

УДК 577.218

ТРАНСКРИПТОМИКА ПЛАЦЕНТАРНОЙ ТКАНИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ БОЛЬШИХ АКУШЕРСКИХ СИНДРОМОВ

© 2025 г. Е. А. Трифонова^{a, b, *}, А. В. Марков^a, А. А. Зарубин^a, А. А. Бабовская^a,
М. М. Гавриленко^a, Т. В. Габидулина^b, В. А. Степанов^a

^aНаучно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского центра,
Томск, 634050 Россия

^bСибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 28.06.2024 г.

После доработки 20.09.2024 г.

Принята к публикации 17.10.2024 г.

Многочисленными гистологическими исследованиями продемонстрировано, что ключевые патогенетические механизмы больших акушерских синдромов (БАС) связаны с нарушением процессов плацентации. Тем не менее молекулярная основа данного открытия все еще не установлена. Цель нашей работы заключалась в выяснении молекулярных механизмов и поиске новых генетических маркеров этих гестационных осложнений на основе интегративного анализа данных, полученных при полногеномном экспрессионном профилировании плацентарной ткани женщин с преэклампсией, задержкой роста плода, преждевременными родами и физиологической беременностью. Показана значимая роль окислительного стресса, ферроптоза и нарушения межклеточных взаимодействий в плацентарной ткани как общих механизмов патогенетики БАС. Выявлено 64 гена, транскрипционная активность которых статистически значимо изменяется как минимум при двух из рассматриваемых гестационных осложнений. Наиболее значимыми клеточными популяциями, обогащенными данными генами, выступили материнские эндотелиальные клетки и клетки синцитиотрофобласта. Биоинформатический анализ и оценка топологии сети белок–белковых взаимодействий позволили идентифицировать в качестве центральных генов *SOD1*, *ACTG1*, *TXNRD1*, *TKT*, *GCLM*, *GOT1*, *ACO1* и *UBB*, а также выделить ключевые регуляторы, запускающие каскад реакций с вовлечением дифференциально экспрессирующихся генов, — *MAPK3*, *MID1*, *LCMT1*, *DUSP10*, *TOPORS*, *SOX10*, *EGFR*, *TFAP2A*, *GLIS1*, *NR2F1*, *NR2F2*, *PAX5*, *HSF1*, *BCL6*, которые сверхпредставлены в сигнальном пути митоген-активируемых протеинкиназ и в процессах, опосредованных интерфероном-гамма. Указанные гены и их продукты являются наиболее перспективными биомаркерами для разработки подходов к оценке факторов риска и таргетной терапии БАС. Дальнейшие исследования должны быть направлены на уточнение функционального и диагностического значения этих генов при развитии патологических состояний беременности.

Ключевые слова: транскриптом, плацента, дифференциально экспрессирующиеся гены, большие акушерские синдромы, преэклампсия, задержка роста плода

DOI: 10.31857/S0026898425020048, EDN: GGNMXX

ВВЕДЕНИЕ

Распространенные акушерские осложнения, включая преэклампсию (ПЭ), задержку развития плода (ЗРП), преждевременные роды (ПР), преждевременный разрыв плодных оболочек, гибель плода и привычное невынашивание беременности (ПНБ) — это патологические состояния беременности, определяемые как большие акушерские синдромы (БАС). Появившаяся более 10 лет назад благодаря работам G. Di Renzo

[1] и R. Romero [2] концепция об общности патогенетических процессов, ассоциированных с возникновением тяжелых гестационных осложнений, задала новый вектор в изучении патологии беременности и заставила иначе взглянуть на роль провизорных органов, в частности плаценты, в их генезе. Ключевыми особенностями всех этих синдромов являются множественная этиология, длительная доклиническая стадия, частое вовлечение плода, а также клинические проявления, которые носят адаптивный

характер. Помимо этого, предрасположенность к определенному заболеванию группы БАС должна определяться взаимодействием генов и окружающей среды и/или сложными ген-генными взаимодействиями матери и/или плода [1, 2]. Примечательно, что все перечисленные БАС чаще встречаются у женщин, забеременевших с помощью вспомогательных репродуктивных технологий, по сравнению со спонтанным зачатием. Данное наблюдение свидетельствует, что большинство из этих неблагоприятных исходов беременности, вероятно, имеет общий опосредованный плацентой путь патогенеза. Необходимо подчеркнуть, что несмотря на стремительное развитие перинатальной медицины, мы все еще далеки от полного понимания патофизиологии данных осложнений беременности, даже принимая во внимание вклад вспомогательных репродуктивных технологий в их развитие и тяжесть их последствий [3]. Таким образом, БАС, являющиеся основной причиной материнской, перинатальной и младенческой заболеваемости и смертности, остаются актуальной проблемой и требуют фундаментального изучения.

Многочисленные исследования гистологических препаратов плаценты продемонстрировали, что основные этиопатогенетические механизмы данных патологических состояний беременности связаны с нарушением процессов глубокой плацентации и ремоделирования спиральных артерий миометрия [4]. Тем не менее молекулярная основа данного феномена все еще не установлена. Существование связи между этими гестационными осложнениями, особенно между ПР и ПЭ, подтвердили не только данные гистологического анализа, но и несколько эпидемиологических исследований. Масштабное исследование, в котором приняли участие более 350000 шведских женщин, выявило более высокий риск спонтанных ПР, отслойки плаценты, ЗРП и мертворождения при второй беременности у пациенток, перенесших раннюю ПЭ. Аналогичные данные получены и в норвежской популяции [5, 6]. Наряду с этим, обследование более 700000 женщин показало, что пациентки, у которых были ПР во время первой беременности, с большей вероятностью имели раннюю или позднюю ПЭ во время следующей беременности, и риск увеличивался с более ранним гестационным возрастом при родах во время первой беременности [7]. Также обнаружено, что женщины с предшествующей ПЭ имеют высокий риск развития спонтанных и индуцированных ПР, а также ЗРП в последующих беременностях [8]. Эти исследования показывают, что как ПЭ, так и ПР являются клиническими факторами риска друг для друга при последующей беременности, что подтверждает наличие общей биологической основы этих заболеваний, а так-

же связь общего фактора риска с наследственно обусловленными патофизиологическими процессами в организме матери.

Мы предполагаем, что для понимания ключевых патофизиологических аспектов БАС приоритетное значение имеет раскрытие молекулярно-генетических механизмов, детерминирующих нарушения в фетоплацентарной системе, характерные для данных гестационных осложнений. Поскольку на сегодняшний день наиболее эффективными и информативными при изучении патогенетики заболеваний являются подходы, основанные на интеграции омиксных данных и построении генных сетей, цель нашей работы состояла в проведении интегративного анализа данных, полученных при полногеномном экспрессионном профилировании плацентарной ткани как основы для поиска молекулярных механизмов и идентификации новых генетических маркеров, определяющих высокий риск развития БАС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Интегративный анализ транскриптомных данных. Краткая характеристика основных этапов анализа, содержащихся в данной работе, представлена на рис. 1. С целью поиска транскриптомных данных, полученных при полногеномном анализе экспрессии генов в материнской (дистальной) части плаценты пациенток из группы БАС и женщин с физиологической беременностью (ФБ), использовали следующие варианты запроса в поисковой строке баз данных (БД) GEO (Gene Expression Omnibus; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) и ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>): “preeclampsia, placenta”; “preeclampsia, decidua”; “preeclampsia, basal plate”; “premature birth, premature delivery, prematurity, preterm delivery, obstetric labor, premature, preterm labor, placenta”; “premature birth, premature delivery, prematurity, preterm delivery, obstetric labor, premature, preterm labor, decidua”; “premature birth, premature delivery, prematurity, preterm delivery, obstetric labor, premature, preterm labor, basal plate”; “fetal growth retardation, intrauterine growth restriction, small gestational age, placenta”; “fetal growth retardation, intrauterine growth restriction, small gestational age, decidua”; “fetal growth retardation, intrauterine growth restriction, small gestational age, basal plate”; “abortion, spontaneous abortion, miscarriage, placenta”; “abortion, spontaneous abortion, miscarriage, decidua”; “abortion, spontaneous abortion, miscarriage, basal plate”.

Анализировали четыре наиболее распространенных патологии из группы БАС: ПЭ, невынашивание беременности (ПР и самопроизвольный выкидыш), ЗРП. Всего найдено 30 ис-

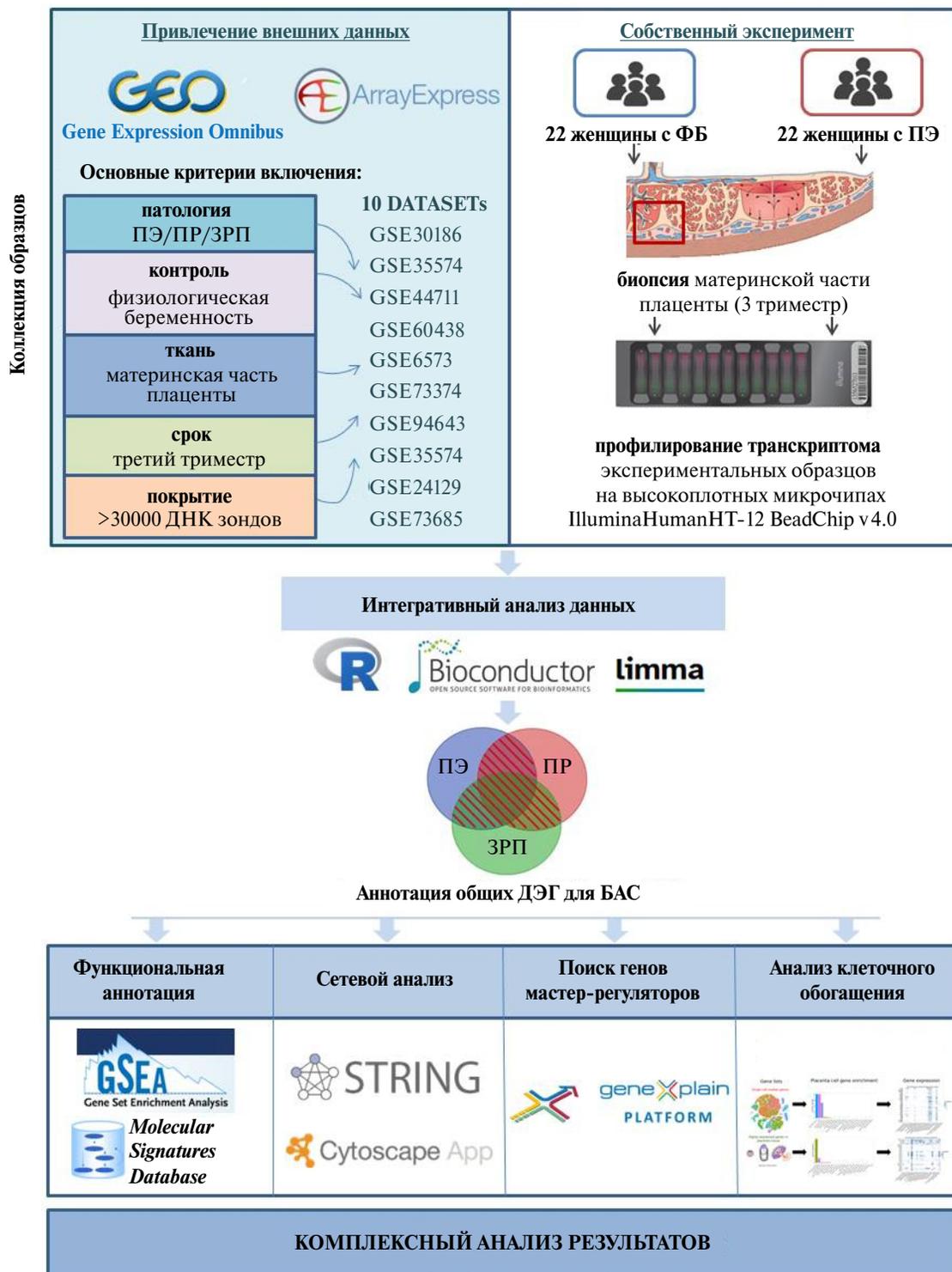


Рис. 1. Дизайн исследования. ФБ – физиологическая беременность; ПЭ – преэклампсия; ПР – преждевременные роды; ЗРП – задержка роста плода; БАС– большие акушерские синдромы; ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены.

следований с выгруженными наборами данных, характеризующих транскриптом плацентарной ткани человека при выбранных фенотипах (E-MTAB-5353, GSE10588, GSE12216, GSE14722, GSE22490, GSE24129, GSE25861, GSE25906,

GSE25906, GSE30186, GSE35574, GSE35574, GSE44711, GSE4707, GSE47187, GSE54618, GSE60438, GSE6573, GSE73374, GSE73377, GSE73685, GSE73712, GSE74341, GSE75010, GSE91077, GSE91189, GSE93839, GSE94643,

GSE94644, GSE96985), которые были дополнены результатами собственных исследований, проведенных ранее в НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ [9, 10]. Из этого спектра в интегративный анализ включены наборы данных, удовлетворяющие следующим критериям: оценка количества транскриптов в образцах представлена в виде сигналов свечения соответствующих ДНК-зондов (детектируемых технологией одноцветного окрашивания микрочипов), сравнимый диапазон интенсивности; для более обширного покрытия спектра возможных транскриптов микрочип должен содержать не менее 30000 ДНК-зондов; ткани, в которых проводилось транскриптомное профилирование, включают материнскую (дистальную) часть плаценты; забор материала на исследование проводили в третьем триместре беременности; дизайн эксперимента включал группу больных и группу с нормальной (физиологической) беременностью, количество индивидов в группе сравнения не менее двух. Согласно этим крите-

риям, отобрано 11 наборов данных, полученных при использовании коммерческих микрочиповых платформ Illumina и Affymetrix (табл. 1). Суммарное количество образцов плацентарной ткани человека, подвергнутых интегративному анализу, составило 411. Необходимо отметить, что нами найдено всего несколько исследований, в которых проведено транскриптомное профилирование плацентарной ткани при ПР и ЗРП, а основной массив данных получен для такого фенотипа, как ПЭ.

