

ТРАНСКРИПТОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

© 2023 г. Е. А. Трифонова¹, *, А. А. Бабовская¹, А. А. Зарубин¹, В. Н. Сереброва¹,
М. М. Гавриленко¹, М. Г. Сваровская¹, Е. В. Ижойкина², И. Г. Куценко², В. А. Степанов¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского
медицинского центра, Томск, 634050 Россия

²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

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

Поступила в редакцию 29.06.2023 г.

После доработки 19.07.2023 г.

Принята к публикации 08.08.2023 г.

На сегодняшний день транскриптомика — одна из самых быстро развивающихся областей молекулярной биологии, позволяющая получить детальную информацию о функциональной активности генома как в норме, так и при патологии. В представленной работе мы использовали современные транскриптомные технологии для всесторонней характеристики полногеномного профиля экспрессии генов клеток синцитиотрофобласта (СТБ) плаценты человека при физиологической и осложненной преэклампсией (ПЭ) беременности. В результате проведенного нами анализа выявлены 26 генов, экспрессия которых статистически значимо различается в клетках СТБ женщин с ПЭ и физиологическим течением беременности. Кластер дифференциально-экспрессирующихся генов (ДЭГ) содержит не только известные гены-кандидаты, выявленные ранее во многих зарубежных полногеномных исследованиях плаценты (к примеру, *LEP*, *INHBA* и *FLT1*), но и новые гены (*AC098613.1*, *AC087857.1*, *FCRLB*, *TENM4*, *PTP4A1P7*, *LINC01225* и др.), которые могут рассматриваться в качестве новых биологических маркеров ПЭ и представляют интерес для дальнейшего изучения. Результаты функциональной аннотации ДЭГ показывают, что с развитием ПЭ на уровне СТБ могут быть связаны сигнальные пути регуляции гормональной секреции, MAPK-каскада, ERK1 и ERK2 каскада, положительной регуляции клеточной адгезии и пролиферации эндотелиальных клеток. Полученные результаты анализа альтернативного сплайсинга гена *FLT1* свидетельствуют о важной роли в патогенетике ПЭ данного механизма процессинга РНК за счет существенного увеличения транскрипционного разнообразия генов в клетках СТБ. Уровень экспрессии транскрипта, кодирующего белковую изоформу FLT-1 e15a, был значительно повышен у пациенток с ПЭ по сравнению с контрольной группой. Это исследование расширяет представление о задействованных в ПЭ молекулярных механизмах и может служить основой для разработки профилактических, прогностических и терапевтических стратегий в области персонифицированного акушерства.

Ключевые слова: полнотранскриптомное секвенирование, плацента, синцитиотрофобласт, ген, sFlt-1, альтернативный сплайсинг, MAPK-каскад.

DOI: 10.31857/S0016675823120135, **EDN:** QERSXD

Персонализированная направленность современной медицины требует инновационных подходов к изучению молекулярных механизмов заболеваний, а также разработки эффективных методов таргетной терапии, основанных на экспериментальных результатах, полученных с использованием омиксных технологий. В данном контексте значительный интерес для исследователей представляет анализ транскриптома различных тканей и клеток, поскольку нарушение экспрессионной активности генов вовлечено в патогенез многочисленных заболеваний. На сегодняшний день

транскриптомика — одна из самых быстро развивающихся областей молекулярной биологии, позволяющая получить детальную информацию о функциональной активности генома человека. Транскриптом отражает профиль экспрессии генов в данный момент времени и в отличие от генома обладает динамичностью, активно меняется в зависимости от внешних факторов, потребностей окружающих тканей и клеток, что делает его удобным инструментом для изучения механизмов реализации генетической информации в процессе адаптации клеток к изменяющимся условиям

среды, а также путей их взаимодействия в норме и при патологии. Ввиду этого транскриптомные технологии нашли широкое применение во всевозможных областях предиктивной медицины, к примеру в разработке методов диагностики, стратегий прогнозирования и профилактики различных заболеваний, включая и акушерскую патологию, где в качестве основного объекта изучения выступает плацента. Необходимо отметить, что изучение молекулярных процессов, происходящих в плацентарной ткани и связанных с транскрипционной регуляцией генной экспрессии, рассматривается на сегодняшний день как наиболее перспективное направление исследований для раскрытия патофизиологии осложненного течения беременности, в частности такого тяжелого заболевания как преэклампсия [1].

Молекулярные механизмы развития преэклампсии (ПЭ) являются предметом фундаментальных и прикладных исследований в области медицины и биологии более 40 лет. Однако, несмотря на некоторый прогресс в этой области, попытки сформировать единую теорию этиопатогенеза ПЭ до сих пор так и не увенчались успехом. За последнее десятилетие с использованием методов биохимии и молекулярной генетики удалось выявить отдельные предиктивные маркеры развития ПЭ (к примеру, PIGF и sFLT1), данные о прогностической значимости которых варьируют в зависимости от исследований [2, 3]. На сегодняшний день не дискутируется только один этиологический момент в развитии этого гестационного осложнения — наличие беременности и нарушения формирования спиральных артерий плаценты. Предположительно в возникновении ПЭ могут играть существенную роль разнообразные пусковые механизмы, которые обуславливают включение множества патогенетических звеньев в развитие этой тяжелой патологии, проявляющейся в конечном итоге полиорганной недостаточностью и вовлечением в патологический процесс различных тканей и типов клеток [4]. Совершенствование высокопроизводительных методов транскриптомики сделало возможным анализ полногеномного профиля мРНК в отдельных клетках человека, что позволяет выявить новые биомаркеры, функционально значимые пути сигнальной трансдукции, а также сети межмолекулярных и межклеточных взаимодействий, и тем самым расширить представления о молекулярных механизмах данного тяжелого акушерского заболевания, а также разработать новые персонализированные стратегии терапевтических и профилактических мероприятий.

Общепризнано, что основным структурным элементом и регулятором функций плаценты является синцитиотрофобласт (СТБ), выстилающий всю площадь поверхности ворсин плаценты. Благодаря непосредственному контакту с материнской кровью СТБ осуществляет многие функции пла-

центы, включая газообмен, транспорт питательных веществ, защиту плода и секрецию ряда гормонов и медиаторов, которые впоследствии попадают в материнский кровоток [5]. При этом любые нарушения функционирования СТБ, начиная с процессов инвазии, могут явиться причиной развития последующих осложнений беременности, включая и ПЭ. Показано, что медиаторы, выделяющиеся из плацентарной ткани в кровь матери, связаны с такими клиническими симптомами ПЭ как повышенное артериальное давление и содержание белка в моче. Более того, обнаружено, что при окислительном стрессе СТБ высвобождает в материнский кровоток ряд сложных веществ, включая провоспалительные цитокины, экзосомы и антиангиогенные факторы, которые могут нарушать функцию эндотелия матери, приводить к системному воспалительному ответу и формированию патологического течения беременности [5, 6].

