

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ
ГЕНЕТИКИ

На правах рукописи



Гавриленко Мария Михайловна

**АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ В ПАТОГЕНЕТИКЕ ЗАДЕРЖКИ
РОСТА ПЛОДА**

1.5.7 Генетика

3.3.3 Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

академик РАН,
доктор биологических наук,
профессор
Степанов Вадим Анатольевич

кандидат медицинских наук
Трифоновна Екатерина
Александровна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Альтернативный сплайсинг как регулятор функционального разнообразия транскриптома.....	15
1.2 Роль децидуализации в поддержании физиологического течения беременности. Краткая характеристика задержки роста плода. Роль альтернативного сплайсинга в патогенезе задержки роста плода	31
1.3 Роль естественного отбора в формировании ландшафта альтернативного сплайсинга на микроэволюционном уровне.....	43
1.4 Заключение по обзору литературы	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	51
2.1 Дизайн исследования.....	51
2.2 Характеристика обследованных групп.....	53
2.3 Технология получения децидуальных клеток плаценты.....	58
2.4 Молекулярно-генетические методы исследования.....	61
2.5 Биоинформатическая и статистическая обработка полученных данных	64
2.6 Валидация идентифицированных вариантов альтернативного сплайсинга ...	70
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	75
3.1 Характеристика событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты при физиологической беременности и задержке роста плода	75
3.2 Выявление паттернов альтернативного сплайсинга, специфичных для пациенток с задержкой роста плода.	85
3.3 Анализ дифференциального сплайсинга в группах пациенток с физиологической беременностью и задержкой роста плода	110
3.3.1 Физиологическая беременность и изолированная задержка роста плода..	110
3.3.2 Физиологическая беременность и сочетанная задержка роста плода	118
3.3.3 Изолированная и сочетанная задержка роста плода.....	124
3.3.4 Валидация полученных результатов	133

3.4 Характеристика паттернов альтернативного сплайсинга при сравнении выраженной и умеренной форм задержки роста плода.....	136
3.5 Оценка роли естественного отбора в формировании генетической архитектуры паттернов альтернативного сплайсинга, ассоциированных с задержкой роста плода, в современных популяциях человека.....	149
3.5.1 D-тест Таджимы.....	151
3.5.2 H-тест Фэй-Ву	156
3.5.3 iHS тест	159
3.5.4 Анализ популяционно-временной компоненты	162
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	170
ВЫВОДЫ.....	176
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	178
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	182
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	226
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	230
ПРИЛОЖЕНИЕ В	235
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	237

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Актуальной задачей современной медицины является углублённое изучение молекулярных механизмов заболеваний, лежащих в основе неблагоприятных исходов беременности и определяющих состояние здоровья человека на протяжении всей жизни. Особое значение в этом контексте приобретает исследование регуляторных процессов на уровне транскриптома, поскольку именно они опосредуют адаптацию клеток к изменяющимся условиям внутриутробной среды и во многом определяют формирование патологических состояний при осложнённом течении беременности.

Альтернативный сплайсинг (АС) представляет собой один из ключевых механизмов посттранскрипционной регуляции, определяющий не только качественный состав транскриптома, но и характер экспрессии генов на функциональном уровне [237, 282, 405]. АС может приводить к образованию различных изоформ мРНК, кодирующих белки с модифицированными доменами и изменёнными функциональными свойствами, обеспечивая пластичность и вариативность сигнальных и метаболических путей клетки [209]. В ряде случаев альтернативный сплайсинг формирует транскрипты с преждевременными стоп-кодонами, которые подвергаются нонсенс-опосредованному распаду, что снижает общий уровень экспрессии гена и фактически эквивалентно частичной потере его функции. Таким образом, альтернативный сплайсинг может изменять баланс экспрессии белковых изоформ, формировать нефункциональные или укороченные белки. Эти особенности делают АС важным звеном патогенеза широкого спектра заболеваний. Несмотря на то, что к настоящему времени известно о вкладе АС в генетическую компоненту развития некоторых многофакторных состояний, включая нейродегенеративные болезни [51, 121, 204], рак различной локализации [332, 421], сердечно-сосудистые патологии [146, 207], механизмы альтернативного сплайсинга остаются недостаточно изученными. Для акушерских заболеваний существуют единичные работы зарубежных

исследователей, касающихся роли альтернативного сплайсинга в патологии беременности, тогда как в российской научной среде данное направление фактически не представлено [233, 315].

Задержка роста плода (ЗРП) относится к числу наиболее клинически значимых осложнений беременности, оказывающих серьёзное влияние как на исход беременности, так и на долгосрочное состояние здоровья ребёнка. Данное состояние является одной из ведущих причин перинатальной заболеваемости и смертности, увеличивает потребность новорождённых в интенсивной терапии и специализированной медицинской помощи в раннем постнатальном периоде. Дети, рождённые с ЗРП, чаще нуждаются в реанимационных мероприятиях, длительном пребывании в отделениях интенсивной терапии и последующей медицинской и психологической поддержке. Это влечёт за собой значительные затраты системы здравоохранения и оказывает долговременное социальное воздействие на семьи и общество в целом. В долгосрочной перспективе ЗРП снижает потенциал здоровья нации: такие дети имеют повышенный риск отставания в нейropsychическом развитии, ухудшения когнитивных функций, а во взрослом возрасте – предрасположенность к метаболическому синдрому, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца и сахарному диабету 2 типа [334]. Всё это снижает трудоспособность, увеличивает риск ранней инвалидизации и преждевременной смертности.

Несмотря на значительный прогресс в области перинатальной медицины, до настоящего времени не существует единой и общепринятой концепции, объясняющей механизмы развития ЗРП, что обусловлено её многофакторной природой. В настоящее время накапливаются данные о влиянии генетических, материнских, фетальных и средовых детерминант, однако степень их вклада и характер взаимодействий остаются недостаточно определёнными. Применение современных предсказательных моделей, включая специализированные программные комплексы, демонстрирует ограниченную чувствительность и специфичность, что существенно снижает их клиническую значимость на

ранних этапах беременности. Наиболее убедительные данные подтверждают ведущую роль плацентарных нарушений, которые занимают ведущее место в патогенезе заболевания. Нарушения процессов плацентации, в том числе недостаточная инвазия трофобласта и ремоделирование спиральных артерий, напрямую связаны с ограничением доставки кислорода и питательных веществ к эмбриону, формируя хроническую внутриутробную гипоксию [38, 61, 63]. Однако молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе этого состояния, до сих пор остаются недостаточно изученными, особенно в контексте регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, включая процессы альтернативного сплайсинга. Кроме того, существующие данные указывают на то, что задержка роста плода не является однородной нозологической формой, а представляет собой гетерогенное состояние, поэтому для более глубокого понимания патогенеза необходимо исследовать различные клинические проявления данного заболевания [134].

Особый интерес представляет анализ эпидемиологических данных, свидетельствующих о выраженных этно-территориальных различиях в частоте задержки роста плода. Так, в африканских популяциях ЗРП диагностируется у 15,1% беременных, тогда как минимальная частота зарегистрирована у латиноамериканцев – 11,3% [24, 66, 120, 199, 262, 401]. Эти различия могут отражать вариабельность аллельных вариантов, вовлечённых в регуляцию плацентарных процессов, а также историческое действие естественного отбора, направленного на адаптацию репродуктивных функций к различным экологическим и демографическим условиям. Известно, что гены, участвующие в репродуктивных функциях, находятся под эволюционным давлением, поскольку напрямую определяют выживаемость потомства и продолжение рода. Так были обнаружены как общепопуляционные, так и специфичные сигналы действия направленного естественного отбора на различные гены, которые играют важную роль в сперматогенезе и оплодотворении в популяциях Африки, Европы и Азии [327]. Некоторые из этих генов участвуют в регуляции экспрессии и альтернативного сплайсинга, что потенциально связывает

действие отбора с вариабельностью паттернов альтернативного сплайсинга и предрасположенностью к репродуктивным патологиям.

Таким образом, анализ ландшафта альтернативного сплайсинга при патологии беременности является крайне актуальным направлением, так как открывает новые перспективы в понимании патогенеза задержки роста плода и может стать основой для поиска прогностических маркеров и терапевтических подходов, направленных на снижение бремени данного осложнения беременности.

Степень научной разработанности темы исследования

Несмотря на значительный прогресс в изучении механизмов альтернативного сплайсинга, основное внимание научного сообщества до настоящего времени сосредоточено на таргетных исследованиях отдельных генов-кандидатов, как правило, в рамках ограниченных моделей заболеваний. Полнотранскриптомные подходы к анализу сплайсинга, включающие оценку глобальных паттернов альтернативных белковых изоформ, начали активно внедряться лишь с развитием высокопроизводительных методов секвенирования и преимущественно в области онкологии, а также нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний [3, 51, 116, 121, 204, 207, 332, 421].

Анализ базы данных PubMed на сегодняшний день выявил 17 публикаций, посвящённых роли альтернативного сплайсинга в патогенезе задержки роста плода, 16 из которых являются экспериментальными статьями, а 1 – обзорной [176]. Только в одной из экспериментальных работ проведён полнотранскриптомный анализ на основе данных секвенирования РНК, в результате анализа которого авторы выявили 88 дифференциально сплайсированных генов при сравнении физиологической беременности и задержки роста плода [233]. Ещё в одной работе использованы массивы высокоплотных микрочипов для оценки экспрессии и вариабельности изоформ и идентифицированы 1409 дифференциально сплайсированных генов [315]. И

одно исследование было посвящено функциональной оценке конкретного гена *PPP1R12A*, предположительно вовлечённого в развитие задержки роста плода [119]. Оставшиеся исследования в основном сфокусированы на описании генетических синдромов, ассоциированных с ЗРП, или других акушерских патологий (малый для гестационного возраста плод, преэклампсия, спонтанные аборт). Критически важным является отсутствие исследований на однородных клеточных популяциях, особенно децидуальных клетках [16, 17, 18], что существенно ограничивает интерпретацию существующих данных и оставляет ключевые патогенетические вопросы без ответа. Всё это подчёркивает, что исследования в данной области носят фрагментарный характер, оставляя широкий спектр вопросов открытыми.

Таким образом, остаётся очевидным существенный дефицит исследований, направленных на изучение глобальных изменений в паттернах альтернативного сплайсинга в плацентарной ткани при задержке роста плода, в том числе в разрезе её клеточного состава, что определяет актуальность настоящего исследования.

Наряду с накопленным значительным массивом публикаций в области популяционной генетики, в большинстве из которых описана вариабельность полиморфных маркеров на уровне геномных данных, тогда как транскриптомные исследования популяций человека с использованием высокопроизводительных технологий секвенирования проводятся крайне редко.

В настоящей работе с применением технологии секвенирования нового поколения оценены паттерны событий альтернативного сплайсинга между женщинами с физиологическим течением беременности и с диагнозом задержки роста плода в децидуальных клетках плаценты, а также охарактеризована потенциальная роль естественного отбора в формировании рассматриваемых фенотипических признаков.

Цель исследования

Установить роль альтернативного сплайсинга генов, экспрессирующихся в децидуальных клетках плаценты, в молекулярных механизмах задержки роста плода.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать события альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты при физиологической беременности и задержке роста плода.
2. Выявить особенности альтернативного сплайсинга генов и сигнальных путей при задержке роста плода.
3. Провести анализ дифференциального сплайсинга мРНК генов децидуальных клеток плаценты в группах пациенток с физиологической беременностью и задержкой роста плода.
4. Установить закономерности изменений профиля альтернативного сплайсинга генов децидуальных клеток плаценты, определяющих тяжесть течения задержки роста плода.
5. Оценить роль естественного отбора в формировании профиля альтернативного сплайсинга, ассоциированного с задержкой роста плода, в современных популяциях человека.

