

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.10.50-54>

## Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона в эмбрионах из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности

Деменева В.В.<sup>1</sup>, Толмачева Е.Н.<sup>1</sup>, Филатова С.А.<sup>1,2</sup>, Зуев А.С.<sup>1</sup>, Ушакова А.С.<sup>1,2</sup>,  
Васильева О.Ю.<sup>1</sup>, Саженова Е.А.<sup>1</sup>, Никитина Т.В.<sup>1</sup>, Васильев С.А.<sup>1,2</sup>

1 – ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,  
Научно-исследовательский институт медицинской генетики  
634050, г. Томск, Россия, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10

2 – Национальный исследовательский Томский государственный университет  
634050, г. Томск, Россия, пр. Ленина, д. 36

**Введение.** Эпигенетические процессы, такие как метилирование ДНК, играют важную роль в поддержании нормальной беременности и могут нарушаться при самопроизвольном аборте. Ранее нами был обнаружен повышенный уровень метилирования ретротранспозона LINE-1, составляющего около 17% генома человека, в ворсинах хориона спонтанных абортусов.

**Цель:** анализ уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона в эмбрионах из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности.

**Методы.** В настоящем исследовании проведен анализ различий уровня метилирования в ворсинах хориона 46 медицинских абортусов (группа сравнения) и спонтанных абортусов из 155 семей со спорадическим и 127 семей с привычным невынашиванием беременности. Уровень метилирования LINE-1 был оценен методом таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования.

**Результаты.** Не было обнаружено значимых различий уровня метилирования LINE-1 между группами с привычным и спорадическим невынашиванием беременности ( $p > 0,05$ ). Однако уровень метилирования LINE-1 был значимо выше по сравнению с медицинскими абортусами ( $40,2 \pm 2,2\%$ ) у спонтанных абортусов с моносомией X из семей с привычным ( $42,0 \pm 4,5\%$ ,  $p = 0,04$ ) и спорадическим невынашиванием беременности ( $43,1 \pm 5,2\%$ ,  $p = 0,03$ ) и у спонтанных абортусов с трисомией 16 из семей со спорадическим невынашиванием беременности ( $43,1 \pm 3,9\%$ ,  $p < 0,001$ ).

**Заключение.** Нарушение уровня метилирования LINE-1 может быть маркером гибели части эмбрионов как при спорадическом, так и при привычном невынашивании беременности.

**Ключевые слова:** ретротранспозон LINE-1, привычное невынашивание беременности, ворсины хориона, метилирование ДНК.

**Для цитирования:** Деменева В.В., Толмачева Е.Н., Филатова С.А., Зуев А.С., Ушакова А.С., Васильева О.Ю., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Васильев С.А. Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона в эмбрионах из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности. *Медицинская генетика*. 2024; 23(10): 50-54.

**Автор для корреспонденции:** Васильев Станислав Анатольевич; **e-mail:** stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-15-00341.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 17.10.2024

## The level of methylation of LINE-1 retrotransposon in chorionic villi in embryos from families with sporadic and recurrent miscarriage

Demeneva V.V.<sup>1</sup>, Tolmacheva E.N.<sup>1</sup>, Filatova S.A.<sup>1,2</sup>, Zuev A.S.<sup>1</sup>, Ushakova A.S.<sup>1,2</sup>,  
Vasilyeva O.Yu.<sup>1</sup>, Sazhenova E.A.<sup>1</sup>, Nikitina T.V.<sup>1</sup>, Vasiliev S.A.<sup>1,2</sup>

1 – Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Genetics  
10, Naberejnaya Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation

2 – Tomsk State University  
36, Lenin Avenue, Tomsk, 634050, Russian Federation

**Background.** Epigenetic processes such as DNA methylation play an important role in maintaining a normal pregnancy and their disruption may be associated with spontaneous abortion. Earlier, we found an increased level of methylation of the retrotransposon LINE-1, which makes up about 17% of the human genome, in the chorionic villi of spontaneous abortions.

**Aim:** to analyze the level of methylation of the LINE-1 retrotransposon in chorionic villi in embryos from families with sporadic and recurrent miscarriage.

