

doi 10.18699/vjgb-26-94

Особенности метилирования ДНК в пораженных тканях аорты при дилатации/аневризме и расслоении восходящего отдела

И.А. Гончарова , А.А. Зарубин , А.В. Марков , С.А. Шипулина , Н.П. Бабушкина , Ю.А. Королёва ,
А.А. Слепцов , М.С. Назаренко 

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра
Российской академии наук, Томск, Россия

 irina.goncharova@medgenetics.ru

Аннотация. Дилатация/аневризма и расслоение восходящей аорты относятся к жизнеугрожающим заболеваниям, и выявление эпигенетического ландшафта, регулирующего функционирование генома в клетках аорты при данной патологии, является актуальной задачей. В связи с этим в настоящем исследовании выполнена идентификация дифференциально метилированных генов (ДМГ) в тканях аорты при дилатации/аневризме и расслоении восходящего отдела с помощью реанализа данных по метилированию ДНК, представленных в открытом доступе в репозитории NCBI GEO (Gene Expression Omnibus). Проведен реанализ результатов исследований (GSE50192, GSE202047, GSE84274), реализованных на платформе Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip. Биоинформатическая деконволюция клеточного состава тканей сосудов осуществлена с помощью алгоритма HEPiDISH, а также разработанного референса, включавшего набор CpG-сайтов, индекс метилирования которых специфичен для эндотелиальных клеток, фибробластов, гладкомышечных и иммунных клеток. Реанализ данных показал, что расслоение аорты и ее дилатация/аневризма с двухстворчатым аортальным клапаном характеризуются специфическим профилем метилирования ДНК относительно интактной ткани аорты, поскольку различаются как по числу, так и по спектру ДМГ. Поправка на клеточный состав аннулирует основное количество ДМГ, но позволяет составить представление о наличии воспаления в ткани аорты, оцениваемого по степени инфильтрации ткани иммунными клетками, охарактеризовать роль воспалительного инфильтрата в нарушении целостности стенки аорты и выявить гены, отражающие различия, связанные с изучаемыми фенотипами, а не с межгрупповой гетерогенностью клеточных популяций. Гены *NFIX*, *PCDH7*, *MED13L*, *LMO4*, *DIP2C*, *PLEKHF1*, *NKD1*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *ARAP2*, *TBX3*, *TBX5*, оставшиеся в статусе ДМГ после поправки на клеточный состав и экспрессируемые в отдельных клетках/цельной ткани аорты, могут рассматриваться как новые гены-кандидаты развития дилатации/аневризмы аорты у пациентов с двухстворчатым аортальным клапаном. Белковые продукты генов *NFIX*, *LMO4*, *DIP2C*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *MED13L*, *TBX3* и *TBX5* являются транскрипционными факторами или регуляторами транскрипционной активности ДНК, а гена *NKD1* – ингибитором сигнального пути Wnt. Полученные данные подчеркивают необходимость строгого подхода к формированию групп сравнения с полным описанием исследуемого фенотипа, включающим морфологию аортального клапана, и проведения исследований на уровне отдельных клеток.

Ключевые слова: дилатация/аневризма восходящей аорты; расслоение восходящей аорты; метилирование ДНК; HEPiDISH; поправка на клеточный состав

Для цитирования: Гончарова И.А., Зарубин А.А., Марков А.В., Шипулина С.А., Бабушкина Н.П., Королёва Ю.А., Слепцов А.А., Назаренко М.С. Особенности метилирования ДНК в пораженных тканях аорты при дилатации/аневризме и расслоении восходящего отдела. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(6):938-948. doi 10.18699/vjgb-26-94

Финансирование. Работа выполнена при частичном финансировании госзадания Министерства науки и высшего образования РФ № 122020300041-7.

DNA methylation analysis of aortic wall tissue in ascending aortic dilatation/aneurysm and dissection

I.A. Goncharova , A.A. Zarubin , A.V. Markov , S.A. Shipulina , N.P. Babushkina , Iu.A. Koroleva ,
A.A. Sleptcov , M.S. Nazarenko 

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

 irina.goncharova@medgenetics.ru

Abstract. Ascending aortic dilatation/aneurysm and dissection are life-threatening cardiovascular conditions. However, the epigenetic regulatory mechanisms within aortic cells underlying these pathologies remain poorly understood. This study aimed to identify differentially methylated genes (DMGs) in aortic tissues from patients with ascending aortic dilatation/aneurysm and dissection by performing a re-analysis of publicly available DNA methylation datasets. A re-analysis was conducted on three DNA methylation datasets (GSE50192, GSE202047, GSE84274) from the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip. To account for tissue heterogeneity, cellular deconvolution was performed using the HEPiDISH algorithm and a custom reference panel of cell-type-specific CpG sites for key vascular cell types (endothelial cells,

fibroblasts, smooth muscle cells, immune cells). Our re-analysis revealed that aortic dissection and bicuspid aortic valve patients with aortic dilatation/aneurysm exhibit distinct DNA methylation profiles compared to intact aorta. These pathologies differ from each other in the number and the spectrum of DMGs. The adjustment for cellular heterogeneity eliminated the majority of the initially identified DMGs. However, this correction helped to make an assessment of vascular inflammation, characterize its impact on aortic wall stability, and identify genes with differential DNA methylation associated with the disease phenotypes, rather than with inter-group heterogeneity. The genes *NFIX*, *PCDH7*, *MED13L*, *LMO4*, *DIP2C*, *PLEKHF1*, *NKD1*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *ARAP2*, *TBX3*, and *TBX5*, which remained in the DMG status after adjustment for cellular composition and are expressed in individual cells/whole aortic tissue, can be considered as new candidate genes for the development of aortic dilatation/aneurysm in patients with bicuspid aortic valve. *NFIX*, *LMO4*, *DIP2C*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *MED13L*, *TBX3*, *TBX5* are transcriptional regulators or modulators; *NKD1* is a recognized inhibitor of the Wnt pathway. Our findings highlight the necessity of a rigorous approach to cohort design, which includes comprehensive phenotyping (encompassing aortic valve morphology) and underscore the importance of future single-cell investigations.

Key words: ascending aortic dilatation/aneurysm; ascending aortic dissection; DNA methylation; HEpiDISH; cell-type adjustment

For citation: Goncharova I.A., Zarubin A.A., Markov A.V., Shipulina S.A., Babushkina N.P., Koroleva Iu.A., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S. DNA methylation analysis of aortic wall tissue in ascending aortic dilatation/aneurysm and dissection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(6):938-948. doi 10.18699/vjgb-26-94

Введение

Метилирование ДНК – один из основных механизмов эпигенетических модификаций генома как в норме, так и при патологии. Тем не менее исследования метилирования ДНК в пораженных тканях при дилатации/аневризме и расслоении восходящей аорты немногочисленны (Shah et al., 2015; Pan et al., 2017; Björck et al., 2018; Li N. et al., 2020; Liu et al., 2021; Chen Y. et al., 2022; Гончарова и др., 2024; Королева и др., 2024). Полученные в этих работах данные в малой степени пересекаются, что связано с гетерогенными по фенотипу группами больных, разными тканями (фрагменты различных отделов аорты, периферическая кровь), использованными в исследованиях, и методами оценки метилирования ДНК. Однако анализ результатов данных работ позволяет сделать некоторые заключения, в том числе: дифференциально метилированные между пораженной и интактной тканью аорты регионы обогащены генами, участвующими в развитии сердечно-сосудистой системы; в патогенезе аневризмы аорты участвуют сигнальные пути MAPK, WNT, TGF β , HOX; строение аортального клапана является одним из факторов, определяющих патогенетические механизмы развития дилатации/аневризмы восходящей аорты.

Хорошо известно, что клеточная гетерогенность оказывает влияние на результаты исследований метилирования ДНК. Стенки кровеносных сосудов содержат разное количество нескольких типов клеток, составляющих их слоистую структуру, и иммунных клеток. Все эти клетки демонстрируют различные паттерны метилирования ДНК. Следовательно, изменения в паттернах метилирования ДНК могут указывать на изменения в клеточном составе, а не предоставлять достоверную информацию об aberrантном метилировании ДНК. В нашей работе мы учитываем клеточный состав артерий как переменную, которая влияет на уровень метилирования ДНК.

В связи с этим целью настоящего исследования была идентификация дифференциально метилированных генов в пораженных тканях аорты при дилатации/аневризме и расслоении восходящего отдела с учетом поправки на их клеточный состав посредством интеграции и реанализа данных по метилированию ДНК патологически изменен-

ных и контрольных тканей восходящего отдела аорты, представленных в открытом доступе в репозитории NCBI Gene Expression Omnibus (GEO).

Материалы и методы

Проведен реанализ результатов исследований, представленных под идентификационными номерами GSE50192, GSE202047 и GSE84274, выполненных на платформе Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip.

