

**ИНДЕКС МЕТИЛИРОВАНИЯ ИМПРИНТИРОВАННЫХ ГЕНОВ *GNAS* И *GRB10* ПРИ  
НАРУШЕНИЯХ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА**А.А. Кадралиева<sup>1</sup>Научный руководитель: к.б.н. Е.А. Саженова<sup>2</sup><sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

<sup>2</sup>НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН,

Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, 630090

E-mail: [aly.kadralieva@gmail.com](mailto:aly.kadralieva@gmail.com)**METHYLATION INDEX OF IMPRINTED *GNAS* AND *GRB10* GENES IN ABNORMAL HUMAN  
EMBRYO DEVELOPMENT**A.A. Kadralieva<sup>1</sup>Scientific supervisor: E.A. Sazhenova, PhD<sup>2</sup><sup>1</sup>National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina str. 36, 634050<sup>2</sup>Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of

Sciences, Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki str. 10, 630090

E-mail: [aly.kadralieva@gmail.com](mailto:aly.kadralieva@gmail.com)

**Abstract.** *The present study analyzes the methylation index of the imprinted *GNAS* and *GRB10* genes in the group of the first trimester spontaneous abortions with normal karyotype. The DNA samples derived from extraembryonic mesoderm of 47 spontaneous abortions and 45 induced abortions were examined. A significant increase in the methylation index of the imprinted *GNAS* gene and a decrease in the *GRB10* in the spontaneous abortions were observed. Based on the function of this imprinted genes, it can be assumed that an increase in the methylation index of the *GNAS* gene and its decrease in the *GRB10* could enhance the suppression of embryo growth and lead to a possible disturbance of embryo development.*

**Введение.** Одной из актуальных проблем современного акушерства является невынашивание беременности, которая, по некоторым оценкам, охватывает примерно 25% супружеских пар репродуктивного возраста, при этом в структуре самопроизвольного прерывания неуклонно растет доля неразвивающейся беременности первого триместра [1].

«Размножение» человека контролируется как генетическими механизмами, так и эпигенетическими факторами регуляции генной экспрессии, одним из которых является геномный импринтинг – особый вид регуляции активности генов в зависимости от родителя, от которого данный ген получен. Геномный импринтинг играет ключевую роль в обеспечении нормального эмбрионального развития и может оказывать влияние на степень экспрессии генов, контролирующих рост эмбриона, процессы пролиферации и дифференцировки клеток и другие процессы внутриутробного развития плода [2]. Механизмы импринтинга преимущественно связаны с дифференциальным метилированием промоторных регионов импринтированных генов и регуляторных последовательностей (центров

импринтинга), устанавливаемым строго специфичным образом в гаметогенезе и поддерживаемым в соматических клетках на протяжении всего онтогенеза [3].

Нарушение дифференциального метилирования импринтированных генов приводит к эпимутациям, которые могут быть представлены как aberrантным гиперметилированием экспрессируемого аллеля, так и, напротив, гипометилированием инактивированного аллеля. В первом случае происходит полная потеря продукта импринтированного гена в клетке, тогда как во втором – наблюдается увеличение дозы гена вследствие установления его биаллельной экспрессии [4].

**Материалы и методы.** Для проведения данной работы в качестве материала исследовали образцы внезародышевой (экстраэмбриональной) мезодермы 47 спонтанных абортусов (СА) I триместра с нормальным кариотипом. В качестве контроля была исследована внезародышевая мезодерма 45 медицинских абортусов (МА) I триместра беременности. Внезародышевая мезодерма является производной эпибласта, дающего начало наружному зародышевому листку, поэтому данная ткань ближе по происхождению к эмбриональным структурам, чем другие плацентарные ткани. Продолжительность внутриутробного периода развития определялась по дате последней менструации и составила для СА –  $7,64 \pm 1,24$  недель и для МА –  $7,69 \pm 1,27$  недель.

Геномную ДНК выделяли из некультивированных клеток внезародышевой мезодермы после стандартной обработки протеиназой К при 37°C и экстракцией фенол/хлороформом.

Для бисульфитной конверсии ДНК использовали набор EZ DNA methylation Direct Kit («Zymo Research», США) согласно протоколу производителя. Индекс метилирования определяли путем пиросеквенирования пяти CpG-динуклеотидов для гена *NESP55* и восьми для *GRB10*, расположенных в ДМР, на пиросеквенаторе PyroMark Q24 («Qiagen», Германия).