Биоинформатический анализ данных. Биоинформатическая обработка и статистический анализ данных выполнены в программной среде R 3.6.1 (<http://www.R-project.org>) с использованием специализированных пакетов проекта Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>). Доступ к ресурсам GEO осуществлен с помощью программного пакета GEOquery [20]. Сигналы ДНК-зондов преобразованы посредством log₂-трансформации, а также квантильной нормализации (в случае микрочипов Illumina), либо

Таблица 1. Краткая характеристика наборов данных, включенных в интегративный анализ

БАС	Набор данных	Пациентки с БАС, число	Контрольная группа, размер	Тип ткани	Микрочиповая платформа	ДНК-зонды, число	Ссылка
Преэклампсия	Собственные данные	22	22	Плацента	Illumina HumanHT-12 BeadChip v4.0	48107	[9, 10]
	GSE30186	6	6	Плацента	Illumina HumanHT-12 BeadChip v4.0	48107	[11]
	GSE35574	19	40	Плацента	Illumina HumanWG-6 BeadChip v2.0	48702	[12]
	GSE44711	8	8	Ворсины хориона	Illumina HumanHT-12 BeadChip v4.0	48107	[13]
	GSE60438	35	42	Decidua basalis	Illumina HumanHT-12 BeadChip v4.0	48107	[14]
	GSE6573	2	2	Decidua basalis	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0	54675	[15]
	GSE73374	19	17	Плацента	Affymetrix Human Gene 2.0 ST Array	53617	[16]
	GSE94643	8	8	Decidua basalis, Decidua parietalis	Affymetrix Human Gene 2.0 ST Array	53617	[17]
Задержка развития плода	GSE35574	35	40	Плацента	Illumina HumanWG-6 BeadChip v2.0	48702	[12]
	GSE24129	8	8	Плацента	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array	33297	[18]
Преждевременные роды	GSE73685	20	36	Плацента, Decidua basalis	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array	33297	[19]

алгоритма Robust Multi-array Average (в случае микрочипов Affymetrix). Выбор метода нормализации определялся технологическими особенностями микрочиповой платформы, использованной для получения данных. Эта стратегия была успешно использована ранее [21]. Для каждой патологии беременности с помощью инструмента biomaRt [22] и аннотационных пакетов Bioconductor получены соответствия между идентификаторами генов из геномной базы данных Ensembl и идентификаторами ДНК-зондов на микрочипах. Если на микрочиповой платформе на один ген приходилось несколько ДНК-зондов, определяющих разные транскрипты, то отбирали только те зонды, которые имели наибольшую вариабельность сигнала в группе образцов из соответствующего исследования. Таким образом, для всех наборов данных по ПЭ идентифицировано 15747 общих ДНК-зондов, для внутриутробной задержки развития – 17367 зондов, а для ПР – 18061. Поиск ДЭГ в группах “случай–контроль” проводили с использованием метода обобщенных линейных моделей (GLM) с эмпирическим байесовским “смягчением” оценок дисперсии при расчете *t*-критерия (moderated *t*-statistics), реализованного в программном пакете limma [23]. Гены считали дифференциально экспрессированными при значении *P*-value с поправкой на частоту возникновения ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) по процедуре Бенджамини–Хохберга, не превышающей 0.1. Такой уровень можно считать оптимальным для минимизации ошибки второго рода, так как методы последующего статистического и интегративного анализа устойчивы к ошибкам первого рода [24]. Общий список ДЭГ в двух и более патологиях использовали для оценки общего уровня активности данной генной сигнатуры в каждом из изученных образцов с помощью инструмента singscore [25]. Для каждого набора данных сравнивали уровни активности генов между патологической и контрольной группами с помощью критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Дополнительно для каждого набора была рассчитана степень изменения экспрессии (показатель log₂ fold change). Аннотацию ДЭГ осуществляли с помощью ресурса Molecular Signatures Database (MSigDB), вычислительного метода “Gene Set Enrichment Analysis” [26] и веб-ресурса “WebGestalt” [27]. Сеть белок–белковых взаимодействий продуктов генов была построена с использованием онлайн-инструмента STRING [28], центральные гены (с рангом связанности узла менее 5) сети идентифицированы с помощью анализа МСС (Maximal Clique Centrality), реализованного в плагине CytoHubba в программном обеспечении Cytoscape 3.7.2 [29].

Поиск мастер-регуляторов. Поиск транскрипционных факторов (ТФ), участвующих в регуляции экспрессионной активности кластера ДЭГ, осуществляли *in silico* в программном обеспечении (ПО) geneXplain platform (<http://platform.genexplain.com>), позволяющем идентифицировать потенциальные сайты связывания ТФ, которыми обогащены исследуемые промоторы по сравнению с набором фоновых последовательностей, таких как промоторы генов, которые не были дифференциально экспрессированы в условиях эксперимента [30]. Сайты связывания ТФ (ССТФ) промоторов ДЭГ анализировали с использованием известных ДНК-связывающих последовательностей, представленных в библиотеке TRANSFAC® (BIOBASE, Wolfenbüttel, Германия) и алгоритма F-Match. Мотивы задаются с использованием матриц позиционного веса (PWM), которые присваивают веса каждому нуклеотиду в каждой позиции мотива ДНК, распределяя его на отдельные ТФ или группами ТФ. Алгоритм находит пороговое значение оценки каждой PWM, которое дает оптимальную сверхпредставленность предсказанных сайтов связывания ТФ в регуляторных областях (последовательности “Yes”) по сравнению с фоновым значением (последовательности “No”). F-Match применяет гипергеометрический тест и сообщает о тех мотивах (и соответствующих ТФ), частота которых в наборе Yes значительно выше, чем в фоновом наборе No. Оптимальная оценка максимизирует вероятность того, что предсказанный сайт связывания будет расположен в последовательности Yes, удовлетворяя выбранному порогу статистической значимости [31]. Посредством нескольких итераций для каждого выбранного порога оценки алгоритм сравнивает частоту найденных мотивов в последовательностях Yes с их фоновой частотой в последовательностях No. Применяемая реализация оптимизирует дискриминацию “Да”/”Нет” по двум критериям. Первый критерий (сверхпредставленность сайтов) учитывает все прогнозируемые сайты связывания и использует биномиальный статистический критерий. Второй (сверхпредставленность последовательностей) направлен на максимальное обогащение последовательностей, содержащих по меньшей мере один сайт связывания в наборе Yes, и применяет критерий Фишера для оценки статистической значимости. Частота ложных обнаружений контролируется путем оценки скорректированного значения *p* (с использованием процедуры Бенджамини–Хохберга).

Основной алгоритм поиска мастер-регуляторов был описан ранее [32]. Цель данного алгоритма – найти узлы в глобальной сети передачи сигналов, которые потенциально могут регулировать активность набора ТФ, обнаруженных на предыдущем этапе анализа. Комплексная

сеть передачи сигналов в клетках человека строится модулем сетевого анализа платформы geneXplain на основе реакций, аннотированных в базе данных TRANSPATH® (<http://genexplain.com/transpath>). Ключевые мастер-регуляторы считаются наиболее эффективными терапевтическими мишенями, поскольку любое воздействие на такую молекулу может переключить программы транскрипции сотен генов, которые регулируются соответствующими ТФ. Скрипты для извлечения, обработки и анализа данных, написанные и использованные в настоящей работе, доступны в репозитории GitHub по ссылке: <https://github.com/alekseizarubin/placental-transcriptomics-GOS>.

компонент, объясняющих почти 80% общей дисперсии данных, выявила тенденцию образцов группироваться в зависимости от экспериментальной работы (рис. 2). Поэтому при идентификации ДЭГ для учета эффекта группировки по отдельным исследованиям (batch effect) в качестве ковариаты в статистической модели использовали информацию о принадлежности образцов к конкретным наборам данных GEO. Анализ такой модели не выявил скрытых суррогатных переменных (Surrogate variable analysis, SVA), что обуславливает отсутствие необходимости использования дополнительной информации (например, разных типов тканей) в модели [33].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Интегративный анализ транскриптомных данных

Для оценки сходства транскриптомных профилей исследуемых образцов проведен анализ главных компонент экспрессионных уровней генов (Principal Component Analysis, PCA). Визуализация в пространстве первых двух главных

Проведенный интегративный анализ выявил 4939 ДЭГ при ПЭ и ФБ, 52 ДЭГ обнаружены при сравнении группы с нормальной беременностью и группы с ЗРП, 96 ДЭГ получены при анализе групп с ПР и ФБ (полный список ДЭГ, полученных при всех сравнениях, а также значения уровня значимости и кратности изменения каждого гена доступны в дополнительных табл. 1–3 на странице исследования в репозитории GitHub). Анализ общности дифференциальной экспрессии при данных осложнениях беременности выявил только один ген – *SOD1* – ассоциированный со всеми тремя рассматриваемыми заболеваниями

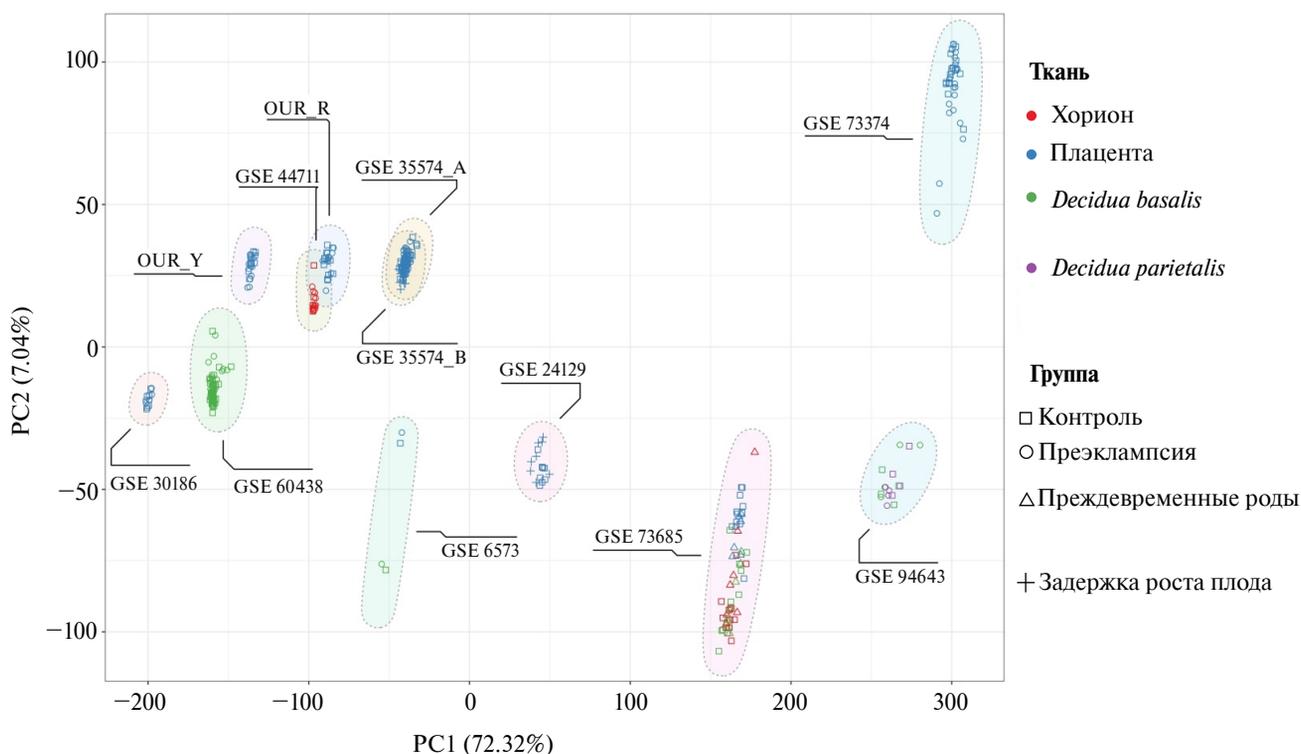


Рис. 2. Кластеризация образцов, включенных в интегративный анализ. Приведены идентификационные номера набора данных согласно базе данных GEO. Наборы данных, полученные в результате собственных исследований в русской и якутской популяционных выборках, обозначены “OUR_Y” и “OUR_R” соответственно.

