

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ИМПРИНТИРОВАННЫХ ГЕНОВ В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

© 2017 г. Е. А. Саженова<sup>1, \*</sup>, Т. В. Никитина<sup>1</sup>, Н. А. Скрябин<sup>1,2</sup>, Л. И. Минайчева<sup>1</sup>,  
Т. В. Иванова<sup>3</sup>, Т. Н. Немцева<sup>3</sup>, С. Ю. Юрьев<sup>3</sup>, И. Д. Евтушенко<sup>3</sup>, И. Н. Лебедев<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики,

Томский национально-исследовательский центр Российской академии наук, Томск 634050

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск 634050

<sup>3</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск 634050

\*e-mail: elena.sazhenova@mail.ru

Поступила в редакцию 01.03.2016 г.

В плацентарных тканях спонтанных абортусов I триместра беременности от женщин с привычным невынашиванием беременности или с одним спорадическим абортусом с использованием ДНК-микрочипов проведен анализ дифференциального метилирования 47 импринтированных генов. Показано, что у абортусов от женщин с привычным невынашиванием беременности в отличие от эмбрионов от женщин со спорадической потерей беременности статистически значимо чаще регистрируются эпимутации импринтированных генов с частотой 6.2 и 3.7% на локус соответственно ( $p < 0.01$ ). Преобладающим типом эпимутаций оказалось постзиготическое гипометилирование импринтированных генов на хромосомах материнского происхождения, составившее в исследованных группах 5.1 и 2.9% на локус соответственно. Репликативное исследование статуса метилирования семи импринтированных генов (*DLK1*, *PEG10*, *PLAGL1*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, *GRB10* и *PEG1/MEST*) в расширенных выборках эмбрионов подтвердило результаты микрочипового анализа как в отношении частот эпимутаций, так и в отношении преобладания соматического гипометилирования аллелей материнского происхождения. Установлено, что потери беременности сопровождаются мультилокусными дефектами метилирования импринтированных генов, частота которых также статистически значимо повышена в плацентарных тканях спонтанных абортусов от женщин с привычным невынашиванием.

**Ключевые слова:** геномный импринтинг, метилирование ДНК, мультилокусные дефекты метилирования, плацента, привычное невынашивание беременности, спонтанные аборты, эпимутации.

**DOI:** 10.7868/S0016675817020096

Невынашивание беременности — одна из основных проблем репродукции человека. Около 15% беременностей спонтанно прерываются в течение первого триместра. При этом существует около 1–2% супружеских пар, в которых потери беременности происходят неоднократно. Это явление называется привычным невынашиванием беременности (ПНБ). Пока нет консенсуса относительно числа выкидышей, которые позволяют отнести семью к категории пар с ПНБ. Так, Европейское общество репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) рекомендует считать ПНБ наличие в анамнезе подряд трех и более самопроизвольных прерываний беременности в сроках до 22 недель [1], однако Американское общество репродуктивной медицины (ASRM) предлагает относить семью к категории ПНБ уже после двух последовательных выкидышей, при этом мас-

штаб проблемы возрастает до 2–5% супружеских пар [2].

В структуре причин ПНБ выделяют генетические и нейроэндокринные нарушения, инфекционные заболевания у матери, возраст, иммунологические конфликты между матерью и плодом, неблагоприятное воздействие окружающей среды. Ранее при спорадическом прерывании беременности в I триместре аномалии кариотипа выявляли у 50% абортусов [3]. Сегодня эта цифра приближается к 60% и даже выше [4]. В этом случае при анализе кариотипа родителей чаще всего аномалии не выявляются. Однако при исследовании супружеских пар с ПНБ в 2–10% случаев имеют место хромосомные аномалии, представленные в основном сбалансированными реципрокными транслокациями, Робертсоновскими транслокациями, мозаичными нарушениями половых хромосом, инверсиями [5].

Тем не менее при исключении всех перечисленных выше причин остается около 40% супружеских пар, происхождение привычного выкидыша у которых представляется неясным. Причина гибели таких зародышей с нормальным кариотипом, как правило, не выявляется. Наличие нормального кариотипа у эмбриона вовсе не означает функциональную сбалансированность его генома, в том числе и вследствие геномного импринтинга — эпигенетического феномена, обеспечивающего дифференциальную моноаллельную экспрессию генов в зависимости от их родительского происхождения [6]. Импринтированная экспрессия регулируется посредством зависящего от пола метилирования ДНК, ковалентной модификации гистоновых белков в составе хроматина, а также функционированием некодирующих РНК. К настоящему времени в геноме человека обнаружено около 70 импринтированных локусов [7], большинство из которых вовлечено в обеспечение процессов внутриутробного развития через контроль клеточной пролиферации и дифференцировки плацентарных тканей, регуляцию метаболизма некоторых гормонов и ростовых факторов [8].

Ранее нами при исследовании статуса метилирования ряда импринтированных генов и центров импринтинга при остановке эмбрионального развития было показано наличие эпимутаций (а именно гипометилирование аллелей материнского происхождения) одновременно в двух импринтированных локусах — в центре импринтинга *KCNQ1OT1* (11p15.5) и в гене *PLAGL1* (6q24) у 2.3% спонтанных абортусов (СА). Примечательно, что эти случаи были отмечены только в семьях с ПНБ [9, 10]. Кроме того, было показано, что гипометилирование *PLAGL1* статистически значимо чаще ( $p < 0.05$ ) встречалось в плацентарных тканях СА от женщин с ПНБ [10].

С применением биочиповых технологий стало возможным оценить одновременно профили метилирования CpG-динуклеотидов практически всех импринтированных генов, что позволяет реализовать непредвзятый подход к выбору таких генов для анализа. Целью настоящего исследования стал сравнительный анализ статуса метилирования 47 импринтированных генов при остановке эмбрионального развития в I триместре беременности при наличии у женщины ПНБ либо одного спорадического аборта, с использованием ДНК-метилочипа “GoldenGate Methylation Cancer Panel I” (Illumina, США) и последующим репликативным исследованием ряда дифференциально метилированных генов на расширенных выборках.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИМГ (прото-

кол № 2 от 22 апреля 2010 г.). От всех супружеских пар было получено информированное согласие на участие в исследовании. Работа выполнена на плацентарных тканях СА I триместра беременности, полученных от женщин с ПНБ (группа I, 9 эмбрионов) и со спорадической потерей беременности (СПБ) — наличием в анамнезе только одного прерванного аборта (группа II, 6 эмбрионов). В группе I женщины в анамнезе имели три СА (№ 2–5, 8 в табл. 1, 2), четыре СА (№ 1, 7) и пять СА (№ 6, 9). В группе II у женщин в анамнезе был один СА (№ 11, 12, 14), СА и один живорожденный ребенок (№ 15) либо СА и двое детей (№ 13, 16). В качестве контроля исследованы плацентарные ткани четырех медицинских абортусов (МА) I триместра беременности от женщин без каких-либо гинекологических заболеваний в анамнезе, не пожелавших сохранить нормально протекавшую беременность по социальным показаниям. Продолжительность внутриутробного развития спонтанных и медицинских абортусов, определенная по данным ультразвукового исследования, статистически значимо не отличалась ( $8.4 \pm 0.9$  недель в группе I,  $8.1 \pm 1.4$  в группе II и  $7.8 \pm 0.7$  — в контрольной группе;  $p = 0.8$ ), так же как не отличался и возраст матерей ( $27.8 \pm 4.2$  лет в группе I,  $26.3 \pm 5.9$  в группе II и  $26.9 \pm 1.9$  в контрольной группе;  $p = 0.6$ ).

