

На правах рукописи



ДЕМЕНЕВА ВИКТОРИЯ ВАДИМОВНА

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

1.5.7 Генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2025

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Васильев Станислав Анатольевич

Официальные оппоненты:

Черных Вячеслав Борисович, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», лаборатория генетики нарушений репродукции, заведующий (г. Москва)

Барков Илья Юрьевич, кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, лаборатория пренатального ДНК-скрининга, заведующий (г. Москва)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» (г. Санкт-Петербург)

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

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

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук



Назаренко Мария Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. Среди внешних факторов риска невынашивания беременности следует отметить воздействие тератогенов химического происхождения [Griebel C.P. et al., 2005]. Таким образом, исследование 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. Метилирование ДНК – наиболее изученная эпигенетическая модификация, которая включает добавление метильной группы к цитозину в контексте CpG-динуклеотидов с помощью ДНК-метилтрансфераз [Ponomareva N. et al., 2020]. Изменение уровня метилирования ДНК

является одним из параметров эпигенетической регуляции экспрессии генов в различных типах клеток и на разных этапах онтогенеза [Plass C. et al., 2002].

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. Сбой этих процессов может критически повлиять на стабильность генома, включая сегрегацию хромосом во время деления клеток. Аномальное метилирование из-за ошибок в процессе перепрограммирования потенциально может привести к анеуплоидии. С другой стороны, наличие целой дополнительной хромосомы или ее потеря также могут повлиять на глобальный уровень метилирования генома. 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 плаценты 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].

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 – это ДНК-транспозоны или классические транспозоны. В настоящее время активных транспозонов у человека не описано. Элементы II класса, автономные ретротранспозоны, который включает в себя три основные подгруппы: LTR-ретротранспозоны или ретровирусы, non-LTR-ретротранспозоны и ретроэлементы [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].

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]. В одном из исследований было 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 ретроэлементов, включая альтернативные промоторы LINE-1.

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 aberrантному метилированию LINE-1. Такой пул половых клеток с aberrантным 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 aberrантное метилирование LINE-1 являться фактором, связанным с привычным невынашиванием 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.

При анеуплоидии часто выявляются нарушения профиля метилирования всего генома, что может приводить к порокам развития и эмбриональной гибели. Так, было показано повышенное метилирование промоторов отдельных генов и гиперметилирование всего 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 зиготы. На преимплантационной и постимплантационной стадиях развития человеческого эмбриона 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 [Zhu P. et al., 2014]. При этом существуют регионы, которые избегают деметилирования ДНК. Одним из таких регионов является молодое семейство длинных диспергированных 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 было связано с более высоким риском дефектов нервной трубки, особенно с пороками развития головного мозга [Wang L. et al., 2010]. Кроме того, образцы плаценты у мертворожденных детей с дефектами нервной трубки имели сниженный 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. 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.

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением в ходе исследования современных высокоточных молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов исследования с верификацией полученных данных, а также использованием статистического, биоинформатического анализа и корректностью в интерпретации полученных результатов.

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.

Личный вклад автора.

Основные результаты настоящего исследования получены автором самостоятельно, либо в ходе совместной работы с коллегами из лаборатории цитогенетики и лаборатории инструментальной геномики НИИ 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.

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 источников, из них 9 источников отечественной литературы и 269 источников зарубежной литературы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 для 148 абортусов. После проверки кариотипа для дальнейшего анализа было оставлено 332 образца (с нормальным кариотипом ($n = 178$), трисомией 16 ($n = 62$) и моносомией 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.

Для анализа индекса метилирования LINE-1 был разработан метод таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования 19 CpG-сайтов в промоторе LINE-1, так как ранее чаще всего анализ индекса метилирования LINE-1 проводили с помощью метилспецифической количественной ПЦР в реальном времени или пиросеквенирования 3-4 CpG-сайтов в его промоторной области. С помощью разработанного метода был проведен анализ индекса метилирования LINE-1 в хорионе спонтанных абортусов первого триместра беременности и медицинских абортусов в качестве группы сравнения. 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 21 пару спонтанных абортусов из одних и тех же семей, была оценена степень корреляции индекса

метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов от одних и тех же родителей. 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».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Был разработан метод определения индекса метилирования в промоторе ретротранспозона LINE-1 с использованием таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Метод направлен на оценку 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]. На основе бисульфит-конвертированной консенсусной последовательности промотора LINE-1 (GenBank Accession: X58075.1) были разработаны праймеры, фланкирующие 19 CpG-сайтов (Рисунок 1).