**Methods.** The present study analyzes the differences in the level of methylation in chorionic villi of 46 induced abortions and spontaneous abortions from 155 families with sporadic miscarriage and 127 families with recurrent miscarriage. The methylation level of LINE-1 was assessed using targeted bisulfite massive parallel sequencing.

**Results.** No significant differences in LINE-1 methylation levels were found between the groups with recurrent and sporadic miscarriage ( $p > 0.05$ ). However, the LINE-1 methylation level was significantly higher compared to induced abortions ( $40.2 \pm 2.2\%$ ) in spontaneous abortions with monosomy X from families with recurrent ( $42.0 \pm 4.5\%$ ,  $p = 0.04$ ) and sporadic miscarriage ( $43.1 \pm 5.2\%$ ,  $p = 0.03$ ), and in spontaneous abortions with trisomy 16 from families with sporadic miscarriage ( $43.1 \pm 3.9\%$ ,  $p < 0.001$ ).

**Conclusion.** Abnormal methylation level of LINE-1 may be a marker of the death of part of the embryos in both sporadic and recurrent miscarriage.

**Keywords:** LINE-1 retrotransposon, recurrent miscarriage, chorionic villi, DNA methylation.

**For citation:** Demeneva V.V., Tolmacheva E.N., Filatova S.A., Zuev A.S., Ushakova A.S., Vasilyeva O.Yu., Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Vasiliev S.A. The level of methylation of LINE-1 retrotransposon in chorionic villi in embryos from families with sporadic and recurrent miscarriage. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(10): 50-54. (In Russian)

**Corresponding author:** Stanislav A. Vasiliev; e-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

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

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Accepted:** 17.10.2024

## Введение

Самопроизвольный аборт — одно из наиболее распространённых осложнений, которое возникает до 22 недели беременности. Термин привычное невынашивание беременности (ПНВ) используется для описания случаев утраты двух и более беременностей необязательно идущих подряд [1]. Распространённость самопроизвольного аборта, как показывают исследования клинических беременностей, составляет примерно 12–15%. Однако это число может быть увеличено, если учитывать ранние потери беременности, которые наступают примерно через 14 дней после зачатия и могут восприниматься как обычный менструальный цикл. Распространённость таких ранних потерь достигает примерно 17–22% [2].

На данный момент описано довольно много причин, которые могут привести к преждевременному прекращению беременности. Это могут быть как унаследованные, так и приобретённые факторы, такие как хромосомные аномалии (например, анеуплоидии), эндокринные и иммунные нарушения у матери, репродуктивные особенности, нарушения свёртывающей системы крови, а также влияние возраста, этнической принадлежности, предыдущих исходов беременности, окружающей среды и образа жизни [1,3].

В связи с этим многообразием знание о точных причинах и патофизиологических механизмах, участвующих в поддержании беременности, а также взаимодействия матери и плода, остаётся неполным. В любом случае продолжение беременности зависит от отрегулированных фетально-материнских взаимодействий, при которых происходят тонко сбалансированные физические и метаболические изменения.

Среди различных факторов, которые участвуют в фетально-материнских взаимодействиях, метили-

рование ДНК является одним из ключевых. Этот процесс происходит на протяжении всего репродуктивного цикла, начиная от формирования гамет, через эмбриональное развитие и регуляцию процессов как со стороны матери, так и со стороны эмбриона [4].

LINE-1 представляют собой семейство мобильных элементов и являются одним из наиболее активно интегрированных мобильных элементов в геноме человека, на долю которых приходится приблизительно 17% всего генома. На практике статус метилирования LINE-1 можно использовать для оценки глобального уровня метилирования ДНК [5]. Эпигенетические процессы, связанные с ретротранспозицией LINE-1, играют важную роль в эмбриогенезе и раннем развитии эмбриона. Метилирование ДНК играет ключевую роль в поддержании активации ретротранспозонов на нужном уровне на ранних стадиях доимплантационного развития эмбриона, так как во время гаметогенеза или раннего эмбриогенеза изменение ретротранспозиции LINE-1 может нарушать работу критически важных для раннего эмбрионального развития генов, что, в свою очередь, будет приводить к самопроизвольному прерыванию беременности [6].