Описание исследований GSE50192, GSE202047, GSE84274, на основании которых выполнен реанализ, представлено в табл. 1. Образцы, проанализированные в GSE50192, являются аутопсийным материалом семнадцати соматических тканей четырех человек: трое мужчин, двое из которых умерли от инфаркта миокарда в возрасте 40 и 53 лет и один от геморрагического инсульта в 54 года; женщина, умершая от геморрагического инсульта в 60 лет. Для дальнейшего анализа нами были выбраны данные по метилированию ДНК в образцах коронарных артерий, восходящего и брюшного отделов аорты.

Образцы, описанные в GSE202047, представляют собой ткани восходящей аорты пациентов с расслоением типа А по Стэнфорду (РВА) ($n = 4$) и здоровых доноров органов ($n = 4$), далее по тексту – интактная восходящая аорта (ИВА). Пациенты и здоровые доноры являются мужчинами (средний возраст 49.10 ± 4.91 и 47.92 ± 6.73 года соответственно).

В GSE84274 нами проанализированы образцы ткани восходящей аорты: у пациентов с острым расслоением типа А по Стэнфорду с аортальным клапаном нормального строения ($n = 12$; 10 мужчин (52.4 года), 2 женщины); с дилатацией/аневризмой аорты ($d > 4.5$ см) и двухстворчатым аортальным клапаном (АВА с ДАК) ($n = 6$; 5 мужчин (53.8 года), 1 женщина); здоровых доноров органов (ИВА) ($n = 6$; все мужчины, 36.7 года).

Статистический анализ осуществлен с помощью пакетов *lumi*, *limma* в программной среде R (Bioconductor). Для снижения размерности данных применяли метод главных компонент (PCA). Коррекция ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) при множественных сравнениях выполнена по методу Benjamini–Hochberg.

Таблица 1. Характеристика исследований, привлеченных к реанализу данных по метилированию ДНК тканей восходящей, брюшной аорты, коронарных артерий и патологически измененных тканей восходящего отдела аорты

Идентификатор в базе данных GEO DataSets	Характеристика биообразцов	Основные результаты	Литературный источник
GSE50192	$n = 4$, 17 аутопсийных тканей, в том числе парные ткани коронарных артерий, восходящей и брюшной аорты	Аорта и коронарные артерии группируются в общий кластер по профилю метилирования ДНК и обладают наибольшим числом тканеспецифичных дифференциально метилированных регионов в области генов, обеспечивающих процессы развития сосудов	Lokk et al., 2014
GSE202047	$n = 4$, ткань восходящей аорты пациентов с расслоением типа А по Стэнфорду; $n = 4$, ткань восходящей аорты здоровых доноров органов	Обнаружено 589 дифференциально метилированных сайтов ($P\text{-value} \leq 0.05$, $ \beta \text{ difference } (\Delta\beta) \geq 0.3$) генов сигнальных путей MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы), TNF (факторы некроза опухолей), апоптоза, ангиогенеза, развития сердца и др. Ключевыми являются гены <i>FAS</i> , <i>ANGPT2</i> , <i>DUSP6</i> , <i>FARP1</i> , <i>CARD6</i>	Chen Y. et al., 2022
GSE84274	$n = 12$, ткань восходящей аорты с острым расслоением типа А по Стэнфорду с аортальным клапаном нормального строения; $n = 6$, ткань восходящей аорты с дилатацией/аневризмой ($d > 4.5$ см) и двухстворчатым аортальным клапаном (ДАК); $n = 6$, ткань восходящей аорты здоровых доноров органов	Расслоение с аортальным клапаном нормального строения и дилатация/аневризма восходящей аорты с ДАК характеризуются потерей метилирования ДНК в сайтах, отличных от CpG, и различными профилями метилирования ДНК в CpG-сайтах. При дилатации/аневризме аорты с ДАК в основном гиперметилированы мишени EZH2 (гистон-лизин-N-метилтрансфераза EZH2). Расслоение аорты характеризуется дедифференцировкой гладкомышечных клеток, а также повышенной экспрессией гена <i>RARA</i> (альфа-рецептора ретиноевой кислоты), связанной с гипометилированием ДНК	Pan et al., 2017

В качестве параметра уровня метилирования ДНК использован индекс метилирования β .

Дифференциально метилированными считались CpG-сайты (ДМС) с разницей среднего уровня метилирования между группами образцов $FDR < 0.05$ и $|\Delta\beta| \geq 0.2$. Гены, содержащие ДМС, определялись как дифференциально метилированные гены (ДМГ). Подробно охарактеризованы первые двадцать сайтов с максимальными различиями в уровне метилирования ДНК между сравниваемыми тканями, определяемыми по значению $|\Delta\beta|$.

Идентификация ДМС при патологии восходящей аорты с учетом поправки на клеточный состав проводилась с помощью алгоритма деконволюции профилей метилирования ДНК HEpiDISH (Hierarchical Epigenetic Dissection of Intra-Sample-Heterogeneity; Zheng et al., 2019), а также разработанного нами референса, включающего набор CpG-сайтов, метилирование которых специфично для эндотелиальных клеток (данные GSE84395, GSE122126, GSE82234, GSE40699 из репозитория GEO), фибробластов (GSE40699), гладкомышечных клеток (ГМК) (GSE40699, GSE113061), иммунных клеток (GSE35069), а также данные ENCSR420WUN из проекта ENCODE (Марков и др., 2020).

Функциональная аннотация выявленных ДМГ проведена с привлечением базы данных по экспрессии генов в тканях дуги аорты (GTEx Portal; <https://gtexportal.org>), результатов транскриптомных исследований отдельных клеток при аневризме восходящей аорты (PlaqView; <https://plaqviewv2.pods.uvarc.io>), данных по экспрессии генов при аневризме восходящей аорты, представленных в открытом доступе в базе Gene Expression Omnibus (GSE83675, GSE61128, GSE5180) и научной литературе (Kim et al., 2010; Doppler et al., 2023; Huang M. et al., 2023).

Выполнен сравнительный анализ спектра ДМГ и генов, ассоциированных с ишемической болезнью сердца (ИБС), инфарктом миокарда (ИМ), двухстворчатым аортальным клапаном (ДАК) по результатам широкогеномных исследований (GWAS) в базе данных GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas>), а также генов наследственных и синдромальных форм аневризмы грудной аорты (Elbitar et al., 2021; Li Y. et al., 2021).

Результаты

При анализе профилей метилирования CpG-сайтов в образцах аорты в интегрированном наборе данных выявлено, что аутопсийные образцы артерий (GSE50192) отчетливо дистанцируются от тканей артерий, собранных во время оперативного лечения (GSE202047 и GSE84274) (рис. 1).

В связи с этим были объединены только данные GSE202047 и GSE84274 с включением всех образцов. Данные, полученные в работе GSE50192, в дальнейшем не анализировались.

Идентификация дифференциально метилированных сайтов ДНК в тканях восходящей аорты с дилатацией/аневризмой и аномалией клапана, ее расслоением относительно интактной ткани аорты

При сравнительном анализе уровня метилирования ДНК между тканями АВА с ДАК и ИВА выявлено 57 ДМС (14 ДМГ). Среди всех ДМС 22 локализовано в CpG-берегах и 14 – в CpG-островках (табл. 2; лист «АВА с ДАК_ИВА» в Приложении¹). Большая часть ДМС (84.2 %) гиперметилирована в тканях АВА с ДАК относительно ИВА.

¹ Приложение см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx46.xlsx>

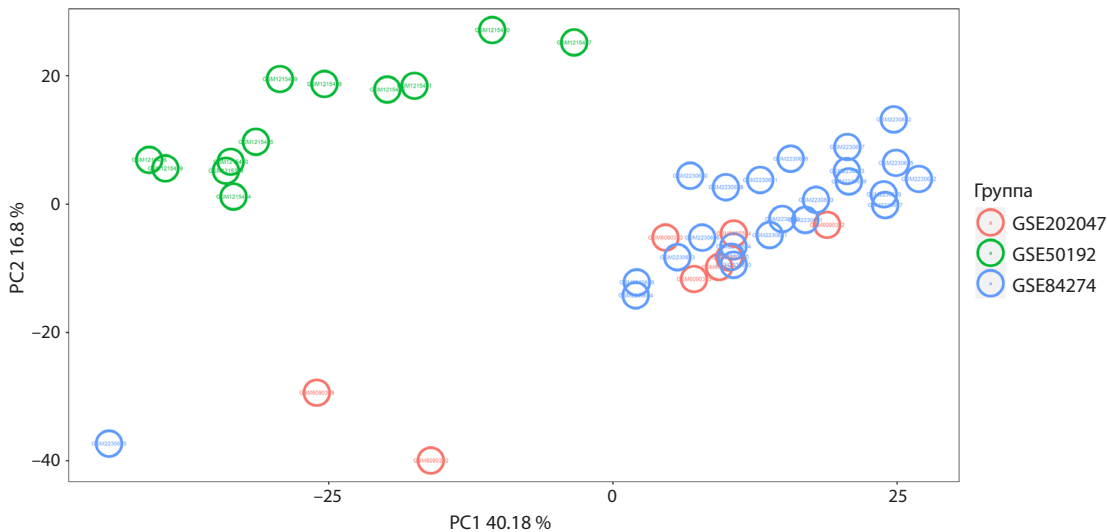


Рис. 1. Распределение анализируемых образцов в пространстве первых двух компонент в зависимости от уровня метилирования CpG-сайтов, представленных в исследованиях GSE50192, GSE202047 и GSE84274.

