

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

На правах рукописи



Деменева Виктория Вадимовна

**РОЛЬ АБЕРРАНТНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ РЕТРОТРАНСПОЗОНА LINE-1
В ЭТИОЛОГИИ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ГИБЕЛИ**

1.5.7 Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Васильев Станислав Анатольевич

Томск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1 Нарушение внутриутробного развития плода.....	18
1.1.1 Причины репродуктивных потерь в первом триместре беременности.....	18
1.2.1 Механизм возникновения анеуплоидий	20
1.2 Метилирование генома как механизм реализации программы развития в эмбриогенезе.....	22
1.2.1 Особенности метилирования в гаметогенезе	23
1.2.2 Изменение профиля метилирования генома на преимплантационной стадии развития	27
1.2.3 Метилирование внезародышевых тканей в первом триместре беременности.....	29
1.3 Мобильные элементы генома и их роль в онтогенезе	32
1.3.1 Классификация различных типов мобильных элементов.....	34
1.3.2 Вклад мобильных элементов в активацию зародышевого генома и развитие плаценты	35
1.4 Ретротранспозон LINE-1	36
1.4.1 Структура и организация ретротранспозона LINE-1	36
1.4.2 Ретротранспозиция и регуляция работы LINE-1.....	37
1.4.3 Вклад LINE-1 и других мобильных элементов в развитие заболеваний .	38
1.4.4 Роль LINE-1 в гаметогенезе и эмбриогенезе	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1 Дизайн исследования.....	46
2.2 Структура и объем материала.....	47
2.3 Анализ индекса метилирования LINE-1 в ворсинах хориона	49
2.3.1 Выделение ДНК из ворсин хориона	49
2.3.2 Бисульфитная модификация ДНК	50
2.3.3 Полимеразная цепная реакция	51
2.3.4 Таргетное бисульфитное массовое параллельное секвенирование.....	54

2.4 Проверка кариотипа спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме и с моносомией по X-хромосоме.....	55
2.4.1 Приготовление суспензий клеток из ворсин хориона	55
2.4.2 Мечение ДНК-зондов.....	56
2.4.3. Постановка флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i> (FISH)	57
2.5 Определение родительского происхождения и момента возникновения анеуплоидии	58
2.5.1 Выделение ДНК из лимфоцитов крови	58
2.5.2 Анализ родительского происхождения анеуплоидий с помощью капиллярного электрофореза	59
2.6 Анализ экспрессии генов	60
2.6.1 Выделение РНК из ворсин хориона и мезодермы	60
2.6.2 Выделение РНК из лимфоцитов периферической крови	61
2.6.3 Обратная транскрипция.....	62
2.6.4 Подбор олигонуклеотидных праймеров.....	62
2.6.5 Проверка эффективности праймеров.....	64
2.6.6 ПЦР в режиме реального времени.....	65
2.7 Биоинформатический анализ подсемейств LINE-1	65
2.8 Статистический анализ данных	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	69
3.1 Разработка метода таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования в 19 CpG-сайтах промотора LINE-1	69
3.2 Оценка индекса метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в первом триместре беременности	72
3.3 Оценка уровня метилирования различных подсемейств LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в первом триместре беременности	82
3.4 Оценка индекса метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в зависимости от возраста родителей.....	89

3.5 Сравнительный анализ уровня метилирования LINE-1 в трофобласте хориона в эмбрионах в семьях с привычным невынашиванием беременности..	93
3.6 Анализ связи уровня метилирования LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей	97
3.7 Анализ экспрессии генов <i>NUP153</i> и <i>YWHAB</i> с канонических и альтернативных промоторов LINE-1.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ.....	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Самопроизвольный аборт или выкидыш – естественная гибель эмбриона или плода до двадцать второй недели беременности (после 22 недель употребляется термин мертворождение). Большинство самопроизвольных абортов приходится на первый триместр беременности, когда трофобласт эмбриона внедряется в эндометрий. Известно, что частота самопроизвольных абортов достигает до 15% среди клинически подтвержденных беременностей в сроке от 4 недель [Quenby S. et al., 2021; Беспалова О.Н. и др., 2024]. Однако данный показатель может быть намного выше, так, по оценкам Jarvis G.E., выкидышами заканчивается от 40 до 60 процентов всех беременностей. При этом большинство абортированных эмбрионов прекращает развитие вскоре после имплантации, что может быть диагностировано только в виде меноррагии или задержки менструации и чаще всего ретроспективно [Jarvis G.E. et al., 2017].

Хорошо известны негенетические причины нарушения репродукции и последующего невынашивания беременности. Это некоторые хронические заболевания, такие как сахарный диабет, целиакия, аутоиммунные состояния, включая антифосфолипидный синдром. Также показано, что беременность, наступившая вскоре после предыдущих родов или перенесенных инфекций (таких как цервицит, вагинит, сифилис, малярия), может закончиться летально и привести к диагнозу невынашивание беременности. Кроме того, структурные аномалии матки, такие как врожденные аномалии, лейомиома и внутриматочные спайки, также увеличивают вероятность самопроизвольного аборта. Среди внешних факторов риска невынашивания беременности следует отметить воздействие тератогенов химического происхождения: от ксенобиотиков до различных металлов и неметаллов (мышьяк, свинец) и органических соединений [Griebel C.P. et al., 2005]. Таким образом, исследование проблемы невынашивания беременности базируется на двух основных клинических подходах: исключение факторов риска негенетической природы и поиск генетической компоненты, которая может внести свой вклад в раннюю эмбриональную гибель.

Основной вклад в этиологию ранней эмбриональной гибели по генетическим причинам приходится на хромосомные аномалии [Nikitina T.V. et al., 2023]. По разным оценкам, от 50 до 60% спонтанных абортусов имеют анеуплоидный кариотип [Eiben B. et al., 1990; Menasha J. et al., 2005; Баранов В.С., Кузнецова Т.В., 2007]. Более того, известно, что частота анеуплоидий выше, а спектр хромосомных аномалий значительно разнообразнее на преимплантационном этапе эмбрионального развития по сравнению с дальнейшими стадиями внутриутробного периода онтогенеза [Tsuiko O. et al., 2018]. Лишь небольшой процент анеуплоидных эмбрионов доживает до более поздних сроков беременности и может быть выявлен с помощью неинвазивного пренатального скрининга и инвазивной диагностики [Барков И.Ю. и др., 2020]. Возникновение анеуплоидии связано с ошибками сегрегации хромосом в мейозе в половых клетках родителей и в первых митотических делениях зиготы [Lebedev I.N., Zhigalina D. I., 2021]. При этом как минимум 30% бластоцист с анеуплоидией имеют мозаицизм, возникший в первых делениях дробления. Мозаицизм по анеуплоидии остается диагностической проблемой и фактором, определяющим фенотип пациента, и после рождения [Опарина Н.В. и др., 2021].

Среди других генетических причин невынашивания беременности потенциальную роль могут играть точковые мутации в белок-кодирующих генах [Maksiutenko E.M. et al., 2023] и нарушения эпигенетической программы формирования организма. Изменение уровня метилирования ДНК является одним из параметров эпигенетической регуляции экспрессии генов в различных типах клеток и на разных этапах онтогенеза является [Plass C. et al., 2002]. Метилирование ДНК является наиболее изученной эпигенетической модификацией, которая включает добавление метильной группы к цитозину CpG-динуклеотидов с помощью ДНК-метилтрансфераз. Было показано, что паттерны метилирования в разных тканях значительно различаются, а тканеспецифические дифференциально метилированные области используются в качестве биомаркеров для мониторинга или прогноза заболеваний [Ponomareva N. et al., 2020].

Периоды возникновения повышенной частоты анеуплоидии в онтогенезе совпадают с волнами глобального эпигенетического перепрограммирования у человека [Tolmacheva E.N. et al., 2020]. Во время гаметогенеза и раннего эмбриогенеза родительские геномы подвергаются двум волнам перепрограммирования метилирования ДНК. Нарушение этих процессов может существенно сказаться на стабильности генома, в том числе на правильной сегрегации хромосом в ходе клеточного деления. Ошибки в метилировании, возникающие в результате перепрограммирования генома эмбриона, могут потенциально привести к возникновению анеуплоидии. С другой стороны, наличие дополнительной хромосомы или ее потеря также могут повлиять на глобальный уровень метилирования. Высокая частота митотической анеуплоидии в бластоцистах совпадает со второй волной эпигенетического репрограммирования, характеризующейся резким снижением уровня метилирования всего генома. Таким образом, можно предположить, что существует связь между геномной и эпигеномной нестабильностью в раннем эмбриогенезе. Однако процессы, обеспечивающие такую связь, и их непосредственные участники остаются неясными.

Для плаценты характерно состояние гипометилирования генома, что отличает ее от других соматических тканей [Rondinone O. et al., 2021]. Паттерн метилирования ДНК имеет решающее значение для регуляции генов, участвующих в инвазии трофобласта и развитии плаценты, которые отвечают за дальнейший рост плода [Rahnama F. et al., 2006; Serman L. et al., 2007]. Например, экспрессия гена, кодирующего хорионический гонадотропин, регулируется эпигенетически [Milano-Foster J. et al., 2019]. Гипометилирование плаценты можно объяснить наличием больших блоков (>100 т.п.н.) с промежуточным уровнем метилирования или частично метилированных доменов (PMD), которые составляют около 37% всего плацентарного генома [Novakovic B. et al., 2010; Schroeder D.I. et al., 2013]. В соматических тканях метилирование ДНК характеризуется гомогенным распределением, где большинство CpG-сайтов демонстрируют либо высокий (>90%), либо низкий (<10%) уровень

метилирования. Однако в плацентарной ДНК присутствие PMD приводит к уникальному распределению профиля метилирования, с пиками частично метилированных и сильно метилированных областей [Schroeder D.I. et al., 2013].

Было подсчитано, что повторяющиеся последовательности занимают более двух третей генома человека, большая часть которых состоит из мобильных элементов (МЭ) [Nurk S. et al., 2022]. Существует два основных класса МЭ. Элементы I класса, ДНК-транспозоны или классические транспозоны, реплицируются по механизму «вырезать и вставить» или «ДНК–ДНК перемещение» [Munoz-Lopez M. et al., 2010]. В настоящее время активных транспозонов у людей не описано. Элементы II класса, автономные ретротранспозоны, перемещаются по механизму «копировать и вставить» или «ДНК–РНК–ДНК механизм», который включает обратную транскрипцию РНК и вставку ее копии кДНК в новый сайт генома. Класс ретротранспозонов включает в себя три основные подгруппы: LTR-ретротранспозоны или ретровирусы, non-LTR-ретротранспозоны и ретроэлементы (Penelope-like elements). LTR-ретротранспозоны включают эндогенные ретровирусы, утратившие способность повторно инфицировать новые клетки. Человеческие эндогенные вирусы (HERV) составляют 8% генома, хотя HERV, способные к ретротранспозиции, идентифицированы не были [Wells J.N. et al., 2020].

Для человека единственный автономно активный мобильный элемент – это LINE-1, non-LTR ретротранспозон, имеющий приблизительно полмиллиона копий и занимающий около 17% генома. В геномах гоминоидных приматов распространились пять подсемейств ретротранспозона LINE-1 (L1P1, L1PA2, L1PA3, L1PA4, L1PA5). Еще одно подсемейство (L1HS) является специфичным только для человека [Boissinot S., Sookdeo A., 2016]. Большинство LINE-1 в геноме человека инактивированы, однако небольшая часть копий, принадлежащих к молодому, специфичному для человека подсемейству L1HS, по-прежнему сохраняет способность к ретротранспозиции [Penzkofer T. et al., 2016]. Транскрипционная активность LINE-1 строго контролируется как на уровне хроматина с помощью эпигенетических механизмов и факторов транскрипции, так и на посттранскрипционном уровне. Эти механизмы, по-видимому, действуют

специфичным для различных последовательностей образом и зависят от эволюционного возраста LINE-1 или типа клеток, в которых они работают [Pérez-Rico Y.A. et al., 2024]. Неконтролируемая активность LINE-1 может иметь негативные последствия для организма, включая повреждение ДНК, геномную нестабильность, нарушения экспрессии генов. Также было установлено, что экспрессия LINE-1 усиливается при старении клетки и при образовании злокачественных новообразований [Payer L.M. et al., 2019]. Другие исследования выявили значительную транскрипционную активность LINE-1 в эмбриональных стволовых клетках и во время предимплантационного развития [Jachowicz J. W. et al., 2017; Richardson S.R. et al., 2017], в нейрональных клетках-предшественниках и нейронах гиппокампа [Richardson S.R. et al., 2014; Upton K.R. et al., 2015]. Кроме того, LINE-1 временно экспрессируется с X-хромосомы во время инактивации X-хромосомы, а не подавляется, что потенциально может способствовать подавлению генов в определенных областях хромосомы [Chow J. C. et al., 2010; Loda A. et al., 2017]. Эти наблюдения поднимают вопрос о возможной роли LINE-1, например, во время перепрограммирования после оплодотворения [Jachowicz J. W. et al., 2017], в возникновении нейронального соматического мозаицизма и пластичности, в координации регуляторных генных сетей или генерации геномного разнообразия [Richardson S.R. et al., 2014].

Одна из возможных ролей LINE-1 может состоять в использовании его регуляторных последовательностей, в частности, антисмыслового промотора, для влияния на транскрипцию расположенных рядом генов. Антисмысловые транскрипты LINE-1 затрагивают до 4% всех генов человека, а с антисмысловых промоторов LINE-1 идет активная транскрипция в различных типах клеток человека, в том числе и в эмбриональных тканях [Criscione S. W. et al., 2016]. Всего на данный момент идентифицировано 988 генов, способных экспрессироваться с альтернативных промоторов LINE-1 [Criscione S. W. et al., 2016]. Возможно, гипометилирование генома в плаценте способствует экспрессии генов с промоторов ретровирусов и ретротранспозонов, включая альтернативные промоторы LINE-1. Вместе с подсемейством L1HS продолжает быть активным и подсемейство L1PA, которое отвечает почти за всю транскрипцию LINE-1 у

преимплантационных эмбрионов человека. Было обнаружено, что эти подсемейства LINE также деметилированы на ранних стадиях развития, в то время как более старые подсемейства сохраняли более высокое метилирование в течение этого периода [Smith Z.D. et al., 2014].

Установление уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 исходно происходит в половых клетках родителей, а аномалии его установления потенциально могут затрагивать пулы половых клеток родителей, формируя «эпимозаицизм» по аберрантному метилированию LINE-1. Такой пул половых клеток с аберрантным метилированием LINE-1 может приводить к повторяющимся нарушениям в ходе эмбриогенеза в одной и той же семье. В связи с этим, необходимо изучить, может ли аберрантное метилирование LINE-1 являться фактором, приводящим к привычному невынашиванию беременности, путем его анализа у спонтанных абортусов в семьях со спорадическим и привычным невынашиванием беременности и у спонтанных абортусов из одних и тех же семей по сравнению с медицинскими абортусами.

Степень научной разработанности темы исследования

Ранее нарушения профиля метилирования генома в плаценте фиксировались при различных патологиях беременности. В первую очередь, это преэклампсия, задержка роста плода во втором триместре и преждевременные роды [Chen P.Y. et al., 2018; Hivert M.F. et al., 2020; Sasaki A. et al., 2022]. Однако, как правило, анализ проводился на материале плаценты, полученном при родах, а исследования профиля метилирования в плаценте в первом триместре беременности очень ограничены. Также известен феномен множественных аномалий импринтинга (multi-locus imprinting disturbances – MLID), встречающийся в том числе у спонтанных абортусов [Саженова Е.А. и др., 2017; Eggermann T. et al., 2022; Sazhenova E.A. et al., 2021] и предимплантационных эмбрионов [White C.R. et al., 2015]. Остается неясным, что при этом происходит с профилем метилирования неимпринтированных генов в плаценте.

Нарушения профиля метилирования всего генома часто выявляются и при анеуплоидии, что может приводить к нарушениям развития и эмбриональной гибели. Так, было показано наличие значимых корреляций между повышенным метилированием промоторов отдельных генов и гиперметилированием генома в ворсинах хориона спонтанных абортусов с трисомией 16 по сравнению с медицинскими абортусами [Tolmacheva E.N. et al., 2022].

В течение первых нескольких дней эмбрионального развития происходят активные изменения в эпигеноме эмбриона. На предимплантационной и постимплантационной стадиях развития происходит активное перепрограммирование метилирования ДНК, которое включает в себя стирание метилирования ДНК в отцовском и материнском геномах и повторное установление паттернов для нового ландшафта метилирования ДНК эмбриона. Глобальное стирание метилирования ДНК происходит в несколько стадий. Основная волна деметилирования происходит в течение 12 часов сразу после оплодотворения. Дальнейшее деметилирование происходит от поздней зиготы до 2-клеточной стадии, а затем от 8-клеточной стадии до стадий морулы и бластоцисты [Zhu P. et al., 2014]. При этом существуют регионы, которые избегают деметилирования ДНК. Одним из таких регионов является молодое семейство длинных диспергированных ядерных элементов (LINE-1), в частности семейство L1PA [Wilkinson A.L. et al., 2023].

Активность LINE-1 рассматривается как одна из потенциальных причин самопроизвольного прерывания беременности [Lou C. et al., 2020], но пока не было данных в пользу этой гипотезы. Высокая экспрессия LINE-1 может способствовать развитию врожденных пороков развития. Например, глобальное гиперметилирование и гипометилирование LINE-1 в нейрональных тканях связано с более высоким риском дефектов нервной трубки, особенно с пороками развития головного мозга [Wang L. et al., 2010]. Кроме того, в образцах плаценты, взятых у мертворожденных детей с дефектами нервной трубки отмечался низкий уровень метилирования LINE-1. Также в плаценте было зафиксировано увеличение уровня экспрессии транскрипта подсемейства LINE-1 L1HS [Wang L. et al., 2015]. Возможно, более низкое метилирование промоторной области LINE-1 может быть

связано с увеличением частоты событий ретротранспозиции, что приводит к нестабильности геномной ДНК и дефектам нервной трубки плода. Действительно, для спонтанных абортусов с нормальным кариотипом гибель эмбриона может быть связана с мутациями в отдельных генах [Colley E. et al., 2019]. Предполагается, что новая вставка LINE-1 в определенный ген может инициировать каскад, ведущий к гибели плода [Lou C. et al., 2020]. Активная ретротранспозиция LINE-1 во время раннего эмбриогенеза может способствовать повышению этого мутационного груза. Возможно, что во время раннего развития эпигенетические изменения могут увеличивать или снижать активность LINE-1, что в свою очередь приводит к невынашиванию беременности. Таким образом, процессы раннего эмбриогенеза в большой степени зависят от эпигенетических регуляторных механизмов. Особенно это касается экстраэмбриональных тканей, эпигенетический ландшафт которых обладает уникальными признаками, способствующими снятию репрессии с ретротранспозонов и контролируемых ими генов. Эпигенетические ошибки потенциально могут возникать из-за действия различных факторов, включая родительские факторы, анеуплоидию, факторы внешней среды. Независимо от причин, нарушение эпигенетического ландшафта может приводить к ошибкам программы эмбрионального развития и ранней гибели зародыша. Таким образом, гипотезой настоящего исследования является предположение о связи aberrантного метилирования ретротранспозона LINE-1 с повышенной вероятностью гибели эмбриона в первом триместре беременности.

Цель исследования

Охарактеризовать aberrантное метилирование ретротранспозона LINE-1 у спонтанных абортусов в первом триместре беременности.

Задачи исследования

1. Разработать метод анализа уровня метилирования ДНК в промоторе LINE-1 с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования.

2. Оценить уровень метилирования LINE-1 в трофобласте хориона эмбрионов человека с анеуплоидным и нормальным кариотипами в сравнении с контрольной группой медицинских абортусов в первом триместре беременности.
3. Определить влияние возраста родителей на индекс метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов.
4. Провести сравнительный анализ уровня метилирования LINE-1 в трофобласте хориона в эмбрионах из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности в анамнезе.
5. Сравнить уровень метилирования LINE-1 в трофобласте хориона между парами абортусов-сисбсов.
6. Оценить экспрессию генов дифференцировки трофобласта с альтернативных промоторов LINE-1 в экстраэмбриональных тканях эмбрионов с различным уровнем метилирования LINE-1.

Научная новизна

В ходе выполнения исследования был разработан метод анализа метилирования ДНК промотора ретротранспозона LINE-1, основанный на массовом параллельном секвенировании. Этот подход позволяет оценить индекс метилирования ДНК 19 CpG-сайтов в промоторе LINE-1, которые имеют наибольшую тканеспецифическую вариабельность. Метод обеспечивает получение либо независимо индекса метилирования каждого CpG-сайта, либо среднего индекса метилирования ДНК вдоль промотора LINE-1.

Была подтверждена гипотеза о том, что aberrантное метилирование ретротранспозона LINE-1 может быть связано с аномальным протеканием ранних этапов эмбрионального развития человека. Получены новые данные об aberrантном метилировании ретротранспозона LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом. Кроме того, впервые охарактеризовано нарушение уровня метилирования различных подсемейств LINE-1 в первом триместре беременности у медицинских абортусов и спонтанных

абортусов с различным кариотипом. Впервые показано влияние возраста родителей на уровень метилирования LINE-1 в первом триместре беременности при нормально протекающей беременности и в случае внутриутробной гибели эмбриона. Впервые описана корреляция уровня метилирования LINE-1 у пар спонтанных абортусов из одних и тех же семей. Впервые охарактеризована экспрессия генов с альтернативных промоторов LINE-1 в трофобласте хориона при нормальном развитии и аномалии экспрессии этих генов при спонтанной внутриутробной гибели эмбриона в первом триместре беременности.

Теоретическая и практическая значимость

Выполненная работа дает возможность расширить представление об эпигенетических механизмах, лежащих в основе нормального развития зародыша человека на ранних стадиях эмбриогенеза и позволяет оценить связь между уровнем метилирования LINE-1 в плаценте и невынашиванием беременности. В будущем эти данные могут использоваться для разработки методов оценки качества эмбрионов во вспомогательных репродуктивных технологиях.

Методология и методы исследования

В работе использованы современные методы молекулярно-генетического, молекулярно-цитогенетического, статистического и биоинформатического анализа. Молекулярно-генетические методы включали выделение ДНК и РНК, ПЦР, синтез библиотек для секвенирования, высокопроизводительное массовое параллельное секвенирование. Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ. Проведение диссертационного исследования одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (09.11.2020/№7).

Положения, выносимые на защиту

1. Спонтанные абортусы с трисомией по 16 хромосоме и моносомией по X-хромосоме характеризуются более высоким уровнем метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона по сравнению с медицинскими абортусами.
2. Нарушения уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 характерны для 15,7% спонтанных абортусов с нормальным кариотипом.
3. Наибольшее повышение уровня метилирования в ворсинах хориона спонтанных абортусов наблюдается по более эволюционно древним подсемействам ретротранспозона LINE-1, обладающим в нормальной плаценте сниженным метилированием.
4. Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона в первом триместре беременности повышается с возрастом родителей и сходен у различных абортусов от одних родителей.
5. Ген белка ядерных пор *NUP153* и ген белка сигнальных путей связывания с содержащими фосфосерин белками *YWHAB* экспрессируются с альтернативных промоторов ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона обратно пропорционально уровню метилирования LINE-1.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Высокая степень достоверности данных, полученных в ходе выполнения настоящей работы, обеспечивается применением в ходе исследования современных высокоточных молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов исследования с верификацией полученных данных, а также статистической обработкой полученных результатов.

Личный вклад автора

Основные результаты настоящего исследования получены автором самостоятельно, либо в ходе совместной работы с коллегами из лаборатории

цитогенетики и лаборатории инструментальной геномики научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ. Изучение литературы по теме диссертации, экспериментальная работа, анализ и обобщение результатов, написание диссертации выполнены лично автором. Диссертант участвовал на всех этапах обсуждения полученных результатов, их опубликования и представления на научных конференциях.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертационной работы были представлены на Международной научно-практической конференции «NGS в медицинской генетике – MGHGS-2022» (Суздаль, 2022); Всероссийском конгрессе молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2022); Европейской конференции по генетике человека 2022 (Вена, Австрия, 2022); Международной XIII научной конференции «Генетика человека и патология» (Томск, 2022); II Дальневосточной конференции молодых ученых «Медицина будущего» (Владивосток, 2023); Европейской конференции по генетике человека 2023 (Глазго, Великобритания, 2023).

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РНФ № 19-74-10026 и 23-15-00341.

Публикации

По теме исследования опубликовано 12 работ, в том числе 4 статьи в журналах перечня ВАК РФ (из них 2 за первым авторством), 8 публикаций – статьи в сборниках и тезисы конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 145 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и обсуждение), выводы, список сокращений, список

литературы, список иллюстративного материала. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 12 таблицами. Библиография включает 278 литературных источника, из них 9 источников отечественной литературы и 269 источника зарубежной литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Нарушение внутриутробного развития плода

Ранние репродуктивные потери беременности определяются как нежизнеспособная внутриматочная беременность, когда на УЗИ может быть зафиксировано плодное яйцо, содержащее эмбрион без сердечной деятельности плода, или анэмбриония в течение первых 13 недель беременности [ACOG, 2018]. Предполагается, что от 40% до 60% всех беременностей заканчиваются ранними репродуктивными потерями. Из них около 10–35% эмбрионов теряются еще до момента имплантации, 10–20% — до клинического подтверждения беременности и 5–15% — после клинического подтверждения наступления беременности и до момента рождения [Jarvis G.E. et al., 2017]. Около трети самопроизвольных абортов приходится на анэмбриональную беременность, при которой собственно эмбрион фактически не формируется (или формируется ненадолго, а затем исчезает) [Blackshaw B.P., Rodger D., 2019].

Невынашивание беременности может быть спорадическим и привычным. Привычное невынашивание беременности определяется как потеря двух или более беременностей с момента зачатия до 22 недель беременности. Известные факторы риска, связанные с данной патологией, очень обширны и включают общие факторы, такие как увеличение возраста матери и количество беременностей, а также более специфические факторы, такие как аномалии числа или структуры хромосом, аномалии развития матки, а также иммунологические факторы и эндокринную патологию.

1.1.1 Причины репродуктивных потерь в первом триместре беременности

Самопроизвольный аборт возникает по множеству различных причин, однако около 60% случаев невынашивания беременности связаны с анеуплоидным кариотипом, когда эмбрион имеет аномальное число хромосом. Помимо нарушения кариотипа, существуют другие генетические причины, которые могут быть связаны с самопроизвольным абортом эуплоидных эмбрионов [Colley E. et al., 2019]. Таким образом, количество выкидышей, причиной которых являются

генетические нарушения, намного больше, чем 60%, и они вносят наиболее существенный вклад в структуру ранних репродуктивных потерь. Другие причины невынашивания беременности включают иммунологические состояния, тромбофилии, эндокринологические причины, пороки развития матки и острые инфекционные заболевания у матери. Некоторые факторы образа жизни (например, курение), хронические состояния (например, диабет) и не поддающиеся изменению факторы риска (например, пожилой возраст) также вносят свой вклад в повышение риска невынашивания беременности [Jurkovic D. et al., 2013].

Нарушения эмбрионального развития могут быть связаны как с внутренними, так и с внешними факторами по отношению к эмбриону. Одним из наиболее важных факторов является возраст родителей [Gruhnet et al., 2019]. Возраст родителей, особенно матери, повышает вероятность возникновения анеуплоидий в половых клетках, имеющих материнское происхождение. С более высокой частотой нарушения в мейозе возникают в возрасте до 20 лет и старше 33 лет [Gruhn J.R. et al., 2019]. В сперматозоидах анеуплоидии обнаруживаются с гораздо меньшей частотой. Анеуплоидии половых хромосом чаще всего имеют отцовское происхождение [Hassold T. et al., 2001].

Анеуплоидия – состояние, при котором количество хромосом в клетке или организме некратно гаплоидному геному. Анеуплоидия отражает как приобретения или потери целых хромосом, приводящие к «полнохромосомной» анеуплоидии, так и несбалансированные перестройки хромосом, включая делеции, амплификации или транслокации больших участков генома, приводящие к так называемой «структурной» анеуплоидии [Bernardo et al., 2016]. Анеуплоидия встречается на всех этапах онтогенеза человека, но наибольшая частота её регистрируется в гаметогенезе и в раннем эмбриогенезе до имплантации. Кроме того, в последние годы накоплены данные о высокой вероятности митотических ошибок на начальных этапах деления оогониев [Delhanty et al., 2019].

Большая часть анеуплоидных клеток или организмов погибает в эмбриогенезе. Анеуплоидия регистрируются в 4-5% среди всех клинических беременностей, и подавляющее большинство таких случаев завершается выкидышем [Hassold T. et

al., 2001; Hassold T. et al., 2007]. При самопроизвольных абортах I триместра беременности анеуплоидии составляют около 50%. При неразвивающейся беременности хромосомные аномалии обнаруживаются в 75–90% случаях [Simpson et al., 2013]. Аномальные кариотипы распределяются в следующем порядке: большинство из них – одиночная трисомия аутосом (40,5%), триплоидия – около 15%, моносомия X – 7,5% [Nikitina T.V. et al., 2020]. При самопроизвольных абортах трисомия регистрируется по всем хромосомам, причем трисомия по хромосомам 2, 13, 15, 16, 18, 21 и 22 является наиболее частой [Hassold T. et al., 2007]. При самопроизвольных абортах часто регистрируется и мозаичный кариотип [Lebedev I. et al., 2011].

Среди всех анеуплоидий в первом триместре беременности самой частой является трисомия по 16 хромосоме [Warburton D. et al., 1991]. Спонтанные абортусы с трисомией 16 также имеют аномальную морфологию ворсинок хориона с кистозным, булавовидным или гипопластическим внешним видом [Sparks T.N. et al., 2017]. Мозаичные формы этой анеуплоидии редко диагностируются на поздних сроках беременности или даже постнатально. Мозаичные формы трисомии 16 связаны с высокой вероятностью гибели плода, преждевременных родов, задержки внутриутробного развития, аномалий развития плода, преэклампсии [Yong P.J. et al., 2006]. На втором месте по частоте встречаемости среди спонтанных абортусов находится моносомия X-хромосомы. Данная анеуплоидия, приводящая к синдрому Шерешевского-Тернера, является единственной моносомией, совместимой с жизнью [Cameron-Pimblett A. et al., 2017]. Однако моносомия хромосомы X широко распространена и у спонтанных абортусов, достигая 6% среди всех случаев, что указывает на ее высокую эмбриональную летальность [Nikitina T.V. et al., 2023].

1.2.1 Механизм возникновения анеуплоидий

Анеуплоидия возникает в результате двух основных типов ошибок во время деления клетки: нерасхождения хромосом и отставания в анафазе. При этом, большинство анеуплоидий, которые возникают в гаметогенезе, являются результатом нерасхождения хромосом [Marquez C. et al., 1996]. Ошибки

расхождения хромосом во время и после мейоза I часто являются результатом неспособности к конъюгации или неправильного кроссинговера. Во время профазы I гомологичные хромосомы с помощью конъюгации образуют биваленты для последующего кроссинговера. При отсутствии правильной конъюгации гомологи хромосом не образуют биваленты и остаются унивалентными, что в итоге приводит к ошибкам расхождения гомологичных хромосом. Чаще всего кроссинговер происходит внутри короткого и длинного плеч хромосомы, но если районы кроссинговера локализованы вблизи теломер или в прицентромерных районах, то возникают дефекты сегрегации хроматид [Scelfo A. et al., 2019] и повышается риск неправильного расхождения гомологичных хромосом [Nagaoka S.I. et al., 2012]. Рекомбинантные хромосомы должны ингибироваться в области центромер, чтобы избежать последующей потери или нерасхождения хромосом после завершения сцепления между сестринскими хроматидами [Tolmacheva E.N., et al., 2020]. Вероятно, существуют механизмы, которые подавляют кроссинговер в данных областях.

Другой причиной нерасхождения хромосом часто является преждевременное разделение сестринских хроматид в MI и MII из-за потери сцепления между хроматидами [Gruhn J.R. et al., 2019]. Связи между гомологичными хромосомами часто теряются при диакинезе. С возрастом матери ухудшается стабильность этих связей: чаще наблюдается потеря сцепления между хромосомами, а сами хромосомы могут быть представлены отдельными сестринскими хроматидами [Lagirand-Cantaloube J et al., 2017]. Этот эффект может быть результатом aberrантного метилирования ДНК в генах, участвующих в обеспечении стабильности сцепления между сестринскими хроматидами. На сегодняшний день известно несколько таких потенциальных генов. Одним из таких генов, нарушение работы которого приводит к мейотической анеуплоидии, является *MEI1*. Его продукт участвует в образовании двухцепочечных разрывов ДНК при мейозе I при индукции рекомбинации, а его генные мутации приводят к аномальной сегрегации всех хромосом в MI в первое полярное тельце [Ben Khelifa M. et al., 2018]. При оплодотворении таких ооцитов двумя сперматозоидами или одним диплоидным сперматозоидом возникает рецидивирующий пузырный занос-3

(OMIM 618431). Другим важным геном, принимающим участие в мейотической рекомбинации, является ген *RAD51C*. Ооциты мышей с гипоморфной мутацией в этом гене нормально прогрессировали до метафазы I после суперовуляции, но обнаруживали преждевременное разделение сестринских хроматид, анеуплоидию и разрывы хроматид в метафазе II [Kuznetsov S. et al., 2007]. Конститутивные эпимутации в гене *RAD51C* с частотой 1,3% обнаружены в ДНК из цельной крови больных семейными формами рака молочной железы и яичников [Hansmann T. et al., 2012]. Эти данные позволяют предположить, что эпимутации, вероятно, происходили либо в оогониях, либо в бластомерах на стадии дробления.

Следующей важной причиной митотических и мейотических анеуплоидий является нарушение контрольной точки сборки веретена (SAC). Нарушение работы SAC в мейозе может привести к образованию анеуплоидных гамет, которые в подавляющем большинстве случаев несовместимы с последующим эмбриональным развитием [Lane S., Kauppi L., 2019]. Центральное место в функции SAC занимает комплекс стимуляции анафазы, нижестоящая мишень SAC, которая необратимо способствует переходу клеток от метафазы к анафазе. SAC способен контролировать ход клеточного цикла, позволяя переходить в анафазу только тогда, когда все хромосомы сформировали правильное прикрепление к веретену [Lane S., Kauppi L., 2019].

1.2 Метилирование генома как механизм реализации программы развития в эмбриогенезе

Развитие организма происходит за счет эпигенетической регуляции экспрессии разных генов в различных типах клеток и на разных этапах онтогенеза. Одним из параметров такой регуляции является изменение уровня метилирования генома. Метилирование ДНК – важный регуляторный фактор, влияющий на экспрессию генов (как правило, экспрессируются гены со сниженным уровнем метилирования в промоторе), защищающий от проникновения чужеродной ДНК, а также от распространения ДНК мобильных элементов. Метилирование ДНК является

эпигенетическим маркером, который включает добавление метильной группы на углерод 5 цитозина, присутствующего в CpG-динуклеотидах [Nakao M. et al., 2001]. Паттерны метилирования в разных тканях значительно различаются, а тканеспецифические дифференциально метилированные области используются в качестве биомаркеров для мониторинга и прогноза заболеваний, особенно в области исследований рака [Ponomareva A.A. et al., 2020]. В некоторых работах отмечалась связь между гиперметилированием промоторов отдельных генов и повышением частоты хромосомных aberrаций [Кузьмина Н.С. и др., 2017].

1.2.1 Особенности метилирования в гаметогенезе

Изменение профиля метилирования у человека и мышей сопровождается волнами эпигенетического репрограммирования в онтогенезе в раннем эмбриогенезе и позднее при формировании первичных половых клеток. Первичные половые клетки изначально имеют высокий уровень метилирования, поскольку происходят из эпибласта и являются высокодифференцированными клетками. Чтобы достигнуть уровня метилирования клеток зародышевой линии, возникает потребность в стирании имеющихся паттернов метилирования и последующем установлении новых меток во время сперматогенеза и оогенеза [Saitou M. et al., 2012]. Оогенез – это процесс, в результате которого образуется самая крупная клетка человеческого организма – яйцеклетка, способная к оплодотворению. Данный многоэтапный процесс состоит из сложных взаимодействий между ооцитом и окружающими его соматическими клетками, которые возможны за счет активации множественных транскрипционных факторов [Krajnik K. et al., 2023]. Оогенез начинается у эмбриона женского пола в яичниках примерно на 12-й неделе беременности, когда из первичных половых клеток формируются оогонии. Затем они подвергаются таким хорошо организованным процессам, как образование бивалентов гомологичных хромосом и кроссинговеру [Zickler D. et al., 2015].

Во время профазы мейоза I гомологичные хромосомы подвергаются рекомбинации, во время которой возникают двухцепочечные разрывы ДНК. В это время происходит фаза пролиферации оогониев. Затем эти клетки останавливаются

в конце профазы I и остаются покоящимися в этом состоянии до перiovуляторной фазы. При переходе фолликулов в антральную стадию, в конце фазы роста, наблюдается гиперметилирование генома и транскрипционное молчание [Eckersley-Maslin M. A. et al., 2018]. Также в конце фазы роста достигает своего максимального уровень метилирования гистонов, так как происходит увеличение уровня модификации H3K4me3 (эпигенетическая модификация гистона H3), которая считается маркером активной транскрипции [Sankar A. et al., 2020]. К периоду покоя фазы роста ооцит накапливает различные белки, необходимые для поддержания жизнедеятельности, а также белки, ответственные за репрессию транскрипции.

Завершение мейоза I происходит в результате преовуляторного высвобождения лютеинизирующего гормона, что приводит к конденсации хроматина. Полностью зрелый ооцит характеризуется повышенным уровнем цАМФ, который, по-видимому, является ключевым для поддержания ооцита в профазе I [Sanchezet F. et al., 2012]. Перед овуляцией яйцеклетка входит в метафазу мейоза II и завершает его только после оплодотворения [Gahurova L. et al., 2017]. Для завершения мейоза ооциты используют материнские белки и РНК, так как их собственная транскрипционная активность отсутствует [Christou-Kent M. et al., 2020].

Как уже было сказано выше, после стадии роста наблюдается гиперметилирование генома ооцитов, поэтому все оставшиеся этапы вплоть до активации транскрипции зиготы будут зависеть от посттранскрипционной регуляции ранее накопленных материнских транскриптов посредством двух основных механизмов: реактивации трансляции цитоплазматического реаденилирования и деградации материнской мРНК, инициированной деаденилированием [Tora L. et al., 2021]. Несколько волн деградации специфических мРНК, связанных с активацией трансляции других мРНК, важны для возобновления мейоза, а после оплодотворения – для стирания идентичности ооцита, установления состояния тотипотентности и перехода от мейоза к активному митозу. Эти последовательные волны имеют решающее значение для устранения белков, которые больше не используются или могут быть вредными для следующих шагов развития [Krajnik K. et al., 2023]. Несмотря на различия между

видами, процессы транскрипции, трансляции и деградации материнского транскриптома сохраняют общие механизмы. Независимо от вида, метилирование ДНК в ооцитах после оплодотворения стирается, а далее устанавливается *de novo*, поскольку в дальнейшем это необходимо для правильного эмбриогенеза. Кроме того, декодирование модификаций хроматина гамет сразу после оплодотворения может обеспечивать эпигенетическое наследование [Asami M. et al., 2022].

Женщины, у которых нарушена работа генов материнского транскриптома, фенотипически здоровы, но подвержены риску репродуктивных потерь из-за ранней остановки развития или нарушения работы генов импринтинга у их потомства [Zhanget K. et al., 2015]. Другие нарушения репродуктивной функции, такие как мутации в генах *PADI6*, *NLRP5*, *TLE6*, связаны с первичным бесплодием вследствие преимплантационной эмбриональной летальности [Zhang M. et al., 2021; Xu Y. et al., 2016; Xu Y. et al., 2020].