Таблица 2. Наиболее значимые категории, обогащенные изучаемыми генами-кандидатами БАС, полученные с помощью ресурса MSigDB

Категория в базе данных	Основные процессы категории	Гены, входящие в категорию	FDR*
Позитивная регуляция клеточного взаимодействия (GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_COMMUNICATION)	Процессы, повышающие частоту, скорость и степень клеточного взаимодействия (передача сигналов или взаимодействие между клетками, между клеткой и внеклеточным матриксом или между клеткой и окружающей средой)	<i>EDNRA, SOD1, SASH1, MAPK11, NPNT, ABCA7, ADAM9, NTRK2, UBB, MID1, ENG, TRIM38, SH2D3A, NCOA2, ADAMTS3, TSPAN14</i>	3.2×10^{-6}
Позитивная регуляция каскада MAPK (GO_POSITIVE_REGULATION_OF_MAPK_CASCADE)	Процессы, активирующие повышение частоты, скорости или степени передачи сигнала, опосредованной MAPK-каскадом	<i>EDNRA, SOD1, SASH1, MAPK11, NPNT, ABCA7, ADAM9, NTRK2, UBB, MID1</i>	5.32×10^{-6}
Позитивная регуляция молекулярной функции (GO_POSITIVE_REGULATION_OF_MOLECULAR_FUNCTION)	Процессы, активирующие или повышающие скорость или степень молекулярной функции, биологическую активность элементов, возникающие на молекулярном уровне (например, катализ или связывание)	<i>EDNRA, SOD1, SASH1, MAPK11, NPNT, ABCA7, ADAM9, UBB, TRIM38, SH2D3A, NCOA2, BCL2L13, TRIP10, GABARAPL2, GCLM</i>	5.11×10^{-5}
Позитивная регуляция внутриклеточной передачи сигнала (GO_POSITIVE_REGULATION_OF_INTRACELLULAR_SIGNAL_TRANSDUCTION)	Любой процесс, который активирует или повышает частоту, скорость или степень передачи сигнала внутри клетки	<i>EDNRA, SOD1, SASH1, MAPK11, NPNT, ABCA7, ADAM9, NTRK2, UBB, MID1, TRIM38, ENG, MAPRE2</i>	7.21×10^{-5}
Регуляция развития многоклеточного организма (GO_REGULATION_OF_MULTICELLULAR_ORGANISMAL_DEVELOPMENT)	Любой процесс, модулирующий частоту, скорость или степень развития многоклеточного организма	<i>EDNRA, SOD1, SASH1, MAPK11, NTRK2, UBB, ENG, AQP1, EPHB3, ANKRD54, MAP1B, WDR61, SEMA3G, BCL6B</i>	9.38×10^{-5}
TGTATGA_MIR4853P	В категорию входят гены, имеющие, по крайней мере, один мотив TGTATGA в их 3'-нетранслируемой области. Мотив представляет собой предполагаемую мишень для зрелой miR человека hsa-miR-485-3p (v7.1 miRBase)	<i>ADAMTS3, RNF145, SYPL1, MAT2B, ZFAND5, TMEM184B</i>	1.28×10^{-4}
Клеточный ответ на кислородсодержащее соединение (GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_OXYGEN_CONTAINING_COMPOUND)	Изменение состояния или активности клетки (движение, секреция, синтез ферментов, экспрессия генов и т.д.) в результате воздействия кислородсодержащего соединения	<i>EDNRA, SOD1, SASH1, GCLM, GOT1, ADAM9, NTRK2, AQP1, MAP1B, NCOA2, LEPROTL1, RPS6KA2</i>	1.76×10^{-3}
Путь транссульфурации WP_TRANSULFURATION_PATHWAY	Превращение гомоцистеина в цистатионин и цистеин, опосредованное B6-зависимыми ферментами	<i>GCLM, GOT1, MAT2B</i>	2.73×10^{-3}
Клеточный ответ на химический стресс (REACTOME_CELLULAR_RESPONSE_TO_CHEMICAL_STRESS)	Универсальные физиологические реакции на стресс, возникающие в результате воздействия химических веществ эндогенного и экзогенного происхождения	<i>GCLM, SOD1, NCOA2, UBB, TXNRD1, TKT</i>	3.16×10^{-3}

Таблица 2. Окончание

Категория в базе данных	Основные процессы категории	Гены, входящие в категорию	FDR*
Процессы в ядре, опосредованные NFE2L2 (REACTOME_NUCLEAR_EVENTS_MEDIATED_BY_NFE2L2)	В ответ на химические и другие стрессовые факторы стабилизированный NFE2L2 перемещается в ядро, где связывается с элементами антиоксидантного ответа (ARE) в промоторах и энхансерах генов-мишеней для усиления их экспрессии	<i>GCLM, UBB, TXNRD1, TKT</i>	6.84×10^{-3}

*Категории, уровень значимости которых с поправкой на множественные сравнения (FDR) $\leq 10^{-3}$.

Таблица 3. Краткая характеристика генов, кодирующих ключевые факторы транскрипции и мастер-регуляторы

Ген	Белок	Локализация на хромосоме	Функция
<i>MAPK3</i>	Митоген-активируемая протеинкиназа 3	chr16:30,114,105–30,123,506	Входит в семейство MAP-киназ, которые участвуют в сигнальном каскаде, регулирующем процессы пролиферации и дифференцировки клеток
<i>MID1</i>	Е3 убиквитин-лигаза MID1	chrX:10,445,310–11,111,177	Ингибирует врожденный иммунный ответ, убиквитинируя IRF3
<i>LCMT1</i>	Лейцин-карбоксиметилтрансфераза 1	chr16:25,111,726–25,178,231	Катализирует метилирование карбоксильной группы С-концевого остатка лейцина каталитической субъединицы протеинфосфатазы 2A. Принимает участие в регуляции клеточного цикла и активности метилтрансферазы
<i>DUSP10</i>	Фосфатаза двойной специфичности 10	chr1:221,701,420–221,742,176	Инактивирует киназы путем дефосфорилирования остатков фосфосерина / треонина и фосфотирозина. Участвует в негативной регуляции белков суперсемейства MAP-киназ, инактивации p38 и SAPK / JNK
<i>TOPORS</i>	Е3 убиквитин-лигаза	chr9:32,540,544–32,552,628	Кодирует обогащенный остатками серина и аргинина ядерный белок с доменом цинкового пальца типа RING. Участвует в клеточном росте, пролиферации и апоптозе, регуляции стабильности p53/TP53 посредством убиквитинзависимой деградации. Может регулировать модификацию хроматина путем сумоилирования нескольких белков, связанных с модификацией хроматина
<i>SOX10</i>	Транскрипционный фактор SRY–Box 10	chr22:37,970,686–37,987,422	Участвует в регуляции эмбрионального развития, может действовать как активатор транскрипции после образования белкового комплекса с другими белками. Важен для развития нервного гребня и периферической нервной системы
<i>EGFR</i>	Рецептор эпидермального фактора роста	chr7:55,019,017–55,211,628	Мембранный белок, связывание которого с эпидермальным фактором роста приводит к пролиферации клеток
<i>TFAP2A</i>	Фактор транскрипции AP-2α	chr6:10,393,186–10,419,659	Регулирует экспрессию генов, контролирующих деление и апоптоз клеток. Активирует гены, участвующие в эмбриогенезе, включая правильное развитие глаз, лица, конечностей и нервной трубки
<i>GLIS1</i>	Белок с доменом цинкового пальца GLIS1	chr1:53,506,233–53,738,106	Действует как активатор и репрессор транскрипции, контролируя экспрессию генов, участвующих в дифференцировке клеток
<i>NR2F1</i>	Член группы F1 подсемейства ядерных рецепторов 2	chr5:93,583,222–93,594,611	Является ТФ семейства орфанных рецепторов стероидных/тиреоидных гормонов, играющих важную роль в нейрогенезе и дифференцировке клеток нервного гребня в эмбриогенезе

Таблица 3. Окончание

Ген	Белок	Локализация на хромосоме	Функция
<i>NR2F2</i>	Член группы F2 подсемейства ядерных рецепторов 2	chr15:96,325,928–96,340,263	Белок суперсемейства ядерных рецепторов стероидных гормонов щитовидной железы, представляет собой активируемый лигандом фактор транскрипции, который участвует в регуляции многих генов
<i>PAX5</i>	Фактор транскрипции PAX5	chr9:36,833,269–37,035,319	Кодирует белок-активатор, специфичный для В-клеточного роста, который экспрессируется на ранних стадиях дифференцировки В-клеток. Участвует в развитии нервной системы и сперматогенезе
<i>HSF1</i>	Фактор транскрипции теплового шока 1 (HSF1)	chr8:144,291,588–144,314,722	Главными мишенями HSF1 являются гены белков теплового шока, участвующих в восстановлении поврежденных белков и предотвращении их агрегации, направлении неправильно упакованных белков на деградацию, стабилизации ряда белков – ключевых регуляторов клеточной пролиферации, а также регуляции множества сигнальных молекул, включая MAPK и mTOR
<i>BCL6</i>	Репрессор транскрипции BCL6	chr3:187,721,377–187,745,725	Репрессирует транскрипцию ряда генов, вовлеченных в дифференцировку плазматических клеток, клеточный цикл, ответ на повреждение ДНК и программируемую клеточную смерть

ями из группы БАС (рис. 3). Ген *SOD1* кодирует металлопротеин, основной антиоксидантный фермент, катализирующий процесс дисмутации супероксидного анионного радикала в молекулярный кислород и пероксид водорода [34]. Бо-

лее обширный кластер ДЭГ, перекрывающихся в группах, различающихся по статусу течения беременности, получен нами при анализе общности двух гестационных осложнений. Так, экспрессия 41 гена статистически значимо отлича-

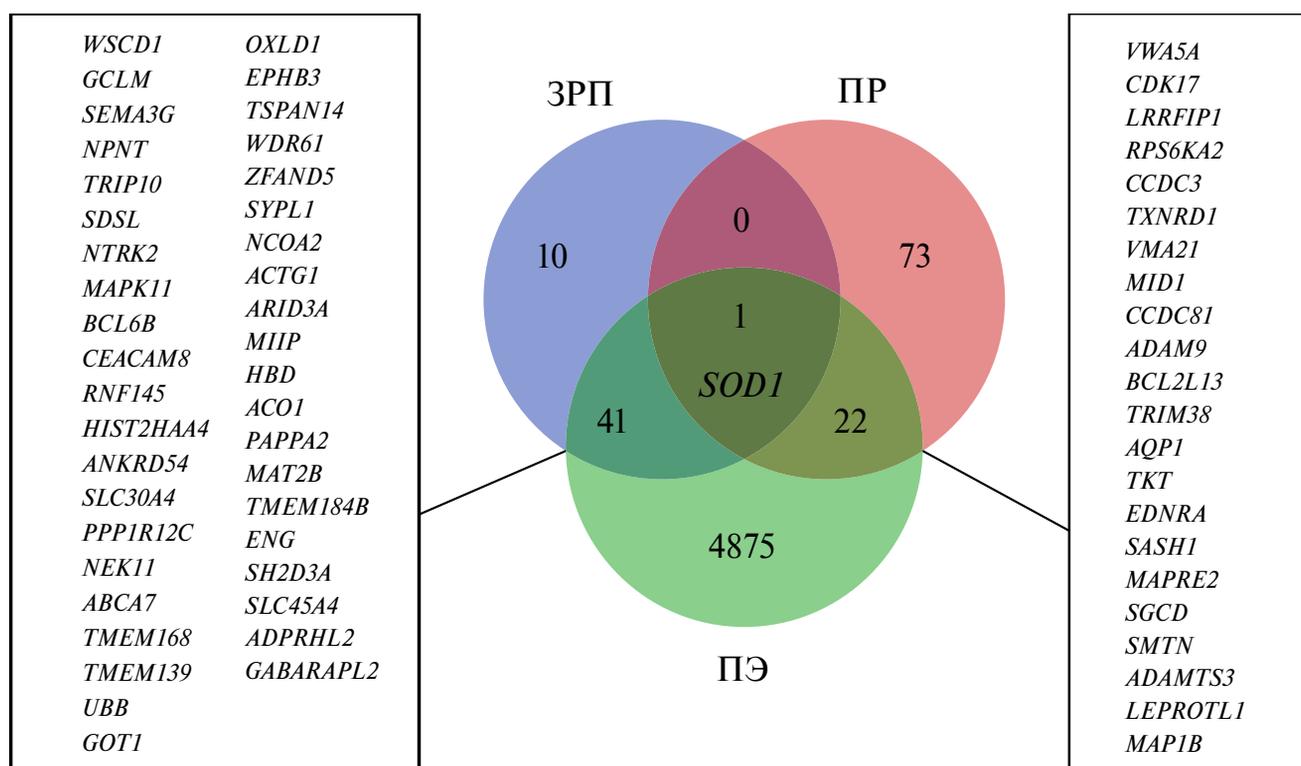


Рис. 3. Диаграмма Венна, демонстрирующая общность и специфичность ДЭГ, выявленных при проведении интегративного анализа. ПЭ – преэклампсия, ЗРП – задержка развития плода, ПР – преждевременные роды.

лась как при развитии ПЭ, так и ЗРП, а 22 гена дифференциально экспрессировались как в группах ПР–контроль, так и ПЭ–контроль (рис. 3).

Таким образом, интегративный анализ результатов дифференциальной экспрессии генов плацентарной ткани у беременных с ПЭ, ПР или ЗРП и женщин с физиологической гестацией выявил 64 общих гена, транскрипционная активность которых статистически значимо изменяется как минимум при двух нозологических формах БАС. Следует отметить, что генная сигнатура 64 общих генов, идентифицированных в настоящей работе, с разной эффективностью дискриминировала образцы, полученные от пациенток с БАС и ФБ в наборах данных, включенных в исследование (дополнительный рис. 1 доступен на странице исследования на GitHub). Это наблюдение может быть связано с высокой межиндивидуальной вариабельностью транскрипционной активности генов, клеточной гетерогенностью исследованных образцов, популяционными особенностями экспрессионного профиля, а также различиями в критериях включения и невключения индивидов в исследование [35].