Таблица 2. Характеристика дифференциально метилированных CpG-сайтов/генов в сравниваемых группах

Сравниваемые ткани	Количество ДМС/ДМГ	Локализация ДМС (a/b/c/d/f)
Дилатация/аневризма восходящей аорты с ДАК (n = 6)/ Интактная восходящая аорта (n = 10)	Всего 57/14	8/0/14/22/4
	Гипер 48 (84.2 %)/10	7/0/12/21/2
	Гипо 9 (15.8 %)/4	1/0/2/1/2
Расслоение восходящей аорты (n = 16)/ Интактная восходящая аорта (n = 10)	Всего 224/99	38/8/34/37/19
	Гипер 110 (49.1 %)/41	16/4/23/14/4
	Гипо 114 (50.9 %)/58	22/4/11/19/15
Дилатация/аневризма восходящей аорты с ДАК (n = 6)/ Расслоение восходящей аорты (n = 16)	Всего 15/8	2/0/4/4/1
	Гипер 3 (20 %)/1	0/0/1/1/0
	Гипо 12 (80 %)/7	2/0/3/3/1

Примечание. Локализация ДМС: а – промотор (TSS, 5'-UTR, 1-й экзон); b – 3'-UTR; c – CpG-островок; d – CpG-берег (shore), менее 2 т.п.н. от CpG-островка; f – CpG-шельф (shelf), 2–4 т.п.н. от CpG-островка.

В пределах нуклеотидной последовательности аннотированных генов обнаружено 23 CpG-сайта, восемь из которых локализованы в промоторах. Среди 23 CpG-сайтов, локализованных в пределах последовательностей известных генов, гипометилированными являются сайты генов *DIP2C* ($\Delta\beta = -0.29$), *TMEM132C* ($\Delta\beta = -0.29$, $\Delta\beta = -0.25$), *CD82* ($\Delta\beta = -0.23$), *ZFPM1* ($\Delta\beta = -0.22$). CpG-сайт (cg01889574) *CD82* локализован в промоторе гена. Все эти гипометилированные ДМС/ДМГ, кроме *ZFPM1* (cg06099697), входят в первые 10 «топовых» сайтов с максимальными различиями в уровне метилирования ДНК между сравниваемыми тканями (см. лист «АВА с ДАК_ИВА» Приложения).

Остальные ДМГ характеризуются наличием CpG-сайтов, гиперметилированных в тканях АВА с ДАК, где в генах *ISL1* и *KCNN2* идентифицировано по два, а в гене *TBX5* – шесть ДМС (см. лист «АВА с ДАК_ИВА» Приложения). В число «топовых» CpG-сайтов с повышенным уровнем метилирования в пораженной ткани аорты входят: *ISL1* ($\Delta\beta = 0.32$, $\Delta\beta = 0.25$), *SNX25* ($\Delta\beta = 0.31$), *TBX5*

($\Delta\beta = 0.26$, $\Delta\beta = 0.26$, $\Delta\beta = 0.25$). Сайт cg12836958 и сайты cg23820885, cg09042277 локализованы в промоторах генов *SNX25* и *TBX5* соответственно (см. лист «АВА с ДАК_ИВА» Приложения).

При сравнении уровня метилирования ДНК между тканями восходящей аорты с расслоением (РВА) относительно ИВА выявлено 224 ДМС (99 ДМГ). Из них 37 ДМС локализованы в CpG-берегах и 34 – в CpG-островках (см. табл. 2; лист «РВА_ИВА» Приложения). В пределах нуклеотидной последовательности 99 генов установлено 130 CpG-сайтов, 38 из которых локализованы в промоторах. Около половины (49.1 %) ДМС в образцах РВА гиперметилированы. Среди «топовых» 10 CpG-сайтов к гиперметилированному относятся только сайты генов *ADARB2* ($\Delta\beta = 0.37$, $\Delta\beta = 0.35$) и *TTL8* ($\Delta\beta = 0.28$). В гене *ADARB2* определены два гипометилированных сайта – cg07162000 ($\Delta\beta = -0.24$) и cg17861863 ($\Delta\beta = -0.23$).

Из первых 10 CpG-сайтов в образцах РВА гипометилированы четыре сайта гена *TBX1*, расположенные в CpG-островке ($\Delta\beta = -0.34...-0.29$), а также сайты генов

FLJ42709 (NR2F1-AS1) ($\Delta\beta = -0.32$), *COL21A1* ($\Delta\beta = -0.29$) и *MAP3K5* ($\Delta\beta = -0.29$) (см. табл. 2; лист «РВА_ИВА» Приложения).

Сравнение уровня метилирования ДНК между тканями АВА с ДАК и РВА показало наличие 15 ДМС (8 ДМГ). Четыре из всех ДМС локализованы в CpG-берегах и пять – в CpG-островках. В генах *CYP2W1* и *PLEKHF1* два CpG-сайта (cg09414673 и cg15561501 соответственно) расположены в промоторе (см. табл. 2; лист «АВА с ДАК и РВА» Приложения). Пятнадцать (80 %) всех ДМС гипометилированы в пораженных тканях аорты с аневризмой и ДАК относительно расслоения аорты (см. табл. 2; лист «АВА с ДАК и РВА» Приложения).

Среди CpG-сайтов, относящихся к известным генам, максимальными различиями в уровне метилирования между сравниваемыми тканями характеризуются гипометилированные в тканях аневризмы с ДАК сайты генов *DIP2C* ($\Delta\beta = -0.27$) и *NFIX* ($\Delta\beta = -0.27$, $\Delta\beta = -0.24$). Два сайта, cg15561501 (*PLEKHF1*) и cg09414673 (*CYP2W1*), локализованные в промоторах генов, также гипометилированы в тканях аневризмы с ДАК ($\Delta\beta = -0.21$ каждый из них, см. лист «АВА с ДАК и РВА» Приложения). ДМС гена *SLC1A3* гиперметилирован в пораженных тканях аорты при аневризме с ДАК ($\Delta\beta = 0.21$).

Реконструкция клеточного состава тканей восходящей аорты с дилатацией/аневризмой и аномалией клапана, ее расслоения и интактной ткани аорты

Поскольку клеточный состав тканей является значимым фактором для определения ДМС (Houseman et al., 2015, 2016), при анализе данных проводилась биоинформатическая деконволюция клеточного состава тканей аорты (рис. 2).

В результате использования алгоритма деконволюции профилей метилирования ДНК с предсказанием пропорций ожидаемых типов клеток в тканях восходящей аорты показано, что существенную долю клеток составляют ГМК (33.7–88.7 %) и лейкоцитарный компонент (6.7–51.3 %). ЭК сосудов представлены в меньшей степени (4.2–21.2 %), а фибробласты не выявляются алгоритмом. Из лейкоцитов существенную долю занимают моноциты (1.4–27.8 %).

Доля иммунных клеток в ИВА не превышает 15 % (в среднем 10.7 %), при АВА с ДАК этот показатель варьирует в диапазоне 6–16 % (в среднем 11.6 %), а при РВА степень инфильтрации сосудистой стенки иммунными клетками оценивается от 9 до 51 %, в среднем составляя 19.6 %, что значимо выше, чем в интактной аорте ($p = 0.003$) (см. рис. 2).

Идентификация ДМС и их генов при патологии восходящей аорты с учетом поправки на клеточный состав

После введения поправки на клеточный состав в списке CpG-сайтов, гипометилированных в образцах АВА с ДАК по сравнению с ИВА, остается сайт cg26561082 гена *DIP2C* ($\Delta\beta = -0.29$), локализованный в области CpG-берега (табл. 3).



Рис. 2. Реконструкция клеточного состава тканей восходящей аорты в норме и при патологии с помощью алгоритма EpiDISH и разработанного референса метилома для клеток сосудов.