Повышение уровня метилирования генов регуляции импринтинга в ооцитах, *Nlrp5* и *Tcl1*, было зафиксировано в полярных тельцах и ооцитах, полученных от более старших мышей, по сравнению с молодыми [Jiao Z.X. et al., 2012] и в ооцитах женщин старшего репродуктивного возраста [Reyes J.M. et al., 2017]. Таким образом, репродуктивное старение приводит к аномальной экспрессии генов и эпигенетической дисрегуляции, что в свою очередь влияет на нормальное развитие ооцитов и возможно связано с повышением частоты анеуплоидий с возрастом женщины [Bebbere D. et al., 2022].

В отличие от оогенеза, сперматогенез происходит непрерывно на протяжении всей взрослой жизни благодаря сперматогониальным стволовым клеткам, которые либо самообновляются, тем самым поддерживая популяцию стволовых клеток, либо дают начало дочерним клеткам, вступающим в сперматогенез [Pohl E. et al., 2021]. В развивающихся сперматозоидах происходит резкое ремоделирование ядерных белков, которое включает замену 90 – 95% гистоновых белков на протамины. Протаминирование — это эпигенетический регуляторный процесс, специфичный для сперматогенеза [Güneş S., Kulaç T. et al., 2013]. Протамины представляют собой небольшие молекулы, богатые аргинином. Они расположены в ядрах и синтезируются на поздних стадиях сперматогенеза [Balhorn R.A. et al.,

1982]. Протаминирование хроматина сперматозоидов способствует уплотнению ядра, необходимому для подвижности сперматозоидов, а также защищает геном сперматозоидов от химического воздействия при попадании в женскую репродуктивную систему [Oliva R. et al., 2006]. Перед оплодотворением отцовский гаплоидный геном, переносимый зрелыми сперматозоидами, плотно упаковывается протаминами, а материнский геном, супрессированный в метафазе II, упаковывается гистоновыми белками. После оплодотворения протамины быстро заменяются на гистоны, ооцит проходит через метафазу II, а полярное тельце удаляется за пределы зиготы. Гистоны H3 и H4, обнаруженные в отцовском хроматине, более эффективно ацетируются по сравнению с гистонами, содержащимися в материнском хроматине [Santos F. et al., 2002]. Важно отметить, что при протаминировании в сперматозоидах сохраняется около 5 – 10% гистонов. Они локализуются в промоторах генов, которые отвечают за развитие, что позволяет предположить, что эпигеном сперматозоидов играет важную роль в эмбриогенезе [Hammoud S.S. et al., 2009].

С возрастом происходит повышение общего уровня 5-метилцитозина в сперматозоидах одних и тех же мужчин. Кроме повышения уровня метилирования, также были выявлены изменения в 117 генах, в значительной степени связанные с шизофренией и биполярным расстройством [Jenkins T.G. et al., 2014]. Эти результаты подтверждаются другими исследованиями, где также были выявлены возрастные изменения метилирования ДНК в генах в сперматозоидах, которые связаны с нарушениями развития нервной системы [Denomme M.M. et al., 2020]. В другом исследовании было обнаружено 254 области дифференциально метилированных сайтов (ДМС) в сперматозоидах при сравнении разных возрастных групп. Анализ онтологии генов показал обогащение ДМС вблизи гомеобоксных генов и генов, участвующих в развитии нервной системы [Laurentino S. et al., 2020]. Данные исследования указывают на возможную роль эпигенетического дрейфа сперматозоидов у мужчин более старшего возраста в патофизиологии нарушений развития нервной системы. Возможно, данные изменения метилирования могут влиять и на эмбриогенез. Например, дефицит DNMT3A или DNMT3L в сперматогенезе приводит к нарушению мейоза, потере

сперматоцитов из-за апоптоза и бесплодию, а также сопровождается гипометилированием всего генома. Предположительно это происходит из-за подавления активности генов, специфичных для клеток зародышевой линии, и транскрипционной активации мобильных элементов, которые становятся способными к ретротранспозиции [Branco M.R. et al., 2016; Duffié R. et al., 2014]. Также было показано, что метилирование ДНК в мужских клетках зародышевой линии играет роль в предотвращении участия ретротранспозонов в мейотической рекомбинации [Zamudio N. et al., 2015].

Таким образом, половые клетки несут разный профиль метилирования, который подвергается эпигенетическому репрограммированию непосредственно после их слияния, что создает условия формирования тотипотентных клеток.

1.2.2 Изменение профиля метилирования генома на преимплантационной стадии развития

После оплодотворения развитие эмбриона не управляется напрямую экспрессией генов новообразованной зиготы, а происходит постепенный переход контроля от материнского генома к зиготическому [Sha Q.Q. et al., 2020a,b]. Данная стадия возникает в начале раннего эмбрионального развития и заключается в эпигенетическом репрограммировании [Dalbies-Tran R. et al., 2020]. Переход происходит в виде двух волн репрограммирования генома, задачами которых является дифференцировка оплодотворенной яйцеклетки в многоклеточный организм. Первая фаза деметилирования ДНК происходит сразу после оплодотворения, за которой следует повторное метилирование ДНК, начинающееся на стадии бластоцисты [Zeng Y. et al., 2019]. Вторая волна глобального полногеномного ремоделирования метилирования ДНК происходит во время развития первичных зародышевых клеток. На эмбрионах мышей было показано, что вторая волна потери метилирования ДНК начинается примерно через 9 дней после оплодотворения, и продолжается до 13,5 дня эмбриогенеза [Zeng Y. et al., 2019]. Деметилирование после оплодотворения происходит по-разному в геномах, унаследованных от отца и от матери. В первую очередь

изменения затрагивают более высокометилированный отцовский геном и включают окисление метильной группы 5mC (5-метилцитозина) с помощью 5mC диоксигеназы TET3 (тет- метилцитозиндиоксигеназа 3) [Wossidlo M. et al., 2011]. Белки TET продуцируют 5hmC (5-гидроксиметилцитозин) в качестве первого продукта реакции, который наблюдается в отцовском геноме оплодотворенного ооцита [Iqbal K. et al., 2011]. Данный продукт представляет собой основание ДНК, которое присутствует в различных типах клеток. Больше всего он распространен в нейрональных клетках, а в остальных клетках соматических тканей уровень 5hmC составляет лишь небольшую долю от уровня общего 5mC [Hahn M.A. et al., 2014].

Для деметилирования генома зиготы требуется не только высокая активность TET3, но также предотвращение реметилирования генома ДНК-метилтрансферазами. ДНК-метилтрансфераза (DNMT1), которая отвечает главным образом за поддержание метилирования ДНК, удаляется из ядра ооцитов и зиготы [Li Y. et al., 2018]. Для сохранения DNMT1 в цитоплазме и поддержания работы кофактора DNMT1, UHRF1, необходим белок PGC7. Потеря материнского PGC7 приводит к гиперметилированию зиготического генома [Li Y. et al., 2018].

Для эмбрионов человека считается, что инициация транскрипции (активация эмбрионального генома) происходит на стадии восьми клеток, примерно в течение 3-х дней или 68 часов после оплодотворения [Xue Z. et al., 2013]. Однако в недавнем исследовании было показано, что транскрипция начинается вскоре после оплодотворения во время мейотической прогрессии и перепрограммирования. Зрелые ооциты человека и бипронуклеарные одноклеточные эмбрионы подверглись секвенированию РНК одиночных клеток (scRNA-seq), где после сравнения было выявлено 2879 дифференциально экспрессируемых генов. Для 1557 генов уровень экспрессии снижался в одноклеточных эмбрионах по сравнению с ооцитами, тем самым отражая деградацию материнского транскрипта [Asami M. et al., 2022]. Среди дифференциально экспрессируемых генов высокая экспрессия в одноклеточных эмбрионах наблюдалась у группы генов АТМ (серин/треониновая протеинкиназа). АТМ вызывает остановку клеточного цикла в

G₂/M в ответ на повреждение ДНК в эмбрионах мышей [Wang B. et al., 2013] и аномальную сегрегацию хромосом, связанную с элиминацией анеуплоидных двухклеточных эмбрионов [Pauerova T. et al., 2020].

1.2.3 Метилирование внезародышевых тканей в первом триместре беременности

Дифференцировка клеток бластоцисты приводит к образованию двух линий: внутренней клеточной массы (собственно эмбрион, который позже становится развивающимся плодом) и трофэктодермы, из которой развивается внезародышевая ткань. Весь этот процесс дифференцировки включает в себя изменения экспрессии генов, которым способствуют различные эпигенетические события [Apicella C. et al., 2019].

Период имплантации у человека начинается примерно с 7 дня развития и продолжается до 3 – 4 недели беременности [Баранов В.С. и др., 2017]. Достигнув матки, зародыш выходит из блестящей оболочки и клетки трофобласта вступают в непосредственный контакт с клетками слизистой оболочки матки [James J.L. et al., 2012]. Во время имплантации возникает внезародышевая мезодерма, выстилающая полость бластоцисты и участвующая в образовании хориона. Это ведет к появлению лакун с материнской кровью, в которых плавают трофобластические тяжи, образующие первичные ворсинки. Вращение в эти тяжи внезародышевой мезодермы приводит к образованию вторичных ворсин. Примерно на 17-й день вторичные ворсинки дифференцируются в третичные ворсинки, содержащие плацентарные кровеносные сосуды. К третьей неделе беременности третичные ворсинки окружаются двойными слоями трофобласта: синцитиотрофобластом, который отвечает на эндокринную функцию во время беременности и слоем цитотрофобласта, за счет которого сохраняется митотическая активность. Таким

образом, к концу 4 недели завершается формирование основной структуры плаценты (Рисунок 1) [James J.L. et al., 2012].

Плацента – временный гемохориальный орган, который существует только во время беременности и оказывает влияние на здоровье матери и ребенка на протяжении всей беременности [Barker D. J. P. et al., 2013]. Основная функция плаценты заключается в обеспечении питания эмбриона, выработке и секреции эндокринных гормонов и стимулировании роста. Хорионическая и базальная пластинки плаценты представляют собой две поверхности. Хорионическая пластинка находится на плодной стороне, где находится эмбрион, а базальная пластинка является поверхностью, обращенной к материнской стороне. Полость, заполненная кровью, между обеими пластинками представляет собой межворсинчатое пространство, в котором располагаются ворсины хориона. Ворсинки хориона имеют разнообразный клеточный состав, кроме цитотрофобласта и синцитиотрофобласта, они также включают клетки фибробластов, мезенхимальные клетки, эндотелиальные клетки и клетки Хофбауэра [Burton G.J. et al., 2015; Pollheimer J. et al., 2018].

Динамика метилирования ДНК в эмбриональных и внеэмбриональных тканях регулируется экспрессией ДНК-метилтрансфераз (DNMT3A, DNMT3B и кофактора DNMT3L) [Laird P.W. et al., 2003]. Глобально трофобласт гипометилирован и уровень его метилирования составляет примерно 40–50% от всех CpG-островков, в то время как уровень метилирования эпибласта равен 80%. Уровни метилирования в плаценте человека увеличиваются во время беременности, что указывает на постепенную потерю клеточной пластичности. Другой характеристикой эпигенома трофобласта являются промежуточно метилированные домены, охватывающие гены, чья экспрессия была подавлена с помощью модификации гистонов [Hemberger M. et al., 2020]. Уровень 5-гидроксиметилцитозина также ниже в трофобласте по сравнению с эпибластом. Экспрессия Tet1 и Tet2 подавляется по мере дифференцировки стволовых клеток трофобласта мыши. Более того, удаление Tet1 *in vivo* влияет на метаболические гены в трофобласте. TET1 локализован в предполагаемых энхансерных областях,

особенно в клетках трофобласта мышши, и может иметь некаталитическую функцию, регулирующую экспрессию генов [Khoueiry R. et al., 2017].

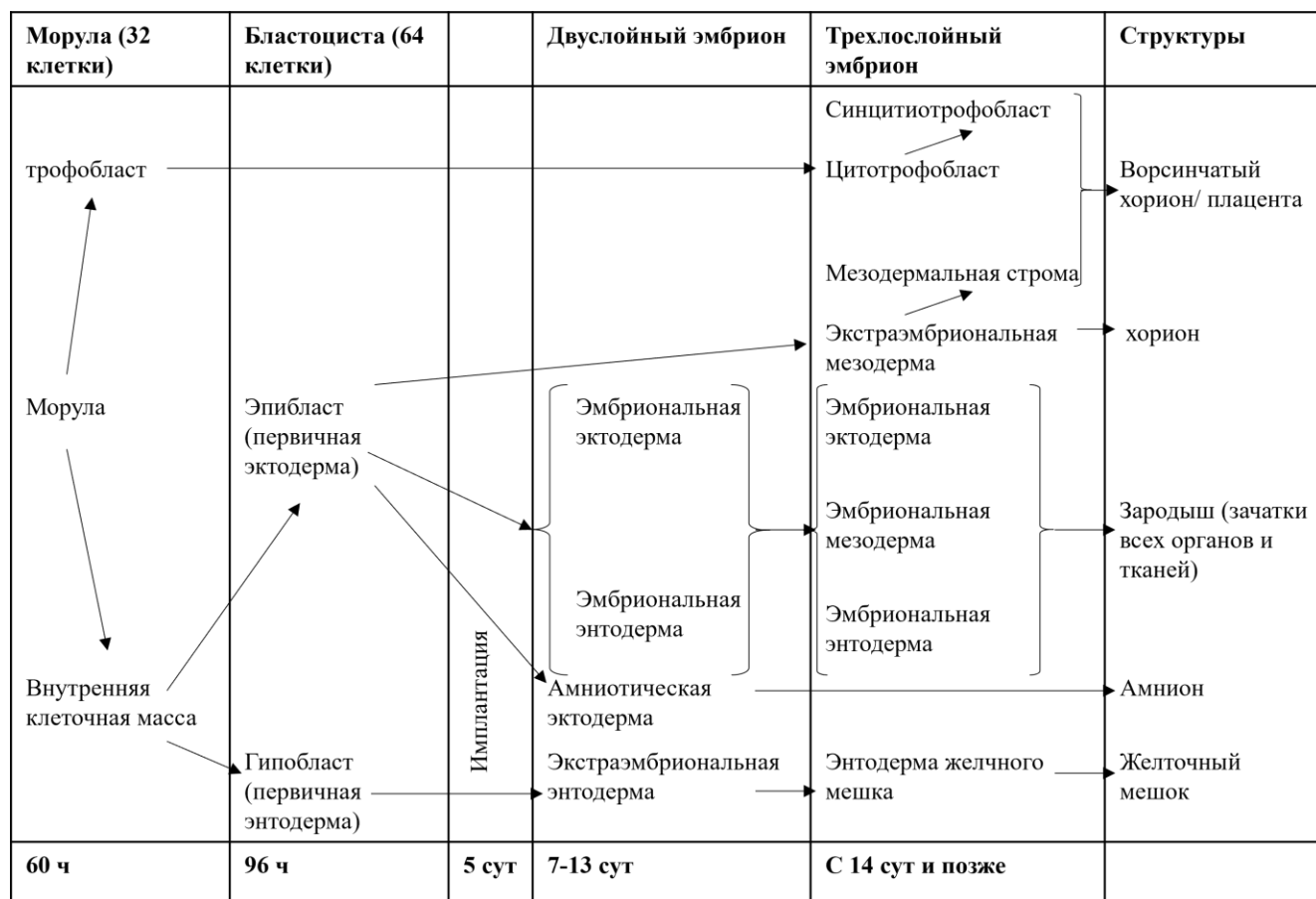


Рисунок 1. Схема развития и дифференцировки эмбриона человека на ранних стадиях развития [Баранов В.С. и др., 2017]

Таким образом, после имплантации эмбриональные клетки приобретают тканеспецифическое метилирование ДНК, глобальный уровень метилирования генома увеличивается, а в экстраэмбриональных тканях уровень метилирования ДНК остается низким [Robinson et al., 2015]. Это совпадает с высоким уровнем анеуплоидии, наблюдаемым в клетках трофобласта [Weier et al., 2005]. Так, при трисомии по 16 хромосоме было обнаружено гиперметилирование множества CpG-сайтов в цитотрофобласте ворсин хориона при самопроизвольных абортах в первом триместре. Выявленные гиперметилированные сайты были ответственны за дифференцировку клеток, клеточную адгезию и иммунный ответ [Tolmacheva E.N. et al., 2013]. В клетках ворсин хориона обнаружено 90 гиперметилированных

генов, кодирующих преимущественно секретируемые факторы, отвечающие за взаимодействие эмбриона с матерью. Кроме того, было показано снижение уровня экспрессии ключевого фактора транскрипции в клетках трофобласта GATA3 в клетках спонтанных абортусов с трисомией 16 [Tolmacheva E.N. et al., 2022]. Более того, профиль метилирования ДНК плаценты с трисомией по 16 хромосоме в первом триместре беременности перекрывается с профилем метилирования ДНК плаценты в третьем триместре беременности при раннем начале преэклампсии [Blair J.D. et al., 2014]. Вполне вероятно, что аномальное развитие хориона может иметь решающее значение на этой стадии развития.

Хотя основной механизм патогенеза привычного невынашивания беременности неизвестен, есть предположения о том, что определенную роль в нем могут играть эпигенетические механизмы [Hoche et al., 2018]. В частности, в одном из недавних исследований было выявлено, что гипометилирование гена *CREB5* усиливает его экспрессию и вызывает миграцию клеток и апоптоз в клетках трофобласта человека, вызывая их дисфункцию, что может способствовать повторной потере беременности [Mingming et al., 2018]. Проводились исследования уровня метилирования ДНК в децидуальных оболочках и стромальных клетках эндометрия [Maekawa et al., 2019; Li S. et al., 2020; Lucas et al., 2017], в которых было показано, что гипометилирование промоторных областей и областей дифференциальной модификации гистонов может приводить к нарушениям дифференцировки эндометрия или аномальной экспрессии эмбриональных белков, что в конечном итоге может быть связано с привычным невынашиванием беременности.

1.3 Мобильные элементы генома и их роль в онтогенезе

Мобильные элементы (МЭ) представляют собой повторяющиеся последовательности ДНК, которые могут перемещаться внутри генома из одной локализации в другую. Из-за особенностей своего строения мобильные элементы сравнивали с эволюционными геномными окаменелостями некогда активных генетических компонентов, которые сохранились в геноме без определенных

функций и были помечены как «мусорная ДНК» [Orgel L.E. et al., 1980]. Это убеждение подверглось переоценке, когда в 1988 году была идентифицирована первая генетическая мутация, связанная с развитием гемофилии А и возникшая вследствие встройки ретротранспозона LINE-1 [Kazazian Jr H. H. et al., 2004].

Считается, что мобильные элементы напрямую формируют геномы. На сегодняшний день МЭ составляют значительную часть всех геномов эукариот, в которых они влияют на экспрессию генов, обеспечивая их регуляторные функции за счет энхансеров и промоторов [Colonna Romano N. et al., 2022]. Мобильные элементы могут модифицировать экспрессию генов и воздействовать на регуляторные сети посредством их встраивания в функционирующие гены [Payer L.M. et al., 2019]. После интеграции в геном хозяина, мобильные элементы реплицируются в нем и подвергаются естественному отбору. Тем не менее, большинство новых вставок МЭ не являются вредными и закрепляются в геноме. Таким образом, они могут сохраняться в популяции как полиморфизмы, а генетический дрейф может привести к их фиксации. Отбор МЭ, выполняющих новые функции в геноме хозяина, приводит к эволюции белок-кодирующих генов, генов некодирующих РНК и цис-регуляторных элементов в процессе, называемом кооптацией [Colonna Romano N. et al., 2022].

С одной стороны, существуют данные, что мобильные элементы могут являться причиной различных заболеваний, с другой стороны, они также являются источником многочисленных и ценных регуляторных последовательностей, рекрутируемых путем «молекулярного одомашнивания» [Capy P. et al., 2021; Zhang Y. et al., 2019].

Мобильные элементы также могут влиять на эпигенетический ландшафт. Новые вставки могут вызывать локальные изменения метилирования ДНК или модификации гистонов, что в конечном итоге влияет на экспрессию генов [Choi K. et al., 2019; Guio L. et al., 2018; Quadrana L. et al., 2016]. Данные эпигенетических исследований показывают, что некоторые семейства мобильных элементов вносят свой вклад в эволюцию тканеспецифических регуляторных сетей генов, участвующих в таких процессах, как раннее развитие [Macfarlan T.S. et al., 2012; Mao J. et al., 2021; Reilly M.T. et al., 2013; Todd C.D. et al., 2019],

органогенез [Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К., 2020; Ferrari R. et al., 2021; Valdebenito-Maturana B. et al., 2021], плацентация [Chuong E.B. et al., 2013] и нормально протекающая беременность [Lynch T.J. et al., 2011].

1.3.1 Классификация различных типов мобильных элементов

Мобильные элементы представляют собой повторяющиеся элементы ДНК, которые занимают примерно 47% генома человека [Fueyo R. et al., 2022; Nurk S. et al., 2022]. Основываясь на механизме транспозиции, МЭ можно классифицировать как ДНК-транспозоны (3% генома человека), которые перемещаются по механизму «вырезать и вставить» [Munoz-Lopez M. et al., 2010], или как ретротранспозоны, которые применяют механизм копирования и вставки, используя свою РНК в качестве промежуточного звена [Luan D.D. et al., 1993]. Достигая охвата почти 44% генома человека, ретротранспозоны составляют большинство мобильных элементов [Fueyo R. et al., 2022] и дополнительно классифицируются на LTR (длинные терминальные повторы) и не-LTR [Wells J.N. et al., 2020]. Подклассы LTR и не-LTR далее подразделяются на различные суперсемейства, семейства и подсемейства на основе филогенетического происхождения и гомологических последовательностей [Bourque G. et al., 2018; Piegu B. et al., 2015].

У человека LTR ретротранспозоны представлены эндогенными ретровирусами человека (HERV), распространенными в классах I, II и III, и MaLR. HERV покрывают ~8% генома человека [Pisano M.P. et al., 2021], представляют собой элементы длиной около 9,5 т.п.н. и происходят от экзогенных ретровирусов [Gifford R.J. et al., 2018; Jansz N. et al., 2021].

К ретротранспозонам, не входящим в группу LTR, относятся длинные элементы LINE (~17% генома человека), короткие элементы SINE (~13% генома человека) и SINE-R/VNTR/Alu (~0,15% генома человека) [Bourque G. et al., 2018; Fueyo R. et al., 2022; Marasca F. et al., 2020]. LINE включают LINE-1, LINE-2 и LINE-3. LINE-1 имеют длину ~6 т.п.н. и являются единственными элементами, все еще способными к ретротранспозиции у людей [Beck C.R. et al., 2011; Lander E.S. et

al., 2001]. SINE у людей преимущественно представлены Alu – последовательностями длиной ~300 п.н. [Ade C. et al., 2013]. Число элементов LINE-1 и Alu варьируется от 500 000 до более чем 1 миллиона копий, делая их наиболее многочисленными надсемействами [Deininger P. et al., 2011; Lander E.S. et al., 2001]. SVA представляет собой наиболее эволюционно молодое семейство активных неавтономных ретротранспозонов, элементы которых специфичны для гоминид, имеют длину ~2 т.п.н. и присутствуют менее чем в 3000 копиях [Hara T. et al., 2012; Wang H. et al., 2005].

1.3.2 Вклад мобильных элементов в активацию зародышевого генома и развитие плаценты

На мышинной модели *in vitro* было показано, что в стволовых клетках трофобласта мыши 10% предполагаемых энхансеров видоспецифичны. Восемьдесят процентов среди данных видоспецифичных энхансеров происходят из видоспецифичных мобильных элементов, особенно LTR [Chuong E.B. et al., 2013]. Эти предполагаемые энхансеры, полученные из LTR, неактивны в эмбриональных стволовых клетках мыши и тканях взрослого организма, и менее активны в дифференцированных *in vitro* гигантских клетках трофобласта [Nelson A.C. et al., 2017]. Следовательно, активность данных LTR тканеспецифична на разных стадиях развития. В плаценте человека предполагаемые энхансеры были обогащены человеческими эндогенными ретровирусами (ERV) в большей степени, чем в других тканях. Предполагаемые энхансеры, полученные из ERV, в плаценте человека также наименее консервативны по сравнению с предполагаемыми энхансерами в 13 других тканей человека [Sun M. et al., 2020]. Таким образом, известный высокий уровень морфологической изменчивости в развитии плаценты у млекопитающих может быть результатом видоспецифичной колонизации эндогенными ретровирусами и их активности [Furukawa S. et al., 2014; Haig D. et al., 2012].

С эволюционной точки зрения мобильные элементы развиваются, чтобы экспрессироваться в раннем развитии эмбриона, таким образом, максимизируя

размножение в клетках зародышевой линии [Haig D. et al., 2016]. Кроме того, активное и пассивное деметилирование ДНК вскоре после оплодотворения и во время развития зародышевой линии может обеспечивать экспрессию мобильных элементов [Smith Z.D et al., 2017]. Так, репрессия мобильных элементов, таких как внутрицистернальные частицы А-типа, после имплантации зависит от 5mC, хотя причинно-следственная связь между экспрессией МЭ и деметилированием ДНК до имплантации на сегодняшний день формально не установлена [Senft A.D. et al., 2021].

Метилирование ДНК стабильно подавляет мобильные элементы после имплантации [Jonsson M.E. et al., 2019; Smith Z.D et al. 2013]. Молчание мобильных элементов обеспечивается специфичностью KRAB-ZFP. Их можно сравнить с антителами, которые генерируют специфичность к антигенам посредством рекомбинации и мутации. Повторяющиеся массивы цинковых пальцев KRAB-ZFP часто рекомбинируют и приобретают мутации в экзонах, кодирующих домены связывания с ДНК [Liu H. et al., 2014; Quenneville S. et al., 2014; Wolf G. et al., 2020]. Мобильные элементы должны постоянно эволюционировать, чтобы избежать инактивации. Эти изменения вместе с новой колонизацией мобильных элементов, приводят к необходимости KRAB-ZFP эволюционировать в ответ [Bruno M. et al., 2019; Cosby R.L. et al., 2019]. Данный процесс может объяснить, почему огромное количество KRAB-ZFP являются видоспецифичными [Bruno M. et al., 2019; Cosby R.L. et al., 2019].

1.4 Ретротранспозон LINE-1

1.4.1 Структура и организация ретротранспозона LINE-1

Полная длина элемента LINE-1 равна 6 т.п.н. Представители данного семейства включают в себя 5'-нетранслируемую область (5'-UTR), содержащую внутренний промотор, две открытые рамки считывания (ORF1 и ORF2), 3'-нетранслируемую область (3'-UTR) и сигнал полиаденилирования AATAAA, за которым следует поли-А хвост [Denli A.M. et al., 2015]. Эти элементы имеют сильные внутренние промоторы и способны к ретротранспозиции и интеграции в новые участки генома.

LINE-1 транскрибируются РНК-полимеразой II. Ранее ретротранспозоны не рассматривали в качестве нужной части генома, а из-за своей способности к рекомбинации и индукции инсерционного мутагенеза, в некоторых случаях их считали даже вредными паразитическими элементами, способными вызывать наследственные заболевания у человека [Mukherjee et al., 2004]. Но в последние годы появились исследования, в которых рассматривается непосредственное участие LINE-1 в таких фундаментальных физиологических процессах, как ранний эмбриогенез, дифференцировка и развитие [Jachowicz J. W. et al., 2015].

1.4.2 Ретротранспозиция и регуляция работы LINE-1

Гипометилирование генома приводит к транскрипционной активации полноразмерных копий LINE-1, которые кодируют два белка. Белок ORF2p обладает ДНК-эндонуклеазной и обратной транскриптазной активностью, а РНК-связывающий белок ORF1 важен для ретротранспозиции, хотя его точная роль пока неясна [Mita et al., 2018]. Существуют также полноразмерные LINE-1 без интактных ORF. Такие элементы могут предоставлять свои промоторы в качестве альтернативных для многих близлежащих генов [Pereira et al., 2018]. LINE-1 содержит смысловой промотор, который управляет транскрипцией двух белков, необходимых для ретротранспозиции, и антисмысловой промотор. Антисмысловой промотор LINE-1 может управлять транскрипцией химерных транскриптов – 5'-антисмысловых последовательностей LINE-1, сплайсированных с экзонами соседних генов. Было показано, что антисмысловые транскрипты затрагивают до 4% всех генов человека, а антисмысловые промоторы LINE-1 активно транскрибируются в различных типах клеток человека, в том числе и в эмбриональных тканях [Criscione S. W. et al., 2016]. Можно предположить, что изменения в паттернах метилирования ДНК LINE-1 во время эмбриогенеза напрямую влияют на гены, участвующие в нормальном развитии экстраэмбриональных тканей и экспрессирующиеся с альтернативных промоторов LINE-1. Поэтому важной частью анализа метилирования ретротранспозона LINE-1 в этиологии ранних репродуктивных потерь является оценка нарушения

экспрессии ключевых генов, использующих альтернативные промоторы LINE-1, в экстраэмбриональных тканях эмбрионов с различным уровнем метилирования LINE-1. Такая проверка может быть проведена как на уровне РНК с оценкой уровня экспрессии гена с различных промоторов, так и на уровне белка с оценкой изменения количества белков в тканях при различном уровне метилирования ретротранспозона LINE-1.

1.4.3 Вклад LINE-1 и других мобильных элементов в развитие заболеваний

На сегодняшний день существует обширное количество исследований, в которых было продемонстрировано, что LINE-1 вносит свой вклад в такие заболевания, как гемофилия, боковой амиотрофический склероз, мышечная дистрофия Дюшенна, муковисцидоз, синдром Аперта и различные виды рака [Belancio T.P. et al., 2009; Cordaux R., Batzer M.A., 2009; Chen J.M. et al., 2005; Li W. et al., 2012].

Первое сообщение о вставке LINE-1 и его роли в развитии заболевания датируется 1988 годом, когда обследовали пациента с гемофилией А, у которого не было семейного анамнеза заболевания. При исследовании была обнаружена новая экзонная вставка LINE-1 в 14 экзоне гена *F8*, ассоциированного с гемофилией А, нарушения VIII фактора свёртывания крови, X-сцепленного типа наследования.

Вставка LINE-1 может быть мутагенной не только за счет нарушения кодирующей последовательности, но и вследствие влияния на экспрессию близлежащих генов, создания новых сайтов сплайсинга, использования промоторов, сигналов аденилирования и сайтов связывания факторов транскрипции, которые могут реорганизовать экспрессию генов. LINE-1 могут также способствовать генетической нестабильности, генерируя делеции сайта-мишени, рекомбинацию с другими ретротранспозонами и возможное образование хромосомных инверсий и межхромосомных транслокаций [Beck C.R. et al., 2011; Goodier J. L., Kazazian H. H., 2008; Hancks D. C., Kazazian Jr H. H., 2012; Kazazian Jr H. H. et al., 2004].

В одном из случаев развития колоректального рака, вставка LINE-1 приводила к

нарушению работы гена-супрессора аденоматозного полипоза толстой кишки в клетках опухоли. Однако в тканях, окружающих опухоль, данная вставка отсутствовала. Это свидетельствует о том, что LINE-1 является важным фактором соматического мутагенеза. При этом вероятность фенотипического проявления зависит от сайта встраивания в конкретной клетке [Miki Y. et al., 1992].

Аберрантная мобилизация LINE-1 также связана с нейродегенеративными заболеваниями, например, болезнями Альцгеймера и Паркинсона, боковым амиотрофическим склерозом, и психическими расстройствами, такими как шизофрения, биполярное расстройство, аутизм и синдром дефицита внимания и гиперактивности [Blaudin de Thé F. X. et al., 2018; Doyle G.A., 2017; Guffanti G., 2014; Jonsson M. E. et al., 2020; Li W. et al., 2012; Li S. et al., 2018; Ravel-Godreuil C. et al., 2021]. У пациентов, страдающих синдромом Ретта и атаксией-телеангиэктазией, обнаруживали измененное число копий LINE-1 в головном мозге, что, возможно, влияет на формирование нейродегенеративного фенотипа и патофизиологию головного мозга [Coufal N.G. et al., 2011; Zhao B. et al., 2019], в то время как у пациентов с шизофренией были отмечены изменения в экспрессии LINE-1 в головном мозге [Bundo M. et al., 2014]. Более того, нарушение регуляции экспрессии LINE-1 связано с ассоциированным со старением воспалительным фенотипом. Конденсация гетерохроматина подавляет активность LINE-1, но с возрастом она теряется, что приводит к дерепрессии мобильных элементов. В стареющих клетках экспрессия ядерной РНК LINE-1 была зафиксирована на ранней стадии, что приводило к подавлению активности гистон-лизин-*N*-метилтрансферазы SUV39H1, потере гетерохроматина и соответственно преждевременному клеточному старению. Подавление РНК LINE-1 с использованием антисмысловых олигонуклеотидов восстанавливало эпигенетические метки гетерохроматина и снижало экспрессию генов, связанных со старением, в клетках человека и в мышинных моделях синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда, что приводило к увеличению продолжительности жизни. Эти данные позволяют предположить, что экспрессия LINE-1 может является терапевтической мишенью для лечения синдромов преждевременного старения [Della Valle F. et al., 2022].

Ретротранспозиции LINE-1 могут вызывать нестабильность генома, запуская циклы разрыв-слияние-мост. Данная форма генетической нестабильности начинается со соприкосновения концов разорванных сестринских хроматид и приводит к появлению дицентрической хромосомы, которая образует анафазный мост во время митоза. Считается, что обычно слияние хромосом конец в конец возникает из-за укорочения теломер [Artandi S. E. et al., 2000; Maciejowski J., de Lange T. et al., 2017; O'Hagan R.C. et al., 2002]. Однако было показано, что соматическая ретротранспозиция может индуцировать первую инверсию, которая приводит к слиянию сестринских хроматид. При секвенировании генома доброкачественной опухоли легких была обнаружена вставка LINE-1 в длинное плечо хромосомы 14. Анализ данных секвенирования в точках разрыва выявил два несогласованных кластера прочтений с одинаковой ориентацией, которые находятся на расстоянии 5,5 т.п.н. друг от друга и свидетельствуют в пользу вставки LINE-1. Единственной геномной структурой, которая может объяснить данный механизм, является обратная инверсия, при которой две сестринские хроматиды соединены мостиком ретротранспозиции LINE-1 в ориентации «голова к голове» [Rodriguez-Martin B. et al., 2020].

В другой работе была выявлена связь между ретротранспозицией LINE-1, повреждением ДНК и онкоген-индуцированной блокадой дифференцировки, необходимой для лейкомогенеза. Потеря белка MPP8, который кодируется геном *MPHOSPH8*, ингибирует развитие острого миелоидного лейкоза путем реактивации LINE-1, вызывая ответ на повреждение ДНК и выход из клеточного цикла. Экспрессия онкогенных мутаций при остром миелоидном лейкозе способствует подавлению LINE-1, что связано с неблагоприятным прогнозом течения заболевания [Gu Z. et al., 2021]. Кроме того, прямая или обратная транскрипция мРНК LINE-1 может индуцировать интерфероновый ответ первого типа, что приводит к активации интерферона- α/β (IFN- α/β) [De Cesso M. et al., 2019; Simon M. et al., 2019]. Вероятно, что активация LINE-1 может модулировать иммунный ответ или иммунную регуляцию, тогда как подавление активности ретротранспозона может быть выгодным для клеток, инициирующих лейкемию во время старения или клональной эволюции миелоидных злокачественных

новообразований [Bowman R.L. et al., 2018; De Cecco M. et al., 2019; Jaiswal S., Ebert B. L. et al., 2019].

1.4.4 Роль LINE-1 в гаметогенезе и эмбриогенезе

В соматических клетках элементы LINE-1 преимущественно гиперметилированы, однако в половых клетках степень их метилирования может отличаться. Также экспрессия LINE-1 и ее регуляция различны в мужских и женских половых клетках. В период эпигенетического репрограммирования генома в мужских первичных половых клетках, когда геном практически деметилирован, транскрипцию LINE-1 контролируют piРНК (Piwi-interacting РНК). В женских половых клетках, во время оогенеза, piРНК вероятнее всего не участвуют в контроле экспрессии ретротранспозонов. В этом случае роль контролирующих элементов могут играть другие малые РНК – микроРНК и малые интерферирующие РНК [Jachowicz J. W. et al., 2015]. В зрелых половых клетках регуляция экспрессии LINE-1 за счет метилирования ДНК также различна. В зрелых сперматозоидах LINE-1 гиперметилирован, в то время как в ооцитах I порядка он гипометилирован на стадии диплотены, а ооциты II порядка на стадии овуляции имеют средний индекс метилирования промотора LINE-1 [Smith Z.D. et al., 2012]. Известно, что уровень метилирования генома в половых и соматических клетках также зависит от возраста родителей. С возрастом матери связано гипометилирование некоторых генов в пуповинной крови новорожденных [Adkins et al., 2011; Markunas et al., 2016]. Что касается отцовского возраста, уровень метилирования LINE-1 в сперматозоидах повышается с возрастом мужчины [Jenkins T.G. et al., 2014]. При этом уровень метилирования некоторых областей генома в плаценте может сохраняться неизменным относительно половых клеток [Sanchez-Delgado M. et al., 2016].

Вторая волна глобального деметилирования генома наблюдается в раннем эмбриогенезе, начиная с момента образования зиготы. С момента оплодотворения статус метилирования меняется на каждом этапе деления зигота [Yeoung-Gyu et al., 2005]. До стадии бластоцисты он постепенно снижается, а затем происходит метилирование *de novo* [Smith Z.D et al., 2012]. Далее в клетках самого эмбриона

LINE-1 гиперметируется, а в цитотрофобласте и в некоторых производных эпибласта, которые далее будут относиться к плацентарным тканям, остается менее метилированным [Chow J. C. et al., 2010]. Снижение индекса метилирования LINE-1 происходит преимущественно пассивным путем и достигает своего минимума к стадии бластоцисты [Smith Z.D et al., 2012]. Таким образом транскрипционная активность ретротранспозона на стадии дробления должна неуклонно расти. Регуляция экспрессии LINE-1 в этот период, вероятно, обеспечивается малыми некодирующими РНК через механизм РНК-интерференции [Fadloun A. et al., 2006].

При исследовании влияния регуляции экспрессии LINE-1 на нормальное протекание эмбриогенеза было установлено, что активация LINE-1 после оплодотворения регулирует глобальную доступность хроматина, а искусственное подавление транскрипции ретротранспозона у эмбрионов мышей препятствует их развитию [Jachowicz J. W. et al., 2017]. В других работах тоже было показано, что изменение экспрессии LINE-1 в эмбрионах мышей играет важную роль в эмбриональном развитии [Percharde et al., 2018; Honson et al., 2018].

Активация экспрессии LINE-1 в раннем эмбриогенезе, вероятно, является необходимой для осуществления успешного дробления и дальнейшей дифференцировки клеток. Во-первых, благодаря способности к ретротранспозиции, LINE-1 может выступать в качестве сильных «альтернативных» промоторов генов, обеспечивая им стабильную экспрессию на стадии дробления [Li J. et al., 2014]. В подтверждение этого имеется ряд исследований [Beraldi R. et al., 2006; Kigami D. et al., 2003], согласно которым подавление активности одного из семейств LINE-1 в зиготе и бластоцисте сопровождалось снижением экспрессии генов-регуляторов клеточных делений, в том числе и гена *TP53*, но повышением экспрессии других генов, таких как *HSP70.1* и *CCND1*, и приводило к нарушению первых делений эмбриона. В других исследованиях [Mangiacasale et al., 2003] подавление активности обратных транскриптаз химическими агентами в мышинных клетках и трансформированных культурах клеток человека приводило к снижению активности ретротранспозонов и нарушению клеточного деления.

