

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.12.30-36>

## Оценка эффективности полногеномного секвенирования для кариотипирования клеток спонтанных абортусов с отсутствием пролиферативной активности

Зуев А.С.<sup>1</sup>, Канканам Патиранге М.Б.<sup>2</sup>, Фонова Е.А.<sup>1,3</sup>, Шевцов Д.Г.<sup>1,2</sup>, Бабай Т.С.<sup>1</sup>,  
Никитина Т.В.<sup>1</sup>, Федотов Д.А.<sup>1</sup>, Саженова Е.А.<sup>1</sup>, Толмачева Е.Н.<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, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10
- 2 – Национальный исследовательский Томский государственный университет 634050, г. Томск, пр. Ленина, д. 36
- 3 – ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации 634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2

**Введение.** Определение хромосомного дисбаланса имеет важное клиническое и биологическое значение при спонтанном прерывании беременности. Оно необходимо для установления причины невынашивания, исключения наследственных факторов, дальнейшего генетического консультирования, а также для понимания механизмов формирования хромосомных аномалий. Золотым стандартом анализа кариотипа является микроскопический анализ хромосом после GTG-окрашивания. Однако этот метод имеет ограничения, так как зависит от митотической активности клеток и наличия хорошо визуализированных хромосом. Альтернативным цитогеномным подходом для определения хромосомного дисбаланса может быть полногеномное секвенирование с низким покрытием и его модифицированные алгоритмы для сверхнизкого покрытия, применяемые для детекции анеуплоидий и крупных вариаций числа копий.

**Цель:** провести полногеномное секвенирование со сверхнизким покрытием для молекулярного кариотипирования спонтанных и медицинских абортусов.

**Методы.** В работе использовался некультивируемый материал экстраэмбриональной мезодермы спонтанных и медицинских абортусов. Молекулярное кариотипирование выполнено методом полногеномного секвенирования со сверхнизким покрытием. Полученные результаты верифицировались посредством флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и ПЦР в реальном времени.

**Результаты.** Среди спонтанных абортусов анеуплоидии были выявлены в 25 из 71 (35,2%) случая, наиболее частыми нарушениями оказались трисомии по аутосомам (92%), в то время как аномалии числа половых хромосом были выявлены в 8% случаев. Полиплоидия была выявлена в 4 из 71 случая (5,6%), что дало суммарную частоту встречаемости хромосомных аномалий 40,8%.

**Выводы.** Определение эффективности и специфичности полногеномного секвенирования со сверхнизким покрытием для обнаружения анеуплоидий показало значения в 100% для обоих показателей в контрольных группах. Подтверждение аномалий кариотипа спонтанных абортусов референсными методами показало, что полногеномное секвенирование со сверхнизким покрытием эффективно в диагностике анеуплоидий при отсутствии альтернативных методов.

**Ключевые слова:** спонтанный аборт, полногеномное секвенирование со сверхнизким покрытием, кариотипирование, невынашивание беременности, хромосомные аномалии, FISH.

**Для цитирования:** Зуев А.С., Канканам Патиранге М.Б., Фонова Е.А., Шевцов Д.Г., Бабай Т.С., Никитина Т.В., Федотов Д.А., Саженова Е.А., Толмачева Е.Н., Васильев С.А. Оценка эффективности полногеномного секвенирования для кариотипирования клеток спонтанных абортусов с отсутствием пролиферативной активности. *Медицинская генетика* 2024; 23(12): 30-36.

**Автор для корреспонденции:** Зуев А.С.; e-mail: andrew.zuev@medgenetics.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №23-15-00341.

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

**Поступила:** 03.12.2024

## Evaluation of the efficiency of full-genome sequencing for karyotyping of spontaneous abortus cells with no proliferative activity

Zuev A.S.<sup>1</sup>, Kankanam Pathirana M.B.<sup>2</sup>, Fonova E.A.<sup>1,3</sup>, Shevtsov D.G.<sup>1,2</sup>, Babay T.S.<sup>1</sup>, Nikitina T.V.<sup>1</sup>, Fedotov D. A.<sup>1</sup>, Sazhenova E.A.<sup>1</sup>, Tolmacheva E.N.<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

3 – Siberian State Medical University  
2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050 Russian Federation

**Background.** Determination of chromosomal imbalance has an important clinical and biological significance in cases of spontaneous abortion. It is necessary to establish the cause of non-pregnancy, to exclude hereditary factors, to provide further genetic counselling, and to understand the mechanisms of chromosomal anomalies. The gold standard for karyotype analysis is microscopic analysis of chromosomes after GTG staining. However, this method has limitations as it depends on the mitotic activity of the cells and the presence of well-visualised chromosomes. An alternative cytogenomic approach to detect chromosomal imbalance may be low-coverage and ultra-low coverage whole-genome sequencing, used to detect aneuploidies and large copy number variations.