а – распределение клеточных типов в тканях восходящей аорты в исследуемых группах лиц (по вертикальной оси указан порядковый номер образца в каждой группе). ЭК – эндотелиальные клетки, ГМК – гладкомышечные клетки, В – В-лимфоциты, NK – NK-клетки, Т – Т-лимфоциты, Мон – моноциты, Нейт – нейтрофилы, Эоз – эозинофилы. б – доля иммунных клеток в исследуемых группах образцов по результатам оценки клеточного состава.

При сравнении уровней метилирования ДНК с поправкой на клеточный состав между группами РВА и ИВА значимых различий не обнаружено.

При сравнении уровня метилирования ДНК между АВА с ДАК и РВА после введения поправки на клеточный состав выявлено 12 ДМС, из которых два гиперметилированы, а десять гипометилированы в аорте при дилатации/аневризме (см. табл. 3). Семь дифференциально

Таблица 3. Дифференциально метилированные CpG-сайты между изученными группами после поправки на клеточный состав

CpG-сайт, локализация (GRCh37/hg19)	Локализация CpG-сайта по отношению к ближайшему CpG-островку	Δβ ABA с ДАК/ИВА	Δβ ABA с ДАК/РВА	Ген
cg26561082, chr10:410363	chr10:409201–409523/CpG-берег, нет	–0.29	–0.27	<i>DIP2C</i>
cg22824635, chr19:13112283	chr19:13112170–13112809/CpG-островок, нет	–0.17	–0.27	<i>NFIX</i>
cg06744585, chr19:13135808	chr19:13135317–13136169/CpG-островок, нет	–0.14	–0.24	
cg01393939, chr1:87803705	chr1:87800835–87801252/CpG-шельф, нет	–0.18	–0.23	<i>LMO4</i>
cg10642548, chr10:77165750	chr10:77155128–77169600/CpG-островок, нет	–0.23*	–0.22	<i>C10orf41 (ZNF503-AS2)</i>
cg06262069, chr10:76835911	chr10:77155128–77169600/CpG-островок, нет	–0.21*	–0.22	
cg02015823, chr16:49142490	chr16:50583175–50583465/CpG-берег, нет	–0.05	–0.22	<i>NKD1</i>
cg15561501, chr19:30160603	chr19:30156038–30156795/CpG-шельф, 5' UTR	–0.07	–0.21	<i>PLEKHF1</i>
cg09414673, chr7:1022797	chr7:1024021–1024233/CpG-берег, TSS	–0.16	–0.21	<i>CYP2W1</i>
cg02060919, chr4:32932085	Нет	–0.072	–0.24	<i>PCDH7/ARAP2</i> межгенный
cg16945186, chr12:115103960	chr12:115102687–115103982/CpG-островок, нет	0.26	0.24	<i>TBX5/TBX3</i> межгенный
cg26343001, chr12:115104274	chr12:115104848–115105548/CpG-берег, нет	0.25	0.21	<i>TBX3/MED13L</i> межгенный

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения Δβ CpG-сайтов, соответствующих критериям ДМС (FDR < 0.05 и |Δβ| ≥ 0.2); * Δβ CpG-сайтов с FDR > 0.05; TSS, 5' UTR – промотор.

метилированных генов (*LMO4*, *NFIX*, *CYP2W1*, *C10orf41 (ZNF503-AS2)*, *PLEKHF1*, *DIP2C*, *NKD1*) содержат гипометилированные CpG-сайты при аневризме восходящей аорты с ДАК относительно расслоения аорты (см. табл. 3).

Кроме того, три CpG-сайта располагались в межгенных регионах: cg02060919 (*PCDH7/ARAP2*) был гипометилирован в группе АВА с ДАК по сравнению с РВА, а сайты cg16945186 (*TBX5/TBX3*) и cg26343001 (*TBX3/MED13L*) были гиперметилированы при дилатации/аневризме восходящей аорты относительно расслоения аорты и интактной ткани аорты.

Таким образом, после введения поправки на клеточный состав показано, что АВА с ДАК относительно ИВА и РВА характеризуется снижением уровня метилирования большинства идентифицированных ДМГ, к которым относятся гены, кодирующие функционально активные молекулы, в том числе транскрипционные факторы (гены *DIP2C*, *LMO4*, *NFIX*, lncRNA *C10orf41 (ZNF503-AS2)*), ингибитор сигнального пути Wnt (*NKD1*), а также гены, белковые продукты которых обеспечивают апоптоз и аутофагию (*PLEKHF1*), фокальную адгезию и межклеточные взаимодействия (*PCDH7*, *ARAP2*) или относятся к семейству цитохромов P450 (*CYP2W1*).

Повышенным уровнем метилирования характеризуются межгенные CpG-сайты, вероятно, оказывающие влияние на функциональную активность генов транскрипционных факторов *TBX3* и *TBX5*, а также гена *MED13L*, белковый продукт которого относится к семейству комплекса медиаторов (MED), которые играют ключевую роль в транскрипции многочисленных генов эукариот.

Функциональная аннотация ДМГ с использованием баз данных и опубликованных исследований

Анализ экспрессии выявленных после поправки на клеточный состав ДМГ в тканях дуги аорты по данным GTEx Portal показал, что среди вышеперечисленных генов

максимальным уровнем экспрессии характеризуются *NFIX* (131.7 TPM – транскриптов на миллион) и *PCDH7* (65.4 TPM). Гены *MED13L*, *LMO4*, *DIP2C*, *PLEKHF1* и *NKD1* экспрессируются на среднем уровне (32.3, 29.6, 28.9, 27.1 и 16.5 TPM соответственно), а *C10orf41 (ZNF503-AS2)*, *TBX3*, *ARAP2*, *TBX5* и *CYP2W1* в дуге аорты почти не экспрессируются (0.06–3.90 TPM).

Привлечение результатов по экспрессии генов при аневризме восходящей аорты у больных с ДАК и ТАК, представленных в открытых источниках (GSE5180, GSE83675, GSE61128 из репозитория GEO) и научных публикациях (Kim et al., 2010; Doppler et al., 2023), позволило сделать вывод, что ДМГ, обнаруженные в настоящем исследовании, значимо не изменяют свою функциональную активность в пораженной аорте относительно интактных тканей, а также в тканях дилатированной аорты у пациентов с аортальным клапаном различного строения.

Согласно ресурсу PlacView, в ткани аорты у 11 человек, в том числе восьми пациентов с аневризмой восходящей аорты и трех здоровых индивидов (Li Y. et al., 2020), гены *NFIX* и *LMO4* экспрессируются в существенном количестве ГМК и фибробластов на высоком уровне для гена *NFIX* и вполнину меньше для гена *LMO4* (рис. 3). Функциональная активность гена *PCDH7* зарегистрирована на высоком уровне в ГМК и в меньшей степени в фибробластах. Ген *DIP2C* экспрессируется на среднем уровне, но в небольшом количестве ГМК, фибробластов и тучных клеток. Активность *ARAP2* обнаружена в Т-, В-, и NK-клетках. Ген *MED13L* экспрессируется в широком спектре клеток на среднем уровне. Остальные ДМГ в тканях восходящей аорты экспрессируются не более чем в 20 % клеток (см. рис. 3).

Сравнительный анализ ДМГ с перечнем генов, ассоциированных с ИБС, аневризмой грудной аорты по результатам GWAS, двухстворчатым аортальным клапаном или генами наследственных аневризм аорты, показал, что

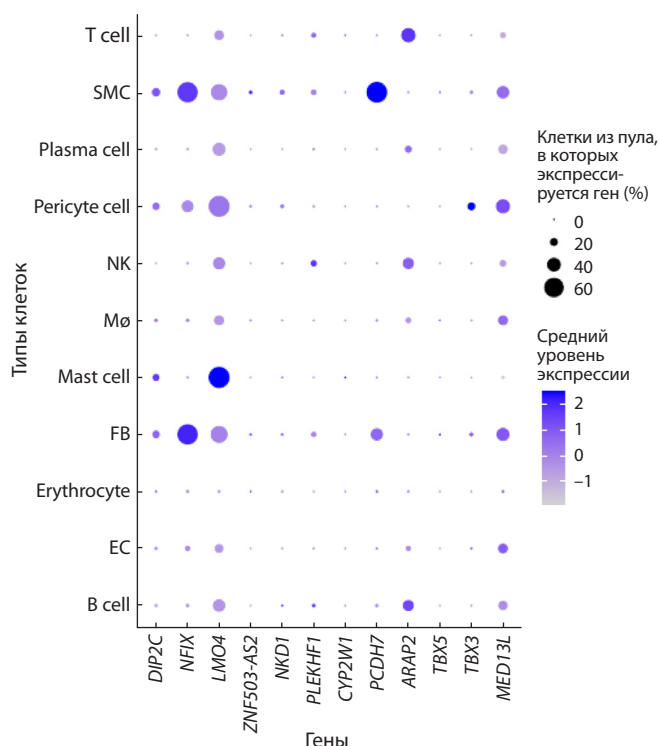


Рис. 3. Типы клеток и средний относительный уровень экспрессии выявленных в настоящем исследовании ДМГ в ресурсе PlaqView, в наборе данных по отдельным клеткам восходящей аорты у 11 человек, в том числе восьми пациентов с аневризмой восходящей аорты и трех здоровых индивидов (Li Y. et al., 2020).