Во-вторых, LINE-1 участвует в образовании как открытой, так и закрытой конфигураций хроматина, тем самым регулируя экспрессию эмбриональных генов. Тотальное деметилирование генома сопровождается образованием эухроматина, что способствует эпигенетическому перепрограммированию и активации эмбрионального генома [Hall L.L. et al., 2014]. Так, например, при дифференцировке зародышевых стволовых клеток в процессе инактивации X-хромосомы LINE-1 совместно с РНК Xist обеспечивает образование гетерохроматиновых участков. На инактивированной X-хромосоме некоторые регионы избегают ингибирующего покрытия Xist, но покрываются РНК транскриптами L1 и поэтому также инактивируются [Chow J. C. et al., 2010]. X-хромосома у мышей, крыс и человека богата копиями LINE-1, причем эволюционно молодыми и активными. Но в районах, содержащих гены, избегающие инактивации, их доля существенно снижена [Abrusan G. et al., 2008]. В добавление ко всему стоит отметить взаимосвязь экспрессии LINE-1 с активностью теломеразы посредством активации транскрипционных факторов c-Myc и KLF-4. Несмотря на то, что связь была показана в опухолевых клетках [Muelle C. et al., 2018], в клетках зародышевых тканей это может иметь значение в поддержании плюрипотентности бластомеров.

На протяжении всей беременности уровень метилирования ретротранспозонов в плаценте не всегда совпадает с глобальным уровнем метилирования генома. В одном из исследований наблюдалось значительное снижение уровня метилирования LINE-1 в третьем триместре плаценты по сравнению с первым. При этом между первым и третьим триместрами не было обнаружено изменения глобального метилирования ДНК [He et al., 2014]. Таким образом, существует временная регуляция метилирования и активации LINE-1 во время нормального развития плаценты. Однако необходимо более детально изучить, может ли aberrантное метилирование LINE-1 усугубляться в зависимости от гестационного возраста спонтанных абортусов в первом триместре беременности.

Таким образом, на данный момент хорошо изучена структура ретротранспозона, известен механизм его работы и пути регуляции, но функции изучены недостаточно. Эпигенетический путь контроля экспрессии и ретротранспозиции

LINE-1 путем метилирования ДНК является главным. Профиль метилирования зависит от волн тотального эпигенетического перепрограммирования в раннем эмбриогенезе и гаметогенезе. Роль LINE-1 в эти периоды изучена недостаточно, но его высокая активность на фоне сниженного уровня метилирования, вероятно, необходима для активации эмбрионального генома и сохранения тотипотентности клеток, что суммарно дает возможность формировать новый организм. Поэтому нарушение экспрессии LINE-1 в эти периоды может повлиять на жизнеспособность эмбриона. По мере созревания эмбриона уровень метилирования быстро растет, однако во внезародышевых тканях остается невысоким и объяснить это явление пока сложно.

Наличие лишней или потерянной хромосомы в клетке также оказывает влияние на профиль метилирования ДНК. Это связано с эпигенетической компенсацией дозы генов за счет увеличения уровня метилирования ДНК в промоторах этих генов в ответ на анеуплоидию [Herrera et al., 2008; Veronese et al., 2020]. Однако наличие лишней хромосомы может влиять и на уровень метилирования всего генома вследствие нарушения дозы генов, задействованных в самом механизме осуществления метилирования различных последовательностей генома. Действительно, в предварительном исследовании было установлено, что в плацентарных тканях с мозаичной формой анеуплоидии повышается уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 [Васильев С.А. и др., 2015]. Такой механизм может объяснить то, что анеуплоидия по разным хромосомам приводит к гибели эмбриона в один и тот же критичный период развития (на 8-12 неделях), когда происходит ремоделирование спиральных артерий матки, во многом зависящее от экспрессии генов с ретровирусных промоторов.

Кроме того, имеется несколько предпосылок, свидетельствующих о наличии в плаценте благоприятного фона для работы генов с ретровирусными регуляторными элементами: отцовский контроль за гипометилированным эпигенетическим ландшафтом, ключевая роль в развитии плаценты генов с ретровирусным происхождением или регуляторными элементами, полученными от ретровирусов и ретротранспозонов. Несмотря на известное влияние глобального уровня метилирования генома на протекание ранних этапов зародышевого

развития, вклад нарушений уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в структуру генетических причин эмбриональной гибели пока недооценен и требует дальнейшего изучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Настоящее исследование направлено на проверку основной гипотезы о влиянии аберрантного метилирования ретротранспозона LINE-1 на эмбриональную гибель плода в первом триместре беременности. Вопрос о наличии данного влияния исследовался в трофобласте хориона спонтанных абортусов в первом триместре беременности.

Для решения первых пяти задач была сформирована выборка, включающая 416 образцов хориона спонтанных абортусов первого триместра беременности с нормальным кариотипом, с трисомией по 16 хромосоме и с моносомией по X-хромосоме. Для подтверждения результатов стандартного кариотипирования и оценки уровня анеуплоидии по хромосомам 16 и X в трофобласте хориона был проведен FISH анализ 148 абортусов. После проверки кариотипа для дальнейшего анализа было оставлено 332 образца с подтвержденным кариотипом (с нормальным кариотипом, $n = 178$, трисомия 16, $n = 62$ и моносомия X, $n = 46$, а также медицинские абортусы в качестве группы сравнения $n = 46$). Для всех образцов было получено информированное согласие родителей на использование биоматериала для исследовательских целей. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (09.11.2020/№ 7).

Для анализа индекса метилирования LINE-1 был разработан метод таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования 19 CpG-сайтов в промоторе LINE-1. С помощью разработанного метода был проведен анализ индекса метилирования LINE-1 в хорионе спонтанных абортусов первого триместра беременности с нормальным кариотипом ($n = 178$) и наиболее частыми анеуплоидиями в первом триместре беременности (трисомия 16, $n = 62$ и моносомия X, $n = 46$), а также медицинских абортусов в качестве группы сравнения ($n = 46$). С помощью анализа STR-маркеров в образцах ворсин хориона и лимфоцитов родителей был проведен анализ родительского происхождения анеуплоидии, информация о котором была использована для выделения подгрупп

в анализируемых выборках. В этих же группах был проведен анализ зависимости индекса метилирования LINE-1 от возраста родителей и анамнеза привычного невынашивания беременности в семье. Наконец, в тех же выборках был проведен анализ дифференциального метилирования различных подсемейств LINE-1. На части проанализированной выборки спонтанных абортусов, представляющей из себя 20 пар спонтанных абортусов из одних и тех же семей, была оценена степень корреляции индекса метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов. Наконец, на образцах части абортусов из сформированных выборок и лимфоцитах взрослых индивидов был проведен анализ связи экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB*, потенциально экспрессирующихся с альтернативного промотора LINE-1, с индексом метилирования LINE-1. Для этого была сформирована выборка из 21 образца экстраэмбриональных тканей и 10 образцов лимфоцитов взрослых индивидов.

Исследование выполнено с использованием ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика».

2.2 Структура и объем материала

В качестве материала для исследования были использованы образцы ворсин хориона 352 абортусов, полученных на территории Томской области с 1995 по 2022 г. Из них 306 образцов были получены из тканей спонтанных абортусов (СА), 46 – медицинских абортусов (МА). Для всех образцов был проведен стандартный цитогенетический анализ, помимо этого для 26 из них кариотипирование проведено с помощью сравнительной геномной гибридизации (comparative genomic hybridization – CGH), и для 4 – с помощью хромосомного микроматричного анализа (aCGH). Все образцы СА были разделены на следующие группы: 178 спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, 62 абортуса с трисомией по 16 хромосоме, 46 абортусов в моносомией по X-хромосоме (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристика групп абортусов для проведения анализа уровня метилирования ретротранспозона LINE-1

Группа		Количество	Срок гестации, нед.	Возраст матери, лет	Возраст отца, лет
Спонтанные абортусы	Нормальный кариотип	178	$7,6 \pm 1,9$	$29,4 \pm 5,5$	$32,4 \pm 6,7$
	Трисомия 16	62	$6,9 \pm 1,9$	$30,9 \pm 6,2$	$32,5 \pm 5,9$
	Моносомия X	46	$8,8 \pm 1,1$	$26,1 \pm 5,2$	$28,4 \pm 4,8$
Медицинские абортусы		46	$8,2 \pm 1,9$	$29,1 \pm 6,6$	$30,8 \pm 6,4$
Всего		332	$7,8 \pm 1,9$	$28,9 \pm 5,9$	$31,0 \pm 6,0$

Для анализа экспрессии генов были отобраны образцы ворсин хориона и экстраэмбриональной мезодермы медицинских абортусов, спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме, моносомией по X-хромосоме и нормальным кариотипом. Все образцы были получены в период с 2013 по 2022 год и до исследования хранились в жидком азоте (Таблица 2)

Таблица 2. Характеристика групп абортусов для анализа экспрессии генов

Группа		Количество	Срок гестации, нед.	Возраст матери, лет	Возраст отца, лет
Спонтанные абортусы	Нормальный кариотип	7	$7,2 \pm 1,4$	$29,4 \pm 5,9$	$31,4 \pm 6,4$
	Трисомия 16	8	$6,5 \pm 0,8$	$31,0 \pm 5,8$	$32,1 \pm 6,1$
	Моносомия X	6	$8,6 \pm 0,7$	$26,9 \pm 5,3$	$28,8 \pm 5,2$
Медицинские абортусы		10	$8,2 \pm 2,3$	$29,8 \pm 4,8$	$30,8 \pm 2,7$
Всего		31	$7,4 \pm 1,3$	$29,3 \pm 5,8$	$31,2 \pm 6,2$

2.3 Анализ индекса метилирования LINE-1 в ворсинах хориона

2.3.1 Выделение ДНК из ворсин хориона

Все образцы тканей хранились при температуре -80°C . Разделение тканей проводилось стерильными инструментами (обработанными 96% спиртом и прожжёнными в пламени спиртовки) в радиусе стерилизующего действия пламени спиртовой горелки. Выделение ДНК проводили согласно следующему протоколу: размораживали ткани плодного мешка из биобанка при комнатной температуре. Отбирали часть тканей и помещали их в чашку Петри с физиологическим раствором. В чашке Петри производили разделение тканей с помощью ножниц и пинцета: ворсины хориона «пушистые» и легко отделялись от плотной прозрачной мезодермы. Перемещали выделенные ворсины хориона в маркированную микроцентрифужную пробирку. Остатки тканей возвращали в биобанк. Инструменты проходили стерилизацию. В микроцентрифужную пробирку к хориону добавляли 475 мкл буфера для протеиназы К (на 100 мл: 2 мл 0,5М ЭДТА, 1 мл 1М трис-НСl (рН 7,4), 200 мкл 5М NaCl, dH₂O до 100 мл), 50 мкл 10% SDS, 7,5 мкл протеиназы К (10 мг/мл) (хранили при -20°C). Перемешивали и инкубировали ночь при 37°C . При достижении гомогенизации раствора дальнейшую работу проводили под вытяжкой. К каждому образцу добавляли равный объем смеси фенол-хлороформ (1:1). Перемешивали на вортексе 10 мин. Центрифугировали 10 мин при 12 тыс. об./мин. Водную фазу отбирали наконечником в новую маркированную микроцентрифужную пробирку. Добавляли равный объем смеси хлороформ-изоамилового спирта (24:1). Перемешивали 10 минут. Центрифугировали 10 мин при 12 тыс. об./мин. Водную фазу снова отбирали в новую микроцентрифужную пробирку. Далее добавляли 15 мкл 3М ацетата натрия и 2–2,5 объема 96% охлажденного этанола. ДНК накручивали саму на себя до визуализации нити ДНК. Центрифугировали при 4°C 20 мин при 12 тыс. об./мин. Сливали спирт. Добавляли 200 мкл 70% этанола комнатной температуры. Хорошо перемешивали. Центрифугировали при 12 тыс. об./мин 10 мин. Спирт сливали, последнюю каплю снимали фильтровальной

бумагой. ДНК сушили в открытом виде в концентраторе 5 мин при 45°C. Добавляли 50–150 мкл буфера TE в зависимости от размера осадка. Оставляли на ночь растворяться в термостате при температуре 37°C.

Выделенные образцы хранили при 4°C. Концентрации ДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND–8000 (Thermo, США) при длине волны 260 нм.

2.3.2 Бисульфитная модификация ДНК

Бисульфитная модификация ДНК проводилась с использованием набора EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, США), согласно протоколу производителя: 1 мкг ДНК разводили до 20 мкл деионизированной водой. Добавляли 130 мкл CT Conversion Reagent и инкубировали 8 мин при 98°C и далее 3,5 часа при 64°C. Модифицированную ДНК объемом 150 мкл переносили в колонки и добавляли 600 мкл M-Binding Buffer. Центрифугировали 30 с на максимальной скорости (13000 об./мин). Осадок сливали. В колонку добавляли 100 мкл M-Wash Buffer, центрифугировали при аналогичных условиях. Добавляли 200 мкл M-Desulphonation Buffer в колонку и инкубировали 15 – 20 мин при комнатной температуре. Центрифугировали 30 с на максимальной скорости. Дважды добавляли 200 мкл M-Wash Buffer, центрифугировали 30 с на максимальной скорости. Колонку переносили в новую маркированную микроцентрифужную пробирку, добавляли 20 мкл M-Elution Buffer и центрифугировали 30 с на максимальной скорости. Для увеличения выхода объема ДНК добавляли еще 30 мкл M-Elution Buffer, центрифугировали 30 с при максимальной скорости. Полученную ДНК хранили при -20°C. В ходе бисульфитной конверсии неметилированный цитозин превращается в урацил, который при дальнейшей ПЦР считывается как тимин, а метилированный цитозин не подвергается какой-либо модификации.

2.3.3 Полимеразная цепная реакция

Наработку ПЦР-продукта для последующего проведения массового параллельного секвенирования производили в два этапа. Первая ПЦР заключалась в наработке большого количества продукта, с использованием праймеров, содержащих последовательности адаптеров и охватывающих 19 CpG-сайтов промотора LINE-1 (Рисунок 2).

Последовательность праймеров:

прямой праймер (LF1): 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACA GTATTAGGGAGTGTAGATAGTGGG-3',

обратный праймер (LR1): 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGAC AGCCTCTAAACCAATATAAAATATAATCTC-3'.

Амплификация продукта проводилась по модифицированному протоколу для анализа 16S рРНК (Illumina, США) с помощью набора BioMaster HS-Taq PCR mix (Биолабмикс, Россия). Протокол проведения первой ПЦР представлен в таблице 3.

Таблица 3. Протокол проведения первой ПЦР для амплификации целевого участка промотора ретротранспозона LINE-1 на бисульфит-конвертированной ДНК с одновременным введением адаптеров

Смесь		Условия	
17 мкл	10 мкл Микс HS-Taq-полимеразы	1. 95°C 5'	
	1 мкл праймера LF1	2. 40 циклов	2.1.95°C 30"
	1 мкл праймера LR1		2.2.57°C 1'
	5 мкл dH ₂ O		2.3.72°C 1'
3 мкл ДНК		3. 72°C 7'	
Общий объем: 20 мкл		4. 4°C ∞	

Длина продукта составляла: 244 + (33 + 34) = 311 п.н. Результаты ПЦР идентифицировались с помощью 2% агарозного гель-электрофореза по

стандартной методике. В качестве маркера длин ДНК использовался маркер длин ДНК Step 50 (Биолабмикс, Россия). Для идентификации всех образцов к каждому из них были присоединены уникальные последовательности индексов во время второй ПЦР (Таблица 4). Индексация библиотек проводилась с помощью набора Nextera XT (Illumina, США) со стандартными баркодами Illumina i7 и i5 с использованием BioMaster HS-Taq PCR mix (Биолабмикс, Россия).

Последовательности прямого и обратного праймеров с индексами:

N7-Index1(i7)Adapter:

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG,

S5-Index2(i5)Adapter:

ATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC.

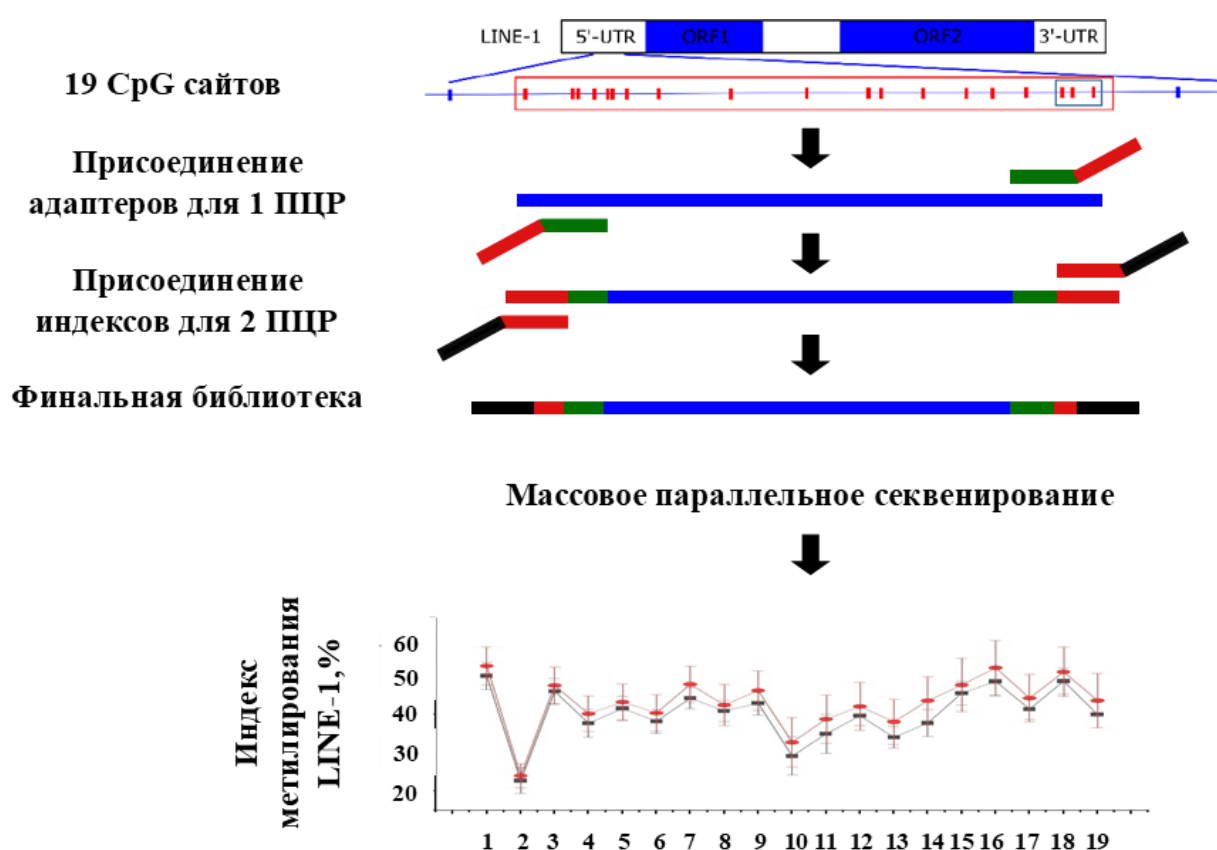


Рисунок 2. Схематическое изображение метода таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования 19 CpG-сайтов в промоторе LINE-1. Примечание: красной рамкой отмечены проанализированные CpG-сайты в этом исследовании, а синей рамкой отмечены наиболее часто анализируемые CpG-сайты, оцениваемые с помощью набора Qiagen для пиросеквенирования LINE-1. Схематический профиль графика был получен из индекса метилирования LINE-1

по области 5'-UTR в анализируемых образцах.

Таблица 4. Протокол проведения второй ПЦР для присоединения индексов к адаптерам целевого участка промотора ретротранспозона LINE-1 на бисульфит-конвертированной ДНК

Смесь		Условия	
22 мкл	12 мкл Микс HS-Taq-полимеразы	1. 95°C 3'	
	2,5 мкл праймера N7	2. 12 циклов	2.1 95°C 30"
	2,5 мкл праймера S5		2.2. 55°C 30"
	5 мкл dH ₂ O		2.3. 72°C 30"
3 мкл ДНК		3. 72°C 7'	
Общий объем: 25 мкл		4. 4°C ∞	

Примечание: Рабочая концентрация праймеров 0,02 мкМ. Источником ДНК являлись продукты амплификации из первой ПЦР.

Поскольку в результате присоединения праймеров с индексами продукт увеличился на 69 нуклеотидов, то его легко идентифицировать в агарозном геле, сравнив с ампликоном от первой ПЦР (Рисунок 3).

Концентрации полученных продуктов измерялись с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo, США) согласно протоколу производителя. Затем образцы объединялись эквимольно в библиотеку для последующего таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Для полученной библиотеки применяли фрагмент Кленова (Сибэнзим, Россия) для затупления концов. Был использован следующий протокол реакции: разводили dNTP: 1 мкл 10 mM каждого dNTP доводили деионизованной водой до 30 мкл. Фрагмент Кленова из исходной концентрации 5 е.а./мкл разводили в 5 раз. ДНК в количестве 100 нг смешивали с 5 мкл SE buffer (Сибэнзим, Россия), 5 мкл раствора dNTP, 5 мкл разведенного фрагмента Кленова и доводили до 50 мкл деионизованной водой. Инкубировали общую смесь 15 минут при 25°C. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 10 mM и нагреванием в течение

20 минут при 75°C.

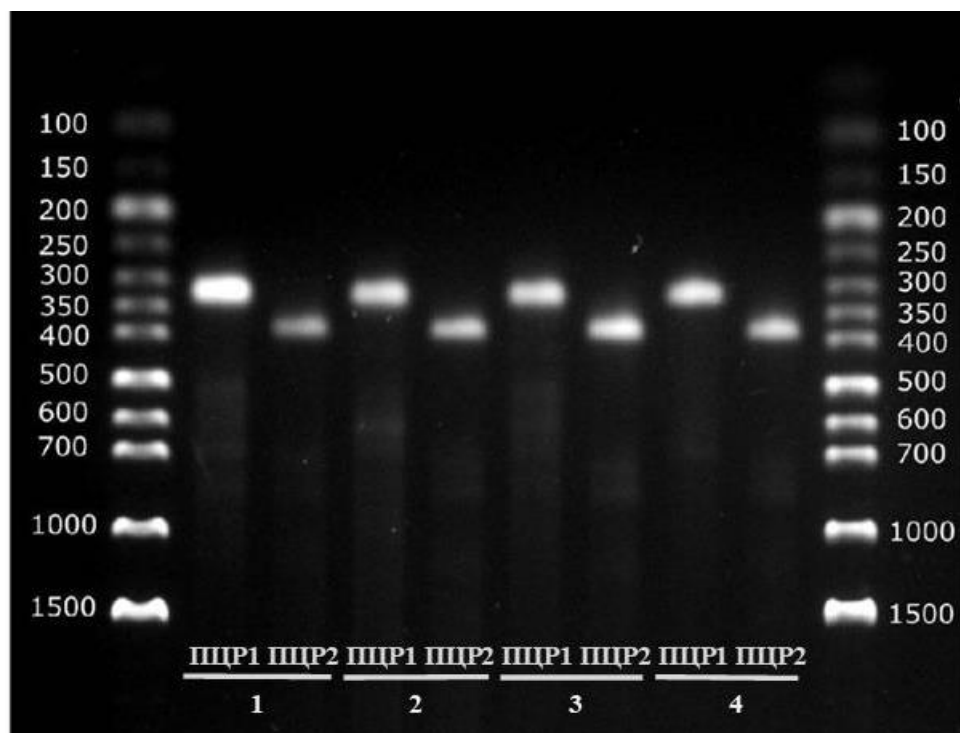


Рисунок 3. Результаты гель-электрофореза амплифицированных последовательностей LINE-1 для 4 образцов после первой ПЦР с прикрепленными адаптерами и тех же образцов с прикрепленными индексами после второй ПЦР. По краям рисунка представлен ДНК-маркер Step 50 (Биолабмикс, Россия) с указанием размера в п.н.

2.3.4 Таргетное бисульфитное массовое параллельное секвенирование

Размер и концентрацию объединенной библиотеки оценивали с помощью прибора Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) и секвенировали на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора Nano Kit v2 (500 циклов) в режиме парных прочтений с добавлением 30% PhiX (Illumina, США). Секвенированные последовательности были демультиплексированы стандартными баркодами Illumina i7 и i5 с использованием Genome Analysis Toolkit (GATK, v4.1.3.0). Качество чтения оценивалось с использованием FastQC, а остаточные последовательности адаптера, а также прочтения низкого качества удалялись с помощью Trimmomatic. Выравнивание прочтений было выполнено с использованием bwa-meth на референсную CpG-богатую область элемента LINE-1 (Genbank Accession: X58075.1). Данные метилирования ДНК CpG сайтов были извлечены из файлов BAM с использованием пакета MethylDackel

(<https://github.com/dpryan79/MethylDackel>). Индекс метилирования анализировался только в CpG-сайтах с покрытием более 10. Индекс метилирования подсчитывали как отношение метилированного цитозина к общему числу метилированных и неметилированных цитозинов в каждом из анализируемых CpG-сайтов в процентах.

2.4 Проверка кариотипа спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме и с моносомией по X-хромосоме

2.4.1 Приготовление суспензий клеток из ворсин хориона

Размороженные экстраэмбриональные ткани помещали в физиологический раствор, отделяли ворсины хориона и переносили их в центрифужную пробирку объемом 15 мл. Ткани подвергали гипотонической обработке – добавляли 10 мл 0,6% цитрата натрия, инкубировали в течение 20 минут при 37°C. Центрифугировали образцы 10 минут при 1000 об./мин. Отбирали надосадок, оставляя 1 мл. Добавляли 10 мл фиксатора метанол : ледяная уксусная кислота, в соотношении 3:1. Инкубировали 15 минут при -20°C. Снова центрифугировали образцы 10 минут при 1000 об./мин, отбирали надосадок, оставляя 1 мл, и добавляли 10 мл фиксатора метанол : ледяная уксусная кислота. Второй раз инкубировали 15 минут при -20°C. Далее центрифугировали образцы 10 минут при 1000 об./мин, отбирали надосадок, оставляя 1 мл. Оставшуюся суспензию в центрифужной пробирке объемом 15 мл переносили в микроцентрифужную пробирку и центрифугировали 5 минут при 6000 об./мин. Отбирали надосадок дозатором, оставляя 50–100 мкл. Добавляли 1 мл 60% уксусной кислоты. Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут, периодически встряхивая пробирку на вортексе. Снова центрифугировали 5 минут при 6000 об./мин и отбирали надосадок дозатором, оставляя 50–100 мкл. Добавляли 1 мл фиксатора и хранили суспензии клеток до использования при -20°C. Перед проведением флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) суспензию клеток

центрифугировали 5 минут при 6000 об./мин, удаляли надосадочную жидкость и добавляли свежий фиксатор. Инкубировали 15 минут при -20°C.

2.4.2 Мечение ДНК-зондов

Для мечення ДНК использовался модифицированный протокол ник-трансляции, применяемый в лаборатории цитогенетики Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ (Таблица 5). Были использованы ДНК-зонды, специфичные к центромерным регионам хромосом X и Y для подтверждения моносомии по X-хромосоме и к локус-специфичным субтеломерным регионам 16q и 16p для подтверждения трисомии по хромосоме 16.

Таблица 5. Протокол проведения мечення ДНК с помощью ник-трансляции

Концентрация ДНК	X
Вода деионизированная	=50-(22+L)
10x буфер для ДНК-полимеразы I <i>E. coli</i>	5 мкл
dNTP (0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,1 mM dTTP)	5 мкл
BSA (бычий сывороточный альбумин – 0,5 мг/мл)	5 мкл
dUTP, конъюгированные с флуоресцеином или Tamra	1 мкл
ДНК	=1000/X=L
ДНК-за I <i>E. coli</i> 1 ед./мл	5 мкл
ДНК-полимераза I <i>E. coli</i> 10 ед./мкл	1 мкл
Всего	50 мкл

Полученную смесь инкубировали в термостате при 15°C 1 час 30 минут. Для остановки реакции добавляли 1 мкл 0,5М ЭДТА. Переосаждение ДНК-зондов проводили в присутствии 100x избытка C_{0t} -1 ДНК человека (Биолинк, Новосибирск), 1/20 объема 3М ацетата натрия и 2 объема 96% этанола. Оставляли пробирку на ночь при -20°C в морозильной камере без доступа света. Для переосаждения центрифугу охлаждали до 4°C. Центрифугировали 30 минут при

4°C и 12 000 об./мин. Спирт сливали, добавляли 150 мкл 70% этанола комнатной температуры. Снова центрифугировали при тех же условиях. Снова сливали спирт. Осадок высушивали при 45°C в концентраторе (V-AL) в течение 3-5 минут. Готовые ДНК-зонды растворяли в 20 мкл смеси для гибридизации (1 часть декстрансульфата, 2 части деионизированного формамида).

2.4.3. Постановка флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH)

Суспензию клеток хориона раскапывали по 30 мкл на верхнюю треть предметного стекла. Далее препарату давали подсохнуть на нагретом предметном столике при температуре 42°C и использовали для FISH. Препарат был проведен через три смены 2xSSC (180 мл дист. воды + 20 мкл 20xSSC) по 5 минут при 37°C, после чего проводилась инкубация препарата в 0,01% растворе пепсина (70 мл дист. воды + 70 мкл пепсина + 70 мкл концентрированной HCl) в течение 10 минут при 37°C. Через 10 минут была проведена постфиксация препарата в 0,5% растворе параформальдегида при комнатной температуре в вытяжном шкафу также в течение 10 минут. Далее проводилась отмывка препарата от постфиксатора в растворе 1xPBS. Следующим шагом было обезвоживание препарата по 5 минут в трёх растворах этанола (70%, 80%, 96%) с увеличением концентрации. После инкубирования препараты были подсушены и на них были нанесено 10 мкл гибридизационной смеси. Препараты были накрыты покровным стеклом и заклеены по краям клеем. Гибридизация (75°C, 5 минут) и инкубация (37°C, ночь) проводились во влажной камере с подогревом (Termobrite, Германия). После окончания инкубации проводилась отмывка препаратов детергентами WT1 – 2 минуты (1 мл 20xSSC + 150 мкл NP-40, объем был доведен до 50 мл дист. водой и нагрет на водяной бане при 73°C) и WT2 – 5 минут (5 мл 20xSSC + 50 мкл NP-40, объем был доведен до 50 мл и оставлен при комнатной температуре). После отмывки препаратов на них был нанесен заключающий раствор Vestashield с красителем DAPI (VectorLabs, США). Препараты были накрыты покровным стеклом, лишняя жидкость была убрана при помощи фильтровальной бумаги, стекло было заклеено по краям прозрачным лаком.

Анализ препаратов проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Imager Z2 (Zeiss, Германия) с набором соответствующих фильтров. Оценка числа сигналов в интерфазных ядрах включала анализ не менее 100 ядер при отсутствии мозаицизма. Для уточнения мозаичного статуса кариотипа просматривали более 400 ядер. В исследование включались интерфазные ядра, в которых возможно было проанализировать все необходимые флуоресцентные сигналы, генерируемые ДНК-зондами. Уровень мозаицизма по анеупloidии оценивали с нижним порогом 10% и верхним порогом 90%.

2.5 Определение родительского происхождения и момента возникновения анеупloidии

2.5.1 Выделение ДНК из лимфоцитов крови

Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови семейных пар с невынашиванием беременности проводили по общепринятой методике. К 0,8 мл 1×SSC добавляли 0,7 мл крови в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и перемешивали. Центрифугировали в течение 2 мин при 12 000 об./мин, осторожно удаляли супернатант. Добавляли в микроцентрифужную пробирку 1×SSC, перемешивали, чтобы разбить плотный осадок. Еще раз центрифугировали в течение 2 мин при 12 000 об./мин, осторожно удаляли супернатант (повторяли данный этап дважды). Добавляли 270 мкл 0,2М NaAc (pH 7,4), тщательно перемешивали на центрифуге-вортекс Microspin (Biosan, Латвия) до полной гомогенизации (6–10 мин). Добавляли 30 мкл 10% SDS, перемешивали и оставляли в термостате на ночь при температуре 37°C. Дальнейшие этапы выделения ДНК проводили на следующий день. Добавляли 300 мкл раствора фенол-хлороформ (1:1), и перемешивали на мини-ротаторе в течение 10 мин. Центрифугировали 10 мин при 12 000 об./мин. Аккуратно переносили водную фазу, не захватывая интерфазу, в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Добавляли 300 мкл хлороформа и перемешивали на центрифуге-вортекс в течение 10 мин. Центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об./мин. Переносили водную фазу, не захватывая интерфазу, в чистую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

К супернатанту в микроцентрифужной пробирке добавляли 2,5 объема 96% охлажденного этилового спирта, аккуратно перемешивали до осаждения ДНК. Центрифугировали при +4°C 60 с при 12 500 об./мин, удаляли спирт. Добавляли 250 мкл 70% этилового спирта комнатной температуры, перемешивали, центрифугировали 60 с при 12 500 об./мин. Сливали спирт, снимали последнюю каплю фильтровальной бумагой, сушили в концентраторе (Eppendorf, США) 3-5 мин при температуре 45°C. Добавляли 50 мкл ТЕ-буфера, оставляли на ночь для полного растворения ДНК в термостате при 37°C.

2.5.2 Анализ родительского происхождения анеуплоидий с помощью капиллярного электрофореза

Анализ бэндов STR проводился на генетическом анализаторе ABI Prism 3730xl (Thermo, США). В основе работы генетического анализатора лежит капиллярный электрофорез с индуцированной лазером флуоресценцией. Разделение фрагментов ДНК происходит в тонком капилляре, заполненном электролитом, в зависимости от массы и заряда.

Амплификацию ДНК проводили на амплификаторе C1000 (Bio-Rad, США) в объеме 20 мкл с использованием следующих реагентов:

- Деионизированная вода 8,5 мкл;
- 10,0 мкл Микс HS-Taq-полимераза (Биолабмикс, Россия);
- По 0,5 мкл прямого и обратного праймера.

В качестве праймеров для амплификации ДНК были использованы нуклеотидные последовательности к коротким tandemным повторам (short tandem repeats — STR), локализованным в хромосомах X (HUMARA) и 16 (D16S3253, D16S539) (Таблица 6).

Протокол ПЦР реакции: денатурация 2 минуты при 96°C в течение 2 мин, далее 39 циклов: 94°C – 20 секунд, 58°C – 20 секунд, 72°C – 20 секунд, окончание цикла 72°C – 5 минут.

Таблица 6. Последовательности олигонуклеотидных праймеров STR маркеров для капиллярного электрофореза

STR маркер	Последовательность нуклеотидов
HUMARA	F 5'- TCCAGAATCTGTTCCAGAGC-3'
	R 5'- GCTGTGAAGGTTGCTGTTCC-3'
D16S3253	F 5'-GTTCAAGCATGGGTGGATAG-3'
	R 5'-TTGTGTGGGAATATAGTGATGC-3'
D16S539	F 5'- GATCCCAAGCTCTTCCTCTT-3'
	R 5'-ACGTTTGTGTGTGCATCTGT-3'.

Концентрация ДНК в образцах составляла 10-12 нг/мкл. В каждую лунку добавляли по 10 мкл смеси формамида Hi-Di и стандарта размера GeneScan 500 (Thermo, США). Затем добавляли по 1 мкл продуктов амплификации. Затем планшет центрифугировали и проводили денатурацию ДНК при 95°C в течение 10 мин. Праймеры были конъюгированы с флуоресцентным красителем, имеющим спектр испускания в красной области. Стандарт длины S550 был мечен специальным флуоресцентным красителем и детектировался в отдельном канале одновременно с продуктами ПЦР. Полученную информацию обрабатывали с помощью сопряженного программного обеспечения GeneMapper.

2.6 Анализ экспрессии генов

2.6.1 Выделение РНК из ворсин хориона и мезодермы

Выделение РНК проводили из ворсин хориона и экстраэмбриональной мезодермы фенол-хлороформным методом. С момента получения материала изучаемых образцов до начала выделения РНК все ткани хранились в жидком азоте. Разделение тканей предварительно проводилось в RNeasy (Invitrogen, США) для стабилизации РНК в образцах. Каждый образец гомогенизировали в ступке с жидким азотом, предварительно добавив 500 мкл реагента Лире (Биолабмикс, Россия). Лизат инкубировали сначала 5 мин при 55°C, далее 5 мин при комнатной температуре. После лизат центрифугировали при 12 000 g в течение

10 мин для удаления нерастворенных фрагментов и отбирали супернатант в новую пробирку. На каждый 1 мл реагента Лира был добавлен 0,2 мл хлороформа, с последующим встряхиванием (вручную) в течение 15 с, инкубированием смеси в течение 10 мин при комнатной температуре и центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин при 4°C. Далее к водной фазе, содержащей РНК, добавляли 0,5 мл 100% охлажденного изопропанола на каждый 1 мл реагента Лира, инкубировали смесь при -20°C в течение 10 мин и центрифугировали образец при 12 000 g в течение 10 мин при 4°C. Осадок промывали дважды 80% охлажденным этанолом, при 10 000 g в течение 5 мин при 4°C. Сушили осадок 2 мин в концентраторе (Eppendorf, США) (параметры: 45°C, V-AL). Для растворения осадка добавляли 40 мкл ДЭПК-воды и 1 мкл Ribolock (Thermo, США) и ожидали 10 мин при комнатной температуре до полного растворения. Все образцы во время выделения на этапах инкубации при комнатной температуре находились на холодной подложке, во избежание деградации РНК. После выделения все образцы хранились при -80°C.

2.6.2 Выделение РНК из лимфоцитов периферической крови

Выделение РНК проводили в течение двух часов после забора цельной крови. К 1 мл крови добавляли водный раствор для лизиса эритроцитов (155 мМ NH_4Cl , 12 мМ NaHCO_3 , 0,1 мМ ЭДТА- Na_2). Далее центрифугировали в течение 5 мин при 4°C и 10 000 g с последующей отмывкой в фосфатно-солевом буфере (1×PBS). Полученный клеточный осадок был ресуспендирован в 1 мл реагента Лира (Биолабмикс, Россия), после чего проводили инкубацию в течение 15 мин. Дальнейшие этапы выделения РНК одинаковы для ворсин хориона и мезодермы и лимфоцитов периферической крови и описаны более подробно в главе «Выделение РНК из ворсин хориона и мезодермы», начиная с процедуры разделения фаз. Для определения концентрации и качества полученных образцов РНК использовали оптоволоконный спектрофотометр NanoDrop ND-8000 (Thermo, США).

2.6.3 Обратная транскрипция

Обратная транскрипция была проведена с помощью набора реактивов ОТ M-MuLV-RH (Биолабмикс, Россия). В стерильных, свободных от нуклеаз пробирках на льду смешивали по 1000 нг РНК-матрицы, 1 мкл случайного гексапраймера и 0,5 мкл ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo, США). При необходимости объем реакционной смеси доводили водой, свободной от РНКаз, до 12 мкл. После аккуратного перемешивания смесь нагревали для расплавления вторичных структур 3 мин при 70 °С в амплификаторе T100 (Bio-Rad, Великобритания) и убирали пробирки в лед. Во время нагревания была приготовлена реакционная смесь, содержащая в расчете на один образец 4 мкл 5×реакционного буфера, 2 мкл 0,1М ДТТ, 1 мкл 10 мМ смеси dNTP и 1 мкл M-MuLV –RH ревертазы (100 ед./мкл). В пробирки, содержащие РНК-матрицы, после нагревания добавляли по 8 мкл реакционной смеси и после аккуратного перемешивания инкубировали в течение 60 мин при 42°С для синтеза кДНК в амплификаторе T100 (Bio-Rad, Великобритания). Останавливали реакцию нагреванием реакционной смеси до 70°С в течение 10 мин. Продукт реакции хранился при -20°С. Для анализа экспрессии гена *YWHAB* перед проведением реакции обратной транскрипции образцы РНК были обработаны ДНКазой I (Thermo, США) для исключения контаминации ДНК.