**Objective:** to perform whole-genome sequencing with ultra-low coverage for molecular karyotyping of spontaneous and medical abortuses.

**Methods.** Uncultured material of extraembryonic mesoderm of spontaneous and induced abortions was used. Molecular karyotyping was performed using ultra-low coverage whole genome sequencing. The results were verified using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and real-time PCR.

**Results.** Among spontaneous abortuses, aneuploidies were detected in 25 out of 71 (35.2%) cases, among which autosomal trisomies were the most frequent abnormality (92%), while sex chromosome number abnormalities were detected in 8% of cases. Polyploidy was detected in 4 out of 71 cases (5.6%), giving a cumulative incidence of chromosomal abnormalities of 40.8%.

**Conclusions.** Determination of the efficacy and specificity of ultra-low coverage whole-genome sequencing for the detection of aneuploidy showed values of 100% in both measures on the control groups. Confirmation of karyotype abnormalities in spontaneous abortions by reference methods showed that ultra-low coverage whole-genome sequencing is effective in the diagnosis of aneuploidy in the absence of alternative methods.

**Keywords:** Spontaneous abortion, ultra-low coverage whole-genome sequencing, karyotyping, pregnancy loss, chromosomal abnormalities, FISH.

**For citation:** Zuev A.S., Kankanam Pathirana M.B., Fonova E.A., Shevtsov D.G., Babay T.S., Nikitina T.V., Fedotov D. A., Sazhenova E.A., Tolmacheva E.N., Vasiliev S.A. Evaluation of the efficiency of full-genome sequencing for karyotyping of spontaneous abortus cells with no proliferative activity. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(12): 30-36. (In Russian).

**Corresponding author:** Andrey S. Zuev; **e-mail:** [andrew.zuev@medgenetics.ru](mailto:andrew.zuev@medgenetics.ru)

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

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

**Accepted:** 03.12.2024

### Введение

Спонтанное прерывание беременности – патологическое состояние, возникающее в 20% всех клинически установленных беременностей и в 80% случаев приходится на 1 триместр [1]. При этом до 2/3 спонтанных аборт (СА) могут быть обусловлены аномалиями хромосомного набора эмбриона – анеуплоидиями и полиплоидиями [2].

Определение кариотипа плода при СА необходимо для установления причины прерывания беременности, а также для исключения унаследованных структурных перестроек хромосом, имеющих значение при планировании последующей беременности. Золо-

тым стандартом при этом является кариотипирование с G-окрашиванием хромосом, впервые предложенное Мариной Сибрайт (Seabright) в 1972 году. Метод, состоящий из этапов отбора, культивирования клеток, остановки клеточного деления с дальнейшими фиксацией, окрашиванием и микроскопией, позволяет детектировать геномные (анеу- и полиплоидии) и хромосомные (транслокации, делеции, дупликации, инверсии, инсерции более 5 млн п.н.) мутации. Однако при отсутствии жизнеспособных клеток или недостаточной митотической активности применение метода становится невозможным. Альтернативой могут стать мето-

ды, основанные на массовом параллельном секвенировании, не требующие культивирования клеток *in vitro*.