T cell – Т-клетки; SMC – гладкомышечные клетки; Plasma cell – плазматические; Pericyte cell – пероциты; NK – натуральные киллеры; Mφ – макрофаги; Mast cell – тучные клетки; FB – фибробласты; Erythrocyte – эритроциты; EC – эндотелиальные клетки; B cell – В-лимфоциты.

rs543659530 гена *PCDH7*, кодирующего протокадгерин 7, ассоциирован с ИБС у больных с сахарным диабетом второго типа (СД2) (Song et al., 2021), а rs61937394 гена *MED13L*, белковый продукт которого относится к медиаторному комплексу регуляции транскрипции, связан с развитием аневризмы восходящей аорты (Pirruccello et al., 2022). Остальные ДМГ не входят ни в один из этих списков.

Обсуждение

Использование алгоритма деконволюции профилей метилирования ДНК и оценки клеточного состава с разработанным референсом для сосудов позволило заключить, что существенную долю клеток в восходящей аорте составляют ГМК и иммунные клетки. Степень инфильтрации сосудистой стенки иммунными клетками при расслоении восходящей аорты значительно превышает таковую в интактных тканях сосуда.

В исследовании (Pan et al., 2017) также выполнена поправка на клеточный состав, но с помощью другого алгоритма (Houseman CP). В результате авторами отмечено снижение среднего количества ГМК и увеличение

количества ЭК при расслоении аорты по сравнению с нормальной аортой и дилатированной/аневризматически расширенной аортой с ДАК (Pan et al., 2017). В нашей работе среднее количество ГМК и ЭК не различалось между группами, тогда как инфильтрация иммунными клетками была выше при расслоении аорты. Данный факт может свидетельствовать о роли воспалительного инфильтрата в нарушении целостности стенки аорты.

Надо также отметить, что по результатам алгоритма деконволюции в изученных образцах не обнаружено фибробластов, значительное количество которых ожидаемо на основании знаний о строении стенки аорты.

Применение технологий анализа транскриптома и эпигенома в отдельных клетках из образцов артерий человека и модельных животных позволило сделать вывод, что ГМК обладают обширной фенотипической пластичностью и вместе с фибробластами и пероцитами обычно составляют единый суперкластер клеток, происходящих из мезенхимальной стволовой клетки (Mosquera et al., 2023; Zhao et al., 2025).

Таким образом, мы полагаем, что «компонент ГМК» в результатах алгоритма деконволюции может вмещать комплекс разных клеточных типов (за исключением пероцитов), близких по профилю экспрессии генов и, по-видимому, метилирования ДНК, в том числе спектр дифференцированных и модулированных ГМК и фибробласты.

Проведение реанализа данных по метилированию ДНК в тканях аорты показало, что дилатация/аневризма с ДАК и расслоение восходящей аорты характеризуются разным статусом метилирования ДНК относительно интактной ткани аорты, поскольку данные фенотипы различаются между собой как по числу, так и по спектру ДМГ. Вместе с тем поправка на клеточный состав аннулирует основное количество ДМС, когда между дилатацией/аневризмой аорты с ДАК и интактной тканью остаются один CpG-сайт гена *DIP2C* и два сайта в межгенных регионах *TBX5/TBX3* и *TBX3/MED13L*. Между дилатацией/аневризмой и расслоением аорты обнаружено 10 дифференциально метилированных CpG-сайтов генов *DIP2C*, *LMO4*, *NFIX*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *PLEKHF1*, *NKD1*, *CYP2W1*, *PCDH7/ARAP2*, *TBX5/TBX3* и *TBX3/MED13L*.

Полученные результаты, по-видимому, в большей степени отражают различия в паттернах метилирования ДНК, связанные с вариативностью клеточного состава образцов, нежели со значимыми эпигенетическими различиями между пораженными и интактными тканями аорты. Это подтверждается экспрессионными исследованиями, проведенными ранее на разных типах тканей (интима-медиа и адвентиция аорты, а также интима-медиа внутренней грудной артерии), которые показали, что при попарном сравнении тканей от 22.5 до 52 % всех генов являются дифференциально экспрессирующимися (Folkersen et al., 2011).

Кроме того, в данных Gene Expression Omnibus, использованных для реанализа, не указано строение аортального клапана у больных с расслоением (GSE202047), или аортальный клапан трехстворчатый (GSE84274), так же как у здоровых доноров. В этом случае идентифицированные

ДМГ между сравниваемыми группами (АВА с ДАК/ИВА и АВА с ДАК/РВА) даже с поправкой на клеточный состав, возможно, отражают особенности метилирования ДНК тканей аорты, обусловленные строением аортального клапана, а не дилатацией аорты. Косвенно это подтверждается и тем, что самое большое число ДМГ, полученное при сравнении групп с трехстворчатым клапаном (РВА/ИВА), не отражает различий в паттернах метилирования ДНК пораженной и интактной ткани аорты с одинаковым строением аортального клапана, поскольку исчезает после поправки на клеточный состав.

Анализ метилирования ДНК в тканях аорты, проведенный другими научными группами, показал, как и в настоящем исследовании, что у больных с ДАК как при аневризме, так и в интактных тканях восходящей аорты выявляются гипометилированные регионы генов *DIP2C*, *LMO4*, *NFIX*, *NKD1* и *CYP2W1* (Björck et al., 2018). Более того, в целом в тканях восходящей аорты с двухстворчатым аортальным клапаном наблюдается значимо больше гипометилированных регионов относительно трехстворчатого, что сопровождается более активным транскрипционным профилем в тканях аорты с ДАК (Björck et al., 2018). Вместе с тем в атеросклеротической бляшке аорты относительно интактной ткани аорты тех же доноров, но где строение аортального клапана не указано, обнаружены гиперметилированные CpG-сайты генов *DIP2C*, *NFIX*, *NKD1* и *ARAP2* (Zaina et al., 2014).

Различия в строении аортального клапана приводят и к различиям функционирования восходящей аорты, которые во многом определяются асимметричностью распределения скорости кровотока при ДАК, что способствует большей частоте развития патологий восходящего отдела (Viscardi et al., 2010). При аневризме восходящей аорты у пациентов с ДАК и ТАК гемодинамические нарушения являются основным фактором, приводящим к различиям не только в структурной организации ткани сосуда, но и в функциональном профиле генома, который обуславливает формирование уникальных паттернов экспрессирующихся генов, микроРНК и белков, при одном и том же клиническом фенотипе (Folkersen et al., 2011; Kjellqvist et al., 2013; Gallo et al., 2018; Freiholtz et al., 2023). Между группами с ДАК и ТАК при аневризме восходящей аорты идентифицированы различия в экспрессионных профилях как в тканях восходящей аорты, так и в отдельных типах клеток, но списки дифференциально экспрессированных генов не включают обнаруженных в настоящем исследовании ДМГ (Lei et al., 2022; Doppler et al., 2023; Huang M. et al., 2023).

В этиологии ДАК важную роль играют генетические факторы, коэффициент наследуемости которых составляет 47–89 % (Gehlen et al., 2023). Ассоциативные исследования, GWAS и анализ редких клинически значимых вариантов привели к обнаружению более четырех десятков генов, ассоциированных с развитием ДАК (Gago-Díaz et al., 2017; Chen S. et al., 2022; Gehlen et al., 2023; Carlisle et al., 2024; Sticchi et al., 2025). Выявленные в нашей работе гены не входят в число ассоциированных с развитием ДАК, но связаны с другими сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ). Так, ген *DIP2C* принимает участие в связывании

транскрипционных факторов, а его дефицит приводит к развитию врожденных пороков сердца (Xia et al., 2025).

Белковые продукты генов *NFIX* и *LMO4* являются транскрипционными факторами. Клинически значимые варианты гена *NFIX* ассоциированы с аневризмой и расслоением грудной аорты при синдроме Малана (Oshima et al., 2017; Chevarin et al., 2020), а *LMO4* сверхэкспрессируется в областях с турбулентным кровотоком, в том числе в области малой кривизны дуги аорты, сонных и коронарных артериях, что предполагает потенциальную роль данного гена в механочувствительности и проатерогенном ответе (Ni et al., 2010). Ген *C10orf41* (*ZNF503-AS2*) кодирует длинную некодирующую РНК (lncRNA). Повышение уровня метилирования гена *ZNF503-AS2* выявлено в плазме крови пациентов с инфарктом миокарда после чрескожного коронарного вмешательства относительно здоровых доноров (Ren et al., 2022).