2.6.4 Подбор олигонуклеотидных праймеров

Для генов *NUP153* и *YWHAB* были подобраны 2 вида праймеров: первый для длинных продуктов, которые экспрессируются только с канонических промоторов, а второй – для коротких продуктов, которые экспрессируются с альтернативных антисмысловых промоторов LINE-1 (Таблица 7). Ген *NUP153* состоит из 22 экзонов, а короткий транскрипт с альтернативного промотора LINE-1 – включает только экзоны 21-22. Для детекции транскриптов гена *NUP153* с канонического промотора были подобраны праймеры на экзоны 16-17, а для детекции транскриптов с альтернативного промотора – на экзоны 12-22. С обычного промотора гена *YWHAB* транскрибируются два нормальных длинных транскрипта с 7 экзонами или 6 экзонами; в связи с этим, были подобраны

праймеры на каждый отдельный продукт. Для первого транскрипта с 7 экзонами праймеры были подобраны в экзонах 1-2. Для второго транскрипта с 6 экзонами праймеры были подобраны в экзонах 1-3. Праймеры короткого продукта с альтернативного промотора LINE-1 гена *YWHAB* были подобраны в экзонах 4-7 (Рисунок 4). В качестве референсного гена использовался ген *GAPDH*.

Таблица 7. Последовательности олигонуклеотидных праймеров для оценки уровня экспрессии генов *NUP153*, *YWHAB* и *GAPDH* с помощью ПЦР в реальном времени

Ген	Транскрипт	Последовательность нуклеотидов
<i>NUP153</i>	Транскрипт с канонического промотора (NM_001278209.2, 22 экзона)	F 5'-TGTATGTCTGAGAAACCAGGAAGTT-3'
		R 5'-GTAGAGTCTGCCTTATTCTGCACTA-3'
	Укороченный транскрипт с альтернативного промотора LINE-1 (2 экзона)	F 5'-CAGCATTTACAGTGGGGTCAAAT-3'
		R 5'-CAACACCAATGTGACCTTTATTTCC-3'
<i>YWHAB</i>	Транскрипт с канонического промотора (NM_003404, 7 экзонов)	F 5'-GCTCGGAAGGGTCTTTGTTC-3'
		R 5'-TCTATCCACAGCCGAATGGG-3'
	Транскрипт с канонического промотора (NM_139323, 6 экзонов)	F 5'-GAGTAGTGGGCTTAGGAAGGAAGAG-3'
		R 5'-CTTTTATCCATTGTCATTCCCGTGG-3'.
	Укороченный транскрипт с альтернативного промотора LINE-1 (4 экзона)	F 5'-CTGTAGCCTGGCAAAAACGG-3'
		R 5'-TCCGATGTCCACAGAGTGAGA-3'.
<i>GAPDH</i>	Транскрипт с канонического промотора (NM_002046.7, 10 экзонов)	F 5'-GCCAGCCGAGCCACATC-3'
		R 5'-GGCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'

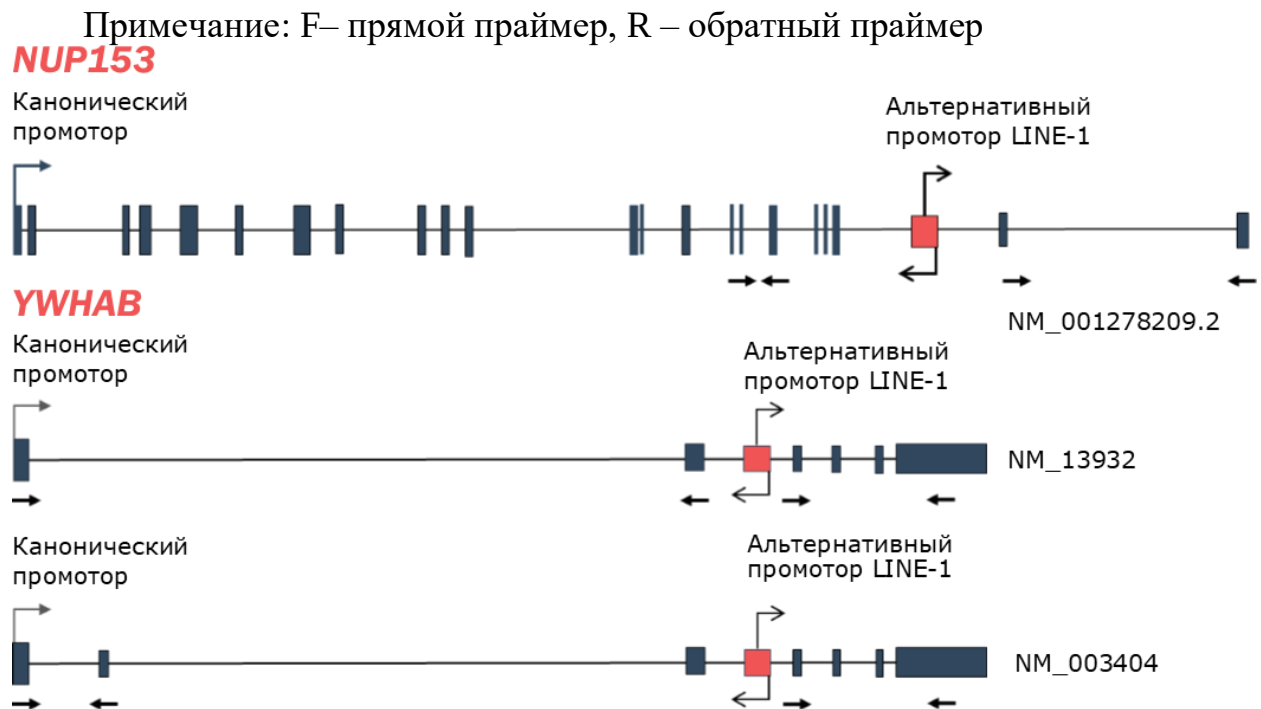


Рисунок 4. Схема расположения альтернативных промоторов LINE-1 для генов *NUP153* и *YWHAB*.

Примечание: стрелками схематично отмечены сайты гибридизации олигонуклеотидных праймеров

2.6.5 Проверка эффективности праймеров

Для оценки специфичности подобранных праймеров была проведена ПЦР в реальном времени с использованием ДНК- и кДНК-матриц, а также отрицательного контроля (деионизованная вода). Праймеры были раскапаны в 96-луночный планшет по 2,5 мкл прямого и обратного праймеров на один образец. Реакции были поставлены в трех повторностях. Далее в двух пробирках смешивали из расчета на один образец по 12,5 мкл буфера для проведения количественной ПЦР в реальном времени БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия), 1 мкл кДНК или ДНК и доводили объем до 20 мкл деионизованной водой. Для отрицательного контроля смешивали только 12,5 мкл буфера для проведения количественной ПЦР в реальном времени БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия) и 7,5 мкл деионизованной воды. Таким образом, для каждого праймера была проведена ПЦР в реальном времени с ДНК, кДНК и отрицательным контролем. Все манипуляции проводили на льду. Планшет накрывали оптически прозрачной пленкой Microseal 'B' (Bio-Rad, Великобритания). Центрифугировали

планшет в концентраторе (Eppendorf, США) в течение 1 мин со скоростью 1000 об./мин. Проводили ПЦР в режиме реального времени в амплификаторе AriaMx (Agilent Technologies, США). В результате выполнения данного этапа работы были получены специфичные ПЦР-продукты для всех тестируемых пар праймеров.

2.6.6 ПЦР в режиме реального времени

Для каждого исследуемого образца смешивали следующие реакционные компоненты из расчета на одну лунку: 5 мкл воды, свободной от ДНКаз и РНКаз, 2,5 мкл кДНК, 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия). Вносили смесь в лунки в соответствии с протоколом проведения ПЦР. Планшет накрывали оптически прозрачной пленкой. Центрифугировали планшет в концентраторе (Eppendorf, США) в течение 1 мин со скоростью 1000 об./мин. ПЦР в режиме реального времени проводили в амплификаторе AriaMx (Agilent Technologies, США) при следующих условиях: 1) предварительная денатурация: 95 °C – 10 мин; 2) 40 циклов: денатурация: 95 °C – 15 с, отжиг: 60 °C – 30 с; элонгация: 72 °C – 30 с. Детекция флуоресцентного сигнала проводилась в конце каждого цикла после этапа элонгации. После завершения реакции для анализа графиков накопления кДНК использовался пороговый метод. Суть метода заключается в определении порогового цикла C_t , в котором количество ДНК в реакционной смеси достигает одинаковой для всех образцов пороговой величины N_t (задается программой или пользователем). После получения и сравнения значений C_t для каждого образца можно сделать вывод о начальной концентрации кДНК в исследуемых образцах. Расчет производили в программе Microsoft Excel (Microsoft, США).

2.7 Биоинформатический анализ подсемейств LINE-1

Сайты посадки использованных праймеров для анализа уровня метилирования LINE-1 присутствуют в последовательностях нескольких подсемейств LINE-1. Для определения степени совпадения был проведен анализ BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) с использованием бисульфит-конвертированной последовательности участка промотора LINE-1, получаемого с помощью разработанных в работе праймеров, и бисульфит-конвертированных консенсусных последовательностей повторов в геноме человека, полученных из UCSC Repeat Browser (Рисунок 5) [Fernandes J.D. et al. 2020]. Результаты анализа показали, что в совпадающих с L1HS последовательностях L1P2, L1PA6, LTR65, HERVL18 и MER110-int отсутствует последовательность прямого праймера, а в последовательностях L1PA7 и L1PA10 – последовательность обратного праймера. Поэтому для этих подсемейств с использованием разработанных праймеров не могло быть получено продукта ПЦР. В результате полное перекрывание последовательностей обнаружено только для следующих подсемейств LINE-1: L1HS, L1P1, L1PA2, L1PA3, L1PA4, L1PA5. Были выделены три участка с повышенной вариабельностью без CpG-сайтов, SNP в которых могут быть использованы для последовательной классификации прочтений, относящихся к разным подсемействам LINE-1 (Рисунок 5). Первый участок позволяет провести фильтрацию подсемейств L1HS и L1PA2, второй участок – подсемейства L1PA5, третий участок – подсемейств L1PA3, L1PA4, L1P1. Для каждого нераспределенного прочтения был проведен анализ BLAST по сравнению с консенсусными последовательностями подсемейств LINE-1, по результатам которого прочтение было отнесено к подсемейству с максимальной степенью совпадения. При проведении сравнений позиции цитозинов были маскированы.

Результаты представлялись в виде уровня метилирования, представляющего собой отношение числа цитозинов к суммарному числу цитозинов и тиминов в отдельном CpG-сайте. Кроме того, был вычислен средний уровень метилирования вдоль всей области интереса.

Примечание. В верхней строке текста приведена референсная последовательность из базы данных GenBank (X58075.1), ниже – последовательности повторов в геноме человека, полученные из UCSC Repeat Browser. Точками отмечены сайты, совпадающие с референсной последовательностью, буквами – несовпадающие позиции. Желтым цветом выделены сайты гибридизации праймеров, зеленым – переменные регионы, по присутствию которых проводилась фильтрация прочтений, специфичных для различных подсемейств LINE-1.

Статистический анализ данных, полученных в ходе работы, был проведен в программном пакете Statistica 12.0 (Statsoft, США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Числовые данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение. Проверка на нормальность производилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения индекса метилирования между группами использовались непараметрические ранговые критерии Манна-Уитни для двух групп и Краскела-Уоллиса для трех и более групп. Для корреляционного анализа использовался непараметрический критерий Спирмана.

Результаты представлялись в виде уровня метилирования, представляющего собой отношение числа цитозинов к суммарному числу цитозинов и тимinov в отдельном CpG-сайте. Кроме того, был вычислен средний уровень метилирования вдоль всей области интереса. Для определения границ выбросов в группе

медицинских абортусов использовались формулы $Q_1 - 1,5 \times IQR$ и $Q_3 + 1,5 \times IQR$, где Q_1 и Q_3 – первый и третий квартиль, соответственно, IQR – межквартильное расстояние.

С помощью инструмента STRING для дифференциально-экспрессирующихся генов были построены сети функциональных взаимодействий на уровне белков.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разработка метода таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования в 19 CpG-сайтах промотора LINE-1

Индекс метилирования LINE-1 часто используется в качестве маркера уровня полногеномного метилирования. Чаще всего анализ индекса метилирования LINE-1 проводят с помощью метилспецифической количественной ПЦР в реальном времени [Furlan C. et al., 2017, Ponomaryova A.A. et al., 2021], метилчувствительного анализа кривых плавления с высоким разрешением [Marques-Rocha J.L. et al., 2016], или пиросеквенирования 3-4 CpG-сайтов в его промоторной области [Васильев С.А. и др., 2015; Benitez-Trinidad A.B. et al., 2018]. В настоящей работе был разработан целевой метод определения индекса метилирования в промоторе ретротранспозона LINE-1 с использованием таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Данный метод направлен на оценку уровня метилирования LINE-1 на основе индекса метилирования ДНК 19 CpG-сайтов в консенсусной последовательности промотора LINE-1, которые имеют самую высокую ткане- или опухолеспецифическую вариабельность [Tang Z. et al., 2017].

Принимая во внимание предобработанную бисульфитом консенсусную последовательность промотора LINE-1 (GenBank Accession: [X58075.1](#)), были разработаны праймеры, охватывающие 19 CpG-сайтов (Рисунок 6). Эти 19 CpG-сайтов включали 3 CpG-сайта, анализируемые в наиболее часто используемом наборе для определения уровня метилирования LINE-1 с помощью пиросеквенирования PyroMark LINE-1 (Qiagen, Hilden, Germany). Были синтезированы праймеры с прикрепленными адаптерами Illumina, и продукт ДНК был амплифицирован с помощью ПЦР с использованием модифицированного протокола Illumina 16S рРНК (Рисунок 2).

а)

```

1  gggggaggag ccaagatggc cgaataggaa cagctcgggt ctacagctcc cagcgtgagc
61  gacgcagaag acgggtgatt tctgcatttc catctgaggt accgggttca tctcactagg
121 gagtgccaga cagtggggcg aggccactgt gtgcgcgcac cgtgcgcgag ccgaagcagg
181 gcgaggcatt gcctcacctg ggaagcgcaa ggggtcaggg agttcccttt ccgagtcaaa
241 gaaaggggtg acggacgcac ctggaaaatc gggtcactcc caccggaata ttgcgctttt
301 cagaccggct taagaaacgg cgcaccacga gactatatcc cacacctggc tcagagggtc
361 ctacgcccac ggaatctcgc tgattgctag cacagcagtc tgagatcaaa ctgcaaggcg
421 gcaacgaggg tgggggaggg gcgcgcgcca ttgccaggc ttgcttaggt aaacaaagca
481 gccgggaagc tcgaactggg tggagcccac cacagctcaa ggaggcctac ctgcctctgt
541 aggtctccac tctgggggca gggcacagac aaacaaaaag acagcagtaa cctctgcaga
601 cttaaagtgc cctgtctgac agctttgaag agagcagtggt ttctcccagc acgcagctgg
661 agatctgaga acgggcagac tgccctctca agtgggtccc tgaccctga ccccgagca
721 gcctaactgg gaggcacccc ccagcagggc aactgacac ctcacacggc aggggtattcc
781 aacagacctg cagctgaggg tcctgtctgt tagaaggaaa actaaccaac agaaaggaca
841 tctacacgaa aaccatctg tacatcacca tcatcaaga ccaaaagtag ataaaaccac
901 aaagatgggg aaaaaacaga acagaaaaac tggaaactct aaaacgcaga ggccctctcc
961 tcctccaaag gaacgcagtt cctcaccagc aacagaacaa agctggatgg agaattgatt
1021 tgacgagctg agagaagaag gcttcagacg atcaaattac tctgagctac aggaggacat
1081 tcaaaccaaa ggcaagaag ttgaaaactt tgaaaaaat ttagaagaat gtataactag
1141 aataacq

```

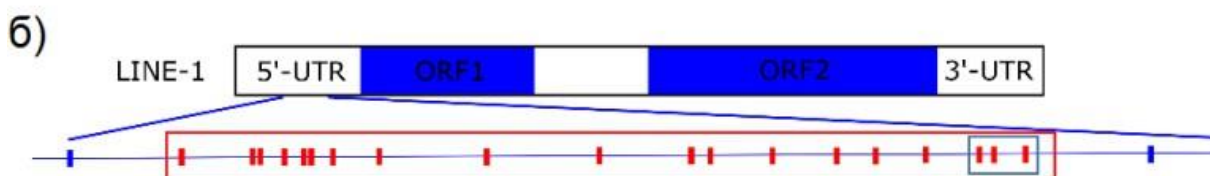


Рисунок 6. Исследуемые CpG-сайты в промоторном регионе ретротранспозона LINE-1. а) Последовательность ДНК ретротранспозона LINE-1 (RefSeq X58075.1). В промоторном регионе анализируемые CpG-сайты выделены серым цветом; б) Схематическое изображение 19 проанализированных CpG-сайтов в промоторе LINE-1.

Примечание. Красной рамкой выделены проанализированные CpG-сайты в этом исследовании, в синей рамке – наиболее часто анализируемые CpG-сайты с помощью набора для пиросеквенирования QIAgen LINE-1.

После проведения секвенирования прочтения были картированы на геном человека (выпуск от февраля 2009 г., hg19/GRCh37) с маскированными повторяющимися последовательностями, а затем некартированные прочтения (флаг SAM «4») были извлечены с помощью SAMtools v1.12 [Li H. et al., 2009] и выровнены на консенсусную последовательность CpG-богатой области элемента LINE-1 (GenBank Accession: [X58075.1](#)) с использованием bwa-meth для избежания контаминации на этапе подготовки библиотеки. Повторы генома человека маскировались с помощью BEDTools v2.26.0 [Quinlan A.R., Hall I.M., 2010] и последовательностей RepeatMasker [Jurka J., 2000]. Полученный индекс метилирования характеризует средний уровень метилирования части последовательностей LINE-1 в геноме, амплифицированных с использованием используемых праймеров и имеющих специфические CpG-сайты.

Для проверки гипотезы, что разработанный нами метод таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования в 19 CpG-сайтах промотора LINE-1 содержит ту же информацию, что и при пиросеквенировании 3-4 CpG-сайтов в его промоторной области, было решено сравнить полученные данные для 31 образца из нашего исследования, для которых ранее был определен индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 на приборе PyroMark Q24 (Qiagen, Германия) по протоколу производителя [Васильев С.А. и др., 2015].

Средний индекс метилирования LINE-1 в 19 CpG-сайтах, оцененный с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования, имел выраженную корреляцию со средним индексом метилирования LINE-1 в 3 CpG-сайтах, полученным с помощью бисульфитного пиросеквенирования. Корреляция между средними индексами метилирования по идентичным CpG-сайтам, измеренным разными методами, также была высокой (Рисунок 7). Однако индекс метилирования, рассчитанный с помощью пиросеквенирования, незначительно коррелировал с индексом метилирования для всех отдельных CpG-сайтов после таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования.

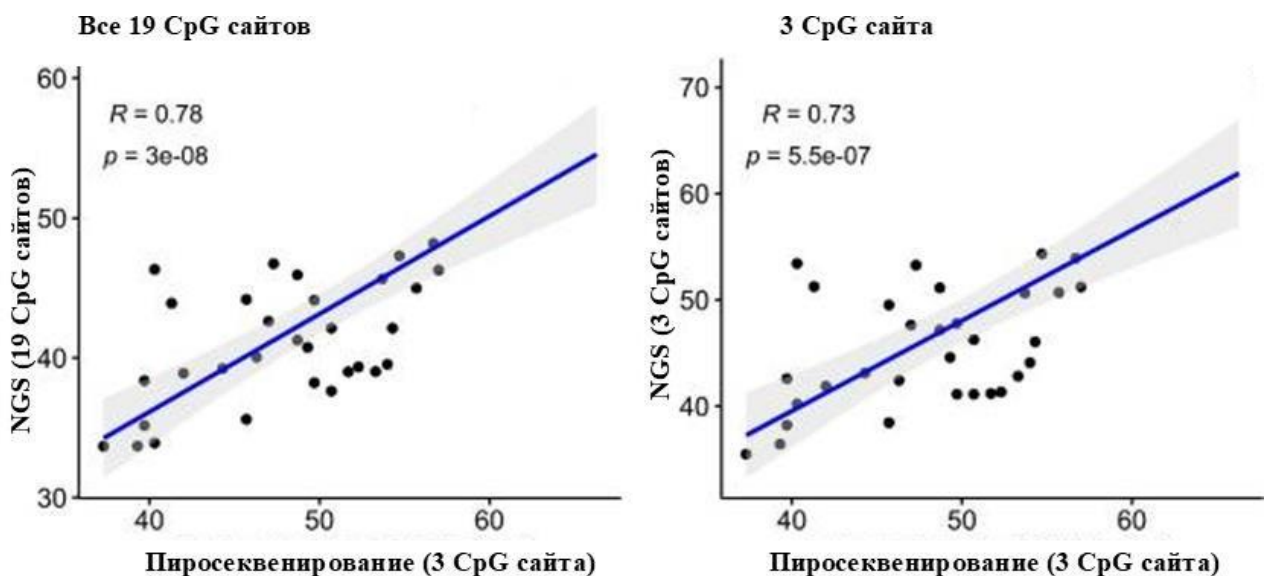


Рисунок 7. Корреляция между средним индексом метилирования LINE-1 (%), измеренным с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования и пиросеквенированием бисульфитной ДНК.

Таким образом, разработанный метод предоставляет не только ту же информацию о средних значениях, что и пиросеквенирование, но и дополнительную информацию об отдельных CpG-сайтах. Метод дает возможность проанализировать либо индекс метилирования каждого CpG-сайта независимо, либо среднего индекса метилирования ДНК вдоль промотора LINE-1. Кроме того, разработанный метод таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования дает гораздо больше информации: профиль метилирования ДНК значительной части промотора LINE-1 и уровень метилирования ДНК в отдельных локусах LINE-1 в геноме.

Данный метод потенциально может иметь широкий спектр применений: от оценки эпигенетических аномалий в различных тканях и опухолях до анализа эпигенетических эффектов мутагенов и мониторинговых исследований.

3.2 Оценка индекса метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в первом триместре беременности

Индекс метилирования LINE-1 был оценен в трофобласте хориона спонтанных абортусов и медицинских абортусов. После исследования кариотипа спонтанных абортусов с помощью цитогенетического исследования, метода FISH и оценки качества секвенирования размер группы спонтанных абортусов составил 286 образцов, медицинских абортусов – 46 образцов. Группа спонтанных абортусов была представлена тремя подгруппами: с нормальным кариотипом ($n = 178$), с трисомией по хромосоме 16 ($n = 62$) и с моносомией по хромосоме X ($n = 46$).

Индексы метилирования отдельных CpG-сайтов в промоторе LINE-1 варьировали от 19% до 57%. Форма профиля метилирования вдоль анализируемого региона совпадала в группах спонтанных и медицинских абортусов. В группе спонтанных абортусов был обнаружен повышенный индекс метилирования LINE-1 по сравнению с группой медицинских абортусов (Рисунок 8). Увеличение диапазона вариации происходило практически равномерно по всему профилю метилирования, составляя $24,1 \pm 3,1\% - 52,2 \pm 4,9\%$ для объединенной группы спонтанных абортусов, $23,9 \pm 3,4\% - 52,5 \pm 4,5\%$ для группы спонтанных

абортусов с трисомией по 16 хромосоме, $24,1 \pm 3,1\%$ – $53,1 \pm 3,9\%$ для группы спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме и $24,2 \pm 3,1\%$ – $51,9 \pm 5,2\%$ для группы спонтанных абортусов с нормальным кариотипом. Так как отличия между группами по всему профилю метилирования LINE-1 оказались распределены равномерно, это позволило далее для анализа использовать среднее значение индекса метилирования 19 CpG-сайтов в промоторе LINE-1.

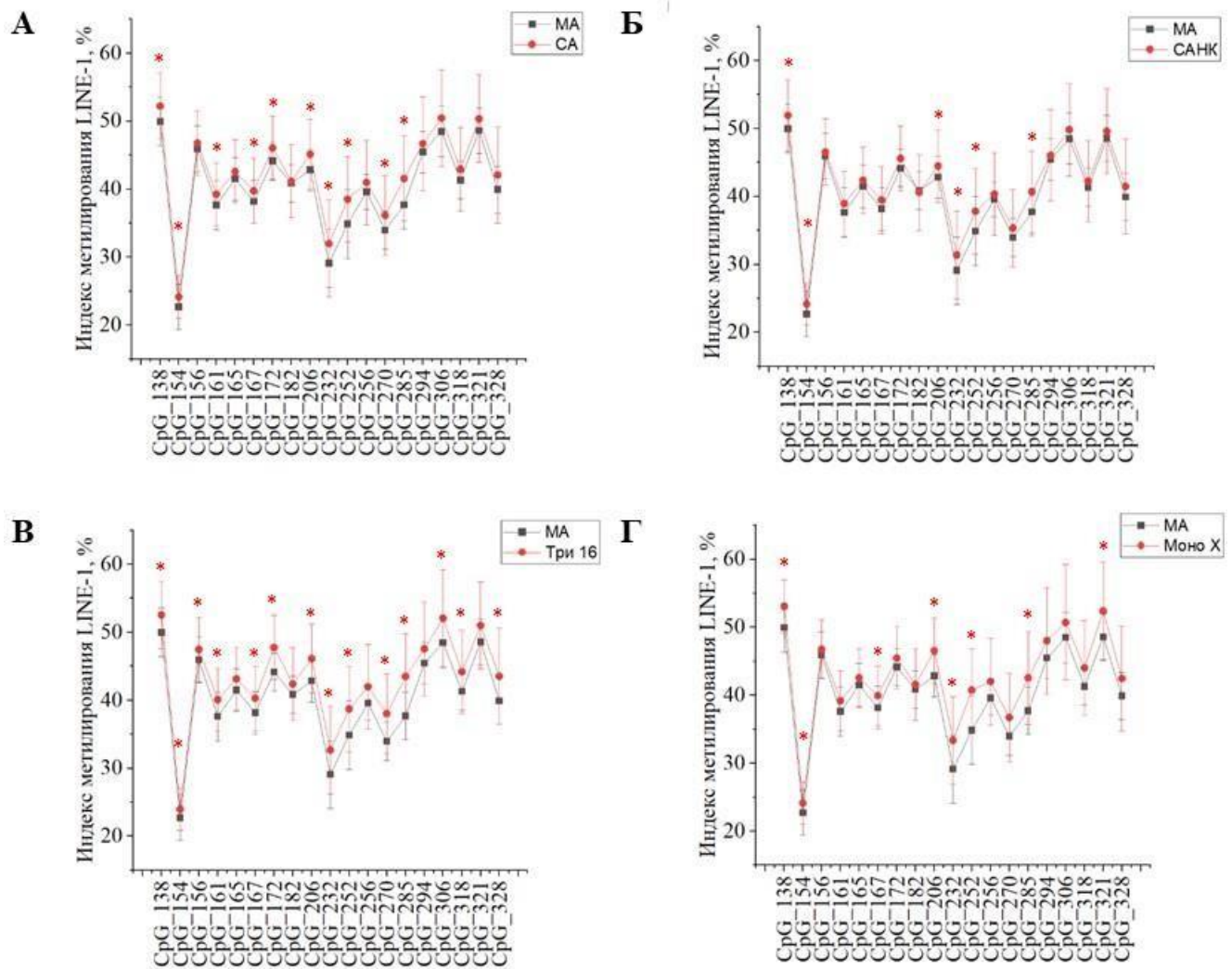


Рисунок 8. Профиль метилирования отдельных CpG-сайтов в промоторе LINE-1:

А – группы медицинских абортусов (МА) и спонтанных абортусов (СА),
 Б – группы медицинских абортусов (МА) и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (САНК), В – группы медицинских абортусов (МА) и спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме (Три 16), Г – группы медицинских абортусов (МА) и спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме (Моно X). Нумерация CpG-сайтов указана от начала референсной последовательности X58075.1. * – $p < 0,05$.

Средний индекс метилирования LINE-1 в группе спонтанных абортусов оказался выше ($41,9 \pm 4,8\%$), чем в группе медицинских абортусов ($40,2 \pm 2,2\%$) ($p = 0,01$). Можно предположить, что выявленные различия могли быть связаны с наличием в выборке образцов с анеуплоидиями в сравниваемых подгруппах. Поэтому было проведено сравнение индекса метилирования LINE-1 в группе медицинских абортусов с каждой отдельной подгруппой спонтанных абортусов с различным кариотипом (Рисунок 9). Индекс метилирования LINE-1 в подгруппах спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме ($42,9 \pm 4,6\%$) и моносомией по X-хромосоме ($42,8 \pm 4,7\%$) оказался также статистически значимо выше, чем в группе медицинских абортусов ($p < 0,05$). Для подгруппы спонтанных абортусов с нормальным кариотипом индекс метилирования LINE-1 ($41,4 \pm 4,8\%$) не отличался значимо по сравнению с группой медицинских абортусов ($p = 0,19$).

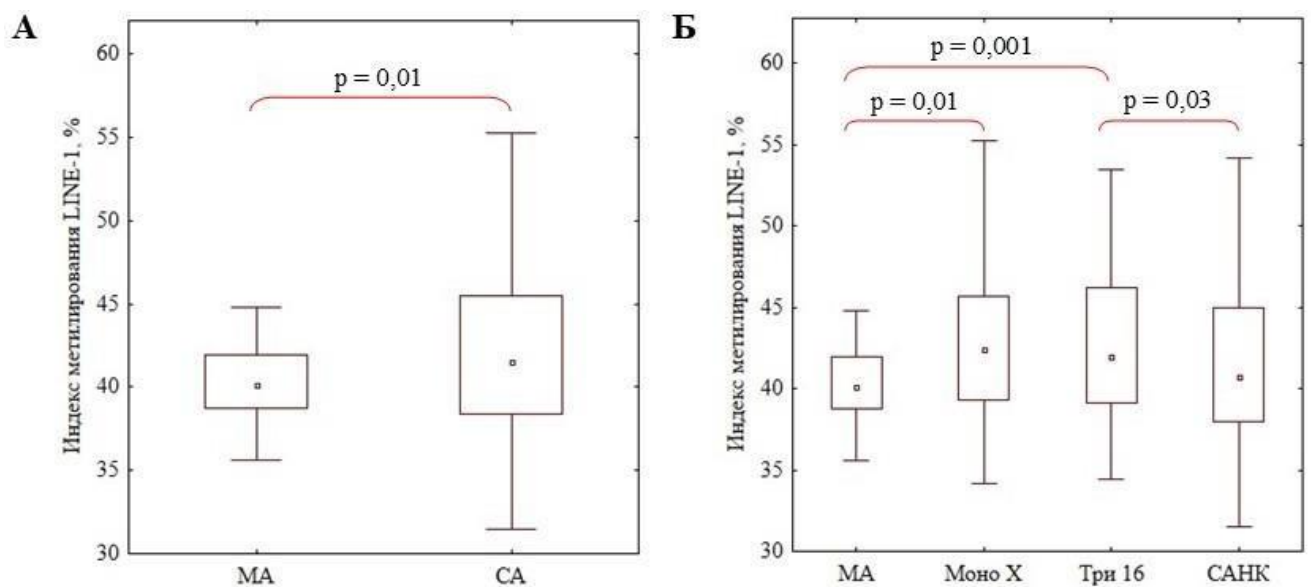


Рисунок 9. Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона: А – сравнение групп медицинских абортусов (МА) и объединенной группы спонтанных абортусов (СА), Б – сравнение групп медицинских абортусов (МА), спонтанных абортусов с моносомией по хромосоме X (Моно X), спонтанных абортусов с трисомией по хромосоме 16 (Три 16) и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (САНК).

Индекс метилирования LINE-1 в группе спонтанных абортусов с моносомией

хромосомы X и спонтанных абортусов с женским кариотипом был статистически значимо выше, чем в группе спонтанных абортусов с мужским кариотипом ($p < 0,05$) (Рисунок 10).

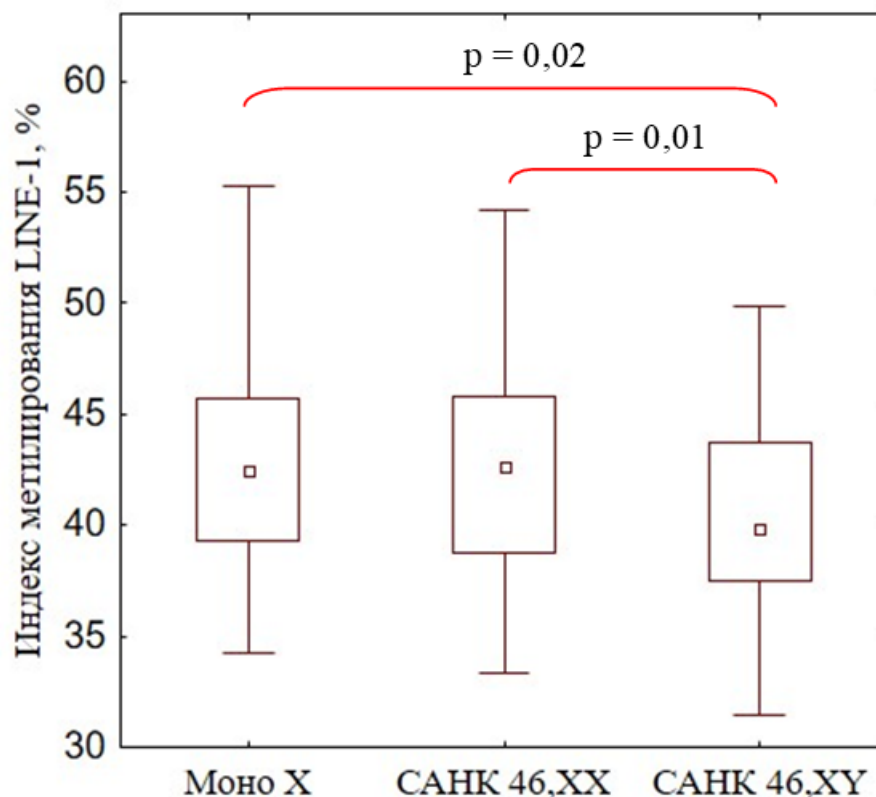


Рисунок 10. Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме (Моно X), спонтанных абортусов с женским (САНК 46,XX) и мужским кариотипами (САНК 46,XY).

Возможно, данные изменения могут быть связаны с особенностями инактивации X-хромосомы. Инактивация X-хромосомы начинается с моноаллельной регуляции некодирующего гена *XIST*, сцепленного с X-хромосомой, который запускает сложные механизмы превращения большей части одной из X-хромосомы в неактивный гетерохроматин, известный как тельце Барра [Loda A. et al., 2017]. Было показано, что инактивация аутомных регионов происходит не полностью, что предполагает специфичную модель работы *XIST* [Porova B.C. et al., 2006; White W.M. et al., 1998]. Молекулярные механизмы, с помощью которых РНК гена *XIST* распространяется по хромосоме и запускает подавление генов, остаются

в значительной степени неизвестными. Для попытки объяснить работу данного механизма было предложено, что LINE-1 может выступать как «промежуточные станции» для распространения *XIST*. Так, в одном из исследований было показано, что одним из первых шагов в формировании гетерохроматина на X-хромосоме до инактивации генов является появление неактивных повторов LINE-1 в части X- хромосомы, покрытой РНК гена *XIST* [Chow J. C. et al., 2010]. При этом более молодое подсемейство LINE-1 - L1HS, специфически экспрессировалось с неактивной X- хромосомы.

Таким образом, можно предположить, что повышение уровня метилирования LINE-1 у эмбрионов женского пола приводит к временному подавлению экспрессии LINE-1 с X-хромосомы во время инактивации X-хромосомы, что создает общий профиль метилирования, близкий к уровню метилирования, как при моносомии X.

Спонтанные абортусы с трисомией по хромосоме 16 имели полную ($n = 40$) и мозаичную ($n = 22$) формы трисомии 16. Между подгруппами спонтанных абортусов с полной и мозаичной формами анеуплоидий не было выявлено отличий по индексу метилирования LINE-1 ($p = 0,16$) (Рисунок 11). Появление мозаичного варианта кариотипа всегда является результатом митотических ошибок, которые происходят на ранних этапах эмбриогенеза. Отсутствие статистически значимых различий позволяет предположить, что повышение уровня метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов с анеуплоидией не связано с возникновением мозаицизма на первых стадиях дробления.

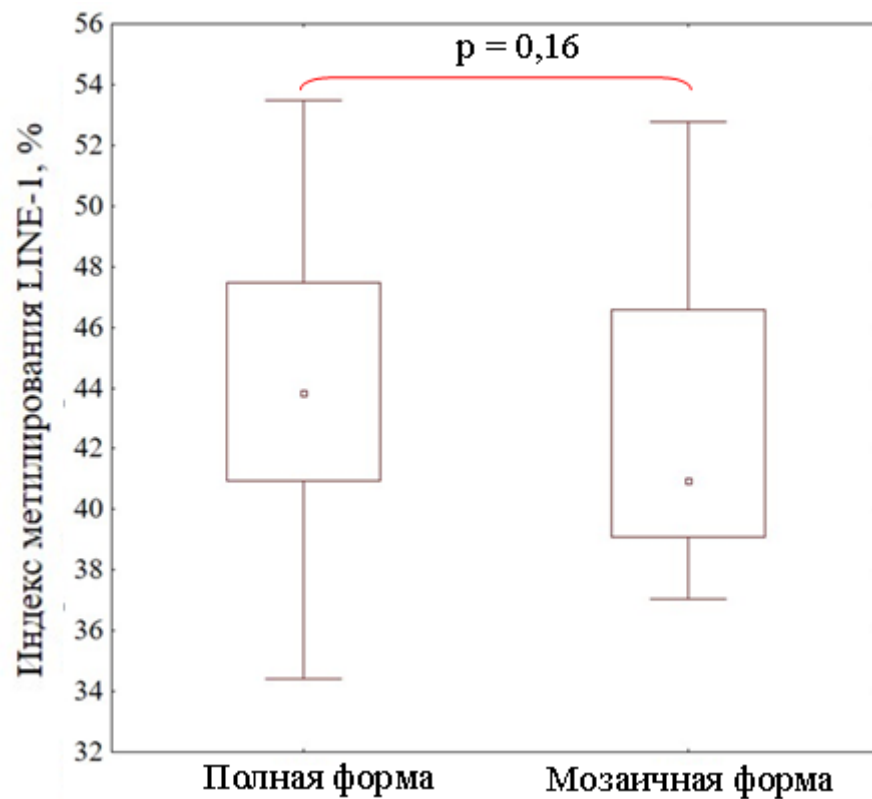


Рисунок 11. Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 у спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме, имеющих полную и мозаичную форму анеуплоидии.

Для 18 образцов спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме был определен момент возникновения анеуплоидии – мейоз I или мейоз II/митоз, а также родительское происхождение анеуплоидии. Для 13 семей был проведен анализ STR маркеров D16S3253 и D16S539 (Таблица 8). Для остальных 5 семей происхождение подтверждали с помощью анализа гаплогитмов [Essers R. et al., 2023]. Все образцы имели материнское происхождение в мейозе I. Таким образом, сверхчисленные хромосомы 16 у всех спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме, кроме одного случая, были материнского происхождения, что не позволяет оценить влияние родительского происхождения трисомии 16 на уровень метилирования LINE-1.