Все медицинские и спонтанные абортусы имели нормальный кариотип, установленный с помощью стандартного кариотипирования G-окрашенных метафазных хромосом, либо комбинации сравнительной геномной гибридизации (CGH) и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) для исключения анеуплоидии и полиплоидии. В отличие от кариотипирования комбинация методов CGH и FISH не может исключить присутствия сбалансированных транслокаций хромосом, которые, однако, не являются распространенной хромосомной аберрацией в материале спонтанных абортусов и в большинстве своем ассоциированы с живорождением и нормальным постнатальным развитием организма [3]. Семь пар с ПНБ имели нормальный кариотип, в двух случаях родители были недоступны для цитогенетического анализа.

Статус метилирования CpG-динуклеотидов определяли в образцах геномной ДНК, выделенной из некультивированных клеток цитотрофобласта хориона (ЦХ) и внезародышевой мезодермы (ВМ). Для обогащения образцов клетками ЦХ осуществляли мацерацию ворсин хориона, полученных после механического разделения внезародышевых тканей с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия), 60%-ной уксусной кислотой в течение 3–5 мин, а затем полученную клеточную суспензию отмывали 3 раза раствором  $1 \times$  PBS. Для получения образцов ВМ использовали ткани около-

**Таблица 1.** Индекс метилирования импринтированных генов с отцовской экспрессией у спонтанных абортусов от женщин с одним спонтанным абортусом и с привычным невынашиванием беременности (результаты исследования с использованием метилоципа)

Ген	Локус	Ткань	МА (контроль, β)	Спонтанные абортусы от женщин																								
				с ПНБ (группа I, β)								с СПБ (группа II, β)																
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16										
<i>PLAGL1</i>	E68R	ЦХ	0.62–0.67															0.08										
<i>DLK1</i>	E227R	ВМ	0.59–0.67		0.11																							
<i>GABRB3</i>	P92F	ЦХ	0.34–0.63	0.05			0.09			0.14	0.10	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.12								0.11	0.11	0.09
<i>PHLDA2</i>	P622R	ВМ	0.37–0.50	0.16	0.16		0.14			0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.14										
<i>SNORD64</i>	E48F	ЦХ	0.34–0.52	0.11	0.11		0.13			0.14	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.14								0.14		0.12
<i>KCNQ1</i>	P546R	ВМ	0.57–0.67			0.14																						
<i>PEG10</i>	P978R	ЦХ	0.34–0.52				0.12																					
<i>PEG3</i>	E496F	ВМ	0.34–0.42	0.15			0.12			0.09	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.16									0.08	0.11
<i>WT1</i>	P853F	ЦХ	0.34–0.45	0.06	0.09		0.13			0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.15									0.14	
<i>HTR2A</i>	P853F	ЦХ	0.33–0.37	0.11			0.13			0.10	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.10									0.09	
<i>INS</i>	P804R	ВМ	0.34–0.59	0.04	0.08	0.14	0.12			0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.10									0.07	
<i>TRPM5</i>	P721F	ЦХ	0.33–0.52				0.12			0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10									0.09	0.10
<i>PWCR1</i>	P811F	ВМ	0.34–0.36	0.02			0.12			0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.10									0.09	0.10
<i>GABRA5</i>	P1016F	ЦХ	0.33–0.51	0.88			0.92			0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.94									0.09	0.10
		ВМ	0.34–0.42	0.85	0.96	0.90	0.95	0.84	0.84	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.94									0.09	0.10
		ЦХ	0.61–0.67				0.85			0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85									0.09	0.10
		ВМ	0.34–0.67	0.87	0.87	0.87	0.91			0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.85									0.09	0.10
		ЦХ	0.43–0.67	0.87	0.87	0.87	0.91			0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.85									0.09	0.10
		ВМ	0.38–0.67	0.89	0.89	0.89	0.92			0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.85									0.09	0.10
		ЦХ	0.60–0.67	0.90	0.90	0.90	0.86			0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.84									0.09	0.10
		ВМ	0.59–0.67	0.90	0.90	0.90	0.89			0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.84									0.09	0.10



плодных оболочек, входящих в состав хориона. ДНК выделяли с помощью стандартной фенол-хлороформной экстракции.

Критерием выбора тканей для исследования являлось их происхождение из различных внезародышевых и зародышевых листков (трофэктодермы и эпибласта, соответственно), обособление которых происходит в период имплантации бластоцисты. Сравнительный анализ распределения эпимутаций в этих тканях позволяет идентифицировать соматические (присутствуют только в одной ткани) и герминативные (наличие в обеих тканях) нарушения характера метилирования с учетом особенностей эпигенетического репрограммирования генома [11]. В онтогенезе млекопитающих известны две волны такого репрограммирования. Одна из них протекает при закладке и созревании половых клеток и представлена последовательными событиями тотального де- и реметилирования ДНК. Тем не менее деметилирование ДНК происходит не полностью, и средний индекс метилирования в мужских и женских примордиальных половых клетках остается на уровне 7.8 и 6.0% соответственно. В зрелых гаметах происходит *de novo* гиперметилирование, в то же время примерно 10% CpG-динуклеотидов остаются в неметилированном состоянии. Другая волна репрограммирования происходит сразу после оплодотворения. В это время материнский и отцовский геном подвергаются деметилированию, за исключением импринтированных генов. Согласно результатам последних исследований, во время оплодотворения средний индекс метилирования в зрелых сперматозоидах составляет 54%, а в ооцитах, находящихся в метафазе II, 48%. В зиготе этот показатель составляет 41% и уменьшается до 32% на преимплантационных этапах развития [12, 13].

С учетом особенностей эпигенетического репрограммирования принималось, что при наличии гипер- или гипометилирования импринтированных генов только в одной из исследованных тканей эпимутации имели постимплантационное происхождение, обусловленное нарушением механизмов поддержания импринтинга в соматических клетках зародыша. Наличие эпимутаций в обеих тканях, наоборот, рассматривалось как результат нарушения перепрограммирования в примордиальных половых клетках родителей. В связи с этим такие эпимутации рассматривали как герминативные. Однако в случае гипометилирования исследуемого локуса в двух тканях нельзя было однозначно говорить о происхождении эпимутаций, так как такой характер метилирования мог возникнуть как в гаметах родителей, так и вследствие потери устойчивости дифференциально метилированных сайтов к эпигенетическому репрограммированию генома, проходящему в период дробления бластомеров.

Анализ статуса метилирования был выполнен с помощью метилочипа “GoldenGate Methylation Cancer Panel I” (Illumina, США) после бисульфитной модификации ДНК согласно протоколу производителя. Данный метилочип содержит 1505 CpG-динуклеотидов 807 генов, включая 108 CpG-сайтов, локализованных в 47 импринтированных генах, среди которых 72 CpG-динуклеотида расположены в 32 генах, экспрессирующихся с хромосомы отцовского происхождения, а 36 CpG – в 15 генах с материнской экспрессией. Список исследованных генов и первичные данные об индексе их метилирования размещены на сайте НИИ медицинской генетики ТНИМЦ [14]. Большинство представленных на метилочипе CpG-сайтов являются функционально значимыми, поскольку ранее было показано, что их метилирование коррелирует с супрессией транскрипционной активности импринтированных генов [15].