Функциональная аннотация кластера дифференциально экспрессирующихся генов

Чтобы оценить потенциальную биологическую значимость ассоциаций, выявленных в транскриптомных исследованиях молекулярных механизмов БАС, мы провели функциональную аннотацию и анализ сетевых взаимодействий 64 идентифицированных генов с помощью вычислительного метода “GSEA” (Gene Set Enrichment Analysis) и базы данных “STRING”. В представленной работе при проведении функциональной аннотации Molecular Signatures Database (MSigDB) программного обеспечения “GSEA” учитывали категории, имеющие $FDR < 0.001$ (в данном случае FDR представляет собой вероятность неслучайного попадания группы генов в категорию с поправкой на множественные сравнения). Нами выявлены 33 категории, включающие 50 генов из 64 изученных. Необходимо отметить, что большая часть данных генов одновременно вовлечена в реализацию нескольких генных онтологий и молекулярных процессов (например, локусы генов *EDNRA*, *SOD1*, *SASH1*, *MAP1B*, *GCLM*, *GOT1*, *ADAM9*, *NTRK2*, *AQP1*, *NCOA2* включены минимум в 10 и более из обнаруженных категорий). Наиболее значимые биологические пути, процессы и молекулярные функции, обогащенные данными генами-кандидатами БАС, связаны с регуляцией межклеточных взаимодействий, ответом клетки на кислородсодержащее соединение, регуляцией сигнального каскада митоген-активируемых протеинкиназ (МАР-

киназ, МАРК), внутриклеточной передачей сигнала и метаболизмом гомоцистеина (табл. 2).

Связь с данными категориями, очевидно, свидетельствует о ключевой роли нарушения межклеточных взаимодействий и окислительного стресса в плацентарной ткани в патогенетике БАС. Данное предположение подтверждается результатами ряда недавно опубликованных работ, показывающих высокую значимость межклеточных коммуникаций в развитии гестационных осложнений, в том числе с участием внеклеточных везикул, которые инициируют целый каскад различных биологических эффектов, определяя механизмы онтогенеза гестационного процесса в норме и патологии [36–40].

Окислительный стресс считается одним из важных патогенетических факторов акушерских заболеваний, тем не менее на сегодняшний день существует много споров о механизмах, с помощью которых данный процесс участвует в патогенезе гестационных осложнений. Хорошо известно, что беременность усиливает окислительный стресс, вызванный, в основном, нормальной системной воспалительной реакцией, которая приводит к образованию большого количества циркулирующих активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота, играющих важную роль в качестве вторичных мессенджеров во многих внутриклеточных сигнальных каскадах. Основным источником АФК во время беременности является центральный орган, который регулирует это состояние, т.е. плацента [41]. В норме повышенный уровень окислительного стресса при беременности компенсируется увеличением синтеза антиоксидантов. В случае, когда окислительный стресс превосходит антиоксидантную защиту плаценты, окислительное повреждение может стимулировать избыточный воспалительный ответ, что, в свою очередь, может приводить к развитию БАС [42, 43]. В представленном исследовании для ДЭГ, ассоциированных с категорией “Клеточный ответ на кислородсодержащее соединение”, зафиксировано разнонаправленное изменение экспрессии при БАС: выявлена сверхэкспрессия генов *EDNRA*, *SASH1*, *ADAM9*, *NTRK2*, *AQP1*, *MAP1B*, *LEPROTL1*, *RPS6KA2*. При этом обнаружено снижение транскрипционной активности генов *GOT1*, *NCOA2*, *SOD1*, *GCLM*.

Важно отметить, что среди ДЭГ, общих для рассматриваемых БАС, сверхпредставлены гены, связанные с регуляцией МАРК-каскада. Вероятно, этот факт дополнительно подтверждает первостепенное значение окислительного стресса в генезе акушерских осложнений. Известно, что компоненты каскада МАР-киназ характеризуются наиболее высокой редокс-чувствительностью. Предыдущие исследования показали,

что окислительный стресс активирует передачу сигналов MAPK и увеличивает экспрессию рецепторов апоптоза [44]. Активность p38 MAPK значительно повышена в плаценте пациенток с ПЭ по сравнению с женщинами с ФБ. Предполагается, что АФК могут активировать сигнальный путь p38 MAPK в плацентарной ткани с последующей сверхэкспрессией sFlt-1 и sEng в материнской сыворотке и системной воспалительной реакцией, вызывая эндотелиальную дисфункцию и клинические симптомы ПЭ [45]. Показано, что инактивация сигнального пути Ras—MAPK в клетках трофобласта является одним из основных патогенетических факторов идиопатического ПНБ, за счет ингибирования способности клеток трофобласта к пролиферации и инвазии [46]. Наряду с этим, Zhao и соавт. установили, что длинная некодирующая РНК LINC01088 ингибирует пролиферацию и инвазию трофобласта, способствует апоптозу клеток трофобласта и активации сигнальных путей JNK и p38 MAPK, вызывая, в конечном итоге, дисфункцию клеток трофобласта и развитие ПНБ [47].

Дополнительным свидетельством ключевой роли окислительного стресса в генезе БАС является обогащенность общими ДЭГ такой категории, как “Процессы в ядре, опосредованные NFE2L2”. Известно, что ТФ Nrf2 (nuclear E2-related factor 2), кодируемый геном *NFE2L2*, выступает важнейшим участником антиоксидантной защиты во всех клетках организма человека, контролируя экспрессию генов, продуктами которых являются антиоксидантные и детоксицирующие ферменты. Наиболее изучена роль этого белка в составе редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE, регулирующей процессы всех трех фаз системы детоксикации. Показано, что в нормальных условиях (в отсутствие стресса) содержание Nrf2 в цитоплазме клеток находится под постоянным контролем репрессорного белка Keap1 (Kelch-like ECH associating protein 1), являющегося своеобразным молекулярным сенсором изменения внутриклеточного гомеостаза [48]. В условиях гипоксии и окислительного стресса Nrf2 транспортируется в ядро, где может инициировать экспрессию более 500 генов, содержащих в своих промоторах элемент ARE ответа на антиоксиданты, включая гены гемоксигеназы-1 (HMOX1), глутатион-S-трансферазы (GST), супероксид-дисмутазы (SOD), каталазы (CAT) и др., обеспечивая таким образом адаптацию к стрессу путем положительной регуляции клеточной антиоксидантной защиты и других метаболических процессов [49]. В период формирования плаценты этот антиоксидантный ответ поддерживает клеточный гомеостаз, способствует выживанию клеток трофобласта

и предотвращает аномальный ангиогенез в плацентарной ткани, обуславливая физиологическое течение беременности [41, 50]. В свою очередь, нарушение регуляции функционирования антиоксидантной системы, опосредованной Nrf2, связано с различными акушерскими осложнениями, включая гестационный сахарный диабет, ЗРП, ПЭ и ПР [49–51]. Недавнее исследование, проведенное Hong и соавт. с использованием культур стволовых клеток трофобласта человека, выявило первостепенное значение ТФ NRF2 в контроле экспрессии клетками синцитиотрофобласта ряда ключевых иммуномодуляторов: опосредованное гипоксией снижение уровня NRF2 приводило в эксперименте к ингибированию дифференцировки клеток трофобласта и процесса синцитиализации, а также к репрессии генов, кодирующих белки контрольных точек иммунного ответа (immune checkpoint), которые определяют иммунологическую толерантность в плацентарной ткани на границе мать—плод [52]. Кроме того, обнаружено, что активация сигнального пути Nrf2/GPX4 приводит к ингибированию ферроптоза трофобластов, являющегося недавно открытым важным звеном патогенеза ПЭ [50]. В настоящей работе обнаружено снижение экспрессии всех генов, ассоциированных с сигнальным путем, опосредованным продуктом гена *NFE2L2* (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2). Так, транскрипционная активность генов *GCLM* и *UBB* снижена при ПЭ и ЗРП, а генов *TXNRD1* и *TKT* — при ПР и ПЭ.

Интересно также то, что ряд изученных генов входит в категорию “TGTATGA_MIR4853P”, включающую гены-мишени микроРНК has-miR-485-3p человека. Содержание has-miR-485-3p было снижено в первом триместре беременности в плазме крови пациенток, у которых позже выявили высокий риск ПР [53].

Анализ сетевых взаимодействий дифференциально экспрессирующихся генов

Полученная с помощью базы данных “STRING” сеть белок—белковых взаимодействий подтверждает взаимосвязи между генами, выявленные при исследовании биологических путей и процессов (рис. 4). Анализ данной сети, включающей 35 белков, кодируемых изучаемыми генами, указывает на немаловажное место в общих молекулярных механизмах БАС коэкспрессии ряда генов (приведены гены, доверительный уровень взаимодействий которых по типу коэкспрессии (coexpression score) составляет более 0.1) *GOT1*, *SOD1*, *MAP1B*, *GCLM*, *TKT*, *AQP1*, *ENG*, *MAPK11*, *TXNRD1*, *UBB*, *NTRK2*, *SMTN* и *RPS6KA2*. Центральное место в данной сети с наибольшим

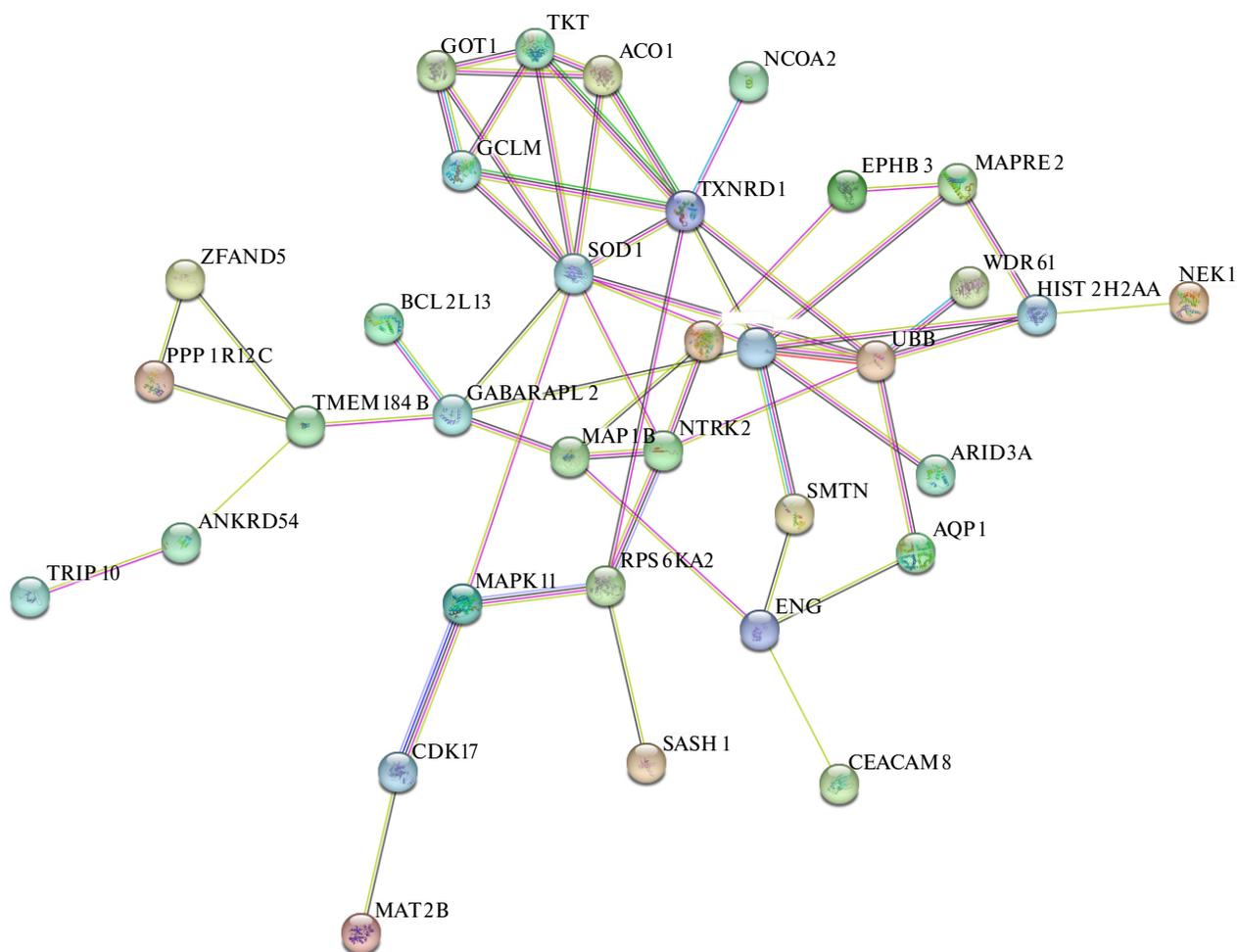


Рис. 4. Белок-белковые взаимодействия продуктов генов, ассоциированных с БАС, по данным анализа транскриптома.

числом взаимодействий занимают гены *SOD1*, *ACTG1*, *TXNRD1* и *UBB*, кодирующие соответственно супероксид-дисмутазу типа 1, цитоплазматический γ -актин (основной компонент цитоскелета и медиатор подвижности клеток), цитозольную форму тиоредоксинредуктазы (содержащий селеноцистеин флавофермент, восстанавливающий тиоредоксины и играющий ключевую роль в окислительно-восстановительном гомеостазе) и убиквитин, принимающий участие в активации или ингибировании активности белков, их транспорте, процессинге, а также деградации. Продукты некоторых из этих генов, согласно известным на сегодняшний день данным об их функциональных особенностях, вполне могут быть вовлечены в молекулярные механизмы исследуемых патологических состояний.