Одним из таких методов является полногеномное секвенирование с низким покрытием (low-coverage whole genome sequencing, lcWGS). С использованием специальных методов фильтрации и статистического анализа, компенсирующих низкую глубину покрытия, lcWGS позволяет идентифицировать наличие дополнительного или отсутствие хромосомного материала размером от сотен т.п.н. до млн п.н. [3]. Такое разрешение позволяет использовать подход для диагностики патологий, связанных с вариациями числа копий (copy number variation, CNV), детекции анеуплоидий, определения изменений в кариотипе культивируемых клеточных линий [4-7]. Несмотря на ограничения метода, связанные со сложностью биоинформатической обработки, ограничением статистической мощности для индивида, интерпретацией результатов, он обладает рядом преимуществ, особенно в контексте крупномасштабных геномных и популяционных исследований, и уже применяется в диагностических целях. Однако для целевой диагностики анеуплоидий могут применяться подходы, основанные на меньшем покрытии – полногеномное секвенирование со сверхнизким покрытием (ulcWGS). Такой метод, имея немного большие ограничения, сохраняет преимущества предыдущего и является более экономически эффективным, что приближает его к методам скрининга.

Определение кариотипа является важным и необходимым шагом в исследовании причин невынашивания беременности. В данной работе описывается применение ulcWGS для молекулярного кариотипирования абортивного материала, в котором было невозможно определение кариотипа стандартными цитогенетическими методами.

## Методы

Всего в анализ было включено 9 образцов медицинских абортусов (отрицательный контроль), 10 образцов спонтанных абортусов с известным анеуплоидным кариотипом (положительный контроль) и 76 образцов спонтанных абортусов с неизвестным кариотипом. Ткани спонтанных абортусов с неизвестным кариотипом были получены из биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра. Гестационный возраст, определенный по дате последней менструации, составил от 4 до 17,8 недели ( $8,3 \pm 2,9$  не-

дель). Возраст матерей был в диапазоне от 18 до 42 лет ( $28,5 \pm 6,8$  лет). Всеми участниками было подписано информированное согласие.

Для кариотипирования в группе контроля использовались стандартный цитогенетический метод (G-окрашивание), а также интерфазный FISH-анализ, выполненные согласно описанным протоколам [2]. Для интерфазного FISH использовались центромерные ДНК-зонды на хромосомы 13/21, 18 и X.

Образцы экстраэмбриональной мезодермы были сепарированы под инвертированным микроскопом Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия). Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции, описанным ранее [2].

Качество и количество ДНК анализировали на спектрофотометрах Nanodrop (Thermo, США) и Qubit 2.0 (Thermo, США). Библиотеки были подготовлены с помощью MBU транспозазы Tn5 (МБС-Технология, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. При подготовке были использованы последовательности адаптеров из набора Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, США). Качество библиотек было определено с помощью 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Библиотеки были секвенированы в проточной ячейке FCM V2.0 на секвенаторе Genolab M с помощью набора GenoLab M Sequencing Reagent (300 cycles) V2.0 (GeneMind, Китай) в соответствии с рекомендациями производителя.

Контроль качества исходных данных последовательности выполнялся с использованием FastQC v0.11.4 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Среднее покрытие по геному составило 0,08x. Выравнивание прочтений проводилось с помощью bwa 0.7.17 по отношению к референсному геному человека GRCh38 (hg38). Уникально выровненные прочтения были получены и отфильтрованы по качеству картирования с помощью SAMtools v1.6. Полученные .bam файлы обрабатывались с помощью QDNAseq 1.40.0. Для половых хромосом коррекция содержания ГЦ была рассчитана с помощью ComputeGCbias (инструмент пакета deepTools), используя метод Бенджамини [8]. Геном был разделен на регионы по 50 т.п.н., для которых было рассчитано покрытие с помощью bedtools v2.30.0 [9].

Для анализа полиплоидии использовались суспензии тканей хориона и центромерные ДНК-зонды на хромосомы 2 и X. В каждом образце подсчитывали от 100 до 400 интерфазных ядер. Все образцы, для которых имелась возможность получения препаратов

интерфазных ядер хориона, были проверены на полиплоидию с использованием системы ДНК-зондов на центромеры X и 2. Для верификации анеуплоидий использовались ДНК-зонды на центромеры хромосом 4, 7, 10, 15, 16, 18, 20, 13/21, а также разработанные уникальные зонды на хромосомы 13 (регион гена *RBI*) и 22 (регион гена *DGCR2*). Анализ проводился с использованием микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия) с программным обеспечением Metafer и ISIS (MetaSystems, Германия).