Результаты гибридизации анализировали с использованием программного пакета “GenomeStudio Methylation Module” (Illumina, США), который переводит интенсивность флуоресценции в количественную величину  $\beta$ . Эта величина соответствует отношению флуоресцентных сигналов метилированных аллелей к сумме флуоресцентных сигналов метилированных и неметилированных аллелей анализируемого локуса. Величина  $\beta$  является непрерывной и может принимать любое значение от 0 до 1, где 0 соответствует состоянию, когда все CpG-сайты в данном положении неметилированы, а 1 указывает на полное метилирование всех гомологичных CpG-динуклеотидов. Для каждого CpG-динуклеотида рассчитывалась  $\Delta\beta$  – разность в индексе метилирования между CpG-локусом опытного и контрольного образцов. Значение  $\Delta\beta$ , равное 0.17, принимается порогом чувствительности данного метилочипа, позволяющим выявлять статистически значимые различия в индексе метилирования анализируемого сайта в сравниваемых группах при уровне значимости  $p = 0.01$  [16]. Поэтому в качестве контрольных значений метилирования импринтированных генов принимались значения  $0.50 \pm 0.17$ . При регистрации эпимутаций у СА исходили из того, что значение индекса метилирования в CpG-сайтах  $\beta \leq 0.17$  соответствует гипометилированному состоянию локуса, а  $\beta \geq 0.83$  – гиперметилированному.

Спектр эпимутаций регистрировался по следующим параметрам и их комбинациям:

- 1) гипо- или гиперметилирование аллелей;
- 2) наличие эпимутации на хромосомах материнского или отцовского происхождения;
- 3) герминативное или соматическое происхождение эпимутации.

Частоту эпимутаций определяли исходя из числа эмбрионов (9 и 6 абортусов в группах I и II), общего числа исследуемых CpG-сайтов (89 сайтов в обеих группах), анализа у каждого эмбриона двух тканей и возможности эпимутаций по каждому локусу на хромосомах материнского и отцовского происхождения. С учетом этого суммарное число исследованных CpG-динуклеотидов составило в группе I – 1602 ( $89 \times 9 \times 2$ ), а в группе II – 1068 ( $89 \times 6 \times 2$ ).

Для валидации данных микрочипового исследования в расширенных выборках был проведен анализ статуса метилирования импринтированных генов (*DLK1*, *PEG10*, *PLAGL1*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, *GRB10*), задействованных в регуляции эмбрионального развития. Кроме того, был исследован статус метилирования еще одного импринтированного гена – *PEG1/MEST*, эпимутации в котором были обнаружены в других исследованиях [17, 18]. Этот ген, так же как и *PEG10* и *GRB10*, локализован на хромосоме 7, поэтому сопоставление данных статуса метилирования этих генов дополнительно позволяет дифференцировать эпимутации от однородительского наследования этой хромосомы.

Расширенная выборка составила 102 СА от женщин с ПНБ (группа III) и 114 СА от женщин со СПБ (группа IV). В качестве контроля было проанализировано 100 МА. Продолжительность внутриутробного развития эмбрионов в сравниваемых группах статистически значимо не отличалась ( $7.7 \pm 0.8$  недель в группе III,  $7.9 \pm 1.6$  в группе IV и  $7.6 \pm 1.2$  – в контрольной группе;  $p = 0.8$ ), так же как не отличался и возраст матерей ( $27.9 \pm 4.1$  лет в группе III,  $26.7 \pm 6.4$  в группе IV и  $25.4 \pm 2.0$  в контрольной группе;  $p = 0.6$ ). Все эмбрионы имели нормальный кариотип, установленный с помощью стандартного метафазного анализа или с использованием комбинации CGH и FISH. Характер метилирования анализировали в ВМ и ЦХ с использованием метил-специфической ПЦР и олигонуклеотидных праймеров, предложенных в литературе [19–22].

Статистический анализ экспериментальных данных проводили с использованием критерия  $\chi^2$  и точного критерия Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследования статус метилирования с помощью ДНК-метилочипов был оценен в контрольной группе МА. Отмечено, что среди 108 CpG-динуклеотидов, представленных на чипе, 19 CpG имели статус метилирования, не соответствующий теоретически ожидаемому для импринтированных генов, из них восемь генов (*ASCL2*, *SGCE*, *SNRPN*, *RASGRF1*, *SLC22A3*, *COPG2*, *NDN* и *MKRN3*) оказались в гипометили-

рованном состоянии ( $\beta < 0.17$ ), тогда как в четырех генах (*USP29*, *GABRG3*, *SLC22A18* и *DIRAS3*), напротив, было зарегистрировано гиперметилирование ( $\beta > 0.83$ ). Такой статус метилирования не характерен для импринтированных генов, поскольку известно, что их дифференциальное метилирование устанавливается в половых клетках родителей и сохраняется в соматических клетках потомства [23]. В то же время имеются данные о том, что для некоторых импринтированных генов, например *UBE3A*, возможно постзиготическое установление дифференциального метилирования [24]. Не исключено, что на исследованном нами этапе эмбриогенеза некоторые гены в плацентарных тканях имеют другой, отличающийся от теоретически ожидаемого, характер метилирования [25] либо в регуляции их импринтинга задействованы другие эпигенетические механизмы, например, такие как модификации гистонов и некодирующие РНК.

Таким образом, только в 89 CpG-динуклеотидах статус метилирования в плацентарных тканях при нормальном развитии совпал с теоретически ожидаемым для импринтированных локусов генома ( $0.50 \pm 0.17$ ), поэтому в дальнейший анализ были включены только эти CpG-динуклеотиды. Анализ их профилей метилирования у СА от женщин с ПНБ (группа I) и СПБ (группа II) показал наличие эпимутаций в обеих выборках (табл. 1, 2). Суммарное число импринтированных генов, затронутых эпимутациями, составило 20 и представлены они были либо в обеих анализируемых группах (*PLAGL1*, *DLK1*, *GABRA5*, *KCNQ1*, *GABRB3*, *PHLDA2*, *PEG10*, *WT1*, *PWCR1*, *ZNF215*, *CPA4*, *INS*, *H19*, *TRPM5*, *HTRA2* и *GNAS*), либо только в группе женщин с ПНБ (*PEG3*, *SNORD64*, *GRB10* и *ATP10A*). Гены, аномалии метилирования которых обнаруживались бы исключительно у СА от женщин со СПБ, выявлены не были.

Гипометилирование (и как следствие возможность проявления двойной дозы гена) материнских, в норме метилированных аллелей, было установлено для 10 генов – *PLAGL1*, *DLK1*, *PHLDA2*, *GABRB3*, *HTRA2*, *SNORD64*, *KCNQ1*, *PEG10*, *PEG3* и *WT1*. Гипометилирование аллелей отцовского происхождения обнаружено в трех генах, экспрессирующихся с материнской хромосомы – *ZNF215*, *CPA4* и *GRB10*. Гиперметилирование (и как следствие отсутствие экспрессии гена) выявлено для четырех генов с отцовской (*INS*, *TRPM5*, *PWCR1* и *GABRA5*) и для трех генов (*H19*, *ATP10A* и *GNAS*) с материнской экспрессией. Статистически значимых отличий по частоте эпимутаций в каждом из этих генов между анализируемыми выборками выявлено не было.