Топология сети проанализирована также с использованием модуля *cytoHubba* программного обеспечения *Cytoscape*. Для каждого узла сети посчитана степень, учитывающая ко-

личество взаимодействий с соседними узлами, длину связи, а также тенденцию к образованию кластеров генов (рис. 5). В результате были идентифицированы шесть генов с наиболее высокими значениями данного показателя (ранг <5): *SOD1*, *TKT*, *TXNRD1*, *GCLM*, *GOT1*, *ACO1*. Основными, центральными генами рассматриваемой сети являются *SOD1* и *TKT* (ранг = 1), вовлеченные в сигнальные пути, связанные с окислительным стрессом (ген *SOD1*) и пентозофосфатным циклом (ген *TKT*).

В последние десятилетия плацентарная активность различных эндогенных антиоксидантов, включая *SOD1*, активно изучается как при физиологической, так и при патологической беременности. Известно, что в плацентарной ткани окислительный стресс участвует в запуске механизмов дифференцировки клеток, повреждении трофобласта и прогрессирующей дегенерации ворсинок при формировании плодных оболочек. Тем не менее при невозможности регуляции продукции свободных ради-

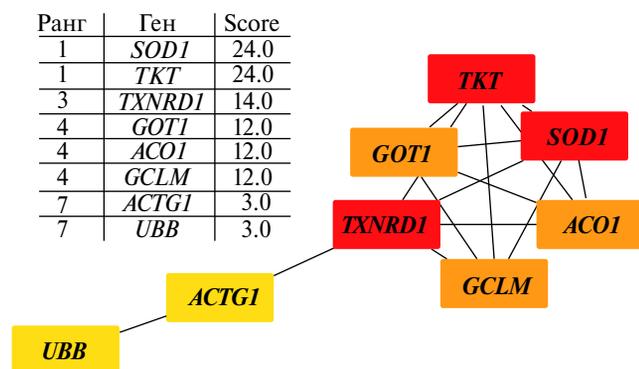


Рис. 5. Анализ топологии генной сети с использованием плагина cytoHubba. Красным цветом выделены центральные гены сети с максимальным коэффициентом связи (ранг).

калов антиоксидантной системой в плацентарной ткани резко повышается уровень маркеров окислительного стресса, что может приводить к повреждению ворсинчатого дерева и патологическому течению беременности, в частности, ПЭ, плацентарной недостаточности, неразвивающейся беременности. Предыдущие исследования показали, что активность и экспрессия *SOD1* в плаценте повышались в норме при сроке беременности от 8 до 20 недель [34]. Наряду с этим, в большинстве сообщений, связывающих уровень *SOD1* с осложненным течением гестации, отмечается снижение активности данного фермента или экспрессии его гена в образцах венозной крови и биоптатах плацентарной ткани, полученных от пациенток с плацентарной дисфункцией или гипертензивными расстройствами во время беременности [54–56]. Гипоэкспрессия гена *SOD1* в плацентарной ткани и крови обнаружена и при развитии ПЭ по сравнению с ФБ, а также и при ПР [34, 57, 58]. Вовлеченность супероксид-дисмутазы 1 в молекулярные механизмы ПЭ показана не только в плацентарной ткани, но и на уровне гломерулярного барьера почек: в условиях гипоксии сниженная экспрессия *SOD1* и повышенный уровень окислительного стресса были ключевыми индукторами потери белка висцеральными эпителиальными клетками клубочка (подоцитами), обуславливая один из основных симптомов ПЭ — протеинурию [59]. Снижение транскрипционной активности гена *SOD1*, приводящее к возникновению окислительного стресса, наблюдалось также у пациенток с ПНБ, инфицированных *Chlamydia trachomatis* [60]. Примечательно, что сверхэкспрессия гена *SOD1* в кумулюсных клетках играет важную роль в патогенезе бесплодия, ассоциированного с эндометриозом [61]. В нашей работе гипоэкспрессия гена *SOD1* зафиксирована при всех трех изучаемых БАС по сравнению с группой контроля, представленной женщинами с ФБ, что указыва-

ет на особую значимость окислительного стресса как общего патогенетического звена БАС.

Центральным геном рассматриваемой сети является также ген *TKT*, кодирующий транскетолазу. Опубликованы единичные данные о вариабельности экспрессии этого гена при физиологической и патологической беременности. Так, метаанализ результатов изучения транскриптома плаценты выявил снижение уровня экспрессии гена *TKT* при тяжелой ПЭ [62]. Аналогичные данные получены и при проведении интегративного анализа экспрессионных данных, полученных с помощью микрочипов [63, 64]. Связь этого локуса с патологическим течением беременности зафиксирована также и на уровне генома: полногеномный анализ ассоциаций, проведенный на финской когорте новорожденных, выявил ассоциацию маркера rs4687715 (eQTL гена *TKT*) с таким фенотипом, как гестационный возраст более 42 недель [65]. Известно, что ген *TKT* кодирует белок, участвующий в основных метаболических путях углеводов, связывая пентозофосфатный путь с гликолизом. Этот процесс приводит к снижению синтеза NADPH, вовлеченного в регуляцию генерации АФК, отвечающих за формирование состояния окислительного стресса. Недостаточная экспрессия гена *TKT* у мышей способствует развитию беременности с меньшим количеством потомства, задержкой постнатального роста и сниженным содержанием жировой ткани у потомства [65]. Показано также, что дисрегуляция активности транскетолазы играет важную роль в нарушении скорости роста клеток, прогрессии клеточного цикла и созревании ооцитов [62].

В контексте обсуждаемой ведущей роли окислительного стресса в патогенезе БАС интересной представляется обнаруженная нами при ПР и ПЭ гипоэкспрессия гена *TXNRD1*, кодирующего тиоредоксинредуктазу, NADPH-зависимый селенофлавопротеин, являющийся маркером ферроптоза. Тиоредоксинредуктаза участвует в регуляции целого ряда важных для жизнедеятельности клеток процессов, включая транскрипцию генов, репарацию ДНК, клеточную пролиферацию и апоптоз. Недавно выявили связь повышенной экспрессии гена *TXNRD1* во внеклеточных везикулах, продуцируемых синцитиотрофобластом, с развитием ПЭ [66].

Поиск мастер-регуляторов

Чтобы идентифицировать главные мастер-регуляторы, потенциально управляющие изменениями экспрессии генов, влияющих на патофизиологические особенности и молекулярные пути развития рассматриваемых БАС, на первом этапе мы провели *in silico* крупно-

масштабный анализ мотивов ДНК, обогащенных в промоторах ДЭГ, общих у ПЭ, ЗРП и ПР. В кластере ДЭГ, ассоциированных (по данным интегративного анализа) с БАС, выявлены 217 потенциальных сайтов связывания ТФ на промоторах ДЭГ, ассоциированных со 101 ТФ (полный список идентифицированных ТФ доступен по запросу у авторов). В дальнейшем анализе рассматривали сайты связывания ТФ с показателем “Yes density per 1000bp” > 1 и максимальным отношением Yes/No (“Yes–No ratio”), а также с уровнем значимости менее 0.01. Затем полученный кластер ТФ и исходный массив ДЭГ анализировали с помощью инструментария базы данных “Cistrome Data Browser” (<http://dbtoolkit.cistrome.org>), которая содержит информацию о цис-регуляторных механизмах у человека и мыши, полученных из экспериментальных результатов профилирования доступности хроматина ChIP-seq, DNase-seq и ATAC-seq [67]. В дальнейший анализ вошли ТФ, сайты связывания которых обнаружены с помощью вышеперечисленных экспериментальных подходов в промоторных регионах изучаемого массива ДЭГ (в анализ включали только ТФ, имеющие RP_score (коэффициент регуляторного потенциала) больший или равный 1).

Для идентификации ключевых регуляторных молекул мастер-регуляторов использовали “восходящий анализ” (upstream analysis), реализованный в программном обеспечении geneXplain platform (<http://platform.genexplain.com>). Поиск проводили по графам базы данных TRANSPATH® с максимальным радиусом в 10 шагов выше входного набора ТФ. Контроль частоты ошибок этого алгоритма был осуществлен путем применения его 10000 раз к случайно сгенерированным наборам входных ТФ одинакового размера. Затем для каждого потенциального узла главного регулятора рассчитывали значения рангов Z-score и false discovery rate (FDR) на основе результатов данной пермутационной процедуры (см. подробное описание в [32]).

Для анализируемого кластера ДЭГ в данной работе обнаружена 71 мастер-регуляторная молекула (полный список мастер-регуляторов доступен в дополнительной табл. 4 на странице исследования на GitHub). Из этого кластера отобрали наиболее значимые мастер-регуляторы, имеющие показатель “Ranks sum” менее 30 (*MAPK3*, *MID1*, *LCMT1*, *DUSP10*). Кроме того, в дальнейшем более детальное рассмотрение вошли гены ТФ и мастер-регуляторы, экспрессия которых, согласно проведенному в настоящей работе интегративному анализу, статистически значимо изменилась при БАС – это *TOPORS*, *SOX10*, *EGFR*, *TFAP2A*, *GLIS1*, *NR2F1*, *NR2F2*, *PAX5*, *HSF1*, *BCL6* (табл. 5 на странице исследования на GitHub).

Согласно результатам анализа обогащения в онлайн-ресурсе “WebGestalt” с использованием базы данных PANTHER, эти гены ассоциированы с: сигнальным путем интерферона- γ ; сигнальным путем инсулиноподобного фактора роста (IGF), сопряженным с MAPK-каскадом; путем p38 MAPK-каскада; стимулируемой ангиотензином II передачей сигналов через G-белки и бета-аррестин; реакцией на окислительный стресс; сигнальным путем Toll-рецептора; сигнальным путем рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); активацией В-клеток; сигнальным путем фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (рис. 6). Наиболее высокий коэффициент обогащения получен в данном случае для категорий, связанных с интерфероном- γ и MAP-киназами.

Известно, что сигнальные пути, включающие MAP-киназы, регулируют такие клеточные процессы, как пролиферация, дифференцировка, апоптоз, ответ на стресс и выживание клеток. Активность MAP-киназы p38 изменяется в условиях теплового и осмотического шока, взаимодействия клетки с провоспалительными цитокинами и факторами роста. Киназы p38 участвуют в регуляции клеточного цикла, дифференцировки клеток, апоптоза, аутофагии, супрессии опухолей и гипертрофии кардиомиоцитов [68]. Патологическая активация опосредованного p38 MAPK сигнального пути рассматривается как ключевая причина неблагоприятных исходов беременности, связанных с окислительным стрессом, воспалением и преждевременным старением тканей плода [45, 69].

Интерферон- γ , ключевая молекула клеточного иммунного ответа, является одним из важнейших факторов ФБ. Интерферон- γ опосредует развитие и выживание плацентарного цитотрофобласта, контролируя скорость апоптоза его клеток. Показано, что повышенная экспрессия интерферона- γ подавляет пролиферацию и миграцию мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека, усиливает их способность индуцировать образование кластера CD4+CXCR5+Foxp3+ регуляторных Т-клеток и нарушает инвазию трофобласта человека через сигнальный путь SOCS1/JAK/STAT1 [70, 71]. В целом, высокий уровень интерферона- γ связан с нарушением развития и функционирования плаценты, патологическим ангиогенезом, а также с прогрессированием таких гестационных осложнений, как ПЭ, ЗРП, ПНБ и предлежание плаценты [72, 73].