**Результаты.** Индекс метилирования был определен в пяти CpG-сайтах гена *GNAS* и в восьми CpG-сайтах гена *GRB10* внутри групп медицинских и спонтанных абортусов (табл. 1, 2).

Для гена *GNAS* в контрольной выборке минимальный и максимальный индекс метилирования составил 26,6% и 70,9%, и был обнаружен в пятом CpG. Среди спонтанных абортусов данные показатели составили 32,7% в пятом CpG и 84,4% в четвертом CpG, соответственно (табл. 1). Увеличение индекса метилирования может приводить к снижению экспрессии гена, а значит к уменьшению количества продуцируемого белка.

Таблица 1

Значение индекса метилирования гена *GNAS* в группе индуцированных и спонтанных абортусов

CpG-сайты	Индекс метилирования (МА)			Индекс метилирования (СА)			p
	значение			Значение			
	мин.	макс.	среднее	мин.	макс.	среднее	
CpG1	29,6	66,5	43,5±8,3	36,2	75,3	49,9±7,1	<0,01
CpG2	29,5	65,5	43,2±8,6	35,8	79,8	50,0±8,1	<0,01
CpG3	29,9	62,1	41,7±7,7	39,9	76,4	49,7±7,6	<0,01
CpG4	29,4	64,6	43,0±8,3	35,7	84,4	49,5±8,0	<0,01
CpG5	26,6	70,9	42,3±11,3	32,7	73,5	47,7±9,8	<0,05
CpGcp	29,3	65,1	42,7±9,6	37,7	77,9	49,4±7,8	<0,01

Примечание: мин. – минимальное значение индекса метилирования, макс. - максимальное значение индекса метилирования, CpGcp – среднее значение индекса метилирования по пяти CpG.

Индекс метилирования гена *GRB10* в контрольной группе варьировал в пределах от 29,5% в четвертом CpG до 71,0% в пятом CpG. В выборке СА минимальное значение этого показателя соответствовало 20,0% в четвертом, максимальное 59,5% в восьмом CpG (табл. 2). Снижение индекса метилирования гена *GRB10* могло привести к увеличению экспрессии данного гена, а значит к увеличению количества белка.

Таблица 2

Значение индекса метилирования гена *GRB10* в группе индуцированных и спонтанных эмбрионов

CpG-сайты	Индекс метилирования (МА)			Индекс метилирования (СА)			p
	значение			Значение			
	мин.	макс.	среднее	мин.	макс.	среднее	
CpG1	42,0	64,5	51,3±6,1	21,9	49,3	37,9±7,7	<0,01
CpG2	42,7	64,9	49,8±5,2	29,2	55,0	41,8±7,6	<0,01
CpG3	42,1	60,6	49,3±9,2	27,2	54,3	41,7±8,1	<0,01
CpG4	29,5	65,4	49,5±6,9	20,0	55,5	41,1±9,1	<0,01
CpG5	38,9	71,0	50,5±6,5	25,8	58,4	39,9±9,4	<0,01
CpG6	41,3	63,1	50,4±5,0	24,3	57,2	41,3±8,4	<0,01
CpG7	36,0	67,0	50,4±6,2	23,9	57,5	40,7±7,8	<0,01
CpG8	34,4	60,4	50,3±5,8	20,4	59,5	41,0±8,5	<0,01
CpGcp	49,3	51,3	50,2±4,4	36,9	41,9	40,6±6,5	<0,01

Примечание: мин. – минимальное значение индекса метилирования, макс. – максимальное значение индекса метилирования, CpGcp – среднее значение индекса метилирования по восьми CpG.

**Заключение.** В настоящем исследовании обнаружены статистически значимые отличия по индексу метилирования импринтированных генов между спонтанными и медицинскими абортусами, которые свидетельствует о том, что в пренатальном периоде происходит отбор против эмбрионов с подобными нарушениями.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Радзинский В.Е. Независящая беременность. Методические рекомендации МАРС. – М.: Редакция журнала Status Praesens, 2015. – 48 с.
2. Elhamamsy A.R. (2017). Role of DNA methylation in imprinting disorders: an updated review. J Assist Reprod Genet, Vol. 34, no. 5, pp. 549-562.
3. Adalsteinsson B.T., Ferguson-Smith A.C. (2014). Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting. Genes, Vol. 5, no. 3, pp. 635-655.
4. Лебедев И.Н., Саженова Е.А. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 10. – С. 1356–1373.