











МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА MEDICAL GENETICS


DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-515-531
EDN: IHQKOH

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Нарушения метилирования генов *PRDM16* и *PTPRN2* в ворсинах хориона при невынашивании беременности

С.А. Васильев^{1,2}  , О.Ю. Васильева¹ , Б. Оппонг-Пепрах²,
В.В. Деменова¹ , А.С. Зуев¹ , Е.А. Саженова¹ ,
Т.В. Никитина¹ , Е.Н. Толмачева¹ 

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр, г. Томск, Российская Федерация

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Российская Федерация
 stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Аннотация. *Актуальность.* Нарушения эпигенетической регуляции генов, ответственных за развитие эмбриона и плаценты, ассоциированы со многими патологиями беременности. *Цель.* Целью настоящей работы стал анализ распространенности нарушений метилирования генов *PRDM16* и *PTPRN2* в ворсинах хориона спонтанных абортусов с нормальным кариотипом и с наиболее частыми анеуплоидиями (трисомия 16 и моносомия X). *Материалы и методы.* Оценка профиля метилирования была проведена с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования в ворсинах хориона медицинских абортусов (n = 10), спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (n = 39), трисомией 16 (n = 17) и моносомией X (n = 20) и лимфоцитов периферической крови здоровых добровольцев (n = 6). *Результаты и обсуждение.* Было обнаружено дифференциальное метилирование отдельных CpG-сайтов в изученных генах в ворсинах хориона спонтанных абортусов. Несмотря на отсутствие значимых отличий между группами по среднему уровню метилирования в изученных регионах генов, отклонения уровня метилирования генов *PRDM16* и *PTPRN2* были выявлены для 33 % и 5 % спонтанных абортусов, соответственно, что указывает на высокую частоту распространения эпигенетических аномалий по этим генам в ворсинах хориона спонтанных абортусов. Уровень метилирования гена *PRDM16*

© Васильев С.А., Васильева О.Ю., Оппонг-Пепрах Б., Деменова В.В., Зуев А.С., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Толмачева Е.Н., 2023



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

значимо коррелировал с уровнем метилирования ретротранспозона LINE-1, что указывает на генерализованный характер нарушений метилирования у спонтанных абортусов. Наконец, уровень метилирования гена *PTPRN2* зависел от возраста матерей спонтанных абортусов с моносомией X, что поднимает вопрос о влиянии материнских факторов на профиль метилирования в этой группе спонтанных абортусов. **Выводы.** Полученные результаты указывают, что эпигенетические нарушения гена *PRDM16* могут быть связаны со спонтанным прерыванием беременности в первом триместре.

Ключевые слова: *PRDM16*, *PTPRN2*, метилирование ДНК, ворсины хориона, невынашивание беременности, анеуплоидия, бисульфитное секвенирование, спонтанные абортусы

Информация о финансировании. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23–15–00341.

Вклад авторов: Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности — неприменимо.









Этическое утверждение. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (09.11.2020/№ 7).

Информированное согласие на публикацию. Перед началом исследования все участники исследования дали добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013).

Поступила 14.10.2023. Принята 14.11.2023.


Для цитирования: Васильев С.А., Васильева О.Ю., Оппонг-Пепрах Б., Деменева В.В., Зувев А.С., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Толмачева Е.Н. Нарушения метилирования генов *PRDM16* и *PTPRN2* в ворсинах хориона при невынашивании беременности // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 4. С. 515–531. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–515–531

Abnormal methylation of *PRDM16* and *PTPRN2* genes in chorionic villi in miscarriage

Stanislav A. Vasilyev^{1,2}  , Oksana Yu. Vasilyeva¹ , Bismark Oppong-Peprah²,
Victoria V. Demeneva¹ , Andrey S. Zuev¹ , Elena A. Sazhenova¹ ,
Tatiana V. Nikitina¹ , Ekaterina N. Tolmacheva¹ 

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russian Federation

² National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

 stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Abstract. Relevance. Abnormal epigenetic regulation of genes responsible for the development of the embryo and placenta is associated with many pregnancy pathologies. **Aim.** The aim of this work was to analyze the prevalence of abnormal methylation of the *PRDM16* and *PTPRN2* genes in chorionic villi of spontaneous abortions with normal karyotype and with

the most frequent aneuploidies (trisomy 16 and monosomy X). *Materials and Methods*. The methylation profile was evaluated using targeted bisulfite massive parallel sequencing in chorionic villi of induced abortions (n = 10), spontaneous abortions with normal karyotype (n = 39), trisomy 16 (n = 17) and monosomy X (n = 20) and peripheral blood lymphocytes of healthy volunteers (n = 6). *Results and Discussion*. In analyzed genes, differential methylation of individual CpG sites was found in chorionic villi of spontaneous abortions. Despite the absence of significant differences between the groups in the average level of methylation in analyzed gene regions, abnormal methylation of the *PRDM16* and *PTPRN2* genes were detected for 33 % and 5 % of spontaneous abortions, respectively, indicating a high incidence of epigenetic abnormalities in these genes in the chorionic villi of spontaneous abortions. The level of methylation of the *PRDM16* gene significantly correlated with the level of methylation of the retrotransposon LINE-1, which indicates the generalized nature of methylation disorders in spontaneous abortions. Finally, the level of methylation of the *PTPRN2* gene depended on the age of mothers of spontaneous abortions with monosomy X, which raises the question of the influence of maternal factors on the methylation profile in this group of spontaneous abortions. *Conclusion*. The results indicate that epigenetic disorders of the *PRDM16* gene may be associated with spontaneous termination of pregnancy in the first trimester.

Keywords: PRDM16, PTPRN2, DNA methylation, chorionic villi, miscarriage, aneuploidy, bisulfite sequencing, spontaneous abortions

Funding. The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 23–15–00341.

Author contributions. All authors made a significant contribution to the development of the concept and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements— not applicable.

Ethics approval. The study was approved by the Biomedical Ethics Committee of the Research Institute of Medical Genetics of the Tomsk NIMC (09.11.2020/No. 7).

Consent for publication. Before starting the study, all study participants gave voluntary written informed consent to participate in the study and the processing of personal data in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013).

Received 14.10.2023. Accepted 14.11.2023.

For citation: Vasilyev SA, Vasilyeva OYu, Oppong-Peprah B, Demeneva VV, Zuev AS, Sazhenova EA, Nikitina TV, Tolmacheva EN Abnormal methylation of PRDM16 and PTPRN2 genes in chorionic villi in miscarriage. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(4):515–531. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–515–531

Введение

Репродуктивные потери у человека являются крайне частым событием. Демографические исследования показали, что шансы произвести жизнеспособное потомство у женщины среднего репродуктивного возраста в пределах одного менструального цикла не превышают 25 % [1]. При этом около 15 % клинически распознаваемых беременностей спонтанно прерывается в течение первого

триместра [2]. Ранняя эмбриональная гибель является наиболее тяжелым проявлением генетических нарушений, среди которых наибольшими по размеру являются нарушения числа хромосом — анеуплоидия. Действительно, от 50 до 60 % спонтанных абортусов первого триместра беременности имеют анеуплоидии по различным хромосомам [3–5].

Тяжесть фенотипа ранней эмбриональной гибели обуславливает возможность существования

в этом периоде и масштабных эпигенетических нарушений. Действительно, значительные нарушения метилома выявлены в плаценте при различных патологиях беременности на поздних сроках: преэклампсии, задержке роста плода, гестационном диабете [6]. Особый интерес представляют гены, нарушения метилирования которых обнаруживаются при различных патологиях беременности. Одними из них являются гены *PRDM16* и *PTPRN2*, имеющие большое число CpG-островков.

Кроме того, в наших предварительных исследованиях показаны масштабные нарушения метилома и в хорионе спонтанных абортусов первого триместра как с анеуплоидным, так и с нормальным кариотипом [7, 8]. Это может объяснять гибель большей части эмбрионов в период первого триместра, когда происходит ремоделирование спиральных артерий матки, благодаря которому обеспечивается дальнейший быстрый рост и развитие эмбриона. Однако, неясно, насколько распространены аномалии метилирования генов среди спонтанных абортусов I триместра. Поэтому целью исследования являлся анализ распространенности нарушений метилирования генов *PRDM16* и *PTPRN2* в ворсинах хориона спонтанных абортусов с нормальным кариотипом и наиболее частыми анеуплоидиями (трисомия 16 и моносомия X).

Материалы и методы

В качестве исследуемого материала использовались ворсины хориона спонтанных абортусов с трисомией 16 ($n = 17$, гестационный возраст $8,6 \pm 1,4$ недели), с моносомией X ($n = 20$, гестационный возраст $10,5 \pm 1,7$ недели), с нормальным кариотипом ($n = 39$, гестационный возраст $9,9 \pm 2,3$ недели), а также медицинских абортусов ($n = 10$, гестационный возраст $8,3 \pm 1,2$ недели). Кроме того, был проведен анализ образцов лимфоцитов периферической крови 6 взрослых добровольцев. Образцы, взятые из биобанка «Биобанк населения Северной Азии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, были получены в период с 1993 по 2022 год. Для всех образцов из биобанка было получено инфор-

мированное согласие родителей на использование биоматериала для биобанкирования и проведения исследований. Также были получены информированные согласия от здоровых добровольцев.