Верификация анеуплоидий в образцах, где для анализа была доступна только ДНК, осуществлялась методом ПЦР в реальном времени. Олигонуклеотидные праймеры были подобраны с использованием баз данных NCBI Gene, UCSC Genome Browser, Ensembl, и программ Primer-BLAST, Oligoanalyzer на регионы различных плеч хромосом (4, 9, 16) или региона длинного плеча хромосом 14 и 22 (таблица). Анализ был проведен на приборе AriaMx (Agilent Technologies, США).

## Результаты

После получения данных ulcWGS 5 образцов спонтанных абортусов с неизвестным кариотипом были исключены из анализа ввиду плохого качества согласно FastQC.

При секвенировании ДНК медицинских абортусов анеуплоидии выявлены не были, однако в одном образце при дальнейшей проверке была выявлена мозаичная тетраплоидия с минорным клоном с моносомией X – mos 92,XXXX[78]/45,X[14]/46,XX[25]. Для положительного контроля были взяты спонтанные абортусы с известными анеуплоидиями, проверенные цитогенетическими и/или молекулярно-цитогенетическими (интерфазный FISH) методами: с трисомией 13 (n=2), трисомией 16 (n=2), трисомией 18 (n=2), трисомией 21 (n=2) и моносомией X (n=2). Примечательно, что кариотипированный стандартным методом образец с трисомией 18 по данным ulcWGS был интерпретирован как имеющий дополнительный материал хромосомы 16, а в образце,

**Таблица.** Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени

**Table.** Primers used for real-time PCR

Праймер	Последовательность 5' - 3'	Регион хромосомы
OCIAD1ex7 F	TGACTCAAGTGTGAGTGGTCAA	4p11
OCIAD1ex7 R	TCAGTAATACCAGTGGGAGCAG	4p11
SGCBex2 F	CAAAGTTCCAATGGTCCTGTAA	4q12
SGCBex2 R	TAAATTGCCCTTTCTCCTCTC	4q12
KANK1intr7 F	TTCAGGGCAAGAACATTGTTAG	9p24.3
KANK1intr7 R	ATAGAGATGCGGGTCTCTTGTT	9p24.3
TRPM6ex33 F	GTCTACAGGTTGGAGGAGAGTT	9q21.13
TRPM6ex33 R	ACGACTCTCATAGCTTTACGGA	9q21.13
ATXN3ex11	CATGGAATGTAGGTGTCTGCTT	14q32.12
ATXN3ex11	CATGATGCAAGTGTCAAATCAC	14q32.12
TGM1intr13 F	CTGTGACAGCCTTTATTGAGGA	14q12
TGM1intr13 R	AAGCTGCTTAGAAGCAAAACCT	14q12
PDPReX18 F	TGTTGGCCAGAAATACGGAATC	16q22.1
PDPReX18 R	TCTCTAATTTACCCGAGACTCT	16q22.1
PDZD9ex5 F	CTGGATAATGGTGAAGCAAGACA	16p12.2
PDZD9ex5 R	GGCTTTACCCTCTTCAACTTGG	16p12.2
HIRAex16 F	AGAGCAGAACCCTGTGAAAGAG	22q11.21
HIRAex16 R	TGTCTCTACCTCAAGCTCAAGT	22q11.21
MAPK8IP2ex10 F	TAGATACACTCGATTGGCCACA	22q13.33
MAPK8IP2ex10 R	TGTTCTCAAGGAGTTCATGCC	22q13.33

в котором исходно была обнаружена трисомия 16, после ulcWGS была выявлена анеуплоидия по X-хромосоме. Проведенный впоследствии интерфазный FISH-анализ подтвердил трисомию 16 в 100% ядер в первом случае и кариотип mos 47,XX +16[139]/92,XXXX[21]/69,XXX[2] во втором. Таким образом, метод ulcWGS показал 100% эффективность и специфичность для обнаружения анеуплоидий в контрольных группах.