Таблица 8. Результаты анализа родительского происхождения трисомии по 16 хромосоме

№ семьи	Семья	Длина STR маркеров (п.н.)						Происхождение
		D16S3253			D16S539			
3	М	180	183		284		292	Мейоз II/Митоз
	А	180	183			288	292	
5	О		180	183	288			Мейоз I (отец)
	М	171		183	288	292		
	А	171	180	183	288			
7	О		175	183	284	288		Мейоз I
	М	171		183		288		
	А	171	175	183		288		
8	О	171		183	288	292		Мейоз II/Митоз
	А		179	183	288	292		
9	О	179				292		Мейоз II/Митоз
	М	179	183		288		296	
	А	179	183			292	296	
10	М	183			276		296	Мейоз I
	А	183			276	280	296	
11	М	171			284	288		Мейоз II/Митоз
	А	171	183		284			
12	М	171	179		280			Мейоз I
	А	171	179	183	280	284		
13	М	171	175		280	292		Мейоз I
	А	171	175	183	280	292		
14	О		175	179	284		296	Мейоз II/Митоз
	М	171	175		284	288		
	А	171		179	284	288		
16	М	171	175		283		292	Мейоз I
	А	171	175	183	283	288	292	
17	О	171	179		284			Мейоз I
	М	171		183	284	288		
	А	171	179	183	284	288		
18	М	171		183	276	288		Мейоз I
	А	171	175	183	276	288		

Примечание: О – отец, М – мать, А – абортус.

При сравнении уровня метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме, имеющих подтвержденное происхождение мейоз II/митоз ($n = 5$) или мейоз I ($n = 13$) не было выявлено статистически значимых различий между группами ($p = 1$) (Рисунок 12).

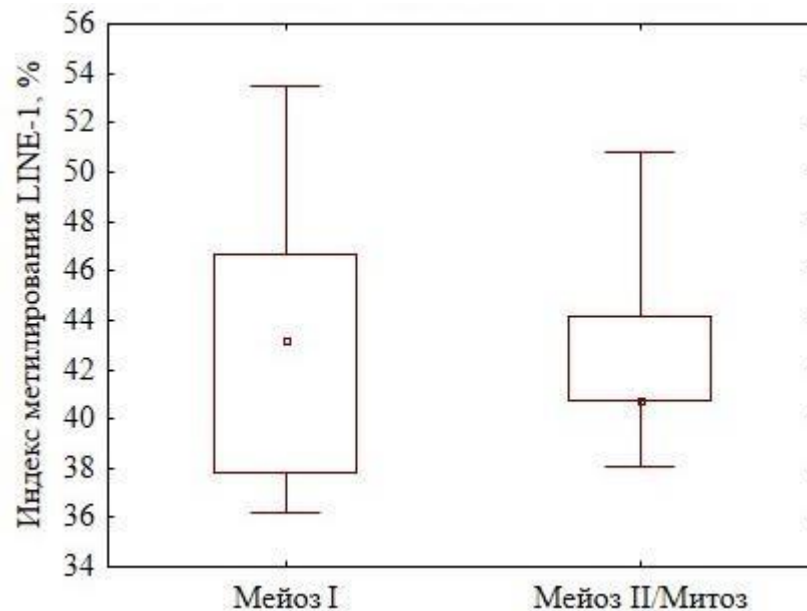


Рисунок 12. Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 у спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме, имеющих подтвержденное происхождение мейоз I или мейоз II/митоз

Большинство спонтанных абортусов с моносомией хромосомы X были представлены в основном полной ($n = 44$) формой, а на образцы с мозаичной формой моносомии X приходилось меньше 5% ($n = 2$). Поэтому невозможно было провести сравнительный анализ индекса метилирования LINE-1 между двумя данными группами. Для 12 образцов получилось определить родительское происхождение анеуплоидии. Для 5 образцов было выявлено материнское происхождения анеуплоидии, а для 7 образцов отцовское. Образцы, имеющие материнское происхождение анеуплоидии, имели немного более высокий средний индекс метилирования LINE-1 ($42,9 \pm 4,1\%$), чем образцы, имеющие отцовское происхождение ($38,5 \pm 2,7\%$), хоть отличия были и не значимы статистически ($p = 0,1$) (Рисунок 13).

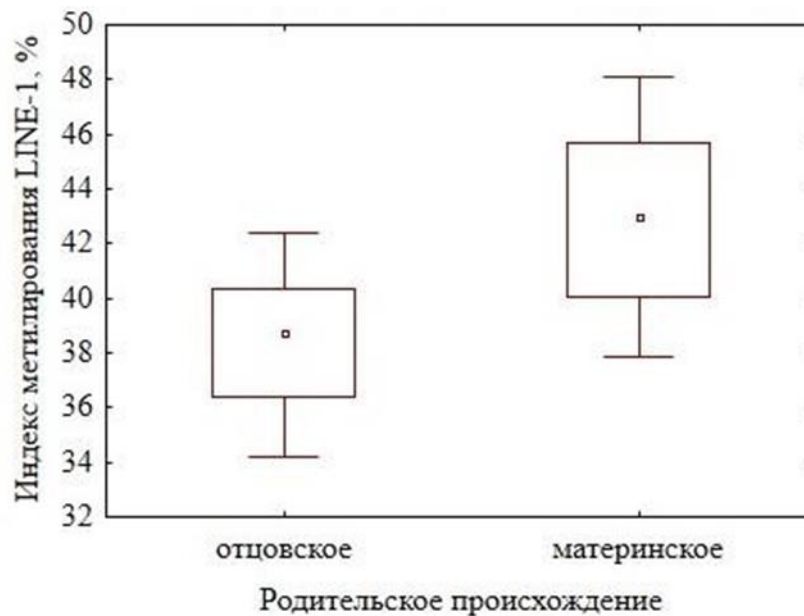


Рисунок 13. Индекс метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов с моносомией по хромосоме X в зависимости от родительского происхождения

Коэффициент вариации индекса метилирования LINE-1 для медицинских абортусов составлял 5,5%, спонтанных абортусов с нормальным кариотипом – 11,6%, спонтанных абортусов с трисомией по хромосоме 16 – 10,6%, спонтанных абортусов с моносомией по хромосоме X – 11,1%. Коэффициент вариации для всех спонтанных абортусов вместе составлял 11,4%. Таким образом, все группы спонтанных абортусов имели минимум в 2 раза большую вариацию индекса метилирования LINE-1 по сравнению с группой медицинских абортусов. Учитывая перекрывающиеся диапазоны вариации в группах спонтанных и медицинских абортусов, это указывает на то, что за наблюдаемые отличия между группами характерны лишь для части образцов в группах спонтанных абортусов. Было обнаружено, что 17% всех спонтанных абортусов имели уровень метилирования LINE-1 выше границы выбросов в группе медицинских абортусов. При этом для группы спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме и трисомией по 16

хромосоме число образцов с аномалиями метилирования было еще выше (17,3% и 20,9%), а для группы спонтанных абортусов с нормальным кариотипом помимо образцов с повышенным индексом метилирования (12,3%) также отмечалось небольшое количество образцов с уровнем метилирования LINE-1 ниже границы выбросов в группе медицинских абортусов (3,4%) (Таблица 9). Таким образом, даже в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, для которой не было обнаружено значимых отличий по сравнению с медицинскими абортусами по индексу метилирования LINE-1, каждый восьмой абортус имеет повышенный индекс метилирования LINE-1.

Таблица 9. Доля спонтанных абортусов с индексом метилирования LINE-1, выходящим за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов

		Количество (доля) абортусов с аномалиями метилирования	Всего абортусов
Границы индекса метилирования у МА (non-outlier range)		33,68 – 46,96%	
СА НК	Гипер	22 (12,3%)	178
	Гипо	6 (3,4%)	
СА Моно X	Гипер	8 (17,3%)	46
	Гипо	0	
СА Три 16	Гипер	13 (20,9%)	62
	Гипо	0	
Итого		49 (17,1%)	286

Примечание. Представлено количество и доля абортусов с уровнем метилирования выше, чем верхняя граница (гипер), и ниже, чем нижняя граница (гипо) диапазона вариации в группе медицинских абортусов. МА – медицинские абортусы, СА НК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, СА Моно X – спонтанные абортусы с моносомией X (СА Моно X), СА Три 16 – спонтанные абортусы с трисомией 16.

Имеются противоречивые данные о стабильности уровней метилирования генома в тканях плаценты во время внутриутробного развития. Было показано, что на протяжении всей беременности уровень метилирования в ворсинах хориона увеличивался в основном в CpG-островках и вне CpG-островков, в то время как уровень метилирования в промоторе LINE-1 оставался относительно постоянным

[Price E.M. et al., 2012]. Наблюдаемый в нашей работе повышенный индекс метилирования LINE-1 для группы спонтанных абортусов с трисомией хромосомы 16 может быть результатом накопления эффектов трисомии при дифференцировке ворсин хориона. В связи с наличием среди спонтанных абортусов с нормальным кариотипом образцов со сниженным индексом метилирования LINE-1, возникает вопрос, может ли гипометилирование LINE-1 приводить к избыточной экспрессии генов и оказывать негативное влияние на выживаемость эмбриона. На сегодняшний день гипометилирование LINE-1 считается универсальным признаком, сопровождающим многие злокачественные новообразования, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак молочной железы и легких [Ponomaryova A.A. et al., 2020].

3.3 Оценка уровня метилирования различных подсемейств LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в первом триместре беременности

Праймеры для таргетного обогащения части промотора ретротранспозона LINE-1 с помощью ПЦР были разработаны на основе референсной последовательности ретротранспозона LINE-1 подсемейства L1HS, взятой из базы данных GenBank (X58075.1). Однако сайты посадки праймеров присутствуют и в последовательностях из других подсемейств LINE-1. Проведенная фильтрация прочтений по подсемействам показала следующие результаты распределения прочтений: 55% прочтений приходилось на подсемейства L1HS, L1P1, L1PA2, L1PA3, L1PA4, L1PA5. Около 44% прочтений не удалось классифицировать как относящиеся к одному из подсемейств LINE-1 (Рисунок 14).

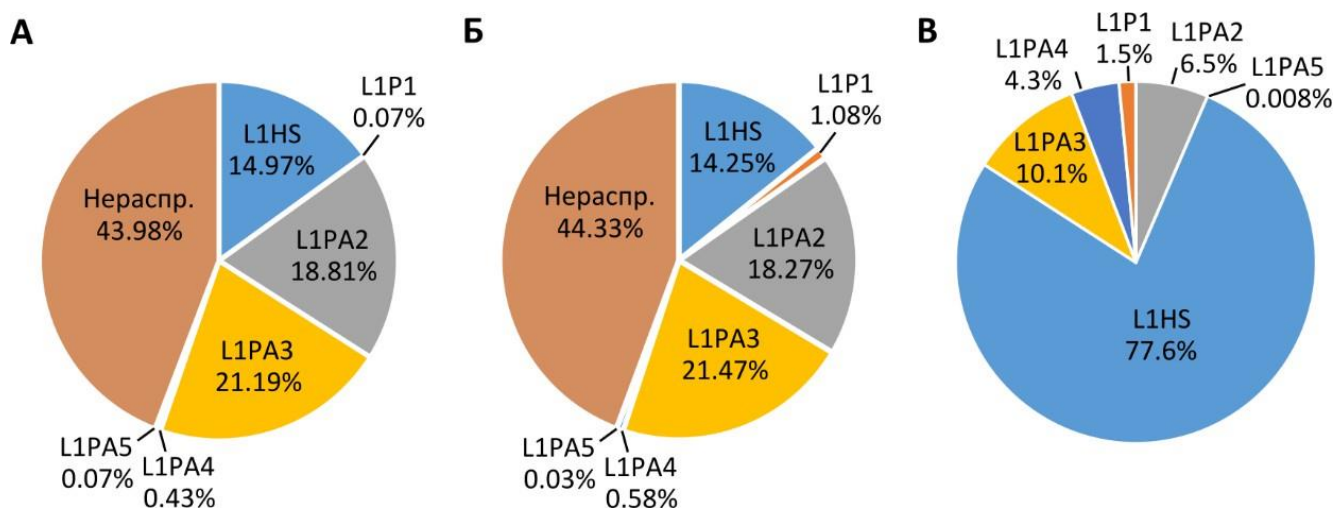


Рисунок 14. Распределение прочтений между подсемействами LINE-1. А – в группе спонтанных абортусов, Б – в группе медицинских абортусов, В – представленность подсемейств LINE-1 среди нераспределенных прочтений в группе спонтанных абортусов.

Распределение прочтений было одинаково между группами, что позволило провести анализ уровня метилирования всех подсемейств между группами. Для более молодых подсемейств L1HS и L1PA2 не было выявлено различий в индексе метилирования между медицинскими и спонтанными абортусами. При отдельном анализе для каждого подсемейства, индекс метилирования LINE-1 не имел статистически значимых отличий между группой медицинских абортусов и объединенной выборкой всех спонтанных абортусов для молодых подсемейств L1HS (МА – $51,1 \pm 3,1\%$; СА – $52,6 \pm 5,0\%$, $p = 0,12$) и L1PA2 (МА – $36,6 \pm 2,8\%$; СА – $37,9 \pm 5,4\%$, $p = 0,3$). Индекс метилирования более древних подсемейств LINE-1 был выше в объединенной выборке спонтанных абортусов по сравнению с группой медицинских абортусов: L1PA3 (МА – $37,4 \pm 2,3\%$; СА – $39,4 \pm 5,0\%$, $p = 0,02$), L1PA4 (МА – $23,5 \pm 7,1\%$; СА – $30,8 \pm 9,9\%$, $p < 0,001$). Индекс метилирования в недифференцированных подсемействах был также выше у спонтанных абортусов (МА – $40,7 \pm 2,0\%$; СА – $43 \pm 4,5\%$, $p = 0,001$). Исключением стало эволюционно-молодое подсемейство L1P1 (МА – $20,8 \pm 8,4\%$; СА – $23,5 \pm 8,0\%$, $p = 0,004$), для которого уровень метилирования был также повышен в группе спонтанных

абортусов (Рисунок 15).

При сравнении уровня метилирования LINE-1 в каждой отдельной подгруппе спонтанных абортусов с медицинскими абортусами результаты различались. Для спонтанных абортусов с нормальным кариотипом и моносомией по хромосоме X сохранялось отсутствие статистически значимых различий уровня метилирования LINE-1 для подсемейств L1HS ($p = 0,32$ и $p = 0,24$ соответственно) и L1PA2 ($p = 0,32$ и $p = 0,24$ соответственно), а также подсемейства L1PA3 ($p = 0,09$ и $p = 0,23$ соответственно) несмотря на то, что уровень метилирования LINE-1 всех спонтанных абортусов в сумме имел значимые различия по сравнению с медицинскими абортусами (Рисунок 16).

Таким образом, анализ уровня метилирования различных подсемейств ретротранспозона LINE-1 показал, что в ворсинах хориона спонтанных абортусов повышен как средний уровень метилирования ретротранспозона LINE-1, так и уровень метилирования отдельных подсемейств ретротранспозона LINE-1. При этом для эволюционно более древних подсемейств повышение уровня метилирования LINE-1 относительно уровня, характерного для контрольной группы медицинских абортусов, было более выраженным по сравнению с эволюционно молодыми семействами. Это может быть связано с тем, что наиболее эволюционно-молодое подсемейство LINE-1 (L1HS) еще способно к ретротранспозиции и находится под более жестким контролем за счет метилирования ДНК в промоторе [Zheng Y. et al., 2017], что подтверждается и нашими результатами.

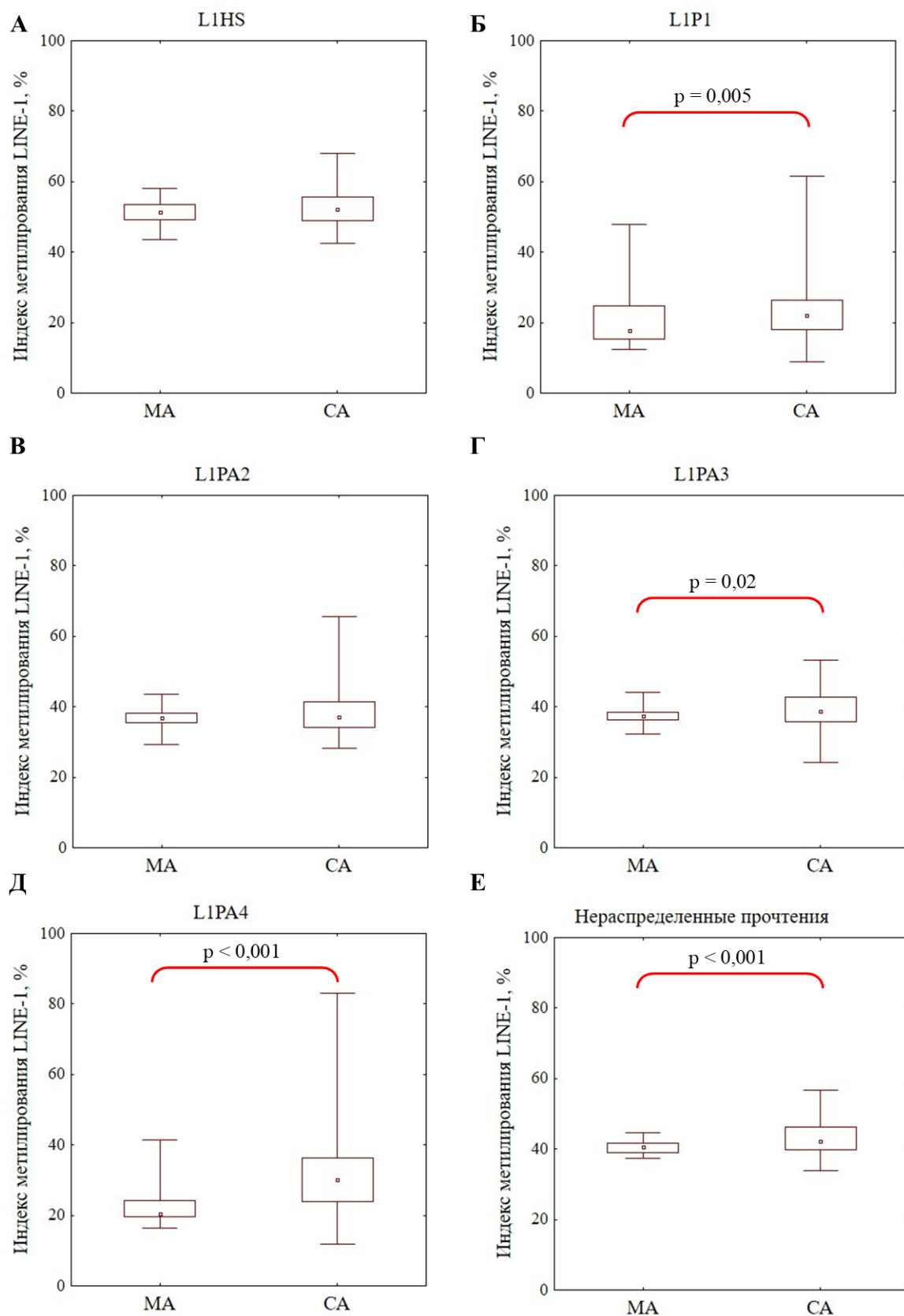


Рисунок 15. Индекс метилирования подсемейств ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона медицинских абортусов (МА) и спонтанных абортусов (СА).

А – подсемейство L1H1, Б – подсемейство L1P1, В – подсемейство L1PA2, Г – подсемейство L1PA3, Д – подсемейство L1PA4, Е – нераспределенные прочтения.

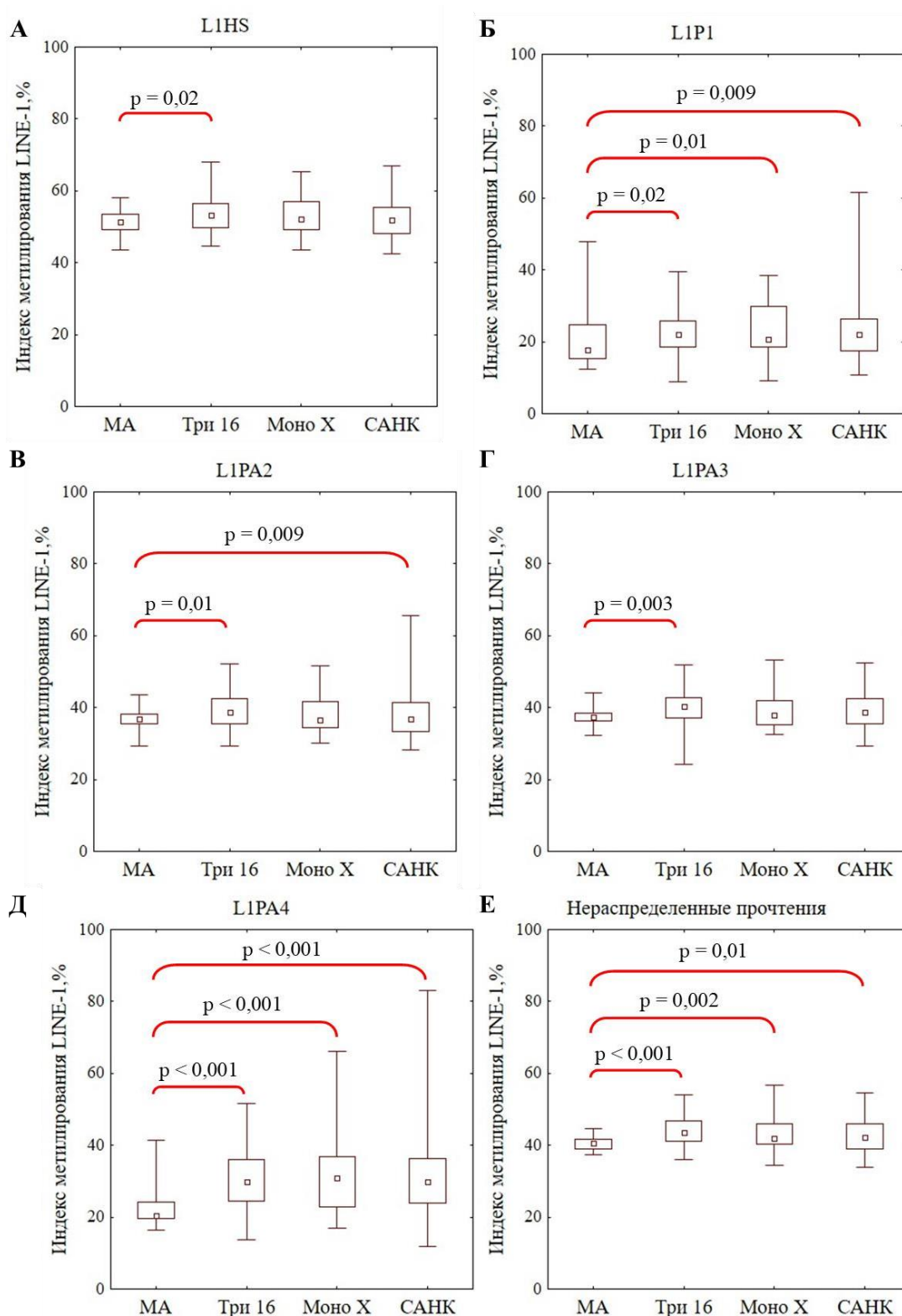


Рисунок 16. Индекс метилирования подсемейств ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона медицинских абортусов (МА), спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме (Три 16), спонтанных абортусов с моносомией по X - хромосоме (Моно X) и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (САНК). А – подсемейство L1H1, Б – подсемейство L1P1, В – подсемейство L1PA2, Г – подсемейство L1PA3, Д – подсемейство L1PA4, Е – нераспределенные прочтения.

Во всех группах спонтанных абортусов коэффициент вариации (CV) среднего уровня метилирования LINE-1 был в два раза выше (СА НК – 11,6%, Моно X – 11,4%, Три 16 – 10,55%) по сравнению с медицинскими абортусами (5,5%). В результате значительная часть спонтанных абортусов имела уровень метилирования LINE-1 выше границы выбросов в группе медицинских абортусов. Доля спонтанных абортусов с уровнем метилирования LINE-1, выходящим за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов, возрастала с увеличением эволюционного возраста подсемейства LINE-1 в ряду L1HS, L1PA2, L1PA3 (Таблица 10).

Для спонтанных абортусов с трисомией по хромосоме 16 были выявлены значимые различия для всех подсемейств: L1HS, L1P1, L1PA2, L1PA3, L1PA4 и группы нераспределенных прочтений ($p < 0,05$). Таким образом, у спонтанных абортусов, имеющих дополнительную хромосому 16, уровень метилирования был статистически значимо выше для всех подсемейств LINE-1. Однако, высокий уровень метилирования был также характерен для спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме и отмечен у пятой части спонтанных абортусов с нормальным кариотипом. Это указывает на возможную роль нарушений метилирования генома как самостоятельного и независимого от наличия анеуплоидии фактора, ассоциированного с гибелью эмбриона на ранних сроках беременности.

Таблица 10. Количество и доля спонтанных абортусов с уровнем метилирования LINE-1, выходящим за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов

		Среднее	L1HS	L1PA2	L1PA3	Нераспр.	Всего
Границы индекса метилирования у МА (non-outlier range)		33,37-45,73%	39,82-61,32%	29,96-42,52%	32,88-42,73%	35,62-46,76%	
МА	Гипер	0	0	1 (2,6%)	1 (2,6%)	0	39
	Гипо	0	0	1 (2,6%)	1 (2,6%)	0	
СА НК	Гипер	34 (19,7%)	6 (3,5%)	27 (15,6%)	41 (23,7%)	28 (16,2%)	173
	Гипо	4 (2,3%)	0	7 (4,0%)	19 (11,0%)	9 (5,2%)	
СА Моно X	Гипер	11 (23,9%)	5 (10,9%)	10 (21,7%)	10 (21,7%)	11 (23,9%)	46
	Гипо	0	0	0	4 (8,7%)	1 (2,2%)	
СА Три 16	Гипер	18 (29,0%)	2 (3,2%)	17 (27,4%)	16 (25,8%)	15 (24,2%)	62
	Гипо	0	0	1 (1,6%)	2 (3,2%)	0	
Итого		67 (20,9%)	13 (4,1%)	64 (20,0%)	94 (29,4%)	64 (20,0%)	320

Примечание: представлены количество и доля абортусов с уровнем метилирования выше, чем верхняя граница (гипер), и ниже, чем нижняя граница (гипо) диапазона вариации в группе медицинских абортусов.

МА – медицинские абортусы, СА НК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, СА Моно X – спонтанные абортусы с моносомией по X-хромосоме, СА Три 16 – спонтанные абортусы с трисомией по 16 хромосоме.

Несмотря на обнаруженный повышенный уровень метилирования у сравнительно молодых подсемейств LINE-1 (L1HS, L1PA2 и L1PA3), они являются наиболее транскрипционно активными в плаценте [Zadora J. et al., 2017]. Показано, что среди генов, способных к использованию промоторов LINE-1, обогащены гены, экспрессирующиеся в мозге и плаценте [Criscione S. W. et al., 2016]. Кроме того, ретротранспозоны из подсемейства L1PA2 могут предоставлять свои антисмысловые промоторы в качестве альтернативных

промоторов длинных некодирующих РНК в плаценте [Chishima T. et al., 2018]. Возможно, что неспособные к ретротранспозиции элементы LINE-1 постепенно начинают использоваться геномом в качестве отдельных функциональных элементов (в первую очередь, промоторов) для рядом расположенных генов [Pourrajab F. et al., 2021].

3.4 Оценка индекса метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в зависимости от возраста родителей

В зависимости от возраста родителей все образцы были поделены на 3 группы: 18 – 25 лет, 25 – 35 лет, старше 35 лет. Для медицинских абортусов индекс метилирования LINE-1 положительно коррелировал с возрастом матери ($R = 0,35$, $p = 0,026$) (Рисунок 17). Среди спонтанных абортусов ни для одной из групп не было выявлено корреляции с возрастом матери. С возрастом отца индекс метилирования LINE-1 положительно коррелировал для медицинских абортусов ($R = 0,36$, $p = 0,03$) и для спонтанных абортусов с моносомией X-хромосомы ($R = 0,47$, $p = 0,0024$) (Рисунок 17). Таким образом, индекс метилирования LINE-1 возрастал для медицинских абортусов как с возрастом матери, так и с возрастом отца. При этом возраст родителей не отличался значимо в группах медицинских и спонтанных абортусов ($p = 0,7$) (Рисунок 17, 18). Можно предположить, что этот эффект является результатом наследования меток метилирования ДНК родительских гамет во внеэмбриональных тканях, что недавно было показано для метилирования, происходящего из ооцитов [Sanchez-Delgado M. et al., 2016].

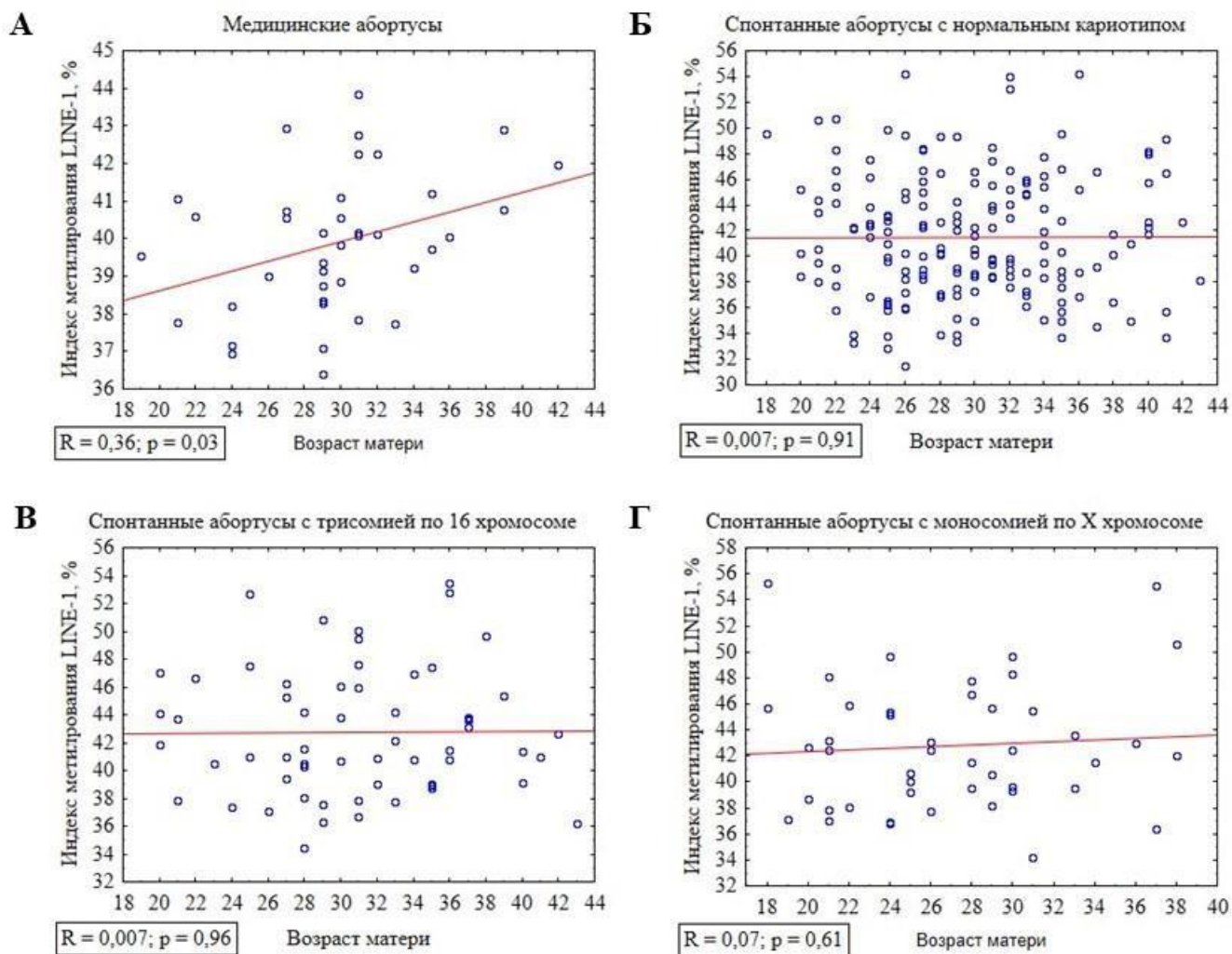


Рисунок 17. Корреляция между индексом метилирования LINE-1 и возрастом матери: А – медицинские абортусы, Б – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, В – спонтанные абортусы с трисомией по 16 хромосоме, Г – спонтанные абортусы с моносомией X-хромосомы.

При сравнении индекса метилирования LINE-1 у медицинских абортусов и спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме не было обнаружено статистически значимых различий между данными группами, несмотря на то, что в обеих группах отмечалась положительная корреляция с возрастом отца. Возможно существуют другие эпигенетические регуляторные механизмы в плаценте, приводящие к еще более высокому индексу метилирования LINE-1, чем те, которые зависят от возраста отца и могут быть унаследованы.

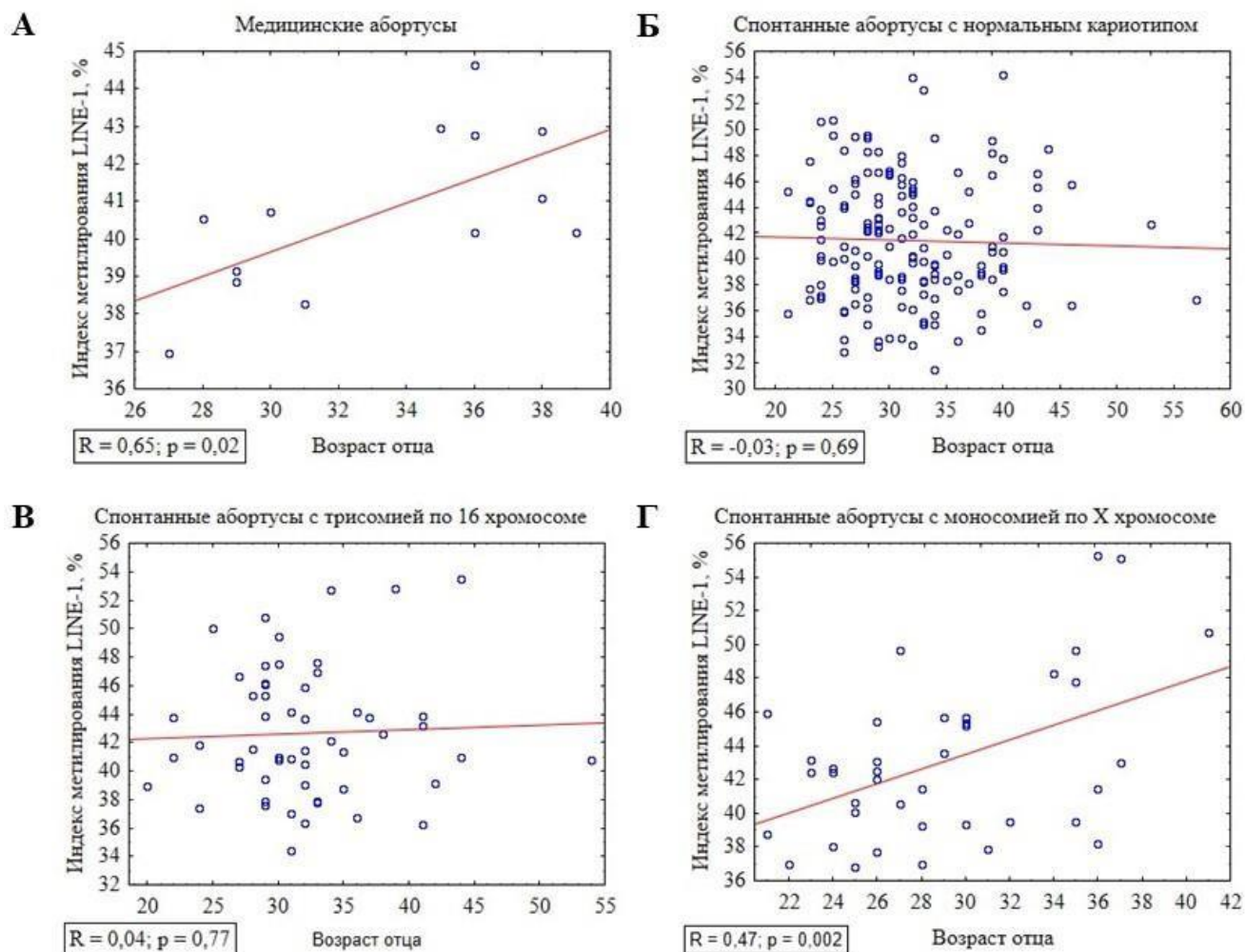


Рисунок 18. Корреляция между индексом метилирования LINE-1 и возрастом отца: А – медицинские абортусы, Б – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, В – спонтанные абортусы с трисомией по 16 хромосоме, Г – спонтанные абортусы с моносомией X-хромосомы.

Таким образом, наши результаты показывают, что существует зависимость индекса метилирования от возраста обоих родителей, что может влиять на различные эпигенетические регуляторные механизмы в плаценте, включая регуляцию ретротранспозонов LINE-1. Так как возраст обоих родителей для медицинских абортусов имеет положительную корреляцию между собой, мы не можем сделать на основании этого заключение, возраст кого из родителей имеет больший вклад в изменение индекса метилирования LINE-1 (Рисунок 19).

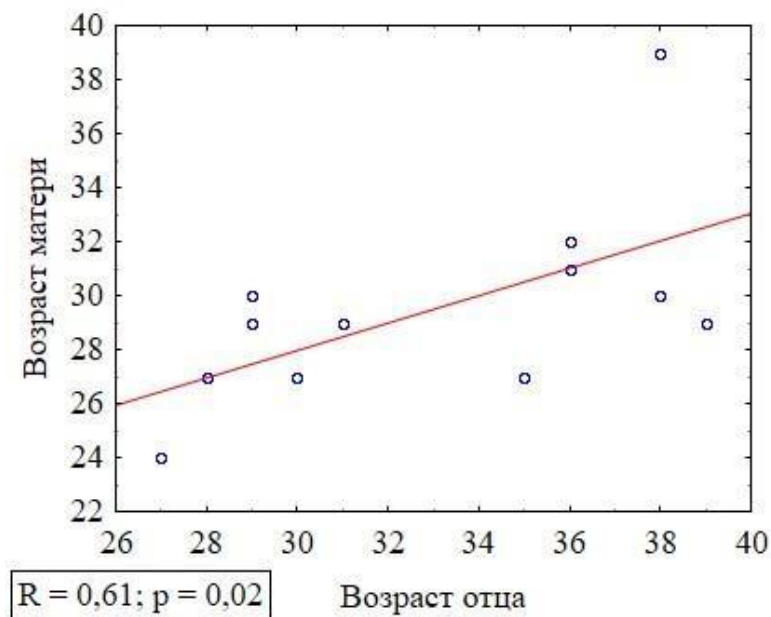


Рисунок 19. Корреляция между возрастом родителей медицинских абортусов

Как известно, увеличение возраста отца связано с повышением количества мутаций в ДНК, хромосомными анеуплоидиями и эпигенетическими изменениями, которые могут передаваться потомству, приводя к нарушениям здоровья [Kaltsas A. et al., 2023]. Изменение статуса метилирования LINE-1 может является одним из факторов, влияющих на данную связь. Так, в одном из исследований было показано, что уровень метилирования LINE-1 в сперматозоидах здоровых мужчин повышается с возрастом [Jenkins T.G. et al., 2014; Potabattula R. et al., 2020]. В соответствии с этими результатами, недавно было обнаружено, что, в отличие от других клеток, длина теломер в сперматозоидах увеличивается с возрастом, и это связано со снижением экспрессии гена LINE-1 [Berteli T.S. et al., 2023]. Увеличение возраста матери и постовуляторное старение ооцитов также оказывает негативное влияние на качество ооцитов, включая созревание ооцитов, сегрегацию хромосом, эпигенетические модификации и функционирование митохондрий. Однако было показано, что с возрастом в ооцитах происходит снижение общего уровня метилирования генома [Liang X.W. et al., 2011]. Исходя из этого, можно предположить, что наблюдаемая в настоящем исследовании корреляция может объясняться наследованием уровня метилирования LINE-1 от отца.