Для определения кариотипа сразу после получения свежего материала до замораживания был проведен стандартный цитогенетический анализ на прямых препаратах ворсин хориона и в культурах фибробластов экстраэмбриональной мезодермы [9]. Результаты кариотипирования всех спонтанных абортусов с анеуплоидией были подтверждены методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Для анализа моносомии по X хромосоме были использованы центромеро-специфичные ДНК-зонды на хромосому X, а для анализа трисомии по 16 хромосоме были использованы субтеломерные ДНК-зонды (16q и 16p). Анализ проводился по описанной методике [10].

Образцы тканей хранились при температуре -80 °С. Разделение тканей проводилось морфологически стерильными инструментами, после чего клетки обрабатывались протеиназой К и инкубировались ночь при 37 °С. Выделение ДНК проводилось с помощью стандартного фенол-хлороформного метода. Концентрации ДНК измерялись с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (США). Бисульфитная модификация ДНК проводилась с использованием набора EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя. В ходе бисульфитной конверсии неметилированный цитозин метилируется в 5'-положении и модифицируется в урацил, который при дальнейшей ПЦР считывается как тимин. Метилированный цитозин не подвергается какой-либо модификации.

Анализ профиля метилирования проводился с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Для получения библиотек были использованы разработанные олигонуклеотидные праймеры, позволяющие амплифицировать с бисульфит-конвертированной ДНК участки генов *PRDM16* и *PTPRN2* (табл. 1). Амплификация целевого фрагмента проводилась

с помощью набора БиоМастер HS-Тaq ПЦР (2×) (Биолабмикс, Россия) по протоколу производителя. ПЦР проводилась в следующих условиях: 95 °С 5 мин; 40 циклов: 95 °С 30 с, 60 °С 45 с, 72 °С 45 с. Концентрацию целевых фрагментов

определяли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo, США). Продукты реакции очищали от примесей с помощью раствора сефадекса G50 (Sigma, США).

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для получения библиотек для таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования

Table 1

Sequences of oligonucleotide primers used to obtain libraries for targeted bisulfite massive parallel sequencing

Наименование / Name		Последовательность / Sequence	Продукт, п.н. / Product, bp	Координаты (hg38) / Coordinates (hg38)
PTPRN2_m2	F	5'-ATTGGTTATGTTTGGTAATTGTTA-3'	268	chr7:157542717-157542984
	R	5'-CCACAAAACCTTAAATACTACATCC-3'		
PTPRN2_m4	F	5'-TAAGATTTATATTGAGTAAATTAGGTTGTA-3'	310	chr7:158019641-158019950
	R	5'-AAATCTAAAATCCAAAAATATCTAAC-3'		
PRDM16_m1	F	5'-TGTTTTAGAGAGTTTGTGAGGTGTAT-3'	358	chr1:3117444-3117801
	R	5'-CTATAATCCCATAAAAACCAACAC-3'		
PRDM16_m3	F	5'-GAAGGTAGGGTGGGTTTTATTATT-3'	373	chr1:3237449-3237821
	R	5'-CAAAACCTTAAAAACCCAAAATCTA-3'		
PRDM16_m4	F	5'-GTTTAGTTTTGTTGGAGTTTATA-3'	350	chr1:3238668-3239017
	R	5'-ACATATAAAAAACCTATCCCAAACAC-3'		
PRDM16_m5	F	5'-GTGGTGTTTTAATTGTTTAGG-3'	381	chr1:3241142-3241522
	R	5'-AACCAAAAAACCCCAATCATAC-3'		
PRDM16_m6	F	5'-AAGGAGTGGATGTAGAAGTTGTTAT-3'	598	chr1:3279081-3279678
	R	5'-TCCTACAACACAAACTCTCCCTAAC-3'		

Таргетное бисульфитное массовое параллельное секвенирование было проведено на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора Micro Kit (2 × 150). Оценка качества прочтений была выполнена с помощью FastQC v0.11.8, после чего был проведен тримминг оставшихся последовательностей адаптеров и низких по качеству прочтений с помощью Trim-Galore. Затем прочтения были картированы на бисульфит-конвертированные таргетные последовательности с помощью инструмента bwa-meth v0.2.2 с параметрами по умолчанию. Данные по метилированию в контексте CpG были извлечены из полученных файлов BAM с помощью инструмента MethylDackel. Результаты представлялись в виде уровня метилирования,

представляющего собой отношение числа цитозинов к суммарному числу цитозинов и тиминов в отдельном CpG-сайте. Кроме того, был вычислен средний уровень метилирования вдоль всей области интереса. Статистический анализ был выполнен с помощью программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, США). Ранговый критерий Манна-Уитни был использован для сравнения уровня метилирования между группами образцов. Для определения границ выбросов в группе медицинских абортусов использовались формулы $Q_1 - 1,5 \times IQR$ и $Q_3 + 1,5 \times IQR$, где Q_1 и Q_3 — первый и третий квартиль, соответственно, IQR — межквартильное расстояние. Отличия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании был проведен анализ профиля метилирования генов *PTPRN2* и *PRDM16* в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом: наиболее частыми анеуплоидиями (трисомией 16, моносомией X) и нормальным кариотипом. В качестве контрольных групп сравнения использовались медицинские абортусы первого триместра беременности и лимфоциты периферической крови их родителей.

Ген *PTPRN2* находится в субтеломерном регионе длинного плеча хромосомы 7. Проанализированная область гена включает отдельные участки в 11–21 экзонах и соответствующих интронах (рис. 1). Было обнаружено значимое повышение уровня метилирования в группе спонтанных абортусов с трисомией 16 по сравнению с группой медицинских абортусов по 8 из 24 проанализированных CpG-сайтов, а один CpG-сайт был гипометилирован ($p < 0,05$) (рис. 1). У спонтанных абортусов с моносомией X не было обнаружено значимых отличий по уровню метилирования, а у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом был значимо снижен уровень метилирования только одного CpG-сайта (того же, что и у спонтанных абортусов с трисомией 16) ($p < 0,05$).

Ген *PRDM16* расположен в субтеломерной области короткого плеча хромосомы 1. Проанализированная область гена включает 2–3 экзона и 1–3 интроны (рис. 2). Было обнаружено значимое повышение уровня метилирования в группе спонтанных абортусов с трисомией 16 по сравнению с группой медицинских абортусов по 11 из 94 проанализированных CpG-сайтов ($p < 0,05$) (рис. 2). У спонтанных абортусов с моносомией X было обнаружено 2 гиперметилированных CpG-сайта, а у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом был значимо повышен уровень метилирования только одного CpG-сайта ($p < 0,05$).

Несмотря на отличия в уровне метилирования отдельных CpG-сайтов, средние уровни метилиро-

вания исследуемых генов вдоль всей проанализированной области значимо не отличались между группами абортусов. При этом были обнаружены значимые различия для уровней метилирования всех генов по сравнению с лимфоцитами периферической крови взрослых индивидов ($p < 0,05$), в которых уровень метилирования исследуемых генов составлял около 90 % (рис. 3). Это может указывать на транскрипционную активность данных генов в клетках ворсин хориона в отличие от лимфоцитов периферической крови взрослого организма.

Группы спонтанных абортусов с различным кариотипом характеризовались значительно большей вариацией уровня метилирования исследованных генов по сравнению с медицинскими абортусами. Это соответствует результатам наших предыдущих работ, где у спонтанных абортусов было обнаружено как снижение [11], так и повышение [8] уровня метилирования ретротранспозона LINE-1. Наблюдаемые широкие границы вариации уровня метилирования различных генов в группах спонтанных абортусов могут объясняться масштабной разбалансировкой метилома в ворсинах хориона. Учитывая, что при этом в большинстве случаев не наблюдается значимых отличий по уровню метилирования проанализированных генов у спонтанных абортусов по сравнению с группой медицинских абортусов, такая разбалансировка происходит только у части спонтанных абортусов.

Поэтому был проведен анализ нарушений уровня метилирования у отдельных спонтанных абортусов относительно группы медицинских абортусов. Для этого были вычислены пороговые значения вариации уровня метилирования для каждого гена в группе медицинских абортусов. Все значения в группах спонтанных абортусов, выходящие за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов, рассматривались как гипо- и гиперметилированные (табл. 2).

