p14ARF) и *CDKN2B* (*p15INK4b*) экспрессируются в гладкомышечных клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий и в нормальном состоянии артерий человека [9].

Данное исследование имеет некоторые ограничения. На профиль метилирования ДНК может оказывать влияние различное соотношение типов клеток, входящих в состав сосудистой стенки в разных артериальных бассейнах, что не было охарактеризовано в настоящем исследовании. Информацию о метилировании ДНК, специфичную для разных типов клеток, могла бы предоставить лазерная микродиссекция в сочетании с соответствующим количественным методом (например, пиросеквенирование).

Заключение. Исследование пациентов с выраженным атеросклерозом сонных артерий свидетельствует, что статус метилирования *CDKN2A*, *CDKN2B* и *RB1*, скорее всего, не является важным фактором, определяющим развитие атеросклероза сонных артерий у человека.

Исследование поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 10-04-00674а) и ФЦП «Научные и педагогические кадры инновационной России» (№8062).

Литература

1. Аномальное метилирование некоторых генов-супрессоров при спорадическом раке молочной железы / В.В. Землякова, А.И. Жевлова, В.В. Стрельников [и др.] // Молекулярная биология. – 2003. – Т.37, №4. – С. 696-703.
2. Abnormal methylation of some tumor suppressor genes at sporadic breast cancer / V. V. Zemliakova, A.I. Zhevlova, V.V. Strel'nikov [et al.] // Mol. Biol. – 2003. – V. 37, № 4. – P. 696-703.
3. Amatyа V.J. Methylation of p14(ARF)

gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation / V.J. Amatyа, Y. Takeshima, K. Inai // Mod. Pathol. – 2004. – V. 17, № 6. – P. 705-710.

3. Baccarelli A. Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies / A. Baccarelli, M. Rienstra, E.J. Benjamin // Circ. Cardiovasc. Genet. – 2010. – V. 3. – № 6. – P. 567-573.

4. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies / J. J. Fuster, P. Fernandez, H. Gonzalez-Navarro [et al.] // Cardiovasc. Res. – 2010. – V. 86. – № 2. – P. 254-264.

5. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions / M.O. Hiltunen, M.P. Turunen, T. P. Rutanen [et al.] // Vasc. Med. – 2002. – V. 7. – № 1. – P. 5-11.

6. Epigenetics and atherosclerosis / M.P. Turunen, E. Aavik, S. Yla-Herttuala // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1790, № 9. – P. 886-891.

7. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence / J. Kim, J.Y. Kim, K.S. Song [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – V. 1772, № 1. – P. 72-80.

8. Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries / S.A. Castillo-Diaz, M.E. Garay-Sevilla, M.A. Hernandez-Gonzalez [et al.] // Int. J. Mol. Med. – 2010. – V. 26, № 5. – P. 691-700.

9. Holdt L.M. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations / L.M. Holdt, D. Teupser // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2012. – V. 32, № 2. – P. 196-206.

10. Macrophage retinoblastoma deficiency leads to enhanced atherosclerosis development in ApoE-deficient mice / L.S. Boesten, A.S. Zadelaar, A. Nieuwkoop [et al.] // FASEB. J. – 2006. – V. 20, № 7. – P. 953-955.

11. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system / W.S. Post, P.J. Goldschmidt-Clermont, C. C. Wilhide [et al.] // Cardiovasc. Res. – 1999. – V. 43, № 4. – P. 985-991.

12. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands / J.G. Herman, J.R. Graff, S. Myohanen [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1996. – V. 93, №18. – P.9821-9826.

13. p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis / H. Gonzalez-Navarro, Y.N. Abu Nabah [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2010. – V. 55, № 20. – P. 2258-2268.

14. Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques / C. Zawadzki, N. Chatelain, M. Delestre [et al.] // Atherosclerosis. – 2009. – V. 204, № 2. – P. e4-14.

15. Inactivation of monocarboxylate transporter MCT3 by DNA methylation in atherosclerosis / S. Zhu, P. J. Goldschmidt-Clermont, C. Dong // Circulation. – 2005. – V. 112, № 9. – P. 1353-1361.