3.5 Сравнительный анализ уровня метилирования LINE-1 в трофобласте хориона в эмбрионах в семьях с привычным невынашиванием беременности

Все образцы с нормальным кариотипом, трисомией по 16 хромосоме и моносомией X были разделены на две группы: спонтанные абортусы со спорадическим невынашиванием и спонтанные абортусы с привычным невынашиванием беременности. Средний индекс метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов со спорадическим невынашиванием оказался статистически значимо выше в группах спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме ($43,1 \pm 3,9\%$) и моносомией по X-хромосоме ($43,1 \pm 5,2\%$), чем в группе медицинских абортусов ($p < 0,05$). Также индекс метилирования LINE-1 был статистически значимо выше между спонтанными абортусами с нормальным кариотипом и с трисомией по хромосоме 16 ($p = 0,02$). Для подгруппы спонтанных абортусов с нормальным кариотипом индекс метилирования LINE-1 ($41,4 \pm 4,8\%$) не отличался значимо по сравнению с группой медицинских абортусов ($p = 0,4$) (Рисунок 20). Данные результаты совпадают с оценкой индекса метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в первом триместре беременности, описанной в главе 3.1.

При сравнении среднего индекса метилирования LINE-1 в подгруппе спонтанных абортусов с привычным невынашиванием беременности статистически значимые различия были обнаружены только между группой спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме ($42,0 \pm 4,5\%$) и медицинскими абортусами ($p = 0,04$).

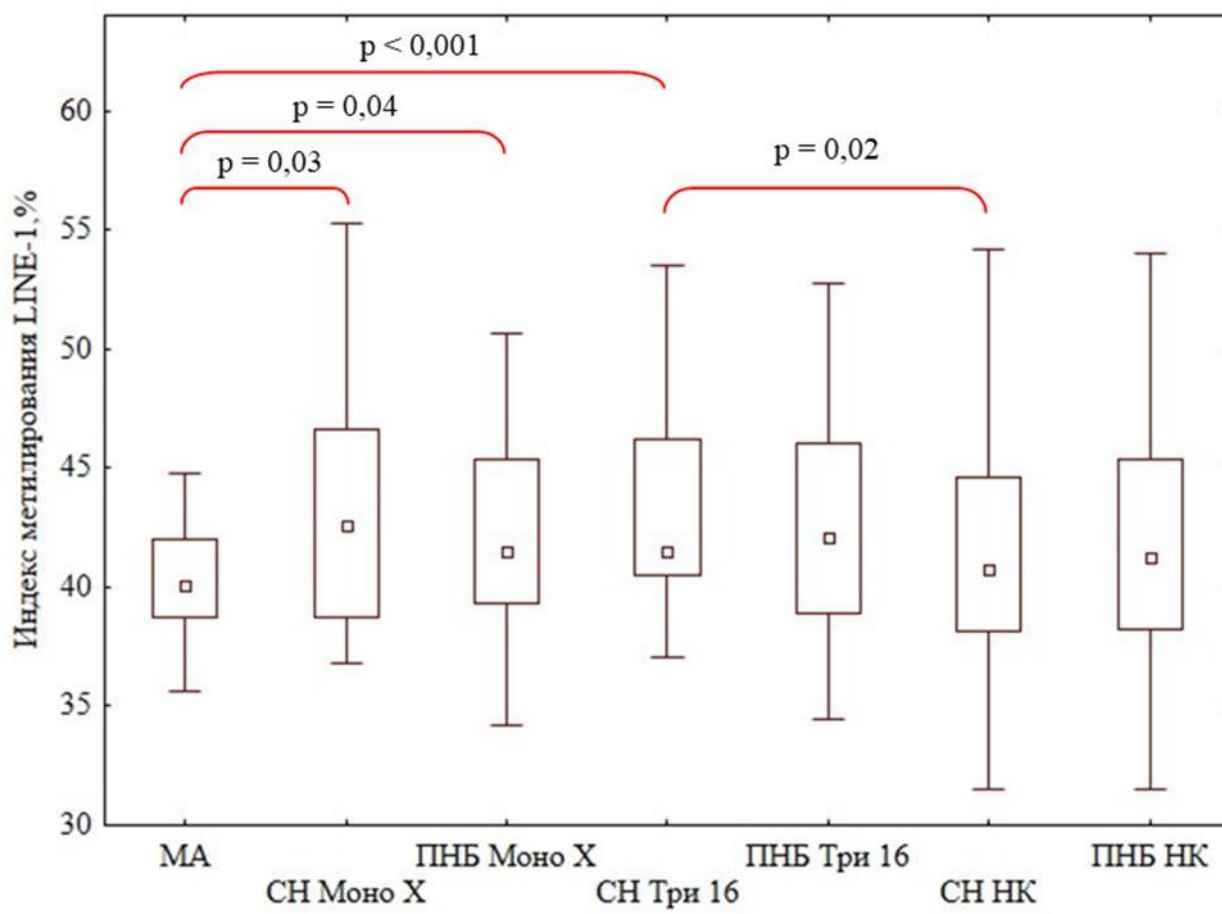


Рисунок 20. Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона у спонтанных абортусов из семей со спорадическим по сравнению с семьями с привычным невынашиванием беременности.

МА – медицинские абортусы, СН Моно Х – спорадическое невынашивание с моносомией Х, СН Три 16 – спорадическое невынашивание с трисомией 16, СН НК – спорадическое невынашивание с нормальным кариотипом, ПНБ Моно Х – привычное невынашивание с моносомией Х, ПНБ Три 16 – привычное невынашивание с трисомией 16, ПНБ НК – привычное невынашивание с нормальным кариотипом

Доля спонтанных абортусов с нормальным кариотипом с индексом метилирования LINE-1, выходящим за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов, была равномерно распределена между группой с привычным невынашиванием беременности и со спорадическим.

Таким образом, при сравнительном анализе уровня метилирования LINE-1 в трофобласте хориона в эмбрионах из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности в анамнезе не было выявлено статистически значимых отличий между группами ($p = 0,9$). При этом в обеих группах значимые отличия по сравнению с медицинскими абортусами были обнаружены только для

спонтанных абортусов с анеуплоидией. Ранее неоднократно наблюдались значимые отклонения профиля метилирования при анеуплоидии по различным хромосомам, в том числе и в плаценте [Lim J.H. et al., 2016, Lim J.H. et al.; 2019; Tolmacheva E.N. et al., 2022]. По-видимому, такие отклонения затрагивают не только промоторы генов, но и значимо влияют на уровень метилирования повторяющихся последовательностей, включая ретротранспозон LINE-1.

Ранее в одном из исследований было показано, что уровень экспрессии мРНК LINE-1 и обратной транскриптазы LINE-1 в тканях спонтанных абортусов с нормальным кариотипом были выше, чем в тканях медицинских абортусов [Lou C. et al., 2022]. В другом исследовании обнаружили снижение уровня метилирования LINE-1 в лимфоцитах периферической крови женщин с невынашиванием беременности [Tisato V. et al., 2024]. Высокая вариабельность уровня метилирования в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом потенциально может быть вызвана аномалиями на этапе установления метилирования генома в гаметогенезе или снятия метилирования генома на стадии дробления. Кроме того, нарушения уровня метилирования LINE-1 могут потенциально возникать в процессе эмбриогенеза вследствие недостатка фолатов, являющихся донорами метильных групп для ДНК-метилтрансферазы. Установить конкретную причину для спонтанных абортусов не представляется возможным, хотя известно, что аномалии метилирования ретротранспозона LINE-1 наблюдаются уже в гаметогенезе [Malki S. et al. 2014] и при мейозе [Yuan P. et al., 2021]. В целом результаты указывают на то, что нарушение уровня метилирования LINE-1 может быть маркером эмбриональной гибели части спонтанных абортусов как при спорадическом, так и при привычном невынашивании беременности.

Дополнительно было решено оценить влияние материнских факторов, таких как отягощенный гинекологический анамнез и наличие других заболеваний, которые не связаны с репродуктивной системой (Таблица 11).

Таблица 11. Доля спонтанных абортусов с нормальным кариотипом с индексом метилирования LINE-1, выходящим за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов, в зависимости от отягощенности материнского анамнеза

		Количество (доля) абортусов с аномалиями метилирования	Всего абортусов
Границы индекса метилирования у МА (non-outlier range)		33,68 – 46,96%	
ОАА	Гипер	10 (12,1%)	82
	Гипо	3 (3,6%)	
ОАГА	Гипер	11 (14,8%)	74
	Гипо	3 (4%)	
ОАА+другие заболевания	Гипер	1 (4,5%)	22
	Гипо	0	
Итого		28 (15,7%)	178

Примечание: ОАА – отягощенный акушерский анамнез, ОАГА – отягощенный акушерско-гинекологический анамнез

Почти все случаи, выходящие за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов, были распределены равномерно между группой с отягощенным акушерским анамнезом, без других сопутствующих заболеваний и группой с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом. Для третьей группы был всего один случай, выходящий на границы нормальной вариации.

Для спонтанных абортусов с нормальным кариотипом с индексом метилирования LINE-1, не выходящим за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов, возможно есть другие причины, которые могли послужить фактором, приводящим к невынашиванию. Например, причиной самопроизвольного аборта могут быть мутации отдельных генов [Colley E. et al., 2019]. В данном обзоре был описан ряд возможных генов, точковые мутации и вариации числа копий (CNV) в которых могут быть причиной невынашивания беременности, включая *CHRNA1* (холинергический рецептор, никотиновый, альфа-полипептид 1), *DYNC2H1* (динеин, цитоплазматический 2, тяжелая цепь 1) и *RYR1* (рианодинергический рецептор 1). В исследовании Y. Fang с соавторами показано, что экспрессия *VEGF* (васкулярный эндотелиальный фактор роста),

часть сигнального пути ангиогенеза, была значительно снижена в тканях спонтанных абортусов и коррелировала с повышенными уровнями *VEGFR1* (рецептор 1 сосудистого эндотелиального фактора роста) и рецептора Notch-1 [Fang Y. et al., 2013]. С привычным невынашиванием беременности ассоциированы полиморфизмы генов цитокинов, различные аллели главного комплекса гистосовместимости HLA и генетические варианты в генах воспалительных факторов и белка синаптонемного комплекса 3 (SYCP3) [Aruna M. et al., 2011; Rull K. et al., 2012].

3.6 Анализ связи уровня метилирования LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей

Кроме того, в настоящей работе была проведена оценка корреляции уровней метилирования LINE-1 в хорионе пар спонтанных абортусов из одних и тех же семей. Предварительно было выявлено, что из 21 исследованных пар спонтанных абортусов из одних и тех же семей 16 пар спонтанных абортусов являлись полными sibсами, 5 пар – полусибсами с общими матерями (Таблица 12).

Средний уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 был значимо выше у всех первых абортусов по сравнению со всеми последующими абортусами в парах ($47,7 \pm 7,2\%$ против $43,9 \pm 6,8\%$, $p=0,0004$). При анализе уровня метилирования отдельных CpG-сайтов уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 был значимо выше у всех первых абортусов по сравнению со всеми последующими абортусами в парах для большинства проанализированных CpG-сайтов (кроме CpG_2, CpG_3, CpG_11) (Рисунок 21).

Таблица 12. Характеристика спонтанных абортусов из одних и тех же семей

Номер семьи	Родство	Сибс 1	Сибс 2
1	сибс	46,XX	47,XX,+16
2	сибс	46,XX	46,XX
3	сибс	47,XX, +7	47,XY,+9
4	полусибс	46,XY	46,XY
5	сибс	69,XXY	47,XY+22
6	сибс	46,XY	47,XX+9
7	полусибс	46,XX	46,XY
8	сибс	46,XX	46,XY
9	сибс	47,XY+22	47,XX+9
10	полусибс	46,XX	47,XX,+16[110]/ 46,XX[11]
11	сибс	46,XX	46,XX
12	полусибс	46,XY	47,XY,+16[15]/ 46,XY[85]
13	сибс	46,XY	46,XY
14	сибс	69,XXX	69,XXY
15	сибс	46,XY	46,XY
16	сибс	46XY	47,XY,+16[77]/94,XXYY,+16,+16 [23]
17	сибс	46,XX	46,XX
18	сибс	47,XX+16	46,XX
19	сибс	46,XY	46,XX
20	сибс	47,XY,+16[22]/ 46,XY[78]	46,XY
21	полусибс	47,XY+22	46,XY

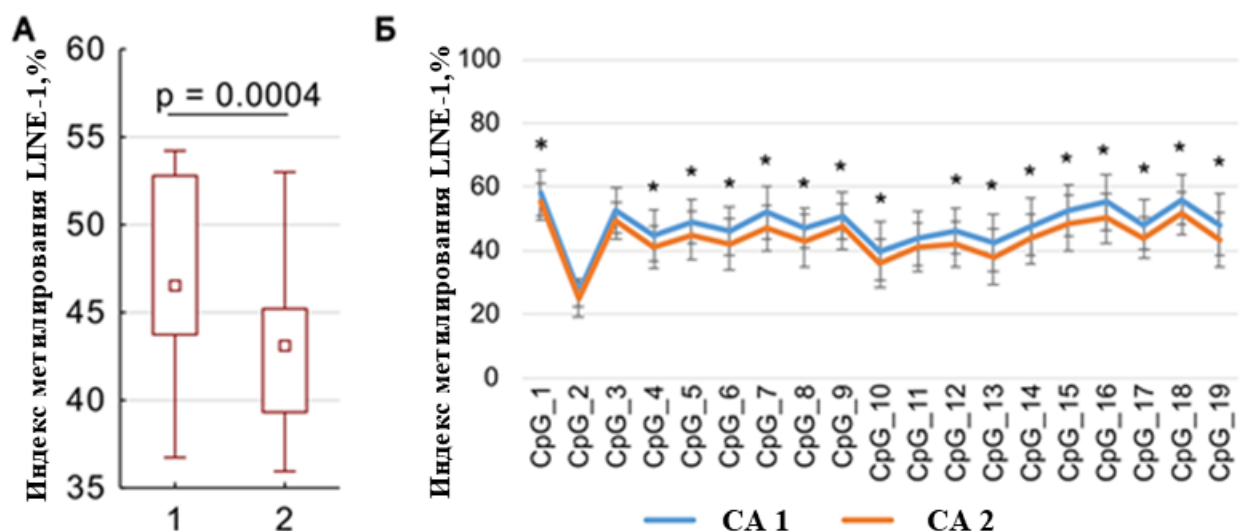


Рисунок 21. Профиль метилирования 19 CpG-сайтов в промоторе ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей у всех первых абортусов по сравнению со всеми последующими абортусами в парах. А. Отличие среднего уровня метилирования LINE-1 между первыми и последующими абортусами в парах. Б. Отличия профиля метилирования LINE-1 между первыми и последующими абортусами в парах. * - $p < 0.05$ (критерий Стьюдента для зависимых выборок).

Было также обнаружено, что уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 значимо коррелирует у спонтанных абортусов из одних и тех же семей ($n=21$ пар, $R=0,71$, $p=0,0003$) (Рисунок 22). Для пар спонтанных абортусов с нормальным кариотипом ($n=10$) корреляция остается значимой ($R=0,74$, $p=0,015$), тогда как для пар спонтанных абортусов, в которых один из абортусов имеет анеуплоидию, корреляция становится статистически незначимой ($n=8$, $R=0,64$, $p=0,08$). Если исключить из всего анализа без учета кариотипа спонтанных абортусов полусибсов ($n=5$), то корреляция также остается значимой ($n=16$ пар, $R=0,67$, $p=0,005$). В качестве выборки неродственных абортусов использовалась выборка спонтанных абортусов с нормальным кариотипом ($n=178$) и неродственных медицинских абортусов ($n=46$), для которых был проанализирован уровень метилирования LINE-1 [Vasilyev S. A. et al., 2021]. Значимых корреляций обнаружено не было.

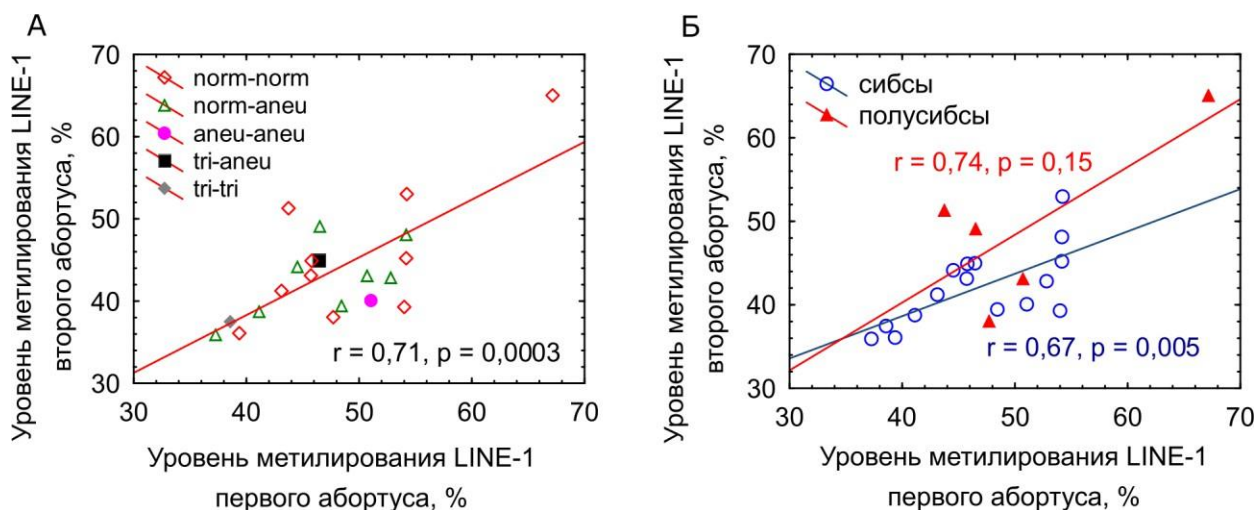


Рисунок 22. Корреляция уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей. В качестве первого абортуса взят хронологически более ранний абортус, в качестве второго – более поздний. Анализ проведен с помощью коэффициента корреляции Пирсона. А. Корреляция уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона для всех образцов (n=20 пар) с выделением пар образцов с различным кариотипом (norm-norm – оба спонтанных абортуса с нормальным кариотипом, norm-aneu – один из спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, другой с анеуплоидией, norm-aneu – оба спонтанных абортусов с анеуплоидией, tri-aneu – один из спонтанных абортусов с триплоидией, другой с анеуплоидией, tri-aneu – оба спонтанных абортусов с триплоидией). Б. Корреляция уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона для подгрупп спонтанных абортусов, являющихся друг другу полными сибсами (голубые круги) (n=16) или полусибсами (красные треугольники) (n=5).

Кроме того, корреляционный анализ уровня метилирования у спонтанных абортусов был проведен для всех возможных перестановок между первым и вторым спонтанными абортусами в семье. В результате во всех случаях корреляция оказывалась значимой ($R=0,59 \pm 0,02, p=0,0055 \pm 0,0016$) (Рисунок 23).

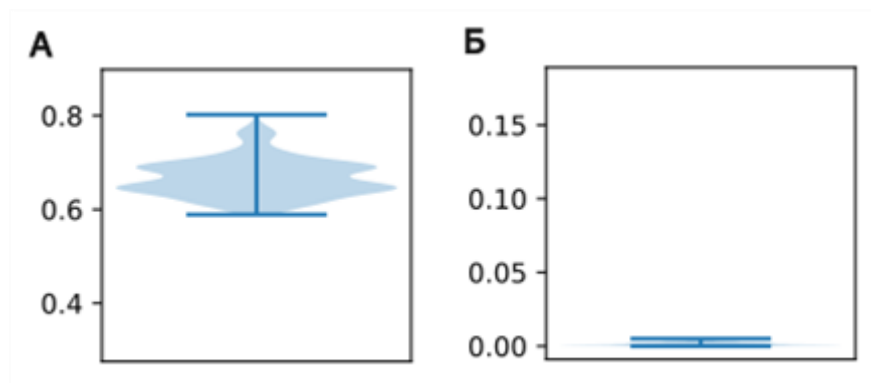


Рисунок 23. Корреляция уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей для всех возможных перестановок между первым и вторым спонтанными абортусами в 21 паре (2097152 варианта). А – коэффициент корреляции. Б – значение р.

Профиль метилирования в проанализированном участке ретротранспозона LINE-1 показывает, что в целом все CpG-сайты имели сходную вариабельность среди проанализированных спонтанных абортусов ($CV=11,6-22,5\%$, Рисунок 21). При этом выделяется CpG_2, имеющий значительно более низкий уровень метилирования ($25,8\pm 5,0\%$) по сравнению с остальными проанализированными CpG-сайтами ($37,9-56,7\%$).

Анализ корреляции между уровнями метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей для всех возможных перестановок между первым и вторым спонтанными абортусами был также проведен отдельно для каждого проанализированного CpG-сайта в LINE-1. Результаты показали, что уровень метилирования различных CpG-сайтов LINE-1 в разной степени коррелирует между первым и вторым спонтанными абортусами из одних и тех же семей (Рисунок 23, 24). Наиболее выраженная и одновременно наиболее значимая корреляция отмечалась для CpG_15 и CpG_17. Наименее выраженная и наименее значимая корреляция наблюдалась для CpG_2 (Рисунок 24, 25). Этот же CpG-сайт характеризовался наименьшим уровнем метилирования из всех проанализированных CpG-сайтов (Рисунок 23).

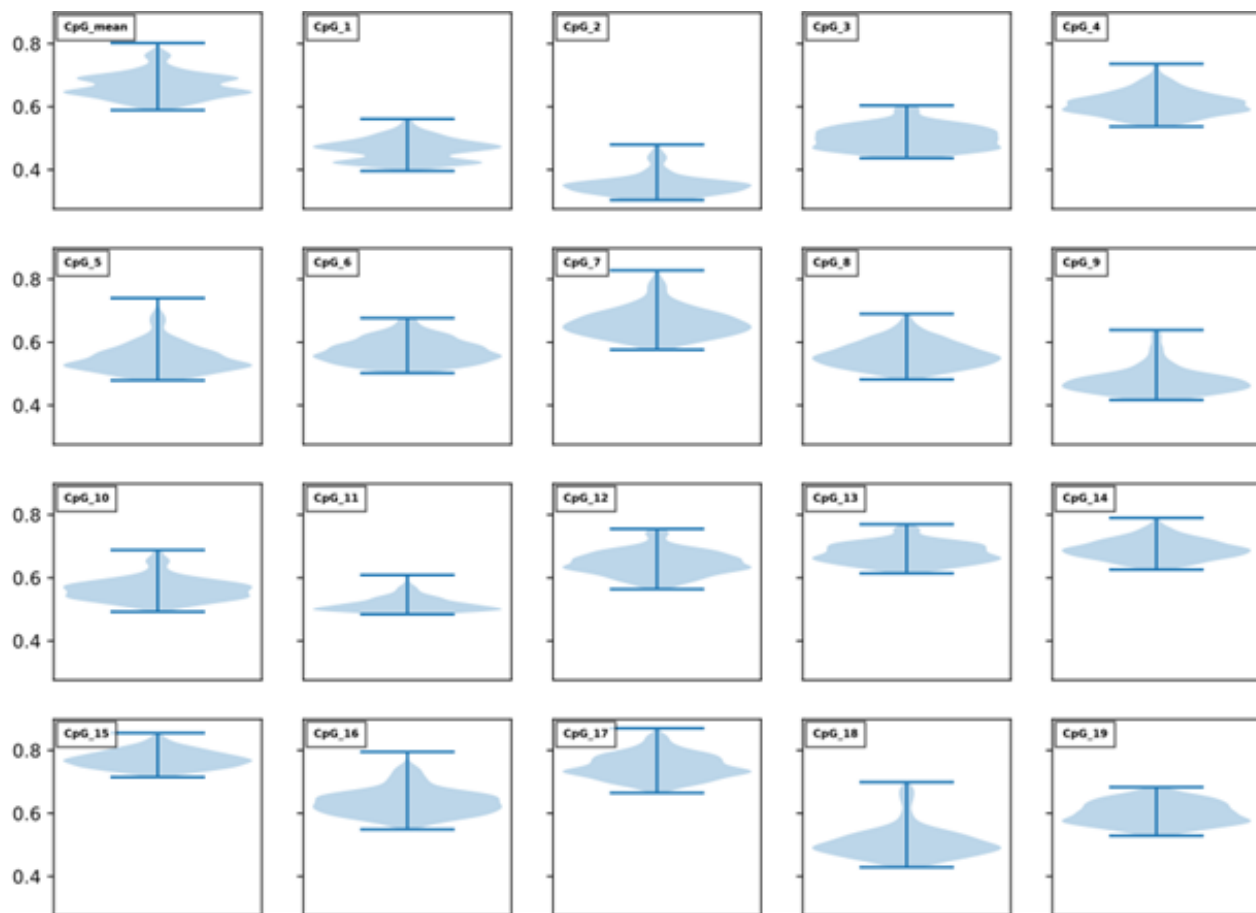


Рисунок 24. Коэффициенты корреляции уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей для всех возможных перестановок между первым и вторым спонтанными абортусами в 21 паре (2097152 варианта) отдельно для 19 проанализированных CpG-сайтов.

В данном случае мы наблюдаем более выраженную корреляцию индекса метилирования ретротранспозона LINE-1 между спонтанными абортусами-сибсами, чем между неродственными спонтанными абортусами, что может быть связано с возникновением аномалий метилирования на стадии примордиальных клеток и трансгенерационным эпигенетическим наследованием. На сегодняшний день данные механизмы у человека довольно плохо изучены, однако существуют литературные данные, в которых предполагается существование данного варианта наследования [Da Cruz R.S. et al., 2020; King S. E., Skinner M. K., 2020]. Например, было показано, что в сперматозоидах сохраняется 4% гистонов, несущие посттрансляционные модификации, на которые влияют ландшафты отцовского хроматина и задают паттерны экспрессии в раннем эмбриогенезе [Brykczynska U. et al., 2010; Gold H.B. et al., 2018; Jung Y.H. et al., 2017],

увеличивая возможность эпигенетического наследования по крайней мере в определенных локусах.

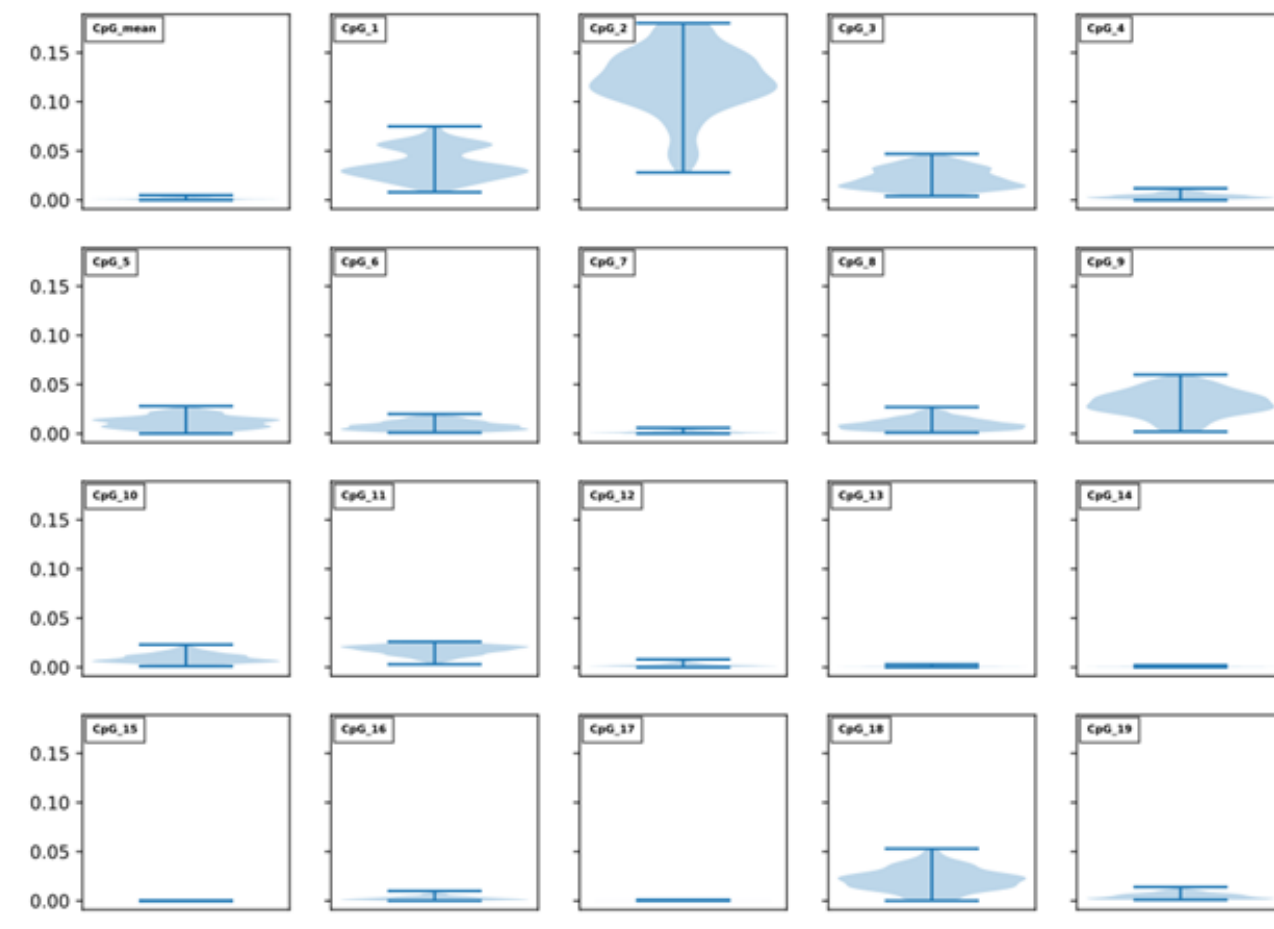


Рисунок 25. Значения p-value при анализе корреляции уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей для всех возможных перестановок между первым и вторым спонтанными абортусами в 21 паре (2097152 варианта) отдельно для 19 проанализированных CpG-сайтов.

3.7 Анализ экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* с канонических и альтернативных промоторов LINE-1

Как рассматривалось в обзоре литературы, LINE-1 содержит антисмысловые промоторы, которые активно транскрибируются в различных типах клеток человека, в том числе и в эмбриональных тканях [Criscione S. W. et al., 2016]. Для анализа возможности экспрессии генов с антисмысловых промоторов LINE-1 в зависимости от уровня метилирования LINE-1 среди генов, потенциально

способных к экспрессии с альтернативных промоторов LINE-1, с помощью инструмента STRING было отобрано два, *NUP153* и *YWHAB*, продукты которых показали высокий уровень экспрессии в плаценте и функционально связаны с белками, участвующими в дифференцировке трофобласта (по данным Gene Ontology: GO:0061450, trophoblast cell migration; GO:0097360, chorionic trophoblast cell proliferation; GO:0001890, placenta development) (Рисунок 26). Ген *NUP153* функционирует как каркасный элемент в ядерной фазе комплекса ядерных пор и необходим для нормального ядерно-цитоплазматического транспорта белков и мРНК как во время митоза соматических клеток [Bilir S. et al., 2019], так и в эмбриональных стволовых клетках мыши [Souquet et al., 2018]. Ген *YWHAB* относится к группе генов, отвечающих за передачу сигнала путем связывания с фосфосеринсодержащими белками. Белок, кодируемый геном, взаимодействует с фосфатазами RAF1 и CDC25 и может играть роль в митогенной передаче сигналов и механизмах клеточного цикла. В клеточной линии фибробластов, выделенной из эмбрионов мышей, было показано, что сверхэкспрессия *YWHAB* стимулирует и поддерживает независимый от прикрепления рост клеток [Sasaki Y. et al., 2014].

Уровень экспрессии для обоих генов был выше с канонических промоторов в лимфоцитах крови, чем в тканях плаценты (для гена *NUP153* – в 12,5 раза, для гена *YWHAB* – в 4,6 раза, $p < 0,05$). Однако уровень экспрессии гена *NUP153* с альтернативных промоторов LINE-1 был статистически значимо выше в экстраэмбриональных тканях по сравнению с лимфоцитами взрослых индивидов (в ворсинах хориона — в 17 раз, в экстраэмбриональной мезодерме — в 23 раза, $p < 0,05$) (рис. 26). Можно предположить, что в плаценте благодаря гипометилированию происходит синтез укороченных транскриптов с генов, в интронах которых есть LINE-1. В пользу данного предположения также свидетельствует обогащение генов, которые специфично экспрессируются в плаценте среди всех генов, которые могут быть транскрибированы с промоторов LINE-1 [Criscione S. W. et al., 2016].

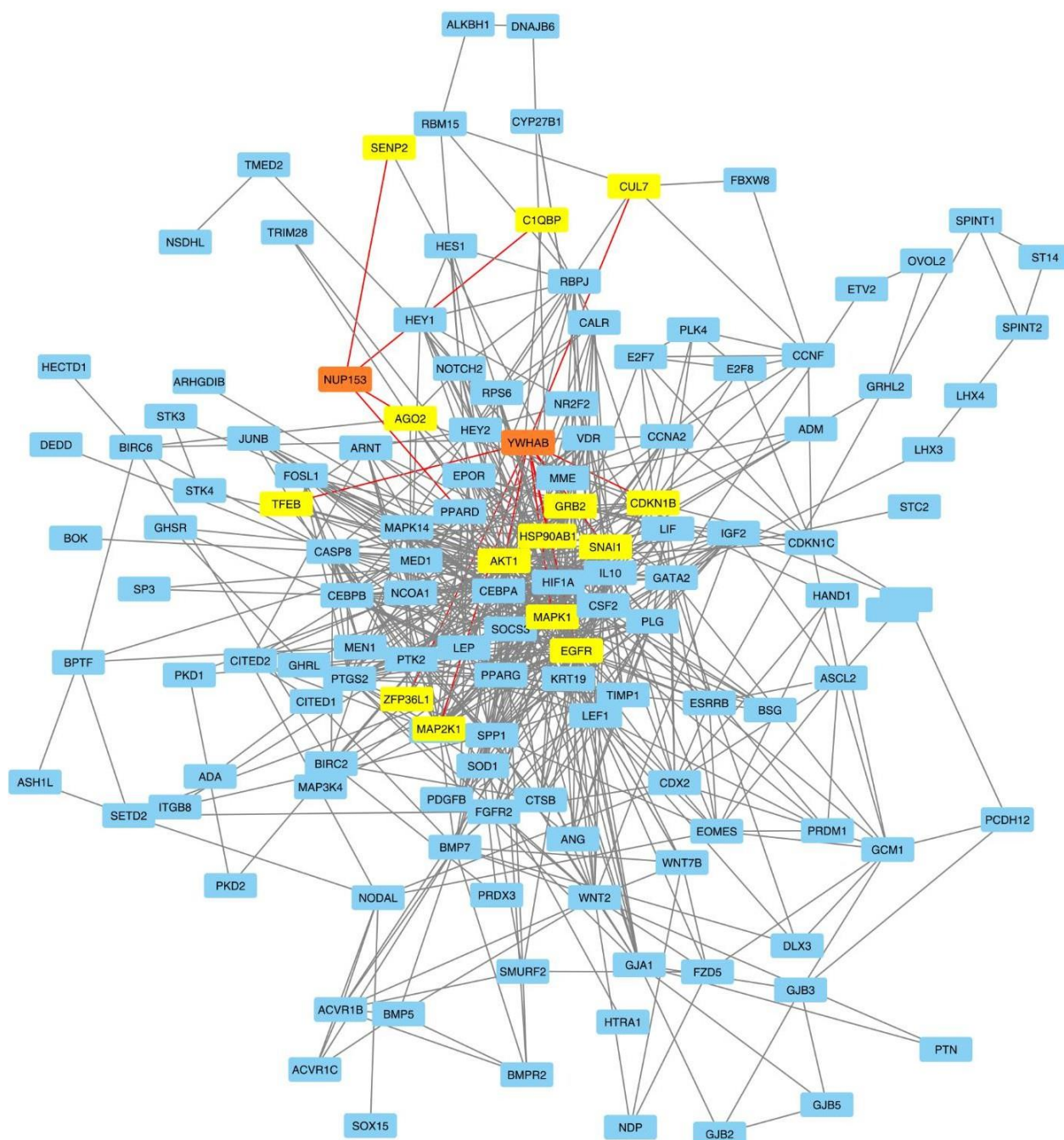


Рисунок 26. Функционально значимые связи генов, участвующих в развитии плаценты (GO:0061450, GO:0097360, GO:0001890), с генами *NUP153* и *YWHAB* по данным STRING.

Примечание: желтым цветом показаны гены, имеющие функциональные связи (выделены красным) с генами *NUP153* и *YWHAB* (отмечены оранжевым цветом) (STRING, score > 0,4).

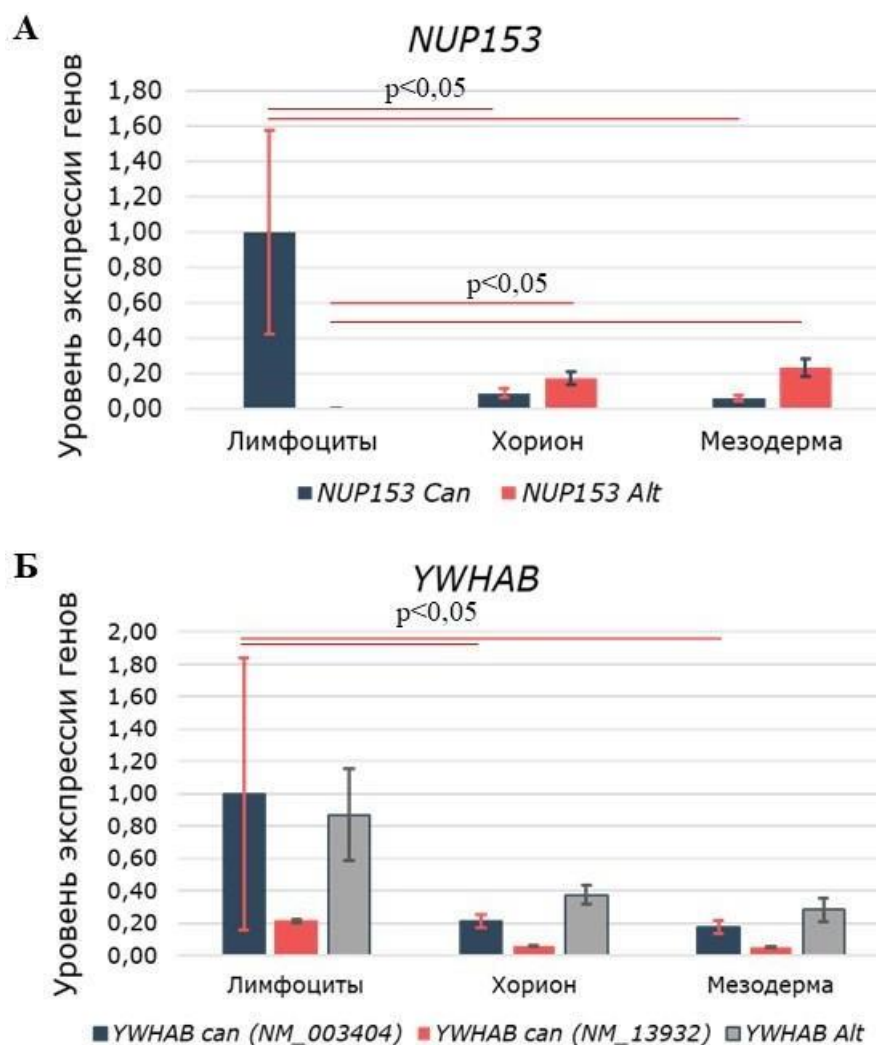


Рисунок 27. Сравнение уровня экспрессии генов *NUP153* (А) и *YWHAB* (Б) с канонических промоторов и альтернативных промоторов LINE-1 в лимфоцитах крови, хорионе и мезодерме плаценты ($p < 0,05$).