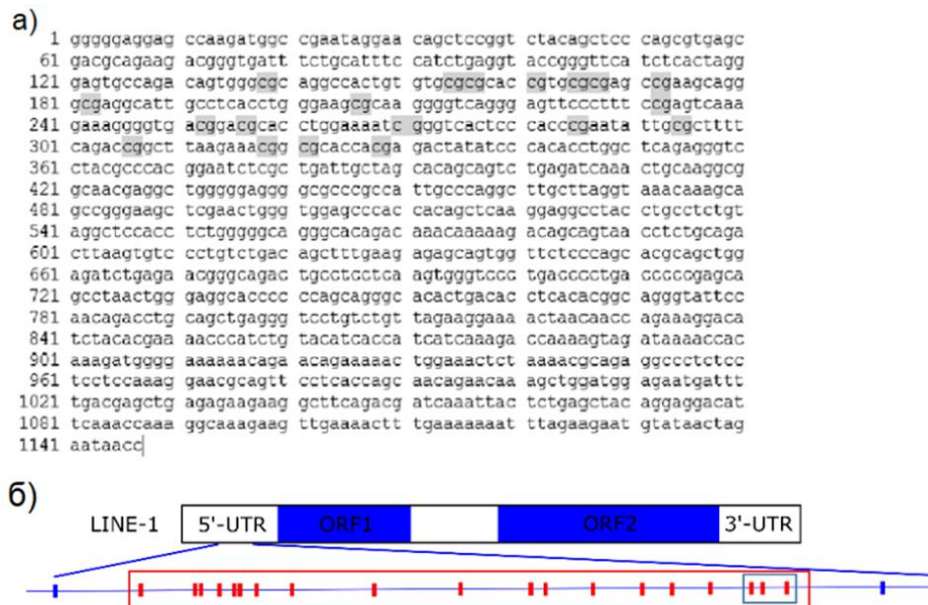


Рисунок 1. Исследуемые CpG-сайты в промоторном регионе ретротранспозона LINE-1. а) Последовательность ДНК ретротранспозона LINE-1 (RefSeq X58075.1). В промоторном регионе анализируемые CpG-сайты выделены серым цветом; б) Схематическое изображение 19 проанализированных CpG-сайтов в промоторе LINE-1.

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

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 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 2). 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 2).

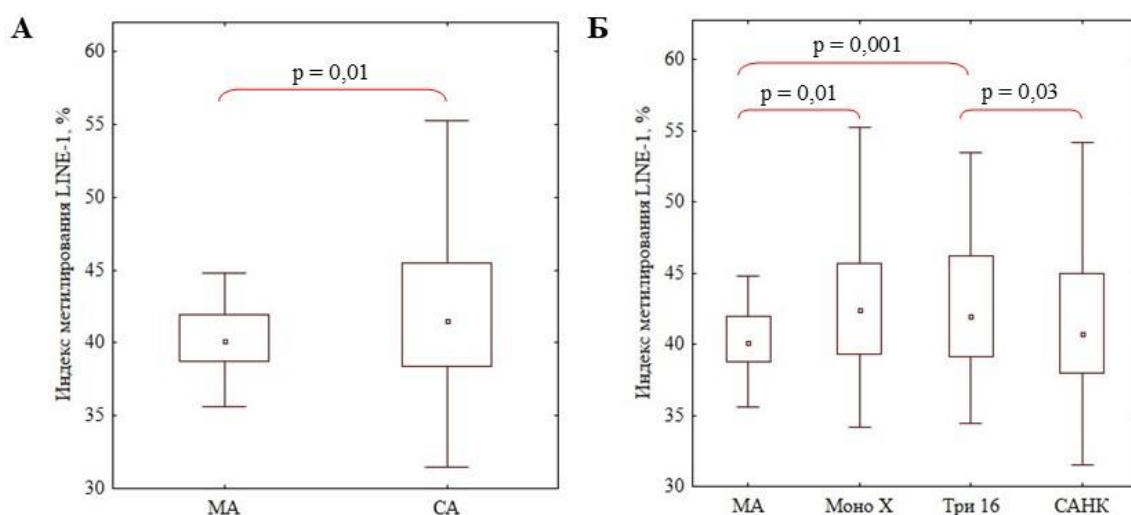


Рисунок 2. Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона:

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).

Коэффициент вариации индекса метилирования LINE-1 для медицинских абортусов составлял 5,5%, для спонтанных абортусов с нормальным кариотипом – 1,6%, для спонтанных абортусов с трисомией по хромосоме 16 – 10,6%, для спонтанных абортусов с моносомией по хромосоме X – 11,1%. 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 ответственна лишь часть 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 1). 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, для 12,3% образцов индекс метилирования LINE-1 был выше границы выбросов в группе медицинских абортусов.

Таблица 1. 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

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

Проведенная фильтрация прочтений по подсемействам LINE-1 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 3).

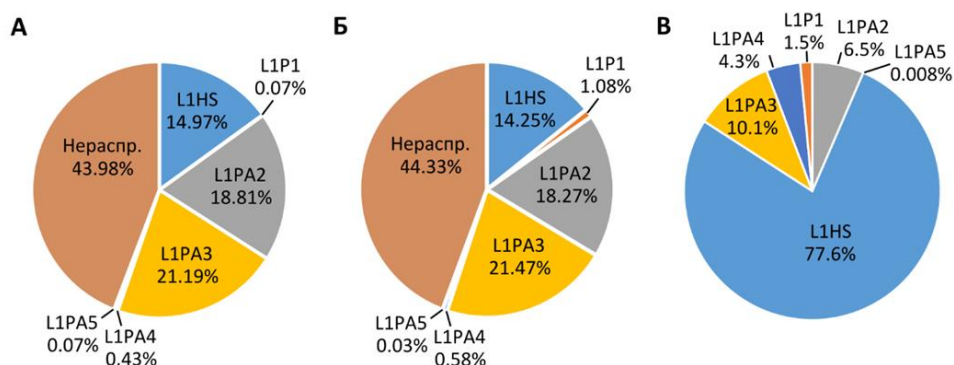


Рисунок 3. Распределение прочтений между подсемействами LINE-1. А – в группе спонтанных абортусов, Б – в группе медицинских абортусов, В – представленность подсемейств LINE-1 среди нераспределенных прочтений в группе спонтанных абортусов.

