

УДК 618.3-06

Бариева Диана Айдыновна

студентка Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинского института имени С.И. Георгиевского,
«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»
diana.barieva.2000@bk.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0009-0003-2136-3556>

Ибраимова Элина Эмилиевна

студентка Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинского института имени С.И. Георгиевского,
«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»
ibraimova.el@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0009-0006-2275-9001>

Дубовик Мария Юрьевна

студентка Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинского института имени С.И. Георгиевского,
«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»,
showboatp321@gmail.com;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7838-8111>

Diana A. Barieva

student of the Order of the Red Banner of Labor at the Medical Institute named
after S.I. Georgievsky, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, di-
ana.barieva.2000@bk.ru

Elina E. Ibraimova

student of the Order of the Red Banner of Labor at the Medical Institute named
after S.I. Georgievsky, V.I. Vernadsky Crimean Federal University,
ibraimova.el@mail.ru

Maria Yu. Dubovik

student of the Order of the Red Banner of Labor at the Medical Institute named
after S.I. Georgievsky, V.I. Vernadsky Crimean Federal University,
showboatp321@gmail.com

**Особенности экспрессионного профиля микроРНК
и их генов-мишеней у беременных с преэклампсией**

**Features of the expression profile of micrnas
and their target genes in pregnant women with preeclampsia**

Аннотация: Цель. Сравнительный анализ профилей экспрессии микроРНК и идентификация соответствующих генов-мишеней в плацентарной ткани у беременных с преэклампсией.

Материал и методы. В исследование включены 62 женщины, разделенные на две группы: 32 пациентки с преэклампсией и 30 клинически здоровых женщин с неосложненным течением беременности. Транскрип-

томный анализ для идентификации дифференциально экспрессируемых микроРНК в плазме крови пациенток исследуемых групп выполнен с помощью NGS-секвенирования.

Результаты. Секвенирование плацентарной ткани позволило идентифицировать от 540 до 720 микроРНК для каждого образца. При этом статистически значимые различия в экспрессии были установлены для 60 микроРНК. Расчет отношений рисков показал, что повышение экспрессированности *hsa-miR-103a-3p* и *hsa-miR-18a-5p* повышает шансы развития преэклампсии, в то время как снижение *hsa-miR-516a-5p*, напротив, минимизирует риски формирования патологии. Установлено, что развитие преэклампсии тесно связано с сигнальными путями MAPK- и TGF- β , а также кальциевой сигнализацией.

Вывод. МикроРНК представляют собой многообещающие биомаркеры с хорошим диагностическим потенциалом для внедрения в программу скрининга для прогнозирования преэклампсии.

Ключевые слова: осложнения беременности, преэклампсия, транскриптом, микроРНК, гены-мишени, сигнальные пути.

Annotation: Object. Comparative analysis of microRNA expression profiles and identification of corresponding target genes in placental tissue in pregnant women with preeclampsia.

Methods. The study included 62 women, divided into two groups: 32 patients with preeclampsia and 30 clinically healthy women with uncomplicated pregnancy. Transcriptomic analysis to identify differentially expressed microRNAs in the blood plasma of patients in the study groups was performed using NGS sequencing.

Results. Sequencing of placental tissue allowed the identification of 540 to 720 miRNAs for each sample. At the same time, statistically significant differences in expression were established for 60 microRNAs. Calculation of risk ratios showed that increasing the expression of *hsa-miR-103a-3p* and *hsa-miR-18a-5p* increases the chances of developing preeclampsia, while decreasing *hsa-miR-516a-5p*, on the contrary, minimizes the risks of developing pathology. It has been established that the development of preeclampsia is closely related to the MAPK- and TGF- β signaling pathways, as well as calcium signaling.

Conclusion. MicroRNAs are promising biomarkers with good diagnostic potential for inclusion in a screening program to predict preeclampsia.

Key words: pregnancy complications, preeclampsia, transcriptome, microRNA, target genes, signaling pathways.