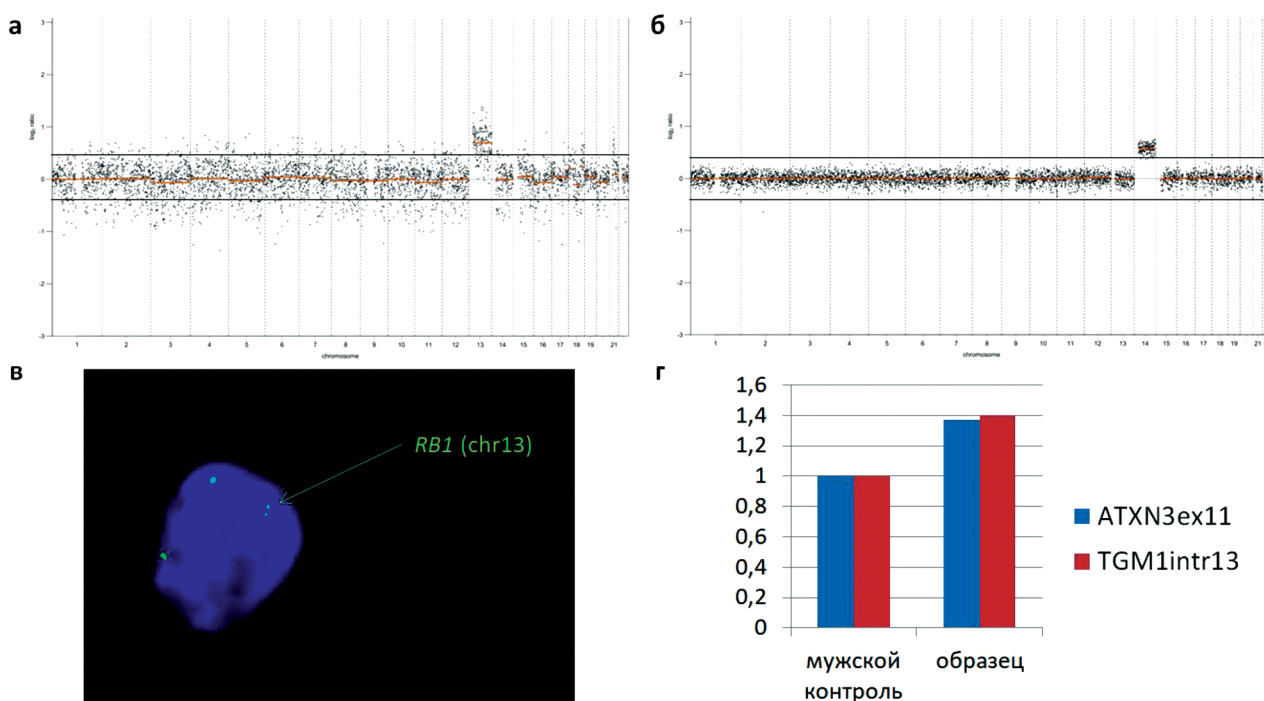
Среди спонтанных абортусов с неизвестным кариотипом 30 образцов имели анеуплоидный кариотип по данным ulcWGS. Из выявленных методом интерфазного FISH вариантов было подтверждено 19 из 23, а методом ПЦР в реальном времени – 6 из 7 случаев (рис. 1).

Анеуплоидии по ауто索мам были наиболее частой хромосомной аномалией (92%), из них самой частой оказалась трисомия 22, а анеуплоидии по половым хромосомам были представлены моносомией X и подтверждены в 2 случаях (8%) (рис. 2).

Полипloidия, определяемая методом интерфазного FISH (58 из 71 случая), была зафиксирована в 4 случаях: в трех из них наблюдалась тетраплоидия и в одном – триплоидия (рис. 2).

### Обсуждение

Молекулярное кариотипирование основывается на определении изменения числа прочтений в образце по отношению к референсу. В данном исследовании мы определили пороговые значения в опытных образцах 1,25 и более для трисомии и 0,75 и менее для моносомии. Такой подход повысил чувствительность обнаружения анеуплоидий, но также увеличил частоту ложноположительных результатов. Так, в группе спонтанных абортусов 20 случаев имели значения более 1,4, и анеуплоидии были подтверждены во всех образцах. Из 10 случаев с значениями 1,25–1,4 в 50% была подтверждена анеуплоидия, в том числе в 3 об-



**Рис. 1.** Результаты анализа анеуплоидии методом ulcWGS и верификации методами FISH и ПЦР в реальном времени: а) пример полногеномного профиля образца с выявленной трисомией 13; б) пример полногеномного профиля образца с выявленной трисомией 14; в) подтверждение трисомии 13 методом FISH с использованием ДНК-зонда на регион гена *RB1*; г) подтверждение трисомии 14 методом ПЦР в реальном времени.