Анализ клеточного обогащения кластера генов, ассоциированного с БАС

Интегративный анализ транскриптомных данных, проведенный в настоящей работе в об-

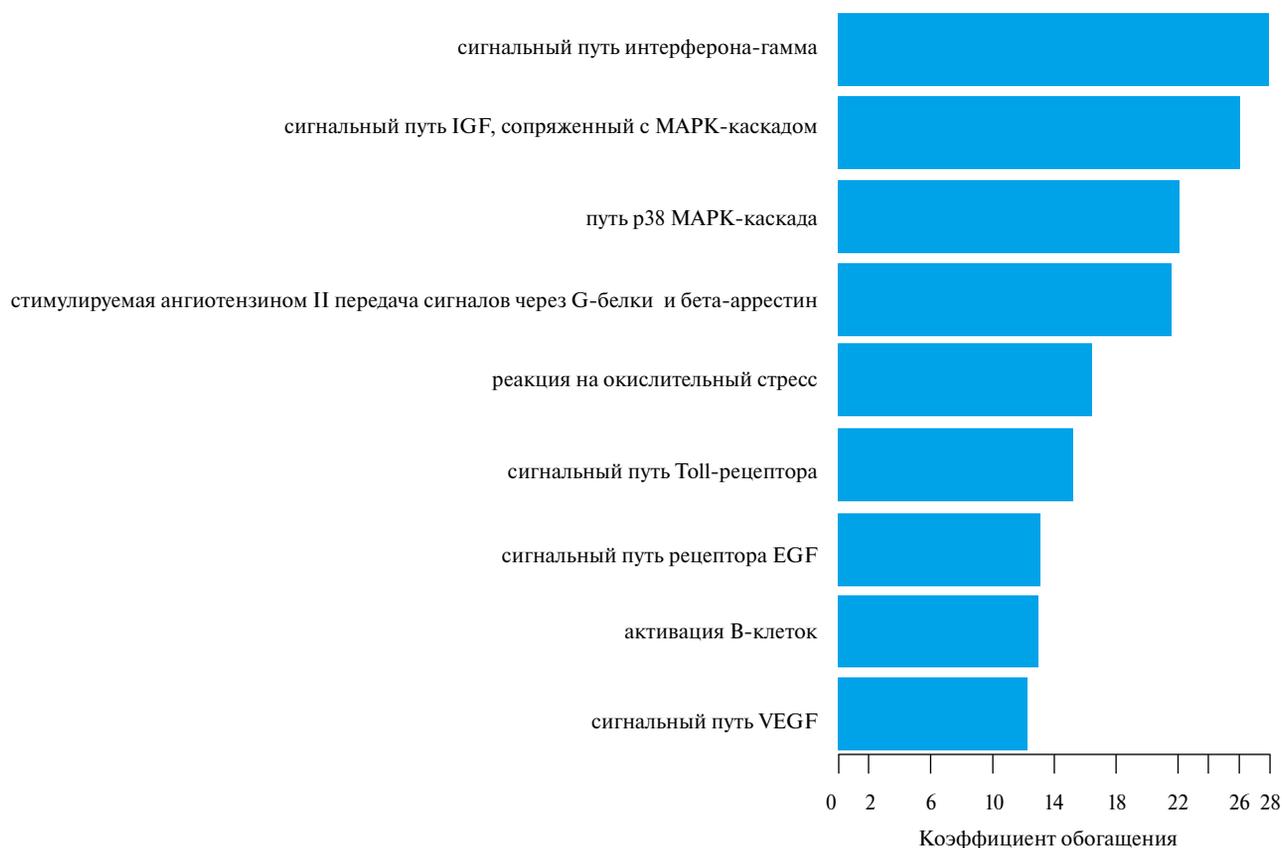


Рис. 6. Основные сигнальные пути, ассоциированные с мастер-регуляторами.

ширных когортах пациентов, предоставил беспрецедентные возможности изучения молекулярных аспектов акушерских заболеваний, но ресурсы фундаментального понимания патогенеза заболеваний в данном случае частично ограничены отсутствием информации, специфичной для определенных типов клеток. Генерация транскриптомных данных для отдельных клеток в когортных исследованиях зачастую оказывается неосуществимой из-за высокой стоимости, ограничений по срокам и логистики сбора плацентарных образцов. Однако с использованием инструментов клеточной деконволюции можно выявить клеточный состав изучаемого образца ткани и решить проблему сложности интерпретации результатов. Нами проведен анализ клеточного обогащения кластера ДЭГ, ассоциированного с БАС, с помощью веб-инструмента “PlacentaCellEnrich” [74], который позволяет пользователю определить, обогащен ли исследуемый массив ДЭГ паттернами экспрессии, специфичными для плацентарных клеток.

Гены, специфичные для определенного типа клеток, идентифицированы на основе полученных ранее данных секвенирования единичных клеток плаценты человека [75, 76]. Анализ, бази-

рующийся на результатах гипергеометрического теста, проведенный с использованием данных, полученных ранее Vento-Tormo R. и соавт. [75], позволил выделить из 32 клеточных популяций, идентифицированных в плацентарной ткани (рис. 7), материнские эндотелиальные клетки, клетки Хофбауэра, децидуальные периваскулярные клетки, фибробласты плода, синцитиотрофобласт и эпителиальные железистые клетки в качестве наиболее значимых типов клеток, обогащенных генами, ассоциированными с БАС (рис. 8a).

Примечательно, что наиболее специфичные паттерны экспрессии (максимальное значение Fold change) выявлены в кластере материнских эндотелиальных клеток. Ключевая роль этой популяции клеток в формировании фенотипа БАС, наряду с клетками синцитиотрофобласта, обнаружена и при анализе массива данных, полученных Suryawanshi и соавт. (рис. 8b) [76]. К настоящему времени накоплен большой фактический материал о роли дисфункции эндотелиальных клеток в патогенезе ПЭ, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты, ПР и других гестационных осложнений [4], характеризующихся изменением уровня продукции эндотелиальных факторов в фетоплацентарном

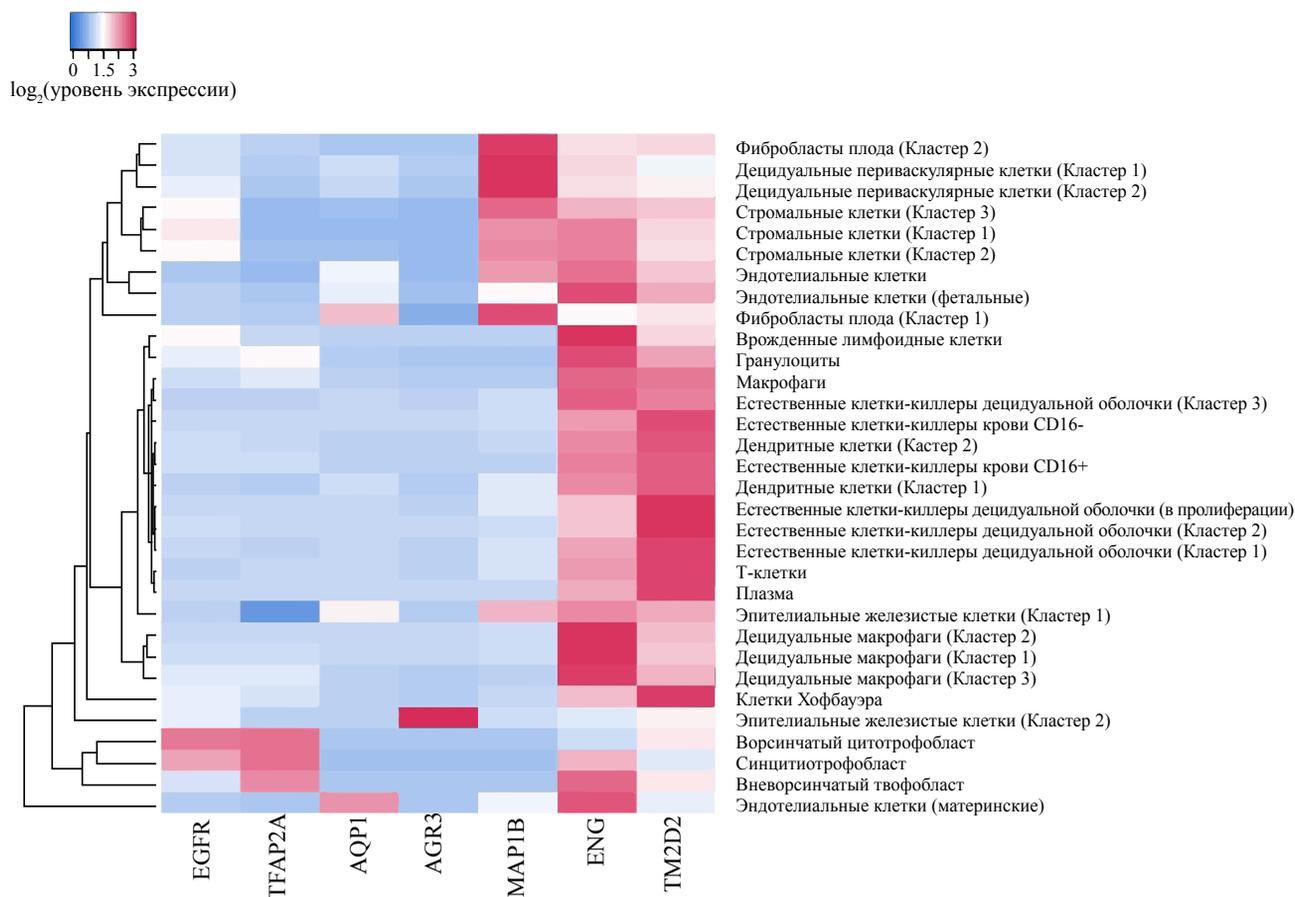


Рис. 7. Теплокарта, отражающая вариабельность уровня экспрессии ряда генов, ассоциированных с БАС, в клеточных популяциях, идентифицированных в плаценте при анализе данных, полученных ранее Vento-Tormo R. и соавт. [75].

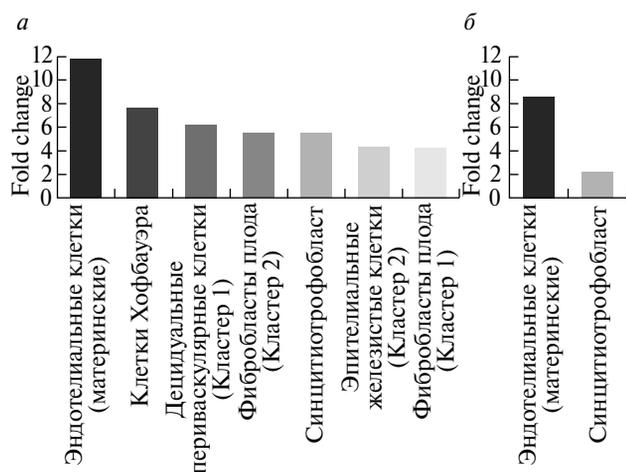


Рис. 8. Основные клеточные популяции, обогащенные генами, ассоциированными с БАС. Специфичность генов для определенного типа клеток идентифицирована на основе проведенного ранее секвенирования единичных клеток. *a* – Vento-Tormo R. и соавт. [75]; *b* – Sutyawanshi и соавт. [76]. Показатель Fold change отражает изменение кратности обогащения клеток специфичными транскриптами относительно фонового набора генов (подробнее см. [74]).

комплексе по сравнению с ФБ. Показано, что при нормальном течении беременности потребности плода/плаценты и сердечно-сосудистой системы матери сбалансированы. Тогда как при ПЭ повышен уровень растворимого фактора роста эндотелия сосудов (sFlt-1) и снижен уровень плацентарного фактора роста (PlGF), что приводит к выраженному ангиогенному дисбалансу, гипоксии и стрессу синцитиотрофобласта. Предполагается, что эндотелиальная дисфункция в данном случае может быть предрасполагающим фактором или особенностью патогенеза ПЭ [77]. При этом первичным патологическим звеном может быть чрезмерный или атипичный иммунный ответ матери, способный нарушить процесс плацентации, привести к хроническому окислительному стрессу в плацентарной ткани и, в конечном итоге, к дисфункции материнских эндотелиальных клеток. Известно, что повреждение эндотелиальных клеток снижает синтез вазорелаксирующих агентов, увеличивает выработку вазоконстрикторов, ухудшает синтез эндогенных антикоагулянтов и увеличивает продукцию прокоагулянтов, что способствует прогрессированию симптомов БАС [78].

В основе выполнения эндотелиальными клетками высокоспециализированных функций при изменении физиологических условий в различных сосудистых руслах лежит их молекулярная гетерогенность [79]. Спиральные артерии в дистальной части плаценты претерпевают значительное ремоделирование в соответствии с постоянно растущими потребностями плода (этот процесс в различной степени нарушается в зависимости от клинической формы БАС). Молекулярные механизмы, в рамках которых материнские эндотелиальные клетки взаимодействуют с иммунными клетками, синцитиотрофобластом и гормонами на разных этапах беременности, способствуя ремоделированию спиральных артерий, остаются в значительной степени неизвестными, ограничивая разработку подходов прецизионной медицины в отношении БАС [79, 80].

Деконволюция транскриптомных профилей на тканевом уровне важна для учета эффектов, вносимых клеточной гетерогенностью сравниваемых образцов в картину дифференциальной экспрессии генов, и может рассматриваться как достаточно эффективный биоинформатический подход к оценке распределения типов клеток, составляющих ткань. Однако этот метод имеет и некоторые ограничения. Деконволюция транскриптомных данных основана на независимом наборе профилей экспрессии генов в разных типах клеток, входящих в состав исследуемой ткани или органа. Хотя размеры выборки клеток плаценты, описанных к настоящему времени с помощью секвенирования единичных клеток (scRNA-seq), превышают 40000 клеток, эти наборы по-прежнему представляют собой ограниченный объем биологической вариативности по сравнению с исследованиями популяционного масштаба [81]. Секвенирование генома тысяч клеток, взятых у многих индивидов, позволило бы лучше охарактеризовать межиндивидуальную изменчивость, чем секвенирование большого количества клеток, взятых у нескольких человек. На сегодняшний день эта проблема перинатальной молекулярной эпидемиологии может быть решена созданием обширного по клеточному составу, общедоступного и надежного эталона для деконволюции экспрессии генов в плацентарной ткани как при патологической, так и при физиологической беременности в различные триместры гестации [79, 81], а также путем разработки экспериментальных подходов и вычислительных алгоритмов для мультиплексного scRNA-seq [82].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БАС остаются основной клинической и терапевтической проблемой современной репродуктивной медицины. Существующие профилак-

тические и терапевтические стратегии, основанные на знаниях патофизиологии БАС, оказались лишь частично эффективными из-за серьезных пробелов в текущих представлениях о механизмах и факторах риска этих заболеваний. Интегративный анализ транскриптомных данных, анализ сетей белок-белковых взаимодействий продуктов генов, дифференциально экспрессирующихся в плацентарной ткани при патологической и физиологической беременности, позволил охарактеризовать перспективные генетические маркеры подверженности БАС и улучшить понимание патофизиологии заболеваний этой группы, а также обозначить наиболее важные общие гены и молекулярные механизмы ПЭ, ПР и ЗРП, связанные с патологическими процессами, протекающими в плацентарной ткани. Анализ общности дифференциальной экспрессии плацентарных генов при данных осложнениях беременности выявил только один ген – *SOD1*, кодирующий супероксид-дисмутазу 1 – один из основных антиоксидантных ферментов, ассоциированный со всеми тремя заболеваниями из группы БАС. Примечательно, что результаты функциональной аннотации общего кластера из 64 генов с нарушенной экспрессией в плаценте как минимум при двух нозологических формах БАС, свидетельствуют о ключевой роли окислительного стресса, нарушений межклеточных коммуникаций, а также ферроптоза в патогенетике рассматриваемых гестационных осложнений.