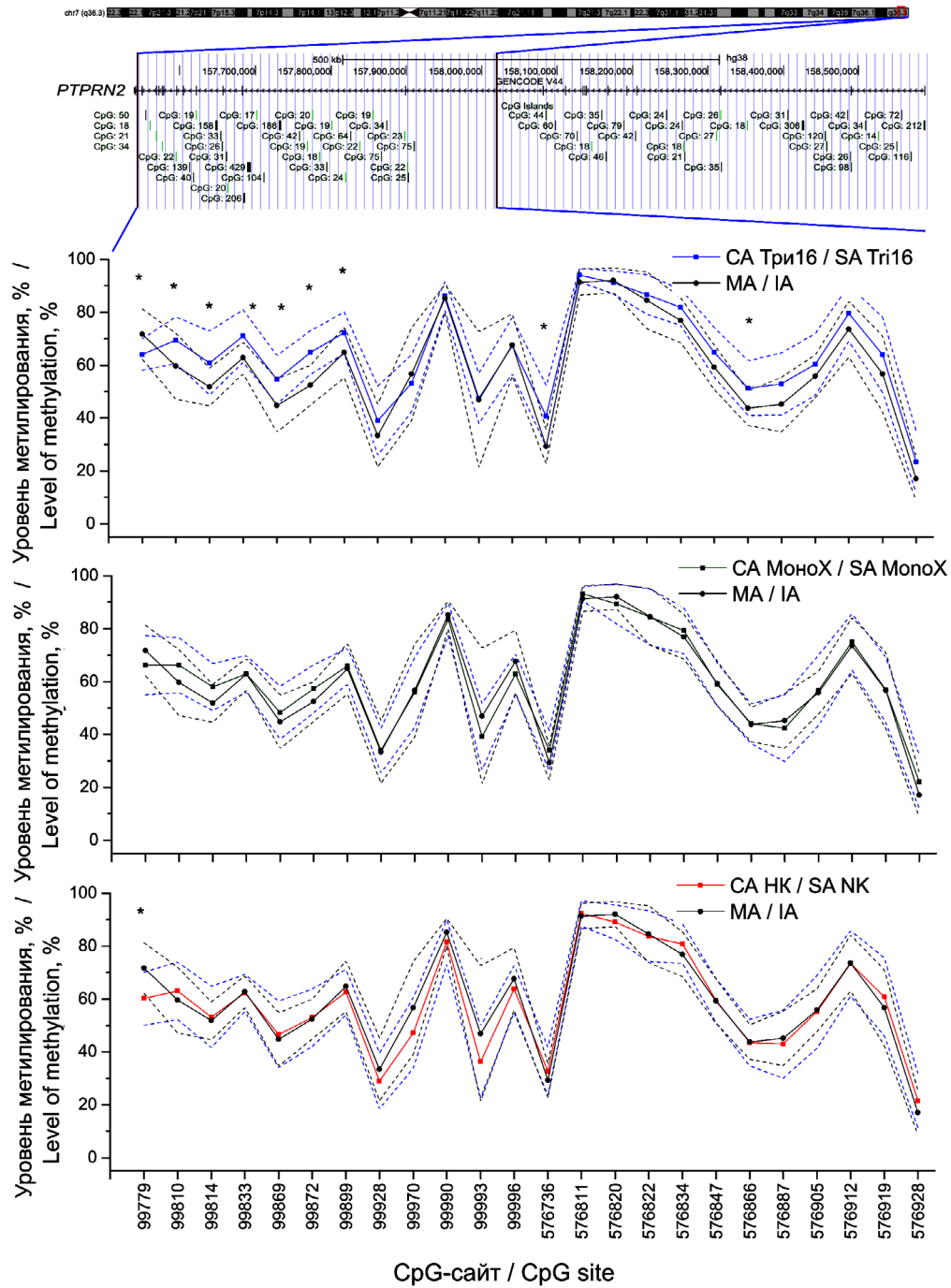


Рис. 1. Профиль метилирования CpG-сайтов в анализируемом регионе (обозначен красными вертикальными полосами на схеме) гена *PTPRN2* в группах спонтанных абортусов с трисомией 16 (СА Три16), с моносомией X (СА МоноX) и с нормальным кариотипом (СА НК) по сравнению с группой медицинских абортусов (МА). Пунктирными линиями показано стандартное отклонение профиля метилирования; * – $p < 0,05$

Fig. 1. The methylation profile of CpG sites in the analyzed region (indicated by red vertical stripes in the diagram) of the *PTPRN2* gene in the groups of spontaneous abortions with trisomy 16 (SA Tri16), with monosomy X (SA MonoX) and with normal karyotype (SA NK) compared with the group of induced abortions (IA). Dotted lines show standard deviation of the methylation profile; * – $p < 0,05$

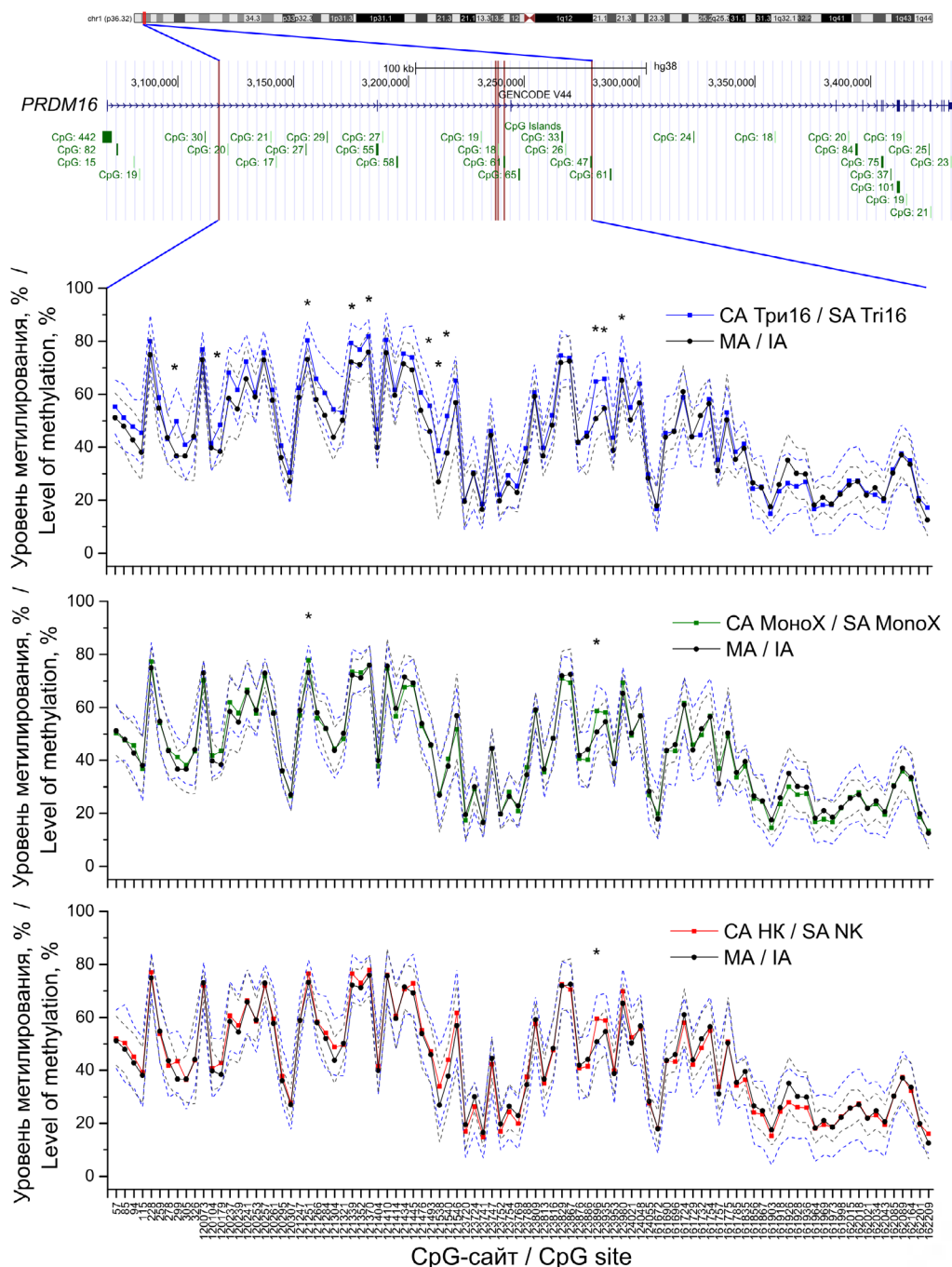


Рис. 2. Профиль метилирования CpG-сайтов в анализируемом регионе (обозначен красными вертикальными полосами на схеме) гена *PRDM16* в спонтанных абортусов с трисомией 16 (Три 16), с моносомией X (Моно X) и с нормальным кариотипом (CA НК) по сравнению с группой медицинских абортусов (МА).

Пунктирными линиями показано стандартное отклонение профиля метилирования; * – $p < 0,05$

Fig. 2. The methylation profile of CpG sites in the analyzed region (indicated by red vertical stripes in the diagram) of the *PRDM16* gene in the groups of spontaneous abortions with trisomy 16 (SA Tri16), with monosomy X (SA MonoX) and with normal karyotype (SA NK) compared with the group of induced abortions (IA).