Стоит отметить, что к настоящему времени проведены многочисленные зарубежные и единичные отечественные исследования, посвященные как характеристике профиля генной экспрессии при физиологической беременности, так и поиску паттернов транскриптома лейкоцитов крови и плаценты, связанных с различными гестационными осложнениями [1, 6–11]. Однако до сих пор неясно, какие изменения происходят в профилях экспрессии генов различных типов клеток плацентарной ткани в условиях нормального и патологического течения беременности. В представленной работе мы использовали современные транскриптомные технологии для всесторонней характеристики полногеномного профиля экспрессии генов клеток СТБ плаценты человека при физиологической и осложненной ПЭ беременности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение настоящего исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Материал для исследования представлен биоптатами материнской части плаценты женщин с физиологическим течением беременности ($N = 8$) и преэклампсией тяжелой степени ($N = 8$). Сбор биоптатов осуществлялся по стандартной методике [12] акушерами-гинекологами на базе ОГАУЗ “ОПЦ им. И.Д. Евтушенко” г. Томска. Полученный материал немедленно промывался физиологическим раствором и помещался в криопробирки, которые далее хранились в жидком азоте, чтобы свести к минимуму деградацию РНК. У всех пациентов срезы плацентарной ткани были охарактеризованы гистологически с окрашиванием гематоксилин-эозином. Лазерная микродиссекция с целью получения клеток СТБ осуществлена на оборудо-

вании PALM (Carl Zeiss, Германия) с технологией автоматизированного захвата фрагментов (Laser Capture Microdissection).

Для выделения тотальной РНК использован набор Single Cell RNA Purification Kit (Norgen, США). Концентрация и качество РНК были оценены с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer. Приготовление библиотек проведено по протоколу SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 (Takara, США). Массовое параллельное секвенирование выполнено на приборе Next-seq 2000 (Illumina). Выравнивание на референсный геном (hg38) было выполнено с помощью программы STAR. Аннотацию транскрипционных активных областей, полученных в настоящей работе в результате секвенирования клеток СТБ, проводили в программной среде R (<http://www.r-project.org>) с использованием базы данных gencode.v39. Фильтрация и нормализация данных осуществлялись в пакете edgeR среды для статистических вычислений R согласно стандартным параметрам. Статистический анализ дифференциальной экспрессии также проводили с помощью пакета edgeR. Порогом для фильтрации дифференциально экспрессированных РНК был выбран $|\log_2FC| > 1$ и $FDR < 0.05$ как оптимальный для минимизации ошибки второго рода, так как методы последующих статистического и интегративного анализов устойчивы к ошибкам первого рода [13].

Функциональный анализ кластера дифференциально-экспрессирующихся генов (ДЭГ) проводили с помощью веб-инструмента в ресурсе Molecular Signatures Database (MSigDB) программного обеспечения GSEA и базы данных GeneMANIA [14, 15]. Анализ событий альтернативного сплайсинга выполнен с помощью пакета “MAJIQ” [16], позволяющего прогнозировать и количественно оценивать события сплайсинга на основе данных полногеномного РНК-секвенирования, используя входные файлы BAM и GFF3. Восстановление последовательностей альтернативных изоформ проводили с помощью Illumina DRAGEN (Dynamic Read Analysis for GENomics) Bio-IT Platform. Экспериментальные исследования были выполнены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием “Медицинская геномика” НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления молекулярных механизмов, которые могут лежать в основе формирования преэклампсии на уровне нарушения функционирования ворсин плацентарной ткани, был проведен транскриптомный анализ клеток СТБ пациенток с ПЭ и женщин с физиологической беременностью с помощью технологии RNA-seq.

В рамках данной работы было получено 16 транскриптомов клеток СТБ из образцов плацентарной ткани восьми пациенток с ПЭ и восьми женщин из контрольной группы. По меньшей мере 86% прочтений последовательности были однозначно выровнены на геном человека, равномерность отображения считывания по транскриптам всех образцов была хорошей. После выравнивания на геном человека среднее покрытие на образец составило 43 млн прочтений. Всего в анализ было включено 22625 транскриптов, для которых количество прочтений (CPM) составляло не менее пяти для 10% и более образцов. Аннотацию транскрипционных активных областей, полученных в настоящей работе в результате секвенирования клеток СТБ, проводили в программной среде R с использованием базы данных gencode.v39 (см. табл. 1, приводятся усредненные данные по всем анализируемым образцам). Большинство из анализируемых транскриптов (66.5%) соответствуют протеинкодирующим регионам генома человека (15046). В оставшемся кластере преобладают длинные некодирующие РНК и процессированные псевдогены.

Анализ дифференциальной экспрессии генов синцитиотрофобласта

Дифференциальную экспрессию генов СТБ определяли с помощью пакета edgeR, который вычисляет дисперсию показателя экспрессии для каждого гена. Дифференциально экспрессируемыми считали гены с различиями в абсолютном значении экспрессии в логарифмической шкале $|\log_2FC| > 2$ и уровнем значимости с поправкой на множественные сравнения менее 0.05 (рис. 1).

В результате проведенного нами анализа выявлены 26 генов, экспрессия которых статистически значимо различается ($FDR < 0.05$; $|\log_2FC| > 1$) в клетках СТБ женщин с ПЭ и физиологическим течением беременности (рис. 2). Причем только для двух генов — *IGHG1* и *TUBG2*, кодирующих константную область тяжелой цепи гамма-глобулина 1 и цепь гамма-тубулина соответственно, было обнаружено снижение транскрипционной активности в группе больных по сравнению с контрольной выборкой, в то время как гиперэкспрессия у пациенток с ПЭ была показана для 24 генов, что составляет более 92% от всех идентифицированных ДЭГ.

Кластер ДЭГ, экспрессия которых повышена при ПЭ в клетках СТБ, включает не только известные гены-кандидаты, выявленные ранее во многих полногеномных исследованиях профилей экспрессии генов плаценты при данной патологии (к примеру, *LEP*, *FLT1*, *INHBA*), но также новые потенциальные генетические маркеры (*PTP4A1P7*, *AC087857.1*, *SLC46A3*, *RPS18P9*, *STAMBPL1*,

Таблица 1. Аннотация транскриптов клеток СТБ, полученных в результате RNA-seq

Идентифицированные транскрипты (категории GENCODE)	Количество транскриптов
Белок-кодирующие (protein_coding)	15046
Длинные некодирующие РНК (lincRNA)	4034
Процессированные псевдогены (processed_pseudogene)	1618
Транскрибируемые непротессированные псевдогены (transcribed_unprocessed_pseudogene)	346
Транскрипты с неустановленной функцией (ТЕС)	356
Непротессированные псевдогены (unprocessed_pseudogene)	248
Неидентифицированная РНК (misc_RNA)	203
Транскрибируемые процессированные псевдогены (transcribed_processed_pseudogene)	172
Малые ядерные РНК (snRNA)	156
МикроРНК (miRNA)	109
Малые ядрышковые РНК (snoRNA)	153
Транскрибируемые унитарные псевдогены (transcribed_unitary_pseudogene)	71
Инактивированные гены рРНК (rRNA_pseudogene)	52
Унитарные псевдогены (unitary_pseudogene)	9
Митохондриальная тРНК (Mt_tRNA)	22
Гены варибельной цепи Т-клеточного рецептора (TR_V_gene)	12
Гены варибельной цепи иммуноглобулина (IG_C_gene)	7
рРНК (rRNA)	7
Инактивированный ген иммуноглобулина (IG_C/V_pseudogene)	1
Митохондриальная рРНК (Mt_rRNA)	1
Транслированные процессированные псевдогены (translated_processed_pseudogene)	1
Транслированные непротессированные псевдогены (translated_unprocessed_pseudogene)	1

SULT1C2, *AC073410.2*, *ASRGL1*, *TP53TG1* и др.), связь которых с развитием ПЭ установлена впервые в настоящей работе. Стоит отметить также большое количество некодирующих РНК в данном кластере ДЭГ, функциональную значимость которых в механизмах патологического течения беременности еще предстоит охарактеризовать. В табл. 2 представлены данные о наиболее значимых ДЭГ ($FDR < 0.01$).