Научная новизна

Впервые комплексно охарактеризован полнотранскриптомный ландшафт событий альтернативного сплайсинга, ассоциированных с задержкой роста плода. Показано, что ЗРП сопровождается увеличением количества событий АС по сравнению с физиологической беременностью. В рамках изучения механизмов, лежащих в основе различных исходов и осложнений заболевания, установлены специфичные альтернативно сплайсированные гены для изолированной и сочетанной форм ЗРП, а также выявлены кластеры общих генов, вовлечённых в ключевые биологические процессы. Впервые идентифицированы дифференциально сплайсированные гены,

характеризующие физиологическую беременность, изолированную и сочетанную ЗРП, и выделены патогенетически значимые процессы, включая сигнальные пути PI3K-Akt и Wnt, клеточный цикл, регуляцию ГТФаз и организацию цитоскелета. Впервые определены различия в спектре альтернативного сплайсинга между выраженной и умеренной ЗРП, свидетельствующие о вовлечённости процессов апоптоза, аутофагии и клеточного гомеостаза в развитие тяжелой формы заболевания. Несомненной новизной обладают результаты, связанные с изучением действия естественного отбора на гены, дифференциально сплайсированные при различных формах задержки роста плода. Показано, что такие гены вовлечены в процессы регуляции клеточного цикла, ремоделирования хроматина, иммунного ответа и организации цитоскелета, что подчёркивает их потенциальную эволюционную и патогенетическую значимость.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Научная значимость заключается, прежде всего, в получении новых фундаментальных знаний о роли альтернативного сплайсинга в патогенезе задержки роста плода. Впервые охарактеризован ландшафт событий альтернативного сплайсинга децидуальных клеток плаценты при физиологической беременности и задержки роста плода, что позволило выделить как специфичные, так и общие гены и биологические процессы, ассоциированные с данной патологией. Включение анализа результатов популяционно-генетических тестов в исследование транскриптомных данных позволило впервые продемонстрировать связь сигналов естественного отбора с генами, вовлечёнными в развитие задержки роста плода, что открывает новые перспективы для понимания эволюционных основ репродуктивных нарушений.

Выявленные дифференциально сплайсированные гены потенциально могут служить молекулярными маркёрами для стратификации форм задержки роста плода. Полученные данные создают основу для поиска новых терапевтических мишеней, связанных с нарушением ключевых сигнальных

путей и регуляции клеточного цикла. Использование популяционно-генетического анализа позволяет учитывать этническую и популяционную специфику генетических предрасположенностей к развитию задержки роста плода, что имеет значение для персонализированной медицины и более точного прогнозирования риска акушерских осложнений.

Методология и методы диссертационного исследования

В работе использовались современные методы клинической диагностики, высокотехнологичный метод получения децидуальных клеток с помощью лазерной микродиссекции препаратов децидуальной ткани, передовые методы молекулярно-генетического анализа и статистической обработки данных. Молекулярно-генетические методы настоящего исследования включали в себя выделение РНК, синтез библиотек для секвенирования, массовое параллельное секвенирование полных транскриптомов децидуальных клеток плаценты, проведение автоматического гель-электрофореза молекул РНК и кДНК, ПЦР в реальном времени. Биоинформатический и статистический анализ данных секвенирования и последующая обработка полученных транскриптов проводились с применением современных инструментов для интерпретации данных.

Положения, выносимые на защиту

1. При задержке роста плода в транскриптом децидуальных клеток плаценты наблюдаются значимые изменения ландшафта альтернативного сплайсинга по сравнению с физиологической беременностью.
2. Альтернативный сплайсинг выступает в качестве важного патогенетического фактора задержки роста плода: более 28% выявленных событий альтернативного сплайсинга наблюдаются только у пациенток с задержкой роста плода. Гены, в которых идентифицированы указанные события, связаны с регуляцией апоптоза, ответом на цитокиновую стимуляцию и процессингом матричной РНК.

3. Изолированная и сочетанная формы задержки роста плода характеризуются как общностью, так и специфичностью паттернов альтернативного сплайсинга, а также ассоциированными с ними патогенетическими путями.
4. Дифференциально сплайсированные гены при выраженной и умеренной формах задержки роста плода сверхпредставлены в процессах морфогенеза, организации пероксисом и лизосом, сигнального пути SMAD и ремоделирования хроматина.
5. Дифференциально сплайсированные гены, для которых обнаружены сигналы отбора в двух и более метапопуляциях, играют роль в формировании фенотипических признаков, отражающих нарушения краниофасциального развития, опорно-двигательного аппарата и развития нервной системы.

Степень достоверности результатов проведенного исследования

Достоверность результатов, полученных в настоящем исследовании, обеспечивается применением современных методов и технологий (лазерная микродиссекция, РНК-секвенирование, ПЦР в реальном времени), привлечением внешних данных из открытых источников и баз (GTEx, PopHuman, 1000 Genomes), а также использованием релевантных методов математической статистики и биоинформатики при соблюдении необходимых требований к условиям их применения.

Личный вклад автора

Работа выполнена в лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Основные результаты диссертационного исследования получены автором самостоятельно. Поиск и изучение литературы по тематике диссертации, экспериментальный блок работ, биоинформатический анализ и статистическая обработка полученных данных, а также написание и оформление настоящей рукописи выполнено лично автором.

Апробация материалов диссертации

Основные результаты исследования были представлены для обсуждения на Всероссийском конгрессе молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск – 2022); Международной конференции Европейского общества генетики человека (онлайн-участие, Вена – 2022, Глазго – 2023); конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике (HSG-2022)» (Новосибирск – 2022); XIII научной конференции «Генетика человека и патология» (Томск – 2022); 14-й Международной школе молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика» (Новосибирск – 2023); Международном Конгрессе «VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы» (Саратов – 2024); 14-й Международной Мультиконференции «Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология» (Новосибирск – 2024); IX Всероссийском молодежном научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Самара – 2024); XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск – 2025); XI Съезде Российского общества медицинских генетиков с международным участием (Санкт-Петербург – 2025); XIV научной конференции «Генетика человека и патология» (Томск – 2025); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции физиологических функций в норме и при патологии», посвященной 90-летию со дня рождения академика РАН Михаила Андреевича Медведева (Томск – 2025).

Публикации

По теме диссертации опубликованы 34 научные работы, из них 14 статей в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Российской Федерации, 5 статей в сборниках материалов конференций, 15 тезисных публикаций в материалах отечественных и международных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 245 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственного исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, четырех приложений. Работа проиллюстрирована 48 рисунками и 6 таблицами. Библиографический указатель содержит 427 источников, из них 18 отечественных и 409 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Современная медицина всё в большей степени ориентирована на изучение молекулярных механизмов многофакторных заболеваний (МФЗ), в основе которых лежит сложное взаимодействие генетических, эпигенетических и средовых факторов. В отличие от моногенных патологий, для которых характерны чёткие причинно-следственные связи, МФЗ формируются в результате совокупного действия множества регуляторных процессов, реализующихся на различных уровнях биологической организации. В этом контексте особое значение приобретает транскриптомика как направление, позволяющее анализировать ответ клеток и тканей на физиологические и патологические стимулы, не сопровождающиеся изменениями нуклеотидной последовательности ДНК.

Транскриптомный уровень регуляции представляет собой ключевое звено, связывающее геном с фенотипом, поскольку именно на этом этапе формируется качественный и количественный состав РНК, определяющий последующий синтез белков и функциональное состояние клетки. Одним из центральных механизмов, обеспечивающих пластичность транскриптома, является альтернативный сплайсинг пре-мРНК. В последние годы накоплены убедительные данные о том, что нарушения альтернативного сплайсинга играют значимую роль в патогенезе широкого спектра заболеваний, однако их вклад в развитие акушерских осложнений остаётся недостаточно изученным. Особый интерес представляет анализ транскриптома клеток плацентарной ткани, поскольку именно они обеспечивают ключевые процессы имплантации, инвазии трофобласта и адаптации маточно-плацентарного кровотока.

1.1 Альтернативный сплайсинг как регулятор функционального разнообразия транскриптома

Альтернативный сплайсинг (АС) является одним из наиболее значимых этапов посттранскрипционной модификации РНК и представляет собой ключевой процесс, который обеспечивает разнообразие белков и регуляцию генов. Этот процесс позволяет одному гену кодировать несколько различных

белковых изоформ благодаря вариативному включению или исключению экзонов и/или интронов в процессе созревания пре-мРНК. АС является одним из основных механизмов, отвечающих за повышение функциональной сложности транскриптома у эукариот, особенно у высших организмов [184]. Таким образом, альтернативный сплайсинг РНК играет важную роль в формировании фенотипа человека, обеспечивая транскриптомное и протеомное разнообразие кодирующих участков генома человека. В целом фенотип можно определить как совокупность всех проявлений генетической информации на уровне организма, начиная с клеточной структуры и заканчивая поведенческими характеристиками. Это динамическая система, отражающая взаимодействие множества факторов, включая геномные, транскриптомные, эпигенетические и метаболомные, а также воздействие окружающей среды [94].

Однако особое значение имеют процессы, которые происходят на уровне транскриптома. Одной из ключевых задач молекулярной биологии и генетики является понимание того, каким образом регуляция экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях определяет формирование функциональных и морфологических характеристик организма. Транскриптом представляет собой совокупность всех молекул РНК, которые синтезируются в клетке на основе информации, заложенной в ДНК. Транскриптом динамичен и может изменяться в зависимости от таких факторов, как тип клетки, стадия развития, условия окружающей среды и патологические состояния, а также служит отражением профиля экспрессии генов в клетке или ткани в данный момент времени, что делает его ключевым объектом для посттранскрипционной регуляции [331].

Посттранскрипционные процессы являются различными модификациями, которые происходят с молекулами РНК после этапа транскрипции, но до этапа трансляции. Помимо альтернативного сплайсинга, к ним относят кэпирование, полиаденилирование, редактирование РНК, транспорт и локализация РНК, деградация РНК [153]. Эти процессы необходимы для модулирования

динамики экспрессии генов, обеспечения точности и разнообразия протеома, организации клеточных реакций на внутренние и внешние сигналы.

Конститутивный сплайсинг (КС) и альтернативный сплайсинг (АС) – это два разных способа процессинга мРНК. При конститутивном сплайсинге все интроны удаляются и все экзоны лигируются последовательно, что обеспечивает получение единственной «стандартной» изоформы мРНК, считываемой с данного гена [425]. Конститутивный сплайсинг обеспечивает стабильность и предсказуемость экспрессии генов. Он гарантирует, что клетки будут производить необходимые белки в нужных количествах и с необходимыми функциональными свойствами. Например, гены, кодирующие структурные белки или ферменты, часто подвергаются исключительно конститутивному сплайсингу, чтобы обеспечить постоянство их экспрессии и функционирования. Изоформы мРНК, генерируемые посредством КС, обычно представляют базальный уровень экспрессии для данного гена, поскольку они последовательно вырабатываются в различных тканях и условиях, если только не регулируются определенными факторами [253, 389].

Посредством альтернативного сплайсинга происходит генерация множества изоформ мРНК из одного гена путем избирательного включения или исключения экзонов и/или интронов во время процессинга мРНК [237]. Этот механизм позволяет значительно увеличить функциональное разнообразие транскриптома, поскольку различные варианты мРНК кодируют белки с отличными друг от друга структурными и функциональными свойствами, адаптированные к конкретным клеточным функциям или стадиям развития.

История изучения альтернативного сплайсинга

История исследований альтернативного сплайсинга насчитывает несколько десятилетий и включает в себя важные вехи в понимании сложности и значимости этого фундаментального процесса регуляции экспрессии генов.