Dotted lines show standard deviation of the methylation profile; * – $p < 0.05$

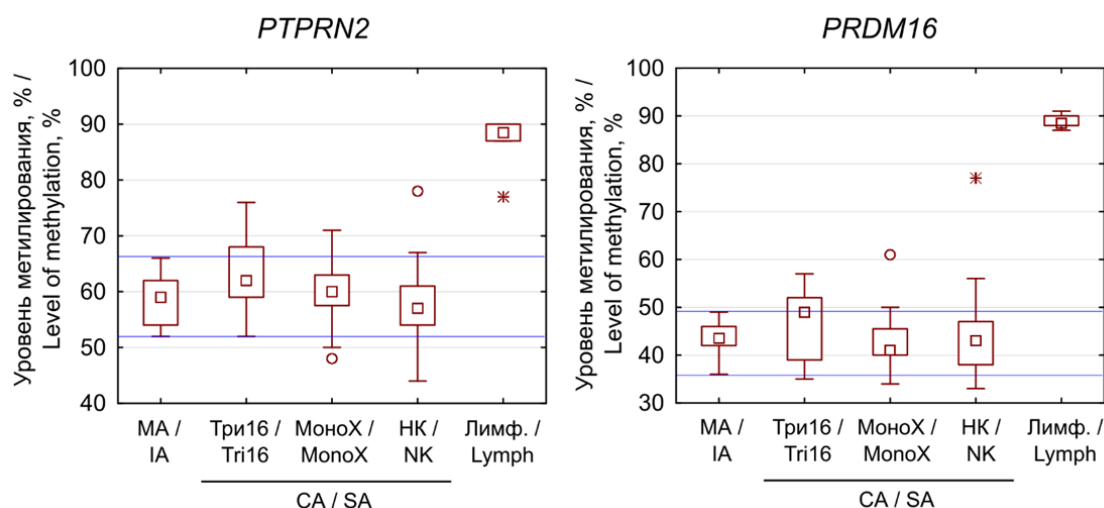


Рис. 3. Средний уровень метилирования проанализированных CpG-сайтов генов *PTPRN2* и *PRDM16* в ворсинах хориона в группах спонтанных абортусов с трисомией 16, с моносомией X, с нормальным кариотипом по сравнению с медицинскими абортусами и лимфоцитами периферической крови взрослых индивидов. Три 16 – спонтанные абортусы с трисомией 16, Моно X – спонтанные абортусы с моносомией X, НК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, Лимф. – лимфоциты взрослых индивидов, МА – медицинские абортусы. Квадрат в центре прямоугольника обозначает медиану. Боксы обозначают 25-й и 75-й процентиля. Усы отмечают границы выбросов, голубыми линиями отмечены границы выбросов в группе МА

Fig. 3. The average level of methylation of the analyzed CpG sites of the *PTPRN2* and *PRDM16* genes in chorionic villi in groups of spontaneous abortions with trisomy 16, with monosomy X, with normal karyotype compared with induced abortions and peripheral blood lymphocytes of adult individuals. Tri16 – spontaneous abortions with trisomy 16, MonoX – spontaneous abortions with monosomy X, NK – spontaneous abortions with normal karyotype, Lymph – lymphocytes of adult individuals, IA – induced abortions. The square in the center of the box represents the median. The boxes represent the 25th and 75th percentiles. Whiskers mark the outlier thresholds; blue lines mark the outlier thresholds in the IA group

Таблица 2

Число образцов с гипер- или гипометилированием исследуемых генов, выходящим за пределы вариации в группе медицинских абортусов

Table 2

The number of samples with hyper- or hypomethylation of the studied genes beyond the limits of variation in the group of induced abortions

Гены/степень метилирования Genes/methylation degree		Порог в группе МА (%) / Threshold in IA group	СА Три16 / SA Tri16	СА Моно X / SA Mono X	СА НК / SA NK	Всего
PTPRN2	Гипо- / Нуро-	44,5	0/17	0/20	1/39	5 % (4/76)
	Гипер- / Нупер-	72,5	2/17	0/20	1/39	
PRDM16	Гипо- / Нуро-	37,375	3/17	3/20	7/39	33 % (25/76)
	Гипер- / Нупер-	50,375	7/17	1/20	4/39	

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

Note: the number and proportion of abortions with a methylation level higher than the upper threshold (hyper-) and lower than the lower threshold (hypo-) of the range of variation in the group of induced abortions are presented. IA – induced abortions, SA Tri 16 – spontaneous abortions with trisomy on the 16 chromosome, SA Mono X – spontaneous abortions with monosomy on the X chromosome, SA NK – spontaneous abortions with normal karyotype.

Было обнаружено, что 33 % всех спонтанных абортусов имело нарушения уровня метилирования по гену *PRDM16* и 5 % спонтанных абортусов имело нарушения уровня метилирования по гену *PTPRN2*. При этом нарушения метилирования гена *PRDM16* наблюдались не только в группе спонтанных абортусов с трисомией 16, для которых характерно гиперметилированное состояние генома в клетках ворсин хориона [7], но и в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (28 %).

Параллельно с анализом профиля метилирования исследуемых генов, для тех же образцов ворсин хориона спонтанных и медицинских абортусов был проведен анализ профиля метилирования ретротранспозона LINE-1 также с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Ретротранспозон LINE-1 занимает около 21 % генома человека и поэтому уровень метилирования его промотора часто рассматривается в качестве маркера глобального метилирования всего генома человека. Ранее в работах нашей группы было показано, что спонтанные абортусы с анеуплоидией по различным хромосомам характеризуются повышенным уровнем метилирования LINE-1, а среди

спонтанных абортусов с нормальным кариотипом часть спонтанных абортусов имеет повышенный, а часть — сниженный уровень метилирования LINE-1 [8]. Поэтому, в настоящем исследовании был проведен корреляционный анализ между уровнем метилирования LINE-1 и средним уровнем метилирования исследуемых генов в группах спонтанных абортусов с различным кариотипом.

Было обнаружено, что в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом с уровнем метилирования LINE-1 значимо коррелирует уровень метилирования гена *PRDM16* ($R = 0,36$, $p = 0,03$) (рис. 4). Для других групп спонтанных абортусов значимых корреляций выявлено не было. Таким образом, у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом со сниженным и повышенным уровнем метилирования гена *PRDM16* нарушения метилирования затрагивают не только этот ген, а носят более глобальный характер в масштабах генома. Такие нарушения уровня метилирования могут быть связаны с недостаточным или избыточным функционированием базовых механизмов метилирования ДНК, независимых или слабо зависимых от локального геномного контекста.

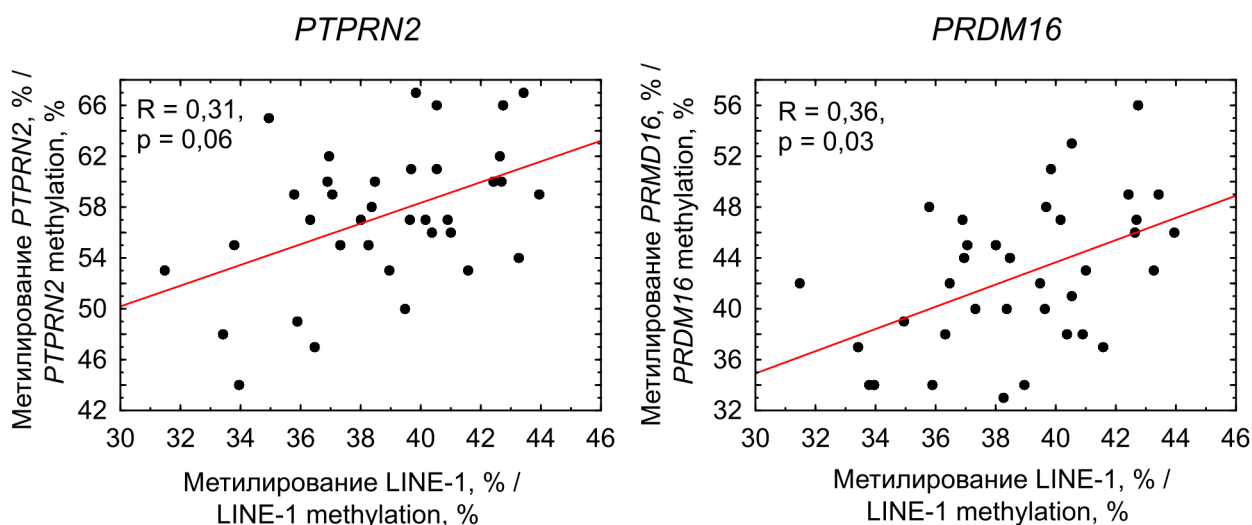


Рис. 4. Зависимость среднего уровня метилирования проанализированных CpG-сайтов генов *PTPRN2* и *PRDM16* в ворсинах хориона в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом от среднего уровня метилирования ретротранспозона LINE-1

Fig. 4. Dependence of the average methylation level of the analyzed CpG sites of the *PTPRN2* and *PRDM16* genes in chorionic villi in the group of spontaneous abortions with normal karyotype on the average methylation level of the retrotransposon LINE-1

Уровень метилирования гена *PTPRN2* значимо снижался с повышением возраста матери в группе спонтанных абортусов с моносомией хромосомы X ($R = -0,53$, $p = 0,016$) (рис. 5). В других группах

спонтанных абортусов значимых корреляций с возрастом матери не наблюдалось. С возрастом отца также значимых корреляций обнаружено не было ни в одной из групп.