При сравнении уровня метилирования LINE-1 каждой отдельной подгруппы спонтанных абортусов с медицинскими абортусами результаты различались. Спонтанные

абортусы с трисомией 16 имели значимо более высокий средний уровень метилирования LINE-1 и уровни метилирования всех подсемейств LINE-1 по сравнению с медицинскими абортусами. Для спонтанных абортусов с моносомией X значимо более высокий уровень метилирования LINE-1 по сравнению с медицинскими абортусами отмечался для подсемейств L1PA4, L1P1, группы нераспределенных прочтений и среднего уровня метилирования по всем подсемействам LINE-1. Спонтанные абортусы с нормальным кариотипом имели повышенный уровень метилирования лишь для подсемейств L1PA4, L1P1 и нераспределенных прочтений (Рисунок 4). 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 4).

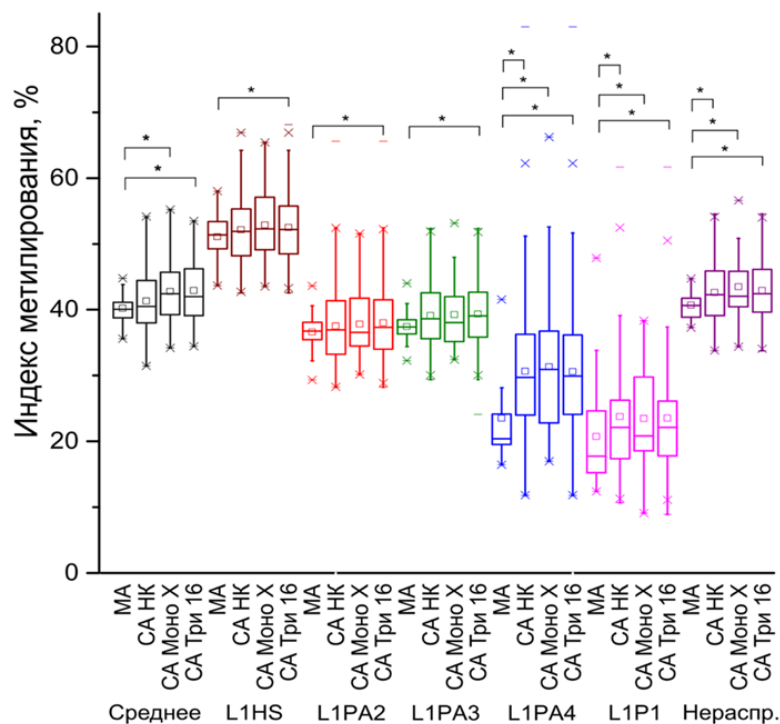


Рисунок 4. Индекс метилирования подсемейств ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона медицинских абортусов (МА), спонтанных абортусов с трисомией по 16 хромосоме (СА Три 16), спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме (СА Моно X) и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (СА НК).

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

Для медицинских абортусов индекс метилирования LINE-1 положительно коррелировал с возрастом матери ($R = 0,35$, $p = 0,026$) (Рисунок 5). 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 6). 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 ($p = 0,7$). 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].