В конце 1970-х годов молекулярные биологи начали получать доказательства того, что транскрипция генов в эукариотических клетках не

приводит непосредственно к формированию зрелой мРНК. До 1977 года считалось, что молекулы мРНК, которые передают информацию от ДНК к рибосомам, являются точными копиями ДНК, причем каждая молекула мРНК точно соответствует участку ДНК, который ее кодирует. Это было верно для бактерий. В 1977 году американские ученые Ричард Робертс и Филлип Шарп независимо друг от друга открыли, что в процессе транскрипции происходит удаление некодирующих участков РНК, известных как интроны, с последующим соединением кодирующих участков – экзонов [48, 82]. С помощью рестрикционных ферментов, которые выявили размеры сегментов ДНК, Робертс и Шарп подтвердили, что молекулы мРНК эукариот действительно короче, чем соответствующие им гены; в мРНК отсутствуют большие промежутки, называемые интронами. После того, как РНК транскрибируется из ДНК, интроны вырезаются, прежде чем мРНК преобразуется в белок. Это открытие стало фундаментом для дальнейших исследований сплайсинга и привело к получению ими Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1993 году за открытие интронов и процесса сплайсинга. Сама концепция альтернативного сплайсинга была впервые предложена Уолтером Гилбертом в 1978 году на основе наблюдений за множеством изоформ мРНК, полученных из одного гена [127].

В 1979-1980 годах исследователи начали выявлять механизмы, ответственные за сплайсинг. Появились первые сообщения о малых ядерных рибонуклеопротеидах (мяРНП). Было обнаружено, что эти частицы, которые включают мяРНК (например, U1, U2, U4, U5 и U6) и связанные с ними белки, являются важными компонентами сплайсосомы, которая катализирует удаление интронов из пре-мРНК [217]. В 1980-1990-х годах ученые начали экспериментально подтверждать существование альтернативного сплайсинга, используя такие методы, как РНК-гибридизация, ОТ-ПЦР и Нозерн-блоттинг. Эти исследования показали, что АС является широко распространенным и эволюционно консервативным механизмом экспрессии генов у эукариот [197].

В 2000-х годах с развитием технологий секвенирования и увеличением объемов данных, стало возможным исследовать альтернативный сплайсинг в более широком масштабе. Была создана серия открытых баз данных, таких как Ensembl и RefSeq, в которых собрана информация о мРНК, генах и их вариантах, полученных с помощью секвенирования. Современные эксперименты по анализу АС осуществляются с привлечением полногеномного анализа на микрочипах, секвенирования РНК и количественной ПЦР (qPCR), которые позволяют исследователям профилировать и количественно определять транскрипты РНК в образце. Секвенирование РНК (RNA-seq) является широко применяемым методом, позволяющим проводить количественный анализ транскриптомов. Он включает прямое секвенирование молекул РНК, предоставляя информацию о типах и количестве транскриптов РНК, присутствующих в образце. С помощью RNA-Seq можно обнаружить известные транскрипты, а также идентифицировать новые.

События альтернативного сплайсинга

Существует несколько типов событий альтернативного сплайсинга [49, 226], каждый из которых приводит к различным изоформам мРНК (Рисунок 1.1). Следует отметить, что каждый тип идентифицируется с разной частотой в биологических царствах. Так, распространенность каждого типа события существенно различается между эукариотическими линиями. Например, пропуск экзона является наиболее распространенной формой АС у многоклеточных животных [284], тогда как удержание интрона чаще встречается у растений и грибов [357].

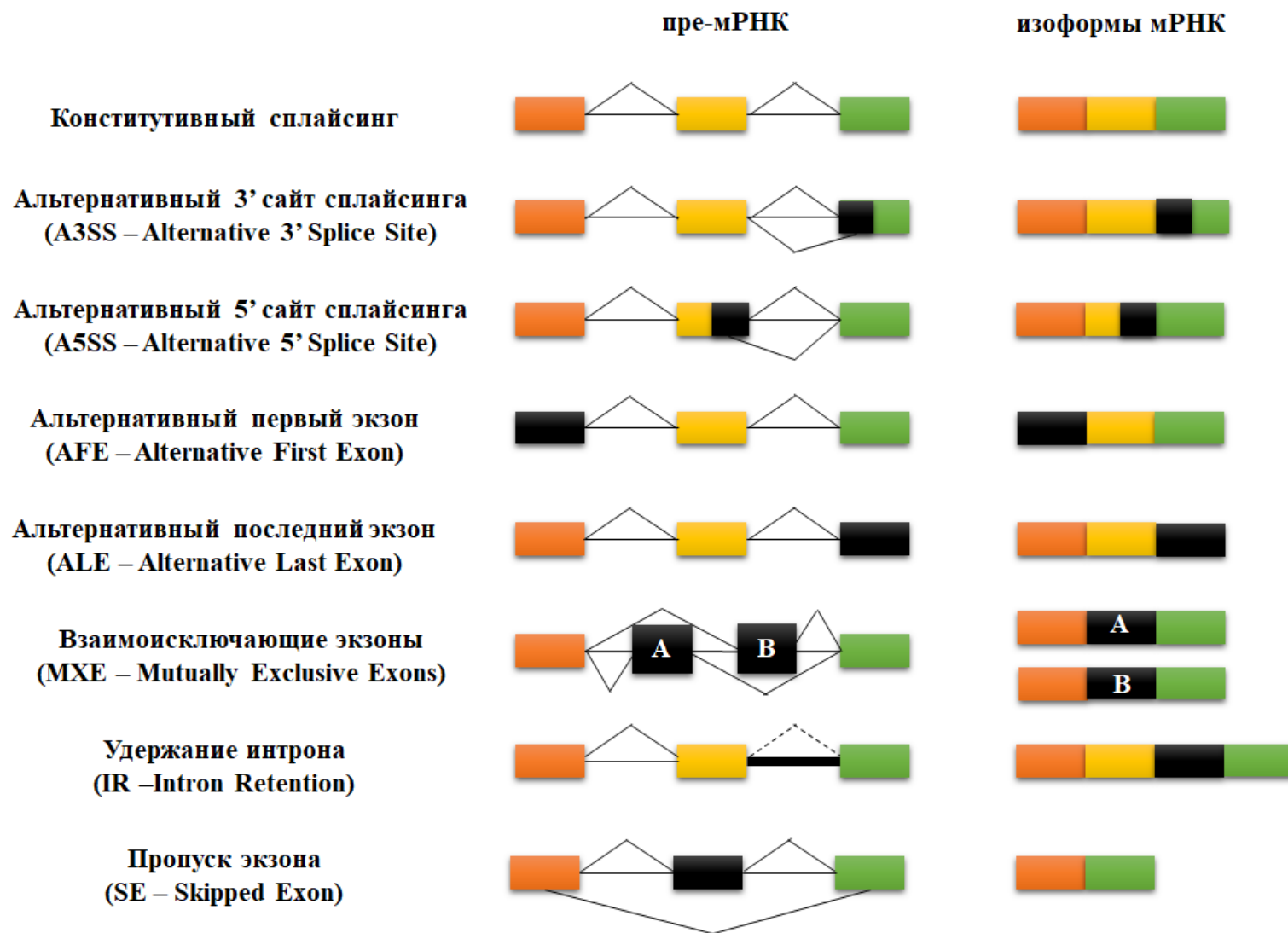


Рисунок 1.1 – Различные типы событий альтернативного сплайсинга (с изменениями по [211])

1. *Альтернативный 3'-сайт сплайсинга (альтернативный акцептор)* предполагает включение различных сегментов интрона и получение изоформ мРНК с переменными 3'-концами. Контролирует включение дополнительных аминокислотных остатков в белок, влияя на его стабильность или функцию. Ярким примером является ген *Bcl-x*, где альтернативный 3'-сайт сплайсинга дает две разные изоформы с противоположными функциями; длинная изоформа *Bcl-xL* обладает антиапоптотической активностью, тогда как короткая изоформа *Bcl-xs* опосредует запрограммированную гибель клеток [402]
2. *Альтернативный 5'-сайт сплайсинга (альтернативный донор)* приводит к включению различных сегментов интрона и образованию изоформ мРНК с переменными 5'-концами. Регулирует включение или исключение функциональных доменов в белке. Одним из примеров является ген рецептора фактора роста фибробласта 2 *FGF-R2*. Альтернативный 5'-сплайсинг приводит к образованию двух основных изоформ: *FGFR2-IIIb* экспрессируется в эпителиальных клетках и связывает *FGF7/FGF10*, а *FGFR2-IIIc* экспрессируется в мезенхимальных клетках и связывает *FGF2/FGF4* [411].
3. *Взаимоисключающий сплайсинг экзонов* происходит, когда один из двух или более экзонов включается в зрелый транскрипт мРНК, но не оба одновременно. Этот механизм обеспечивает разнообразие белков, важных для специфических клеточных функций. Ген *TPM1* содержит пару взаимоисключающих экзонов *6a* и *6b*, используя этот механизм для производства изоформ, специфичных для мышечной и немusечной ткани [238].
4. *Удержание интрона*. При сохранении интронов один или несколько интронов сохраняются в зрелом транскрипте мРНК вместо того, чтобы быть вырезанными. Обычно это приводит к значительному снижению уровня белковой продукции или продукту с аномальной функцией. Например, частичное удержание интрона в гене *PTEN* может являться одной из причин развития синдрома Каудена [369].

5. *Пропуск экзонов (кассетные экзоны)*. Один или несколько экзонов полностью исключаются из зрелого транскрипта мРНК. Чаще всего используется для регуляции функции белков, таких как изменение активности ферментов или связывающей способности рецепторов. Так, спинальная мышечная атрофия вызвана гомозиготной делецией гена *SMN1*, в результате чего дублирующий ген *SMN2* остается единственным источником белка SMN. Однако большая часть мРНК, продуцируемой из пре-мРНК *SMN2*, пропускает экзон 7 (приблизительно 80%), что приводит к образованию крайне нестабильного и почти не обнаруживаемого белка [347].

6. *Альтернативный первый экзон (альтернативный промотор)* предполагает использование различных сайтов старта транскрипции. Это приводит к образованию изоформ мРНК с различными 5'-нетранслируемыми участками, которые могут содержать уникальные регуляторные элементы, такие как сайты связывания микроРНК или мотивы, связывающие белок. Способствует тканеспецифической экспрессии белков. 5'-UTR гена *CYP19A1* содержит десять идентифицированных альтернативных нетранслируемых первых экзонов, которые регулируются тканеспецифическими промоторами в плаценте, жировой ткани, головном мозге, коже, костях и половых железах [424]. Тканеспецифические промоторы регулируются различными факторами транскрипции и зависят от местных гормонов и сигнальных путей.

7. *Альтернативный последний экзон*, также известный как альтернативное полиаденилирование – тип АС, при котором различные сайты полиаденилирования используются в пределах 3'-нетранслируемой области гена, в результате чего образуются изоформы мРНК с разными 3'-концами, которые могут влиять на стабильность, локализацию и регуляцию трансляции мРНК. Ген *SYK* экспрессирует две различные изоформы: более длинную SYK(L) и более короткую SYK(S). SYK(L) обнаруживается при многих видах рака и способствует выживанию клеток и злокачественности опухоли. Переключение SYK(L) на SYK(S) вызывает апоптоз раковых клеток яичников,

в то время как переключение в противоположном направлении приводит к росту раковых клеток [202].

Также существует такое явление как сложный альтернативный сплайсинг, при котором происходит сочетание нескольких типов АС в одной изоформе. Например, удержание интрона в сочетании с пропуском экзона или альтернативным последним экзоном [379].

Общая схема сплайсинга

Основной механизм сплайсинга состоит из двух основных этапов: сборки сплайсосомы, за которой следует, собственно, сплайсинг пре-мРНК [206, 237]. Сплайсосома – структура, состоящая из молекул РНК и белков и осуществляющая удаление некодирующих последовательностей (интронов) из предшественников мРНК. Сплайсосома в основном состоит из пяти малых ядерных рибонуклеопротеидов (мяРНП) (U1, U2, U4/U6, U5) и позволяет идентифицировать ключевой набор сигналов сплайсинга: 5'-сайт сплайсинга, последовательность точек ветвления и 3'-сайт сплайсинга [206, 384, 419]. Интроны обычно определяются по наличию последовательности GU на 5'-конце и последовательности AG на 3'-конце. 3'-конец может быть также определен по цепочке полипиримидинов различной длины, называемой полипиримидиновым трактом [244, 312, 336] (Рисунок 1.2).