Ранее в наших работах был обнаружен повышенный уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинках хориона спонтанных абортусов [7]. Целью настоящего исследования стало проведение сравнительного анализа уровня метилирования LINE-1 в трофобласте хориона эмбрионов из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности в анамнезе.

**Цель исследования:** анализ уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинках хориона в эмбрионах из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности.

## Методы

В качестве материала для исследования были отобраны образцы ворсин хориона медицинских абортусов (МА) как группы сравнения ( $n=46$ , гестационный возраст  $8,2 \pm 1,9$  недель). Группа спонтанных абортусов из семей со спорадическим невынашиванием составила 155 образцов (спонтанные абортусы с нормальным кариотипом ( $n=92$ , гестационный возраст  $7,8 \pm 1,9$  недель), трисомией 16 ( $n=33$ , гестационный возраст  $6,9 \pm 1,9$  недель), моносомией X ( $n=30$ , гестационный возраст  $8,8 \pm 1,1$  недель)), а группа спонтанных абортусов из семей с ПНБ – 127 образцов (спонтанные абортусы с нормальным кариотипом ( $n=84$ , гестационный возраст  $7,8 \pm 1,9$  недель), трисомией 16 ( $n=29$ , гестационный возраст  $7,0 \pm 1,8$  недель), моносомией X ( $n=14$ , гестационный возраст  $8,7 \pm 1,2$  недель)). Сравнимые подгруппы значимо не различались по сроку гестации ( $p>0,05$ ).

Образцы, полученные из биоресурсной коллекции «Биобанк населения Северной Азии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, были собраны в период с 1996 по 2022 гг. и хранились при температуре  $-80$  °С. Информированное согласие от родителей на участие в исследовании было получено для каждого образца из биобанка. Исследование получило одобрение комитета по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (09.11.2020/№ 7).

Стандартный цитогенетический анализ на прямых препаратах ворсин хориона и культурах фибробластов экстраэмбриональной мезодермы использовался для определения кариотипа медицинских и спонтанных абортусов [8]. Результаты кариотипирования всех образцов с трисомиями и моносомиями были подтверждены методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Мозаицизм по анеуплоидиям оценивался с минимальным пороговым значением 10% и максимальным – 90%. Центромероспецифические ДНК-зонды на хромосому X применялись для анализа моносомии X, тогда как для исследования трисомии 16 использовались субтеломерные ДНК-зонды (16q и 16r). Анализ проводился по описанной ранее методике [9].

Индекс метилирования оценивался в 19 CpG-сайтах промотора LINE-1 для ворсин хориона медицинских и спонтанных абортусов с использованием таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования по ранее опубликованному протоколу [10]. Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 10.0. Для сравнения индекса метилирования между группа-

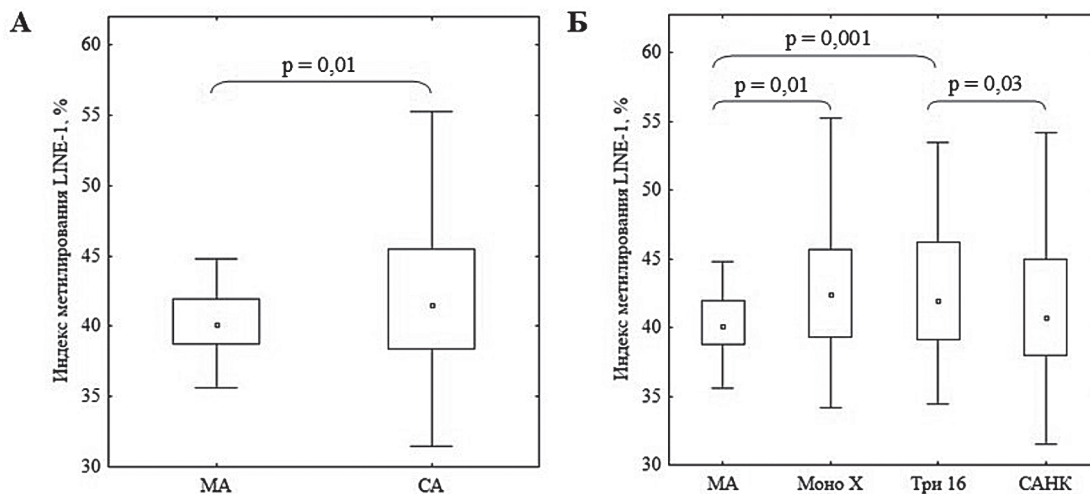
ми использовались непараметрические ранговые критерии Манна-Уитни для двух групп и Краскела-Уоллиса для трех и более групп.