PLEKHF1 – лизосомально-ассоциированный белок, индуцирующий апоптоз и аутофагию. Известно, что аутофагия тесно связана с возникновением и развитием атеросклероза, ишемии/реперфузии миокарда, сердечной недостаточности и аортопатии в сочетании с ДАК (Forte et al., 2019; Jiang B. et al., 2023). *PLEKHF1* – один из восьми генов, связанных с общей выживаемостью при дилатационной кардиомиопатии, а его экспрессия понижена в тканях миокарда у больных по сравнению с контрольной группой (Zhang et al., 2022). В целом ген *PLEKHF1* рассматривается как потенциальный биомаркер развития ИБС при СД2 и кардиомиопатии (Huang Q. et al., 2020; Zhang et al., 2022).

Белковый продукт гена *NKD1* – это ингибитор сигнального пути Wnt, который необходим для генерации клеток-предшественников сердца, миграции и дифференцировки клеток нервного гребня, формирования выводного тракта и клапанов сердца (Weerackoon et al., 2021). Нарушения функционирования сигнального пути Wnt считаются одним из факторов, влияющих на развитие ССЗ, в том числе структурных аномалий аорты, что непосредственно связано с предрасположенностью к аневризмам (Pozo-Vilumbrales et al., 2025).

Варианты гена транскрипционного фактора *TBX3*, который необходим для формирования предсердной и желудочковой перегородок и проводящей системы сердца, связаны с развитием врожденных пороков сердца, синдромами Холт–Орама и Бругада, фибрилляцией предсердий, острого инфаркта миокарда и ДАК (Steimle, Moskowitz, 2017; Wang F. et al., 2017; Wang S. et al., 2019; Jiang W.F. et al., 2020). *TBX3* – фактор транскрипции, который важен для дифференциации синоатриального и атриовентрикулярного узлов. Варианты гена *TBX3* связаны с нарушением сердечной проводимости, развитием атриовентрикулярной блокады, гипертрофической кардиомиопатии, фибрилляции предсердий и сердечной недостаточности (Lakda et al., 2025).

ARAP2 – белок, активирующий ГТФазу Arf6, участвует в регуляции фокальной адгезии, ремоделировании актинового цитоскелета и рециркуляции интегринов в клетках сосудов (Vitali et al., 2019). Изменение активности гена

ARAP2 в аорте в мышинных моделях (линия *Eln*^{-/-}) отражает модуляцию клеточного цитоскелета и межклеточных взаимодействий в сосудистой стенке аорты при тяжелых дефектах эластических волокон (Staiculescu et al., 2018). У человека однонуклеотидный вариант rs116215256 гена *ARAP2* ассоциирован с уровнем сердечного тропонина I, который, как известно, является одним из регуляторов сокращения миокарда (Yang et al., 2021).

Ген *PCDH7* кодирует протокадгерин 7 – мембранный белок, участвующий в распознавании и адгезии клеток друг к другу. Семейство кадгеринов играет ключевую роль в морфогенезе, а также в развитии различных патологических состояний, в том числе ССЗ, таких как дилатационная кардиомиопатия, атеросклероз и рестеноз, при которых происходит значительное ремоделирование тканевой архитектуры, приводящее к клиническим проявлениям заболеваний (Joshi et al., 2024).

Ген *MED13L* кодирует одну из субъединиц большого медиаторного комплекса, который участвует в процессе регуляции транскрипционной активности генов различных сигнальных путей на ранних стадиях развития, включая развитие сердца (Henry et al., 2025). Патогенные варианты в гене *MED13L* связывают с транспозицией магистральных артерий, коарктацией аорты и другими ССЗ (Schiano, Napoli, 2025).

Таким образом, выявленные в настоящем исследовании гены играют важную роль в развитии сердечно-сосудистой системы, а нарушение их функционирования может приводить к развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Связь данных генов с дилатацией/аневризмой аорты у пациентов с двухстворчатым аортальным клапаном через изменение их эпигенетической регуляции в тканях пораженной аорты выявлена нами впервые.

Заключение

Оценка клеточного состава по профилю метилирования ДНК в образцах тканей аорты позволяет составить представление о наличии воспаления, оцениваемого по степени инфильтрации стенки артерии иммунными клетками, и может охарактеризовать роль воспалительного инфильтрата в нарушении целостности стенки аорты, а также очертить гены, отражающие различия, связанные с изучаемыми фенотипами, а не с клеточной гетерогенностью образцов.

Гены *NFIX*, *PCDH7*, *MED13L*, *LMO4*, *DIP2C*, *PLEKHF1*, *NKD1*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *ARAP2*, *TBX3*, *TBX5* могут рассматриваться как новые гены-кандидаты развития дилатации/аневризмы аорты у пациентов с двухстворчатым аортальным клапаном. Особого внимания заслуживают гены *NFIX*, *LMO4*, *DIP2C*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *MED13L*, *TBX3*, *TBX5*, являющиеся транскрипционными факторами или регуляторами транскрипционной активности ДНК, а также ген *NKD1* – ингибитор сигнального пути Wnt.

Кроме того, полученные данные еще раз подтверждают необходимость строгого подхода к формированию групп сравнения с четким и полным описанием изучаемого фенотипа и проведения исследований на уровне отдельных клеток.

Список литературы / References

- Гончарова И.А., Зарубин А.А., Шипулина С.А., Королёва Ю.А., Панфилов Д.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Профиль метилирования ДНК при коморбидности аневризмы и атеросклероза восходящей аорты. *Молекулярная биология*. 2024;58(3):414-424. doi 10.31857/S0026898424030069
- [Goncharova I.A., Zarubin A.A., Shipulina S.A., Koroleva Iu.A., Panfilov D.S., Kozlov B.N., Nazarenko M.S. DNA methylation profiling in aneurysm and comorbid atherosclerosis of the ascending aorta. *Mol Biol*. 2024;58(3):439-449. doi 10.1134/s0026893324700079]
- Королёва Ю.А., Гончарова И.А., Зарубин А.А., Шипулина С.А., Слепцов А.А., Панфилов Д.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Разнонаправленное изменение уровня метилирования CpG-сайтов в 5' регионе гена *TBX20* в восходящей аорте при атеросклерозе и аневризме. *Генетика*. 2024;60(7):100-106. doi 10.31857/S0016675824070091
- [Koroleva Iu.A., Goncharova I.A., Zarubin A.A., Shipulina S.A., Sleptsov A.A., Panfilov D.S., Kozlov B.N., Nazarenko M.S. Methylation levels in the 5' region of the *TBX20* gene in the ascending aorta change in opposite direction in atherosclerosis and aneurysm. *Russ J Genet*. 2024;60(7):977-981. doi 10.1134/S102279542470042X]
- Марков А.В., Зарубин А.А., Шарыш Д.В., Назаренко М.С. Оценка соотношения разных типов клеток при изучении метилирования ДНК в образцах артерий пациентов с атеросклерозом. В: Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины. Томск, 2020;45-47
- [Markov A.V., Zarubin A.A., Sharysh D.V., Nazarenko M.S. Evaluation of the ratio of different cell types in the study of DNA methylation in arterial samples from patients with atherosclerosis. In: Current Issues in Fundamental and Clinical Medicine. Tomsk, 2020;45-47 (in Russian)]
- Björck H.M., Du L., Pulignani S., Paloschi V., Lundströmer K., Kostina A.S., Österholm C., ... Teixidó-Tura G., Maleki S., Franco-Cereceda A., Eriksson P.; Mechanistic Interrogation of Bicuspid Aortic Valve associated Aortopathy (MIBAVA) Leducq Consortium. Altered DNA methylation indicates an oscillatory flow mediated epithelial-to-mesenchymal transition signature in ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve. *Sci Rep*. 2018;8(1):2777. doi 10.1038/s41598-018-20642-4
- Carlisle S.G., Albasha H., Michelena H.I., Sabate-Rotes A., Bianco L., De Backer J., Mosquera L.M., ... Milewicz D.M., Body S.C., Prakash S.K.; EBAV Investigators; BAVCon Investigators. Rare genomic copy number variants implicate new candidate genes for bicuspid aortic valve. *PLoS One*. 2024;19(9):e0304514. doi 10.1371/journal.pone.0304514
- Chen S., Jin Q., Hou S., Li M., Zhang Y., Guan L., Pan W., Ge J., Zhou D. Identification of recurrent variants implicated in disease in bicuspid aortic valve patients through whole-exome sequencing. *Hum Genomics*. 2022;16(1):36. doi 10.1186/s40246-022-00405-z
- Chen Y., Xu X., Chen Z., Huang B., Wang X., Fan X. DNA methylation alternation in Stanford – a acute aortic dissection. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022;22(1):455. doi 10.1186/s12872-022-02882-5
- Chevarin M., Duffourd Y., Barnard R.A., Moutton S., Lecoquierre F., Daoud F., Kuentz P., ... Deleuze J.F., Thauvin-Robinet C., Rivière J.B., O'Roak B.J., Faivre L. Excess of de novo variants in genes involved in chromatin remodelling in patients with marfanoid habitus and intellectual disability. *J Med Genet*. 2020;57(7):466-474. doi 10.1136/jmedgenet-2019-106425
- Doppler C., Messner B., Mimler T., Schachner B., Rezk M., Ganhör C., Wechselberger C., Müller M., Puh S., Pröll J., Arbeithuber B., Müller T., Zierer A., Bernhard D. Noncanonical atherosclerosis as the driving force in tricuspid aortic valve associated aneurysms – a trace collection. *J Lipid Res*. 2023;64(3):100338. doi 10.1016/j.jlr.2023.100338
- Elbitar S., Renard M., Arnaud P., Hanna N., Jacob M.P., Guo D.C., Tsutsui K., ... Michel J.B., Jondeau G., Sakai L.Y., Boileau C., Abifadel M. Pathogenic variants in *THSD4*, encoding the ADAMTS-