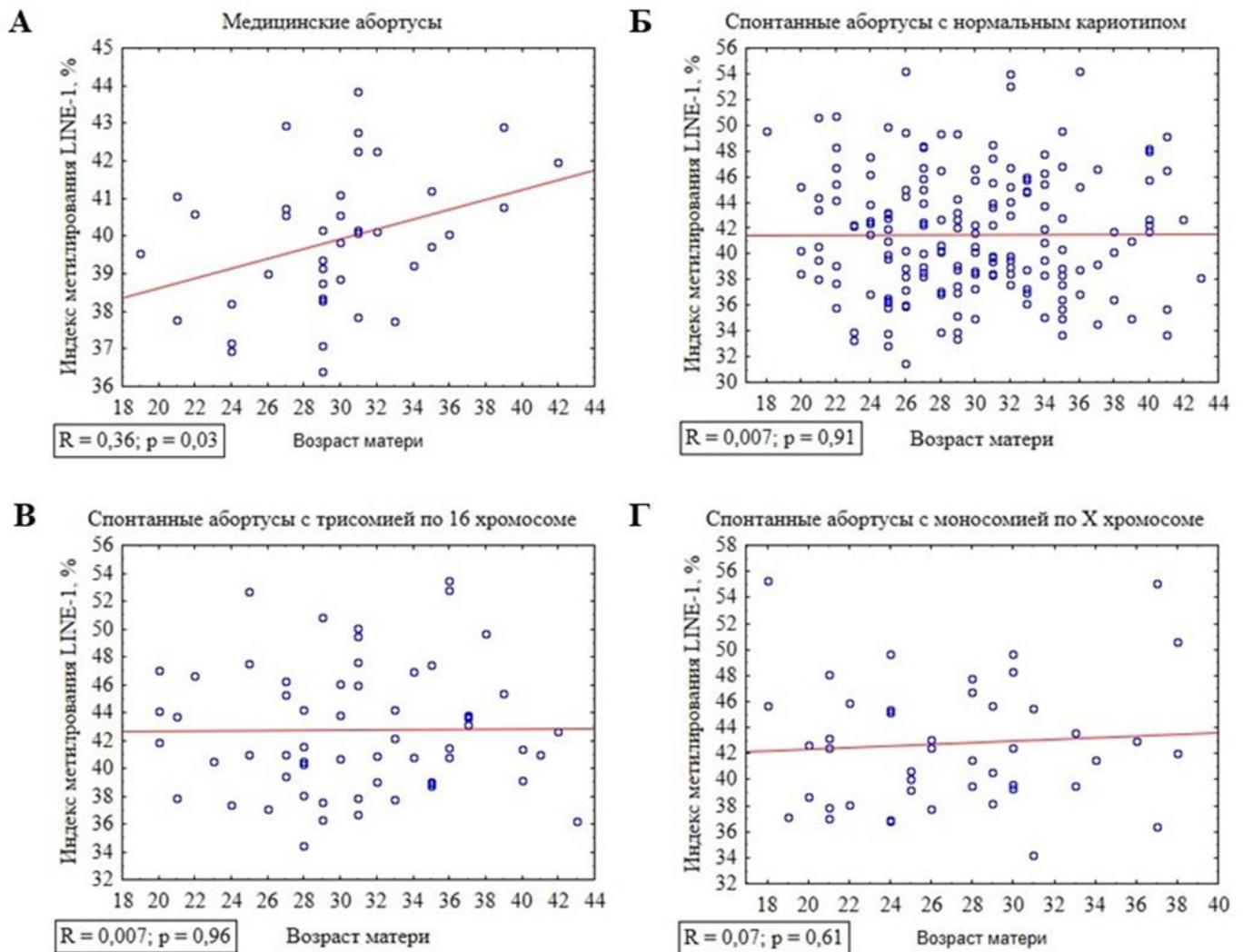


Рисунок 5. Корреляция между индексом метилирования LINE-1 и возрастом матери
 А – медицинские абортусы, Б – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, В – спонтанные абортусы с трисомией по 16 хромосоме, Г – спонтанные абортусы с моносомией X-хромосомы.

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.

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 – с увеличением возраста растет индекс метилирования, значит увеличивается степень подавления активности LINE-1 за счет метилирования, включая экспрессию и транспозицию.

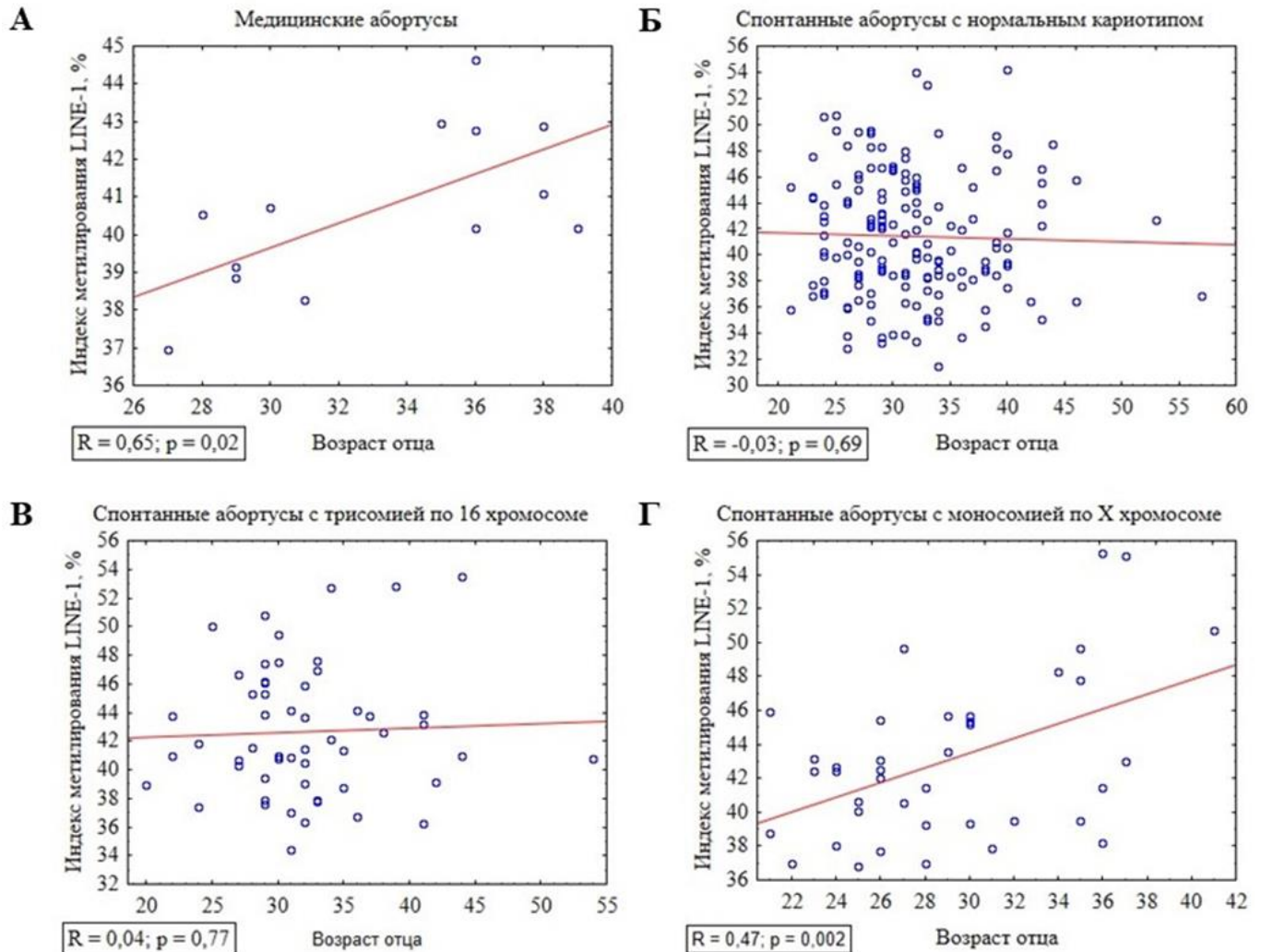


Рисунок 6. Корреляция между индексом метилирования LINE-1 и возрастом отца.