**Fig. 1.** Results of aneuploidy analysis by ulcWGS and verification by FISH and real-time PCR: а) example of a whole-genome profile of a sample with identified trisomy 13; б) example of a whole-genome profile of a sample with identified trisomy 14; в) confirmation of trisomy 13 by FISH using a DNA probe for the *RB1* gene region; г) confirmation of trisomy 14 by real-time PCR.

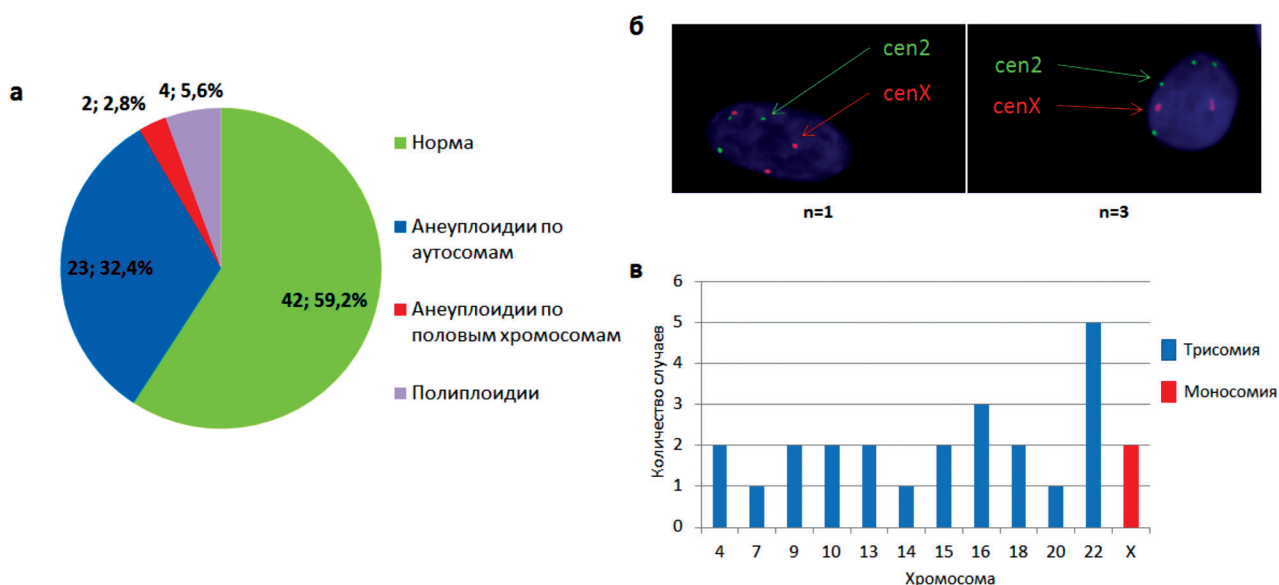
разцах в мозаичной форме. В 5 образцах результаты подтверждающей диагностики дали ложноположительные результаты. Снижение порогового значения позволило обнаружить мозаичные формы (уровень мозаицизма от 20%) анеуплоидий, однако ложноположительные результаты также не исключает более сложных хромосомных перестроек, не позволяющих обнаружить хромосомный дисбаланс выбранными методами, но способных приводить к фенотипу невынашивания беременности. В связи с этим, при пограничных значениях отклонения числа прочтений от референсных значений кажется необходимым более углубленный анализ с использованием методов, позволяющих детектировать нарушения копийности отдельных сегментов хромосом.

В результате аномалии кариотипа, среди которых преобладали аутосомные анеуплоидии, были выявлены у 29 из 71 (40,8%) спонтанных абортусов. Полученные результаты согласуются с распределением отдельных анеуплоидий в недавних исследованиях [10, 11], но отличаются меньшей частотой общего количества аномалий кариотипа, установленного в интервале от 50 до 67% [2]. Такое может объясняться малой

выборкой, неполным анализом полиплоидии и свойствами исследуемой группы, имеющей аномалии клеточного деления, а также, возможно, другими патологиями генома, включающими недетектируемые методом ulcWGS патогенные CNV, летальные точковые генетические варианты, эпигенетические аномалии и др. Такие аномалии, в свою очередь, могут объяснять как прерывание беременности, так и нарушения митотической активности клеточных культур, что уже было показано при аномалиях метилирования генома [12-15].