У всех СА обнаружены мультилокусные дефекты метилирования импринтированных генов (табл. 1, 2). Число CpG-динуклеотидов с эпиму-

тациями у абортусов в группе с ПНБ в целом оказалось больше, чем в группе со СПБ, и варьировало от 7 (№ 3, 8) до 14 (№ 4, 6, 7). В группе с СПБ минимальное число эпимутаций составило 2 (№ 11), а наибольшее – 13 (№ 12).

Гаметические эпимутации были выявлены у трех СА (№ 2, 4, 7) в группе ПНБ и отсутствовали в группе с СПБ. Соматические эпимутации обнаружены у каждого эмбриона в обеих группах: гипометилирование материнского аллеля было отмечено у всех СА в обеих группах, а гиперметилирование отцовского – у всех, кроме эмбриона № 11 в группе с СПБ. Что касается гиперметилирования материнских аллелей, то этот тип эпимутации выявлен у 5 СА (№ 1, 2, 4, 6, 7) в группе I и только у двух (№ 12, 16) во второй группе. Гиперметилирование отцовских аллелей было показано также в обеих группах: у всех СА, кроме № 8 и 9 в группе I, и № 11 и 13 в группе II. Таким образом, в обеих группах были отмечены все варианты нарушений характера метилирования, которые теоретически ожидаемы для импринтированных генов.

Анализируя характер эпимутаций и гены, затронутые эпимутациями в сравниваемых группах (табл. 1, 2), можно отметить, что больше чем в половине случаев в группе СА от женщин с ПНБ встречалось гипометилирование материнских аллелей таких генов, как *DLK1*, *GABRB3*, *KCNQ1*, *PHLDA2*, *PEG10*, *WT1*, и отцовских аллелей *ZNF215*, *GRB10*, *CPA4*, а также гиперметилирование отцовского аллеля *INS*. В группе СА от женщин с СПБ обнаруживалось гиперметилирование отцовского аллеля *PWCR1*, а также гипометилирование материнского аллеля *DLK1* и отцовского *CPA4*.

В целом эпимутации регистрировались в группе СА с ПНБ чаще, чем в группе со СПБ (6.2 и 3.7% соответственно,  $p < 0.01$ ) (табл. 3). В первой группе эпимутации импринтированных генов были выявлены в 99, а во второй – в 39 CpG-сайтах. Суммарная частота эпимутаций в группе I составила 6.2% на локус (99/1602), в группе II – 3.7% на локус (39/1068). Гаметические эпимутации были представлены исключительно в группе с одним СА, однако статистически значимых отличий по частоте этого показателя между группами выявлено не было (0.4% (7/1602) в группе I и 0 в группе II,  $p = 0.07$ ). В то же время соматические эпимутации статистически значимо чаще обнаруживались в группе I – 5.1% (81/1602) по сравнению со второй группой – 3.4% (36/1068),  $p < 0.05$ .

Большинство эпимутаций были представлены гипометилированием неактивного импринтированного гомолога. Так, суммарная частота гипометилирования аллелей материнского происхождения в группе I статистически значимо превысила соответствующий показатель в группе II (5.5% (55/54 × 9 × 2) и 3.1% (20/54 × 6 × 2) соответствен-

но,  $p < 0.05$ ) (табл. 3). Причем статистически значимые отличия были получены по частоте соматического гипометилирования именно материнских аллелей – 5.1% (50/54 × 9 × 2) в группе I и 2.9% (19/54 × 6 × 2) в группе II. Суммарная частота гипометилирования отцовских аллелей также была несколько выше в первой группе по сравнению со второй (3.0% (19/35 × 9 × 2) и 2.1% (9/35 × 6 × 2) соответственно), однако статистически значимые отличия по этому показателю достигнуты не были ( $p = 0.5$ ).

Не было показано статистически значимых отличий и между группами по гиперметилированию как материнского, так и отцовского аллелей. Так, гиперметилирование отцовских аллелей в I группе составило 1.8% (18/54 × 9 × 2), а во II группе – 1.1% (7/54 × 6 × 2) ( $p = 0.29$ ), гиперметилирование материнских аллелей составило 1.2% (7/35 × 9 × 2) в группе I и 0.7% (3/35 × 6 × 2) в группе II ( $p = 0.74$ ) (табл. 3). Таким образом, преимущественно гипометилирование материнских, в норме не экспрессирующихся аллелей, возникающее в соматических клетках, оказалось ассоциированным с остановкой эмбрионального развития в группе спонтанных абортусов от женщин с ПНБ.

Все эмбрионы, включенные в настоящее исследование, эпимутации у которых были установлены ранее по данным метил-чувствительной или метил-специфической ПЦР (№ 1, 3, 4, 13) [9, 10], также имели аномальный статус метилирования и по результатам микрочипового анализа.

На следующем этапе было проведено репликативное исследование статуса метилирования семи импринтированных генов (*DLK1*, *PEG1*, *PEG10*, *PLAGL1*, *KCNQ1OT1*, *PEG3* и *GRB10*) в расширенных выборках эмбрионов. Показано наличие эпимутаций по каждому исследованному локусу в двух группах от женщин с ПНБ (группа III) и с СПБ (группа IV) в отличие от контрольной группы МА, где, так же как и по данным метилчипа, не было выявлено нарушений характера метилирования для этих генов. Однако необходимо отметить, что эпимутации у спонтанных абортусов оказались представлены как гипо-, так и гиперметилированием аллелей (кроме *KCNQ1OT1* и *PEG3*, в которых было отмечено только гипометилирование), что в некоторой степени противоречит данным чипа, где во всех случаях эпимутации в этих генах были представлены исключительно гипометилированием. Очевидно, что это может быть связано с анализом выборки большего объема.

В целом в расширенной выборке эмбрионов, так же как и по данным метилчипа, частота эпимутаций в группе СА от женщин с ПНБ оказалась статистически значимо выше и составила 7.1% на локус (102/102 × 7 × 2) в отличие от группы СА с СПБ у матери – 2.6% на локус (43/114 × 7 × 2,  $p <$

**Таблица 3.** Частота эпимутаций импринтированных генов у спонтанных абортусов от женщин с привычным и спорадическим невынашиванием беременности