А – медицинские абортусы, Б – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, В – спонтанные абортусы с трисомией по 16 хромосоме, Г – спонтанные абортусы с моносомией X-хромосомы.

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

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 7). Доля спонтанных абортусов с нормальным кариотипом с индексом метилирования LINE-1,

выходящим за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов, была распределена равномерно 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 ($p = 0,9$).

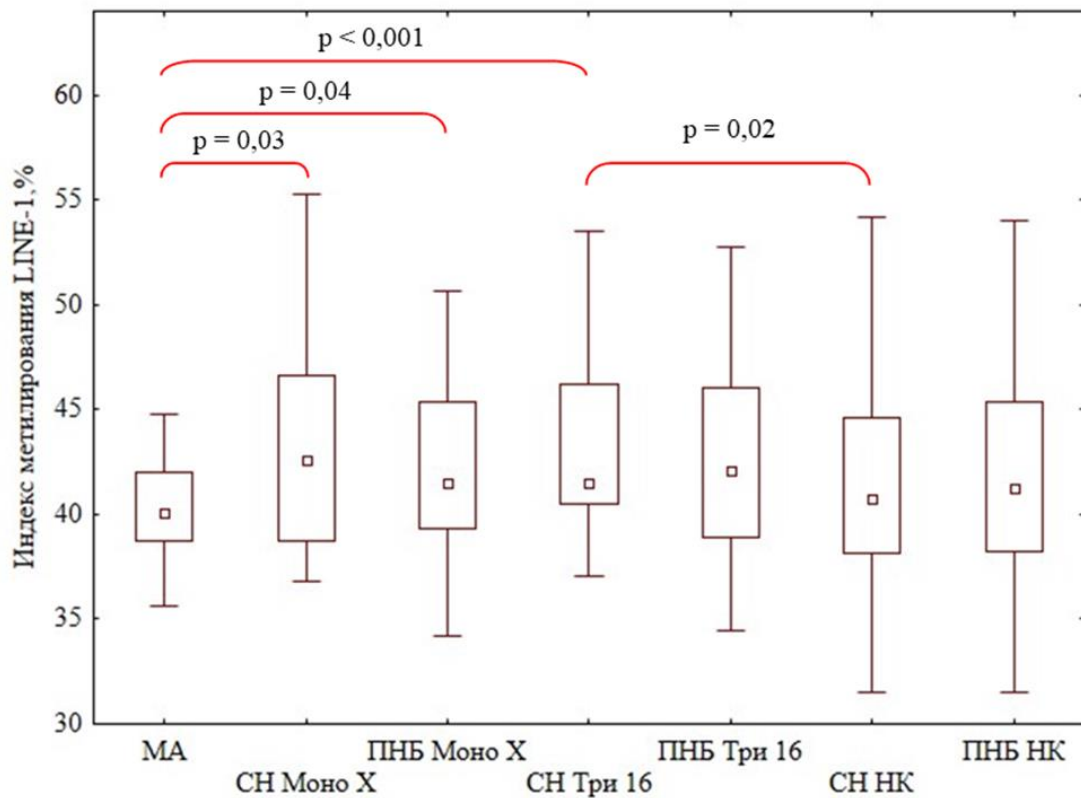


Рисунок 7. Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона у спонтанных абортусов из семей со спорадическим по сравнению с семьями с привычным невынашиванием беременности. МА – медицинские абортусы, СН Моно Х – спорадическое невынашивание с моносомией Х, СН Три 16 – спорадическое 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

Нами 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 исследованной пары спонтанных абортусов из одних и тех же семей 16 пар являлись полными сибсами, 5 пар – полусибсами с общими матерями.

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 8).

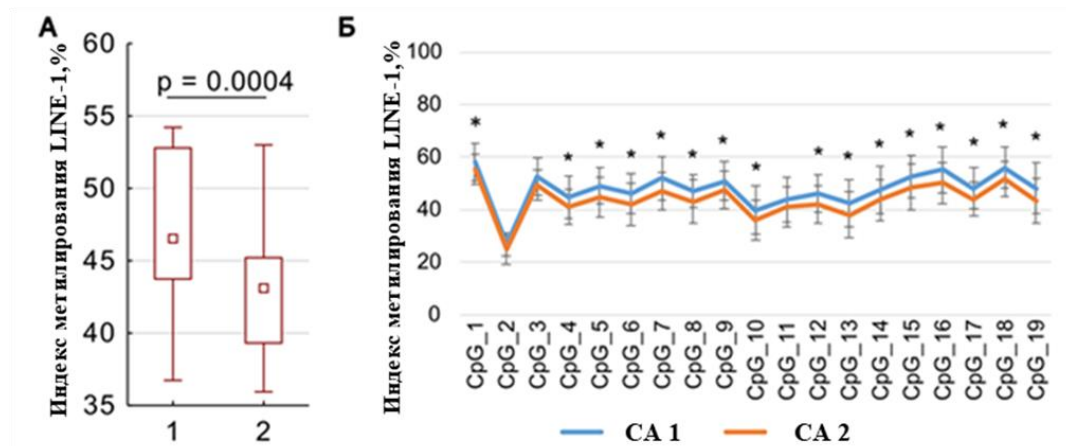


Рисунок 8. Профиль метилирования 19 CpG-сайтов в промоторе ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей у всех первых абортусов по сравнению со всеми последующими абортусами в парах. А. Отличие среднего уровня метилирования LINE-1 между первыми и последующими 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 ($n=21$ пара, $R=0,71$, $p=0,0003$) (Рисунок 9). 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 ($n=46$). Значимых корреляций обнаружено не было.