Во время сборки мяРНП U1 связывается с 5'-сайтом сплайсинга с помощью белка вспомогательного фактора U2 (U2AF), образуя спаривание оснований между мяРНП U1 и сайтом сплайсинга. Этот самый ранний сформированный комплекс (комплекс E или комплекс фиксации) затем связывается с мяРНП U2, образуя комплекс A (предсплайсосому) [76, 295]. Формирование комплекса A обеспечивает вырезание интрона и сохранение последнего экзона на заключительном этапе. Комплекс B (прекаталитическая сплайсосома) образуется из комплекса A, соединяющего мяРНП U4, U5 и U6 [296, 416]. Затем происходит серия сложных процессов реорганизации, чтобы сформировать комплекс C (каталитическая стадия 1 сплайсосомы) [415].

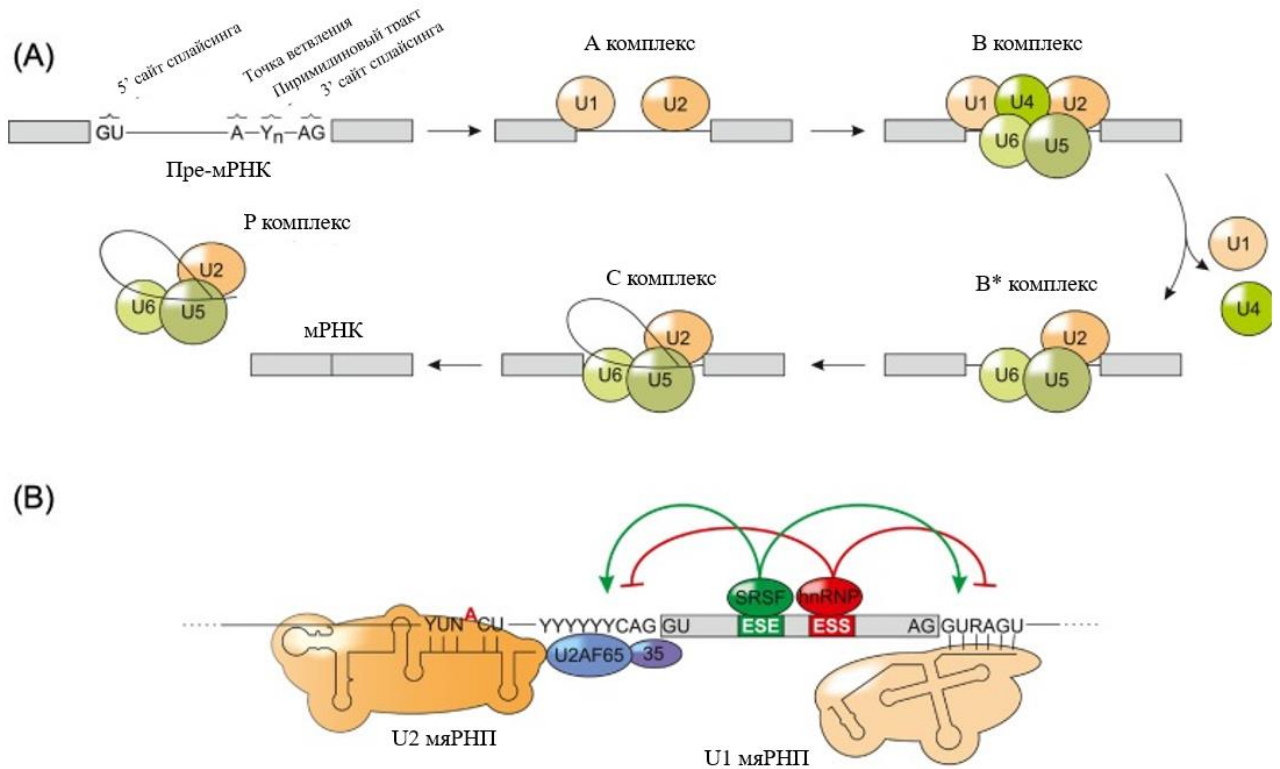


Рисунок 1.2 – Механизм сплайсинга и его регуляция [267]

Во-первых, взаимодействие мяРНП U1 в донорном участке заменяется взаимодействием мяРНП U6, за которым следуют U1 и U4, покидающие комплекс В. Этот окончательно образовавшийся комплекс С катализирует две реакции переэтерификации сплайсинга. Во время первой переэтерификации фосфат в 5'-сайте сплайсинга подвергается атаке 2'-гидроксильной группы в точке разветвления, что приводит к отщеплению 5'-конца интрона от вышестоящего экзона и последующему присоединению к точке разветвления фосфодиэфирной связью. При второй переэтерификации фосфат в сайте 3'-сплайсинга интрона подвергается атаке 3'-гидроксила нижележащего экзона [400]. Этот шаг окончательно высвобождает интрон, а также связывает два экзона фосфодиэфирной связью.

При конститутивном сплайсинге сплайсосома распознает специфические последовательности на границах интрон-экзон и удаляет интрон, соединяя соседние экзоны вместе, образуя зрелую мРНК. Однако в случаях удержания интрона сплайсосома может не распознать или неправильно сплайсировать

интрон, что приводит к его удержанию в зрелой мРНК [244]. Этот сбой может происходить из-за различных факторов, включая мутации в сайтах сплайсинга, регуляторных элементах в интронных или фланкирующих последовательностях или изменения уровней экспрессии или активности компонентов сплайсосомы [320]. Последствия удержания интрона могут варьировать в зависимости от конкретного сохраняемого интрона и его расположения в транскрипте мРНК. В некоторых случаях удержание интрона может привести к преждевременной терминации кодонов или нарушению рамок считывания, что приводит к образованию нефункциональных или усеченных белков. В других случаях удержание интрона может также привести к включению регуляторных элементов или белковых доменов, закодированных внутри сохраненного интрона, изменяя функцию или локализацию полученной изоформы белка [166].

Регуляция сплайсинга

Процесс сплайсинга регулируется различными цис-действующими элементами и транс-действующими факторами, которые связываются с цис-сайтами первичного транскрипта (Рисунок 1.3) [79, 375]. Этот регуляторный механизм управляет распознаванием и включением/исключением экзонов, выбором места сплайсинга и сборкой сплайсосомы, обеспечивая точный контроль над альтернативными схемами сплайсинга в различных условиях.

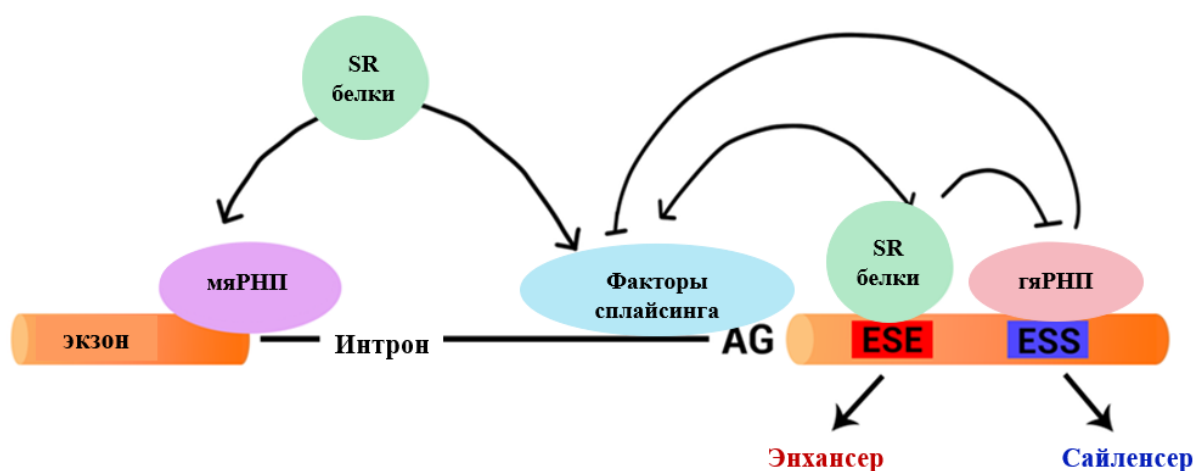


Рисунок 1.3 – Схематичное изображение цис- и транс-факторов сплайсинга

Иногда наличия или отсутствия одного-единственного регулятора достаточно для альтернативного сплайсинга пре-мРНК [169, 243]. Цис-действующие элементы в основном состоят из энхансеров и сайленсеров, специфичных для экзонов и интронов. В целом, цис-действующие элементы функционируют аддитивно. Энхансеры, как правило, играют доминирующую роль в конститутивном сплайсинге, в то время как сайленсеры относительно более важны для контроля альтернативного сплайсинга [54, 392].

Транс-действующие факторы, такие как SR белки (серин/аргинин-богатые факторы сплайсинга), могут связываться с энхансерами сплайсинга экзона или интрона, чтобы помочь аппарату сплайсинга распознавать слабые сайты сплайсинга [339]. Также SR белки взаимодействуют с мяРНП U1 и субъединицей гетеродимерного фактора U2AF массой 35 кДа. Вторая субъединица U2AF, U2AF65, связывает фактор сплайсинга 1 и пиримидиновый тракт одновременно на основе богатого серином/аргинином домена, что приводит к распознаванию и стабильности точки сплайсинга, а также последовательностей полипиримидинового тракта [426]. С другой стороны, такие белки, как гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины (гяРНП), связываются с сайленсерами сплайсинга экзона или интрона, чтобы предотвратить сплайсинг, маскируя сайты сплайсинга от сплайсосомы, или стимулировать пропуск экзонов, подавляя включение экзона стерическими действиями, или связывается с обеими сторонами кассетного экзона, образуя петлю, пропускающую экзон [200].

Структуры РНК также играют важную роль в регуляции АС [67]. Они могут либо способствовать сплайсингу, либо ингибировать его. Например, в гене *ADML* аденовирусов образуется шпилька, чтобы приблизить 3'-сайт сплайсинга к трем возможным точкам расхождения [77]. В некоторых других случаях структуры, расположенные близко к экзонам или сайтам сплайсинга, могут изолировать важные последовательности, необходимые для сплайсинга, тем самым подавляя использование сайтов сплайсинга [393].

Дифференциальный и абберантный альтернативный сплайсинг

Дифференциальный сплайсинг мРНК (ДС) встречается как в норме, так и при патологии. При физиологическом состоянии, как явление, при котором паттерны альтернативного сплайсинга различаются в зависимости от типов клеток, стадии развития организма, условий среды, сигнальных путей. В таком случае ДС является естественным регуляторным механизмом, который позволяет клеткам генерировать множество изоформ мРНК из одного гена, тем самым увеличивая протеомное разнообразие и регулируя экспрессию генов. Исследователи часто изучают дифференциальный альтернативный сплайсинг, чтобы понять, как изменения в паттернах сплайсинга способствуют клеточному разнообразию и функциональной специализации [110, 170, 408]. С другой стороны, ДС можно рассматривать в условиях манифестации заболеваний, так, например, определенные изоформы могут иметь более высокую экспрессию при патологии, как в случае изоформы e15a гена *FLT1* при преэклампсии [280, 281].

Абберантный альтернативный сплайсинг (ААС) относится к аномалиям в нормальном процессе сплайсинга молекул пре-мРНК, приводящих в итоге к образованию нефункциональных или дисфункциональных белков [106, 205, 380]. ААС может возникать из-за различных факторов, включая мутации в сайтах сплайсинга или регуляторных последовательностях, изменения в экспрессии или активности факторов сплайсинга, изменения в механизме сплайсинга или нарушения в клеточной среде.