Введение.

Традиционно, преэклампсию (ПЭ) принято рассматривать как системное патологическое состояние мультифакториальной природы, обусловленное суммарным воздействием различных факторов (генетических, эпигенетических, иммунологических, средовых и др.) [1].

Актуальность рассмотрения ПЭ обусловлена не только существенным влиянием на демографические показатели, но и ее значительным

вкладом в развитие нарушений функций жизненно-важных органов систем женщины и плода [2]. Несмотря на многолетнюю историю изучения механизмов развития ПЭ, до настоящего времени отсутствует единое представление о природе данной патологии.

В эру развития «омиксных» технологий все большую популярность набирают исследования, направленные на изучение транскриптома, занимающего промежуточное положение между «статичным» геномом и чрезвычайно «динамичным» протеомом. Именно молекулы микроРНК, ориентируясь на транскрипты, кодирующие белки, оказывают влияние на фундаментальные процессы жизнедеятельности различных клеток [3]. И хотя функциональный потенциал микроРНК изучен все еще не в полной мере, роль этих молекул в управлении различных сложных биологических механизмов больше не вызывает сомнений.

Накопленный пул значений о вовлеченности микроРНК в развитие акушерской патологии [4-6], что указывает на перспективность исследований в области транскриптомики и мотивирует к дальнейшему научному поиску с целью уточнения и расширения представлений о молекулярных механизмах ПЭ. Считается, что в будущем полученные результаты откроют новые возможности не только для разработки инновационных диагностических инструментов ПЭ, но и сделают возможным расширение спектра терапевтических возможностей.

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ профилей экспрессии микроРНК и идентификация соответствующих генов-мишеней в плацентарной ткани у беременных с ПЭ.

Методы.

В период 2022-2024 гг. обследовано 62 беременных в возрасте от 18 до 45 лет, родоразрешенных на базе ГБУЗ РК «Симферопольский клинический родильный дом №1». Все женщины, включенные в исследования, были рандомизированы в две группы: основная группа (n=42) – беременные с верифицированной ПЭ; контрольная группа (n=20) – пациентки с неосложненным течением беременности, родов и послеродового периода.

Диагноз «ПЭ» устанавливался согласно критериям, указанным в Федеральных клинических рекомендациях [7].

Критерии исключения: возраст менее 18 и более 45 лет; многоплодная беременность; экстрагенитальная патология в стадии декомпенсации; инфекционно-воспалительные заболевания в фазе обострения; многоплодная беременность; отказ от участия в исследовании.

Транскриптомный анализ для идентификации дифференциально экспрессируемых микроРНК в ткани плаценты пациенток исследуемых групп выполнен с помощью NGS-секвенирования.

Фрагменты ткани плаценты, взятые после родоразрешения, промывали в изотоническом физиологическом растворе, замораживали и хранили при -20°C . Замороженный образец плаценты измельчали в микротоме. Экстракцию тотальной РНК проводили при помощи тест-системы miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Нидерланды) согласно инструкции произво-

дителя. Малые РНК конвертировали в комплементарную (кДНК) в реакции обратной транскрипции с последующим проведением ПЦР-амплификации кДНК-библиотеки плацентарной ткани. Библиотеки были подготовлены с использованием MGIEasy Small RNA Library Prep Kit v.2.0 (BGI-940-000196-00, MGI, КНР) согласно протоколу производителя. Проведя очистку, в полиакриламидном геле осуществляли последующее извлечение кДНК-фракции длиной 140–160 пар оснований. Количество и качество кДНК оценивали с помощью Qubit™ ssDNA Assay Kit (Cat. No. Q10212 Thermo Fisher Scientific, США) и флуориметра Qubit®. Очищенную кДНК-библиотеку секвенировали на платформе MGI DNBSEQ-G400 (BGI, Китай) в режиме SE50.