Эпимутации	Число локусов с эпимутацией (частота)					
	по данным метилочипа			на расширенной выборке		
	спонтанные абортусы от женщин					
	с ПНБ (группа I, 9 СА)	с СПБ (группа II, 6 СА)	<i>p</i>	с ПНБ (группа III, 102 СА)	с СПБ (группа IV, 114 СА)	<i>p</i>
<b>Гипометилирование материнских аллелей</b>						
	число материнских в норме метилированных аллелей у каждого СА					
	54			6		
Соматические	50 (5.1%)	19 (2.9%)	<b>0.04</b>	49 (4.0%)	29 (2.1%)	<b>0.005</b>
Гаметические/ соматические	5 (0.5%)	1 (0.15%)	0.45	13 (1.1%)	5 (0.4%)	0.1
Всего	55 (5.5%)	20 (3.1%)	<b>0.02</b>	62 (5.1%)	34 (2.5%)	<b>0.001</b>
<b>Гипометилирование отцовских аллелей</b>						
	число отцовских в норме метилированных аллелей по каждому СА					
	35			1		
Гаметические	–	–	–	–	–	–
Соматические	13 (2.1%)	7 (1.6%)	0.81	7 (3.4%)	1 (0.4%)	0.1
Гаметические/ соматические	6 (0.9%)	2 (0.5%)	0.61	–	–	–
Всего	19 (3.0%)	9 (2.1%)	0.50	7 (3.4%)	1 (0.4%)	0.1
<b>Гиперметилирование материнских аллелей</b>						
	число материнских в норме метилированных аллелей по каждому СА					
	35			1		
Гаметические	1 (0.2%)	–	0.83	–	1 (0.4%)	0.9
Соматические	6 (1.0%)	3 (0.7%)	0.94	1 (0.5%)	5 (2.2%)	0.1
Всего	7 (1.2%)	3 (0.7%)	0.74	1 (0.5%)	6 (2.6%)	0.1
<b>Гиперметилирование отцовских аллелей</b>						
	число отцовских в норме метилированных аллелей по каждому СА					
	54			6		
Гаметические	6 (0.6%)	–	0.11	8 (0.7%)	–	<b>0.008</b>
Соматические	12 (1.2%)	7 (1.1%)	0.96	24 (1.9%)	2 (0.1%)	<b>0.001</b>
Всего	18 (1.8%)	7 (1.1%)	0.29	32 (2.6%)	2 (0.1%)	<b>0.001</b>
<b>Частота эпимутаций</b>						
	число исследованных локусов у каждого СА					
	89			7		
Гаметические	7 (0.4%)	–	0.07	8 (0.6%)	1 (0.1%)	<b>0.001</b>
Соматические	81 (5.1%)	36 (3.4%)	<b>0.04</b>	81 (5.6%)	37 (2.3%)	<b>0.001</b>
Гаметические/ соматические	11 (0.7%)	3 (0.3%)	0.25	13 (0.9%)	5 (0.2%)	0.1
Всего	99 (6.2%)	39 (3.7%)	0.004	102 (7.1%)	43 (2.6%)	0.001

$< 0.01$ ) (табл. 3). В том числе соматические эпимутации встречались с частотой 5.6% в группе III ( $81/102 \times 7 \times 2$ ) и только 2.3% в группе IV ( $37/114 \times 7 \times 2$ ) ( $p < 0.01$ ). В то же время в отличие от данных микрочипового исследования частота гаметических эпимутаций в группе III оказалась статистически значимо выше по сравнению с группой IV — 0.6% ( $8/102 \times 7 \times 2$ ) и 0.1% ( $1/114 \times 7 \times 2$  соответственно;  $p < 0.05$ ).

Анализируя распределение эпимутаций отдельно по отцовским и материнским аллелям, следует отметить, что, так же как и по данным чипа, большинство эпимутаций оказались представлены соматическим гипометилированием материнского аллеля, которое в группе СА от женщин с ПНБ было статистически значимо выше, чем у СА от женщин с СПБ, — 4.0% ( $49/102 \times 6 \times 2$ ) по сравнению с 2.1% ( $29/114 \times 6 \times 2$ ) соответственно,  $p < 0.01$  (табл. 3). В то же время дополнительно были выявлены статистически значимые различия по частоте гаметического и соматического гиперметилирования материнских и отцовских аллелей, которые составили — 0.7% ( $8/102 \times 6 \times 2$ ) в группе III в сравнении с 0% в IV группе ( $p < 0.01$ ) и 1.9% ( $24/102 \times 6 \times 2$ ) в группе III в сравнении с 0.1% ( $2/114 \times 6 \times 2$ ) в IV группе ( $p < 0.01$ ) соответственно.

При исследовании отдельных генов на расширенной выборке СА было показано, что гипометилирование *KCNQ1OT1*, *PEG10* и *GRB10* и гиперметилирование *DLK1* и *PEG1* чаще отмечено в группе III в отличие от группы IV ( $p \leq 0.05$ ) (табл. 4). Гены *PEG1/MEST*, *PEG10* и *GRB10* расположены на хромосоме 7, поэтому сопоставление данных о статусе метилирования этих локусов позволило исключить однородительскую дисомию по этой хромосоме.

Также в расширенной выборке был подтвержден мультилокусный характер эпимутаций. Частота этого показателя в группе СА от женщин с ПНБ составила 1.9% ( $27/102 \times 7 \times 2$ ), а в группе с одним спорадическим аборт — 0.4% ( $6/114 \times 7 \times 2$ ,  $p < 0.01$ ). В первом случае эпимутации затрагивали одновременно от 2 до 5 локусов, а во втором — не более чем два локуса. При сравнении множественных эпимутаций в шести генах, установленных при микрочиповом исследовании, и исключая данные по локусу *PEG/MEST*, в котором не было выявлено эпимутаций, было показано, что 4 из 6 СА в группе I имели нарушения метилирования от 2 до 4 генов, а в группе II у всех абортусов выявлены множественные эпимутации, одновременно затрагивающие от 3 до 5 генов. Наблюдаемое уменьшение разнообразия затрагиваемых генов, по сравнению с данными чипа, обусловлено, вероятно, спецификой формирования выборки для микрочипового исследования, в которую вошли несколько СА с ранее обнаруженными эпимута-

циями, а также с большим числом анализируемых импринтированных генов.

Таким образом, сопоставляя результаты микрочипового исследования и данные репликативного анализа, следует обратить внимание, что в целом они демонстрируют сходные тенденции и закономерности в группах СА от женщин с привычным и спорадическим невынашиванием беременности:

суммарная частота эпимутаций импринтированных генов повышена у СА от женщин с ПНБ по сравнению с СА от женщин с СПБ;

большинство эпимутаций имеют соматическое происхождение, при этом их частота выше в группе СА от женщин с ПНБ по сравнению с СА от женщин с СПБ;

наиболее часто соматическому гипометилированию в обеих группах подвергаются аллели материнского происхождения, при этом частота их гипометилирования оказывается также выше в группе СА от женщин с ПНБ по сравнению с СА от женщин с СПБ;

в обеих группах СА выявлены множественные дефекты метилирования импринтированных генов, однако статистически значимое повышение их частоты в группе СА от женщин с ПНБ было зарегистрировано только при исследовании расширенной выборки.

При анализе расширенных выборок были получены дополнительные статистически значимые отличия по следующим показателям:

частота гаметического гиперметилирования аллелей отцовского происхождения оказалась выше у СА от женщин с ПНБ по сравнению с СА от женщин с СПБ, где таких эпимутаций выявлено не было;

частота соматического гиперметилирования отцовских аллелей оказалась выше в группе СА от женщин с ПНБ по сравнению с СА от женщин с СПБ;

гипометилирование каждого из генов *KCNQ1OT1*, *PEG10* и *GRB10*, так же как и гиперметилирование *DLK1* и *PEG1*, чаще отмечено в группе СА от женщин с ПНБ по сравнению с СА от женщин с СПБ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Геномный импринтинг — эпигенетический феномен, обеспечивающий моноаллельную экспрессию генов на одной из родительских хромосом. Согласно наиболее популярной гипотезе “конфликта полов” [26], подобная функциональная гаплоидизация импринтированных участков генома ограничивает участие материнских генов в формировании плацентарных структур и усиливает роль отцовских в реализации этого процесса.