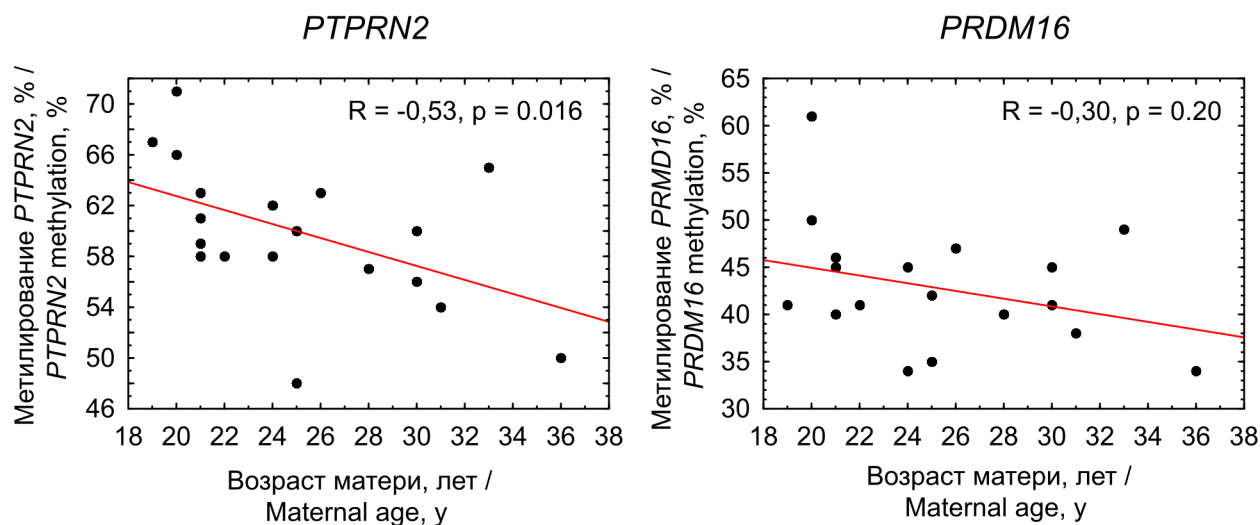


Рис. 5. Зависимость среднего уровня метилирования проанализированных CpG-сайтов генов *PTPRN2* и *PRDM16* в ворсинах хориона в группе спонтанных абортусов с моносомией X от возраста матери

Fig. 5. Dependence of the average methylation level of the analyzed CpG sites of the *PTPRN2* and *PRDM16* genes in chorionic villi in the group of spontaneous abortions with monosomy X on the maternal age

Ген *PRDM16* занимает очень протяженный участок в геноме (369,419 п. н.) и содержит в своем составе 33 CpG-островка. *PRDM16* является членом семейства белков, содержащих домен PR, и связан с различными заболеваниями, включая миелодиспластический синдром и Т-клеточный лейкоз взрослых [12, 13], а также аномалиями развития, такими как волчья пасть [14]. Известно также, что он действует как регулятор клеточной дифференцировки [15]. В развивающемся эмбрионе мыши экспрессия *PRDM16* обнаруживается на E9.5 в ограниченном числе тканей, а к E14.5 *PRDM16* экспрессируется в широком спектре развивающихся тканей, включая ткани головного мозга, легких, почек и желудочно-кишечного тракта [16].

Дифференциальное метилирование *PRDM16* при беременности связано с различными метаболическими нарушениями у матерей. В нескольких исследованиях показана связь с материнским диа-

бетом дифференциального метилирования *PRDM16* в крови детей [17–19], в ткани пуповины [20] и плаценты [21]. Известно, что *PRDM16* играет важную роль в развитии поджелудочной железы [22].

Кроме того, ген *PRDM16* вместе с геном *PTPRN2* был гиперметилирован в крови новорожденных от матерей с ожирением [23]. *PRDM16* имеет решающее значение для дифференцировки бурой жировой ткани [15], которая играет важную роль в удержании тепла и расходовании энергии на первом году жизни [24] и остается метаболически активной во взрослом возрасте. Дифференциальное метилирование *PRDM16* наблюдалось перед желудочным шунтированием и потерей веса в жировой ткани, что позволяет предположить, что уровень метилирования модифицируется потерей веса [25]. Было также обнаружено, что метилирование ДНК в *PRDM16* обратимо при неонатальном введении ресвератрола мышам-самцам [26]. Наличие диф-

ференциального метилирования в крови, а также в первичных тканях в этих исследованиях подчеркивает потенциал *PRDM16* в качестве биомаркера для скрининга, а также его потенциал в качестве ключевого участника метаболических регуляторных механизмов, на которые влияет материнское ожирение.

PRDM16 вместе с *PTPRN2* участвует в развитии нервной ткани [16, 27]. Дифференциальное метилирование генов *PRDM16* и *PTPRN2* в числе прочих было обнаружено в крови пациентов с расстройствами аутистического спектра [28]. В исследовании показано, что метилом мозга пациентов с аутизмом имеет сходство с метиломом эмбрионального мозга. Авторы высказывают гипотезу об эпигенетической задержке в метилировании ДНК в ходе развития мозга при расстройствах аутистического спектра, что может привести к нарушениям на уровне транскриптома [28]. Потеря *PRDM16* у *Danio rerio* и мыши приводит к нарушению эмбрионального развития и черепно-лицевым дефектам [29]. Это подтверждается и ассоциацией гена *PRDM16* с аномалиями развития, такими как волчья пасть [14].

Ген *PRDM16* является импринтированным с экспрессией с отцовского аллеля [30]. Дифференциальное метилирование гена *PRDM16* было обнаружено в образцах децидуального эпителия матки, полученного путем выскабливания, у женщин с привычным невынашиванием беременности [31]. Все это указывает на возможное влияние уровня метилирования гена *PRDM16* у матери на нормальное развитие потомства. Недавно оказалось, что ген *PRDM16* активно и специфично экспрессируется в ооцитах мышей и его экспрессия повышается при старении [32]. Это соответствует некоторому снижению уровня метилирования *PRDM16* с возрастом матери в нашем исследовании, хотя корреляция с возрастом матери и была незначимой. Ранее было показано гиперметилирование гена *PRDM16* в ооцитах мышей, полученных после культивирования фолликулов *in vitro* [33]. При двойном ооцит-специфичном нокауте генов *PRDM3* и *PRDM16* не наблюдалось пренатальной гибели, однако большинство мышей умирали в первые 2 месяца жизни [32].

Было высказано предположение, что аберрантное метилирование *PRDM16* вызывает мужское бесплодие [34], и его гипометилирование было обнаружено в образцах сперматозоидов с низкой подвижностью [35]. Кроме того, было обнаружено, что *PRDM16* дифференциально метилирован в сперматозоидах взрослых, подвергшихся жестокому обращению в детстве [36], и гиперметилирован в сперматозоидах потребителей каннабиса [37]. Наконец, на средний уровень метилирования *PRDM16* влияет протокол получения и отбора сперматозоидов. Дополнительный этап очистки от апоптотических сперматозоидов с помощью магнитной сепарации приводит к повышению уровня метилирования *PRDM16* в полученных сперматозоидах [38].

Таким образом, уровень метилирования гена *PRDM16* в гонадах вариабелен и может изменяться под влиянием различных факторов внутренней и внешней среды, включая уровень глюкозы в крови, ожирение и стресс. Дифференциальное метилирование *PRDM16* потенциально может наследоваться трансгенерационно и влиять на процессы в организме потомков. В составе *PRDM16* имеется домен SET, отвечающий за метилирование гистонов. Действительно, показано, что *PRDM16* регулирует хроматин благодаря контролю H3K9me3 и H3K4me3 в эмбриогенезе *Danio rerio* [29]. За счет влияния на регуляцию метилирования гистонов наблюдаемое в настоящей работе дифференциальное метилирование *PRDM16* может быть связано с множественными аномалиями транскриптома в ходе индивидуального развития и приводить к гибели эмбриона.

Ген *PTPRN2* занимает еще более протяженный участок в геноме (1,048,768 п.н.) и содержит в своем составе 63 CpG-островка. Интересно, что, как и в случае с геном *PRDM16*, регион гена *PTPRN2* (7q36.3) часто подвергается перестройкам при лейкемии [39].

Ген *PTPRN2* кодирует белок, который функционирует как основной островковый аутоантиген при диабете I типа [40–42]. Как и в случае с *PRDM16*, дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* часто обнаруживается при различных метаболических нарушениях, связанных с повышенной массой

тела [43]. Нарушение метилирования гена *PTPRN2* в островках Лангерганса поджелудочной железы было связано с повышенным риском развития диабета II типа [44]. Дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* наблюдалось в плаценте и пуповинной крови при диабете беременных [21, 45–47] и коррелировало с уровнем глюкозы в плазме натощак у монозиготных близнецов [48]. Дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* было обнаружено у индивидов, рожденных в период Великого китайского года в 1959–1961 годах [49]. При этом дифференциальное метилирование этого гена также было связано и с детским ожирением [47, 50]. Кроме того, вместе с геном *PRDM16*, ген *PTPRN2* был дифференциально метилирован в крови новорожденных от матерей с ожирением [23]. В недавнем исследовании уровень метилирования гена *PTPRN2* в подкожной жировой клетчатке также ассоциирован с уровнем триглицеридов в крови [51]. Наконец, дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* ассоциировано со стеатозом и неалкогольной жировой болезнью печени [52].