Принимая во внимание важную роль сплайсинга пре-мРНК в формировании разнообразия белков и поддержании функциональности организма, неудивительно, что нарушение сплайсинга может привести к дисфункции генов и даже к заболеванию. По состоянию на январь 2026 года, известно около 20 000 белок-кодирующих генов у человека и от 80 000 до 100 000 различных белковых изоформ. Альтернативному сплайсингу подвержены почти 95% генов человека [282]. Таким образом, в среднем каждый ген имеет около пяти изоформ. Некоторые гены человека демонстрируют высокий

уровень консервативности на протяжении эволюции, сохраняя свои последовательности и функции у различных видов. Под консервативностью подразумевается, что определенные гены часто демонстрируют относительно стабильные транскрипционные профили и ограниченное разнообразие альтернативных изоформ, при котором преобладает одна каноническая, функционально полноценная изоформа мРНК. Отклонения от данного паттерна встречаются редко и, как правило, ассоциированы с патологическими состояниями или стрессовыми условиями, что подчёркивает функциональную значимость экспрессии таких генов. Эти гены обычно связаны с базовыми и критическими для жизни процессами: трансляция белков (*RPS*, *RPL*), клеточная структура и движение (*ACTB*, *TUBB*), окислительное фосфорилирование (*COX1*), гликолиз (*GAPDH*). Между тем, недавнее исследование показало, что более 30% тканезависимых вариаций транскриптов составляют локальные вариации сплайсинга [379]. Учитывая, что такой высокий уровень сложности генома человека подтверждается гибкостью каждого гена при альтернативном сплайсинге, естественно рассматривать это как фактор риска развития ряда заболеваний.

Нарушения альтернативного сплайсинга тесно связаны с патогенезом многих многофакторных заболеваний (МФЗ). Это заболевания, развитие которых зависит от взаимодействия генетических и средовых факторов. К ним относят рак, диабет, сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные болезни, аутоиммунные расстройства и другие. ДС позволяет одному гену производить несколько различных изоформ белков, так, в генах *TP53* (гена-супрессора опухолей), *BCL2* (регулятор апоптоза) и *CD44* (адгезионный белок) альтернативный сплайсинг приводит к образованию изоформ, которые могут либо ингибировать апоптоз, либо ускорять клеточную пролиферацию, что способствует развитию рака [205, 380, 394]. Стоит отметить, что при анализе паттернов альтернативного сплайсинга при различных акушерских патологиях преимущественно рассматривается именно этот тип альтернативного сплайсинга [233, 315]. ААС часто приводит к синтезу дефектных белков,

нарушающих нормальные клеточные функции и взаимодействия. Процессы ААС связаны с различными нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера [51], болезнь Паркинсона [121] и боковой амиотрофический склероз [204]. ААС является общей особенностью раковых клеток и способствует прогрессированию опухоли, метастазированию и лекарственной устойчивости [332, 421]. Нарушение регуляции сплайсинга может привести к образованию онкогенных изоформ, изменениям в сигнальных путях и изменениям клеточных фенотипов.

Существующие биоинформатические подходы к анализу альтернативного сплайсинга

Биоинформатический анализ является мощным инструментом для изучения сложных молекулярных механизмов альтернативного сплайсинга. За последнее десятилетие были разработаны различные вычислительные инструменты для анализа альтернативного сплайсинга на основе данных RNA-seq. В целом, методы анализа АС можно разделить на три основные категории: подходы, ориентированные на изоформы (cuffdiff2 [370], DiffSplice [161]); подходы, ориентированные на экзоны (DEXSeq [26], JunctionSeq [145]); и событийные подходы (MAJIQ [379], rMATS [338], SUPPA2 [372], SGSeq [132]). Подходы, ориентированные на изоформы, фокусируются на идентификации и количественном определении полных транскриптов, которые формируются в результате альтернативного сплайсинга. Инструменты количественной оценки изоформ, такие как Salmon [283], Kallisto [59] и RSEM [221], используются для выявления изменений в относительном количестве изоформ гена в различных условиях эксперимента без выравнивания (quasi-mapping). Экзон-центрические подходы непосредственно направлены на количественную оценку коэффициентов включения отдельных экзонов, независимо от их принадлежности к определенным изоформам. Существенным минусом является невозможность определить точные связи между экзонами и транскриптами. Анализ на основе событий фокусируется на выявлении и

количественной оценке конкретных событий альтернативного сплайсинга, таких как пропуск экзона, альтернативные 5' или 3' сайты сплайсинга, удержание интрона, альтернативные первый и последний экзоны и взаимоисключающие экзоны. Квантифицируется уровень включения (PSI, Percent Spliced In) или частота конкретного события в различных условиях, но при этом наблюдается сильная зависимость от аннотации для корректной идентификации событий. В одном из исследований, где были протестированы 10 различных инструментов [247], в итоге продемонстрировано, что все методы, основанные на экзонах, и только два метода, основанные на событиях (MAJIQ и rMATS), показали хорошие результаты по выбранным показателям: согласованность, воспроизводимость, точность, частоты повторных и ложных обнаружений, соответствие сообщаемых дифференциально сплайсированных генов и функционального обогащения. Каждый подход имеет свои преимущества и ограничения. Выбор метода анализа зависит от целей исследования. Для изучения полных транскриптов предпочтительны изоформные подходы. Для локального анализа экспрессии – экзонные. Для изучения конкретных изменений в сплайсинге – событийные. Анализ, основанный на событиях, является более полным и современным методом для исследования ландшафта альтернативного сплайсинга. Особенно интересными представляются программы с «встроенной» визуализацией, такие как: MAJIQ, rMATS и SGSeq. Но одним из недостатков rMATS является анализ 5 типов событий вместо 7, а SGSeq больше нацелен на таргетный анализ генов, вместо оценки полномасштабных изменений событий AC [4]. Поэтому MAJIQ является наиболее эффективной программой для исследования AC и будет более подробно описана в разделе «Материал и методы».

В одном из существующих исследований ландшафта альтернативного сплайсинга в плацентарной ткани при задержке роста плода анализ сводится к оценке только пропуска экзона [315], тогда как в другом были рассмотрены лишь пять типов событий сплайсинга [233], что не отражает всей сложности посттранскрипционной регуляции. Кроме того, оба исследования проводились

на цельных фрагментах плаценты, несмотря на то что ткань представляет собой гетерогенную структуру, включающую разнообразные клеточные популяции с различными функциями. Именно поэтому переход от анализа цельных образцов к изучению клеточного уровня альтернативного сплайсинга является необходимым шагом для более точного понимания механизмов патогенеза плацентарных нарушений.

1.2 Роль децидуализации в поддержании физиологического течения беременности. Краткая характеристика задержки роста плода. Роль альтернативного сплайсинга в патогенезе задержки роста плода

Роль децидуализации в поддержании физиологической беременности

Клеточный состав плацентарной ткани играет решающую роль в обеспечении нормального внутриутробного развития плода на протяжении всей беременности. Клетки плаценты обеспечивают транспорт кислорода, питательных веществ и метаболитов, участвуют в эндокринной регуляции и синтезе гормонов, необходимых для адаптации организма матери к гестации [68, 140, 165, 373]. Нарушение функциональной активности отдельных клеточных популяций плаценты способно приводить к серьёзным осложнениям как со стороны матери, так и со стороны плода. Одним из ключевых процессов, определяющих успешное формирование и функционирование плаценты на клеточном уровне, является децидуализация – трансформация эндометрия в специализированную ткань, обеспечивающую оптимальные условия для имплантации и последующего развития эмбриона [125, 277].

Во время физиологической беременности (ФБ) спиральные артерии матки подвергаются интенсивному ремоделированию, в результате которого они трансформируются из узких, реактивных сосудов в широкие, не реагирующие на вазоактивные стимулы каналы с низким сосудистым сопротивлением [21]. Это необходимо для обеспечения адекватного притока крови к плаценте и удовлетворения быстро растущих потребностей плода. Процесс ремоделирования включает две фазы: сначала изменения происходят на уровне

децидуального сегмента артерий, а затем – миометриального. Глубокая плацентация у человека, в отличие от других млекопитающих, включает трансформацию обоих сегментов примерно 100 спиральных артерий, и её успех во многом зависит от качества децидуализации [95, 326].

С эволюционной точки зрения человеку присуща уникальная модель децидуализации, которая происходит не только в ответ на имплантацию эмбриона, но и в позднюю секреторную фазу менструального цикла, независимо от наступления беременности. Эти процессы делают эндометрий человека в определённой степени «подготовленным» к возможной гестации. Децидуализация включает морфологическую и функциональную трансформацию фибробластов эндометрия в крупные, метаболически активные децидуальные клетки (ДК), обладающие способностью к секреции, иммунорегуляции и ответу на окислительный стресс [124, 175, 215, 351]. ДК богаты гликогеном и липидами, служащими источником энергии для развивающегося эмбриона, и выделяют широкий спектр биологически активных молекул, в том числе пролактин, IGFBP-1, IL-15, CXCL14, а также молекулы, регулирующие функцию NK-клеток. Важнейшими функциями ДК являются модуляция инвазии трофобласта, контроль локального воспаления, участие в ремоделировании сосудов, регуляция иммунной толерантности к полуаллогенному плоду. Кроме того, они участвуют в регуляции гемостаза, предотвращая как тромбообразование, так и кровотечения в области имплантации. Таким образом, децидуальные клетки играют центральную роль в формировании благоприятной микросреды на материнской стороне плаценты, обеспечивая как физиологическое развитие беременности, так и адаптивные механизмы в ответ на стрессовые воздействия [60, 328, 352]. В целом, выявлена ключевая роль децидуальных клеток как в поддержании физиологической беременности, так и в развитии ее неблагоприятных исходов [15, 16, 17, 18]. В связи с этим ДК были выбраны в качестве объекта исследования в этой работе.

Нарушения децидуализации неизбежно приводят либо к ранней потере беременности, либо к предрасположенности к акушерским осложнениям,

связанным с нарушением функции плаценты [61, 107, 232, 272]. Впервые дефектная глубокая плацентация была описана именно при задержке роста плода (ЗРП) и преэклампсии (ПЭ) [61, 63, 64], что указывает на общность патогенетических механизмов. Данные заболевания относятся к большим акушерским синдромам (БАС), охватывающих группу сложных акушерских патологий, которые представляют значительный риск, как для здоровья матери, так и для плода. Также к ним относят преждевременные роды, привычное невынашивание беременности и преждевременный разрыв плодных оболочек [102]. В некоторых исследованиях продемонстрировано, что в основе БАС на тканевом уровне лежит нарушение процессов плацентации [62, 155]. Но несмотря на значительный прогресс в изучении клинической картины и средовых причин заболеваний из группы больших акушерских синдромов, а также раскрытии роли плацентарной дисфункции и децидуальных клеток, остаются проблемы в понимании сложной генетической архитектуры, также лежащей в основе фенотипической манифестации.

Стоит отметить, что в отличие от преэклампсии, которая за последние годы стала объектом многочисленных молекулярно-генетических исследований и хорошо охарактеризована на уровне транскриптома, эпигенетики и сигнальных путей, задержка роста плода остаётся сравнительно малоизученной.

Определение и этиопатогенез задержки роста плода

Задержка роста плода – осложнение беременности, определяемое как неспособность плода реализовать свой генетически обусловленный потенциал роста. Данная патология имеет высокий удельный вес, по-прежнему являясь второй по распространенности среди больших акушерских синдромов (около 10% или примерно 20 миллионов новорожденных в год по данным ВОЗ), и большую социально-экономическую значимость за счет снижения демографических показателей, ложась существенным бременем на системы здравоохранения во всем мире [12, 97, 264, 334]. ЗРП является значимым

фактором, обуславливающим материнскую заболеваемость и смертность, более частые случаи недоношенности, мертворождения и неонатальной смертности.

Стоит отметить, что задержка роста плода нередко манифестирует в сочетании с преэклампсией и преждевременными родами, что зачастую обуславливает более тяжелое течение патологии [19]. Исходя из этого, дальнейшие исследования специфических и общих патофизиологических механизмов и генетических факторов, лежащих в основе изолированной и сочетанной задержки роста плода, представляют наибольший интерес и могут послужить основой для персонализированных подходов при ведении беременности.