Поиск мишеней для микроРНК проводился с помощью базы валидированных взаимодействий miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного пакета программ SPSS 26 и Statistica 12. Степень экспрессируемой исследуемых микроРНК в группах сравнения выполнен с использованием теста Вилкоксона–Манна–Уитни. Статистически значимыми считали отличия при $p \leq 0,05$.

Результаты.

Клиническо-анамнестические особенности пациенток, перинатальные исходы и неонатальная заболеваемость анализируемых пациенток приведена в таблице 1.

Таблица 1. Клиническо-анамнестическая характеристика пациенток исследуемых группах

Параметры	Основная группа (n=42)	Контрольная группа (n=20)	p
Возраст, лет	29.76 (27.85-31.67)	28,8 (25.62-31.98)	0.594
ИМТ, кг/м ²	31.17 (28.73-33.62)	28.17 (26.43-29.90)	0.045
Манифестация ПЭ, нед	34.09 (32.45-35.12)	-	-
Ранняя ПЭ, абс (%)	6 (14.3)	-	-
Поздняя ПЭ, абс (%)	36 (85.7)	-	-
Умеренная ПЭ, абс (%)	38 (90.5)	-	-
Тяжелая ПЭ, абс (%)	4 (9.5)	-	-

Секвенирование плацентарной ткани позволило идентифицировать от 540 до 720 микроРНК для каждого образца. При этом статистически значимые различия в экспрессии были установлены для 60 микроРНК. Последующая оценка отношений рисков развития ПЭ позволил идентифицировать только 3 микроРНК, оказывающих достоверное влияние на развитие патологии (табл.2).

Таблица 2. Анализ влияния экспрессии плацентарных микроРНК на развитие ПЭ

МикроРНК	Основная группа (n=42)	Контрольная группа (n=20)	ОШ (95% ДИ)	p
hsa-miR-103a-3p	20,93 (19,93; 21,52)	0,00 (0,00; 14,95)	1,19 (1,02-1,38)	0,023
hsa-miR-18a-5p	0,00 (0,00; 0,00)	19,93 (4,98; 20,68)	0,85 (0,73-0,98)	0,026
hsa-miR-516a-5p	0,00 (0,00; 0,00)	19,93 (4,98; 19,93)	0,84 (0,72-0,98)	0,025

Установлено, что повышение степени экспрессии miR-103a-3p (p=0,023) и hsa-miR-18a-5p (p=0,026) повышает шансы развития ПЭ, в то время как снижение экспрессированности miR-516a-5p (p=0,025), напротив, ассоциировано со снижением рисков ПЭ.

Анализ функционального обогащения прогнозируемых целевых генов каждой микроРНК показал, что только предсказанные целевые гены hsa-miR-516a-5p были обогащены в основных сигнальных путях, связанных с ПЭ. В связи с чем hsa-miR-103a-3p и hsa-miR-18a-5p были исключены из последующего анализа. С использованием базы данных TargetScan было предсказано 738 потенциальных генов-мишеней для hsa-miR-516a-5p. Функциональный анализ KEGG показал, что в развитие ПЭ тесно связано с сигнальными путями MAPK- и TGF- β , а также кальциевой сигнализацией. Прогнозируемые целевые гены hsa-miR-516a-5p, связанные с развитием ПЭ представлены в таблице 3.

Таблица 3. Прогнозируемые целевые гены hsa-miR-516a-5p, связанные с развитием ПЭ

микроРНК	Путь KEGG	p	Целевые гены
miR-516a-5p	Кальций сигнальный путь	0,008	ORAI2, CACNA1C, HTR4, ITPR2, STIM2, PLCB1, GNAL, PLCD4, GRIN1, HTR2C, MYLK4, SLC25A6, TACR2, PDGFRA
	Сигнальный путь MAPK	0,045	DUSP3, CACNG8, TRAF6, CACNA1C, PDGFRA, CACNA1B, RASA2, DUSP7, KRAS, DUSP1, RPS6KA2, MAPK11, MAP3K13, NFKB1, MAP3K2, DUSP8
	Сигнальный путь TGF-бета	0,042	SMAD6, SMAD2, ACVR2B, BMPR1B, GREM1, CREBBP, SMURF1

Обсуждение.