Примечание: Значения приведены в виде кратности различий относительно уровня экспрессии генов с канонического промотора в лимфоцитах взрослых индивидов. Для гена *YWHAB* приведены уровни экспрессии двух различных транскриптов с канонического промотора (NM_003404, NM_139323). Референсный ген – *GAPDH*. can – канонический промотор, alt – альтернативный промотор LINE- 1.

При сравнении групп спонтанных и медицинских абортусов между собой уровень экспрессии обоих генов с канонических промоторов был выше в группе СА с моносомией X, чем в группах СА с нормальным кариотипом (для гена *NUP153* — в 3,7 раза, для гена *YWHAB* — в 4,5 раза, $p < 0,05$), СА с трисомией 16 (для гена *NUP15* — в 3,9 раз, для гена *YWHAB* — в 4,3 раза, $p < 0,05$) и МА (для гена *YWHAB* — в 3,1 раза, $p < 0,05$) (рис. 27).

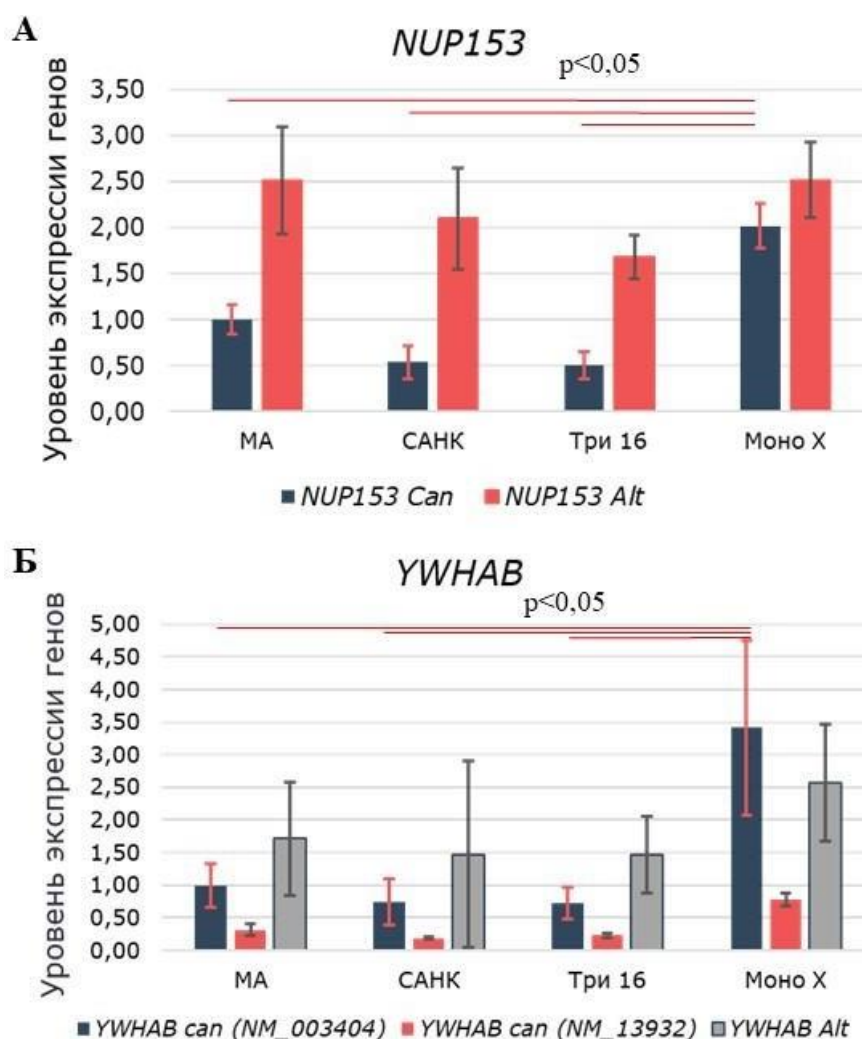


Рисунок 28. Сравнение уровня экспрессии генов *NUP153* (А) и *YWHAB* (Б) с канонических промоторов и альтернативных промоторов LINE-1 между группами спонтанных абортусов и медицинских абортусов ($p < 0,05$).

Примечание: Значения приведены как кратные различия относительно уровня экспрессии генов канонического промотора медицинских абортусов. CANK – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, Три16 – спонтанные абортусы с трисомией по хромосоме 16, Моно X – спонтанные абортусы с моносомией X.

Для данной подгруппы эмбрионов был также оценен уровень метилирования в промоторе ретротранспозона LINE-1. Средний уровень метилирования LINE-1 в ворсинах хориона СА составил: с трисомией 16 – $41,9 \pm 5,8\%$, моносомией X – $39,7 \pm 3,6\%$, с нормальным кариотипом – $38,4 \pm 3,9\%$. Индекс метилирования LINE-1 отрицательно коррелировал с уровнем экспрессии генов как с канонических (*NUP153* – $R = -0,59$, $p < 0,003$; *YWHAB* – $R = -0,52$, $p < 0,01$), так и с альтернативных промоторов LINE-1 (*NUP153* – $R = -0,46$, $p = 0,03$; *YWHAB* – $R = -0,66$, $p = 0,001$) (Рисунок 29).

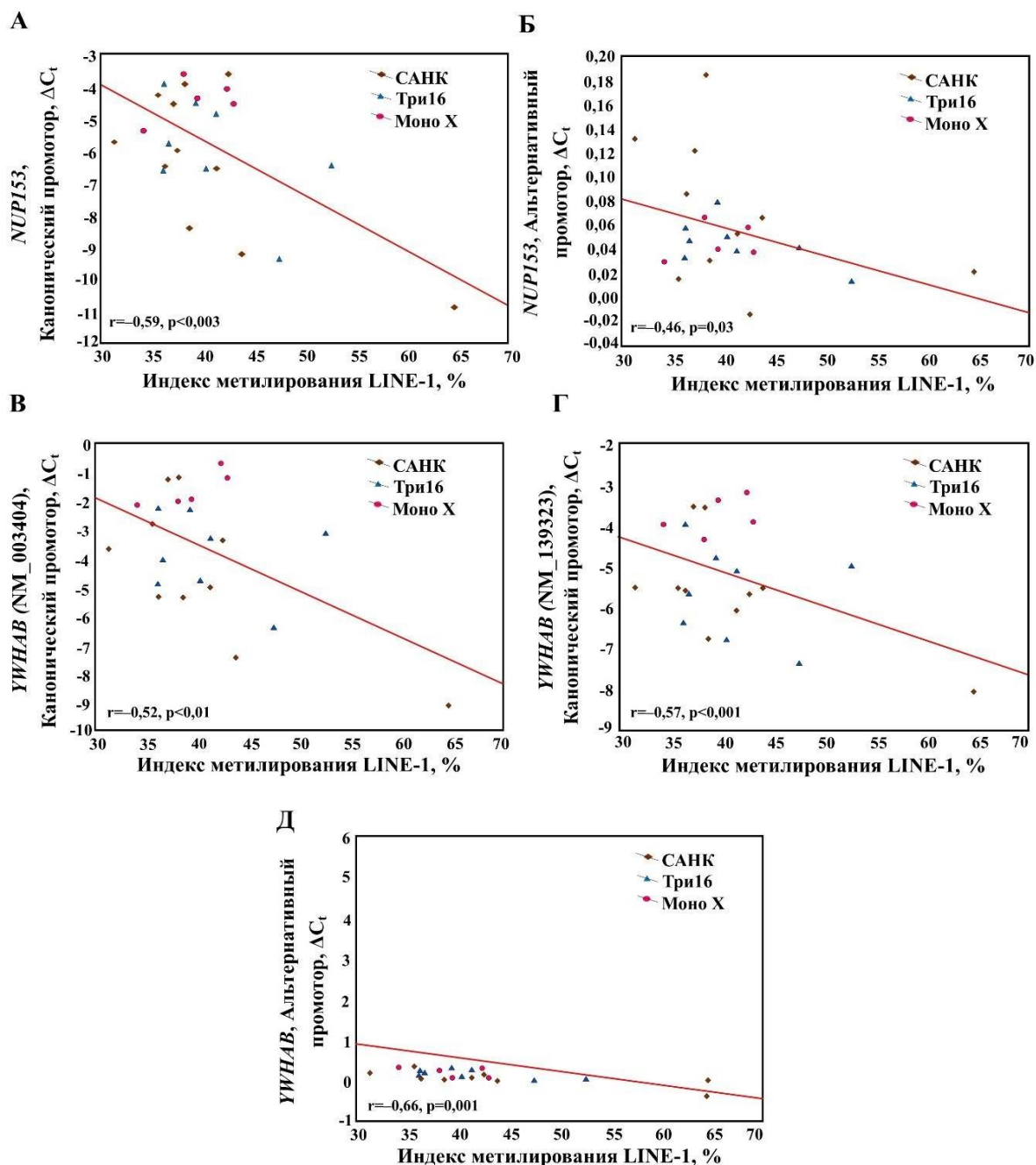


Рисунок 29. Корреляция уровней экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* с уровнем метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, трисомией 16 и моносомией.

Примечание. А – корреляция экспрессии гена *NUP153* с канонического промотора и индекса метилирования LINE-1, Б – корреляция экспрессии гена *NUP153* с альтернативного промотора и уровнем метилирования LINE-1, В – корреляция экспрессии гена *YWHAB* (NM_003404) с канонического промотора и индекса метилирования LINE-1, Г – корреляция экспрессии гена *YWHAB* (NM_139323) с канонического промотора и уровня метилирования LINE-1, Д – корреляция экспрессии гена *YWHAB* с альтернативного промотора и уровня метилирования LINE-1. САМК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, Три16 – спонтанные абортусы с трисомией по хромосоме 16, Моно X – спонтанные абортусы с моносомией X.

Таким образом, в настоящей работе было обнаружено, что уровень экспрессии для генов *NUP153* и *YWHAB* в плаценте имел значение ниже с канонических промоторов по сравнению с лимфоцитами крови взрослых индивидов, однако экспрессия гена *NUP153* с альтернативного промотора LINE-1 фиксировалась выше в плаценте. Полученный результат свидетельствует в пользу гипотезы о том, что в плаценте вследствие гипометилированного эпигенетического ландшафта может активироваться экспрессия генов с альтернативных промоторов, полученных от ретровирусов и ретротранспозонов. Эта гипотеза также подтверждается наличием генов, которые специфически экспрессируются в плаценте, среди всех генов, обладающих способностью транскрибироваться с альтернативных промоторов LINE-1 [Criscione S. W. et al., 2016].

Нами не было обнаружено значимых отличий по уровню экспрессии генов *YWHAB* и *NUP153* с альтернативных промоторов между группами спонтанных абортусов с различным кариотипом и контрольной группой медицинских абортусов. При этом уровень экспрессии обоих генов с канонических промоторов был выше в группе спонтанных абортусов с моносомией X. Однако обнаружено, что уровень экспрессии изученных генов изменяется у отдельных спонтанных абортусов в зависимости от изменения уровня метилирования в геноме. Полученные данные наглядно демонстрируют, что уровень экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* с канонических и альтернативных промоторов LINE-1 коррелирует с уровнем метилирования LINE-1: чем выше уровень метилирования LINE-1, тем ниже экспрессия генов.

Причин связи уровня метилирования LINE-1 с экспрессией исследуемых генов с обоих промоторов может быть несколько. Во-первых, короткий транскрипт с альтернативного промотора может быть связан с активацией транскрипции гена с канонического промотора. Однако такой вариант представляется маловероятным, так как уровень экспрессии исследованных генов с канонических промоторов на фоне гипометилирования генома в плаценте был ниже, чем в лимфоцитах, для которых характерен уровень метилирования LINE-1 более 70% [Rosser J.M., An W., 2012], хотя при верности высказанной гипотезы должно было быть наоборот.

Во-вторых, уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 может отражать глобальный уровень метилирования генома и уровень метилирования в каноническом промоторе исследуемых генов. Этот вариант представляется более вероятным, но также не снимает вопрос о сниженной экспрессии исследованных генов в плаценте на фоне гипометилированного эпигенетического ландшафта по сравнению с лимфоцитами взрослых индивидов. По-видимому, экспрессия исследуемых генов регулируется не только с помощью метилирования, но и тканеспецифичными факторами транскрипции.

Остается неясным, играет ли изменение экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* как с канонических, так и с альтернативных промоторов функциональную роль в жизнедеятельности плаценты или эти транскрипты являются побочным продуктом гипометилирования генома. Потенциально, нарушение работы гена *NUP153* может оказывать негативное влияние на ядерно-цитоплазматический транспорт белков и мРНК, а нарушение работы гена *YWHAB* может влиять на передачу клеточных сигналов. Продукты генов *NUP153* и *YWHAB* имеют значимые функциональные связи с белками, участвующими в дифференцировке трофобласта (Рисунок 26). Для гена *NUP153* такими генами являются: *AGO2*, *SEN2*, *CIQBP*, *PPARD*. Для *YWHAB* список значимых связей шире – он взаимодействует с генами *TFEB*, *CUL7*, *ZFP36L*, *MAP2K1*, *AKT1*, *CDKN1B*, *SNAI1*, *MAPK1*, *EGFR*. Нарушение работы каждого из этих генов оказывает негативное влияние на нормальное течение эмбриогенеза. Например, нормальная экспрессия *MAPK1* необходима для развития внеэмбриональной эктодермы во время плацентогенеза, а его отсутствие может приводить к гибели эмбриона из-за аномального развития и гиповаскуляризации плаценты [Bissonauth T. et al., 2006]. Ген *CUL7* активно экспрессируется в клеточных линиях трофобласта. Дефицит белка Cul7 связан с задержкой внутриутробного развития из-за аномального развития плаценты, что приводит к плохому снабжению плода кислородом [Fahlbusch F. B. et al., 2012]. На более поздних сроках гестации дефицит может приводить к возникновению кожных или гиподермальных кровоизлияний, а также развитию трофобласта с аномальной сосудистой структурой [Arai T. et al., 2003]. Мутации *CUL7* в клетках зародышевой линии связаны с синдромом 3-М и синдромом низкого роста у

якутов, оба из которых характеризуются пре- и постнатальной задержкой роста [Fu J. et al., 2010; Maksimova N. et al., 2007]

Ген *SENP2* принадлежит к семейству белков убиквитин-подобных и локализован в клетке в ядерных порах и цитоплазме [Talamillo A. et al., 2020]. Мутации *SENP2* вызывают нарушение прогрессирования клеточного цикла во время развития трофобласта у мышей: делеция гена *SENP2* нарушает путь p53/Mdm2, влияя на клетки предшественники трофобласта и на их созревание [Chiu S.Y. et al, 2008]. Во время дальнейшей дифференцировки *SENP2* оказывает влияние на нормальное развитие кардиомиоцитов. Сверхэкспрессия вызывает аномальную пролиферацию кардиомиоцитов с нарушенной регуляцией циклина и ингибиторов циклин-зависимой киназы, что приводит к врожденным аномалиям развития сердца [Kim E.Y. et al., 2012]. С другой стороны, делеции *SENP2* также вызывают дефекты развития миокарда из-за снижения пролиферации [Kang X. et al., 2010].

Логично предположить, что существующие функциональные связи генов *NUP153* и *YWHAB* с генами, участвующими в том числе и в дифференцировке трофобласта, могут идти как в негативном направлении, так и в протективном. Патологическое изменение экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* может потенциально приводить к нарушению работы других генов, формированию особенного фенотипа у пациентов или даже закончиться эмбриональной гибелью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Репродуктивные потери у человека — чрезвычайно частое явление, в этиологии которого важную роль играют числовые хромосомные aberrации и нарушение эпигенетической программы развития [Quenby S. et al., 2021]. Причиной гибели половины спонтанных абортусов является анеуплоидия, которая возникает спонтанно в мейозе и первых делениях митоза. Механизмы, приводящие к гибели эмбрионов, обычно связываются с дисбалансом генов на сверхчисленных или недостающих хромосомах. Возникновение анеуплоидий совпадает с двумя волнами эпигенетического перепрограммирования, при которых происходит резкое снижение уровня метилирования ДНК всего генома [Tolmacheva E.N. et al., 2020]. Данный процесс затрагивает не только гены, но и другие области генома, включая различные повторяющиеся последовательности [Tolmacheva E.N. et al., 2022], одним из которых является ретротранспозон LINE-1 [Ardeljan D. et al., 2022].

Индекс метилирования промотора LINE-1 является одним из наиболее часто используемых маркеров для оценки глобального уровня метилирования генома в различных клетках и тканях человека [Benitez-Trinidad A.B. et al., 2018; Ропомарьова А.А. et al., 2021]. В настоящей работе нами был разработан новый подход для анализа метилирования ДНК в промоторе ретротранспозона LINE-1, который был основан на технологии NGS. Данный протокол позволяет оценить индекс метилирования ДНК 19 CpG-сайтов в промоторе LINE-1, которые имеют наибольшую ткане- или опухолеспецифическую вариабельность. Метод дает возможность определить профиль метилирования ДНК для анализа либо индекса метилирования каждого CpG-сайта отдельно, либо среднего индекса метилирования ДНК в промоторе LINE-1 и дает более полную картину для исследования.

С помощью разработанного метода было показано, что индекс метилирования LINE-1 повышается в трофобласте ворсин хориона спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме и моносомией по X-хромосоме. Для 15,7% спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, что соответствует какому восьмому

спонтанному абортусу, также наблюдался абберантный индекс метилирования LINE-1 в ворсинах хориона по сравнению с медицинскими абортусами. Таким образом, наличие более высокого индекса метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов с анеуплоидией по различным хромосомам, а также у части спонтанных абортусов с нормальным кариотипом может указывать на то, что повышение уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 является распространенным нарушением в эмбриогенезе человека.

Также была выявлена положительная корреляция индекса метилирования LINE-1 с родительским возрастом в группе медицинских абортусов, которая косвенно указывает на то, что индекс метилирования LINE-1 может передаваться из поколения в поколение. В случае возникновения аномалий метилирования в мейозе такие аномалии могут быть специфичными для отдельных ооцитов и/или сперматозоидов и выявление аномалии у одного спонтанного абортуса не будет влиять на риск возникновения повторного невынашивания беременности в будущем. Однако в случае возникновения аномалий метилома на стадии примордиальных клеток нарушения метилирования будут наблюдаться в пуле гамет, повышая риск повторного невынашивания беременности.

При сравнении индекса метилирования между группами спонтанных абортусов в семьях с привычным и спорадическим невынашиванием беременности не было выявлено статистически значимых различий. Однако была обнаружена положительная корреляция для спонтанных абортусов из одних и тех же семей. Это косвенно указывает на то, что патологические изменения метилирования LINE-1 происходят или в мейозе, или до него и должны наблюдаться уже в гаметах. Действительно, ооциты мышей в эмбриональном периоде развития характеризуются широкой вариабельностью уровня метилирования LINE-1 [Malki S. et al., 2014]. Затем слишком низкий уровень метилирования LINE-1 является фактором отбора для ооцитов при резком сокращении их пула в перинатальном периоде. Однако судьба ооцитов с повышенным уровнем метилирования LINE-1 остается неизвестной. Возможно, в них повышается вероятность возникновения анеуплоидии вследствие неизвестных механизмов и именно такие ооциты дают начало эмбрионам с повышенным уровнем

метилирования LINE-1 в плаценте.

Повышенный уровень метилирования ретротранспозона LINE-1, выявленный в настоящей работе, может потенциально влиять на развитие эмбриона несколькими путями. Во-первых, уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 отражает значительные изменения по всему эпигенетическому ландшафту клеток плаценты. Во-вторых, недавно было обнаружено, что многие гены, имеющие вставки ретротранспозона LINE-1 в интронах, могут транскрибироваться с антисмыслового промотора LINE-1, приводя к считыванию укороченного транскрипта гена. Учитывая гипометилированный характер эпигенетического ландшафта плаценты, возможно, что в плаценте альтернативные промоторы LINE-1 не находятся под таким строгим контролем, как в других тканях организма, и считывание с них коротких транскриптов может быть более интенсивным. В настоящей работе нами была подтверждена такая возможность на двух генах – *NUP153* и *YWHAB*, для которых была показана зависимость от уровня метилирования повышенная экспрессия с альтернативных промоторов LINE-1 в плаценте по сравнению с лимфоцитами взрослых индивидов. Таким образом, гипометилированный эпигенетический ландшафт в плаценте повышает экспрессию исследованных генов с альтернативных промоторов ретротранспозона LINE-1, находящихся в интронах. Однако очерчивание границ применимости этой модели для всех или определенного подмножества генов, имеющих такие альтернативные промоторы, требует дополнительных исследований с исследованием всего транскриптома плаценты.

Таким образом, числовые хромосомные аномалии у спонтанных абортусов сочетаются с нарушением метилирования ретротранспозона LINE-1, которые могут вносить ощутимый вклад в реализацию патологических механизмов, приводящих к внутриутробной гибели эмбрионов человека. Полученные результаты указывают на возможное эпигенетическое нарушение дифференцировки трофобласта и регуляции сигнального взаимодействия между эмбрионом и матерью, что является потенциальной причиной прерывания беременности.

ВЫВОДЫ

1. Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме и моносомией по X-хромосоме ($42,9 \pm 4,6\%$ и $42,8 \pm 4,7\%$, соответственно) статистически значимо выше, чем у медицинских абортусов ($40,2 \pm 2,2\%$) ($p < 0,05$).
2. Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона по сравнению с медицинскими абортусами повышен у 12,3% и снижен у 3,4% спонтанных абортусов с нормальным кариотипом.
3. Индекс метилирования LINE-1 статистически значимо выше в объединенной выборке спонтанных абортусов по сравнению с медицинскими абортусами для эволюционно более древних подсемейств L1PA3 ($39,4 \pm 5,0\%$ и $37,4 \pm 2,3\%$, соответственно) и L1PA4 ($30,8 \pm 9,9\%$ и $23,5 \pm 7,1\%$, соответственно) ($p < 0,05$).
4. Индекс метилирования LINE-1 повышается с возрастом отца и матери для медицинских абортусов ($R = 0,35$, $p = 0,026$ и $R = 0,36$, $p = 0,03$) и с возрастом отца для спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме ($R = 0,47$, $p = 0,0024$).
5. Привычное невынашивание беременности, отягощенный акушерский и гинекологический анамнез не являются факторами риска более высокого индекса метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом.
6. Индекс метилирования LINE-1 в ворсинах хориона значимо коррелирует у спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей ($R = 0,57$, $p = 0,009$).
7. Уровень экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* в ворсинах хориона был статистически значимо выше с альтернативных промоторов LINE-1 ($p < 0,05$), чем с канонических промоторов, и отрицательно коррелировал с индексом метилирования LINE-1 (*NUP153* – $R = -0,46$, $p = 0,03$; *YWHAB* – $R = -0,66$, $p = 0,001$).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5hmC – (от англ. 5-hydroxymethylcytosine) – 5-гидроксиметилцитозин

5mC – (от англ. 5-methylcytosine) – 5-метилцитозин

aCGH – (от англ. Array Comparative Genomic Hybridization) – матричная сравнительная геномная гибридизация на микрочипах

CNV – (от англ. Copy Number Variation) – вариация числа копий участков ДНК

DAPI – (от англ. 4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

FISH – (от англ. Fluorescence In Situ Hybridization) – флуоресцентная гибридизация

LINE-1 – (от англ. long interspersed nuclear elements) – длинные диспергированные повторы

PBS – (от англ. phosphate buffered saline) – фосфатный буфер

SDS – (от англ. Sodium Dodecyl Sulfate) – додецилсульфат натрия

SSC – (от англ. sodium chloride / sodium citrate buffer) – хлоридный/цитратный буфер

ТАЕ – (от англ. Tris-Acetate and EDTA) – трис-ацетатный буфер ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

НБ – невынашивание беременности

ПНБ – привычное невынашивание беременности

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

TET – (от англ. ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase) – тет-метилцитозиндиоксигеназа

УЗИ – ультразвуковое исследование

ЭДТА – этилендаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. – ООО «Издательство Н-Л», 2007. – С. 640-640.
2. Баранов В. С. и др. Пренатальная диагностика наследственных болезней. Состояние и перспективы. – 2017.
3. Барков И. Ю. и др. Применение неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий при оказании акушерско-гинекологической помощи //Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19. – №. 3. – С. 66-68.
4. Беспалова О. Н. и др. Ранние репродуктивные потери. – 2024.
5. Васильев С.А., Е. Н. Толмачёва Е.Н., Кашеварова А.А., Саженова Е.А., И. Н. Лебедев И.Н. Статус метилирования ретротранспозона LINE-1 при хромосомном мозаицизме на ранних стадиях эмбрионального развития человека // Молекулярная биология. - 2015. – Т. 49, № 1. - С. 165–174.
6. Кузьмина Н. С., Лаптева Н. Ш., Русинова Г. Г., Азизова Т. В., Вязовская Н. С., Рубанович А. В. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2017. – Т. 57, № 4. – С. 341-356.
7. Мустафин Р. Н., Хуснутдинова Э. К. Участие мобильных элементов в нейрогенезе //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24. – №. 2. – С. 209-218.
8. Опарина Н. В. и др. Тканевой гоносомный мозаицизм у пациентов с нарушением формирования пола, связанным с аномалиями дифференцировки гонад //Генетика. – 2021. – Т. 57. – №. 11. – С. 1306-1317.
9. Саженова Е. А., Никитина Т. В., Скрыбин Н. А., Минайчева Л. И., Иванова Т. В., Немцева Т. Н., Юрьев С. Ю., Евтушенко И. Д., И.Н. Л. Эпигенетический статус импринтированных генов в плаценте при привычном невынашивании беременности // Генетика. 2017. Т. 53, № 3. С. 364-377.
10. Abrusán G., Giordano J., Warburton P. E. Analysis of transposon interruptions suggests selection for L1 elements on the X chromosome //PLoS genetics. – 2008.

- V. 4. – №. 8. – P. e1000172.
11. American College of Obstetricians and Gynecologists et al. ACOG practice bulletin no. 200: early pregnancy loss //Obstetrics and gynecology. – 2018. – V. 132. – №. 5. – P. e197-e207.
 12. Ade C., Roy-Engel A. M., Deininger P. L. Alu elements: an intrinsic source of human genome instability //Current opinion in virology. – 2013. – V. 3. – №. 6. – P. 639-645.
 13. Apicella C. et al. The role of epigenetics in placental development and the etiology of preeclampsia //International journal of molecular sciences. – 2019. – V. 20. – №. 11. – P. 2837.
 14. Arai T. et al. Targeted disruption of p185/Cul7 gene results in abnormal vascular morphogenesis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100. – №. 17. – P. 9855-9860.
 15. Ardeljan D., Burns K. H. LINE-1 Mobilization in Cancers: More the Rule than the Exception //Retrotransposons and Human Disease: L1 Retrotransposons as a Source of Genetic Diversity. – World Scientific Publishing Co., 2022. – P. 221-243.
 16. Artandi S. E. et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice //Nature. – 2000. – V. 406. – №. 6796. – P. 641-645.
 17. Aruna M. et al. Novel alleles of HLA-DQ and-DR loci show association with recurrent miscarriages among South Indian women //Human reproduction. – 2011. – V. 26. – №. 4. – P. 765-774.
 18. Asami M. et al. Human embryonic genome activation initiates at the one-cell stage //Cell Stem Cell. – 2022. – V. 29. – №. 2. – P. 209-216. e4.
 19. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm //The Journal of cell biology. – 1982. – V. 93. – №. 2. – P. 298-305.
 20. Barker D. J. P., Thornburg K. L. Placental programming of chronic diseases, cancer and lifespan: a review //Placenta. – 2013. – V. 34. – №. 10. – P. 841-845.
 21. Bebbere D. et al. Oocyte aging: looking beyond chromosome segregation errors //Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2022. – V. 39. – №. 4. – P. 793-800.
 22. Beck C. R. et al. LINE-1 elements in structural variation and disease //Annual review

- of genomics and human genetics. – 2011. – V. 12. – №. 1. – P. 187-215.
23. Belancio T. P., Deininger P. L., Roy-Engel A. M. LINE dancing in the human genome: transposable elements and disease //Genome medicine. – 2009. – V. 1. – P. 1-8.
 24. Ben Khelifa M. et al. A MEI1 homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous family //Human Reproduction. – 2018. – V. 33. – №. 6. – P. 1034-1037.
 25. Benitez-Trinidad A. B. et al. Relationship between LINE-1 methylation pattern and pesticide exposure in urban sprayers //Food and chemical toxicology. – 2018. – V. 113. – P. 125-133.
 26. Beraldi R. et al. Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development //Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research. – 2006. – V. 73. – №. 3. – P. 279-287.
 27. Berteli T. S. et al. A pilot study of LINE-1 copy number and telomere length with aging in human sperm //Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2023. – V. 40. – №. 8. – P. 1845-1854.
 28. Bilir Ş. et al. Roles of Nup133, Nup153 and membrane fenestrations in assembly of the nuclear pore complex at the end of mitosis //Genes to cells. – 2019. – V. 24. – №. 5. – P. 338-353.
 29. Bissonauth T. et al. Requirement for Map2k1 (Mek1) in extra-embryonic ectoderm during placentogenesis. – 2006.
 30. Blackshaw B. P., Rodger D. The problem of spontaneous abortion: Is the pro-life position morally monstrous? //The New Bioethics. – 2019. – V. 25. – №. 2. – P. 103-120.
 31. Blair J. D. et al. Overlapping DNA methylation profile between placentas with trisomy 16 and early-onset preeclampsia //Placenta. – 2014. – V. 35. – №. 3. – P. 216-222.
 32. Blaudin de Thé F. X. et al. Engrailed homeoprotein blocks degeneration in adult dopaminergic neurons through LINE-1 repression //The EMBO Journal. – 2018. – V. 37. – №. 15. – P. e97374.
 33. Boissinot S., Sookdeo A. The evolution of LINE-1 in vertebrates //Genome biology

- and evolution. – 2016. – V. 8. – №. 12. – P. 3485-3507.
34. Bourque G. et al. Ten things you should know about transposable elements //Genome biology. – 2018. – V. 19. – P. 1-12.
 35. Bowman R. L., Busque L., Levine R. L. Clonal hematopoiesis and evolution to hematopoietic malignancies //Cell stem cell. – 2018. – V. 22. – №. 2. – P. 157-170.
 36. Branco M. R. et al. Maternal DNA methylation regulates early trophoblast development //Developmental cell. – 2016. – V. 36. – №. 2. – P. 152-163.
 37. Bruno M., Mahgoub M., Macfarlan T. S. The arms race between KRAB–zinc finger proteins and endogenous retroelements and its impact on mammals //Annual Review of Genetics. – 2019. – V. 53. – №. 1. – P. 393-416.
 38. Brykczynska U. et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa //Nature structural & molecular biology. – 2010. – V. 17. – №. 6. – P. 679-687.
 39. Bundo M. et al. Increased l1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia //Neuron. – 2014. – V. 81. – №. 2. – P. 306-313.
 40. Burton G. J., Fowden A. L. The placenta: a multifaceted, transient organ //Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2015. – V. 370. – №. 1663. – P. 20140066.
 41. Cameron-Pimblett A. et al. The Turner syndrome life course project: Karyotype-phenotype analyses across the lifespan //Clinical endocrinology. – 2017. – V. 87. – №. 5. – P. 532-538.
 42. Capy P. Taming, domestication and exaptation: trajectories of transposable elements in genomes //Cells. – 2021. – V. 10. – №. 12. – P. 3590.
 43. Chen J. M. et al. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease //Human genetics. – 2005. – V. 117. – P. 411-427.
 44. Chen P. Y. et al. Prenatal growth patterns and birthweight are associated with differential DNA methylation and gene expression of cardiometabolic risk genes in human placentas: a discovery-based approach //Reproductive Sciences. – 2018. – V. 25. – №. 4. – P. 523-539.
 45. Chishima T., Iwakiri J., Hamada M. Identification of transposable elements

- contributing to tissue-specific expression of long non-coding RNAs //Genes. – 2018. – V. 9. – №. 1. – P. 23.
46. Chiu S. Y. et al. SUMO-specific protease 2 is essential for modulating p53-Mdm2 in development of trophoblast stem cell niches and lineages //PLoS biology. – 2008. – V. 6. – №. 12. – P. e310.
 47. Choi K. et al. Nucleosomes and DNA methylation shape meiotic DSB frequency in *Arabidopsis thaliana* transposons and gene regulatory regions //Genome research. – 2018. – V. 28. – №. 4. – P. 532-546.
 48. Chow J. C. et al. LINE-1 activity in facultative heterochromatin formation during X chromosome inactivation //Cell. – 2010. – V. 141. – №. 6. – P. 956-969.
 49. Christou-Kent M. et al. Diversity of RNA-binding proteins modulating post-transcriptional regulation of protein expression in the maturing mammalian oocyte //Cells. – 2020. – V. 9. – №. 3. – P. 662.
 50. Chuong E. B. et al. Endogenous retroviruses function as species-specific enhancer elements in the placenta //Nature genetics. – 2013. – V. 45. – №. 3. – P. 325-329.
 51. Colley E. et al. Potential genetic causes of miscarriage in euploid pregnancies: a systematic review //Human reproduction update. – 2019. – V. 25. – №. 4. – P. 452-472.
 52. Colonna Romano N., Fanti L. Transposable elements: major players in shaping genomic and evolutionary patterns //Cells. – 2022. – V. 11. – №. 6. – P. 1048.
 53. Cordaux R., Batzer M. A. The impact of retrotransposons on human genome evolution //Nature reviews genetics. – 2009. – V. 10. – №. 10. – P. 691-703.
 54. Cosby R. L., Chang N. C., Feschotte C. Host–transposon interactions: conflict, cooperation, and cooption //Genes & development. – 2019. – V. 33. – №. 17-18. – P. 1098-1116.
 55. Coufal N. G. et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) modulates long interspersed element-1 (L1) retrotransposition in human neural stem cells //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – V. 108. – №. 51. – P. 20382-20387.
 56. Criscione S. W. et al. Genome-wide characterization of human L1 antisense promoter-driven transcripts //BMC genomics. – 2016. – V. 17. – P. 1-15.
 57. Da Cruz R. S. et al. Diet and transgenerational epigenetic inheritance of breast

- cancer: the role of the paternal germline //Frontiers in Nutrition. – 2020. – V. 7. – P. 93.
58. Dalbies-Tran R. et al. A comparative analysis of oocyte development in mammals //Cells. – 2020. – V. 9. – №. 4. – P. 1002.
 59. De Cecco M. et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation //Nature. – 2019. – V. 566. – №. 7742. – P. 73-78.
 60. Deininger P. Alu elements: know the SINEs //Genome biology. – 2011. – V. 12. – P. 1-12.
 61. Della Valle F. et al. LINE-1 RNA causes heterochromatin erosion and is a target for amelioration of senescent phenotypes in progeroid syndromes //Science Translational Medicine. – 2022. – V. 14. – №. 657. – P. eabl6057.
 62. Denli A. M. et al. Primate-specific ORF0 contributes to retrotransposon-mediated diversity //Cell. – 2015. – V. 163. – №. 3. – P. 583-593.
 63. Denomme M. M. et al. The inherited methylome landscape is directly altered with paternal aging and associated with offspring neurodevelopmental disorders //Aging Cell. – 2020. – V. 19. – №. 8. – P. e13178.
 64. Doyle G. A. et al. Analysis of LINE-1 elements in DNA from postmortem brains of individuals with schizophrenia //Neuropsychopharmacology. – 2017. – V. 42. – №. 13. – P. 2602-2611.
 65. Duffié R. et al. The Gpr1/Zdbf2 locus provides new paradigms for transient and dynamic genomic imprinting in mammals //Genes & development. – 2014. – V. 28. – №. 5. – P. 463-478.
 66. Eckersley-Maslin M. A., Alda-Catalinas C., Reik W. Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition //Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2018. – V. 19. – №. 7. – P. 436-450.
 67. Eggermann T. et al. Trans-acting genetic variants causing multilocus imprinting disturbance (MLID): common mechanisms and consequences //Clinical epigenetics. – 2022. – V. 14. – №. 1. – P. 41.
 68. Eiben B. et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage //American journal of human genetics. – 1990. – V. 47. – №.

4. – P. 656.
69. Essers R. et al. Prevalence of chromosomal alterations in first-trimester spontaneous pregnancy loss //Nature Medicine. – 2023. – V. 29. – №. 12. – P. 3233-3242.
70. Fadloun A. et al. Chromatin signatures and retrotransposon profiling in mouse embryos reveal regulation of LINE-1 by RNA //Nature structural & molecular biology. – 2013. – V. 20. – №. 3. – P. 332-338.
71. Fahlbusch F. B. et al. Cullin 7 and Fbxw 8 expression in trophoblastic cells is regulated via oxygen tension: implications for intrauterine growth restriction? //The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. – 2012. – V. 25. – №. 11. – P. 2209-2215.
72. Fang Y. et al. Association of Dll4/notch and HIF-1a-VEGF signaling in the angiogenesis of missed abortion //PloS one. – 2013. – V. 8. – №. 8. – P. e70667.
73. Fang Y. et al. Autism-associated synaptic vesicle transcripts are differentially expressed in maternal plasma exosomes of physiopathologic pregnancies //Journal of translational medicine. – 2021. – V. 19. – P. 1-11.
74. Fernandes J. D. et al. The UCSC repeat browser allows discovery and visualization of evolutionary conflict across repeat families //Mobile DNA. – 2020. – V. 11. – P. 1-12.
75. Ferrari R. et al. Retrotransposons as drivers of mammalian brain evolution //Life. – 2021. – V. 11. – №. 5. – P. 376.
76. Fu J. et al. Ubiquitin ligase cullin 7 induces epithelial-mesenchymal transition in human choriocarcinoma cells //Journal of Biological Chemistry. – 2010. – V. 285. – №. 14. – P. 10870-10879.
77. Fueyo R. et al. Roles of transposable elements in the regulation of mammalian transcription //Nature reviews Molecular cell biology. – 2022. – V. 23. – №. 7. – P. 481-497.
78. Furlan C. et al. Prognostic significance of LINE-1 hypomethylation in oropharyngeal squamous cell carcinoma //Clinical epigenetics. – 2017. – V. 9. – P. 1-11.
79. Furukawa S., Kuroda Y., Sugiyama A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals //Journal of toxicologic pathology. – 2014. –

- V. 27. – №. 1. – P. 11-18.
80. Gahurova L. et al. Transcription and chromatin determinants of de novo DNA methylation timing in oocytes //Epigenetics & chromatin. – 2017. – V. 10. – P. 1-19.
 81. Gifford R. J. et al. Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci //Retrovirology. – 2018. – V. 15. – P. 1-11.
 82. Gold H. B., Jung Y. H., Corces T. G. Not just heads and tails: The complexity of the sperm epigenome //Journal of Biological Chemistry. – 2018. – V. 293. – №. 36. – P. 13815-13820.
 83. Goodier J. L., Kazazian H. H. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites //Cell. – 2008. – V. 135. – №. 1. – P. 23-35.
 84. Griebel C. P. et al. Management of spontaneous abortion //American family physician. – 2005. – V. 72. – №. 7. – P. 1243-1250.
 85. Gruhn J. R. et al. Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span //Science. – 2019. – V. 365. – №. 6460. – P. 1466-1469.
 86. Gu Z. et al. Silencing of LINE-1 retrotransposons is a selective dependency of myeloid leukemia //Nature genetics. – 2021. – V. 53. – №. 5. – P. 672-682.
 87. Guffanti G. et al. Transposable elements and psychiatric disorders //American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics. – 2014. – V. 165. – №. 3. – P. 201-216.
 88. Guio L., Vieira C., González J. Stress affects the epigenetic marks added by natural transposable element insertions in *Drosophila melanogaster* //Scientific Reports. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 12197.
 89. Güneş S., Kulaç T. The role of epigenetics in spermatogenesis //Turkish journal of urology. – 2013. – V. 39. – №. 3. – P. 181.
 90. Hahn M. A., Szabó P. E., Pfeifer G. P. 5-Hydroxymethylcytosine: a stable or transient DNA modification? //Genomics. – 2014. – V. 104. – №. 5. – P. 314-323.
 91. Haig D. Retroviruses and the placenta //Current Biology. – 2012. – V. 22. – №. 15. – P. R609-R613.
 92. Haig D. Transposable elements: self-seekers of the germline, team-players of the soma //Bioessays. – 2016. – V. 38. – №. 11. – P. 1158-1166.