- like 6 protein, predispose to inherited thoracic aortic aneurysm. *Genet Med.* 2021;23(1):111-122. doi 10.1038/s41436-020-00947-4
- Folkersen L., Wågsäter D., Paloschi V., Jackson V., Petrini J., Kurtovic S., Maleki S., ... Michel J.B., Liska J., Gabrielsen A., Franco-Cereceda A., Eriksson P. Unraveling divergent gene expression profiles in bicuspid and tricuspid aortic valve patients with thoracic aortic dilatation: the ASAP study. *Mol Med.* 2011;17(11-12):1365-1373. doi 10.2119/molmed.2011.00286
- Forte A., Cipollaro M., De Feo M., Della Corte A. Is there a role for autophagy in ascending aortopathy associated with tricuspid or bicuspid aortic valve? *Clin Sci (Lond).* 2019;133(7):805-819. doi 10.1042/CS20181092
- Freiholtz D., Bergman O., Lång K., Poujade F.A., Paloschi V., Granath C., Lindeman J.H.N., Olsson C., Franco-Cereceda A., Eriksson P., Björck H.M. Bicuspid aortic valve aortopathy is characterized by embryonic epithelial to mesenchymal transition and endothelial instability. *J Mol Med (Berl).* 2023;101(7):801-811. doi 10.1007/s00109-023-02316-5
- Gago-Díaz M., Brion M., Gallego P., Calvo F., Robledo-Carmona J., Saura D., Sánchez V., ... Carracedo Á., Muehlschlegel J.D., García-Dorado D., Body S.C., Evangelista A. The genetic component of bicuspid aortic valve and aortic dilation. An exome-wide association study. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;102:3-9. doi 10.1016/j.jmcc.2016.11.012
- Gallo A., Agnese V., Coronello C., Raffa G.M., Bellavia D., Conaldi P.G., Pilato M., Pasta S. On the prospect of serum exosomal miRNA profiling and protein biomarkers for the diagnosis of ascending aortic dilatation in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve. *Int J Cardiol.* 2018;273:230-236. doi 10.1016/j.ijcard.2018.10.005
- Gehlen J., Stundl A., Debiec R., Fontana F., Krane M., Sharipova D., Nelson C.P., ... Abdelilah-Seyfried S., Samani N.J., Erdmann J., Trenkwalder T., Schumacher J. Elucidation of the genetic causes of bicuspid aortic valve disease. *Cardiovasc Res.* 2023;119(3):857-866. doi 10.1093/cvr/cvac099
- Henry K.M., Gardner R.N., Oppman A.M., Daneshgar N., Rosales M., Martins I., Baskin K.K., Grueter C.E. Med13 and Med13L: critical redundant players in basal cardiac function and gene expression. *J Mol Cell Cardiol Plus.* 2025;13:100481. doi 10.1016/j.jmccpl.2025.100481
- Houseman E.A., Kim S., Kelsey K.T., Wiencke J.K. DNA methylation in whole blood: uses and challenges. *Curr Environ Health Rep.* 2015;2(2):145-154. doi 10.1007/s40572-015-0050-3
- Houseman E.A., Kile M.L., Christiani D.C., Ince T.A., Kelsey K.T., Marsit C.J. Reference-free deconvolution of DNA methylation data and mediation by cell composition effects. *BMC Bioinformatics.* 2016;17:259. doi 10.1186/s12859-016-1140-4
- Huang M., Guan R., Qiu J., Gnamey A.J.E., Wang Y., Tian H., Sun H., Shi H., Sun W., Jia X., Wu J. Identification of immune-related signatures and pathogenesis differences between thoracic aortic aneurysm patients with bicuspid versus tricuspid valves via weighted gene co-expression network analysis. *PLoS One.* 2023;18(10):e0292673. doi 10.1371/journal.pone.0292673
- Huang Q., Deng G., Wei R., Wang Q., Zou D., Wei J. Comprehensive identification of key genes involved in development of diabetes mellitus-related atherogenesis using weighted gene correlation network analysis. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:580573. doi 10.3389/fcvm.2020.580573
- Jiang B., Zhou X., Yang T., Wang L., Feng L., Wang Z., Xu J., Jing W., Wang T., Su H., Yang G., Zhang Z. The role of autophagy in cardiovascular disease: cross-interference of signaling pathways and underlying therapeutic targets. *Front Cardiovasc Med.* 2023;10:1088575. doi 10.3389/fcvm.2023.1088575
- Jiang W.F., Xu Y.J., Zhao C.M., Wang X.H., Qiu X.B., Liu X., Wu S.H., Yang Y.Q. A novel TBX5 mutation predisposes to familial cardiac septal defects and atrial fibrillation as well as bicuspid aortic valve. *Genet Mol Biol.* 2020;43(4):e20200142. doi 10.1590/1678-4685-GMB-2020-0142
- Joshi D., Coon B.G., Chakraborty R., Deng H., Yang Z., Babar M.U., Fernandez-Tussy P., ... Traylor J.G., Jr., Orr A.W., Fernandez-Hernando C., Liberos S., Schwartz M.A. Endothelial γ -protocadherins inhibit KLF2 and KLF4 to promote atherosclerosis. *Nat Cardiovasc Res.* 2024;3(9):1035-1048. doi 10.1038/s44161-024-00522-z
- Kim J.H., Na C.Y., Choi S.Y., Kim H.W., Du Kim Y., Kwon J.B., Chung M.Y., Hong J.M., Park C.B. Integration of gene-expression profiles and pathway analysis in ascending thoracic aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 2010;24(4):538-549. doi 10.1016/j.avsg.2010.01.007
- Kjellqvist S., Maleki S., Olsson T., Chwastyniak M., Branca R.M., Lehtiö J., Pinet F., Franco-Cereceda A., Eriksson P. A combined proteomic and transcriptomic approach shows diverging molecular mechanisms in thoracic aortic aneurysm development in patients with tricuspid- and bicuspid aortic valve. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(2):407-425. doi 10.1074/mcp.M112.021873
- Lakda S., Davies R.H., Hingorani A.D., Paliwal N. A systematic review of GWAS on CMR imaging traits: genetic insights into cardiovascular structure, function, and diseases. *EBioMedicine.* 2025;121:105992. doi 10.1016/j.ebiom.2025.105992
- Lei C., Kan H., Chen W., Yang D., Ren J., Xu F., Zhang H., Wang W., Zheng Y. Different gene co-expression patterns of aortic intima-media and adventitia in thoracic aortic aneurysm. *Gene.* 2022;819:146233. doi 10.1016/j.gene.2022.146233
- Li N., Lin H., Zhou H., Zheng D., Xu G., Shi H., Zhu X., Gao J., Shao G., Sun L. Efficient detection of differentially methylated regions in the genome of patients with thoracic aortic dissection and association with MMP2 hypermethylation. *Exp Ther Med.* 2020;20(2):1073-1081. doi 10.3892/etm.2020.8753
- Li Y., Ren P., Dawson A., Vasquez H.G., Ageedi W., Zhang C., Luo W., ... Cassis L.A., Coselli J.S., Daugherty A., Shen Y.H., LeMaire S.A. Single-cell transcriptome analysis reveals dynamic cell populations and differential gene expression patterns in control and aneurysmal human aortic tissue. *Circulation.* 2020;142(14):1374-1388. doi 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046528
- Li Y., Gao S., Han Y., Song L., Kong Y., Jiao Y., Huang S., Du J., Li Y. Variants of focal adhesion scaffold genes cause thoracic aortic aneurysm. *Circ Res.* 2021;128(1):8-23. doi 10.1161/CIRCRESAHA.120.317361
- Liu P., Zhang J., Du D., Zhang D., Jin Z., Qiu W., Zhou X., ... Ma J., Sun S., Fu W., Liu Y., Wang L. Altered DNA methylation pattern reveals epigenetic regulation of *Hox* genes in thoracic aortic dissection and serves as a biomarker in disease diagnosis. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):124. doi 10.1186/s13148-021-01110-9
- Lokk K., Modhukur V., Rajashekar B., Märtens K., Mägi R., Kolde R., Koltšina M., Nilsson T.K., Vilo J., Salumets A., Tõniss N. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biol.* 2014;15(4):r54. doi 10.1186/gb-2014-15-4-r54
- Mosquera J.V., Auguste G., Wong D., Turner A.W., Hodonsky C.J., Alvarez-Yela A.C., Song Y., ... Finn A.V., van der Laan S.W., Zang C., Sheffield N.C., Miller C.L. Integrative single-cell meta-analysis reveals disease-relevant vascular cell states and markers in human atherosclerosis. *Cell Rep.* 2023;42(11):113380. doi 10.1016/j.celrep.2023.113380
- Ni C.W., Qiu H., Rezvan A., Kwon K., Nam D., Son D.J., Visvader J.E., Jo H. Discovery of novel mechanosensitive genes in vivo using mouse carotid artery endothelium exposed to disturbed flow. *Blood.* 2010;116(15):e66-e73. doi 10.1182/blood-2010-04-278192
- Oshima T., Hara H., Takeda N., Hasumi E., Kuroda Y., Taniguchi G., Inuzuka R., Nawata K., Morita H., Komuro I. A novel mutation of *NFLX* causes Sotos-like syndrome (Malan syndrome) complicated with thoracic aortic aneurysm and dissection. *Hum Genome Var.* 2017;4:17022. doi 10.1038/hgv.2017.22
- Pan S., Lai H., Shen Y., Breeze C., Beck S., Hong T., Wang C., Teschen-dorff A.E. DNA methylome analysis reveals distinct epigenetic patterns of ascending aortic dissection and bicuspid aortic valve. *Cardiovasc Res.* 2017;113(6):692-704. doi 10.1093/cvr/cvx050