На данный момент, согласно клиническим рекомендациям Российского общества акушеров-гинекологов (РОАГ), есть три термина [7]: малый для гестационного возраста плод (МГВ), задержка роста плода и выраженная задержка роста плода. Для ЗРП характерно замедление прироста показателей предполагаемой массы плода (ПМП) и/или окружности живота (ОЖ) <10-го перцентиля в сочетании с патологическими показателями кровотока по данным ультразвуковой доплерографии. Для выраженной ЗРП диагностическим показателем является ПМП <3-го перцентиля. Основное различие между МГВ и ЗРП заключается в том, что МГВ плод может быть маленьким, но не подвержен повышенному риску неблагоприятного перинатального исхода, в то время как плод с размером выше 10-го перцентиля может иметь ЗРП и иметь повышенный риск неблагоприятного перинатального и отдаленного исхода.

Термин патогенетика (pathogenetics) означает изучение наследственных механизмов развития патологических признаков, исследование путей превращения «аномального» генома в фенотип болезни [10]. Этиология ЗРП многофакторна и включает в себя широкий спектр различных причин [5, 21, 324]. Факторы, которые способствуют задержке роста плода, можно разделить на четыре отдельные группы: плацентарные, фетальные, материнские и генетические (Рисунок 1.4).

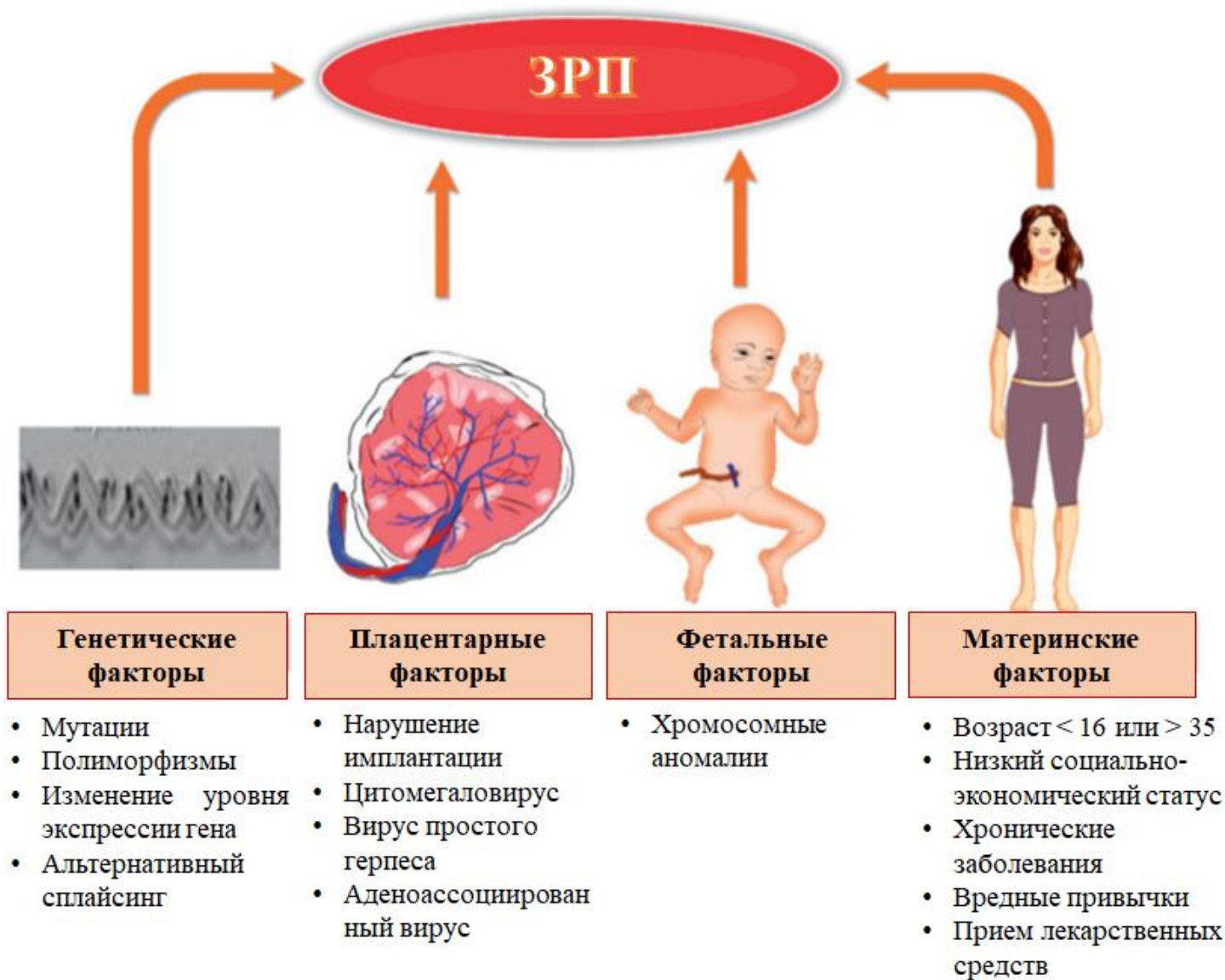


Рисунок 1.4 – Этиология задержки роста плода (по [334] с изменениями)

Предполагается, что центральная роль в патогенезе недостаточного роста плода является снижение маточно-плацентарного кровотока, приводящее к уменьшению площади обмена кислородом и питательными веществами между матерью и плодом как на поверхности ворсинок, так и на поверхности капилляров плода [6, 9].

Известно, что такие материнские факторы как возраст, социально-экономический статус, хронические заболевания, инфекции, вредные привычки, а также приём лекарственных средств влияют на появление патологий у плода. Было установлено, что возраст матери менее 16 и более 35 лет [255], низкий социально-экономический статус и проживание в развивающейся стране, различные материнские заболевания, такие как гипертензивные расстройства, сахарный диабет, хроническое заболевание почек, системная красная волчанка, антифосфолипидный синдром, серповидно-клеточная анемия являются факторами риска ЗРП [22]. При многоплодной беременности конкуренция за питательные вещества и пространство в матке может привести к ЗРП у одного или нескольких плодов, что приводит к рождению монохориальных близнецов с селективным ограничением роста плода [222, 313].

Плацентарная инфекция также может являться причиной задержки роста плода. Вирусы редко проникают через плацентарный барьер, но, когда вирус все же достигает плода, это может привести к серьезным врожденным дефектам, таким как микроцефалия или даже гибель плода. Хорошо известно, что вирусная инфекция, затронувшая клетки на границе раздела мать-плод, может повлиять на функционирование плаценты и привести к осложнениям беременности, включая ЗРП. Наиболее распространенными вирусами, выявленным на сегодняшний день на границе между матерью и плодом, являются цитомегаловирус, вирус простого герпеса и аденоассоциированный вирус. Цитотрофобласт первого триместра беременности, инфицированный одним из вышеуказанных вирусов, демонстрирует сниженную клеточную инвазию в децидуальную оболочку, повышенный апоптоз, снижение секреции

хорионического гонадотропина человека, что впоследствии может привести к ЗРП, ПЭ и спонтанному аборту [302]. Также уровни рецепторов комплемента C3a и C5a повышаются при инфекции, что приводит к сосудистой недостаточности плаценты из-за дисрегуляции ангиогенных факторов, которые необходимы для ремоделирования сосудов плаценты во время роста плода [88].

Хромосомные аномалии плода составляют 7-19% от общего числа новорожденных с ЗРП. Наиболее частыми хромосомными аномалиями являются трисомии 13 (синдром Патау), 18 (синдром Эдвардса) и 21 (синдром Дауна) [310]. Другими хромосомными аномалиями являются аутосомные делеции, кольцевые хромосомы и однородительская дисомия [65]. Генетические синдромы, которые, как известно, приводят к развитию ЗРП, включают синдром Блума, синдром Рассела-Сильвера, синдром Корнелии де Ланге, синдром Рубенштейна-Тайби, синдром Дубовица, синдром Секеля, синдром Йохансона-Близзарда, синдром Робертса и синдром Де Санктиса-Каччионе [148] и др.

Особое значение приобретает тот факт, что дети, рождённые с ЗРП, подвержены высокому риску различных осложнений, что придаёт проблеме дополнительную социальную и медицинскую значимость. Доказано, что младенцы с ограничением роста плода восприимчивы к повышенному риску развития респираторного дистресс-синдрома, легочной гипертензии, гипогликемии, гипокальциемии, гипофосфатемии и могут страдать от задержки когнитивных функций, неврологических и психических расстройств в более позднем возрасте [414]. В дальнейшем онтогенезе взрослые склонны к избыточному весу, артериальной гипертензии, сахарному диабету 2 типа, иммунной дисфункции, сокращению продолжительности жизни, а также неврологическим, сердечно-сосудистым, почечным, печеночным и респираторным осложнениям [46, 252, 264].

Патофизиологические аспекты

С клинической точки зрения описанные неблагоприятные перинатальные и отдалённые последствия задержки роста плода являются отражением патофизиологических нарушений, формирующихся ещё на этапе внутриутробного развития. В основе ЗРП лежит несоответствие между метаболическими потребностями плода и возможностями их обеспечения [252]. Это состояние развивается преимущественно вследствие плацентарной недостаточности и рассматривается как результат сложного каскада нарушений на сосудистом, клеточном и молекулярном уровнях [9, 28, 43, 334] (Рисунок 1.5).