Эти результаты являются убедительным доказательством того, что локусы в *PTPRN2* плода, вероятно, поддаются модификации в зависимости от питания матери и факторов, влиявших на нее в течение беременности. Дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* в назальном эпителии детей было связано с насилием и стрессом, пережитым их матерями [53]. Кроме того, ген *PTPRN2* был дифференциально метилирован в пуповинной крови новорожденных с задержкой роста плода [54, 55]. По-видимому, материнское влияние на уровень метилирования гена *PTPRN2* может быть связано и с трансгенерационным эпигенетическим наследованием уровня метилирования в гене *PTPRN2* от матерей к потомству [56]. Однако важен не только уровень метилирования гена *PTPRN2* у матери. Недавно была обнаружена связь дифференциального метилирования гена *PTPRN2* с мужским бесплодием [57].

Дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* часто обнаруживается и при других заболеваниях, в том числе ишемической болезни сердца [58, 59] и синдроме Марфана [60]. Метилирование

и экспрессия *PTPRN2* были связаны с болезнью Паркинсона [61–64]. У однояйцевых близнецов дифференциальное метилирование *PTPRN2* было связано с депрессией [65]. Уровень метилирования *PTPRN2* в крови был связан с изменением уровня глюкозы и настроением у участников эксперимента по долговременной изоляции в рамках миссии Марс-500 [66]. Мета-анализ данных по всему эпигеному показал, что дифференциально метилированный участок в *PTPRN2* был связан с детской астмой [67], а гипометилированный *PTPRN2* был связан с быстрым снижением функции легких при астме и хроническом обструктивном бронхите [68]. Дифференциальное метилирование генов *PTPRN2* и *PRDM16* среди прочих в висцеральной жировой ткани позволяло выделить группу пациентов с раком прямой кишки [69].

Выводы

Таким образом, гены *PRDM16* и *PTPRN2*, дифференциально-метилированные у части спонтанных абортусов по сравнению с медицинскими абортусами и связанные с уровнем метилирования ретротранспозона LINE-1, обладают рядом сходных признаков. Это очень протяженные гены с большим числом CpG-островков в составе, что открывает широкие возможности для регуляции их активности с помощью метилирования ДНК. Дифференциальное метилирование в данных генах встречается при широком спектре заболеваний, в первую очередь связанных с нарушением метаболизма. Кроме того, дифференциальное метилирование этих генов наблюдается у плода в зависимости от метаболических проблем у матери. Наконец, нарушения метилирования обоих генов связаны с мужским бесплодием. Для обоих генов показана трансгенерационная эпигенетическая наследуемость. Однако в нашем исследовании среди спонтанных абортусов первого триместра нарушения по уровню метилирования наблюдались только для гена *PRDM16*, который при этом коррелировал с уровнем метилирования LINE-1. Полученные результаты указывают, что эпигенетические нарушения гена *PRDM16*, помимо

нарушений на более поздних сроках беременности, могут быть связаны со спонтанным прерыванием беременности в первом триместре.

Библиографический список/ References

- Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E, Wood PJ. Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril*. 1982;38(4): 447–53.
- Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol*. 2009;2(2):76–83.
- Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmers R. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet*. 1990;47(4):656–63.
- Menasha J, Levy B, Hirschhorn K, Kardon NB. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genet Med*. 2005;7(4): 251–63. doi: 00125817-200504000-00005
- Baranov VS, Kuznetsova TV. Cytogenetics of human embryonic development. 2007. Saint-Petersburg, Russia. 639 p. [Баранов ВС, Кузнецова ТВ, Цитогенетика эмбрионального развития человека. 2007. СПб Изд-во Н-Л. 639 с.]. (In Russian).
- Vlahos A, Mansell T, Saffery R, Novakovic B. Human placental methylome in the interplay of adverse placental health, environmental exposure, and pregnancy outcome. *PLoS Genet*. 2019;15(8): e1008236. doi: 10.1371/journal.pgen.1008236
- Tolmacheva EN, Vasilyev SA, Nikitina TV, Lytkina ES, Sazhenova EA, Zhigalina DI, Vasilyeva OY, Markov AV, Demeneva VV, Tashireva LA, Kashevarova AA, Lebedev IN. Identification of differentially methylated genes in first-trimester placentas with trisomy 16. *Sci Rep*. 2022;12(1):1166. doi: 10.1038/s41598-021-04107-9
- Vasilyev SA, Tolmacheva EN, Vasilyeva OY, Markov AV, Zhigalina DI, Zatul LA, Lee VA, Serdyukova ES, Sazhenova EA, Nikitina TV, Kashevarova AA, Lebedev IN. LINE-1 retrotransposon methylation in chorionic villi of first trimester miscarriages with aneuploidy. *J Assist Reprod Genet*. 2021;38(1):139–149. doi: 10.1007/s10815-020-02003-1
- Lebedev IN, Ostroverkhova NV, Nikitina TV, Sukhanova NN, Nazarenko SA. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(7):513–20. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201178
- Vasilyev SA, Timoshevsky VA, Lebedev IN. Cytogenetic mechanisms of aneuploidy in somatic cells of chemonuclear industry professionals with incorporated plutonium-239. *Russian Journal of Genetics*. 2010;46(11):1381–1385. doi: 10.1134/s1022795410110141
- Vasilyev SA, Tolmacheva EN, Kashevarova AA, Sazhenova EA, Lebedev IN. Methylation status of LINE-1 retrotransposon in chromosomal mosaicism during the early stages of human embryonic development. *Molecular Biology (Moscow)*. 2015;49(1):144–152. doi: 10.1134/S0026893314060193 [Васильев С.А., Толмачева Е.Н., Кашеварова А.А., Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Статус метилирования ретротранспозона LINE-1 при хромосомном мозаицизме на ранних стадиях эмбрионального развития человека // Молекулярная биология. 2015. Т. 49. № 1. С. 165–174. doi: 10.7868/S0026898414060196 V]. (In Russian).
- Nishikata I, Sasaki H, Iga M, Tateno Y, Imayoshi S, Asou N, Nakamura T, Morishita K. A novel EVI1 gene family, MEL1, lacking a PR domain (MEL1S) is expressed mainly in t(1;3)(p36; q21)-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation. *Blood*. 2003;102(9):3323–32. doi: 10.1182/blood-2002-12-3944
- Mochizuki N, Shimizu S, Nagasawa T, Tanaka H, Taniwaki M, Yokota J, Morishita K. A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36; q21)-positive leukemia cells. *Blood*. 2000;96(9):3209–14.
- Bjork B, Vieira A, Faust S, Camper S, Murray J, Beier D. Phenotypic, genetic, and developmental characterization of CPO1, a recessive ENU-induced mouse model of cleft palate. *Mouse Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Press, Woodbury, NY. 2006. 149 p.
- Kajimura S, Seale P, Tomaru T, Erdjument-Bromage H, Cooper MP, Ruas JL, Chin S, Tempst P, Lazar MA, Spiegelman BM. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev*. 2008;22(10):1397–409. doi: 10.1101/gad.1666108
- Horn KH, Warner DR, Pisano M, Greene RM. PRDM16 expression in the developing mouse embryo. *Acta Histochem*. 2011;113(2):150–5. doi: 10.1016/j.acthis.2009.09.006
- Chen P, Piaggi P, Traurig M, Bogardus C, Knowler WC, Baier LJ, Hanson RL. Differential methylation of genes in individuals exposed to maternal diabetes in utero. *Diabetologia*. 2017; 60(4): 645–655. doi: 10.1007/s00125-016-4203-1
- Taschereau A, Thibeault K, Allard C, Juvinao-Quintero D, Perron P, Lutz SM, Bouchard L, Hivert MF. Maternal glycemia in pregnancy is longitudinally associated with blood DNAm variation at the FSD1L gene from birth to 5 years of age. *Clin Epigenetics*. 2023;15(1):107. doi: 10.1186/s13148-023-01524-7
- Cote S, Gagne-Ouellet V, Guay SP, Allard C, Houde AA, Perron P, Baillargeon JP, Gaudet D, Guerin R, Brisson D, Hivert MF, Bouchard L. PPARGC1alpha gene DNA methylation variations in human placenta mediate the link between maternal hyperglycemia and leptin levels in newborns. *Clin Epigenetics*. 2016;8:72. doi: 10.1186/s13148-016-0239-9
- Lim IY, Lin X, Teh AL, Wu Y, Chen L, He M, Chan SY, MacIsaac JL, Chan JKY, Tan KH, Chong MFF, Kobor MS, Godfrey KM, Meaney MJ, Lee YS, Eriksson JG, Gluckman PD, Chong YS, Karnani N. Dichotomy in the Impact of Elevated Maternal Glucose Levels on Neonatal Epigenome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022;107(3): e1277-e1292. doi: 10.1210/clinem/dgab710
- Wang WJ, Huang R, Zheng T, Du Q, Yang MN, Xu YJ, Liu X, Tao MY, He H, Fang F, Li F, Fan JG, Zhang J, Briollais L, Ouyang F, Luo ZC. Genome-Wide Placental Gene Methylations in Gestational Diabetes Mellitus, Fetal Growth and Metabolic Health Biomarkers in Cord Blood. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:875180. doi: 10.3389/fendo.2022.875180
- Sugiyama T, Benitez CM, Ghodasara A, Liu L, McLean GW, Lee J, Blauwkamp TA, Nusse R, Wright CV, Gu G, Kim SK. Reconstituting pancreas development from purified progenitor cells reveals genes essential for islet differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(31):12691–6. doi: 10.1073/pnas.1304507110