### Заключение

Полученные результаты показывают, что метод ulcWGS может использоваться для детекции анеуплоидий в случаях ограниченного количества материала или некоторых свойств клеток, не позволяющих применять стандартные подходы кариотипирования. Пограничные значения отклонений копийности хромосомного материала должны рассматриваться как потенциальная причина формирования летального фенотипа и проверяться дополнительными методами.



**Рис. 2.** Хромосомная патология, выявленная у спонтанных абортусов: а) спектр хромосомной патологии в исследуемой выборке спонтанных абортусов; б) результат FISH-анализа при полиплоидии; в) частоты выявленных анеуплоидий по различным хромосомам.

**Fig. 2.** Chromosomal abnormalities detected in spontaneous abortions: а) spectrum of chromosomal abnormalities in the studied sample of spontaneous abortions; б) FISH result for polyploidy; в) frequencies of detected aneuploidies for different chromosomes.

## Литература/References

1. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Gynecology. ACOG Practice Bulletin No. 200: Early Pregnancy Loss. *Obstet Gynecol.* 2018;132(5):e197–e207. doi:10.1097/AOG.0000000000002899
2. Essers R., Lebedev I.N., Kurg A., et al. Prevalence of chromosomal alterations in first-trimester spontaneous pregnancy loss. *Nat Med.* 2023;29(12):3233–3242. doi:10.1038/s41591-023-02645-5
3. Smolander J., Khan S., Singaravelu K., et al. Evaluation of tools for identifying large copy number variations from ultra-low-coverage whole-genome sequencing data. *BMC Genomics.* 2021;22(1):357. doi:10.1186/s12864-021-07686-z
4. Lund R.J., Nikula T., Rahkonen N., et al. High-throughput karyotyping of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2012;9(3):192–195. doi:10.1016/j.scr.2012.06.008
5. Lund R.J., Närvä E., Lahesmaa R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet.* 2012;13(10):732–744. doi:10.1038/nrg3271
6. Kader T., Goode D.L., Wong S.Q., et al. Copy number analysis by low coverage whole genome sequencing using ultra low-input DNA from formalin-fixed paraffin embedded tumor tissue. *Genome Med.* 2016;8(1):121. doi:10.1186/s13073-016-0375-z
7. Chin S.F., Santonja A., Grzelak M., et al. Shallow whole genome sequencing for robust copy number profiling of formalin-fixed paraffin-embedded breast cancers. *Exp Mol Pathol.* 2018;104(3):161–169. doi:10.1016/j.yexmp.2018.03.006
8. Benjamini Y., Speed T.P. Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(10):e72. doi:10.1093/nar/gks001
9. Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6):841–842. doi:10.1093/bioinformatics/btq033
10. Yakut S., Toru H.S., Çetin Z., et al. Chromosome abnormalities identified in 457 spontaneous abortions and their histopathological findings. *Turk Patoloji Derg.* 2015;31(2):111–118. doi:10.5146/tj-path.2015.01303
11. Vlachadis N., Papadopoulou T., Vrachnis D., et al. Incidence and Types of Chromosomal Abnormalities in First Trimester Spontaneous Miscarriages: a Greek Single-Center Prospective Study. *Maedica (Bucur).* 2023;18(1):35–41. doi:10.26574/maedica.2023.18.1.35
12. Zhou W., Dinh H.Q., Ramjan Z., et al. DNA methylation loss in late-replicating domains is linked to mitotic cell division. *Nat Genet.* 2018;50(4):591–602. doi:10.1038/s41588-018-0073-4
13. 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
14. Zhou Q., Xiong Y., Qu B., Bao A., Zhang Y. DNA Methylation and Recurrent Pregnancy Loss: A Mysterious Compass?. *Front Immunol.* 2021;12:738962. doi:10.3389/fimmu.2021.738962
15. Matsumoto Y., Shinjo K., Mase S., et al. Characteristic DNA methylation profiles of chorionic villi in recurrent miscarriage. *Sci Rep.* 2022;12(1):11673. doi:10.1038/s41598-022-15656-y