Использование современных биоинформатических подходов позволило нам идентифицировать более 70 молекул мастер-регуляторов, ответственных за развитие патологического процесса в плацентарной ткани при БАС, которые можно рассматривать как потенциальные терапевтические мишени или диагностические биомаркеры. В качестве ключевых регуляторов, имеющих максимальные значения коэффициента приоритизации и запускающих каскад реакций с вовлечением обнаруженных ДЭГ, можно выделить продукты генов *MAPK3*, *MID1*, *LCMT1*, *DUSP10*, *TOPORS*, *SOX10*, *EGFR*, *TFAP2A*, *GLIS1*, *NR2F1*, *NR2F2*, *PAX5*, *HSF1*, *BCL6*, сверхпредставленные в сигнальном пути MAP-киназ и процессах, опосредованных интерфероном- γ . Необходимо подчеркнуть, что данные, касающиеся потенциальных диагностических и терапевтических мишеней БАС, должны быть дополнительно подтверждены обширными исследованиями *in vivo*, позволяющими объективно оценить возможность трансляции этих результатов в клиническое применение.

Анализ сети белок-белковых взаимодействий продуктов общих ДЭГ позволил выделить центральные гены – *SOD1*, *ACTG1*, *TXNRD1*, *TKT*, *GCLM*, *GOT1*, *ACO1* и *UBB*, обладающие максимальным коэффициентом, отражающим

количество и уровень сетевых взаимодействий, роль которых в развитии патологического течения беременности, как и роль мастер-регуляторов, недостаточно изучена. Дальнейшие исследования должны быть направлены на уточнение функционального и диагностического значения этих генов и их продуктов при БАС.

Несомненную ценность при изучении патогенетики осложненного течения беременности имеет детальный анализ процессов, происходящих на клеточном уровне, позволяющий выявлять специфичные для клеток пути и типы клеточных взаимодействий. Анализ, проведенный в представленной работе с помощью веб-инструмента “PlacentaCellEnrich”, позволил выделить в качестве наиболее значимых типов клеток, обогащенных генами, ассоциированными с БАС, материнские эндотелиальные клетки, клетки Хофбауэра, децидуальные периваскулярные клетки, фибробласты плода, синцитиотрофобласт и эпителиальные железистые клетки.

В заключение хотелось бы отметить, что, учитывая генетическую гетерогенность и сложность патогенетических путей БАС, целесообразно дальнейшее мультимиксное исследование их генетической архитектуры на уровне единичных клеток с целью выявления потенциальных терапевтических мишеней и разработки методов ранней диагностики, а также более глубокого понимания молекулярных основ развития гестационных осложнений.

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г., ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики и одобрены Комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Томский национальный исследовательский медицинский центр” (протокол № 4 от 25.11.2019). От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Di Renzo G.C. (2009) The great obstetrical syndromes. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **22**(8), 633–635.

2. Romero R. (2009) Prenatal medicine: the child is the father of the man. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **22**(8), 636–639.
3. Hoffman M.K. (2023) The great obstetrical syndromes and the placenta. *Internat. J. Obstet. Gynecol.* **130**(Suppl. 3), 8–15.
4. Brosens I., Puttemans P., Benagiano G. (2019) Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **221**(5), 437–456.
5. Wikström A.K., Stephansson O., Cnattingius S. (2011) Previous preeclampsia and risks of adverse outcomes in subsequent nonpreeclamptic pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **204**(2), 148.e1–148.e6.
6. Kvalvik L.G., Wilcox A.J., Skjærven R., Ostbye T., Harmon Q.E. (2020) Term complications and subsequent risk of preterm birth: registry based study. *BMJ.* **369**, m1007.
7. Rasmussen S., Ebbing C., Irgens L.M. (2017) Predicting preeclampsia from a history of preterm birth. *PLoS One.* **12**(7), e0181016.
8. Jayaram A., Collier C.H., Martin J.N. (2020) Preterm parturition and pre-eclampsia: The confluence of two great gestational syndromes. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **150**(1), 10–16.
9. Трифонова Е.А., Габидулина Т.В., Ершов Н.И., Сереброва В.Н., Ворожищева А.Ю., Степанов В.А. (2014) Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией. *Acta Naturae.* **6**(2), 71–83.
10. Бабовская А.А., Трифонова Е.А., Зарубин А.А., Марков А.В., Степанов В.А. (2020) Анализ ко-экспрессии генов плацентарного транскриптома как основа для поиска ключевых сигнальных путей и биомаркеров преэклампсии. *Мед. генетика.* **19**(11), 71–72.
11. Meng T., Chen H., Sun M., Wang H., Zhao G., Wang X. (2012) Identification of differential gene expression profiles in placentas from preeclamptic pregnancies versus normal pregnancies by DNA microarrays. *OMICS.* **16**(6), 301–311.
12. Guo L., Tsai S.Q., Hardison N.E., James A.H., Motsinger-Reif A.A., Thames B., Stone E.A., Deng C., Piedrahita J.A. (2013) Differentially expressed microRNAs and affected biological pathways revealed by modulated modularity clustering (MMC) analysis of human preeclamptic and IUGR placentas. *Placenta.* **34**(7), 599–605.
13. Blair J.D., Yuen R.K., Lim B.K., McFadden D.E. (2013) Widespread DNA hypomethylation at gene enhancer regions in placentas associated with early-onset preeclampsia. *Mol. Hum. Reprod.* **19**(10), 697–708.
14. Yong H.E., Melton P.E., Johnson M.P., Freed K.A., Kalionis B., Murthi P., Brennecke S.P., Keogh R.J., Moses E.K. (2015) Genome-wide transcriptome directed pathway analysis of maternal preeclampsia susceptibility genes. *PLoS One.* **10**(5), e0128230.
15. Herse F., Dechend R., Harsem N.K., Wallukat G., Janke J., Qadri F., Hering L., Muller D.N., Luft F.C.,

- Staff A.C. (2007) Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia. *Hypertension*. **49**(3), 604–611.
16. Martin E., Ray P.D., Smeester L., Grace M.R., Boggess K., Fry R.C. (2015) Epigenetics and preeclampsia: defining functional epimutations in the preeclamptic placenta related to the TGF- β pathway. *PLoS One*. **10**(10), e0141294.
 17. Garrido-Gomez T., Dominguez F., Quiñonero A., Diaz-Gimeno P., Kapidzic M., Gormley M., Ona K., Padilla-Iserte P., McMaster M., Genbacev O., Perales A., Fisher S.J., Simón C. (2017) Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**(40), E8468–E8477.
 18. Nishizawa H., Ota S., Suzuki M., Kato T., Sekiya T., Kurahashi H., Udagawa Y. (2011) Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **9**, 107.
 19. Bukowski R., Sadovsky Y., Goodarzi H., Zhang H., Biggio J.R., Varner M., Parry S., Xiao F., Esplin S.M., Andrews W., Saade G.R., Ileki J.V., Reddy U.M., Baldwin D.A. (2017) Onset of human preterm and term birth is related to unique inflammatory transcriptome profiles at the maternal fetal interface. *PeerJ*. **5**, e3685.
 20. Davis S., Meltzer P.S. (2007) GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics*. **23**(14), 1846–1847.
 21. Turnbull A.K., Kitchen R.R., Larionov A.A., Renshaw L., Dixon J.M., Sims A.H. (2012) Direct integration of intensity-level data from Affymetrix and Illumina microarrays improves statistical power for robust reanalysis. *BMC Med. Genomics*. **5**, 35.
 22. Durinck S., Spellman P.T., Birney E., Huber W. (2009) Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.* **4**(8), 1184–1191.
 23. Zhang B., Horvath S. (2005) A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **4**, 17.
 24. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. **26**(1), 139–140.
 25. Foroutan M., Bhuvu D.D., Lyu R., Horan K., Cursons J., Davis M.J. (2018) Single sample scoring of molecular phenotypes. *BMC Bioinformatics*. **19**, 404.
 26. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**(43), 15545–15550.
 27. Wang J., Vasaikar S., Shi Z., Greer M., Zhang B. (2017) WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucl. Acids Res.* **45**(W1), W130–W137.
 28. Szklarczyk D., Gable A.L., Nastou K.C., Lyon D., Kirsch R., Pyysalo S., Doncheva N.T., Legeay M., Fang T., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. (2021) The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucl. Acids Res.* **49**(D1), D605–D612.
 29. Chin C.H., Chen S.H., Wu H.H., Ho C.W., Ko M.T., Lin C.Y. (2014) cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biol.* **8**(Suppl 4), S11.
 30. Koschmann J., Bhar A., Stegmaier P., Kel A.E., Wingender E. (2015) Upstream analysis: an integrated promoter pathway analysis approach to causal interpretation of microarray data. *Microarrays*. **4**(2), 270–286.
 31. Kel A., Boyarskikh U., Stegmaier P., Leskov L.S., Sokolov A.V., Yevshin I., Mandrik N., Stelmashenko D., Koschmann J., Kel-Margoulis O., Krull M., Martínez-Cardús A., Moran S., Esteller M., Kolpakov F., Filipenko M., Wingender E. (2019) Walking pathways with positive feedback loops reveal DNA methylation biomarkers of colorectal cancer. *BMC Bioinformatics*. **20**(Suppl. 4), 119.
 32. Kel A. (2016) Data on master regulators and transcription factor binding sites found by upstream analysis of multiomics data on methotrexate resistance of colon cancer. *Data Brief*. **10**, 499–504.
 33. Leek J.T., Johnson W.E., Parker H.S., Jaffe A.E., Storey J.D. (2012) The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. **28**(6), 882–883.
 34. Roland L., Beauchemin D., Acteau G., Fradette C., St-Pierre I., Bilodeau J.F. (2010) Effects of labor on placental expression of superoxide dismutases in preeclampsia. *Placenta*. **31**(5), 392–400.
 35. Li H., Peng H., Hong W., Wei Y., Tian H., Huang X., Jia L., Zheng J., Duan T., He Q., Wang K. (2023) Human placental endothelial cell and trophoblast heterogeneity and differentiation revealed by single-cell RNA sequencing. *Cells*. **12**, 87.
 36. Matsubara K., Matsubara Y., Uchikura Y., Sugiyama T. (2021) Pathophysiology of preeclampsia: the role of exosomes. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(5), 2572.
 37. Martin C., Bergamelli M., Malnou C.E., D'Angelo G. (2022) Placental extracellular vesicles in maternal-fetal communication during pregnancy. *Biochem. Soc. Transactions*. **50**(6), 1785–1795.
 38. Buca D., Bologna G., D'Amico A., Cugini S., Musca F., Febbo M., D'Arcangelo D., Simeone P., Liberati M., Vitacolonna E., Miscia S., D'Antonio F., Lanuti P. (2020) Extracellular vesicles in fetomaternal crosstalk and pregnancy disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(6), 2120.
 39. Vento-Tormo R., Efremova M., Botting R.A., Turco M.Y., Vento-Tormo M., Meyer K.B., Park J.E., Stephenson E., Polański K., Goncalves A., Gardner L., Holmqvist S., Henriksson J., Zou A., Sharkey A.M., Millar B., Innes B., Wood L., Wilbrey-Clark A., Payne R.P., Ivarsson M.A., Lisgo S., Filby A., Rowitch D.H., Bul-