С целью оценить потенциальную биологическую значимость выявленных ДЭГ в молекулярных механизмах ПЭ мы провели функциональную аннотацию и анализ сетевых взаимодействий идентифицированных генов с помощью вычислительного метода GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) и базы данных GeneMANIA. В представленной работе при проведении функциональной аннотации в ресурсе Molecular Signatures Database (MSigDB) программного обеспечения GSEA учитывали категории, имеющие FDR (false discovery rate) < 0.05 (в данном случае FDR представляет собой вероятность неслучайного попадания группы генов в категорию с поправкой на множественные сравнения). Нами было выявлено восемь категорий, включающих девять генов из 26 изучен-

ных. Необходимо отметить, что большая часть из данных генов одновременно вовлечена в реализацию нескольких генных онтологий и молекулярных процессов (например, локусы *FGB*, *FGG*, *LEP*, *INHBA*, *TPBG* и *FLT1* включены минимум в три и более из обнаруженных категорий). Наиболее значимые биологические пути, процессы и молекулярные функции, обогащенные данными ДЭГ ($FDR < 0.005$), связаны с регуляцией гормональной секреции, регуляцией MAPK-каскада и положительной регуляцией процессов в многоклеточном организме (табл. 3).

Важно отметить, что среди ДЭГ сверхпредставлены гены, связанные с регуляцией MAPK-каскада. Предыдущие исследования показали, что окислительный стресс активирует передачу сигналов митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) и увеличивает экспрессию рецепторов апоптоза [17]. Активность p38 MAPK была значительно повышена в плаценте пациенток с ПЭ по сравнению с женщинами с нормальной беременностью. Предположительно активные формы кислорода (АФК) могут активировать сигнальный путь p38 MAPK в плацентарной ткани с последующей гиперэкспрессией sFlt-1 и sEng в материнской

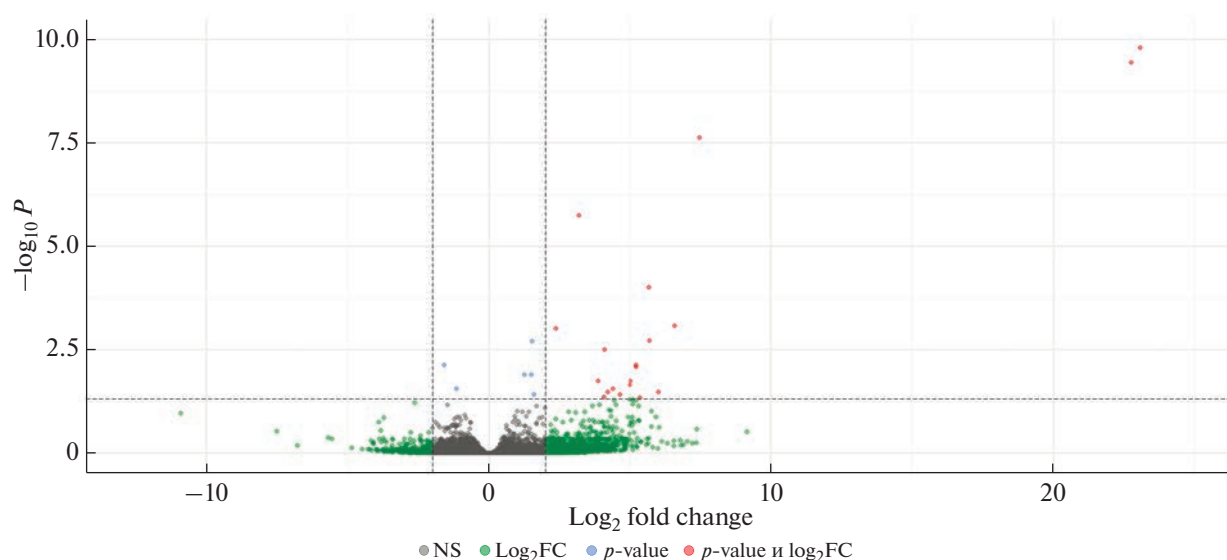


Рис. 1. Volcano-график, демонстрирующий зависимость статистической значимости (уровень FDR) от кратности различий в экспрессии генов между группами. Топовые дифференциально экспрессируемые при ПЭ и физиологической беременности гены ($|\log_2FC| > 2$ и $FDR < 0.05$) отмечены красными точками.

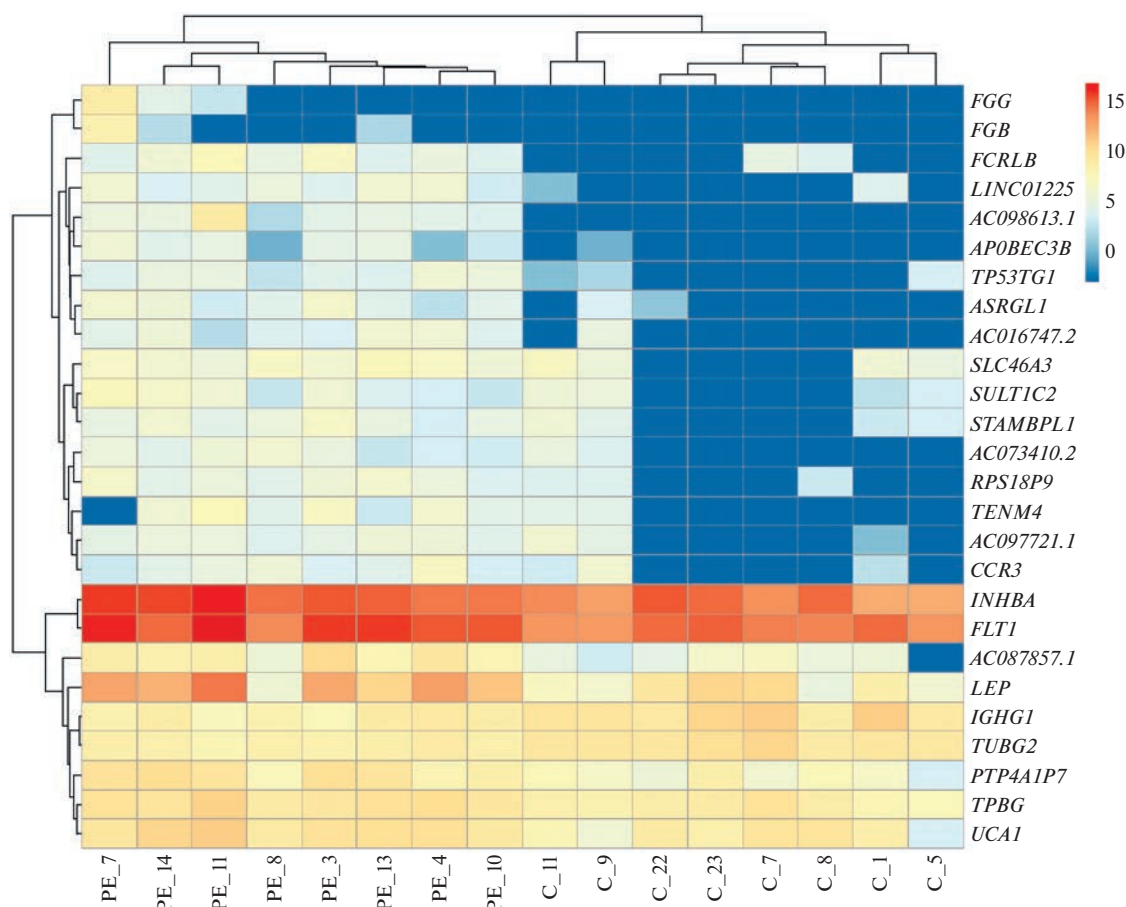


Рис. 2. Теплоката ДЭГ, полученных при сравнительном анализе полнотранскриптомных профилей клеток СТБ в группах с физиологической беременностью (принадлежность к данной группе обозначена на рисунке С) и ПЭ (образцы в данном случае маркированы как PE).