## Результаты и обсуждение

В объединенных группах спонтанных абортусов из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности средний индекс метилирования LINE-1 в группе спонтанных абортусов оказался выше ( $41,9 \pm 4,8\%$ ), чем в группе медицинских абортусов ( $40,2 \pm 2,2\%$ ) ( $p = 0,01$ ). Индекс метилирования LINE-1 в подгруппах спонтанных абортусов с трисомией по хромосоме 16 ( $42,9 \pm 4,6\%$ ) и моносомией по X-хромосоме ( $42,8 \pm 4,7\%$ ) оказался также статистически значимо выше, чем в группе медицинских абортусов ( $p < 0,05$ ). В подгруппе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом индекс метилирования LINE-1 ( $41,4 \pm 4,8\%$ ) не отличался значимо от группы медицинских абортусов ( $p = 0,19$ ), хотя диапазон вариации уровня метилирования LINE-1 в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом был значительно больше, чем в группе медицинских абортусов (рис. 1). Это указывает на то, что часть спонтанных абортусов имела уровень метилирования LINE-1, выходящий за пределы нормальной вариации в группе медицинских абортусов.

Средний индекс метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов из группы со спорадическим невынашиванием оказался статистически значимо выше в группах спонтанных абортусов с трисомией по хромосоме 16 ( $43,1 \pm 3,9\%$ ) и моносомией по X-хромосоме ( $43,1 \pm 5,2\%$ ), чем в группе медицинских абортусов ( $p < 0,05$ ). Также индекс метилирования LINE-1 был статистически значимо выше у спонтанных абортусов с трисомией по хромосоме 16 по сравнению со спонтанными абортусами с нормальным кариотипом ( $p = 0,02$ ). В подгруппе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом индекс метилирования LINE-1 ( $41,4 \pm 4,8\%$ ) не отличался значимо от группы медицинских абортусов ( $p = 0,4$ ) (рис. 2).

При сравнении среднего индекса метилирования LINE-1 в подгруппе спонтанных абортусов из группы с ПНБ статистически значимые различия были обнаружены только между группой спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме ( $42,0 \pm 4,5\%$ ) и медицинскими абортусами ( $p = 0,04$ ). Как и у спонтанных абортусов из группы со спорадическим невынашиванием беременности, часть спонтанных абортусов имела уровень метилирования LINE-1, выходящий за пределы нормальной вариации в группе медицин-

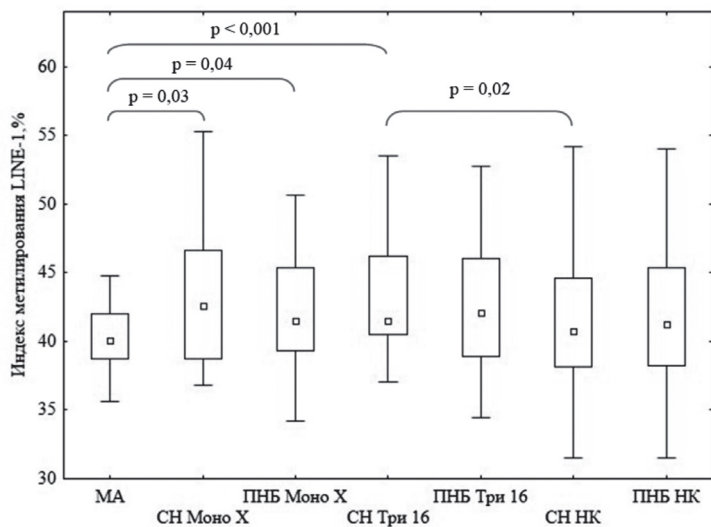


**Рис. 1.** Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона в объединенной группе спонтанных абортусов из семей со sporadическим и привычным невынашиванием беременности.