23. Sasaki A, Murphy KE, Briollais L, McGowan PO, Matthews SG. DNA methylation profiles in the blood of newborn term infants born to mothers with obesity. *PLoS One*. 2022;17(5): e0267946. doi: 10.1371/journal.pone.0267946
24. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S, Spiegelman BM. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(1):96–105. doi: 10.1172/JCI144271
25. Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea RA, Griffiths L, Hoffman EP, Stubbs RS, Macartney-Coxson D. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol*. 2015;16(1):8. doi: 10.1186/s13059-014-0569-x
26. Serrano A, Asnani-Kishnani M, Couturier C, Astier J, Palou A, Landrier JF, Ribot J, Bonet ML. DNA Methylation Changes are Associated with the Programming of White Adipose Tissue Browning Features by Resveratrol and Nicotinamide Riboside Neonatal Supplementations in Mice. *Nutrients*. 2020; 12(2). doi: 10.3390/nu12020461
27. Willi-Monnerat S, Migliavacca E, Surdez D, Delorenzi M, Luthi-Carter R, Terskikh AV. Comprehensive spatiotemporal transcriptomic analyses of the ganglionic eminences demonstrate the uniqueness of its caudal subdivision. *Mol Cell Neurosci*. 2008;37(4):845–56. doi: 10.1016/j.mcn.2008.01.009
28. Corley MJ, Vargas-Maya N, Pang APS, Lum-Jones A, Li D, Khadka V, Sultana R, Blanchard DC, Maunakea AK. Epigenetic Delay in the Neurodevelopmental Trajectory of DNA Methylation States in Autism Spectrum Disorders. *Front Genet*. 2019;10:907. doi: 10.3389/fgene.2019.00907
29. Shull LC, Sen R, Menzel J, Goyama S, Kurokawa M, Artinger KB. The conserved and divergent roles of Prdm3 and Prdm16 in zebrafish and mouse craniofacial development. *Dev Biol*. 2020;461(2):132–144. doi: 10.1016/j.ydbio.2020.02.006
30. Luedi PP, Dietrich FS, Weidman JR, Bosko JM, Jirtle RL, Hartemink AJ. Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Res*. 2007;17(12):1723–30. doi: 10.1101/gr.6584707
31. Pi L, Zhang Z, Gu Y, Wang X, Wang J, Xu J, Liu J, Zhang X, Du J. DNA methylation profiling in recurrent miscarriage. *Peer J*. 2020;8: e8196. doi: 10.7717/peerj.8196
32. Nishimura H, Ikawa Y, Kajikawa E, Shimizu-Mizuno N, Hiver S, Tabata-Okamoto N, Mori M, Kitajima T, Hayashi T, Yoshimura M, Umeda M, Nikaido I, Kurokawa M, Watanabe T, Hamada H. Maternal epigenetic factors in embryonic and postnatal development. *Genes Cells*. 2023;28(6):422–432. doi: 10.1111/gtc.13024
33. Saenz-de-Juano MD, Ivanova E, Billooye K, Herta AC, Smits J, Kelsey G, Anckaert E. Genome-wide assessment of DNA methylation in mouse oocytes reveals effects associated with in vitro growth, superovulation, and sexual maturity. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):197. doi: 10.1186/s13148-019-0794-y
34. Qin L, Luo X-Q, Wei J-X, Wei Y-X, Wang J-L, Zhang L-L, Huang H-B, Wei X-C. Genome-wide DNA methylation analysis of oligospermia and asthenozoospermia in a Chinese population. *Int J Clin Exp Med*. 2019;12(4):3168–3184.
35. Pacheco SE, Houseman EA, Christensen BC, Marsit CJ, Kelsey KT, Sigman M, Boekelheide K. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One*. 2011;6(6): e20280. doi: 10.1371/journal.pone.0020280
36. Roberts AL, Gladish N, Gatev E, Jones MJ, Chen Y, MacIsaac JL, Tworoger SS, Austin SB, Tanrikut C, Chavarro JE, Baccarelli AA, Kober MS. Exposure to childhood abuse is associated with human sperm DNA methylation. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):194. doi: 10.1038/s41398-018-0252-1
37. Murphy SK, Itchon-Ramos N, Visco Z, Huang Z, Grenier C, Schrott R, Acharya K, Boudreau MH, Price TM, Raburn DJ, Corcoran DL, Lucas JE, Mitchell JT, McClernon FJ, Cauley M, Hall BJ, Levin ED, Kollins SH. Cannabinoid exposure and altered DNA methylation in rat and human sperm. *Epigenetics*. 2018;13(12):1208–1221. doi: 10.1080/15592294.2018.1554521
38. Stimpfel M, Vrtacnik-Bokal E. Minor DNA methylation changes are observed in spermatozoa prepared using different protocols. *Andrology*. 2020; 8(5): 1312–1323. doi: 10.1111/andr.12832
39. Gulino GM, Bruno F, Sturiale V, Brancato D, Ragusa D, Tosi S, Saccone S, Federico C. From FISH to Hi-C: The Chromatin Architecture of the Chromosomal Region 7q36.3, Frequently Rearranged in Leukemic Cells, Is Evolutionary Conserved. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5). doi: 10.3390/ijms22052338
40. Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK, Notkins AL. IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6367–70. doi: 10.1073/pnas.93.13.6367
41. Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, Maclaren NK, Notkins AL, Lan MS. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(6):2307–11. doi: 10.1073/pnas.93.6.2307
42. Wasmeier C, Hutton JC. Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem*. 1996;271(30):18161–70. doi: 10.1074/jbc.271.30.18161
43. Dragic D, Ennour-Idrissi K, Michaud A, Chang SL, Durocher F, Diorio C. Association Between BMI and DNA Methylation in Blood or Normal Adult Breast Tissue: A Systematic Review. *Anticancer Res*. 2020;40(4):1797–1808. doi: 10.21873/anticancer.14134
44. Ouni M, Saussenthaler S, Eichelmann F, Jahnert M, Stadion M, Wittenbecher C, Ronn T, Zellner L, Gottmann P, Ling C, Schulze MB, Schurmann A. Epigenetic Changes in Islets of Langerhans Preceding the Onset of Diabetes. *Diabetes*. 2020;69(11):2503–2517. doi: 10.2337/db20-0204
45. Weng X, Liu F, Zhang H, Kan M, Wang T, Dong M, Liu Y. Genome-wide DNA methylation profiling in infants born to gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;142:10–18. doi: 10.1016/j.diabres.2018.03.016
46. Awamleh Z, Butcher DT, Hanley A, Retnakaran R, Haertle L, Haaf T, Hamilton J, Weksberg R. Exposure to Gestational Diabetes Mellitus (GDM) alters DNA methylation in placenta and fetal cord blood. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021; 174: 108690. doi: 10.1016/j.diabres.2021.108690
47. Yang IV, Zhang W, Davidson EJ, Fingerlin TE, Kechris K, Dabelea D. Epigenetic marks of in utero exposure to gestational diabetes and childhood adiposity outcomes: the EPOCH study. *Diabet Med*. 2018;35(5):612–620. doi: 10.1111/dme.13604