Результаты проведенных исследований подтвердили возможность рассмотрения циркулирующих микроРНК как потенциальных биомаркеров ПЭ и продемонстрировали зависимость диагностической ценности той или иной молекулы от фенотипического варианта патологии [8].

В ходе проведенного исследования было идентифицировано 60 микроРНК, показавших абберантную экспрессию в плацентарной ткани пациенток с ПЭ. При проведении анализа литературных данных было установлено, что большинство из дифференциально экспрессирующийся микроРНК в группе ПЭ ассоциированы с процессом физиологической плацентации и регулируют экспрессию генов, участвующих в пролиферации, дифференцировке, инвазии, миграции, апоптозе и ангиогенезе в ткани трофобласта.

Интерес в контексте нашего исследования представляют данные о диагностической ценности hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-18a-5p и hsa-miR-516a-5p. Особо следует отметить, что наибольшее количество предсказанных генов-мишеней было отмечено именно для hsa-miR-516a-5p. Функциональный анализ KEGG показал, что в развитие ПЭ тесно связано с сигнальными путями MAPK- и TGF- β , а также кальциевой сигнализацией.

Известно, что сигнальный путь митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), который играет важную роль в формировании беременности. Недавние исследования показали, что сигнальные каскады MAPK связаны с иммунологическими изменениями, эндотелиальной дисфункцией и резистентностью к инсулину при ПЭ. Сигнализация MAPK при ПЭ оказывает влияние на внутриклеточные обменные процессы, приводящие к формированию метаболического синдрома при ПЭ [9]. Кроме того, указанный каскад играет важную роль в формировании гематоплацентарного барьера, имеющего ключевое значение в процессе эмбрионального развития [10].

Протеины группы трансформирующего фактора роста бета (TGF β) являются членами надсемейства многофункциональных ростовых факторов, которые регулируют широкий спектр биологических процессов и играют критически важную роль в преимплантации и первоначальной децидуализации, а ее активность возрастает во время беременности при ремоделировании эндометрия. [11]. Помимо этого, TGF β -зависимая передача сигналов является прототипным индуктором неоваскуляризации тканей [12]. Соответственно абберантная регуляция сигнальных путей, контролирующая этот процесс, может привести к неправильному развитию сети сосудов в виде гипертаскуляризации или сосудистой мальформации [13].

В настоящее время активно обсуждается значение кальция в механизмах формирования ПЭ. При ПЭ зарегистрировано значимое снижение продукции эндотелиальными клетками NO или его биодоступности, что непосредственно связано с дефицитом кальций-сигнализации. Указанные изменения распространяются не только на маточные сосуды, но и на материнскую системную артериальную и венозную сосудистую систему. Предполагается, что кальций-зависимая сигнализация внутри клеток и между клетками может регулировать продукцию простаглицлина, который

является мощным сосудорасширяющим средством. Снижение уровня простаглицлина происходит еще до развития преэклампсии, и одним из основных механизмов изменения содержания вазодилататора является нарушение продукции простаглицлин-синтетазы, которая тесно связана с внутриклеточной концентрацией кальция [14]. В работе *in vitro*, Naché S. и соав. впервые указали на снижение уровня Ca^{2+} в первичных культурах клеток трофобласта, полученных из плаценты женщин с ПЭ по сравнению с таковой у лиц с неосложненным течением беременности. Нарушение гомеостаза Ca^{2+} в плаценте с осложненной беременностью авторы объясняют высоким уровнем окислительного стресса и отсутствием АТФ [15].

Заключение.