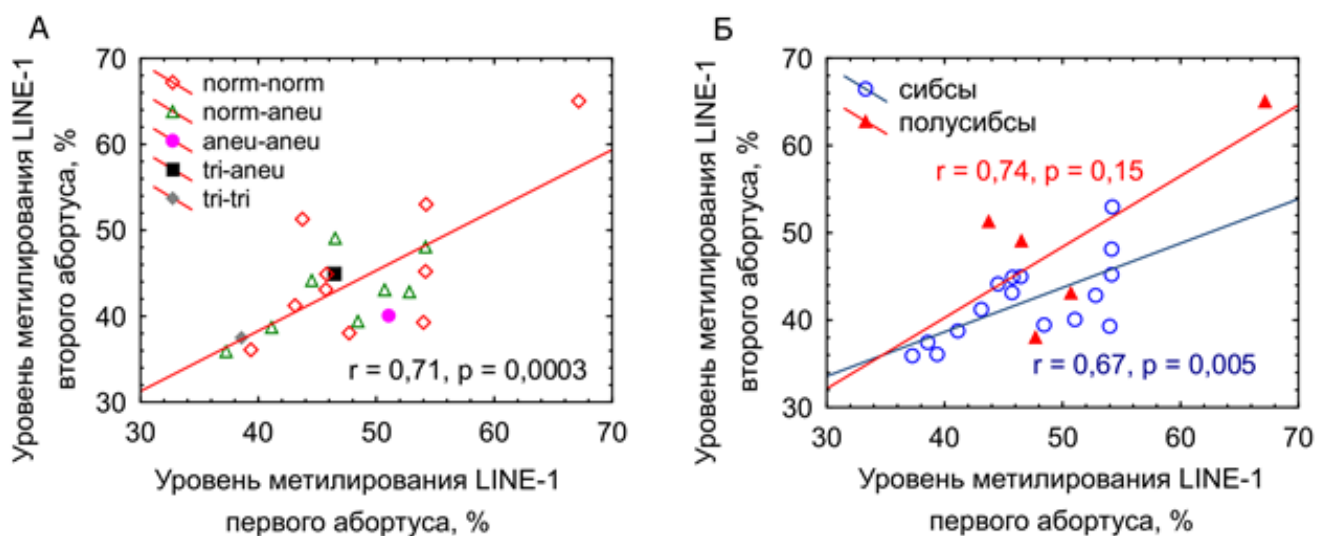


Рисунок 9. Корреляция уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей. Первый абортус – хронологически более ранний, второй – более поздний.

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

Уровень экспрессии для всех 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, $p < 0,05$) (Рисунок 10). 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 промоторами LINE-1 [Criscione S.W. et al., 2016].