93. Hall L. L. et al. Stable COT-1 repeat RNA is abundant and is associated with euchromatic interphase chromosomes //Cell. – 2014. – V. 156. – №. 5. – P. 907-919.
- Hammoud S. S. et al. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development //Nature. – 2009. – V. 460. – №. 7254. – P. 473-478.
94. Hancks D. C., Kazazian Jr H. H. Active human retrotransposons: variation and disease //Current opinion in genetics & development. – 2012. – V. 22. – №. 3. – P. 191-203.
95. Hansmann T. et al. Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast cancer //Human molecular genetics. – 2012. – V. 21. – №. 21. – P. 4669-4679.
96. Hara T. et al. A novel composite retrotransposon derived from or generated independently of the SVA (SINE/VNTR/Alu) transposon has undergone proliferation in gibbon genomes //Genes & genetic systems. – 2012. – V. 87. – №. 3. – P. 181-190.
97. Hassold T., Hall H., Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going //Human molecular genetics. – 2007. – V. 16. – №. R2. – P. R203-R208.
98. Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy //Nature Reviews Genetics. – 2001. – V. 2. – №. 4. – P. 280-291.
99. Hemberger M., Hanna C. W., Dean W. Mechanisms of early placental development in mouse and humans //Nature Reviews Genetics. – 2020. – V. 21. – №. 1. – P. 27-43.
100. Hivert M. F. et al. Interplay of placental DNA methylation and maternal insulin sensitivity in pregnancy //Diabetes. – 2020. – V. 69. – №. 3. – P. 484-492.
101. Iqbal K. et al. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – V. 108. – №. 9. – P. 3642-3647.
102. Jachowicz J. W. et al. LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo //Nature genetics. – 2017. – V. 49. – №. 10. – P. 1502-1510.
103. Jachowicz J. W., Torres-Padilla M. E. LINEs in mice: features, families, and

- potential roles in early development //Chromosoma. – 2016. – V. 125. – P. 29-39.
104. Jaiswal S., Ebert B. L. Clonal hematopoiesis in human aging and disease //Science. – 2019. – V. 366. – №. 6465. – P. eaan4673.
 105. James J. L., Carter A. M., Chamley L. W. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? //Placenta. – 2012. – V. 33. – №. 5. – P. 327-334.
 106. Jansz N., Faulkner G. J. Endogenous retroviruses in the origins and treatment of cancer //Genome biology. – 2021. – V. 22. – №. 1. – P. 147.
 107. Jarvis G. E. Early embryo mortality in natural human reproduction: What the data say //F1000Research. – 2016. – V. 5.
 108. Jenkins T. G. et al. Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility //PLoS genetics. – 2014. – V. 10. – №. 7. – P. e1004458.
 109. Jiao Z. X., Xu M., Woodruff T. K. Age-associated alteration of oocyte-specific gene expression in polar bodies: potential markers of oocyte competence //Fertility and sterility. – 2012. – V. 98. – №. 2. – P. 480-486.
 110. Jönsson M. E. et al. Activation of neuronal genes via LINE-1 elements upon global DNA demethylation in human neural progenitors //Nature communications. – 2019. – V. 10. – №. 1. – P. 1-11.
 111. Jönsson M. E. et al. Transposable elements: a common feature of neurodevelopmental and neurodegenerative disorders //Trends in Genetics. – 2020. – V. 36. – №. 8. – P. 610-623.
 112. Jung Y. H. et al. Chromatin states in mouse sperm correlate with embryonic and adult regulatory landscapes //Cell reports. – 2017. – V. 18. – №. 6. – P. 1366-1382.
 113. Jurka J. Repbase Update: a database and an electronic journal of repetitive elements //Trends in genetics. – 2000. – V. 16. – №. 9. – P. 418-420.
 114. Jurkovic D., Overton C., Bender-Atik R. Diagnosis and management of first trimester miscarriage //Bmj. – 2013. – V. 346.
 115. Kaltsas A. et al. Impact of advanced paternal age on fertility and risks of genetic disorders in offspring //Genes. – 2023. – V. 14. – №. 2. – P. 486.
 116. Kang X. et al. SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of polycomb

- group protein-mediated gene silencing during embryonic development //Molecular cell. – 2010. – V. 38. – №. 2. – P. 191-201.
117. Kazazian Jr H. H. Mobile elements: drivers of genome evolution //science. – 2004. – V. 303. – №. 5664. – P. 1626-1632.
 118. Kazazian Jr H. H. et al. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L 1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man //Nature. – 1988. – V. 332. – №. 6160. – P. 164-166.
 119. Khoueiry R. et al. Lineage-specific functions of TET1 in the postimplantation mouse embryo //Nature genetics. – 2017. – V. 49. – №. 7. – P. 1061-1072.
 120. Kigami D. et al. MuERV-L is one of the earliest transcribed genes in mouse one-cell embryos //Biology of reproduction. – 2003. – V. 68. – №. 2. – P. 651-654.
 121. Kim E. Y. et al. Enhanced desumoylation in murine hearts by overexpressed SENP2 leads to congenital heart defects and cardiac dysfunction //Journal of molecular and cellular cardiology. – 2012. – V. 52. – №. 3. – P. 638-649.
 122. King S. E., Skinner M. K. Epigenetic transgenerational inheritance of obesity susceptibility //Trends in Endocrinology & Metabolism. – 2020. – V. 31. – №. 7. – P. 478-494.
 123. Krajnik K. et al. Oogenesis in women: from molecular regulatory pathways and maternal age to stem cells //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – №. 7. – P. 6837.
 124. Kuznetsov S. et al. RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females //The Journal of cell biology. – 2007. – V. 176. – №. 5. – P. 581-592.
 125. Lagirand-Cantaloube J. et al. Loss of centromere cohesion in aneuploid human oocytes correlates with decreased kinetochore localization of the sac proteins Bub1 and Bubr1 //Scientific reports. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 44001.
 126. Laird P. W. The power and the promise of DNA methylation markers //Nature Reviews Cancer. – 2003. – V. 3. – №. 4. – P. 253-266.
 127. Lander E. S. Initial sequencing and analysis of the human genome //Nature. – 2001. – V. 409. – P. 860-921.
 128. Lane S., Kauppi L. Meiotic spindle assembly checkpoint and aneuploidy in males

- versus females //Cellular and molecular life sciences. – 2019. – V. 76. – P. 1135-1150.
129. Laufer B. I. et al. Placenta and fetal brain share a neurodevelopmental disorder DNA methylation profile in a mouse model of prenatal PCB exposure //Cell reports. – 2022. – V. 38. – №. 9.
 130. Laurentino S. et al. A germ cell-specific ageing pattern in otherwise healthy men //Aging Cell. – 2020. – V. 19. – №. 10. – P. e13242.
 131. Lebedev I. Mosaic aneuploidy in early fetal losses //Cytogenetic and genome research. – 2011. – V. 133. – №. 2-4. – P. 169-183.
 132. Lebedev I. N., Zhigalina D. I. From contemplation to classification of chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos //Journal of assisted reproduction and genetics. – 2021. – V. 38. – №. 11. – P. 2833-2848.
 133. Li G. et al. Genome wide abnormal DNA methylome of human blastocyst in assisted reproductive technology //Journal of Genetics and Genomics. – 2017. – V. 44. – №. 10. – P. 475-481.
 134. Li H. et al. The sequence alignment/map format and SAMtools //bioinformatics. – 2009. – V. 25. – №. 16. – P. 2078-2079.
 135. Li J. et al. An antisense promoter in mouse L1 retrotransposon open reading frame-1 initiates expression of diverse fusion transcripts and limits retrotransposition //Nucleic Acids Research. – 2014. – V. 42. – №. 7. – P. 4546-4562.
 136. Li W. et al. Transposable elements in TDP-43-mediated neurodegenerative disorders. – 2012.
 137. Li Y. et al. Stella safeguards the oocyte methylome by preventing de novo methylation mediated by DNMT1 //Nature. – 2018. – V. 564. – №. 7734. – P. 136-140.
 138. Li S. et al. Hypomethylation of LINE-1 elements in schizophrenia and bipolar disorder //Journal of psychiatric research. – 2018. – V. 107. – P. 68-72.
 139. Li W. et al. Transposable elements in TDP-43-mediated neurodegenerative disorders. – 2012.
 140. Liang X. W. et al. Effect of postovulatory oocyte aging on DNA methylation imprinting acquisition in offspring oocytes //Fertility and sterility. – 2011. – V. 96.

– №. 6. – P. 1479-1484.

141. Lim J. H. et al. Comprehensive investigation of DNA methylation and gene expression in trisomy 21 placenta //Placenta. – 2016. – T. 42. – C. 17-24
142. Lim J. H. et al. Epigenome-wide base-resolution profiling of DNA methylation in chorionic villi of fetuses with Down syndrome by methyl-capture sequencing //Clinical Epigenetics. – 2019. – T. 11. – C. 1-11.
143. Liu H. et al. Deep vertebrate roots for mammalian zinc finger transcription factor subfamilies //Genome biology and evolution. – 2014. – V. 6. – №. 3. – P. 510-525.
144. Loda A. et al. Genetic and epigenetic features direct differential efficiency of Xist-mediated silencing at X-chromosomal and autosomal locations //Nature communications. – 2017. – V. 8. – №. 1. – P. 690.
145. Lou C., Goodier J. L., Qiang R. A potential new mechanism for pregnancy loss: considering the role of LINE-1 retrotransposons in early spontaneous miscarriage //Reproductive Biology and Endocrinology. – 2020. – V. 18. – №. 1. – P. 6.
146. Lou C. et al. Expression of LINE-1 retrotransposon in early human spontaneous abortion tissues //Medicine. – 2022. – T. 101. – №. 49. – C. e31964.
147. Luan D. D. et al. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition //Cell. – 1993. – V. 72. – №. 4. – P. 595-605.
148. Lynch T. J. et al. Transposon-mediated rewiring of gene regulatory networks contributed to the evolution of pregnancy in mammals //Nature genetics. – 2011. – V. 43. – №. 11. – P. 1154-1159.
149. Macciardi F. et al. A retrotransposon storm marks clinical phenoconversion to late-onset Alzheimer's disease //GeroScience. – 2022. – V. 44. – №. 3. – P. 1525-1550.
150. Macfarlan T. S. et al. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity //Nature. – 2012. – V. 487. – №. 7405. – P. 57-63.
151. Maciejowski J., de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability //Nature reviews Molecular cell biology. – 2017. – V. 18. – №. 3. – P. 175-186.
152. Maksimova N. et al. Clinical, molecular and histopathological features of short stature syndrome with novel CUL7 mutation in Yakuts: new population isolate in

- Asia //Journal of Medical Genetics. – 2007. – V. 44. – №. 12. – P. 772-778.
153. Maksiutenko E. M. et al. The Landscape of Point Mutations in Human Protein Coding Genes Leading to Pregnancy Loss //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – №. 24. – P. 17572.
 154. Malki S. et al. A role for retrotransposon LINE-1 in fetal oocyte attrition in mice //Developmental cell. – 2014. – V. 29. – №. 5. – P. 521-533.
 155. Mangiacasale R. et al. Exposure of normal and transformed cells to nevirapine, a reverse transcriptase inhibitor, reduces cell growth and promotes differentiation //Oncogene. – 2003. – V. 22. – №. 18. – P. 2750-2761.
 156. Mao J., Zhang Q., Cong Y. S. Human endogenous retroviruses in development and disease //Computational and Structural Biotechnology Journal. – 2021. – V. 19. – P. 5978-5986.
 157. Marasca F. et al. The sophisticated transcriptional response governed by transposable elements in human health and disease //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V. 21. – №. 9. – P. 3201.
 158. Marques-Rocha J. L. et al. LINE-1 methylation is positively associated with healthier lifestyle but inversely related to body fat mass in healthy young individuals //Epigenetics. – 2016. – V. 11. – №. 1. – P. 49-60.
 159. Márquez C. et al. Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm //Cytogenetic and Genome Research. – 1996. – V. 72. – №. 2-3. – P. 164-170.
 160. Menasha J. et al. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study //Genetics in Medicine. – 2005. – V. 7. – №. 4. – P. 251-263.
 161. Miki Y. et al. Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer //Cancer research. – 1992. – V. 52. – №. 3. – P. 643-645.
 162. Milano-Foster J. et al. Regulation of human trophoblast syncytialization by histone demethylase LSD1 //Journal of Biological Chemistry. – 2019. – V. 294. – №. 46. – P. 17301-17313.
 163. Mueller C. et al. A role of LINE-1 in telomere regulation //Front. Biosci. – 2018. – V. 23. – P. 1310-1319.

164. Müller I. et al. MPP8 is essential for sustaining self-renewal of ground-state pluripotent stem cells //Nature communications. – 2021. – V. 12. – №. 1. – P. 3034.
165. Muñoz-López M., García-Pérez J. L. DNA transposons: nature and applications in genomics //Current genomics. – 2010. – V. 11. – №. 2. – P. 115-128.
166. Nagaoka S. I., Hassold T. J., Hunt P. A. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem //Nature Reviews Genetics. – 2012. – V. 13. – №. 7. – P. 493-504.
167. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin //Gene. – 2001. – V. 278. – №. 1-2. – P. 25-31.
168. Nelson A. C. et al. Mapping the chromatin landscape and Blimp1 transcriptional targets that regulate trophoblast differentiation //Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 6793.
169. Nikitina T. V. et al. Comparative cytogenetic analysis of spontaneous abortions in recurrent and sporadic pregnancy losses //Biomedicine hub. – 2016. – V. 1. – №. 1. – P. 1-11.
170. Nikitina T. V. et al. Karyotype evaluation of repeated abortions in primary and secondary recurrent pregnancy loss //Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2020. – V. 37. – №. 3. – P. 517-525.
171. Nikitina T. V. et al. Comparative cytogenetics of anembryonic pregnancies and missed abortions in human //Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2023. – V. 27. – №. 1. – P. 28.
172. Novakovic B. et al. Increased methylation and decreased expression of homeobox genes TLX1, HOXA10 and DLX5 in human placenta are associated with trophoblast differentiation //Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 4523.
173. Novakovic B. et al. DNA methylation-mediated down-regulation of DNA methyltransferase-1 (DNMT1) is coincident with, but not essential for, global hypomethylation in human placenta //Journal of Biological Chemistry. – 2010. – V. 285. – №. 13. – P. 9583-9593.
174. Nurk S. et al. The complete sequence of a human genome //Science. – 2022. – V. 376. – №. 6588. – P. 44-53.
175. O'Hagan R. C. et al. Telomere dysfunction provokes regional amplification and

- deletion in cancer genomes //Cancer cell. – 2002. – V. 2. – №. 2. – P. 149-155.
176. Oliva R. Protamines and male infertility //Human reproduction update. – 2006. – V. 12. – №. 4. – P. 417-435.
 177. Orgel L. E., Crick F. H. C. Selfish DNA: the ultimate parasite //Nature. – 1980. – V. 284. – №. 5757. – P. 604-607.
 178. Orr B., Godek K. M., Compton D. Aneuploidy //Current Biology. – 2015. – V. 25. – №. 13. – P. R538-R542.
 179. Pauerova T. et al. Aneuploidy during the onset of mouse embryo development //Reproduction. – 2020. – V. 160. – №. 5. – P. 773-782.
 180. Payer L. M., Burns K. H. Transposable elements in human genetic disease //Nature Reviews Genetics. – 2019. – V. 20. – №. 12. – P. 760-772.
 181. Penzkofer T. et al. L1Base 2: more retrotransposition-active LINE-1s, more mammalian genomes //Nucleic acids research. – 2016. – P. gkw925.
 182. Pérez-Rico Y. A. et al. Transcriptional perturbation of LINE-1 elements reveals their cis-regulatory potential //bioRxiv. – 2024. – P. 2024.02. 20.581275.
 183. Pfeifer G. P., Szabó P. E. The link between 5-hydroxymethylcytosine and DNA demethylation in early embryos //Epigenomics. – 2023. – V. 15. – №. 6. – P. 335-339.
 184. Piégu B. et al. A survey of transposable element classification systems—a call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity //Molecular phylogenetics and evolution. – 2015. – V. 86. – P. 90-109.
 185. Pisano M. P., Grandi N., Tramontano E. Human endogenous retroviruses (HERVs) and mammalian apparent LTRs retrotransposons (MaLRs) are dynamically modulated in different stages of immunity //Biology. – 2021. – V. 10. – №. 5. – P. 405.
 186. Plass C., Soloway P. D. DNA methylation, imprinting and cancer //European Journal of Human Genetics. – 2002. – V. 10. – №. 1. – P. 6-16.
 187. Pohl E. et al. Healthy ageing and spermatogenesis //Reproduction. – 2021. – V. 161. – №. 4. – P. R89-R101.
 188. Pollheimer J. et al. Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment //Frontiers in immunology. – 2018. – V. 9. – P. 2597.

189. Ponomareva N. et al. Genetic association between Alzheimer's disease risk variant of the PICALM gene and EEG functional connectivity in non-demented adults //Frontiers in Neuroscience. – 2020. – V. 14. – P. 324.
190. Ponomaryova A. A. et al. Long interspersed nuclear element-1 methylation status in the circulating DNA from blood of patients with malignant and chronic inflammatory lung diseases //European Journal of Cancer Prevention. – 2021. – V. 30. – №. 2. – P. 127-131.
191. Ponomaryova A. A. et al. Aberrant methylation of LINE-1 transposable elements: a search for cancer biomarkers //Cells. – 2020. – V. 9. – №. 9. – P. 2017.
192. Popova B. C. et al. Attenuated spread of X-inactivation in an X; autosome translocation //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – V. 103. – №. 20. – P. 7706-7711.
193. Potabattula R. et al. Increasing methylation of sperm rDNA and other repetitive elements in the aging male mammalian germline //Aging cell. – 2020. – V. 19. – №. 8. – P. e13181.
194. Pourrajab F., Hekmatimoghaddam S. Transposable elements, contributors in the evolution of organisms (from an arms race to a source of raw materials) //Heliyon. – 2021. – V. 7. – №. 1.
195. Price E. M. et al. Different measures of “genome-wide” DNA methylation exhibit unique properties in placental and somatic tissues //Epigenetics. – 2012. – V. 7. – №. 6. – P. 652-663.
196. Quadrana L. et al. The Arabidopsis thaliana mobilome and its impact at the species level //eLife. – 2016. – V. 5. – P. e15716.
197. Quenby S. et al. Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss //The Lancet. – 2021. – V. 397. – №. 10285. – P. 1658-1667.
198. Quenneville S. et al. In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions //Molecular cell. – 2011. – V. 44. – №. 3. – P. 361-372.
199. Quinlan A. R., Hall I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features //Bioinformatics. – 2010. – V. 26. – №. 6. – P. 841-842.

200. Rahnama F. et al. Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion //Endocrinology. – 2006. – V. 147. – №. 11. – P. 5275-5283.
201. Ravel-Godreuil C. et al. Transposable elements as new players in neurodegenerative diseases //FEBS letters. – 2021. – V. 595. – №. 22. – P. 2733-2755.
202. Reilly M. T. et al. The role of transposable elements in health and diseases of the central nervous system //Journal of Neuroscience. – 2013. – V. 33. – №. 45. – P. 17577-17586.
203. Reyes J. M. et al. Differing molecular response of young and advanced maternal age human oocytes to IVM //Human Reproduction. – 2017. – V. 32. – №. 11. – P. 2199-2208.
204. Richardson S. R. et al. Heritable L1 retrotransposition in the mouse primordial germline and early embryo //Genome research. – 2017. – V. 27. – №. 8. – P. 1395-1405.
205. Richardson S. R., Morell S., Faulkner G. J. L1 retrotransposons and somatic mosaicism in the brain //Annual review of genetics. – 2014. – V. 48. – №. 1. – P. 1-27.
206. Rodriguez-Martin B. et al. Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition //Nature genetics. – 2020. – V. 52. – №. 3. – P. 306-319.
207. Rondinone O. et al. Extensive placental methylation profiling in normal pregnancies //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – №. 4. – P. 2136.
208. Rosser J. M., An W. L1 expression and regulation in humans and rodents //Frontiers in bioscience (Elite edition). – 2012. – V. 4. – P. 2203.
209. Rull K., Nagirnaja L., Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions //Frontiers in genetics. – 2012. – V. 3. – P. 34.
210. Saitou M., Yamaji M. Primordial germ cells in mice //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2012. – V. 4. – №. 11. – P. a008375.
211. Sánchez F., Smits J. Molecular control of oogenesis //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. – 2012. – V. 1822. – №. 12. – P. 1896-1912.
212. Sanchez-Delgado M. et al. Human oocyte-derived methylation differences persist in

- the placenta revealing widespread transient imprinting //PLOS genetics. – 2016. – V. 12. – №. 11. – P. e1006427.
213. Sankar A. et al. KDM4A regulates the maternal-to-zygotic transition by protecting broad H3K4me3 domains from H3K9me3 invasion in oocytes //Nature Cell Biology. – 2020. – V. 22. – №. 4. – P. 380-388.
 214. Santos F. et al. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo //Developmental biology. – 2002. – V. 241. – №. 1. – P. 172-182.
 215. Santos Jr H. P. et al. Epigenome-wide DNA methylation in placentas from preterm infants: association with maternal socioeconomic status //Epigenetics. – 2019. – V. 14. – №. 8. – P. 751-765.
 216. Sasaki A. et al. DNA methylation profiles in the blood of newborn term infants born to mothers with obesity //PLOS One. – 2022. – V. 17. – №. 5. – P. e0267946.
 217. Sasaki Y. et al. Molecular contribution to cleft palate production in cleft lip mice //Congenital anomalies. – 2014. – V. 54. – №. 2. – P. 94-99.
 218. Sazhenova E. A. et al. NLRP7 variants in spontaneous abortions with multilocus imprinting disturbances from women with recurrent pregnancy loss //Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2021. – V. 38. – P. 2893-2908.
 219. Scelfo A., Fachinetti D. Keeping the centromere under control: a promising role for DNA methylation //Cells. – 2019. – V. 8. – №. 8. – P. 912.
 220. Schroeder D. I. et al. The human placenta methylome //Proceedings of the national academy of sciences. – 2013. – V. 110. – №. 15. – P. 6037-6042.
 221. Schueler M. G., Sullivan B. A. Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin //Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2006. – V. 7. – №. 1. – P. 301-313.
 222. Schulz K. N., Harrison M. M. Mechanisms regulating zygotic genome activation //Nature Reviews Genetics. – 2019. – V. 20. – №. 4. – P. 221-234.
 223. Schuster J. et al. Effect of prematurity on genome wide methylation in the placenta //BMC medical genetics. – 2019. – V. 20. – P. 1-12.
 224. Senft A. D., Macfarlan T. S. Transposable elements shape the evolution of mammalian development //Nature Reviews Genetics. – 2021. – V. 22. – №. 11. – P. 691-711.

225. Šerman L. et al. The impact of 5-azacytidine on placental weight, glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta //Placenta. – 2007. – V. 28. – №. 8-9. – P. 803-811.
226. Sha Q. Q. et al. Dynamics and clinical relevance of maternal mRNA clearance during the oocyte-to-embryo transition in humans //Nature communications. – 2020. – V. 11. – №. 1. – P. 4917.
227. Sha Q. Q. et al. Characterization of zygotic genome activation-dependent maternal mRNA clearance in mouse //Nucleic acids research. – 2020. – V. 48. – №. 2. – P. 879-894.
228. Simon M. et al. LINE1 derepression in aged wild-type and SIRT6-deficient mice drives inflammation //Cell metabolism. – 2019. – V. 29. – №. 4. – P. 871-885. e5.
229. Smith Z.D., Chan M.M., Mikkelsen T.S., Gu H., Gnirke A., Regev A., Meissner A. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo // Nature. – 2012. – V. 484, №7394. – P. 339-344
230. Smith Z. D. et al. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo //Nature. – 2014. – V. 511. – №. 7511. – P. 611-615.
231. Smith Z. D., Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development //Nature Reviews Genetics. – 2013. – V. 14. – №. 3. – P. 204-220.
232. Smith Z. D. et al. Epigenetic restriction of extraembryonic lineages mirrors the somatic transition to cancer //Nature. – 2017. – V. 549. – №. 7673. – P. 543-547.
233. Sparks T. N., Thao K., Norton M. E. Mosaic trisomy 16: what are the obstetric and long-term childhood outcomes? //Genetics in Medicine. – 2017. – V. 19. – №. 10. – P. 1164-1170.
234. Sun M. et al. Deciphering the evolution of the transcriptional and regulatory landscape in human placenta //bioRxiv. – 2020. – P. 2020.09. 11.289686.
235. Talamillo A. et al. The role of SUMOylation during development //Biochemical Society Transactions. – 2020. – V. 48. – №. 2. – P. 463-478.
236. Tang Z. et al. Human transposon insertion profiling: analysis, visualization and identification of somatic LINE-1 insertions in ovarian cancer //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – V. 114. – №. 5. – P. E733-E740.
237. Tisato V. et al. Epigenetic role of LINE-1 methylation and key genes in pregnancy

- maintenance //Scientific Reports. – 2024. – T. 14. – №. 1. – C. 3275.
238. Todd C. D. et al. Functional evaluation of transposable elements as enhancers in mouse embryonic and trophoblast stem cells //Elife. – 2019. – V. 8. – P. e44344.
 239. Tolmacheva E. N. et al. Identification of differentially methylated genes in first-trimester placentas with trisomy 16 //Scientific Reports. – 2022. – V. 12. – №. 1. – P. 1166.
 240. Tolmacheva E. N. et al. Epigenetic effects of trisomy 16 in human placenta //Molecular biology. – 2013. – V. 47. – P. 373-381.
 241. Tolmacheva E. N., Vasilyev S. A., Lebedev I. N. Aneuploidy and DNA methylation as mirrored features of early human embryo development //Genes. – 2020. – V. 11. – №. 9. – P. 1084.
 242. Tšuiiko O. et al. Genome stability of bovine in vivo-conceived cleavage-stage embryos is higher compared to in vitro-produced embryos //Human reproduction. – 2017. – V. 32. – №. 11. – P. 2348-2357.
 243. Upton K. R. et al. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons //Cell. – 2015. – V. 161. – №. 2. – P. 228-239.
 244. Valdebenito-Maturana B. et al. Differential regulation of transposable elements (TEs) during the murine submandibular gland development //Mobile DNA. – 2021. – V. 12. – P. 1-10.
 245. Vasilyev S. A. et al. Method of targeted bisulfite massive parallel sequencing of the human LINE-1 retrotransposon promoter //MethodsX. – 2021. – V. 8. – P. 101445.
 246. Vasilyev S. A. et al. LINE-1 retrotransposon methylation in chorionic villi of first trimester miscarriages with aneuploidy //Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2021. – V. 38. – P. 139-149.
 247. Vlahos A. et al. Human placental methylome in the interplay of adverse placental health, environmental exposure, and pregnancy outcome //PLoS Genetics. – 2019. – V. 15. – №. 8. – P. e1008236.
 248. Wang B. et al. Zygotic G2/M cell cycle arrest induced by ATM/Chk1 activation and DNA repair in mouse embryos fertilized with hydrogen peroxide-treated epididymal mouse sperm //PloS one. – 2013. – V. 8. – №. 9. – P. e73987.
 249. Wang L. et al. Tissue-specific methylation of long interspersed nucleotide element-

- 1 of homo sapiens (L1Hs) during human embryogenesis and roles in neural tube defects //Current Molecular Medicine. – 2015. – V. 15. – №. 5. – P. 497-507.
250. Wang L. et al. Relation between hypomethylation of long interspersed nucleotide elements and risk of neural tube defects //The American journal of clinical nutrition. – 2010. – V. 91. – №. 5. – P. 1359-1367.
251. Wang H. et al. SVA elements: a hominid-specific retroposon family //Journal of molecular biology. – 2005. – V. 354. – №. 4. – P. 994-1007.
252. Wang Y., Zhao S. Vascular Biology of the Placenta. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. PMID: 21452443.
253. Warburton D., Byrne J. M., Canki N. Chromosome anomalies and prenatal development: an atlas //(No Title). – 1991.
254. Webster A., Schuh M. Mechanisms of aneuploidy in human eggs //Trends in cell biology. – 2017. – V. 27. – №. 1. – P. 55-68.
255. Wells J. N., Feschotte C. A field guide to eukaryotic transposable elements //Annual review of genetics. – 2020. – V. 54. – №. 1. – P. 539-561.
256. White C. R. et al. High frequency of imprinted methylation errors in human preimplantation embryos //Scientific reports. – 2015. – V. 5. – №. 1. – P. 17311.
257. White W. M. et al. The spreading of X inactivation into autosomal material of an x; autosome translocation: evidence for a difference between autosomal and X-chromosomal DNA //The American journal of Human Genetics. – 1998. – V. 63. – №. 1. – P. 20-28.
258. Wilkinson A. L., Zorzan I., Rugg-Gunn P. J. Epigenetic regulation of early human embryo development //Cell Stem Cell. – 2023. – V. 30. – №. 12. – P. 1569-1584.
259. Wolf G. et al. KRAB-zinc finger protein gene expansion in response to active retrotransposons in the murine lineage //Elife. – 2020. – V. 9. – P. e56337.
260. Wossidlo M. et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming //Nature communications. – 2011. – V. 2. – №. 1. – P. 241.
261. Xia M. et al. Long noncoding RNA HOTAIR promotes metastasis of renal cell carcinoma by up-regulating histone H3K27 demethylase JMJD3 //Oncotarget. – 2017. – V. 8. – №. 12. – P. 19795.

262. Xu G. L. et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene //Nature. – 1999. – V. 402. – №. 6758. – P. 187-191.
263. Xu Y. et al. A novel homozygous variant in NLRP5 is associate with human early embryonic arrest in a consanguineous Chinese family //Clinical Genetics. – 2020. – V. 98. – №. 1. – P. 69-73.
264. Xu Y. et al. Mutations in PADI6 cause female infertility characterized by early embryonic arrest //The American Journal of Human Genetics. – 2016. – V. 99. – №. 3. – P. 744-752.
265. Yong P. J. et al. The association between preeclampsia and placental trisomy 16 mosaicism //Prenatal diagnosis. – 2006. – V. 26. – №. 10. – P. 956-961.
266. Yuan P. et al. The methylome of a human polar body reflects that of its sibling oocyte and its aberrance may indicate poor embryo development //Human Reproduction. – 2021. – V. 36. – №. 2. – P. 318-330.
267. Xue Z. et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing //Nature. – 2013. – V. 500. – №. 7464. – P. 593-597.
268. Zadora J. et al. Disturbed placental imprinting in preeclampsia leads to altered expression of DLX5, a human-specific early trophoblast marker //Circulation. – 2017. – V. 136. – №. 19. – P. 1824-1839.
269. Zamudio N. et al. DNA methylation restrains transposons from adopting a chromatin signature permissive for meiotic recombination //Genes & development. – 2015. – V. 29. – №. 12. – P. 1256-1270.
270. Zeng Y., Chen T. DNA methylation reprogramming during mammalian development //Genes. – 2019. – V. 10. – №. 4. – P. 257.
271. Zhang K., Smith G. W. Maternal control of early embryogenesis in mammals //Reproduction, Fertility and Development. – 2015. – V. 27. – №. 6. – P. 880-896.
272. Zhang M. et al. Identification of novel biallelic TLE6 variants in female infertility with preimplantation embryonic lethality //Frontiers in Genetics. – 2021. – V. 12. – P. 666136.
273. Zhang Y. et al. Transposon molecular domestication and the evolution of the RAG recombinase //Nature. – 2019. – V. 569. – №. 7754. – P. 79-84.

274. Zhao B. et al. Somatic LINE-1 retrotransposition in cortical neurons and non-brain tissues of Rett patients and healthy individuals //PLOS genetics. – 2019. – V. 15. – №. 4. – P. e1008043.
275. Zhao P. et al. Two-step maternal-to-zygotic transition with two-phase parental genome contributions //Developmental Cell. – 2019. – V. 49. – №. 6. – P. 882-893. e5.
276. Zheng Y. et al. Prediction of genome-wide DNA methylation in repetitive elements //Nucleic acids research. – 2017. – V. 45. – №. 15. – P. 8697-8711.
277. Zhu P. et al. Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos //Nature genetics. – 2018. – V. 50. – №. 1. – P. 12-19.
278. Zickler D., Kleckner N. Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2015. – V. 7. – №. 6. – P. a016626.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

№ рисунка	Название рисунка	№ страницы
1	Схема развития и дифференцировки эмбриона человека на ранних стадиях развития	31
2	Схематическое изображение метода таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования 19 CpG-сайтов промоторе LINE-1.	52
3	Результаты гель-электрофореза амплифицированных последовательностей LINE-1 для 4 образцов после первой ПЦР с прикрепленными адаптерами и тех же образцов с прикрепленными индексами после второй ПЦР. По краям рисунка представлен ДНК-маркер Step 50 (Биолабмикс, Россия) с указанием размера в п.н.	54
4	Схема расположения альтернативных промоторов LINE-1 для генов <i>NUP153</i> и <i>YWHAB</i> . Примечание: стрелками схематично отмечены сайты гибридизации олигонуклеотидных праймеров	64
5	Результаты анализа BLAST бисульфит-конвертированной последовательности участка промотора LINE-1, получаемого с помощью разработанных в работе праймеров, и бисульфит-конвертированных консенсусных последовательностей повторов в геноме человека	67
6	Исследуемые CpG-сайты в промоторном регионе ретротранспозона LINE-1. а) Последовательность ДНК ретротранспозона LINE-1 (RefSeq X58075.1). В промоторном регионе анализируемые CpG-сайты выделены серым цветом; б) Схематическое изображение 19 проанализированных 68CpG-сайтов в промоторе LINE-1.	70

7	Корреляция между средним индексом метилирования LINE - 1 (%), измеренным с помощью таргетного бисульфитного массивного параллельного секвенирования и пиросеквенированием бисульфитной ДНК.	71
8	Профиль метилирования отдельных CpG-сайтов в промоторе LINE-1: А – группы медицинских абортусов (МА) и спонтанных абортусов (СА), Б – группы медицинских абортусов (МА) и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (САНК), В – группы медицинских абортусов (МА) и спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме (Три 16), Г – группы медицинских абортусов (МА) и спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме (Моно X). Нумерация CpG-сайтов указана от начала референсной последовательности X58075.1. * – $p < 0,05$.	73
9	Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона: А – группа медицинские абортусы (МА) и спонтанные абортусы (СА), Б – группа медицинские абортусы (МА), спонтанные абортусы моносомией по Xхромосоме (Моно X), спонтанные абортусы с трисомией по 16 хромосоме (Три 16) и спонтанные абортусы с нормальным кариотипом(САНК).	74
10	Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме (Моно X), спонтанных абортусов с женским (САНК 46,XX) и мужским кариотипами (САНК, 46, XY).	75
11	Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 у спонтанных абортусов с трисомией по 16хромосоме, имеющих полную и мозаичную форму анеуплоидии.	77
12	Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 у спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме,	79

	имеющих подтвержденное происхождение мейоз I или мейоз II/митоз.	
13	Индекс метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов с моносомией по хромосоме X в зависимости от родительского происхождения.	80
14	Распределение прочтений между подсемействами LINE-1. А – в группе спонтанных абортусов, Б – в группе медицинских абортусов, В – представленность подсемейств LINE-1 среди нераспределенных прочтений в группе спонтанных абортусов.	83
15	Индекс метилирования подсемейств ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона медицинских абортусов (МА) и спонтанных абортусов (СА). А – подсемейство L1H1, Б – подсемейство L1P1, В – подсемейство L1PA2, Г – подсемейство L1PA3, Д – подсемейство L1PA4, Е – нераспределенные прочтения.	85
16	Индекс метилирования подсемейств ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона медицинских абортусов (МА), спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме (Три 16), спонтанных абортусов с моносомией по X - хромосоме (Моно X) и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (САНК). А – подсемейство L1H1, Б – подсемейство L1P1, В – подсемейство L1PA2, Г – подсемейство L1PA3, Д – подсемейство L1PA4, Е – нераспределенные прочтения .	86
17	Корреляция между индексом метилирования LINE-1 и возрастом матери: А – медицинские абортусы, Б – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, В – спонтанные абортусы с трисомией по 16 хромосоме, Г – спонтанные абортусы с моносомией X-хромосомы.	90

18	Корреляция между индексом метилирования LINE-1 и возрастом отца: А – медицинские абортусы, Б – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, В – спонтанные абортусы с трисомией по 16 хромосоме, Г – спонтанные абортусы с моносомией X-хромосомы.	91
19	Корреляция между возрастом родителей медицинских абортусов	92
20	Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона у спонтанных абортусов из семей со спорадическим по сравнению с семьями с привычным невынашиванием беременности.	94
21	Профиль метилирования 19 CpG-сайтов в промоторе ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей у всех первых абортусов по сравнению со всеми последующими абортусами в парах. А. Отличие среднего уровня метилирования LINE-1 между первыми и последующими абортусами в парах. Б. Отличия профиля метилирования LINE-1 между первыми и последующими абортусами в парах. * - $p < 0.05$ (критерий Стьюдента для зависимых выборок).	99
22	Корреляция уровня метилирования ретротранспозона LINE - 1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей.	100
23	Корреляция уровня метилирования ретротранспозона LINE - 1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей для всех возможных перестановок между первым и вторым спонтанными абортусами в 21 паре (2097152 варианта). А – коэффициент корреляции. Б – значение с.	101

24	Коэффициенты корреляции уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей для всех возможных перестановок между первым и вторым спонтанными абортусами в 21 паре (2097152 варианта) отдельно для 19 проанализированных CpG-сайтов.	102
25	Значения p-value при анализе корреляции уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей для всех возможных перестановок между первым и вторым спонтанными абортусами в 21 паре (2097152 варианта) отдельно для 19 проанализированных CpG-сайтов.	103
26	Функционально значимые связи генов, участвующих в развитии плаценты (GO:0061450, GO:0097360, GO:0001890), с генами <i>NUP153</i> и <i>YWHAB</i> по данным STRING.	105
27	Сравнение уровня экспрессии генов <i>NUP153</i> (А) и <i>YWHAB</i> (Б) с канонических промоторов и альтернативных промоторов LINE-1 в лимфоцитах крови, хорионе и мезодерме плаценты.	106
28	Сравнение уровня экспрессии генов <i>NUP153</i> (А) и <i>YWHAB</i> (Б) с канонических промоторов и альтернативных промоторов LINE-1 между группами спонтанных абортусов и медицинских абортусов	107
29	Корреляция уровней экспрессии генов <i>NUP153</i> и <i>YWHAB</i> с уровнем метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, трисомией 16 и моносомией X	108

Благодарности

Автор выражает особую благодарность своему научному руководителю, доктору биологических наук, Васильеву Станиславу Анатольевичу за неоценимую опыт, помощь и поддержку, глубокий профессионализм на всех этапах выполнения моей диссертационной работы.

Автор выражает особую благодарность доктору биологических наук, профессору РАН Лебедеву Игорю Николаевичу и директору Томского НИМЦ, академику РАН, доктору биологических наук, профессору Степанову Вадиму Анатольевичу за предоставленную возможность выполнения диссертационной работы в НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Автор выражает особую благодарность научным коллективу лаборатории цитогенетики, лаборатории онтогенетики и лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ за поддержку в освоении методик, проведении экспериментов, за помощь и участие в планировании и проведении исследования, обсуждении полученных результатов интерпретации полученных результатов, а также дружественную рабочую атмосферу.

Автор особенно признательна своей семье и друзьям за понимание, терпение, заботу и безграничную поддержку на протяжении всех этапов работы.