1. Показано, что повышение экспрессированности hsa-miR-103a-3p и hsa-miR-18a-5p повышает шансы развития ПЭ, в то время как снижение hsa-miR-516a-5p, напротив, минимизирует риски формирования патологии.
2. Установлено, что развитие ПЭ тесно связано с сигнальными путями MAPK- и TGF- β , а также кальциевой сигнализацией.
3. МикроРНК представляют собой многообещающие биомаркеры с хорошим диагностическим потенциалом для внедрения в программу скрининга для прогнозирования ПЭ.

Литература

1. Scholten, R.R. *Co-occurrence of cardiovascular and prothrombotic risk factors in women with a history of preeclampsia* / R.R. Scholten, M.T. Norman, F.C. Sweep, et al. // *Obstet Gynecol.* - 2013. - Vol. 121(1). - P. 97-105.
2. Сидорова, И.С. *Решенные и нерешенные вопросы преэклампсии по результатам анализа материнской смертности за последние 10 лет* / И.С. Сидорова, Н.А. Никитина, О.С. Филиппов, и др. // *Акушерство и гинекология.* - 2021. - Т. 4. - С. 64-74.
3. Wilson, R.C. *Molecular mechanisms of RNA interference* / R.C. Wilson, J.A. Doudna // *Annu Rev Biophys.* - 2013. - Vol. 42. - P. 217–39.
4. Lycoudi, A.. *miRNAs in pregnancy-related complications* / A. Lycoudi, D. Mavreli, A. Mavrou, et al. // *Expert Rev Mol Diagn.* 2015. - Vol. 15(8). - P. 999-1010.
5. Poirier C., Desgagné V., Guérin R., Bouchard L. *MicroRNAs in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus: Emerging Role in Maternal Metabolic Regulation* / C. Poirier, V. Desgagné, R. Guérin, L. Bouchard // *Curr Diab Rep.* - 2017. - Vol. 17(5) - P. 35.
6. Cai, M. *Small Molecule, Big Prospects: MicroRNA in Pregnancy and Its Complications* / M. Cai, G.K. Kolluru, A.Ahmed // *Journal of pregnancy.* - 2017. - Vol. 2017. - P. 6972732.
7. *Клинические рекомендации – Преэклампсия. Эклампсия. Отеки, протеинурия и гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде – 2021-2022-2023 (24.06.2021).* М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2021.
8. Yin, Y. *Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Diagnosis and Prediction of Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis* / Y. Yin,

M. Liu, H. Yu, et al. // *Eur. J. Obs. Gynecol. Reprod. Biol.* - 2020. - Vol. 253. - P. 121–132.

9. D'Oria, R. PKB/Akt and MAPK/ERK phosphorylation is highly induced by inositols: Novel potential insights in endothelial dysfunction in preeclampsia / R. D'Oria, L. Laviola, F. Giorgino, et al. // *Pregnancy Hypertens.* - 2017. - Vol. 10. - P. 107-112.

10. Nadeau, V. Essential role of the ERK/MAPK pathway in blood-placental barrier formation / V. Nadeau, J. Charron // *Development.* - 2014. - Vol. 141(14). - P. 2825-37.

11. Jones, R.L. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta / R.L. Jones, C. Stoikos, J.K. Findlay, L.A. Salamonsen // *Reproduction.* - 2006. - Vol. 132(2). - P. 217–232.

12. Goumans, M.J. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction / M.J. Goumans, Z. Liu, P. ten Dijke // *Cell Res.* - 2009. - Vol. 19(1). - P. 116-27.

13. Arroyo, J.A. Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta / J.A. Arroyo, V.D. Winn // *Semin Perinatol.* - 2008. - Vol. 32(3). - P. 172–177.

14. Boeldt, D.S. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia / D.S. Boeldt, Bird I.M. // *J. Endocrinol.* - 2017. - Vol. 232(1). - P. 27–44.