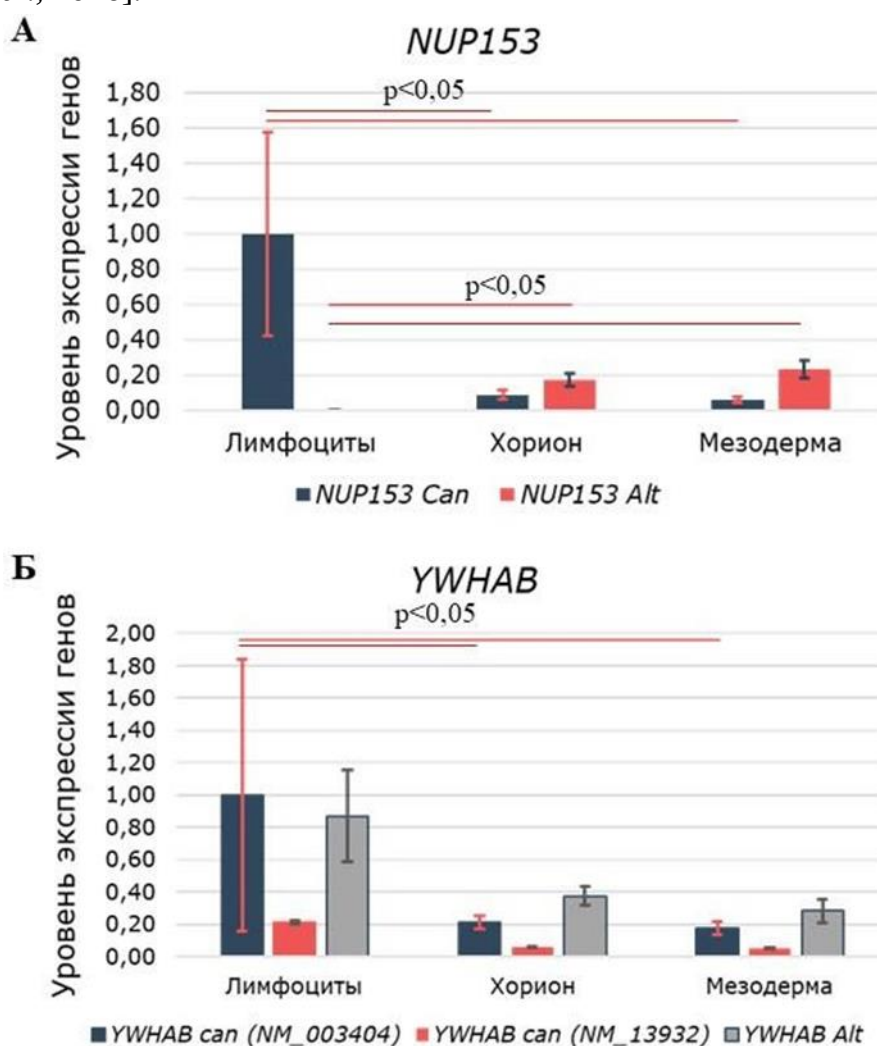


Рисунок 10. Сравнение уровня экспрессии генов *NUP153* (А) и *YWHAB* (Б) с канонических промоторов и альтернативных промоторов LINE-1 в лимфоцитах крови, хорионе и мезодерме плаценты

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 *NUP153* – в 3,9 раз, для гена *YWHAB* – в 4,3 раза, $p < 0,05$) и МА (для гена *YWHAB* – в 3,1 раза, $p < 0,05$) (Рисунок 11).

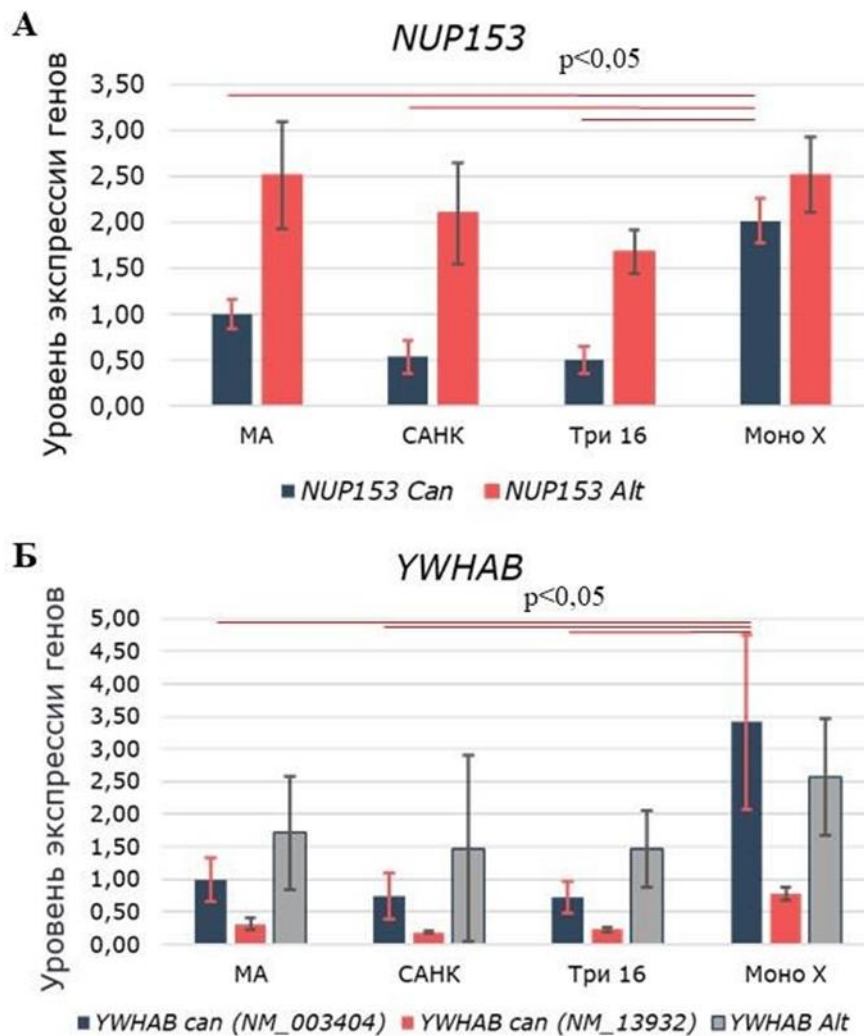


Рисунок 11. Сравнение уровня экспрессии генов *NUP153* (А) и *YWHAB* (Б) с канонических промоторов и альтернативных промоторов LINE-1 между группами спонтанных абортусов и медицинских абортусов

Для спонтанных и медицинских абортусов была проведена оценка корреляции экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* с уровнем метилирования в промоторе ретротранспозона LINE-1. 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* – $R = -0,66$, $p = 0,001$).

Таким образом, в настоящей работе было обнаружено, что уровень экспрессии для генов *NUP153* и *YWHAB* в плаценте был ниже с канонических промоторов по сравнению с лимфоцитами крови взрослых индивидов, однако экспрессия гена *NUP153* с альтернативного промотора LINE-1 была 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционно считается, что 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].

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; Ponomaryova A.A. et al., 2021]. В настоящем исследовании 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 также наблюдался aberrантный 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.