**Таблица 4.** Число и частота эпимутаций импринтированных генов в расширенной выборке спонтанных абортусов от женщин с привычным и спорадическим невынашиванием беременности

Ген	Число и частота эпимутаций у спонтанных абортусов от женщин										Р				
	с ПНБ (группа III, число исследованных CpG-сайтов – 204 по каждому гену)					с СПБ (группа IV, число исследованных CpG-сайтов – 228 по каждому гену)									
	ГЭ	СЭ	Г/СЭ	Э	ГЭ	СЭ	Г/СЭ	Э	ГЭ	СЭ	Г/СЭ	ГЭ	СЭ	Г/СЭ	Э
<b>Гипометилирование</b>															
<i>PLAGL1</i>	–	9 (4.4%)	2 (0.9%)	11 (5.4%)	–	6 (2.6%)	–	6 (2.6%)	–	0.5	–	–	0.5	0.5	0.4
<i>DLK1</i>	–	7 (3.4%)	–	7 (3.4%)	–	6 (2.6%)	–	6 (2.6%)	1 (0.4%)	0.6	–	–	0.6	0.9	0.9
<i>KCNQ1OT1*</i>	–	10 (4.9%)	–	10 (4.9%)	–	2 (0.8%)	–	2 (0.8%)	1 (0.4%)	<b>0.03</b>	–	–	<b>0.03</b>	0.9	<b>0.05</b>
<i>PEG1</i>	–	7 (3.4%)	2 (0.9%)	9 (4.3%)	–	4 (1.8%)	–	4 (1.8%)	1 (0.4%)	0.2	–	–	0.2	0.9	0.1
<i>PEG3*</i>	–	8 (3.9%)	3 (1.5%)	11 (5.4%)	–	4 (1.8%)	–	4 (1.8%)	2 (0.8%)	0.2	–	–	0.2	0.9	0.1
<i>PEG10</i>	–	8 (3.9%)	6 (2.9%)	14 (6.8%)	–	7 (0.3%)	–	7 (0.3%)	–	0.5	–	–	0.5	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>
<i>GRB10</i>	–	7 (3.4%)	–	7 (3.4%)	–	1 (0.4%)	–	1 (0.4%)	–	<b>0.05</b>	–	–	<b>0.05</b>	–	<b>0.05</b>
<b>Гиперметилирование</b>															
<i>PLAGL1</i>	–	2 (0.9%)	–	2 (0.9%)	–	1 (0.4%)	–	1 (0.4%)	–	0.9	–	–	0.9	–	0.7
<i>DLK1</i>	2 (0.8%)	6 (2.5%)	–	8 (3.3%)	–	–	–	–	–	<b>0.05</b>	–	–	<b>0.05</b>	–	<b>0.01</b>
<i>PEG1</i>	7 (3.8%)	13 (6.4%)	–	20 (10.2%)	–	1 (0.4%)	–	1 (0.4%)	–	<b>0.001</b>	<b>0.01</b>	–	<b>0.001</b>	–	<b>0.001</b>
<i>PEG10</i>	–	3 (1.5%)	–	3 (1.5%)	–	–	–	–	–	0.3	–	–	0.3	–	0.3
<i>GRB10</i>	–	1 (0.5%)	–	1 (0.5%)	1 (0.4%)	5 (2.2%)	–	5 (2.2%)	–	0.6	–	–	0.6	0.6	0.6

Примечание. ПНБ – привычное невынашивание беременности; ГЭ – герминативные эпимутации; СЭ – соматические эпимутации; Э – эпимутации; Г/СЭ – гамети-ческие или соматические эпимутации.

\* В данных генах обнаружено только гипометилирование.

Действительно, в настоящей работе в плацентарных тканях показано преимущественное гипометилирование материнских и гиперметилирование отцовских аллелей у СА от женщин с ПНБ. Такие эпигенетические нарушения, согласно гипотезе “конфликта полов”, могут приводить к увеличению супрессирующих и уменьшению стимулирующих рост эмбриона факторов.

Плацента выполняет целый ряд важнейших функций, направленных на обеспечение достаточных условий для физиологического течения беременности и нормального развития плода. Очевидно, что нарушение метилирования импринтированных генов способно изменять функции плаценты и тем самым влиять на развитие эмбриона. Действительно у СА от женщин с ПНБ и без данной патологии нами показано наличие эпимутаций в 20 из 47 исследованных импринтированных генах. Эти гены задействованы в разных биологических процессах: в эмбриональном развитии (*DLK1*, *GNAS*, *PEG3*), клеточной пролиферации и дифференцировке (*DLK1*, *INS*, *PEG10*, *GABRA5*, *GABRB3*, *HTR2A*, *GNAS*, *WT1*), апоптозе (*HTR2A*, *INS*, *PEG10*, *PEG3*, *WT1*), клеточном росте (*INS*, *GNAS*, *PEG3*, *WT1*), транспорте (*GABRA5*, *GABRB3*, *GRB10*, *HTR2A*, *INS*, *TRPM5*) и клеточном цикле (*INS*) [27]. Для подтверждения полученных данных нами было проведено репликативное исследование, в которое было включено семь импринтированных генов:

*PEG10* (7q21) – продуктом гена является транспозоноподобный белок, участвующий в развитии плаценты, дифференцировке клеток и апоптозе;

*DLK1* (14q32) – продуктом гена является фактор роста, который совместно с *INS*, *PEG10* и *WT1* вовлечен в нейроэндокринную и клеточную дифференцировку;

*PEG1/MEST* (7q32) – участвует в регуляции процессов роста эмбриона и плаценты;

*PEG3* (19q13.4) – кодирует белок, который относится к семейству цинковых пальцев и является регулятором транскрипции, играет роль в пролиферации и р53-опосредованном апоптозе, является опухолесупрессором;

*GRB10* (7p12.2) – рецептор фактора роста. Продукт гена принадлежит к адаптерным белкам, которые взаимодействуют с рядом рецепторов тирозинкиназ и сигнальных молекул, с рецепторами инсулина и инсулиноподобного фактора роста. Избыточная экспрессия некоторых изоформ кодируемого белка ингибирует активность тирозинкиназы и таким образом подавляет рост клеток;

*PLAGL1* (6q24) – продуктом этого опухолесупрессорного гена является транскрипционный фактор, который вместе с белком р53 вовлечен в регуляцию клеточного цикла через контроль пе-

рехода фазы G1/S и запуск апоптоза. Он подавляет клеточный рост и экспрессируется только с отцовского гомолога. Поэтому гипометилирование этого гена может привести к уменьшению пролиферативной активности клеток;

*KCNQ1OT1* (*KvDMR1*, 11p15) – один из двух центров импринтинга кластера импринтированных генов 11p15, локализован в 10-м интроне гена *KCNQ1* и транскрибируется только с хромосомы отцовского происхождения. Продуктом транскрипции является длинная некодирующая РНК, которая выключает активность рядом расположенных импринтированных генов.

Особого внимания заслуживают данные, имеющие большую частоту аномалий метилирования импринтированных генов в плацентарных тканях СА от женщин с ПНБ по сравнению с СПБ. Этот факт указывает на наличие какого-то фактора, оказывающего систематическое негативное воздействие на ход эмбрионального развития в течении каждой беременности. При анализе полученных результатов исследования обращает на себя внимание и то обстоятельство, что большинство выявленных нарушений характера метилирования импринтированных генов имеет соматическое происхождение и связано с нарушением молекулярных механизмов поддержания импринтированного статуса генов в соматических клетках организма. Вместе с тем, несмотря на соматическое происхождение эпимутаций, важно отметить, что эти изменения затрагивали преимущественно хромосомы материнского происхождения и были представлены гипометилированием материнских аллелей. Такой тип эпимутаций характерен для биродительского полного пузырного заноса (БППЗ) – репродуктивной патологии, при котором материнские в норме метилированные аллели импринтированных генов оказываются гипометилированными вследствие глобального нарушения установления геномного импринтинга в оогенезе. Подобное эпигенетическое нарушение приводит к формированию классической картины полного пузырного заноса, традиционно формируемой при диандрии [28].