**Примечание:** А – сравнение групп медицинских абортусов (МА) и объединенной группы спонтанных абортусов (СА), Б – сравнение групп медицинских абортусов (МА), спонтанных абортусов с моносомией X (Моно X), спонтанных абортусов с трисомией 16 (Три 16) и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (САНК).

**Fig. 1.** Average methylation index of LINE-1 retrotransposon in chorionic villi in a combined group of spontaneous abortions from families with sporadic and recurrent miscarriage.

**Note:** А – comparison of groups of medical abortions (МА) and a combined group of spontaneous abortions (СА), Б – comparison of groups of medical abortions (МА), spontaneous abortions with monosomy X (Моно X), spontaneous abortions with trisomy 16 (Три 16) and spontaneous abortions with a normal karyotype (САНК).



**Рис. 2.** Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона у спонтанных абортусов из семей со sporadическим невынашиванием по сравнению с семьями с ПНБ.

**Примечание:** МА – медицинские абортусы, СН Моно X – sporadическое невынашивание с моносомией X, СН Три 16 – sporadическое невынашивание с трисомией 16, СН НК – sporadическое невынашивание с нормальным кариотипом, ПНБ Моно X – ПНБ с моносомией X, ПНБ Три 16 – ПНБ с трисомией 16, ПНБ НК – ПНБ с нормальным кариотипом.

**Fig. 2.** Average methylation index of LINE-1 retrotransposon in chorionic villi in spontaneous abortions from families with sporadic miscarriage compared to families with recurrent miscarriage.

**Note:** МА – medical abortions, СН Моно X – sporadic miscarriage with monosomy X, СН Три 16 – sporadic miscarriage with trisomy 16, СН НК – sporadic miscarriage with normal karyotype, ПНБ Моно X – recurrent miscarriage with monosomy X, ПНБ Три 16 – recurrent miscarriage with trisomy 16, ПНБ НК – recurrent miscarriage with normal karyotype.

ских абортусов. При сравнении групп со спорадическим и привычным невынашиванием беременности между собой не было выявлено статически значимых различий ( $p = 0,5$ ).

Таким образом, при сравнительном анализе уровня метилирования LINE-1 в трофобласте хориона в эмбрионах из семей со спорадическим и привычным невынашиванием беременности в анамнезе не было выявлено статистически значимых различий между группами. При этом в обеих группах значимые различия от группы медицинских абортусов были обнаружены только для спонтанных абортусов с анеуплоидией. Ранее неоднократно наблюдались значимые отклонения профиля метилирования при анеуплоидии по различным хромосомам, в том числе и в плаценте [11-13]. По-видимому, такие отклонения затрагивают не только промоторы генов, но и значимо влияют на уровень метилирования повторяющихся последовательностей, включая ретротранспозон LINE-1.

Ранее было показано, что уровни экспрессии МРНК LINE-1 и обратной транскриптазы LINE-1 в тканях спонтанных абортусов с нормальным кариотипом были выше, чем в тканях медицинских абортусов [14]. В другом исследовании обнаружили снижение уровня метилирования LINE-1 в лимфоцитах периферической крови женщин с невынашиванием беременности [15]. В настоящей работе, как и в нашем предыдущем анализе [7], не обнаружено значимых отличий уровня метилирования LINE-1 в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, однако спонтанные абортусы с нормальным кариотипом характеризовались повышенной вариабельностью уровня метилирования LINE-1, в том числе в сторону снижения уровня метилирования. Высокая вариабельность уровня метилирования в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом потенциально может быть вызвана аномалиями на этапе установления метилирования генома в гаметогенезе или снятия метилирования генома на стадии дробления. Кроме того, нарушения уровня метилирования LINE-1 могут потенциально возникать в процессе эмбриогенеза вследствие недостатка фолатов, являющихся донорами метильных групп для ДНК-метилтрансферазы. Установить конкретную причину для спонтанных абортусов не представляется возможным, хотя известно, что аномалии метилирования ретротранспозона LINE-1 наблюдаются уже в гаметогенезе [16] и при мейозе [17]. В целом результаты указывают на то, что нарушение уровня метилирования LINE-1 может быть маркером эмбриональной гибели части спонтанных абортусов как при спорадическом невынашивании, так и при ПНБ.