Таблица 2. Гены, экспрессия которых наиболее существенно различается в клетках СТБ у женщин с ПЭ и физиологической беременностью

№	Ген	Локализация на хромосоме	Продукт гена	log ₂ FC	FDR
1	<i>FGG</i>	4q32.1	Гамма-цепь фибриногена	23.08	1.6×10^{-10}
2	<i>FGB</i>	4q31.3	Бета-цепь фибриногена	22.75	3.6×10^{-10}
3	<i>AC098613.1</i>	3p21.31	Некодирующая РНК	7.48	2.4×10^{-8}
4	<i>AC087857.1</i>	3p26.1	Некодирующая РНК	3.19	1.8×10^{-6}
5	<i>FCRLB</i>	1q23.3	Рецептор Fc, цепь B	5.68	9.8×10^{-5}
6	<i>TENM4</i>	11q14.1	Трансмембранный белок 4 тенейрин	6.58	0.0008
7	<i>PTP4A1P7</i>	1q25.2	РТР4А1 псевдоген 7	2.36	0.0009
8	<i>LINC01225</i>	1p35.2	Длинная некодирующая РНК	5.72	0.0019
9	<i>INHBA</i>	7p14.1	Ингибин Бета А субъединица	1.52	0.0019
10	<i>LEP</i>	7q32.1	Лептин	4.08	0.0031
11	<i>AC097721.1</i>	2q22.1	Некодирующая РНК	5.24	0.0073
12	<i>IGHG1</i>	14q32.33	Тяжелая цепь гамма-1 иммуноглобулина	1.58	0.0073
13	<i>TP53TG1</i>	7q21.12	Белок TP53 фрагмент 1	5.23	0.0081
14	<i>TPBG</i>	6q14.1	Гликопротеин трофобласта	1.26	0.0101
15	<i>FLT1</i>	13q12.3	Рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста 1	1.50	0.0112

сыворотке и системной воспалительной реакцией, вызывая эндотелиальную дисфункцию и клинические симптомы ПЭ [18]. Показано, что инактивация сигнального пути Ras-МАРК в клетках трофобласта является одним из основных патогенетических факторов идиопатического привычного невынашивания беременности за счет ингибирования способности клеток трофобласта к пролиферации и инвазии [19].

Полученная с помощью web-ресурса GeneMANIA сеть взаимодействий продуктов ДЭГ подтверждает взаимосвязи между генами, выявленные при исследовании биологических путей и процессов. Анализ данной сети, включающей 15 протеинов, кодируемых изучаемыми генами, указывает на важное место в молекулярных механизмах ПЭ на уровне клеток СТБ белок-белковых взаимодействий продуктов ДЭГ и ко-экспрессии ряда генов (рис. 3). Функциональная аннотация кластера ДЭГ, связанных сетевыми взаимодействиями, указывает на высокодостоверную сверхпредставленность данных генов ($FDR < 0.001$) в таких категориях как пролиферация эндотелиальных и эпителиальных клеток, регуляция пролиферации эндотелиальных клеток, положительная регуляция клеточной адгезии, регуляция связывания цитокиновых рецепторов, каскада ERK1/ERK2 и межклеточной адгезии, а также негативная регуляция процесса апоптоза.

Центральное место в данной сети с наибольшим числом взаимодействий занимают гены *FGB*, *FGG*, *LEP* и *FLT1*, кодирующие гамма и бета

цепи фибриногена, лептин и рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста 1-го типа соответственно. Продукты некоторых из этих генов, согласно известным на сегодняшний день данным об их функциональных особенностях, могут играть ведущую роль в молекулярных механизмах исследуемой патологии.

Так, современные исследования демонстрируют, что нарушение баланса между про- и антиангиогенными факторами роста имеет большое значение в процессах инвазии цитотрофобласта при ПЭ [3, 20]. Показано, что растворимый антиангиогенный фактор (sFlt-1) – продукт гена *FLT1*, при физиологическом течении беременности уменьшает скорость инвазии цитотрофобласта, при этом концентрация его в начале беременности относительно низка и начинает повышаться в последнем триместре беременности. S.A. Karamanli с коллегами продемонстрирована значительная гиперэкспрессия в плацентарной ткани изоформы гена *FLT1*, кодирующей sFlt-1 [20]. Наряду с этим методами иммуногистохимии выявлены значительные изменения экспрессии VEGF, плацентарного фактора роста (PlGF) и антиангиогенного фактора (Flt-1) в плацентах женщин с ПЭ. У мышей с нокдауном в геноме данных локусов обнаруживается нарушение плацентарного васкулогенеза и увеличение внутриутробной смертности плодов [21]. Результаты, полученные в настоящей работе, также свидетельствуют о ключевой роли гиперэкспрессии гена *FLT1* в молекулярных механизмах ПЭ на уровне клеток СТБ, в связи с чем

Таблица 3. Наиболее значимые категории, обогащенные ДЭГ, полученные с помощью ресурса MSigDB

№	Категория в базе данных	Описание основных процессов категории	Гены, входящие в категорию	FDR
1	Позитивная регуляция MAPK-каскада (GO_POSITIVE_REGULATION_OF_MAPK_CASCADE)	Процессы, активирующие повышение частоты, скорости или степени передачи сигнала, опосредованной MAPK-каскадом	<i>FGB, FGG, LEP, INHBA, TPBG, FLT1</i>	0.008
2	Положительная регуляция секреции гормонов (GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_HORMONE_SECRETION)	Любые процессы, которые активируют или увеличивают частоту, скорость или степень секреции гормона из клетки	<i>FGB, FGG, LEP, INHBA</i>	0.009
3	Положительная регуляция процессов в многоклеточном организме (GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_MULTICELLULAR_ORGANISMAL_PROCESS)	Любые процессы, которые активируют или увеличивают частоту, скорость или длительность процесса в организме, любой из процессов, относящихся к функционированию организма выше клеточного уровня, включая интегрированные процессы тканей и органов	<i>FGB, FGG, LEP, INHBA, TPBG, FLT1, CCR3, TENM4</i>	0.009
4	Менометроррагия (HP_MENOMETRORRHAGIA)	Сочетание метроррагии и меноррагии	<i>FGB, FGG</i>	0.01
5	Эпидуральное кровоотечение (HP_EPIDURAL_HEMORRHAGE)	Эпидуральное кровоотечение	<i>FGB, FGG</i>	0.01
6	Регуляция вазоконстрикции (GOBP_REGULATION_OF_VASOCONSTRICTION)	Любой процесс, который модулирует частоту, темп или степень уменьшения диаметра кровеносных сосудов	<i>FGB, FGG, LEP</i>	0.01
7	Положительная регуляция секреции гонадотропина (GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_GONADOTROPIN_SECRETION)	Процессы, которые активируют или увеличивают степень регулируемого высвобождения гонадотропина	<i>LEP, INHBA</i>	0.01
8	Положительная регуляция каскада ERK1/ERK2 (GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_ERK1_AND_ERK2_CASCADE)	Любой процесс, который активирует или увеличивает скорость передачи сигнала, опосредованного каскадом ERK1/ERK2	<i>FGB, FGG, INHBA, TPBG</i>	0.01