15. Haché, S. Alteration of calcium homeostasis in primary preeclamptic syncytiotrophoblasts: effect on calcium exchange in placenta / S. Haché, L.Takser, F. LeBellego, et al. // *J Cell Mol Med.* - 2011. - Vol. 15(3). - P. 654-67.

Reference

1. Scholten, R.R. Co-occurrence of cardiovascular and prothrombotic risk factors in women with a history of preeclampsia / R.R. Scholten, M.T. Hopman, F.C. Sweep, et al. // *Obstet Gynecol.* - 2013. - Vol. 121(1). - P. 97-105.

2. Sidorova, I.S. Resolved and unresolved issues of preeclampsia based on the results of an analysis of maternal mortality over the past 10 years / I.S. Sidorova, N.A. Nikitina, O.S. Filippov, etc. // *Obstetrics and gynecology.* - 2021. - T. 4. - P. 64-74.

3. Wilson, R.C. Molecular mechanisms of RNA interference / R.C. Wilson, J.A. Doudna // *Annu Rev Biophys.* - 2013. - Vol. 42. - P. 217–39.

4. Lycoudi, A.. miRNAs in pregnancy-related complications / A. Lycoudi, D. Mavreli, A. Mavrou, et al. // *Expert Rev Mol Diagn.* 2015. - Vol. 15(8). - P. 999-1010.

5. Poirier C., Desgagné V., Guérin R., Bouchard L. MicroRNAs in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus: Emerging Role in Maternal Metabolic Regulation / C. Poirier, V. Desgagné, R. Guérin, L. Bouchard // *Curr Diab Rep.* - 2017. - Vol. 17(5) - P. 35.

6. Cai, M. Small Molecule, Big Prospects: MicroRNA in Pregnancy and Its Complications / M. Cai, G.K. Kolluru, A. Ahmed // *Journal of pregnancy.* - 2017. - Vol. 2017. - P. 6972732.

7. *Clinical guidelines – Preeclampsia. Eclampsia. Edema, proteinuria and hypertensive disorders during pregnancy, childbirth and the postpartum period - 2021-2022-2023 (06/24/2021). M.: Ministry of Health of the Russian Federation, 2021.*

8. Yin, Y. *Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Diagnosis and Prediction of Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis / Y. Yin, M. Liu, H. Yu, et al. //Eur. J. Obs. Gynecol. Reprod. Biol. - 2020. - Vol. 253. - P. 121–132.*

9. D'Oria, R. *PKB/Akt and MAPK/ERK phosphorylation is highly induced by inositols: Novel potential insights in endothelial dysfunction in preeclampsia / R. D'Oria, L. Laviola, F. Giorgino, et al. // Pregnancy Hypertens. - 2017. - Vol. 10. - P. 107-112.*

10. Nadeau, V. *Essential role of the ERK/MAPK pathway in blood-placental barrier formation / V. Nadeau, J. Charron // Development. - 2014. - Vol. 141(14). - P. 2825-37.*

11. Jones, R.L. *TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta / R.L. Jones, C. Stoikos, J.K. Findlay, L.A. Salamonsen // Reproduction. - 2006. - Vol. 132(2). - P. 217–232.*

12. Goumans, M.J. *TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction / M.J. Goumans, Z. Liu, P. ten Dijke // Cell Res. - 2009. - Vol. 19(1). - P. 116-27.*

13. Arroyo, J.A. *Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta / J.A. Arroyo, V.D. Winn // Semin Perinatol. - 2008. - Vol. 32(3). - P. 172–177.*

14. Boeldt, D.S. *Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia / D.S. Boeldt, Bird I.M. // J. Endocrinol. - 2017. - Vol. 232(1). - P. 27–44.*

15. Haché, S. *Alteration of calcium homeostasis in primary preeclamptic syncytiotrophoblasts: effect on calcium exchange in placenta / S. Haché, L. Taxer, F. LeBellego, et al. // J Cell Mol Med. - 2011. - Vol. 15(3). - P. 654-67.*