## Литература/References

1. Quenby S., Gallos I.D., Dhillon-Smith R.K. et al. Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss. *The Lancet*. 2021; 10285: 1658-1667. doi:10.1016/S0140-6736(21)00682-6.
2. Coomarasamy A., Dhillon-Smith R.K., Papadopoulou A. et al. Recurrent miscarriage: evidence to accelerate action. *The Lancet*. 2021; 10285: 1675-1682. doi:10.1016/S0140-6736(21)00681-4
3. Devall A. J., Coomarasamy A. Sporadic pregnancy loss and recurrent miscarriage Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2020; 69: 30-39. doi:10.1016/j.bpobgyn.2020.09.002
4. Feldberg D. Epigenetic aspects of human reproduction and early pregnancy. *Sex, Gender, and Epigenetics*. Academic Press. 2023; 237-243. doi:10.1016/B978-0-12-823937-7.00018-3
5. Tisato V., Silva J.A., Scarpellini F. et al. Epigenetic role of LINE-1 methylation and key genes in pregnancy maintenance. *Scientific Reports*. 2024; 1: 3275. doi:10.1038/s41598-024-53737-2
6. Lou C., Goodier J. L., Qiang R. A potential new mechanism for pregnancy loss: considering the role of LINE-1 retrotransposons in early spontaneous miscarriage. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020; 18: 6. doi:10.1186/s12958-020-0564-x
7. Vasilyev S.A., Tolmacheva E.N., Vasilyeva O.Y. et al. LINE-1 retrotransposon methylation in chorionic villi of first trimester miscarriages with aneuploidy. *J Assist Reprod Genet*. 2021; 38(1): 139-149. doi:10815-020-02003-1.
8. Lebedev I.N., Ostroverkhova N.V., Nikitina T.V. et al. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *Eur. J. Hum. Genet*. 2004; 12:513-520. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201178
9. Vasilyev S.A., Timoshevsky V.A., Lebedev I.N. Cytogenetic mechanisms of aneuploidy in somatic cells of chemonuclear industry professionals with incorporated plutonium-239. *Russ. J. Genet*. 2010; 46:1381-1385. doi: 10.1134/S1022795410110141
10. Vasilyev S.A., Markov A.V., Vasilyeva O.Yu. et al. Method of targeted bisulfite massive parallel sequencing of the human LINE-1 retrotransposon promoter. *MethodsX*. 2021;8, 101445. doi: 10.1016/j.mex.2021.101445
11. Lim J.H., Kang Y.J., Lee B.Y. et al. Epigenome-wide base-resolution profiling of DNA methylation in chorionic villi of fetuses with Down syndrome by methyl-capture sequencing. *Clin Epigenet*. 2019; 11(180). doi:10.1186/s13148-019-0756-4
12. Lim J.H., Kim S.Y., Han J.Y. et al. Comprehensive investigation of DNA methylation and gene expression in trisomy 21 placenta. *Placenta*. 2016; 42:17-24. doi: 10.1016/j.placenta.2016.03.012.
13. Tolmacheva E.N., Vasilyev S.A., Nikitina T.V. et al. 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.
14. Lou C., Qiang R., Wu H. et al. Expression of LINE-1 retrotransposon in early human spontaneous abortion tissues. *Medicine (Baltimore)*. 2022; 101(49):e31964. doi: 10.1097/MD.00000000000031964.
15. Tisato V., Silva J.A., Scarpellini F. et al. Epigenetic role of LINE-1 methylation and key genes in pregnancy maintenance. *Sci Rep*. 2024; 14(1):3275. doi: 10.1038/s41598-024-53737-2.
16. Malki S., van der Heijden G.W., O'Donnell K.A., et al. A role for retrotransposon LINE-1 in fetal oocyte attrition in mice. *Dev Cell*. 2014; 29(5):521-533. doi: 10.1016/j.devcel.2014.04.027.
17. Yuan P., Guo Q., Guo H. et al. The methylome of a human polar body reflects that of its sibling oocyte and its aberrance may indicate poor embryo development. *Hum Reprod*. 2021; 36(2):318-330. doi: 10.1093/humrep/deaa292.