- mer J.N., Wright G.J., Stubbington M.J.T., Haniffa M., Moffett A., Teichmann S.A. (2018) Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans. *Nature*. **563**(7731), 347–353.
40. Garcia-Flores V., Romero R., Tarca A.L., Peyvandipour A., Xu Y., Galaz J., Miller D., Chaiworapongsa T., Chaemsaihong P., Berry S.M., Awonuga A.O., Bryant D.R., Pique-Regi R., Gomez-Lopez N. (2024) Deciphering maternal-fetal cross-talk in the human placenta during parturition using single-cell RNA sequencing. *Sci. Transl. Med.* **16**(729), eadh8335.
 41. Chiarello D.I., Abad C., Rojas D., Toledo F., Vázquez C.M., Mate A., Sobrevia L., Marín R. (2020) Oxidative stress: normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1866**(2), 165354.
 42. Hussain T., Murtaza G., Metwally E., Kalhoro D.H., Kalhoro M.S., Rahu B.A., Sahito R.G.A., Yin Y., Yang H., Chughtai M.I., Tan B. (2021) The role of oxidative stress and antioxidant balance in pregnancy. *Mediators Inflamm.* **2021**, 9962860.
 43. Grzeszczak K., Lanocha-Arendarczyk N., Malinowski W., Ziętek P., Kosik-Bogacka D. (2023) Oxidative stress in pregnancy. *Biomolecules*. **13**(12), 1768.
 44. Wang Z., Zhao G., Zibrila A.I., Li Y., Liu J., Feng W. (2021) Acetylcholine ameliorated hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in trophoblast cells via p38 MAPK/NF- κ B pathway. *Mol. Hum. Reprod.* **27**(8), gaab045.
 45. Guo L., Liu M., Duan T. (2023) Hydrogen suppresses oxidative stress by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in preeclampsia. *Adv. Clin. Exp. Med.* **32**(3), 357–367.
 46. Zhang J., Liu X., Gao Y. (2021) Abnormal H3K27 histone methylation of *RASA1* gene leads to unexplained recurrent spontaneous abortion by regulating Ras-MAPK pathway in trophoblast cells. *Mol. Biol. Rep.* **48**(6), 5109–5119.
 47. Zhao H., Li Y., Dong N., Zhang L., Chen X., Mao H., Al-Ameri S.A.A., Wang X., Wang Q., Du L., Wang C., Mao H. (2021) LncRNA LINC01088 inhibits the function of trophoblast cells, activates the MAPK signaling pathway and associates with recurrent pregnancy loss. *Mol. Hum. Reprod.* **27**(8), gaab047.
 48. Зенков Н.К., Колпаков А.Р., Меньшикова Е.Б. (2015) Редокс-чувствительная система Keap1/Nrf2/ARE как фармакологическая мишень при сердечно-сосудистой патологии. *Сиб. Научный Мед. Журн.* **35**(5), 5–25.
 49. Kweider N., Huppertz B., Kadyrov M., Rath W., Pufe T., Wruck C.J. (2014) A possible protective role of Nrf2 in preeclampsia. *Ann. Anat.* **196**(5), 268–277.
 50. Liao T., Xu X., Ye X., Yan J. (2022) DJ-1 upregulates the Nrf2/GPX4 signal pathway to inhibit trophoblast ferroptosis in the pathogenesis of preeclampsia. *Sci. Rep.* **12**(1), 2934.
 51. Tantengco A.G., de Castro Silva M., Shahin H., Bento G.F.C., Cursino G.C., Cayenne S., da Silva M.G., Menon R. (2021) The role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) in normal and pathological pregnancy: a systematic review. *Am. J. Reprod. Immunol.* **86**(6), e13496.
 52. Hong K., Muralimanoharan S., Kwak Y.T., Mendelson C.R. (2022) NRF2 serves a critical role in regulation of immune checkpoint proteins (ICPs) during trophoblast differentiation. *Endocrinology*. **163**(7), bqac070.
 53. Illarionov R.A., Pachuliia O.V., Vashukova E.S., Tkachenko A.A., Maltseva A.R., Postnikova T.B., Nasykhova Y.A., Bepalova O.N., Glotov A.S. (2022) Plasma miRNA profile in high risk of preterm birth during early and mid-pregnancy. *Genes*. **13**(11), 2018.
 54. Martinez-Fierro M.L., Garza-Veloz I., Carrillo-Sanchez K., Martinez-Gaytan V., Cortes-Flores R., Ochoa-Torres M.A., Guerrero G.G., Rodriguez-Sanchez I.P., Cancela-Murrieta C.O., Zamudio-Osuna M., Badillo-Almaraz J.I., Castruita-De la Rosa C. (2014) Expression levels of seven candidate genes in human peripheral blood mononuclear cells and their association with preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy*. **33**(2), 191–203.
 55. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Палиева Н.В., Аллилуев И.А., Ларичкин А.В. (2019) Нарушение регуляции редокс-процессов в плаценте при ее дисфункции. *Проблемы репродукции*. **25**(6), 112–118.
 56. Ivanišević J., Arđalić D., Banjac G., Janać J., Cabunac P., Vekić J., Zeljković A., Spasojević-Kalimanovska V., Karadžov Orlić N., Mandić Marković V., Miković Ž., Stefanović A. (2022) Antioxidant status in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens. Pregnancy*. **41**(1), 31–38.
 57. Nakamura M., Sekizawa A., Purwosunu Y., Okazaki S., Farina A., Wibowo N., Shimizu H., Okai T. (2009) Cellular mRNA expressions of antioxidant factors in the blood of preeclamptic women. *Prenat. Diagn.* **29**(7), 691–696.
 58. Lin P., Lai X., Wu L., Liu W., Lin S., Ye J. (2021) Network analysis reveals important genes in human placenta. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **47**(8), 2607–2615.
 59. Wang Y., Zhao S., Gu Y., Lewis D.F. (2018) Loss of slit protein nephrin is associated with reduced antioxidant superoxide dismutase expression in podocytes shed from women with preeclampsia. *Physiol. Rep.* **6**(13), e13785.
 60. Ray A., Bhati T., Pradhan D., Arora R., Parvez S., Rastogi S. (2022) Aberrant gene expression of superoxide dismutases in *Chlamydia trachomatis*-infected recurrent spontaneous aborters. *Sci. Rep.* **12**(1), 14688.
 61. Donabela F.C., Meola J., Padovan C.C., de Paz C.C., Navarro P.A. (2015) Higher *SOD1* gene expression in cumulus cells from infertile women with moderate and severe endometriosis. *Reprod. Sci.* **22**(11), 1452–1460.
 62. Vennou K.E., Kontou P.I., Braliou G.G., Bagos P.G. (2020) Meta-analysis of gene expression profiles in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* **19**, 52–60.
 63. Schierding W., Antony J., Karhunen V., Väärämäki M., Franks S., Elliott P., Kajantie E., Sebert S., Blakemore A., Horsfield J.A., Järvelin M.R., O'Sullivan J.M., Cutfield W.S. (2018) GWAS on prolonged

- gestation (post-term birth): analysis of successive Finnish birth cohorts. *J. Med. Genet.* **55**(1), 55–63.
64. Xu H., Xie Y., Sun Y., Guo R., Lv D., Li X., Li F., He M., Fan Y., Deng D. (2021) Integrated analysis of multiple microarray studies to identify potential pathogenic gene modules in preeclampsia. *Exp. Mol. Pathol.* **120**, 104631.
 65. Xu Z.P., Wawrousek E.F., Piatigorsky J. (2002) Transketolase haploinsufficiency reduces adipose tissue and female fertility in mice. *Mol. Cell. Biol.* **22**(17), 6142–6147.
 66. Wu Q., Ying X., Yu W., Li H., Wei W., Lin X., Zhang X. (2022) Identification of ferroptosis-related genes in syncytiotrophoblast-derived extracellular vesicles of preeclampsia. *Medicine.* **101**(44), e31583.
 67. Mei S., Qin Q., Wu Q., Sun H., Zheng R., Zang C., Zhu M., Wu J., Shi X., Taing L., Liu T., Brown M., Meyer C.A., Liu X.S. (2017) Cistrome data browser: a data portal for ChIP-Seq and chromatin accessibility data in human and mouse. *Nucl. Acids Res.* **45**(D1), D658–D662.
 68. Иваненко К.А., Прасолов В.С., Хабушева Э.Р. (2022) Транскрипционный фактор SP1 в регуляции экспрессии генов, кодирующих компоненты сигнальных путей MAPK, JAK/STAT и PI3K/AKT. *Молекуляр. биология.* **56**(5), 832–847.
 69. Menon R., Papaconstantinou J. (2016) p38 Mitogen activated protein kinase (MAPK): a new therapeutic target for reducing the risk of adverse pregnancy outcomes. *Expert. Opin. Ther. Targets.* **20**(12), 1397–1412.
 70. Liu H., Wang W., Liu C. (2021) Increased expression of IFN- γ in preeclampsia impairs human trophoblast invasion via a SOCS1/JAK/STAT1 feedback loop. *Exp. Ther. Med.* **21**(2), 112.
 71. Yi J.Z., Chen Z.H., Xu F.H., Wang Z.Y., Zhang H.Q., Jiang G.S., Luan X.Y. (2018) Interferon- γ suppresses the proliferation and migration of human placenta-derived mesenchymal stromal cells and enhances their ability to induce the generation of CD4+CXCR5+Foxp3+ Treg subset. *Cell. Immunol.* **326**, 42–51.
 72. Chen C.P., Piao L., Chen X., Yu J., Masch R., Schatz F., Lockwood C.J., Huang S.J. (2015) Expression of interferon- γ by decidual cells and natural killer cells at the human implantation site: implications for preeclampsia, spontaneous abortion, and intrauterine growth restriction. *Reprod. Sci.* **22**(11), 1461–1467.
 73. Sheibak N., Mahmoudzadeh-Sagheb H., Moudi B., Heidari Z. (2020) Elevated immunoexpression of interferon-gamma in placenta tissue samples from pregnancies complicated with preeclampsia compared to the placenta previa. *Pregnancy Hypertens.* **22**, 175–180.
 74. Jain A., Tuteja G. (2021) PlacentaCellEnrich: a tool to characterize gene sets using placenta cell-specific gene enrichment analysis. *Placenta.* **103**, 164–171.
 75. Vento-Tormo R., Efremova M., Botting R.A., Turco M.Y., Vento-Tormo M., Meyer K.B., Park J.E., Stephenson E., Polański K., Goncalves A., Gardner L., Holmqvist S., Henriksson J., Zou A., Sharkey A.M., Millar B., Innes B., Wood L., Wilbrey-Clark A., Payne R.P., Ivarsson M.A., Lisgo S., Filby A., Rowitch D.H., Bulmer J.N., Wright G.J., Stubbington M.J.T., Haniffa M., Moffett A., Teichmann S.A. (2018) Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. *Nature.* **563**, 347–353.
 76. Suryawanshi H., Morozov P., Straus A., Sahasrabudhe N., Max K.E.A., Garzia A., Kustagi M., Tuschl T., Williams Z. (2018) A single-cell survey of the human first trimester placenta and decidua. *Sci. Adv.* **4**(10), eaau4788.
 77. Yagel S., Cohen S.M., Admati I., Skarbianskis N., Solt I., Zeisel A., Beharier O., Goldman-Wohl D. (2023) Expert review: preeclampsia type I and type II. *Am. J. Obstet. Gynecol. MFM.* **5**(12), 101203.
 78. Harris L.K., Benagiano M., D'Elios M.M., Brosens I., Benagiano G. (2019) Placental bed research: II. Functional and immunological investigations of the placental bed. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **221**(5), 457–469.
 79. Yao T., Liu Q., Tian W. (2022) Deconvolution of a large cohort of placental microarray data reveals clinically distinct subtypes of preeclampsia. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 917086.
 80. Pawlak J.B., Bálint L., Lim L., Ma W., Davis R.B., Benyó Z., Soares M.J., Oliver G., Kahn M.L., Jakus Z., Caron K.M. (2019) Lymphatic mimicry in maternal endothelial cells promotes placental spiral artery remodeling. *J. Clin. Invest.* **129**(11), 4912–4921.
 81. Campbell K.A., Colacino J.A., Puttabyatappa M., Dou J.F., Elkin E.R., Hammoud S.S., Domino S.E., Dolinoy D.C., Goodrich J.M., Loch-Carusso R., Padmanabhan V., Bakulski K.M. (2023) Placental cell type deconvolution reveals that cell proportions drive preeclampsia gene expression differences. *Commun. Biol.* **6**, 264.
 82. Kang H., Subramaniam M., Targ S., Nguyen M., Maliskova L., McCarthy E., Wan E., Wong S., Byrnes L., Lanata C.M., Gate R.E., Mostafavi S., Marson A., Zaitlen N., Criswell L.A., Ye C.J. (2018) Multiplexed droplet single-cell RNA sequencing using natural genetic variation. *Nat. Biotechnol.* **36**, 89–94.

Analysis of Placental Transcriptome Data as a Tool for Identifying of Molecular Pathways Related to Great Obstetrical Syndromes

© 2025 E. A. Trifonova^{1,2,*}, A. V. Markov¹, A. A. Zarubin¹, A. A. Babovskaya¹,
M. M. Gavrilenko¹, T. V. Gabidulina², V. A. Stepanov¹

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, 634050 Russia

²Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

Numerous histological studies have demonstrated that the key pathogenetic mechanisms of great obstetrical syndromes (GOS) are associated with impaired placentation processes. However, the molecular basis of this discovery is still unclear. Therefore, the purpose of this work was to characterize the molecular mechanisms and search for GOS new genetic markers based on an integrative analysis of data obtained by whole genome expression profiling of placental tissue with preeclampsia, fetal growth restriction, premature birth and physiological pregnancy. The significant role of oxidative stress, ferroptosis and intercellular interactions disorders in placenta has been shown as common mechanisms of GOS pathogenetics. We have identified 64 genes significantly dysregulated at least in two pregnancy complications. The most significant cell populations enriched with these genes were maternal endothelial cells and syncytiotrophoblast cells. Computational analysis and topology assessment of the protein-protein interaction network made it possible to identify *SOD1*, *ACTG1*, *TXNRD1*, *TKT*, *GCLM*, *GOT1*, *ACO1* and *UBB* as hub genes. We also emphasized key regulators (*MAPK3*, *MID1*, *LCMT1*, *DUSP10*, *TOPS*, *SOX10*, *EGFR*, *TFAP2A*, *GLIS1*, *NR2F1*, *NR2F2*, *PAX5*, *HSF1* and *BCL6*) triggering a cascade of reactions with the involvement of detected differentially expressed genes. These genes are overrepresented in the MAP kinase and interferon-gamma response signaling pathways. The above mentioned genes and their products are the most promising biomarkers for the development of new approaches to the risk factors assessment and GOS targeted therapy. Further studies should be aimed at clarifying their functional and diagnostic significance in the development of pregnancy pathological conditions.

Keywords: transcriptome, placenta, differentially expressed genes, great obstetrical syndromes, preeclampsia, fetal growth restriction, preterm birth