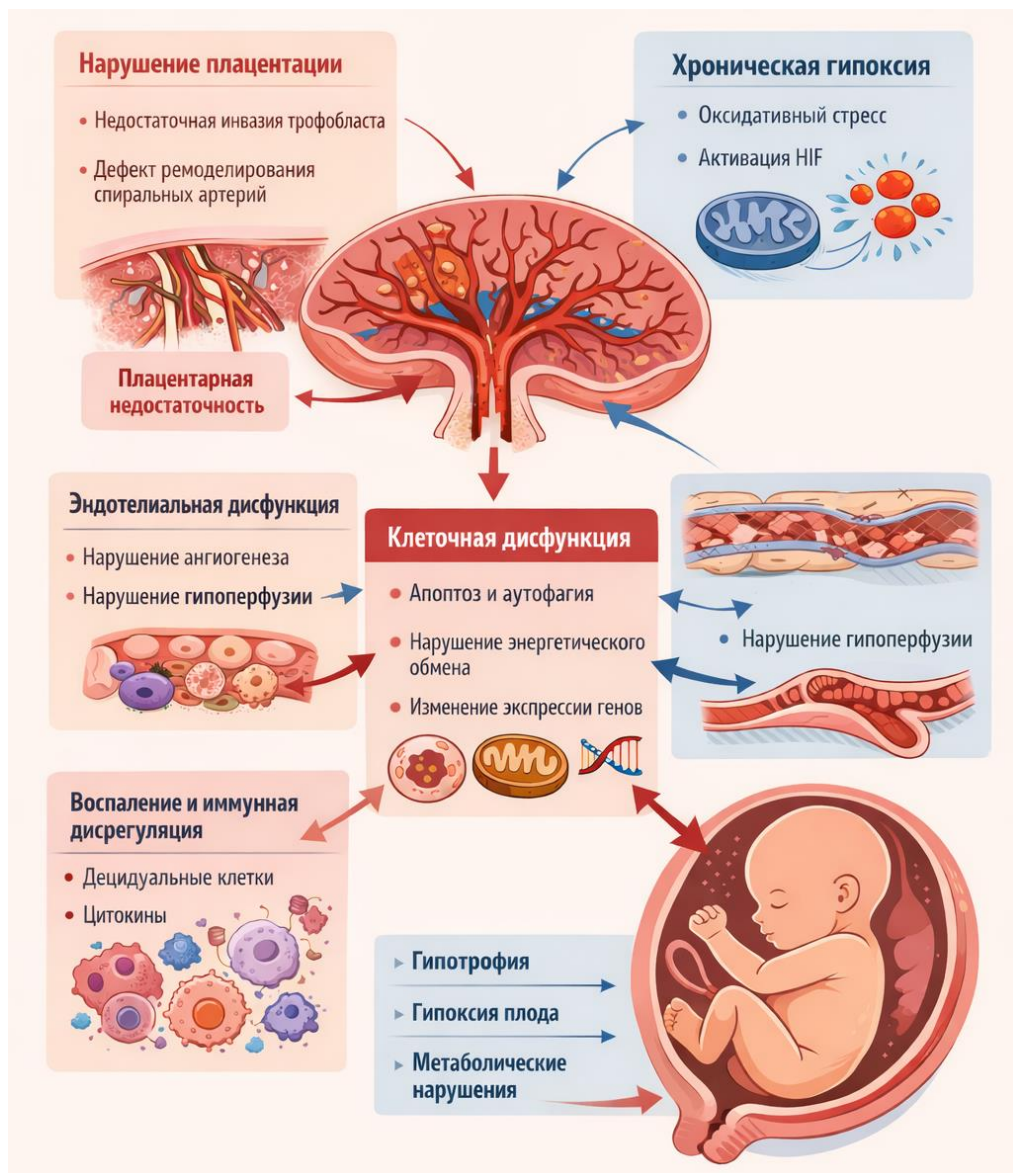


Рисунок 1.5 – Патофизиологические механизмы задержки роста плода

Ключевым звеном патофизиологии задержки роста плода является нарушение процессов плацентации, прежде всего дефект ремоделирования спиральных артерий миометрия. В норме инвазия цитотрофобласта приводит к трансформации этих сосудов в низкорезистентные каналы, обеспечивающие адекватную перфузию межворсинчатого пространства. При ЗРП данный процесс остаётся неполным: артерии сохраняют мышечный слой и способность к вазоконстрикции, что ограничивает маточно-плацентарный кровоток и формирует состояние хронической гипоперфузии [43].

Снижение перфузии плаценты сопровождается развитием хронической гипоксии и оксидативного стресса, что оказывает системное воздействие на плацентарную ткань. Активация гипоксия-индуцируемых сигнальных путей, накопление реактивных форм кислорода и нарушение митохондриальной функции приводят к дезорганизации энергетического обмена, снижению пролиферативной активности клеток и активации программ апоптоза и аутофагии. Важной составляющей патогенеза ЗРП является эндотелиальная дисфункция и нарушение ангиогенеза [9, 28]: дисбаланс между проангиогенными и антиангиогенными факторами приводит к снижению плотности сосудистой сети ворсин, уменьшению площади фето-материнского обмена и дальнейшему ухудшению доставки кислорода и питательных веществ. На фоне этих изменений формируется морфологическая картина плацентарной недостаточности, включающая снижение зрелости ворсин, интерстициальный отёк, фибриноидные отложения и инфарктоподобные участки. Наряду с сосудистыми и метаболическими нарушениями, существенную роль играют изменения функционального состояния децидуальных клеток, обеспечивающих иммунную толерантность. Дисрегуляция этих процессов способствует формированию хронического воспаления и нарушению межклеточных взаимодействий [88, 107].

Очевидно, что столь многоуровневая патология не может быть объяснена исключительно анатомическими или гемодинамическими изменениями, что подчёркивает необходимость обращения к молекулярным механизмам,

лежащим в основе нарушений функций клеток плаценты. В этом контексте особый интерес представляет изучение процессов транскриптомной регуляции, включая альтернативный сплайсинг, как потенциального звена, связывающего патофизиологические изменения плаценты с клиническими проявлениями задержки роста плода.

Альтернативный сплайсинг в патогенетике задержки роста плода

Стоит отметить, что в литературе имеется небольшое количество работ, затрагивающих изучение альтернативного сплайсинга при ЗРП. Так, на сентябрь 2025 года в базе данных PubMed при запросе «fetal growth restriction / intrauterine growth restriction / fetal growth retardation alternative splicing» с учетом фильтра «humans» обнаружены 17 результатов, 16 из которых являются экспериментальными статьями, а 1 – обзорной, в которой обсуждается роль белка Klotho, две основные формы которого образуются в результате альтернативного сплайсинга [176]. В 4 экспериментальных исследованиях описаны различные генетические синдромы [47, 108, 218, 407]; 3 работы связаны с ПЭ, малым для гестационного возраста плодом и спонтанными абортами, а не ЗРП [53, 234, 235]; 3 исследования проведены на стволовых клетках [80, 319, 424]; а 2 эксперимента проведены на таких модельных организмах как мыши [70, 420]; в 1 работе продемонстрировано моделирование продукта одной из изоформ рецептора инсулина, лишенной альтернативно сплайсированного экзона 11 (IR-A), и только упомянуто наличие экспрессии в эмбриональных и раковых клетках [101]. И только 3 работы полностью удовлетворяют поисковому запросу [119, 233, 315].

В исследовании Ruano и коллег проведено широкогеномное исследование молекулярного профиля котиледонов на микрочипах ClariomD (Affymetrix) при ПЭ (N = 9) и ЗРП (N = 8) в сравнении с ФБ (N = 20). При сравнении плацентарной ткани от пациенток с ФБ и ЗРП авторы идентифицировали 1409 дифференциально сплайсированных генов. Наибольшим индексом сплайсинга обладают гены *BAIAP2*, *PLA2G2F*, *CRX*, *MED18*, *PRAMEF9*, а наименьшим –

FSTL3, *HTRA4*, *XIST*, *SLC38A9*, *TREM1*. Индекс сплайсинга (PSI, Percent Spliced In) – это количественный показатель, отражающий относительную долю или частоту определённого события АС и позволяющий оценить различия между группами. Функциональная аннотация всех выявленных в работе генов, дифференциально сплайсированных при ЗРП, согласно базе данных GLAD4U показала ассоциации с такими категориями, как удержание синтазы оксида азота (NOS) в плаценте (PA165108943), гестационной артериальной гипертензией (PA165108364), осложнениями беременности (PA445403), преэклампсией (PA445398) и метастазированием (PA445058). Стоит отметить, что в цитируемой работе идентифицировано 176 альтернативно сплайсированных генов при обоих патологических состояниях, в том числе 4 гена, обладающими максимальными значениями PSI как при ПЭ, так и при ЗРП (*BAIAP2*, *PLA2G2F*, *FSTL3*, *XIST*). Также в этой работе для 48 генов с наиболее высоким индексом сплайсинга были идентифицированы 52 цис-sQTL и 52 транс-sQTL и показано аллель-специфическое влияние четырех транс-sQTL (rs13185255, rs6965391, rs1431647, rs7145295) на альтернативный сплайсинг различных генов. Интересно, что 3 из этих 4 транс-sQTL связаны с изменением сплайсинга гена *FLT1*, изоформа которого e15a ассоциирована с развитием преэклампсии. Таким образом, Ruano и коллеги представили всеобщему вниманию возможный механизм регуляции появления этой изоформы в организме человека посредством действия sQTL [315]. Настоящее исследование предлагает новое видение регуляции экспрессии плацентарных генов, которое требует дальнейшего изучения.

Ещё одно исследование альтернативного сплайсинга при ЗРП проведено Majewska и коллегами, где выполнено полнотранскриптомное исследование плацентарной ткани на 5 образцах с ФБ и 5 образцах с ЗРП. Работа была направлена как на выявлении дифференциально экспрессирующихся генов, так и дифференциально сплайсированных. В итоге было идентифицировано 88 дифференциально сплайсированных генов, с помощью совокупного анализа такими программами, как rMATS и SUPPA. Функциональная аннотация всех

выявленных в работе генов, дифференциально сплайсированных при ЗРП, согласно базе данных GLAD4U показала ассоциации с такими категориями, как осложнения беременности (РА445403), сердечно-сосудистые заболевания (РА443635, РА443425, РА443423, РА443636), эндокринные нарушения (РА444525, РА443890), висцеральное ожирение (РА447286) и лейкоemia (РА444090) [233].

В третьей работе рассматривается роль гена *PPP1R12A* и его изоформ в развитии осложнений беременности при преэклампсии и задержке роста плода [119], которые, как описано выше, возникают из-за первоначальной плацентарной недостаточности, что приводит к клиническим последствиям, свидетельствующим о дисфункции эндотелия [195, 323]. Ген *PPP1R12A* кодирует субъединицу миозиновой фосфатазы, участвующей в регуляции расслабления гладких мышц сосудов за счет дефосфорилирования миозиновых фибрилл. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию различных изоформ *PPP1R12A*, включая варианты с включением или исключением лейциновой «молнии» (LZ-домена). Изоформы без LZ-домена менее чувствительны к воздействию оксида азота и протеинкиназы G, что способствует повышенной сократимости сосудов. В образцах плацент от пациентов с ПЭ и ЗРП наблюдалось увеличение экспрессии таких изоформ, что, по предположениям авторов, может приводить к сужению сосудов и снижению кровотока в плаценте [119].

Таким образом, альтернативный сплайсинг, вероятно, является одним из ключевых механизмов регуляции экспрессии генов, связанных с функцией плаценты и развитием плода. Специфические изменения сплайсинга мРНК генов, ассоциированных с ЗРП, могут влиять на ангиогенез, сосудистый тонус и стрессовые реакции в плаценте.

Несмотря на это, причины возникновения таких изменений остаются во многом неясными. Одним из возможных факторов, определяющих предрасположенность к развитию данной патологии, могут быть эволюционные процессы. Естественный отбор в разные периоды человеческой истории мог

закреплять генетические варианты, обеспечивавшие адаптацию к условиям внешней среды и повышавшие репродуктивный успех, но при этом в современных условиях они могут ассоциироваться с патологией беременности.

1.3 Роль естественного отбора в формировании ландшафта альтернативного сплайсинга на микроэволюционном уровне

Эпидемиологические исследования показывают, что частота возникновения задержки роста плода варьирует среди различных этнических групп. Афроамериканки чаще, чем женщины других рас и популяционных групп (Рисунок 1.6), сталкиваются с задержкой роста плода, которая является существенной причиной неонатальной заболеваемости и смертности [24, 66, 120, 199, 262, 401]. Это может быть связано с доступом к медицинской помощи, социально-экономическими условиями, генетическими и другими факторами, влияющими на здоровье матери и плода. Кроме того, традиционные стандарты оценки роста плода зачастую основаны на обобщенных популяционных данных и не учитывают этнические особенности [265]. Это может приводить к недооценке или, наоборот, завышению риска ЗРП у разных групп населения.