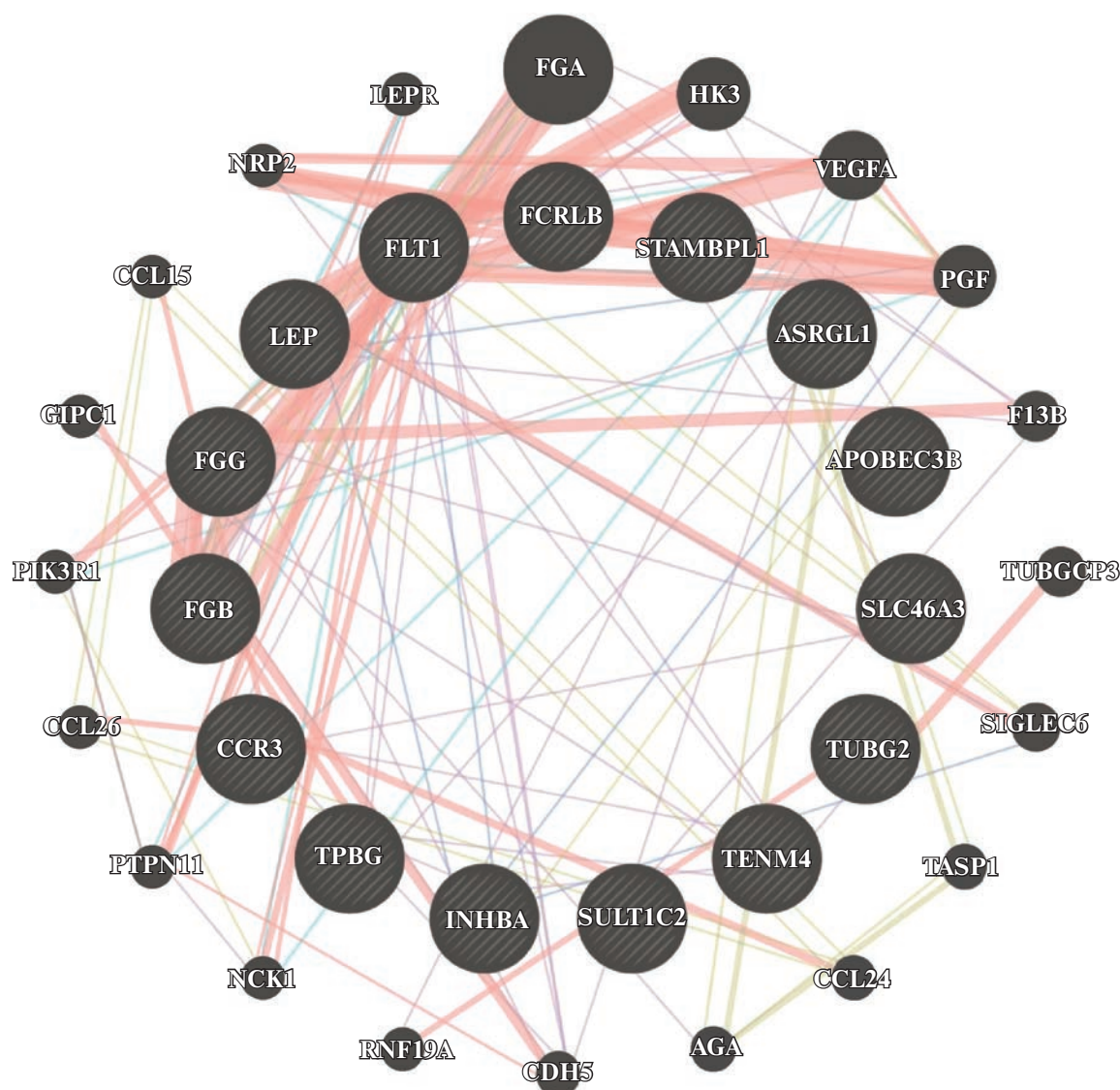


Рис. 3. Сеть белок-белковых взаимодействий продуктов ДЭГ. Сеть потенциальных взаимодействий создана с помощью базы данных GeneMANIA (<http://www.genemania.org>). Соответственно каждая цветная линия представляет определенный тип функциональной ассоциации, доступный в литературе, полученный из различных биологических систем и принятый алгоритмом GeneMANIA. Физическое взаимодействие – розовый цвет, ко-экспрессия – фиолетовый, общий белковый домен – желтый, ко-локализация – синий, общий патологический путь – светло-голубой. Чем толще линия, тем ближе вес ассоциации двух данных генов друг к другу.

нами был проведен детальный анализ событий альтернативного сплайсинга данного локуса.

Анализ альтернативного сплайсинга гена FLT1

Анализ событий альтернативного сплайсинга (АС) в клетках СТБ обследованных женщин проводили с помощью программы MAJIQ [16]. Данная программа идентифицирует комплексные (LSV (Local Splice Variation) события) и бинарные (семь “классических” типов событий) события АС; аннотированные и новые, используя данные RNA-seq. LSVs определяются и легко визуализи-

руются как расщепления (множественные ребра) в графе сплайсинга, где несколько ребер либо входят в один экзон, либо исходят из него. В частности, ранее определенные “классические” события АС отображаются как особые случаи расщепления двоичного графа (например, включение или пропуск экзона), в то время как LSVs фиксируют неклассические двоичные расщепления и расщепления, включающие более двух соединений. Количественная оценка событий АС в конкретных условиях основана на предельном процентном индексе сплайсинга (PSI, Ψ) от 0.05