- Pirruccello J.P., Chaffin M.D., Chou E.L., Fleming S.J., Lin H., Nekoui M., Khurshid S., ... Hoffmann U., Lubitz S.A., Philippakis A.A., Lindsay M.E., Ellinor P.T. Deep learning enables genetic analysis of the human thoracic aorta. *Nat Genet.* 2022;54(1):40-51. doi 10.1038/s41588-021-00962-4
- Pozo-Vilumbrales B., Martín-Chaves L., López-Unzu M.A., Soto-Navarrete M.T., Pavón-Morón F.J., Rodríguez-Capitán J., Fernández B. Unraveling the molecular complexity of bicuspid aortopathy: lessons from comparative proteomics. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2025;1871(3):167679. doi 10.1016/j.bbadis.2025.167679
- Ren J., Jiang L., Liu X., Liao Y., Zhao X., Tang F., Yu H., Shao Y., Wang J., Wen L., Song L. Heart-specific DNA methylation analysis in plasma for the investigation of myocardial damage. *J Transl Med.* 2022;20(1):36. doi 10.1186/s12967-022-03234-9
- Schiano C., Napoli C. Mediator complex: update of key insights into transcriptional regulation of ancestral framework and its role in cardiovascular diseases. *Eur J Med Res.* 2025;30(1):507. doi 10.1186/s40001-025-02720-2
- Shah A.A., Gregory S.G., Krupp D., Feng S., Dorogi A., Haynes C., Grass E., Lin S.S., Hauser E.R., Kraus W.E., Shah S.H., Hughes G.C. Epigenetic profiling identifies novel genes for ascending aortic aneurysm formation with bicuspid aortic valves. *Heart Surg Forum.* 2015;18(4):E134-E139. doi 10.1532/hsf.1247
- Song Y., Choi J.E., Kwon Y.J., Chang H.J., Kim J.O., Park D.H., Park J.M., Kim S.J., Lee J.W., Hong K.W. Identification of susceptibility loci for cardiovascular disease in adults with hypertension, diabetes, and dyslipidemia. *J Transl Med.* 2021;19(1):85. doi 10.1186/s12967-021-02751-3
- Staiculescu M.C., Cocciolone A.J., Procknow J.D., Kim J., Wagen-seil J.E. Comparative gene array analyses of severe elastic fiber defects in late embryonic and newborn mouse aorta. *Physiol Genomics.* 2018;50(11):988-1001. doi 10.1152/physiolgenomics.00080.2018
- Steimle J.D., Moskowitz I.P. *TBX5*: a key regulator of heart development. *Curr Top Dev Biol.* 2017;122:195-221. doi 10.1016/bs.ctdb.2016.08.008
- Sticchi E., De Carlo R., Suraci S., Kura A., Berteotti M., Squillantini L., Barbieri G., ... Gori A.M., Marcucci R., Pepe G., Nistri S., Giusti B. Bicuspid aortic valve: old and novel gene contribution to disease onset and complications. *Diagnostics (Basel).* 2025;16(1):104. doi 10.3390/diagnostics16010104
- Viscardi F., Vergara C., Antiga L., Merelli S., Veneziani A., Puppini G., Faggian G., Mazzucco A., Luciani G.B. Comparative finite element model analysis of ascending aortic flow in bicuspid and tricuspid aortic valve. *Artif Organs.* 2010;34(12):1114-1120. doi 10.1111/j.1525-1594.2009.00989.x
- Vitali T., Giraldo-Berlingeri S., Randazzo P.A., Chen P.W. Arf GAPs: a family of proteins with disparate functions that converge on a common structure, the integrin adhesion complex. *Small GTPases.* 2019;10(4):280-288. doi 10.1080/21541248.2017.1299271
- Wang F., Liu D., Zhang R.R., Yu L.W., Zhao J.Y., Yang X.Y., Jiang S.S., Ma D., Qiao B., Zhang F., Jin L., Gui Y.H., Wang H.Y. A *TBX5* 3'UTR variant increases the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population. *Cell Discov.* 2017;3:17026. doi 10.1038/celldisc.2017.26
- Wang S., Zhang J., He X., Zhang Y., Chen J., Su Q., Pang S., Zhang S., Cui Y., Yan B. Identification and functional analysis of genetic variants in *TBX5* gene promoter in patients with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.* 2019;19(1):265. doi 10.1186/s12872-019-1237-6
- Weerackoon N., Gunawardhana K.L., Mani A. Wnt signaling cascades and their role in coronary artery health and disease. *J Cell Signal.* 2021;2(1):52-62. doi 10.33696/Signaling.2.035
- Xia Y., Zhang M., Song R., Wu H., Deng J., Huang S., Yang Y. The deficiency of *DIP2C* leads to congenital heart defects in patients with 10p15.3 microdeletion syndrome. *Gene.* 2025;969:149753. doi 10.1016/j.gene.2025.149753
- Yang Y., Bartz T.M., Brown M.R., Guo X., Zilhão N.R., Trompet S., Weiss S., ... Rotter J.I., Boerwinkle E., Fornage M., Jun G., Yu B. Identification of functional genetic determinants of cardiac troponin T and I in a multiethnic population and causal associations with atrial fibrillation. *Circ Genom Precis Med.* 2021;14(6):e003460. doi 10.1161/CIRCGEN.121.003460
- Zaina S., Heyn H., Carmona F.J., Varol N., Sayols S., Condom E., Ramírez-Ruz J., Gomez A., Gonçalves I., Moran S., Esteller M. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7(5):692-700. doi 10.1161/CIRCGENETICS.113.000441
- Zhang F., Xia M., Jiang J., Wang S., Zhao Q., Yu C., Yu J., Xian D., Li X., Zhang L., Liu Y., Peng M. Machine learning and bioinformatics to identify 8 autophagy-related biomarkers and construct gene regulatory networks in dilated cardiomyopathy. *Sci Rep.* 2022;12(1):15030. doi 10.1038/s41598-022-19027-5
- Zhao Q., Pedroza A., Sharma D., Gu W., Dalal A., Weldy C., Jackson W., ... Kundaje A., Fischbein M., Wirka R., Quertermous T., Cheng P. A cell and transcriptome atlas of human arterial vasculature. *Cell Genom.* 2025;5(12):101034. doi 10.1016/j.xgen.2025.101034
- Zheng S.C., Breeze C.E., Beck S., Dong D., Zhu T., Ma L., Ye W., Zhang G., Teschendorff A.E. EpiDISH web server: Epigenetic Dissection of Intra-Sample-Heterogeneity with online GUI. *Bioinformatics.* 2019;36(6):1950-1951. doi 10.1093/bioinformatics/btz833

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.02.2026. После доработки 15.05.2026. Принята к публикации 15.05.2026.