48. Wang W, Yao W, Tan Q, Li S, Duan H, Tian X, Xu C, Zhang D. Identification of key DNA methylation changes on fasting plasma glucose: a genome-wide DNA methylation analysis in Chinese monozygotic twins. *Diabetol Metab Syndr*. 2023;15(1):159. doi: 10.1186/s13098-023-01136-4
49. Li S, Wang W, Zhang D, Li W, Lund J, Kruse T, Mengel-From J, Christensen K, Tan Q. Differential regulation of the DNA methylome in adults born during the Great Chinese Famine in 1959–1961. *Genomics*. 2021;113(6):3907–3918. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.09.018
50. Lee S. The association of genetically controlled CpG methylation (cg158269415) of protein tyrosine phosphatase, receptor type N2 (PTPRN2) with childhood obesity. *Sci Rep*. 2019;9(1):4855. doi: 10.1038/s41598-019-40486-w
51. Ronn T, Perfilyev A, Jonsson J, Eriksson KF, Jorgensen SW, Brons C, Gillberg L, Vaag A, Stener-Victorin E, Ling C. Circulating triglycerides are associated with human adipose tissue DNA methylation of genes linked to metabolic disease. *Hum Mol Genet*. 2023;32(11):1875–1887. doi: 10.1093/hmg/ddad024
52. Melton PE, Burton MA, Lillycrop KA, Godfrey KM, Rauschert S, Anderson D, Burdge GC, Mori TA, Beilin LJ, Ayonrinde OT, Craig JM, Olynyk JK, Holbrook JD, Pennell CE, Oddy WH, Moses EK, Adams LA, Huang RC. Differential DNA methylation of steatosis and non-alcoholic fatty liver disease in adolescence. *Hepatol Int*. 2023;17(3):584–594. doi: 10.1007/s12072-022-10469-7
53. Yan Q, Forno E, Cardenas A, Qi C, Han YY, Acosta-Perez E, Kim S, Zhang R, Boutaoui N, Canino G, Vonk JM, Xu CJ, Chen W, Marsland A, Oken E, Gold DR, Koppelman GH, Celedon JC. Exposure to violence, chronic stress, nasal DNA methylation, and atopic asthma in children. *Pediatr Pulmonol*. 2021;56(7):1896–1905. doi: 10.1002/ppul.25372
54. Krishna RG, Vishnu Bhat B, Bobby Z, Papa D, Badhe B, Kalidoss VK, Karli S. Identification of differentially methylated candidate genes and their biological significance in IUGR neonates by methylation EPIC array. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2022; 35(3): 525–533. doi: 10.1080/14767058.2020.1727881
55. Williams L, Seki Y, Delahaye F, Cheng A, Fuloria M, Hughes Einstein F, Charron MJ. DNA hypermethylation of CD3(+) T cells from cord blood of infants exposed to intrauterine growth restriction. *Diabetologia*. 2016;59(8):1714–23. doi: 10.1007/s00125-016-3983-7
56. Garcia E, Wiemels J, Marconett C, Corona K, Howe C, Foley H, Lerner D, Lurvey N, Farzan S, Bastain T, Breton C, Mohazzab-Hosseini S. Effect of Parental Adverse Childhood Experiences on Intergenerational DNA Methylation Signatures. *Res Sq*. 2023. doi: 10.21203/rs.3.rs-2977515/v1
57. Sarkar S, Sujit KM, Singh V, Pandey R, Trivedi S, Singh K, Gupta G, Rajender S. Array-based DNA methylation profiling reveals peripheral blood differential methylation in male infertility. *Fertil Steril*. 2019;112(1):61–72 e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.020
58. Agha G, Mendelson MM, Ward-Caviness CK, Joehanes R, Huan T, Gondalia R, Salfati E, Brody JA, Fiorito G, Bressler J, Chen BH, Lighthart S, Guarera S, Colicino E, Just AC, Wahl S, Gieger C, Vandiver AR, Tanaka T, Hernandez DG, Pilling LC, Singleton AB, Sacerdote C, Krogh V, Panico S, Tumino R, Li Y, Zhang G, Stewart JD, Floyd JS, Wiggins KL, Rotter JI, Multhaup M, Bakulski K, Horvath S, Tsao PS, Absher DM, Vokonas P, Hirschhorn J, Fallin MD, Liu C, Bandinelli S, Boerwinkle E, Dehghan A, Schwartz JD, Psaty BM, Feinberg AP, Hou L, Ferrucci L, Sotoodehnia N, Matullo G, Peters A, Fornage M, Assimes TL, Whitsel EA, Levy D, Baccarelli AA. Blood Leukocyte DNA Methylation Predicts Risk of Future Myocardial Infarction and Coronary Heart Disease. *Circulation*. 2019;140(8):645–657. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.039357
59. Krolevets M, Cate VT, Prochaska JH, Schulz A, Rapp S, Tenzer S, Andrade-Navarro MA, Horvath S, Niehrs C, Wild PS. DNA methylation and cardiovascular disease in humans: a systematic review and database of known CpG methylation sites. *Clin Epigenetics*. 2023;15(1):56. doi: 10.1186/s13148-023-01468-y
60. van An del MM, Groenink M, van den Berg MP, Timmermans J, Scholte A, Mulder BJM, Zwinderman AH, de Waard V. Genome-wide methylation patterns in Marfan syndrome. *Clin Epigenetics*. 2021;13(1):217. doi: 10.1186/s13148-021-01204-4
61. Chuang YH, Lu AT, Paul KC, Folle AD, Bronstein JM, Bordelon Y, Horvath S, Ritz B. Longitudinal Epigenome-Wide Methylation Study of Cognitive Decline and Motor Progression in Parkinson’s Disease. *J Parkinsons Dis*. 2019;9(2):389–400. doi: 10.3233/JPD-181549
62. Grunblatt E, Mandel S, Jacob-Hirsch J, Zeligson S, Amariglio N, Rechavi G, Li J, Ravid R, Roggendorf W, Riederer P, Youdim MB. Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J Neural Transm (Vienna)*. 2004;111(12):1543–73. doi: 10.1007/s00702-004-0212-1
63. Sandor C, Robertson P, Lang C, Heger A, Booth H, Vowles J, Witty L, Bowden R, Hu M, Cowley SA, Wade-Martins R, Webber C. Transcriptomic profiling of purified patient-derived dopamine neurons identifies convergent perturbations and therapeutics for Parkinson’s disease. *Hum Mol Genet*. 2017;26(3):552–566. doi: 10.1093/hmg/ddw412
64. Kochmanski J, Kuhn NC, Bernstein AI. Parkinson’s disease-associated, sex-specific changes in DNA methylation at PARK7 (DJ-1), SLC17A6 (VGLUT2), PTPRN2 (IA-2beta), and NR4A2 (NURR1) in cortical neurons. *NPJ Parkinsons Dis*. 2022;8(1):120. doi: 10.1038/s41531-022-00355-2
65. Wang W, Li W, Wu Y, Tian X, Duan H, Li S, Tan Q, Zhang D. Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses in monozygotic twins identify potential biomarkers of depression. *Transl Psychiatry*. 2021;11(1):416. doi: 10.1038/s41398-021-01536-y
66. Liang F, Lv K, Wang Y, Yuan Y, Lu L, Feng Q, Jing X, Wang H, Liu C, Rayner S, Ling S, Chen H, Wan Y, Zhou W, He L, Wu B, Qu L, Chen S, Xiong J, Li Y. Personalized Epigenome Remodeling Under Biochemical and Psychological Changes During Long-Term Isolation Environment. *Front Physiol*. 2019;10:932. doi: 10.3389/fphys.2019.00932
67. den Dekker HT, Burrows K, Felix JF, Salas LA, Nedeljkovic I, Yao J, Rifas-Shiman SL, Ruiz-Arenas C, Amin N, Bustamante M, DeMeo DL, Henderson AJ, Howe CG, Hivert MF, Ikram MA, de Jongste JC, Lahousse L, Mandaviya PR, van Meurs JB, Pinart M, Sharp GC, Stolk L, Uitterlinden AG, Anto JM, Litonjua AA, Breton CV, Brusselle GG, Sunyer J, Smith GD, Relton CL, Jaddoe VWV, Duijts L. Newborn DNA-methylation, childhood lung function, and the risks of asthma and COPD across the life course. *Eur Respir J*. 2019;53(4). doi: 10.1183/13993003.01795-2018
68. Chen YC, Tsai YH, Wang CC, Liu SF, Chen TW, Fang WF, Lee CP, Hsu PY, Chao TY, Wu CC, Wei YF, Chang HC, Tsen CC,

Chang YP, Lin MC. Epigenome-wide association study on asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap reveals aberrant DNA methylations related to clinical phenotypes. *Sci Rep*. 2021;11(1):5022. doi: 10.1038/s41598-021-83185-1

69. Izquierdo AG, Boughanem H, Diaz-Lagares A, Arranz-Salas I, Esteller M, Tinahones FJ, Casanueva FF, Macias-Gonzalez M,

Crujeiras AB. DNA methylome in visceral adipose tissue can discriminate patients with and without colorectal cancer. *Epigenetics*. 2022;17(6):665–676. doi: 10.1080/15592294.2021.1950991

Ответственный за переписку: Васильев Станислав Анатольевич — доктор биологических наук, руководитель лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра, профессор кафедры генетики и клеточной биологии Национального исследовательского Томского государственного университета, Российская Федерация, 634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки д. 10. E-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Васильев С.А. SPIN 8087–5222; ORCID 0000–0002–5301–070X

Васильева О.Ю. SPIN 3582–1273; ORCID 0000–0001–5797–0014

Деменова В.В. SPIN 3631–0953; ORCID 0000–0002–5315–4914

Зуев А.С. SPIN 3235–1754; ORCID 0000–0001–9474–9335

Саженова Е.А. SPIN 8788–4112; ORCID 0000–0003–3875–3932

Никитина Т.В. SPIN 8941–1605; ORCID 0000–0002–4230–6855

Толмачева Е.Н. SPIN 7837–4073; ORCID 0000–0001–6427–3276

Corresponding author: Stanislav A. Vasilyev, PhD, Dr.Sc., Head of Laboratory of Genomic Tools, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Professor of Department of Genetics and Cell Biology of National Research Tomsk State University, 634050, Tomsk, Nab. Ushaiki, 10, Russian Federation. E-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Vasilyev S.A. ORCID 0000–0002–5301–070X

Vasilyeva O. Yu. ORCID 0000–0001–5797–0014

Demeneva V.V. ORCID 0000–0002–5315–4914

Zuev A.S. ORCID 0000–0001–9474–9335

Sazhenova E.A. ORCID 0000–0003–3875–3932

Nikitina T.V. ORCID 0000–0002–4230–6855

Tolmacheva E.N. ORCID 0000–0001–6427–3276