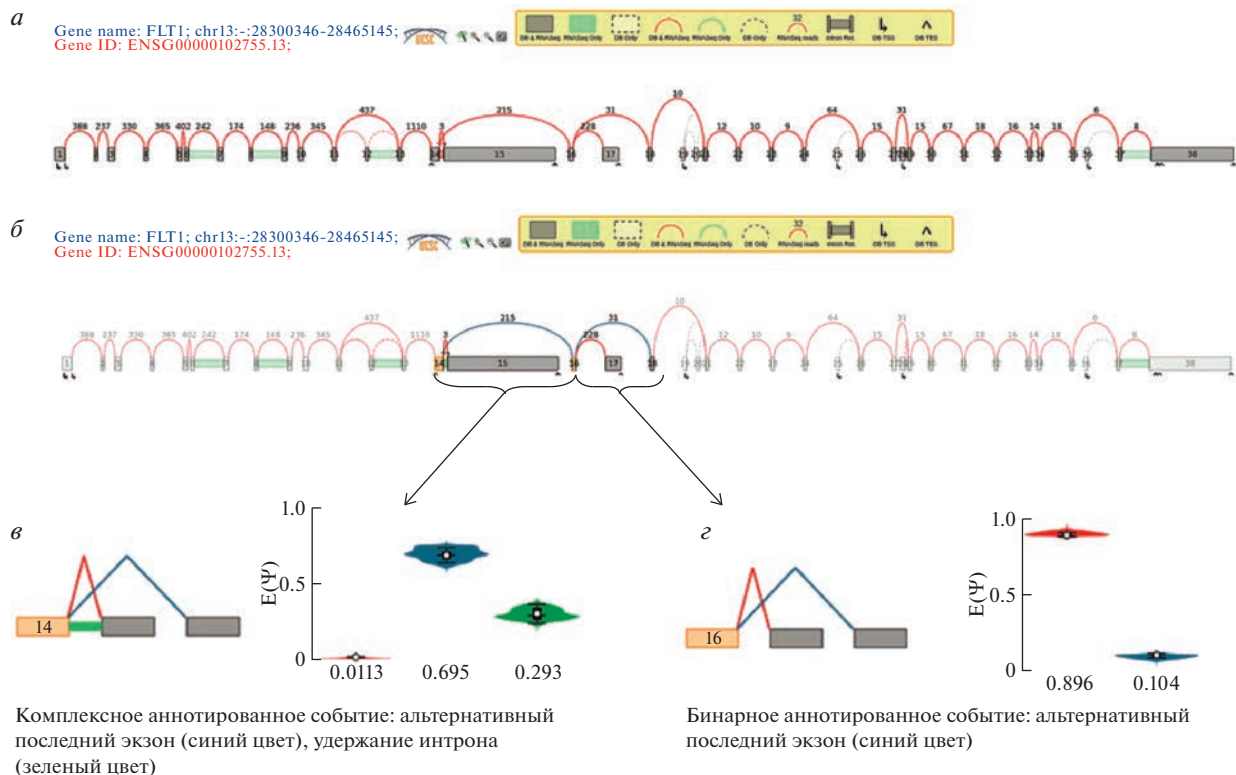


Рис. 4. Визуализация событий АС для гена *FLT1* в контрольной группе с помощью программы MAJIQ VOILA. *a* – интрон-экзонная структура гена *FLT1*; *б* – статистически значимые события в интрон-экзонной структуре; *в* – аннотированное комплексное событие; *г* – аннотированное бинарное событие.

до 0.95 для каждого элемента, участвующего в событии.

В контрольной группе для гена *FLT1* идентифицированы два аннотированных события. Одно из них является комплексным LSV и включает в себя альтернативный последний экзон с уровнем $PSI = 0.695$ и удержание интрона с уровнем $PSI = 0.293$ (рис. 4, *в*), красным цветом указано конститутивное событие соединения экзон–экзон, которое имеет низкий процент включения в транскрипт и $PSI = 0.0113$. Второе событие является классическим бинарным и соответствует альтернативному последнему экзону с $PSI = 0.104$, тогда как конститутивное событие экзон–экзон имеет $PSI = 0.896$ и более вероятно будет включено в транскрипт (рис. 4, *г*).

В группе с преэклампсией для гена *FLT1* идентифицированы два аннотированных и два *de novo* события. Если рассмотреть группу аннотированных событий, то они имеют ту же структуру, что и в контрольной группе, но незначительно отличающийся процентный индекс сплайсинга. Одно из них – комплексное LSV и включает в себя альтернативный последний экзон с уровнем $PSI = 0.702$ и удержание интрона с уровнем $PSI = 0.285$ (рис. 5, *з*), красным цветом указано конститутивное событие соединения экзон–экзон, которое

имеет низкий процент включения в транскрипт и $PSI = 0.0131$. Второе событие является классическим бинарным и соответствует альтернативному последнему экзону с $PSI = 0.338$, тогда как конститутивное событие экзон–экзон имеет $PSI = 0.662$ и более вероятно будет включено в транскрипт (рис. 5, *д*). Два события *de novo* являются бинарными и соответствуют удержанию интрона между экзонами 6 и 7 (рис. 5, *е*), между экзонами 37 и 38 (рис. 5, *е*). Оба события имеют невысокий процентный индекс сплайсинга, равный 0.0662 и 0.117 соответственно.

При оценке уровня экспрессии отдельных изоформ гена *FLT1* во всех 16 образцах были представлены следующие транскрипты (рис. 6): ENST00000282397.9 (кодирует белок FLT-1), ENST00000541932.5 (sFLT-1 e15b), ENST00000615840.4 (sFLT-i13), ENST00000639477.1 (sFLT-e15a) и ENST00000540678.2, который не имеет белкового продукта. Согласно U-критерию Манна–Уитни статистически значимо между контрольной группой и группой с преэклампсией отличается экспрессия транскриптов ENST00000282397.9 ($Z = -2.941$, $p = 0.0019$) и ENST00000639477.1 ($Z = -2.836$, $p = 0.0029$).

Примечательно, что уровень экспрессии транскрипта, кодирующего белковую изоформу FLT-1

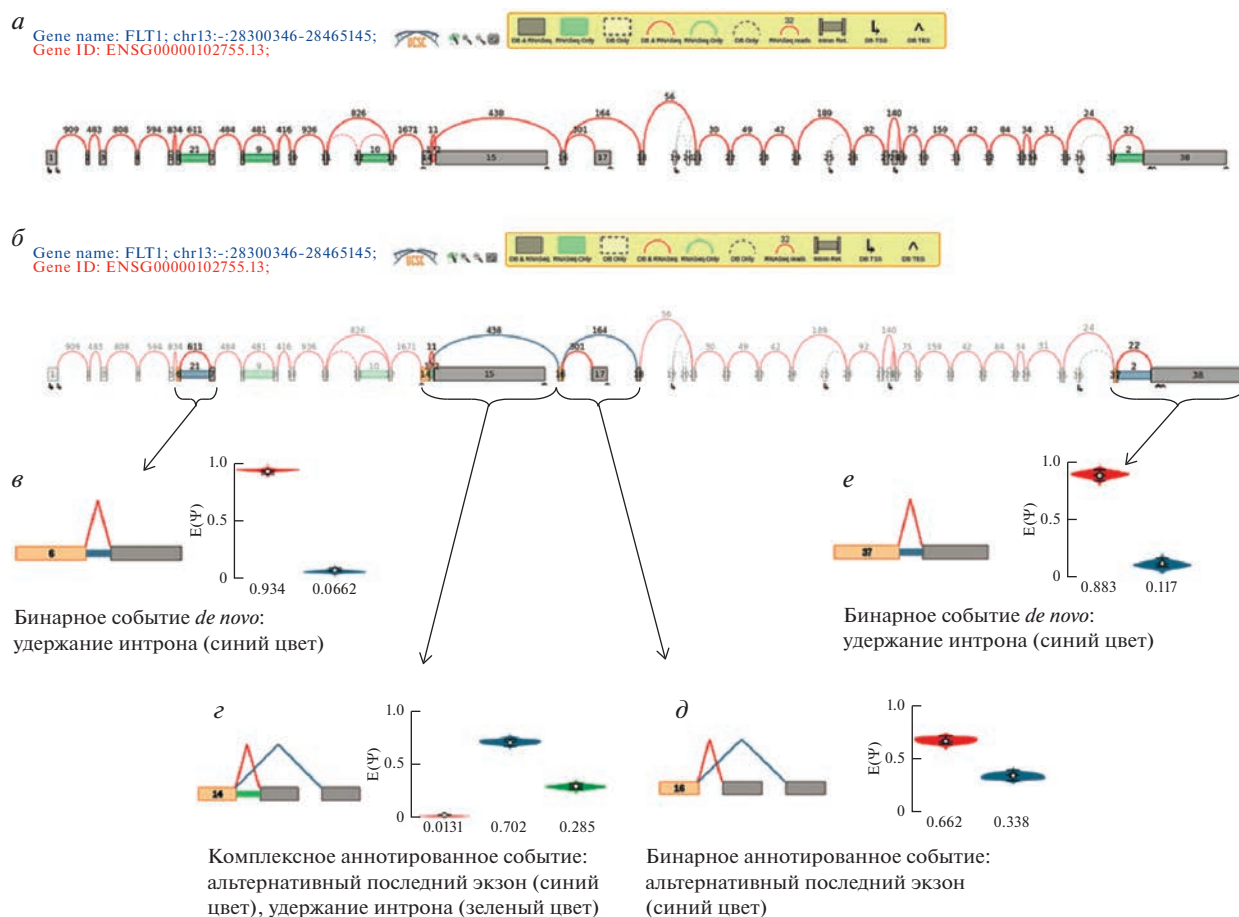


Рис. 5. Визуализация событий АС для гена *FLT1* в группе с преэклампсией с помощью программы MAJIQ VOILA. *a* – интрон-экзонная структура гена *FLT1*; *b* – статистически значимые события в интрон-экзонной структуре; *c* – *de novo* бинарное событие 1; *d* – аннотированное комплексное событие; *e* – аннотированное бинарное событие 2.

е15а, которая согласно литературным данным гиперэкспрессируется в крови и синцитиотрофобласте при ПЭ [22], был значительно повышен у пациенток с ПЭ по сравнению с контрольной группой (так, среднее количество CPM составило 88.21 в контрольной группе и 390.15 в группе с преэклампсией). В экспериментах *in vitro* на клеточных культурах протеин sFlt-1e15a снижал миграцию эндотелиальных клеток, инвазию и ингибировал образование трубочек в эндотелиальных клетках [22]. Предполагается, что именно эта изоформа FLT-1 может вызывать эндотелиальную дисфункцию и дисфункцию органов-мишеней, поражающихся при ПЭ [23], что позволяет рассматривать данный вариант как перспективный в отношении разработки современных методов диагностики и таргетной терапии этого тяжелого гестационного заболевания.

Транскриптомные исследования многофакторных заболеваний являются одним из приоритетных направлений современной персонализированной медицины, в том числе и в области аку-

шерства. Несмотря на значительные успехи в исследовании этиопатогенеза осложненного течения беременности, многие вопросы, связанные с молекулярными механизмами данного состояния, остаются открытыми и требуют детального изучения. Современные методы транскриптомики предоставляют подходящую методологическую базу для реализации подобных исследований. Основным звеном патогенеза преэклампсии считается нарушение плацентации с недостаточной инвазией трофобласта в структуры матки и неполноценным ремоделированием спиральных артерий, приводящее к снижению кровоснабжения и ишемии плаценты. Показано, что основным структурным элементом и регулятором функций сформированной плаценты является синцитиотрофобласт, выступающий ворсины плаценты и непосредственно контактирующий с материнской кровью. Представленная работа – первое в России полнотранскриптомное исследование клеток синцитиотрофобласта плаценты человека. Выявлены 26 генов, экспрессия которых статистиче-

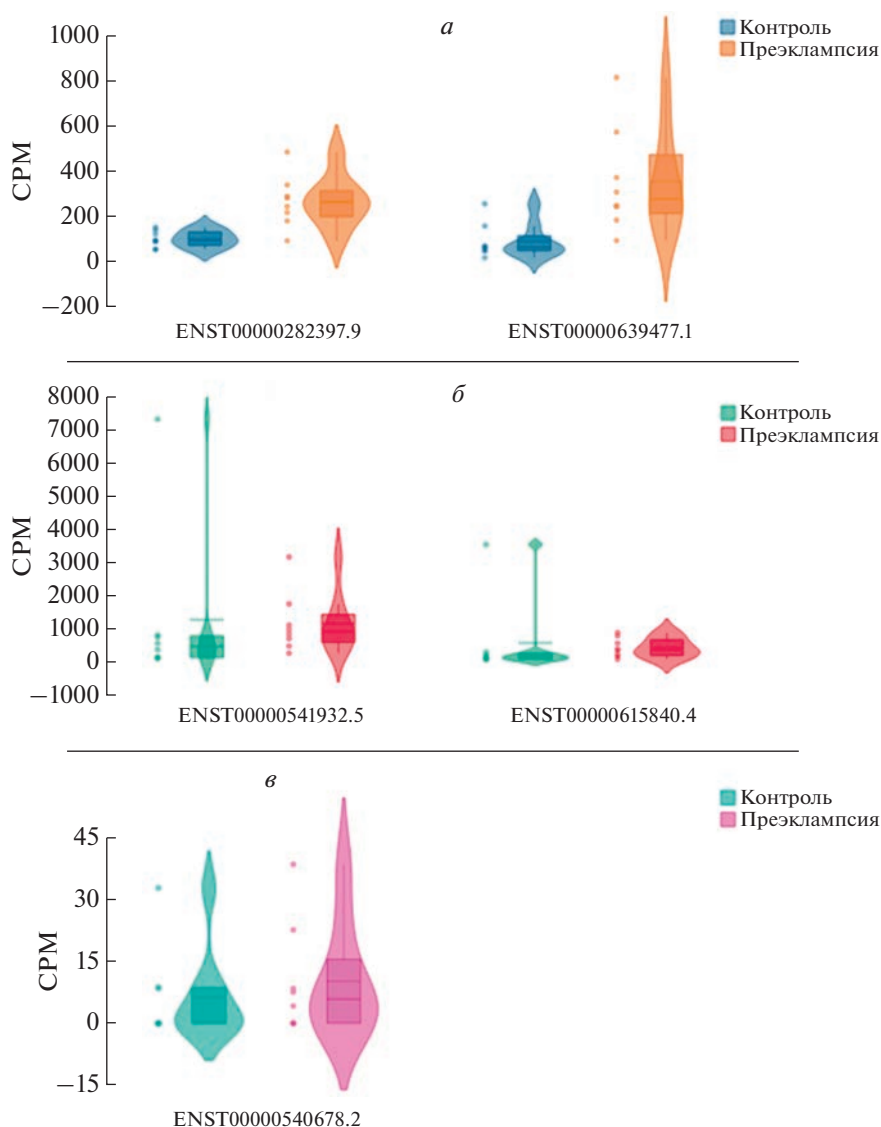


Рис. 6. Вариабельность изоформ гена *FLT1* в клетках СТБ.

ски значительно различается в клетках СТБ женщин с ПЭ и с физиологическим течением беременности. Кластер ДЭГ содержит не только известные гены-кандидаты, выявленные ранее во многих зарубежных полногеномных исследованиях плаценты (к примеру, *LEP*, *INHBA* и *FLT1*), но и новые гены (*AC098613.1*, *AC087857.1*, *FCRLB*, *TENM4*, *PTP4A1P7*, *LINC01225* и др.), которые могут рассматриваться в качестве новых биологических маркеров ПЭ и представляют интерес для дальнейшего изучения. Результаты функциональной аннотации ДЭГ показывают, что с развитием ПЭ на уровне СТБ могут быть связаны сигнальные пути регуляции гормональной секреции, MAPK-каскада, ERK1 и ERK2 каскада, положительной регуляции клеточной адгезии, пролиферации эндотелиальных клеток и др. Полученные результа-

ты анализа АС гена *FLT1* свидетельствуют о важной роли в патогенетике ПЭ данного механизма процессинга РНК, который существенно увеличивает транскрипционное разнообразие генов-кандидатов ПЭ в клетках СТБ.