Исследования последних лет показывают, что молекулярно-генетической основой БППЗ могут являться мутации в ряде генов (*NLRP7*, *KHDC3L*), вероятно задействованных в установлении и поддержании геномного импринтинга [29–31] либо контролирующих отбор имплантирующихся бластоцист андрогенетического происхождения [32]. Однако в отличие от БППЗ, обусловленного герминативными эпимутациями, выявленные в нашем исследовании множественные дефекты метилирования импринтированных генов имели постзиготическое соматическое происхождение.

Наличие множественных эпимутаций преимущественно у СА от женщин с ПНБ свидетельствует

о том, что, возможно, эпимутации в импринтированных генах возникают на фоне мутаций в генах, контролирующих импринтинг, а супруги в таких семьях являются носителями этих мутаций. В этой связи интересными являются данные о мутациях в гене *NLRP7*, которые были обнаружены при семейных и повторяющихся формах БППЗ, сопровождающихся множественным гипометилированием материнских аллелей [33]. В то же время Агаянова с соавторами не показали ни одного случая мутаций в генах *NLRP7*, *NLRP2* или *KHDC3L* у 94 и 24 женщин с СПБ и ПНБ соответственно, однако при этом они не изучали эпигенетический статус импринтированных генов у самих эмбрионов [34].

В формировании гиперметилирования нескольких импринтированных генов было показано участие еще одного гена — *ZFP42*, входящего в семейство *KRAB* домена цинковых пальцев. Так, Ким с соавторами описали мутации в *Zfp42* при гиперметилировании импринтированных генов *Gnas* и *Peg3* у мыши [35]. Ген *ZFP42* является маркером плюрипотентности, экспрессирующимся в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках. Резкое подавление экспрессии этого гена происходит при начале дифференцировки клеток.

В связи с соматическим происхождением большинства выявленных эпимутаций особого внимания заслуживает гипотеза и о том, что отмеченные выше гены, в частности *NLRP7*, могут быть так называемыми генами с материнским эффектом. Экспрессия таких генов происходит в ооцитах и их продукты необходимы для обеспечения ранних этапов развития, особенно до активации эмбрионального развития. Мутации в этих генах могут не оказывать влияния на овуляцию и оплодотворение, но отсутствие их продуктов приведет к ранней остановке эмбрионального развития. В связи с этим интересно отметить и тот факт, что мужчины, носители мутаций в гене *NLRP7*, обычно не имеют репродуктивных проблем [36].

Таким образом, множественные нарушения импринтинга, возникающие преимущественно в соматических клетках эмбрионов и изменяющие баланс дозы генов материнского и отцовского происхождения, оказываются распространенным явлением в плацентарных тканях спонтанных абортусов от женщин с привычным невынашиванием беременности. Эпигенетический статус импринтированных генов может быть рассмотрен в качестве нового биомаркера для диагностики наследственных причин и профилактики привычных потерь беременности на ранних сроках, в том числе через поиск мутаций в генах, продукты которых задействованы в регуляции геномного импринтинга.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФАНО РФ по теме “Эпигенетический компонент соматической вариабельности генома при патологии ранних этапов онтогенеза человека” (№ госрегистрации: 01201362164), а также при частичной поддержке программы “Научный фонд им. Д.И. Менделеева Томского государственного университета” в 2015 г. Фрагмент исследования, посвященный репликативному анализу, выполнен на базе Центра коллективного пользования “Медицинская геномика” (ННИМГ, г. Томск). Авторы выражают благодарность сотрудникам ЗАО “Геноаналитика” (г. Москва) за проведение гибридизации на ДНК-метилочипах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farquharson R.G., Jauniaux E., Exalto N. Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events // Hum. Reprod. 2005. V. 20. P. 3008–3011.
2. Pfeifer S., Goldberg J., Lobo R. et al. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion // Fertil. Steril. 2013. V. 99. P. 63. doi 10.1016/j.fertnstert.2012.09.023
3. Menasha J., Levy B., Hirschhorn K., Kardon N.B. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study // Genet. Med. 2005. V. 7(4). P. 251–263. doi 10.1097/01.GIM.0000160075.96707.04
4. Hardy K., Hardy P.J., Jacobs P.A. et al. Temporal changes in chromosome abnormalities in human spontaneous abortions: Results of 40 years of analysis // Am. J. Med. Genet. A. 2016. V. 10. doi 10.1002/ajmg.a.37795
5. Никитина Т.В., Лебедев И.Н. Цитогенетика привычного невынашивания беременности // Генетика. 2014. Т. 50. № 5. С. 501–514. doi 10.7868/S001667581402012X
6. Adalsteinsson B.T., Ferguson-Smith A.C. Epigenetic control of the genome—lessons from genomic imprinting // Genes. 2014. V. 5(3). P. 635–655. doi 10.3390/genes5030635
7. Каталог импринтированных генов и родительских эффектов у человека и животных. Университет Отаго. Режим доступа: <http://igc.otago.ac.nz>
8. Lambertini L. Genomic imprinting: sensing the environment and driving the fetal growth // Curr. Opin. Pediatr. 2014. V. 26(2). P. 237–242. doi 10.1097/MOP.0000000000000072
9. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Эпимутации центра импринтинга *KCNQ1OT1* хромосомы 11 при ранней эмбриональной гибели у человека // Генетика. 2008. Т. 44. № 12. С. 1609–1616.
10. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Эпимутации импринтированного гена *PLAGL1* при привычном невынашивании беременности // Мед. генетика. 2010. Т. 9. № 11. С. 34–39.
11. Lebedev I.N. Genomic imprinting and human reproduction // Epigenetics and Epigenomics / Ed. Dr. Payne C.J. In Tech. 2014. doi 10.5772/57241