Также была выявлена положительная корреляция индекса метилирования LINE-1 с родительским возрастом в группе медицинских абортусов, которая может указывать на то, что индекс метилирования LINE-1 может передаваться из поколения в поколение. В случае возникновения аномалий метилирования в мейозе такие аномалии должны 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Деменева В.В., Толмачева Е.Н., Филатова С.А., Зуев А.С., Ушакова А.С., Васильева О.Ю., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Васильев С.А. Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона в эмбрионах из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности //Медицинская генетика. – 2024. – Т. 23. – № 10. – С. 50-54 (RSCI).
2. Васильев С.А., Деменева В.В., Толмачева Е.Н., Филатова С.А., Зуев А.С., Ушакова А.С., Васильева О.Ю., Лушников И.В., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Лебедев И.Н. Метилирование подсемейств ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона при невынашивании беременности //Генетика. – 2023. – Т. 59. – № 12. – С. 1419-1426 (RSCI, WoS, Scopus).
3. Деменева В.В., Толмачева Е.Н., Никитина Т.В., Саженова Е.А., Юрьев С.Ю., Махмутходжаев А.Ш., Зуев А.С., Филатова С.А., Дмитриев А.Е., Даркова Я.А., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н., Васильев С.А. Экспрессия генов *NUP153* и *YWHAB* с их канонических промоторов и альтернативных промоторов ретротранспозона LINE-1 в плаценте первого триместра беременности //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 27. – №. 1. – С. 63-71 (RSCI, WoS, Scopus).
4. Vasilyev S.A., Markov A.V., Vasilyeva O.Y., Tolmacheva E.N., Sharysh D.V., Zhigalina D.I., Demeneva V.V., Lebedev I.N., Zatula L.A. Method of targeted bisulfite massive parallel sequencing of the human LINE-1 retrotransposon promoter //MethodsX. – 2021. – V. 8. – P. 101445 (WoS, Scopus).

Статьи в сборниках и материалах конференций:

5. Лушников И.В., Деменева В.В. Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 коррелирует в ворсинах хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей //В сборнике: Перспективы развития фундаментальных наук. Сборник научных трудов XXI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. В 7 томах. Томск, 2024. С. 91-93.
6. Деменева В.В., Зуев А.С., Филатова С.А., Ушакова А.С., Ермолина Е.А. Анализ уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 при невынашивании беременности в первом триместре беременности //Медицина будущего: Сборник материалов,

Владивосток, 24–27 апреля 2023 года. – Владивосток: Дальневосточный федеральный университет, 2023. – С. 272-274.

7. **Деменева В.В.**, Толмачева Е.Н., Никитина Т.В., Саженова Е.А., Юрьев С.Ю., Махмутходжаев А.Ш., Зуев А.С., Филатова С.А., Дмитриев А.Е., Даркова Я.А., Лебедев И.Н., Васильев С.А. Оценка уровня экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* с канонических и альтернативных промоторов LINE-1 в плаценте первого триместра беременности //В сборнике материалов конгресса молодых ученых: Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины. Томск, 2022. С. 18-21

Тезисы:

8. Лушников И.В., **Деменева В.В.**, Васильев С.А. Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 коррелирует в ворсинах хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей //Мультишкола молодых ученых. Системная биология и биоинформатика (SBB-2024). Тезисы докладов 15-ой международной школы молодых ученых. Новосибирск, 2024. – С. 15.
9. **Demeneva V.V.**, Tolmacheva E.N., Nikitina T.V., Sazhenova E.A., Fonova E.A., Zuev A.S., Filatova S.A., Ushakova A.S., Aleksei Zarubin A.A., Vasilyeva O.Y, Vasilyev S.A. The level of methylation of the LINE-1 retrotransposon subfamilies in the placenta of the first trimester of pregnancy //Abstracts from the 56th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference. – 2024. – 31:91. – 344 – P. 348.
10. **Demeneva V.V.**, Tolmacheva E.N., Nikitina T.V., Sazhenova E.A., Yuriev S. Y., A. Makhmutkhodzhaev A. S., Zuev A.S., Filatova S.A., Dmitriev A.E., Darkova Ya. A., Lebedev I.N., Vasilyev S.A. Expression of the *NUP153* and *YWHAB* genes from canonical and alternative LINE-1 promoters in the placenta of the first trimester of pregnancy //Abstracts from the 55th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference. – 2023. – 31:91 - 344 – P. 320.
11. **Деменева В.В.**, Толмачева Е.Н., Васильева О.Ю., Жигалина Д.И., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Ермолина Е.А., Фонова Е.А., Лебедев И.Н., Васильев С.А. Оценка уровня метилирования подсемейств ретротранспозона LINE-1 L1HS и L1PA2 в плаценте первого триместра беременности. //NGS в медицинской генетике – MGHGS-2022, г. Суздаль – 2022. – С. 29-30.
12. Vasilyev S.A., Tolmacheva E.N., Vasilyeva O.Yu., Markov A.V., Zhigalina D.I., Zatula L., Lee V., Lytkina E., **Demeneva V.V.**, Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Kashevarova A.A., Lebedev I.N. Aneuploidy is associated with increased methylation of different LINE-1 retrotransposon families in placenta of first trimester miscarriages //E.C.A. News Letter. – 2021. – Vol. 48. – P. 13.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

FISH – (от англ. Fluorescence In Situ Hybridization) – флуоресцентная *in situ* гибридизация
 LINE-1 – (от англ. long interspersed nuclear elements) – длинные диспергированные повторы
 НБ – невынашивание беременности
 ПНБ – привычное невынашивание беременности
 СА – спонтанные абортусы
 МА – медицинские абортусы
 ПЦР – полимеразная цепная реакция

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:
НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ
634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10
Ученому секретарю диссертационного совета 24.1.215.03
д-ру мед. наук Назаренко М.С.
e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru