

УДК 575.174.015.3:599.9

Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией

Е. А. Трифонова¹, Т. В. Габидулина², Н. И. Ершов³, В. Н. Сереброва¹, А. Ю. Ворожищева⁴, В. А. Степанов^{1*}

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН, 634050, Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

²Сибирский государственный медицинский университет Минздрава РФ, кафедра акушерства и гинекологии ФПК и ППС, 634050, Томск, ул. Московский тракт, 2

³Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

⁴МЛПУ «Городская клиническая больница № 1», 654057, Новокузнецк, просп. Бардина, 28

*E-mail: vadim.stefanov@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 28.08.2013

После доработки 23.12.2013

РЕФЕРАТ Преэклампсия (ПЭ) – одно из наиболее тяжелых гестационных осложнений, занимает ведущее место среди причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности, причем в последние годы отмечается рост тяжелых и сочетанных форм данной патологии. Согласно современным представлениям в развитии ПЭ, которая характеризуется синдромом полиорганной недостаточности, ведущую роль играют нарушение инвазии цитотрофобласта в спиральные артерии матки и формирование в плацентарной ткани синдрома ишемии-реперфузии. В связи с этим целью нашей работы состояла в изучении паттернов транскриптома плацентарной ткани, специфичных для женщин с ПЭ и с физиологическим течением беременности, а также в выявлении потенциальных перспективных биомаркеров и молекулярных механизмов развития данной патологии. Выявлены 63 гена, экспрессия которых статистически значимо различается в плацентарной ткани женщин с ПЭ и с физиологическим течением беременности. Кластер дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), уровень экспрессии которых повышен при ПЭ, содержит не только известные гены-кандидаты, выявленные ранее во многих зарубежных полногеномных исследованиях (к примеру, *LEP*, *BHLHB2*, *SIGLEC6*, *RDH13*, *BCL6*), но и новые гены (*ANKRD37*, *SYDE1*, *CYBA*, *ITGB2* 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 могут быть связаны реакция на стресс, иммунные процессы, регуляция межклеточных взаимодействий, внутриклеточные сигнальные каскады и др. Кроме того, выявлены особенности дифференциальной экспрессии генов, зависящие от степени тяжести ПЭ, получены доказательства важной роли молекулярных механизмов, обуславливающих нарушения иммунологической толерантности и запуск провоспалительного каскада в развитии тяжелой формы ПЭ. Полученные результаты расширяют представление о патофизиологии ПЭ и содержат информацию, необходимую для разработки мероприятий таргетной терапии этого заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА микрочипы, плацента, полногеномный анализ, преэклампсия, транскриптом, экспрессия генов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; МФЗ – многофакторные заболевания; ПЭ – преэклампсия; GWAS – полногеномное исследование ассоциаций; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

ВВЕДЕНИЕ

Проведенные к настоящему времени многочисленные полногеномные исследования ассоциаций (GWAS) предоставили ценную информацию о гене-

тической архитектуре многофакторных заболеваний (МФЗ) человека и выявили сотни рискованных аллелей однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), связанных с большим количеством фенотипов. Однако они

объясняют лишь относительно малую часть наследования сложных признаков и оказывают весьма умеренный эффект на фенотип ассоциированных вариантов [1]. Эти результаты поставили интенсивно обсуждаемый в настоящее время вопрос об «упущенной наследственности» (missing heritability). Другое ограничение эффективности GWAS в отношении изучения структуры наследственной компоненты предрасположенности к МФЗ связано с использованием tagSNP: рисковые аллели, идентифицированные в ходе GWAS, как правило, не относятся к «причинным», а находятся в неравновесии по сцеплению (LD) с аллелями функционально значимых вариантов [2], поэтому серьезную проблему представляет биологическая интерпретация результатов GWAS.

Большинство используемых на сегодняшний день подходов к идентификации «причинных» аллельных вариантов, сцепленных с полиморфизмами, детектированными в GWAS, основано на анализе кодирующих или транскрибируемых участков генома [2–4]. Однако подавляющее большинство SNP, выявленных при GWAS, находятся в нетранскрибируемых областях, не сцеплены с вариантами, расположенными в экзонах, и основной механизм их действия связан, по-видимому, с регуляцией экспрессии генов [5, 6]. Поэтому при исследовании генетической архитектуры и молекулярных механизмов МФЗ особую актуальность приобретают постгеномные методы, позволяющие в короткий срок получить информацию практически обо всех компонентах, координирующих основные функции генов, РНК и белков на различных иерархических уровнях. Один из таких подходов, а именно высокопроизводительное измерение экспрессии генов с помощью технологии микрочипов, использован в представленной работе для характеристики паттернов транскриптома при физиологической беременности и при преэклампсии (ПЭ), одном из наиболее тяжелых гестационных осложнений.

Преэклампсия, при которой развивается синдром полиорганной недостаточности, – специфичный синдром, который возникает после 20-й недели беременности и определяется по наличию артериальной гипертензии и протеинурии. ПЭ диагностируется в 70% случаев гипертензивных расстройств у беременных, причем в последние годы отмечается рост частоты тяжелых и сочетанных форм данной патологии [7]. Несмотря на большое количество теорий этиопатогенеза (неврогенная, гормональная, плацентарная, иммунологическая, генетическая и др.), многочисленные исследования механизмов развития этого заболевания и появление новых методов лечения, ПЭ продолжает занимать ведущее место среди причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. На долю этой патологии приходится

до 70% мертворождений и выкидышей, а величина перинатальных потерь при ПЭ возрастает почти в 5 раз [7, 8].

Согласно современным представлениям, этиопатогенез преэклампсии тесно связан с нарушением инвазии цитотрофобласта в спиральные артерии матки и с формированием синдрома ишемии-реперфузии, обуславливающего развитие окислительного стресса и системного воспаления [9, 10]. Этиологические факторы и механизмы этого нарушения на сегодняшний день остаются не вполне ясными и требуют пристального внимания. С целью выявления возможных перспективных биомаркеров ПЭ и изучения молекулярных механизмов гестационных осложнений мы анализировали паттерны плацентарного транскриптома, специфичные для ПЭ и физиологического течения беременности, поскольку очевидно, что ведущая роль в развитии ПЭ принадлежит плацентарной ткани. Стратегия использования микрочипов в данном контексте представляется достаточно обоснованной и мощной, так как позволяет детально исследовать на уровне транскриптома возможные изменения в экспрессии генов, связанных с патофизиологией преэклампсии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика обследованных групп

В рамках данной работы были обследованы 10 пациенток с ПЭ и 11 с физиологическим течением беременности, составивших контрольную группу (табл. 1). В анкету были включены сведения о демографических (этническая принадлежность) и антропометрических (рост, вес) параметрах, образе жизни (курение, злоупотребление психоактивными веществами), а также информация о соматическом и акушерско-гинекологическом анамнезе. Диагноз ПЭ был установлен на основании ведущих клинических симптомов различной степени выраженности, таких, как протеинурия, отеки, гипертензия (систолическое давление более 140 мм рт. ст., диастолическое – от 90 мм рт. ст.), в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра. Степень тяжести ПЭ оценивали по критериям клинического протокола 2012 года «Гипертензия во время беременности. Преэклампсия. Эклампсия» [11].

Группа больных ПЭ была неоднородной как по степени тяжести (в исследование вошли шесть пациенток с умеренно выраженной и четыре пациентки с тяжелой формой ПЭ), так и по наличию предшествовавших и сопутствующих фоновых заболеваний: у четырех пациенток диагностирована ПЭ при отсутствии фоновых заболеваний, у остальных гестационное осложнение развилось на фоне таких экс-

Таблица 1. Характеристика обследованных групп

Показатель	ПЭ, N = 10	Контрольная группа, N = 11	Уровень значимости, p*
Средний возраст, лет	26 ± 2	28 ± 3	0.241
Средний вес, кг	60 ± 7	62 ± 6	0.324
Индекс массы тела, ИМТ	23 ± 4	23 ± 3	0.832
Среднее максимальное систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	162 ± 19	121 ± 3	0.0001
Среднее максимальное диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	104 ± 13	80 ± 4	0.0001
Срок родов, недели	38 ± 1	40 ± 2	0.009
Вес новорожденных, г	2783 ± 560	3549 ± 345	0.004
Рост новорожденных, см	50 ± 4	53 ± 2	0.021
Преждевременные роды, %	50	0	0.012
Наличие хронических заболеваний, %	60	50	0.575

*Уровень значимости определен при сравнении групп с помощью критерия Манна–Уитни или точного критерия Фишера.

трагениальных заболеваний, как вегетососудистая дистония по гипо-/гипертоническому типу, хронический пиелонефрит, хронический холецистит, хроническая артериальная гипертензия. У шести женщин контрольной группы также зафиксирован хронический пиелонефрит и хронический холецистит. Возраст беременных в обеих группах варьировал от 18 до 33 лет, по показателю среднего возраста группы были сопоставимы. Выявлены статистически значимые отличия по весу и росту новорожденных из контрольной группы и группы больных. Группы различались также по показателям артериального давления и срока родов.

Сбор плацентарных образцов

В работе исследовали дистальную (материнскую) часть плаценты. Ткань забирали сразу после родов (время ишемии образца не превышало 10 мин). Плацентарные биоптаты забирали из центральных зон близко к пуповине на 0.5 см плацентарной глубины. Образцы были собраны из макроскопически нормальных участков плаценты (без кровоизлияний, кальцификации, некроза и осадений фибрина), не затрагивая крупные сосуды, промыты физиологическим раствором для удаления остатков материнской крови и амниотической жидкости, сразу погружены в RNAlater (Ambion, Великобритания) и перенесены на хранение при -80°C до процедуры выделения РНК. При гистологическом исследовании

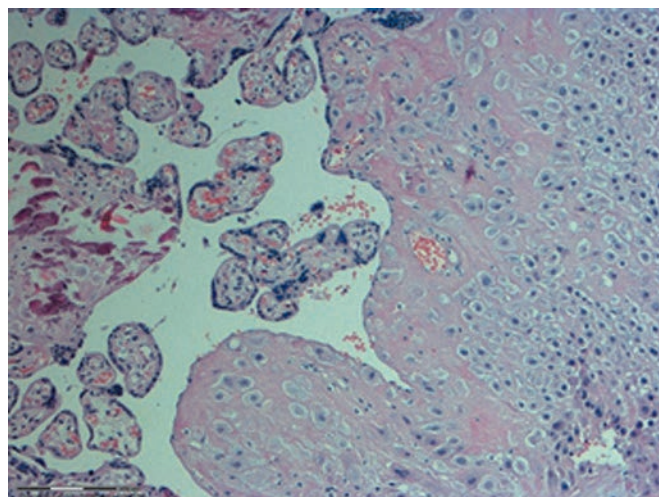


Рис. 1. Микрофотография одного из биоптатов плаценты. Окраска гематоксилином-эозином

во всех биоптатах определялись ворсинки хориона и децидуальная ткань с очагами фибриноидного некроза и мелкими кальцинатами (рис. 1).

Выделение РНК

Образцы ткани (100–200 мг) гомогенизировали с помощью TissueLyser (Qiagen) в Trizol и далее выделяли РНК по стандартному протоколу. Концентра-

цию суммарной РНК определяли с использованием на Nanodrop ND-1000 по поглощению при длине волны 260 нм в воде. Качество образцов контролировали с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) и спектрофотометрического сканирования.

Анализ микроматриц

Полногеномный профиль экспрессии генов в ткани плаценты определяли с помощью гибридизации на микроматрицах HT-12 BeadChip (Illumina, США), содержащих информацию более чем о 48000 транскриптов. После гибридизации микроматрицы сканирование на приборе Illumina BeadArray Reader. Преобразование первичных данных в средние значения интенсивности сигнала по каждой пробе (Sample Probe Profile) проводили с помощью программного пакета BeadStudio v3 (Illumina).

Биоинформатический анализ

Анализ данных проводили в программной среде R с помощью пакета limma [12]. Для всего набора данных проводили непараметрическую коррекцию фона с последующей квантильной нормализацией (функция *neqc*). В дальнейшем рассмотрение вошли пробы, выявленные во всех образцах хотя бы одной из экспериментальных групп (detection p -value < 0.01). Анализ дифференциальной экспрессии проводили с использованием множественной линейной регрессии и модерируемой t -статистики [12], включая оценку весов качества чтения микроматриц [13] и поправку на множественные сравнения Бенжамини–Хохберга (FDR). Значимым считали изменение уровня экспрессии гена (FC – fold change) в 1.5 раза и более при скорректированном уровне значимости $p \leq 0.1$. Функциональную аннотацию и функциональный кластерный анализ групп дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) осуществляли с помощью Web-инструмента DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) с использованием стандартных значений параметров кластеризации и уровнем обогащения EASE ≤ 0.01 [14]. Конструирование генных сетей проводили с использованием программы STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) 9.0 [15].

Проведение настоящего исследования одобрено комитетом по этике при ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» СО РАМН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного нами анализа выявлены 63 гена, экспрессия которых статистически значимо различается (FDR < 0.1; FC ≥ 1.5) в плацентарной тка-

ни женщин с ПЭ и физиологическим течением беременности (50 ДЭГ с повышенным и 13 со сниженным уровнем экспрессии). Кластер ДЭГ, экспрессия которых повышена при ПЭ, включает не только известные гены-кандидаты, выявленные ранее во многих полногеномных исследованиях профилей экспрессии генов плаценты при преэклампсии (к примеру, *LEP*, *BHLHB2*, *SIGLEC6*, *RDH13*, *BCL6*), но также новые потенциальные гены-кандидаты (*CORO2A*, *SYDE1*, *PLIN2*, *CEBPA*, *HK2*, *NDRG1*, *ERRFI1*, *EFNB1*, *GFOD2*, *NCOR2*, *HMHA1*, *HERPUD1*, *KIF2A*), связь которых с развитием ПЭ установлена либо в единичных исследованиях [16–21], либо впервые в нашей работе. Продукты некоторых из этих генов, согласно известным на сегодняшний день данным об их функциональных особенностях, вполне могут быть вовлечены в этиопатогенез ПЭ.

На *рис. 2* представлена теплокарта, показывающая результаты иерархической кластеризации женщин по уровню экспрессии 63 ДЭГ. Видно, что все пациентки с ПЭ, за исключением одной, попадают в один кластер, в то время как женщины с физиологическим течением беременности – в другой. Отнесение одного образца с ПЭ в контрольную группу обусловлено, вероятно, существенной межиндивидуальной вариабельностью уровней транскрипции генов плацентарной ткани. Подобное явление наблюдали в ряде клеточных линий человека, в частности транскриптома гепатоцитов [22, 23].

В *табл. 2* представлены данные о наиболее значимых ДЭГ (FC > 2, FDR < 0.01). Интерес вызывает присутствие в этом списке некоторых генов, продукты которых участвуют в регуляции транскрипции (*BHLHB2*, *ZNF175*, *ANKRD37*, *BCL6*), а также значительное повышение уровня экспрессии гена *LEP* и гена его рецептора *SIGLEC6* при развитии ПЭ.

С целью изучения биологических процессов, связанных с развитием ПЭ, мы проанализировали ДЭГ с помощью он-лайн ресурса DAVID (*рис. 3*). Основные категории молекулярных функций белковых продуктов данных генов включают реакцию на различные стимулы, иммунные процессы, регуляцию клеточных коммуникаций, внутриклеточные сигнальные каскады и др. Анализ метаболических путей, в которые включены ДЭГ, указывает на возможное участие в молекулярных механизмах ПЭ путей цитотоксичности, обусловленной NK-клетками, трансэндотелиальной миграции лейкоцитов и сигнальных путей, опосредованных активаторами GTP-аз.

Для выявления возможных взаимоотношений ДЭГ был проведен анализ белок-белковых взаимодействий продуктов ДЭГ (*рис. 4*). Ассоциации в построенной сети основаны в основном на «text mining» (упомянутые в резюме одной статьи). Обращает

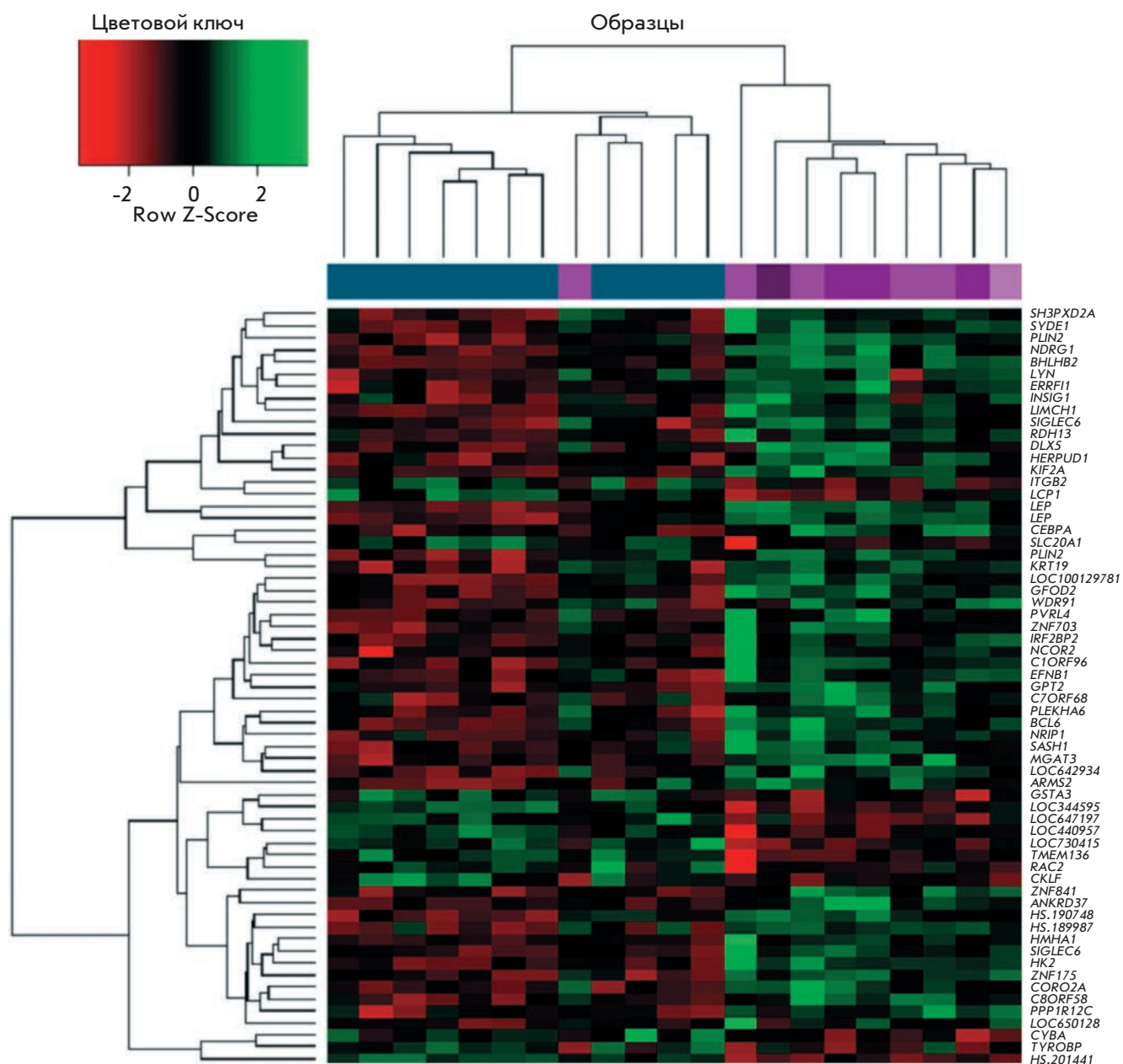


Рис. 2. Теплокарта ДЭГ (FDR < 0.1; FC ≤ 1.5). Каждый столбец представляет образец, каждая строка – ДЭГ. Розовым цветом маркированы образцы от пациенток с ПЭ, синим – от женщин контрольной группы. Цветовая шкала теплокарты обозначает отклонение нормализованного уровня экспрессии в данной ячейке от среднего по строке

на себя внимание кластер коэкспрессии, включающий гены *RAC2*, *CYBA*, *TYROBP*, *HMHA1*, *ITGB2*, *LYN* и *LCP1*. Кроме того, определенный интерес вызывают пары *LEP*/его рецептор *SIGLEC6*, эфрин и его киназа *LYN*.

В нашей работе выявлены также особенности дифференциальной экспрессии генов в зависимости

от степени тяжести ПЭ (табл. 3). Всего найдено восемь ДЭГ (FDR < 0.1; FC ≤ 1.5), уровень экспрессии которых статистически значимо отличается при умеренной и тяжелой формах заболевания. Наибольший интерес, на наш взгляд, представляет *BAG3*, кодирующий Bcl-2-связывающий белок Bis, основная функция которого – ингибирование шаперонной ак-

Таблица 2. Наиболее значимые дифференциально экспрессирующиеся гены

№	Изменение уровня экспрессии	FC	p-уровень FDR	Ген	Хромосома	Продукт гена	Основные функции*
1	↑	1.054	0.0007	<i>LEP</i>	7	Лептин	Ген кодирует белок, секретируемый адипоцитами и играющий важную роль в регуляции потребления пищи и/или расхода энергии для поддержания постоянства жировой массы. Лептин также участвует в регуляции иммунных, воспалительных реакций и процессов кровотока, стимулировании ангиогенеза и ингибировании апоптоза.
2	↓	3.84	0.0001	<i>HS.201441</i>	13	Длинная некодирующая РНК 284	По данным анализа EST-библиотек тканеспецифичная экспрессия гена <i>HS.201441</i> наблюдается преимущественно в плаценте и яйцниках.
3	↑	2.95	0.0000	<i>BHLHE40</i>	3	Транскрипционный фактор с доменом спираль-петля-спираль	Транскрипционный фактор, модулирующий хондрогенез в рамках сAMP-сигнального пути. Вовлечен в контроль клеточной дифференцировки.
4	↑	2.93	0.0031	<i>ANKRD37</i>	4	Повторяющийся домен анкирина 37	Кодируемый белок содержит четыре анкириновых повтора, которые являются медиаторами белок-белковых взаимодействий и вовлечены в регуляцию функционирования таких ключевых факторов транскрипции, как NFκB и TP53. Кроме того, получены данные, свидетельствующие о важной роли ANKRD37 в клеточном ответе на гипоксию [24].
5	↑	2.91	0.0067	<i>SIGLEC6</i>	19	Иммуноглобулинподобный лектин 6, связывающий сиаловую кислоту	Иммуноглобулинподобные лектины, связывающие сиаловые кислоты, представляют собой семейство мембранных белков типа I, которые распознают сиалированные гликаны и связываются с ними. SIGLEC6 взаимодействует с α-2,6-связанной сиаловой кислотой клеточных мембран иммунных клеток и регулирует клеточную адгезию, таким образом, принимая участие в иммунном ответе. Кроме того, SIGLEC6 является лигандом лептина [25].
6	↑	2.64	0.0006	<i>ZNF175</i>	19	Белок цинковых пальцев 175	Негативная регуляция экспрессии различных хемокиновых рецепторов.
7	↑	2.43	0.0031	<i>CCSAP (C1orf96)</i>	1	Белок, локализующийся в центриоле, ресничках и веретене деления (открывающая рамка считывания 96, хромосома 1)	Предположительно играет роль в эмбриональном развитии.

8	↑	2.43	0.0050	<i>GPT2</i>	16	Аланин-аминотрансфераза 2; глутамат-пируват-трансминаза	Катализирует обратимое трансаминирование между аланином и 2-оксоглутаратом с образованием пирувата и глутамата, участвуя в метаболизме аминокислот и глюконеогенезе.
9	↑	2.39	0.0050	<i>RDN13</i>	19	Релинолдегидрогеназа 13	Катализирует окисление и восстановление региноидов, участвует в защите митохондрий от окислительного стресса.
10	↑	2.36	0.0006	<i>BCL6</i>	3	Транскрипционный фактор – белок цинковых пальцев 51	Содержит N-концевой POZ/BTV-домен и является специфичным к последовательности репрессором транскрипции. Принимает участие в модуляции STAT-зависимого IL-4-индуцируемого иммунного ответа с привлечением В-клеток, формировании антител и лимфоангиогенезе.
11	↑	2.33	0.0056	<i>PLIN2</i>	9	Перилипин 2, белок липидных капель	Функция перилипина в базовых клетках заключается в стабилизации хранилищ нейтральных липидов. В активированных клетках его функции связаны с обеспечением PKA-активированного липолиза.
12	↑	2.31	0.0174	<i>NR1P1</i>	21	Ядерный фактор RIP140	Модулирует транскрипционную активность стероидных рецепторов, таких, как NR3C1, NR3C2 и ESR1 в ядре. Может действовать как репрессор или активатор транскрипции в зависимости от транскрипционных факторов, с которыми взаимодействует [26].
13	↑	2.18	0.0407	<i>HILPDA (C7orf68)</i>	7	Индукцируемый гипоксией белок 2 (открытая рамка считывания 68, хромосома 7)	Ген кодирует индуцируемый гипоксией фактор 2, который способствует внутриклеточному накоплению липидов, стимулирует экспрессию цитокинов, включая IL-6, MIF и VEGFA, усиливает рост и пролиферацию клеток.
14	↑	2.18	0.0006	<i>SYDE1</i>	19	Белок, активирующий GTP-азу, гомолог 1	Белок семейства Rho GTP-аз, играющих важную роль в клеточной пролиферации, апоптозе, экспрессии генов и регуляции внутриклеточной динамики актина.
15	↑	2.06	0.0050	<i>CORO2A</i>	9	Коронин 2A	Относится к семейству актинсвязывающих белков, выполняющих важные функции, связанные с клеточной подвижностью, мембранным транспортом, трансдукцией межклеточных сигналов. Показано, что коронин 2A служит медиатором Toll-подобных рецепторов и принимает участие в воспалительном ответе [27].

*Информация из базы данных GeneCards (<http://www.genecards.org/>) с дополнениями.

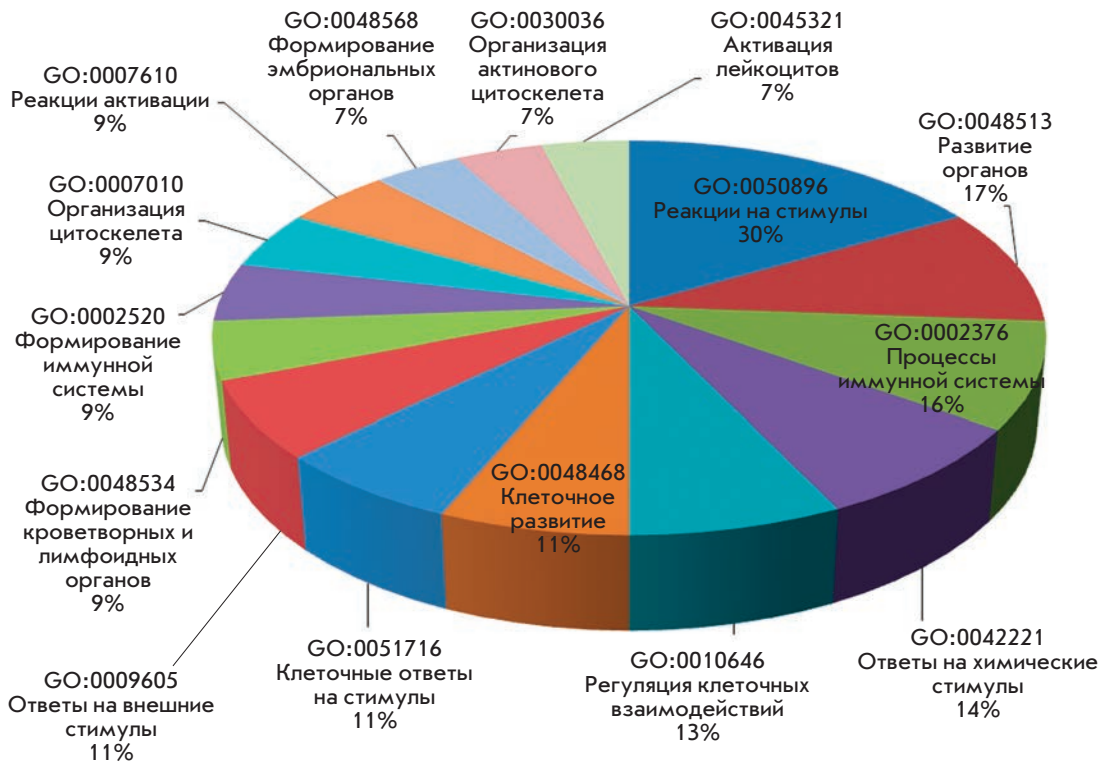
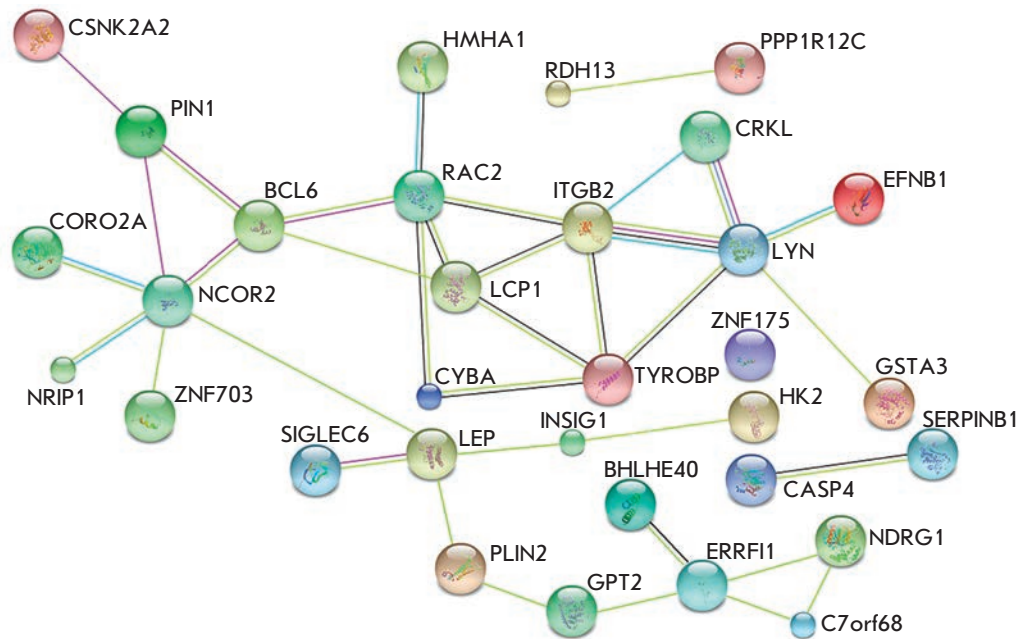


Рис. 3. Основные биологические процессы, в которые вовлечены ДЭГ, ассоциированные с преэклампсией ($p < 0.05$). Процентное соотношение указывает долю идентифицированных ДЭГ, связанных с данным процессом

Рис. 4. Белок-белковые взаимодействия продуктов ДЭГ. Белки представлены на рисунке в виде кругов, цвет линии между которыми указывает на категорию доказательства белок-белковых взаимодействий: желтый – литературные данные («text mining»), черный – согласно анализу коэкспрессии генов, фиолетовый – результаты экспериментальных работ, голубой – свидетельства, полученные из баз данных, розовый – совокупные доказательства



тивности комплекса HSP70/HSC70 и *HSPA1A*, кодирующего высококонсервативный белок теплового шока 70 (HSP70).

Сравнительный анализ профилей экспрессии генов в ткани плаценты у женщин с умеренно выраженной формой ПЭ и в контрольной группе выявил 56 транскриптов 52 генов, уровни транскрипции ко-

торых статистически значимо различаются в этих выборках. Более выраженными были изменения профиля экспрессии при тяжелой форме ПЭ: обнаружено значительное повышение экспрессии 55 и снижение экспрессии 35 генов по сравнению с физиологической беременностью (рис. 5). Необходимо отметить, что наряду с небольшим количеством

Таблица 3. Список генов, дифференциально экспрессирующихся (FDR < 0.1; FC ≤ 1.5) при умеренной и тяжелой формах преэклампсии

Ген	Изменение уровня экспрессии	FC	p-уровень FDR	Продукт гена
<i>HSPA1A</i>	↑	6.44	0.079549	Белок теплового шока 70, HSP70-1A
<i>BAG3</i>	↑	2.14	0.073131	Bcl-2-ассоциированный атаноген 3
<i>SNHG8</i>	↑	1.78	0.04105	Малая ядрышковая РНК 8
<i>LOC729660</i>	↓	2.63	0.010437	Нет данных
<i>LOC728457</i>	↓	2.43	0.010437	Нет данных
<i>APOC1</i>	↓	2.28	0.04433	Аполипопротеин C1
<i>LOC401357</i>	↓	2.27	0.010399	Нет данных
<i>LOC100128326</i>	↓	1.92	0.079549	Нет данных

Таблица 4. Основные биологические процессы, в которые вовлечены дифференциально экспрессирующиеся гены, характерные для тяжелой формы преэклампсии

Категории биологических процессов	Ген	p*
Процессинг и представление пептидов или полисахаридных антигенов молекулами МНС класса II (GO:0002504)	<i>HLA-DPA1, CD74, HLA-DMA, HLA-DRA</i>	0.0421
Процессинг и презентация экзогенных пептидных антигенов (GO:0002478)	<i>HLA-DMA, CD74, HLA-DRA</i>	0.0453
Шаперон-опосредованный фолдинг белков (GO:0051085)	<i>ERO1L, HLA-DMA, CD74</i>	0.0467
Посттрансляционный фолдинг белков <i>de novo</i> (GO:0051084)	<i>ERO1L, HLA-DMA, CD74</i>	0.0478
Реакции с участием несвернутых белковых молекул (GO:0006986)	<i>ERO1L, HSPH1, HSPA1A, HERPUD1</i>	0.0489

*Уровень значимости с поправкой на множественные сравнения Бенжамини–Хохберга, характеризующий правдивость отнесения данного набора генов к определенному биологическому процессу.

общих генов (21 ген), дифференциально экспрессирующихся как при тяжелой, так и при умеренной ПЭ, более 60 ДЭГ были специфичны только для тяжелой формы этой патологии. Результаты функциональной аннотации данных генов в WEB-ресурсе DAVID указывают на ряд биологических процессов, статистически значимо ассоциированных с развитием тяжелой формы ПЭ, таких, как процессинг и представление пептидных или полисахаридных антигенов и фолдинг белков (табл. 4). Анализ метаболических путей, в которые вовлечены эти гены, также свидетельствует о важной роли механизмов процессинга и презентации антигенов в молекулярном патогенезе тяжелой формы ПЭ (согласно базам данных KEGG и BIOCARТА).

ОБСУЖДЕНИЕ

Плацента – ключевой компонент в понимании физиологических процессов, связанных с беременностью. Характеристика генов, важных для функционирования плаценты, необходима для понимания механизмов, лежащих в основе нормальной и патологической гестации. Результаты настоящей работы свидетельствуют о принадлежности идентифицированных ДЭГ к ряду биологических процессов, связанных с иммунными реакциями, межклеточным взаимодействием и ответами на различные стимулы. Необходимо отметить, что анализ, проведенный с помощью модуля для кластеризации функциональных аннотаций («functional annotation clustering») биоинформатического ресурса DAVID, позволил выделить 16 класте-

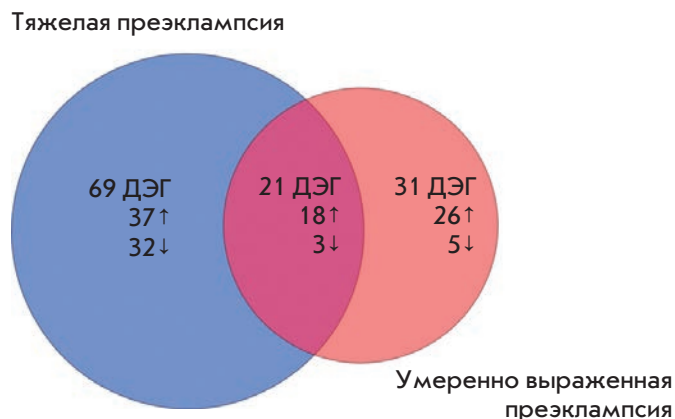


Рис. 5. Диаграмма Венна, показывающая результаты определения профиля экспрессии генов при умеренно выраженной и тяжелой формах преэклампсии и при физиологической беременности. ДЭГ – гены, которые по-разному экспрессируются у женщин с преэклампсией и при физиологическом течении беременности (контрольная группа). Стрелка показывает повышение (↑) или снижение (↓) экспрессии генов

ров, однако только один из них имеет коэффициент обогащения («enrichment score») более 2. Этот кластер включает пять генов (*KRT19*, *RAC2*, *LIMCH1*, *BCL6*, *LCPI1*), вовлеченных в биологические процессы, связанные с организацией актинового цитоскелета (GO:0030036; GO:0030029; GO:0007010). Изучение функциональной роли актинового цитоскелета представляет собой одно из актуальных направлений в изучении механизмов передачи сигнала в клетке. За последние несколько лет опубликованы многочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие о включении актина в регуляцию экспрессии генов, опосредованную его участием в процессе элонгации транскрипции, сборке преинициаторного комплекса, созревании и экспорте мРНК, реорганизации хроматина и др. [28, 29]. Интересным в данном контексте представляется повышение уровня экспрессии гена *CORO2A*, продукт которого, коронин 2А, входит в семейство актинсвязывающих белков и опосредует *Coro2A*/актинзависимый механизм де-репрессии генов воспалительного ответа [27].

Нами не найдено ассоциации развития ПЭ с такими каноническими путями, как нарушение процессов апоптоза и ангиогенеза, описанной в ряде работ [16, 19, 30, 31]. Возможно, это связано с межэтнической вариабельностью профилей экспрессии генов в ткани плаценты, обусловленной популяционной дифференциацией регуляторных участков генома, либо с различными критериями (объем выборок, срок родов, степень тяжести заболевания и т.п.), использованны-

ми при формировании групп обследуемых. Другой фактор, влияющий, по-видимому, на возникновение этих противоречий, – различная плацентарная локализация биоптата, использованного в отдельных исследованиях транскриптома при ПЭ. Так, методом высокопроизводительного секвенирования (RNA-Seq) выявлены значительные различия в профилях экспрессии генов в амнионе, хорионе и децидуальной оболочке плаценты человека [32]. Ранее подобные результаты были получены при анализе на микроматрицах паттернов транскриптома в различных участках плаценты [33].

Несмотря на вышеописанные различия в результатах функциональной аннотации ДЭГ, интересным представляется тот факт, что изменение уровня экспрессии некоторых ДЭГ, идентифицированных в нашей работе, описано также в других исследованиях (табл. 5).

Так, значительное повышение экспрессии гена *LEP* при преэклампсии наблюдали практически во всех полногеномных исследованиях профилей экспрессии генов в плацентарной ткани. Лептин, продукт данного гена, является одним из новых сывороточных маркеров ПЭ. Известно, что лептин относится к адипоцитспецифическим цитокинам, регулирующим энергетический обмен и участвующим в различных метаболических и нейроэндокринных процессах [39]. По показателям веса и индексу массы тела обследованная нами группа пациенток с ПЭ не отличалась статистически значимо от контрольной группы, у них отсутствовала патологическая прибавка веса на протяжении беременности, в связи с чем можно предположить, что вклад лептина в развитие ПЭ определяется другими функциями этого белка. Известно, что плацентарный лептин принимает участие в обеспечении притока питательных веществ к фетоплацентарному комплексу и индуцирует пролиферацию трофобласта путем ингибирования апоптоза [40, 41]. Таким образом, увеличение уровня лептина в плаценте может быть компенсаторным механизмом, направленным против эндотелиальной дисфункции, наблюдаемой при ПЭ. В то же время показано, что лептин участвует в активации симпатoadrenalовой системы, которая способствует возникновению артериальной гипертензии, основного симптома ПЭ [42]. Кроме того, обнаружена важная иммуномодулирующая функция лептина, которая также может вносить вклад в развитие патологии беременности [43]. Несмотря на активное изучение экспрессии гена *LEP*, только отдельные работы посвящены анализу наследственной вариабельности этого гена и ее роли в изменении уровня транскрипции и структуре подверженности к патологии беременности. Показано, что у носителей генотипа AA локуса rs2167270

Таблица 5. Выявленные в настоящей работе дифференциально экспрессирующиеся гены, ассоциация которых с преэклампсией была показана ранее при изучении транскриптома плацентарной ткани

№	Ген	Продукт гена	FC	Уровень значимости	Этническая выборка	Ссылка
1	<i>LEP</i>	Лептин	10.94	< 0.0001*	Японцы	[30]
			8.58	0.036*	Китайцы	[34]
			40.11	1.35×10^{-9}	Европеоиды	[16]
			5.52	0.0020	Европеоиды Афроамериканцы Монголоиды Испанцы	[18]
			108.9	< 0.0001	Европеоиды	[35]
			4.4	< 0.0001	Корейцы	[36]
			≥ 1.5	< 0.05	Китайцы	[37]
			11.79	< 0.01*	Жители США	[38]
2	<i>BCL6</i>	Транскрипционный фактор – белок цинковых пальцев 51	1.78	0.0154	Европеоиды Афроамериканцы Монголоиды Испанцы	[18]
			2.02	0.0024	Японцы	[30]
			2.24	3.58×10^{-5}	Европеоиды	[16]
			2.60	< 0.01*	Жители США	[38]
			≥ 1.5	< 0.05	Китайцы	[37]
3	<i>SIGLEC6</i>	Иммуноглобулинподобный лектин 6, связывающий сиаловую кислоту		0.02*	Жители США	[31]
			2.13	0.001	Европеоиды	[16]
			2.73	< 0.01*	Жители США	[38]
			≥ 1.5	< 0.05	Китайцы	[37]
			4.5	0.019	Европеоиды	[35]
4	<i>RDH13</i>	Ретинолдегидрогеназа 13	-	$3.86 \times 10^{-8**}$	Жители США	[31]
			1.91	< 0.01*	Жители США	[38]
			≥ 1.5	< 0.05	Китайцы	[37]
5	<i>NDRG1</i>	Цитоплазматический белок суперсемейства гидролаз	2.02	0.0001	Японцы	[30]
			2.67	1.12×10^{-5}	Европеоиды	[16]
6	<i>BHLHE40</i>	Транскрипционный фактор с доменом спираль-петля-спираль	1.95	0.0004	Японцы	[30]
			3.08	2.18×10^{-5}	Европеоиды	[16]
7	<i>KRT19</i>	Кератин 19	1.75	0.0071	Японцы	[30]
			2.28	1.59×10^{-5}	Европеоиды	[16]
8	<i>GPT2</i>	Аланинаминотрансфераза 2	2.45	3.70×10^{-5}	Европеоиды	[16]
9	<i>PPP1R12C</i>	Регуляторная субъединица 12А фосфатазы 1	-	$2.16 \times 10^{-8**}$	Жители США	[31]
10	<i>CEBPA</i>	ССААТ/энхансерсвязывающий белок α	-	$2.52 \times 10^{-8**}$	Жители США	[31]
11	<i>HK2</i>	Гексокиназа типа 2	3.90	3.87×10^{-6}	Европеоиды	[16]
12	<i>HMHA1</i>	Минорный антиген гистосовместимости HA1	-	$1.23 \times 10^{-8**}$	Жители США	[31]
13	<i>PVRL4</i>	Нектин 4	2.54	3.62×10^{-5}	Европеоиды	[16]
14	<i>SASH1</i>	SAM- и SH3-доменсодержащий белок 1	2.54	1.22×10^{-7}	Европеоиды	[16]
15	<i>SH3PXD2A</i>	SH3- и PX-доменсодержащий белок 2A	≥ 1.5	< 0.05	Китайцы	[37]
16	<i>SYDE1</i>	Белок, активирующий GTP-азу, гомолог 1	1.55	< 0.01*	Жители США	[38]

*Уровень значимости, рассчитанный с поправкой на множественные сравнения.

(G19A), расположенного в области промотора гена *LEP*, повышен уровень экспрессии этого гена в крови, а также риск развития ПЭ и артериальной гипертензии [44]. В чешской популяции обнаружена ассоциация другого полиморфизма – G2548A, локализованного в промоторе гена *LEP*, с гестационным диабетом [45]. Наряду с этим, в ряде работ [37, 46, 47] выявлено значимое гипометилирование данного локуса, а также нарушение регуляции эпигенома плацентарной ткани при развитии ПЭ.

Особый интерес в контексте роли эпигенетической дисрегуляции в формировании данной патологии представляет наблюдаемое в нашей работе повышение экспрессии гена длиной некодирующей РНК 284 в плацентарной ткани пациенток с ПЭ. Недавно показано, что длинные нкРНК выполняют в клетках жизненно важные регуляторные функции. В частности, предполагается, что они могут функционировать в качестве модульного скаффолда при специфичной высокоупорядоченной организации рибонуклеопротеидных комплексов и индукции эпигенетических изменений этих локусов. Некоторые из длинных нкРНК могут связывать хроматин при помощи ремоделирующих ферментов, а затем принимать участие в модификации локального хроматина, например при метилировании ДНК, иницируя или репрессируя транскрипцию. РНК данного класса могут включаться в связывание транскрипционных факторов и ингибирование экспрессии генов [48].

Интересной представляется ассоциация гиперэкспрессии генов *BAG3* и *HSPA1A* с развитием тяжелой формы ПЭ. Известно, что белковый продукт гена *BAG3* конкурирует с кошапероном Hsp за связывание с АТФ-азным доменом комплекса HSP70/HSC70 и таким образом ингибирует шаперонную активность белка теплового шока 70 (Hsp70) – продукта гена *HSPA1A*, экспрессия которого существенно повышена при тяжелой форме ПЭ (более чем в 6 раз по сравнению с умеренно выраженной ПЭ и в 8 раз по сравнению с контрольной выборкой). Известно, что Hsp70 выполняет различные функции, основные из которых – повышение устойчивости аппарата биосинтеза белка к повреждающим воздействиям и шаперонная активность. Кроме того, получены данные об участии Hsp70 в транспорте белков, проведении внутриклеточного сигнала и протеасомозависимой деградации [49]. Необходимо отметить, что по результатам функциональной аннотации ДЭГ основными процессами, характерными для развития тяжелой формы ПЭ являются процессинг и представление пептидных и полисахаридных антигенов и шаперон-опосредованный фолдинг белков. Поскольку белок теплового шока Hsp70 способен образовывать комплексы с нефолдированными белками и широким спектром пептидных

фрагментов, предшественников антигенных пептидов, представленных на клеточной мембране в составе молекул МНС классов I и II [50], логично предположить, что ключевую роль в патогенезе тяжелой ПЭ играют механизмы иммунологического контроля инвазии трофобласта в стенку матки и факторы иммунологической толерантности в системе мать–плод, патологическое действие которых, как известно, может приводить к осложненному течению беременности. Кроме того, многие белки теплового шока обладают иммунорегуляторной активностью, стимулируют созревание дендритных клеток и являются индукторами некоторых провоспалительных цитокинов [51]. Эти свойства белков также могут вносить свой вклад в механизмы тяжелой ПЭ.

Обнаруженное в настоящей работе статистически значимое снижение экспрессии гена *APOC1* при тяжелой форме ПЭ, вероятно, связано с развитием окислительного стресса в сосудах плаценты либо с недавно открытыми иммуносупрессорными свойствами аполипопротеина C1, кодируемого данным геном [52]. Ранее было показано, что в сыворотке крови пациенток с преэклампсией повышена концентрация триглицерид-богатых липопротеинов, которые могут способствовать развитию эндотелиальной дисфункции [53, 54]. В то же время содержание аполипопротеинов E и A1 в крови снижено при развитии данной патологии [55, 56]. Кроме того, показана протективная роль аллеля $\epsilon 2$ гена *APOE* в популяции курдов, связанная, по мнению авторов работы [57], с высокими антиоксидантными свойствами этого аллеля. Нами не найдены сведения об ассоциации полиморфных вариантов гена *APOC1* с осложненным течением беременности, однако, показано, что инсерционно-делеционный полиморфизм в положении –317 промоторной области данного гена (rs11568822) связан с болезнью Альцгеймера, а маркер rs4803770 – с ишемической болезнью сердца [58, 59]. Поскольку ген *APOC1* расположен в одном кластере с геном *APOE*, предполагается, что эти ассоциации обусловлены сильным неравновесием по сцеплению между данными генами [60]. Тем не менее нами не найдено статистически значимых изменений уровня экспрессии гена *APOE*, поэтому логично рассматривать ген *APOC1* в качестве «самостоятельного» нового ген-кандидата ПЭ. Однако это предположение нуждается в подтверждении.

Таким образом, в настоящей работе получены данные, косвенно подтверждающие иммунологическую гипотезу развития тяжелой формы ПЭ, которая постулирует ключевую роль иммунокомпетентных клеток (В-лимфоцитов, моноцитов, дендритных и НК-клеток) в патофизиологии этого заболевания. В рамках этой теории предполагается, что пусковым

механизмом в этиопатогенезе ПЭ является недостаточная инвазия трофобласта в материнские спиральные артерии, связанная со сниженной экспрессией антигенов HLA и «агрессией» со стороны НК-клеток. В результате снижается плацентарная перфузия и возникает гипоксия на границе мать/плод, которая, в свою очередь, инициирует запуск провоспалительных цитокинов, что приводит к эндотелиальной дисфункции [61]. В-клетки также могут вносить свой вклад в развитие преэклампсии, продуцируя аутоантитела против адренорецепторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа – первое в России полномасштабное исследование дифференциальной экспрессии генов в тканях плаценты при физиологическом и осложненном течении беременности. Полученные результаты свидетельствуют о некоторых процессах, которые могут играть важную роль в молекулярном патогенезе ПЭ: реакции, связанные с иммунным ответом, организацией цитоскелета, межклеточным взаимодействием, ответами на различные стимулы и шаперон-опосредованным фолдингом белков. Интеграция результатов функциональной аннотации ДЭГ, анализа сетевых взаимодействий белков, кодируемых этими генами, и изучения транскриптома плацентарной ткани позволяют выделить ряд новых генов, потенциально связанных с ПЭ: *LEP*, *SIGLEC6*, *VHLHE40*, *BCL6*, *RDH13*, *HSPH1*, *HSPA1A*, *BAG3*, *KRT19*, *RAC2*, *LIMCH1*, *BCL6* и *LCP1*.

Также в нашей работе получены данные, указывающие на значительную роль в развитии тяжелой

формы ПЭ окислительного стресса, индуцирующего повышение экспрессии генов белков теплового шока *Hsp70* и *Hsp105*, вовлеченных в молекулярные механизмы, связанные с нарушением иммунологической толерантности и запуском провоспалительного каскада. В то же время наблюдаемое повышение экспрессии гена *BAG3*, вероятно, связано с компенсаторными механизмами либо с антиапоптотическими свойствами белка, кодируемого данным локусом. Это предположение подтверждается статистически значимым повышением экспрессии белков теплового шока *Hsp70* и *Hsp90*, фактора теплового шока 1 (*HSF1*) и антиапоптотического фактора *Bcl-2* в эндотелиальных клетках плаценты пациенток с преэклампсией по сравнению с женщинами с нормотензивной беременностью [62]. Кроме того, значимость индуцируемых стрессом белков, в том числе и *Hsp70*, в патогенезе ПЭ показана при анализе протеома плацентарной ткани женщин с физиологической и осложненной беременностью [63].

Результаты представленной работы могут быть полезны для понимания молекулярных механизмов ПЭ, поиска новых генов-кандидатов и биомаркеров данной патологии, а также дают информацию для разработки таргетной терапии этого заболевания. ●

Работа поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (соглашение № 8118) и РФФИ (грант № 14-04-01467).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Marigorta U.M., Navarro A. // PLoS Genet. 2013. V. 9. № 6. P. e1003566.
- Manolio T.A., Collins F.S., Cox N.J., Goldstein D.B., Hindorf L.A., Hunter D.J., McCarthy M.I., Ramos E.M., Cardon L.R., Chakravarti A., et al. // Nature. 2009. V. 461. № 7265. P. 747–753.
- Saccone S.F., Rice J.P., Saccone N.L. // Genet Epidemiol. 2006. V. 30. № 6. P. 459–470.
- Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. // Nat. Methods. 2010. V. 7. № 4. P. 248–249.
- Nicolae D.L., Gamazon E., Zhang W., Duan S., Dolan M.E., Cox N.J. // PLoS Genet. 2010. V. 6. № 4. P. e1000888.
- Zhong H., Yang X., Kaplan L.M., Molony C., Schadt E.E. // Am. J. Hum. Genet. 2010. V. 86. № 4. P. 581–591.
- Макаров О.В., Волкова Е.В., Джохадзе Л.С. // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2012. № 1. С. 35–42.
- Айламазян Э.К., Мозговая Е.В. Гестоз: теория и практика. М.: МЕДпресс-информ, 2008. 272 с.
- George E.M., Granger J.P. // Expert Rev. Obstet. Gynecol. 2010. V. 5. № 5. P. 557–566.
- Naljayan M.V., Karumanchi S.A. // Adv. Chronic. Kidney Dis. 2013. V. 20. № 3. P. 265–270.
- Проект «Мать и Дитя». Гипертензия во время беременности. Преэклампсия. Эклампсия. Клинический протокол. М.: ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, 2012. 51 с.
- Smyth G.K. // Stat. Appl. Genet. Mol. Biol. 2004. V. 3. № 1. P. 1544–6115.
- Ritchie M.E., Diyagama D., Neilson J., van Laar R., Dobrovic A., Holloway A., Smyth G.K. // BMC Bioinformatics. 2006. V. 7. P. e261.
- Huang da W., Sherman B.T., Tan Q., Kir J., Liu D., Bryant D., Guo Y., Stephens R., Baseler M.W., Lane H.C., Lempicki R.A. // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. P. 169–175.
- Szklarczyk D., Franceschini A., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Minguez P., Doerks T., Stark M., Muller J., Bork P., et al. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. 561–568.
- Sitras V., Paulssen R.H., Grønaas H., Leirvik J., Hanssen T.A., Vårtun A., Acharya G. // Placenta. 2009. V. 30. № 5. P. 424–433.
- Nishizawa H., Pryor-Koishi K., Kato T., Kowa H., Kurahashi H., Udagawa Y. // Placenta. 2007. V. 28. № 5. P. 487–497.

18. Enquobahrie D.A., Meller M., Rice K., Psaty B.M., Siscovick D.S., Williams M.A. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008. V. 199. № 5. P. e1–11.
19. Founds S.A., Dorman J.S., Conley Y.P. // *J. Obstet. Gynecol. Neonatal. Nurs.* 2008. V. 37. № 2. P. 146–157.
20. Winn V.D., Gormley M., Paquet A.C., Kjaer-Sorensen K., Kramer A., Rumer K.K., Haimov-Kochman R., Yeh R.F., Overgaard M.T., Varki A., et al. // *Endocrinology.* 2009. V. 150. № 1. P. 452–462.
21. Lapaire O., Grill S., Lalevee S., Kolla V., Hösl I., Hahn S. // *Fetal Diagn. Ther.* 2012. V. 31. № 3. P. 147–153.
22. Rogue A., Lambert C., Spire C., Claude N., Guillouzo A. // *Drug Metab. Dispos.* 2012. V. 40. № 1. P. 151–158.
23. Hulse A.M., Cai J.J. // *Genetics.* 2013. V. 193. № 1. P. 95–108.
24. Benita Y., Kikuchi H., Smith A.D., Zhang M.Q., Chung D.C., Xavier R.J. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 14. P. 4587–4602.
25. Lam K.K., Chiu P.C., Lee C.L., Pang R.T., Leung C.O., Koistinen H., Seppala M., Ho P.C., Yeung W.S. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 43. P. 37118–37127.
26. Nichol D., Christian M., Steel J.H., White R., Parker M.G. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 43. P. 32140–32147.
27. Huang W., Ghisletti S., Saijo K., Gandhi M., Aouadi M., Tesz G.J., Zhang D.X., Yao J., Czech M.P., Goode B.L., et al. // *Nature.* 2011. V. 470. № 7334. P. 414–418.
28. Gettemans J., van Impe K., Delanote V., Hubert T., Vandekerckhove J., De Corte V. // *Traffic.* 2005. V. 6. № 10. P. 847–857.
29. Percipalle P. // *Nucleus.* 2013. V. 4. № 1. P. 43–52.
30. Nishizawa H., Ota S., Suzuki M., Kato T., Sekiya T., Kurahashi H., Udagawa Y. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011. V. 2. № 9. P. 107.
31. Tsai S., Hardison N.E., James A.H., Motsinger-Reif A.A., Bischoff S.R., Thames B.H., Piedrahita J.A. // *Placenta.* 2011. V. 32. № 2. P. 175–182.
32. Kim J., Zhao K., Jiang P., Lu Z.X., Wang J., Murray J.C., Xing Y. // *BMC Genomics.* 2012. V. 27. № 13. P. 115.
33. Sood R., Zehnder J.L., Druzin M.L., Brown P.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 14. P. 5478–5483.
34. Meng T., Chen H., Sun M., Wang H., Zhao G., Wang X. // *OMICS.* 2012. V. 16. № 6. P. 301–311.
35. Várkonyi T., Nagy B., Füle T., Tarca A.L., Karázi K., Schönleber J., Hupuczi P., Mihalik N., Kovalszky I., Rigó J. Jr., et al. // *Placenta.* 2011. V. 32. Suppl. S21. P. 9.
36. Lee G.S., Joe Y.S., Kim S.J., Shin J.C. // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2010. V. 282. № 4. P. 363–369.
37. Xiang Y., Cheng Y., Li X., Li Q., Xu J., Zhang J., Liu Y., Xing Q., Wang L., He L., Zhao X. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 3. P. e59753.
38. Winn V.D., Gormley M., Fisher S.J. // *Pregnancy Hypertens.* 2011. V. 1. № 1. P. 100–108.
39. Denver R.J., Bonett R.M., Boorse G.C. // *Neuroendocrinology.* 2011. V. 94. № 1. P. 21–38.
40. Domali E., Messinis I.E. // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2002. V. 12. № 4. P. 222–230.
41. Laivuori H. // *Front. Biosci.* 2007. V. 12. P. 2372–2382.
42. Aizawa-Abe M. // *J. Clin. Invest.* 2000. V. 105. P. 1243–1252.
43. Fairfax B.P., Vannberg F.O., Radhakrishnan J. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 4. P. 720–730.
44. Sugathadasa B.H., Tennekoon K.H., Karunanayake E.H. // *Hypertens. Pregnancy.* 2010. V. 29. P. 366–374.
45. Vasku J., Dostalova Z., Kankova K. // *J. Obstet. Gynecol.* 2008. V. 34. № 5. P. 858–864.
46. Jia R.Z., Zhang X., Hu P., Liu X.M., Hua X.D., Wang X., Ding H.J. // *Int. J. Mol. Med.* 2012. V. 30. № 1. P. 133–141.
47. Hogg K., Blair J.D., von Dadelszen P., Robinson W.P. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013. V. 367. № 1. P. 64–73.
48. Rinn J.L., Chang H.Y. // *Annu. Rev. Biochem.* 2012. V. 81. P. 145–166.
49. Евдонин А.Л., Медведева Н.Д. // *Цитология.* 2009. Т. 51. № 2. С. 130–137.
50. Черников В.А., Гороховец Н.В., Савватеева Л.В., Северин С.Е. // *Биомед. химия.* 2012. Т. 58. № 6. С. 651–661.
51. Abdulsid A., Hanretty K., Lyall F. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 1. P. e54540.
52. Cudaback E., Li X., Yang Y., Yoo T., Montine K.S., Craft S., Montine T.J., Keene C.D. // *J. Neuroinflammation.* 2012. V. 10. № 9. P. 192.
53. Cekmen M.B., Erbagci A.B., Balat A., Duman C., Maral H., Ergen K., Ozden M., Balat O., Kuskay S. // *Clin. Biochem.* 2003. V. 36. № 7. P. 575–578.
54. Bayhan G., Koçyigit Y., Atamer A., Atamer Y., Akkus Z. // *Gynecol. Endocrinol.* 2005. V. 21. № 1. P. 1–6.
55. Koçyigit Y., Atamer Y., Atamer A., Tuzcu A., Akkus Z. // *Gynecol. Endocrinol.* 2004. V. 19. № 5. P. 267–273.
56. Catarino C., Rebelo I., Belo L., Rocha-Pereira P., Rocha S., Castro E.B., Patrício B., Quintanilha A., Santos-Silva A. // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2008. V. 87. № 6. P. 628–634.
57. Ahmadi R., Rahimi Z., Vaisi-Raygani A., Kiani A., Jalilian N., Rahimi Z. // *Hypertens. Pregnancy.* 2012. V. 31. № 4. P. 405–418.
58. Drigalenko E., Poduslo S., Elston R. // *Neurology.* 1998. V. 51. P. 131–135.
59. Ken-Dror G., Talmud P.J., Humphries S.E., Drenos F. // *Mol. Med.* 2010. V. 16. № 9. P. 389–399.
60. Lucatelli J.F., Barros A.C., Silva V.K., Machado Fda S., Constantin P.C., Dias A.A., Hutz M.H., de Andrade F.M. // *Neurochem. Res.* 2011. V. 36. № 8. P. 1533–1539.
61. Laresgoiti-Servitje E. // *J. Leukoc. Biol.* 2013. V. 94. № 2. P. 247–257.
62. Padmini E., Venkatraman U., Srinivasan L. // *Toxicol. Mech. Methods.* 2012. V. 22. № 5. P. 367–374.
63. Gharesi-Fard B., Zolghadri J., Kamali-Sarvestani E. // *Placenta.* 2010. V. 31. № 2. P. 121–125.