- Available from: <http://www.intechopen.com/books/epigenetics-and-epigenomics/genomic-imprinting-and-human-reproduction>.
12. Guo F, Yan L., Guo H., Li L. et al. The transcriptome and DNA methylome landscapes of human primordial germ cells // *Cell*. 2015. V. 161(6). P. 1437–1452. doi 10.1016/j.cell.2015.05.015
  13. Tang W.W., Dietmann S., Irie N. et al. A unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development // *Cell*. 2015. V. 161(6). P. 1453–1467. doi 10.1016/j.cell.2015.04.053
  14. [http://www.medgenetics.ru/UserFile/File/Doc/Publications/2016/Supplement\\_Sazhenova%20et%20al.pdf](http://www.medgenetics.ru/UserFile/File/Doc/Publications/2016/Supplement_Sazhenova%20et%20al.pdf) – список исследованных генов и индексы их метилирования.
  15. Martin-Subero J., Bibikova M., Mackay D. et al. Microarray-based DNA methylation analysis of imprinted loci in a patient with transient neonatal diabetes mellitus // *Am. J. Med. Genet.* 2008. V. 15(24). P. 3227–3229. doi 10.1002/ajmg.a.32577
  16. Fernandez A.F., Assenov Y., Martin-Subero J.I. et al. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples // *Genome Res.* 2012. V. 22(2). P. 407–419. doi 10.1101/gr.119867.110
  17. Zheng H.Y., Shi X.Y., Wu F.R. et al. Assisted reproductive technologies do not increase risk of abnormal methylation of *PEG1/MEST* in human early pregnancy loss // *Fertil. Steril.* 2011. V. 96(1). P. 84–89. doi 10.1016/j.fertnstert.2011.04.021
  18. Zechner U., Pliushch G., Schneider E. et al. Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy losses after ART and spontaneous conception // *Mol. Hum. Reprod.* 2010. V. 16(9). P. 704–713. doi 10.1093/molehr/gap107
  19. Abdollahi A., Pisarcik D., Roberts D. et al. *LOT1 (PLAGL1/ZAC1)*, the candidate tumor suppressor gene at chromosome 6q24–25, is epigenetically regulated in cancer // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 6041–6049. doi 10.1074/jbc.M210361200
  20. Arima T., Kamikihara T., Hayashida T. *ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1)* and *p57KIP2 (CDKN1C)* are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33(8). P. 2650–2660. doi 10.1093/nar/gki555
  21. Kainz B., Shehata M., Bilban M. et al. Overexpression of the paternally expressed gene 10 (*PEG10*) from the imprinted locus on chromosome 7q21 in high-risk B-cell chronic lymphocytic leukemia // *Int. J. Cancer.* 2007. V. 121(9). P. 1984–1993. doi 10.1002/ijc.22929
  22. Otsuka S., Maegawa S., Takamura A. et al. Aberrant promoter methylation and expression of the imprinted *PEG3* gene in glioma // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2009. V. 85(4). P. 157–165. doi 10.2183/pjab.85.157
  23. Seisenberger S., Peat J.R., Hore T.A. et al. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2013. V. 368. P. 368–379. doi 10.1098/rstb.2011.0330
  24. LaSalle J.M., Reiter L.T., Chamberlain S.J. Epigenetic regulation of *UBE3A* and roles in human neurodevelopmental disorders // *Epigenomics.* 2015. V. 7(7). P. 1213–1228. doi 10.2217/epi.15.70
  25. Pozharny Y., Lambertini L., Ma Y. et al. Genomic loss of imprinting in first-trimester human placenta // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010. V. 202(4). P. 391–398. doi 10.1016/j.ajog.2010.01.039
  26. Halg D., Graham C. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor // *Cell.* 1991. V. 64(6). P. 1045–1046. doi 10.1016/0092-8674(91)90256-X
  27. Баз данных “Gene Ontology” [<http://www.geneontology.org>].
  28. Van den Veyver I.B., Al-Hussaini T.K. Biparental hydatidiform moles: a maternal effect mutation affecting imprinting in the offspring // *Hum. Reprod. Update.* 2006. V. 12(3). P. 233–242. doi 10.1093/humupd/dmk005
  29. Murdoch S., Djuric U., Mazhar B. et al. Mutations in *NALP7* cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastages in human // *Nat. Genet.* 2006. V. 38(3). P. 300–302. doi 10.1038/ng1740
  30. Parry D.A., Logan C.V., Hayward B.E. et al. Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate *c6orf221* as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocytes // *Am. J. Hum. Genet.* 2011. V. 89(3). P. 451–458. doi 10.1016/j.ajhg.2011.08.002
  31. Fallahian M., Sebire N.J., Savage P.M. et al. Mutations in *NLRP7* and *KHDC3L* Confer a Complete Hydatidiform Mole Phenotype on Digynic Triploid Conceptions // *Hum. Mutat.* 2013. V. 34. P. 301–308. doi 10.1002/humu.22228
  32. Deveault C., Qian J.H., Chebaro W.A. et al. *NLRP7* mutations in women with diploid androgenetic and triploid moles: a proposed mechanism for mole formation // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18(5). P. 888–897. doi 10.1093/hmg/ddn418
  33. Landolsi H., Rittore C., Philibert L. et al. *NLRP7* mutation analysis in sporadic hydatidiform moles in Tunisian patients: *NLRP7* and sporadic mole // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2012. V. 136(6). P. 646–651. doi 10.5858/arpa.2011-0399-OA
  34. Aghajanova L., Mahadevan S., Altmae S. et al. No evidence for mutations in *NLRP7*, *NLRP2* or *KHDC3L* in women with unexplained recurrent pregnancy loss or infertility // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30(1). P. 232–238. doi 10.1093/humrep/deu296
  35. Kim J.D., Kim H., Ekram M.B. et al. *Rex1/Zfp42* as an epigenetic regulator for genomic imprinting // *Hum. Mol. Genet.* 2011. V. 20(7). P. 1353–1362. doi 10.1093/hmg/ddr017
  36. Лепшин М.В., Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Множественные эпимутации импринтированных генов в геноме человека и наследственная патология // *Генетика.* 2014. Т. 50. № 3. С. 253–272. doi 10.7868/S0016675814030059

**Epigenetic Status of Imprinted Genes in Placenta during Recurrent Pregnancy Loss**

**E. A. Sazhenova<sup>a,\*</sup>, T. V. Nikitina<sup>a</sup>, N. A. Skryabin<sup>a,b</sup>, L. I. Minaycheva<sup>a</sup>, T. V. Ivanova<sup>c</sup>,  
T. N. Nemtseva<sup>c</sup>, S. Yu. Yuriev<sup>c</sup>, I. D. Evtushenko<sup>c</sup>, and I. N. Lebedev<sup>a,b,c</sup>**

<sup>a</sup>*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center  
of Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia*

*\*e-mail: elena.sazhenova@mail.ru*

<sup>b</sup>*Tomsk National Research State University, Tomsk, 634050 Russia*

<sup>c</sup>*Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia*

An analysis of differential methylation of 47 imprinted genes in placenta tissues of spontaneous abortions at the first trimester of pregnancy from women with recurrent pregnancy loss or with one sporadic abortion was performed using the DNA-microarray approach. We showed that epimutations of the imprinted genes were registered significantly more often in abortions from women with recurrent miscarriage in contrast to the embryos from women with sporadic pregnancy loss with frequency of 6.2 and 3.7% per locus, respectively ( $p < 0.01$ ). The predominant type of epimutation appeared to be a postzygotic hypomethylation of the imprinted genes on chromosomes of maternal origin, which was observed in the examined samples in 5.1 and 2.89% of cases, respectively. Replicative study of the methylation status of seven imprinted genes (*DLK1*, *PEG10*, *PLAGL1*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, *GRB10*, and *PEG1/MEST*) in the enlarged embryo samples supported the results of microarray analysis in respect to both epimutation frequency and predominance of somatic hypomethylation of maternal alleles. It was also demonstrated that pregnancy loss was associated with multilocus methylation defects of imprinted genes, the frequency of which was also significantly increased in the placental tissues of spontaneous abortions in women with recurrent miscarriage. English translation of the paper published in Russian Journal of Genetics, 2017, Vol. 53, No. 3, is available ONLINE by subscription from: <http://www.springer.com/>, <http://link.springer.com/journal/11177>.

**Keywords:** genomic imprinting, DNA methylation, multilocus methylation defects, placenta, recurrent pregnancy loss, spontaneous abortions, epimutations.