Профилирование плацентарного транскриптома на уровне единичных клеток и отдельных субпопуляций клеток плацентарной ткани, а также интегративный анализ с геномными, протеомными и метиломными данными представляет собой огромный потенциал для расширения знаний о функционировании плаценты как при физиологической, так и патологической беременности, выявления основных причинно-следственных механизмов развития ПЭ, а также для прогнозирования и улучшения материнских и перинаталь-

ных исходов при осложненном течении беременности.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gong S., Gaccioli F., Dopierala J. et al. The RNA landscape of the human placenta in health and disease // Nat. Communications. 2021. V. 12. № 1. P. 2639. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22695-y>
2. Dimitriadis E., Rolnik D.L., Zhou W. et al. Pre-eclampsia // Nat. Reviews Disease Primers. 2023. V. 9. № 1. P. 8. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00417-6>
3. Verlohren S., Brennecke S.P., Galindo A. et al. Clinical interpretation and implementation of the sFlt-1/PIGF ratio in the prediction, diagnosis and management of preeclampsia // Pregnancy Hypertension. 2022. V. 27. P. 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2021.12.003>
4. Jena M.K., Sharma N.R., Pettit M. et al. Pathogenesis of preeclampsia and therapeutic approaches targeting the placenta // Biomolecules. 2020. V. 10. № 6. P. 953. <https://doi.org/10.3390/biom10060953>
5. Redman C.W.G., Staff A.C., Roberts J.M. Syncytiotrophoblast stress in preeclampsia: the convergence point for multiple pathways // Am. J. Obstetrics and Gynecology. 2022. V. 226. № 2. P. S907–S927. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.09.047>
6. Tsang J.C.H., Vong J.S., Ji L. et al. Integrative single-cell and cell-free plasma RNA transcriptomics elucidates placental cellular dynamics // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 37. P. E7786–E7795. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710470114>
7. Li H., Huang Q., Liu Y., Garmire L.X. Single cell transcriptome research in human placenta // Reproduction (Cambridge, England). 2020. V. 160. № 6. P. R155. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0231>
8. Benton S.J., Leavey K., Grynspan D. et al. The clinical heterogeneity of preeclampsia is related to both placental gene expression and placental histopathology // Am. J. Obstetrics and Gynecology. 2018. V. 219. № 6. P. 604.e1–604.e25. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.09.036>
9. Trifonova E.A., Gabidulina T.V., Ershov N.I. et al. Analysis of the placental tissue transcriptome of normal and preeclampsia complicated pregnancies // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 2(21). P. 71–83. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-2-71-83>
10. Vashukova E.S., Glotov A.S., Fedotov P.V. et al. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by superimposed pre-eclampsia on chronic hypertension // Mol. Med. Reports. 2016. V. 14. № 1. P. 22–32. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5268>
11. Liu S., Xie X., Lei H. et al. Identification of key circRNAs/lncRNAs/miRNAs/mRNAs and pathways in preeclampsia using bioinformatics analysis // Medical Science Monitor: Intern. Med. J. Experim. Clin. Research. 2019. V. 25. P. 1679. <https://doi.org/10.12659/MSM.912801>
12. Robson S.C., Simpson H., Ball E. et al. Punch biopsy of the human placental bed // Am. J. Obstetrics and Gynecology. 2002. V. 187. № 5. P. 1349–1355. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.126866>
13. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // Bioinformatics. 2010. V. 26. № 1. P. 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
14. Liberzon A., Subramanian A., Pinchback R. et al. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0 // Bioinformatics. 2011. V. 27. № 12. P. 1739–1740. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr260>
15. Franz M., Rodriguez H., Lopes C. et al. GeneMANIA update 2018 // Nucl. Acids Res. 2018. V. 46. № W1. P. W60–W64. <https://doi.org/10.1093/nar/gky311>
16. Vaquero-Garcia J., Aicher J.K., Jewell S. et al. RNA splicing analysis using heterogeneous and large RNA-seq datasets // Nat. Communications. 2023. V. 14. № 1. P. 1230. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36585-y>
17. Wang Z., Zhao G., Zibrila A.I. et al. Acetylcholine ameliorated hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in trophoblast cells via p38 MAPK/NF-κB pathway // Mol. Hum. Reproduction. 2021. V. 27. № 8. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab045>
18. Guo L., Liu M., Duan T. Hydrogen suppresses oxidative stress by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in preeclampsia // Adv. Clin. & Experim. Medicine. 2023. V. 32. № 3. P. 357–367. <https://doi.org/10.17219/acem/154623>
19. Zhang J., Liu X., Gao Y. Abnormal H3K27 histone methylation of RASA1 gene leads to unexplained recurrent spontaneous abortion by regulating Ras-MAPK pathway in trophoblast cells // Mol. Biol. Reports. 2021. V. 48. № 6. P. 5109–5119. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06507-6>
20. Karumanchi S.A. Angiogenic factors in preeclampsia: from diagnosis to therapy // Hypertension. 2016. V. 67. № 6. P. 1072–1079. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06421>
21. Hiratsuka S., Minowa O., Kuno J. et al. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. № 16. P. 9349–9354. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9349>
22. Palmer K.R., Kaitu'u-Lino T.U.J., Hastie R. et al. Placental-specific sFLT-1 e15a protein is increased in preeclampsia, antagonizes vascular endothelial growth factor signaling, and has antiangiogenic activity // Hypertension. 2015. V. 66. № 6. P. 1251–1259. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05883>
23. Palmer K. Assessing the circulating placental-specific anti-angiogenic protein sFLT-1 e15a in preeclampsia // Preeclampsia: Methods and Protocols. 2018. P. 27–37. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6_3

Transcriptomic Profiling of Placental Cells in Preeclampsia as an Effective Tool for Personalized Medicine

E. A. Trifonova^{a, *}, A. A. Babovskaya^a, A. A. Zarubin^a, V. N. Serebrova^a,
M. M. Gavrilenko^a, M. G. Svarovskaya^a, E. V. Izhoynina^b, I. G. Kutsenko^b, and V. A. Stepanov^a

^aResearch Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, 634050 Russia

^bSiberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

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

At present transcriptomics is one of the fastest developing fields of molecular biology, which allows to obtain detailed information about the functional activity of the genome both in normal and pathological conditions. We used modern transcriptomic technologies to comprehensively characterize the whole genome gene expression profile of human placental syncytiotrophoblast cells (STB) in physiological pregnancy and preeclampsia (PE). As a result of our analysis, we identified 26 differentially expressed genes (DEGs) in the STB cells between healthy and diseased states. The cluster of DEGs contains not only well-known candidate genes identified earlier in many foreign whole genome studies of the placenta (for example, *LEP*, *INHBA* and *FLT1*), but also new genes (*AC098613.1*, *AC087857.1*, *FCRLB*, *TENM4*, *PTP4A1P7*, *LINC01225*, etc.) that can be considered as new biological markers of PE and are of interest for further study. Functional enrichment annotation indicated that most of the DEGs were implicated in the signaling pathways of regulation of hormonal secretion, MAPK cascade, ERK1 and ERK2 cascade, positive regulation of cell adhesion and proliferation of endothelial cells. These processes may be associated with the development of PE at the STB cells level. Additionally, we revealed that alternative splicing of the *FLT1* gene indicate the important role of this RNA processing mechanism in the pathogenetics of PE due to a significant increase in the transcriptional diversity of genes in STB cells. The expression level of the transcript encoding the protein isoform FLT-1 e15a was significantly increased in patients with PE compared to the control group. This study expands understanding of the molecular mechanisms involved in PE and can serve as a basis for developing of preventive, prognostic and therapeutic strategies in the field of personalized obstetrics.

Keywords: whole transcriptome sequencing, placenta, syncytiotrophoblast, gene, sFlt-1, alternative splicing, MAPK cascade.