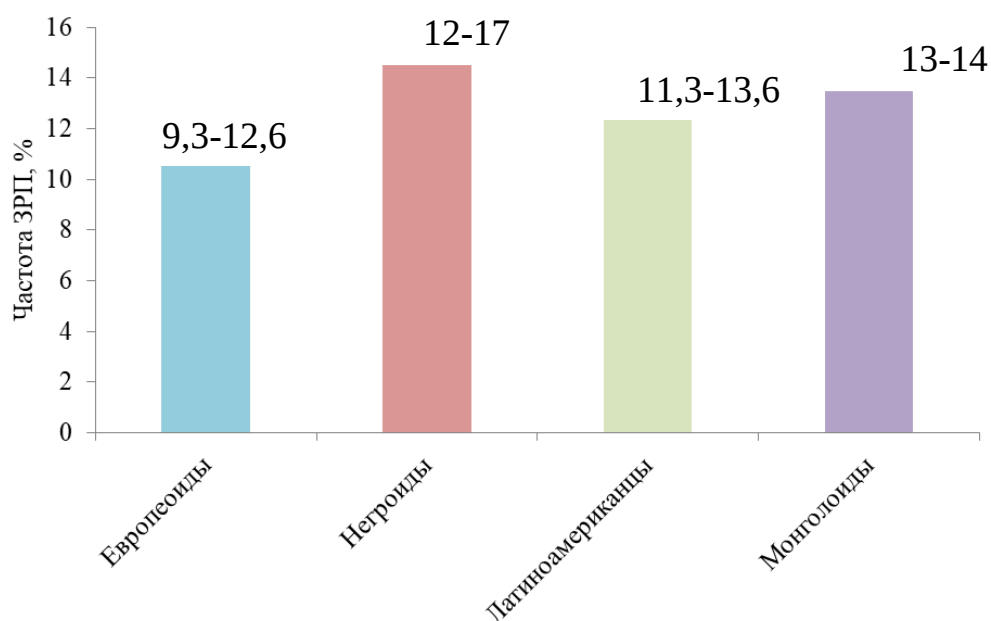


Рисунок 1.6 – Частота задержки роста плода на 1000 родов среди женщин различной расовой принадлежности

Например, у афроамериканских женщин риск развития ЗРП выше по сравнению с белыми женщинами, и примерно 13% этого риска связано с недостаточным уровнем дородовой помощи. Аналогичная ситуация наблюдается среди латиноамериканских женщин, у которых около 12% случаев ЗРП также можно объяснить недостаточным медицинским сопровождением беременности. Для женщин других этнических групп этот показатель составляет всего около 10%. Таким образом, доступность и качество медицинской помощи играют не последнюю роль в снижении частоты ЗРП среди уязвимых групп населения. Это свидетельствует о том, что улучшение доступа к качественному пренатальному уходу может помочь сократить расовые различия в исходах родов. Также доказано, что такие факторы, как здоровье, вес и питание матери до беременности, злоупотребление психоактивными веществами и воздействие сигаретного дыма влияют на рост плода. Афроамериканки с большей вероятностью будут иметь недостаточную прибавку в весе во время беременности и недостаток в продуктах питания и впоследствии более тяжелую форму ЗРП [120, 208, 241, 355]. Несколько исследователей обнаружили связь между загрязнением окружающей среды полициклическими ароматическими углеводородами и пестицидами и малым весом новорожденных [87, 98, 288]. Подверженность воздействию некоторых из этих веществ, по-видимому, зависит от расово-этнического происхождения: в исследованиях, проведенных в Нью-Йорке, было обнаружено, что они способствуют ограничению роста среди афроамериканцев, но не латиноамериканцев. Авторы, обнаружившие эту связь, предполагают, что защитные факторы среди испаноязычных иммигрантов могут быть более эффективны, чем неблагоприятное воздействие окружающей среды, как это было доказано в других случаях «испаноязычного парадокса». Однако большая часть различий в рисках ЗРП между этническими группами остаётся необъяснённой. Это указывает на наличие других факторов, в первую очередь, генетических, которые также могут играть важную роль в формировании этих различий.

Прежде всего, это может быть связано с естественным отбором и адаптацией генофонда к условиям окружающей среды в ходе формирования популяций. Понимание того, как естественный отбор повлиял на генетическую структуру сложных признаков, включая различные многофакторные заболевания у людей, имеет большое значение для медицинской и эволюционной генетики. Установлено, что изменения в экспрессии генов и паттернов альтернативного сплайсинга способствуют адаптации к изменяющимся условиям и могут иногда увеличивать восприимчивость к болезням [112]. Изменения окружающей среды заставляют организмы адаптироваться либо посредством фенотипической пластичности, либо через генетические или эпигенетические изменения.

Альтернативный сплайсинг может способствовать фенотипической пластичности – способности организма продуцировать различные фенотипы в ответ на сигналы окружающей среды без изменений в последовательности ДНК [398]. Эта пластичность может позволить популяциям быстро приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды, способствуя их выживанию и стойкости в динамичных экосистемах. В настоящее время признано, что пластичность, за которой следует генетическая ассимиляция, может привести к расхождению популяций, адаптации и видообразованию [109]. Как вариации в экспрессии генов, так и альтернативный сплайсинг потенциально могут влиять на фенотипическую изменчивость [141, 172]. В отсутствие экспериментальной проверки каждого выявленного события сплайсинга трудно оценить общий функциональный вклад событий сплайсинга. Сохранение интронов может быть важным для адаптации в короткие сроки эволюции [348], тогда как пропуск экзонов более важен на макроэволюционном уровне, так как частота этого события АС увеличилась в ходе эволюции животных [42, 183, 246].

Несмотря на различные примеры альтернативно сплайсированных белков, играющих различные функциональные роли, вполне вероятно, что большая часть изоформ не приводят к получению функциональных белков

[216, 292, 353]. Анализ восьми крупномасштабных экспериментов по протеомике человека – анализ более 100 тканей, клеточных линий и состояний развития с помощью тандемной масс-спектрометрии – показал, что небольшой процент обнаруженных белков получены именно из альтернативно сплайсированных транскриптов [371]. Возможно, что в некоторых случаях основная функциональная роль альтернативного сплайсинга не обязательно должна проявиться на уровне белка. Например, некоторые альтернативные транскрипты с экзонами с ранними стоп-кодонами в рамке никогда не будут продуцировать белок, но вместо этого могут снижать экспрессию, перенаправляя часть пре-мРНК на путь нонсенс-опосредованного распада [220].

На сегодняшний день отсутствуют работы, исследующие влияние естественного отбора на гены, eQTL и sQTL репродуктивной системы женщин, на микроэволюционном уровне. Только в одной работе были обнаружены сигналы действия направленного естественного отбора на гены, которые играют важную роль в сперматогенезе и оплодотворении у мужчин [327]. Так, для популяций Африки, Европы и Азии действие направленного отбора было выявлено для разных генов. В популяциях с африканским происхождением гены *MORC1*, *RNF17* и *WBP2NL* находятся под действием направленного отбора. У европейцев это относится к генам *FAM71D*, а также к *DMRT1* и *PLCZ1*; для последних двух также зафиксированы сигналы естественного отбора в странах Южной Азии, а у жителей Восточной Азии – только на ген *ROPN1L*. Ген *SLC9B1* характеризуется направленным естественным отбором во всех изученных популяциях людей. Такая популяционная специфичность может быть обусловлена адаптивной эволюцией репродуктивных генов, задействованных в сперматогенезе, в разных средовых условиях, характерных для данных популяций.

Для выявления сигналов отбора на гены применяются популяционно-генетические методы анализа нейтральности. Одним из наиболее широко используемых является D-тест Таджимы [359], который сравнивает два типа

оценок генетического разнообразия – среднее число парных различий и количество полиморфных сайтов – и позволяет выявлять отклонения от нейтральной модели эволюции. Отрицательное значение D может свидетельствовать о направленном отборе, тогда как положительное значение – о действии балансирующего отбора или о недавнем сокращении популяции. Дополнительную информацию о действии отбора можно получить с помощью H -теста Фэй-Ву [114], который более чувствителен к частоте производных (недавних) аллелей в выборке и может выявлять сигналы отбора, не обнаруживаемые тестом Таджимы. Высокие отрицательные значения H указывают на избыток производных аллелей с высокой частотой, когда вариант быстро распространяется по популяции. Для выявления недавнего положительного отбора на гаплотипическом уровне используется тест iHS [382], которая оценивает степень удлинения гаплотипов вокруг аллеля – маркер стремительного распространения мутации.

Применение этих подходов при изучении варибельности генов, участвующих в альтернативном сплайсинге, позволяет сформировать представление о том, как генетическая изменчивость влияет на транскриптомное разнообразие и, в свою очередь, на фенотипическую адаптацию. Более того, выявление популяционно-специфичных сигналов отбора может объяснить межэтнические различия в частоте встречаемости заболеваний, включая задержку роста плода. Таким образом, альтернативно сплайсированные гены или гены, непосредственно регулирующие сплайсинг, могут выступать как мишени отбора и играть важную роль в адаптации физиологических процессов, включая репродуктивную функцию.

1.4 Заключение по обзору литературы

Альтернативный сплайсинг является важным механизмом регуляции экспрессии генов и играет роль в клеточной дифференцировке, развитии организма, формировании тканеспецифичных транскриптов, а также в обеспечении фенотипической пластичности на межиндивидуальном и

межпопуляционном уровнях. Альтернативный сплайсинг представляет собой сложный многоступенчатый процесс, в котором задействованы многочисленные взаимодействующие регуляторные компоненты, включая цис-действующие элементы и транс-действующие факторы, сплайсому, а также структурные особенности РНК. В совокупности они обеспечивают точную и динамическую регуляцию экспрессии изоформ, критически важную для нормального функционирования клетки и организма в целом. Любое нарушение этого процесса может привести к формированию нефункциональных или токсичных белковых продуктов, нарушению клеточного гомеостаза и, как следствие, к развитию заболевания.

Несмотря на значительное количество исследований, посвящённых роли альтернативного сплайсинга в онкологии, психиатрии и сердечно-сосудистых заболеваниях, относительно мало внимания уделено его роли в патогенезе нарушений репродуктивной системы человека. Одной из социально-значимых акушерских патологий является задержка роста плода – состояние, ассоциированное с повышенной перинатальной смертностью, отставанием в нейropsychическом развитии и долгосрочными метаболическими последствиями. ЗРП имеет выраженную многофакторную природу, однако на молекулярном уровне всё большее внимание уделяется нарушениям регуляции экспрессии генов, включая транскрипционные и посттранскрипционные механизмы, реализующиеся в плацентарной ткани – ключевом органе фето-материнского взаимодействия.

С позиций патологической физиологии задержка роста плода рассматривается как следствие хронической плацентарной недостаточности, сопровождающейся нарушением маточно-плацентарного кровотока, развитием гипоксии, оксидативного стресса и метаболической дезадаптации. Эти условия приводят к активации стресс-индуцированных сигнальных каскадов, изменению клеточного цикла, апоптоза, аутофагии и процессов репарации ДНК в клетках плаценты. В таких условиях альтернативный сплайсинг может выступать не только как адаптивный механизм, направленный на поддержание

жизнеспособности клеток, но и как фактор патогенеза, способствующий формированию дисфункциональных белковых изоформ и усугублению нарушений клеточного гомеостаза. Таким образом, изменения паттернов АС могут являться молекулярным отражением патологических процессов, лежащих в основе плацентарной недостаточности и ЗРП.

Перспективным объектом для исследований патогенетики акушерских патологий являются децидуальные клетки, как подавляющая клеточная субпопуляция материнского происхождения в составе плаценты. Эти клетки играют ключевую роль в иммунной толерантности, регуляции инвазии цитотрофобласта и ремоделировании спиральных артерий миометрия, участвуют в формировании микросреды, необходимой для нормального развития плода, всё это необходимо для поддержания физиологической беременности. Тем не менее, ландшафт альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках остаётся крайне малоизученным. Анализ специфических паттернов сплайсинга в этой клеточной субпопуляции может пролить свет на ранее неучтённые аспекты транскриптомной регуляции при осложнённой беременности.

Дополнительная значимость данного направления заключается в возможности изучения сигналов действия естественного отбора на альтернативно сплайсированные гены. Поскольку механизмы сплайсинга тесно связаны с адаптацией к условиям внутриутробной среды и обеспечением успешного воспроизводства, можно предположить, что эволюционные процессы оказывали давление на соответствующие регуляторные элементы. Использование популяционно-генетических тестов, таких как D-тест Таджимы, H-тест Фэй-Ву и тест iHS позволяет выявлять отклонения от нейтральной модели эволюции и оценивать, подвергались ли определённые гены или регуляторные участки, участвующие в сплайсинге, действию положительного или балансирующего отбора. Такой подход даёт возможность не только расширить понимание молекулярной архитектуры нарушений альтернативного сплайсинга при задержке роста плода, но и включить их в более широкий

эволюционный контекст, связанный с адаптацией репродуктивных механизмов в различных популяциях человека.

Таким образом, настоящая работа сосредоточена на характеристике событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты при физиологической беременности и задержке роста плода, с анализом роли естественного отбора в формировании структуры альтернативно сплайсированных генов. Такой комплексный подход позволит не только привнести новые фундаментальные знания в раскрытие патофизиологических механизмов ЗРП, но и дополнить существующие идеи о роли процессов сплайсинга мРНК в адаптации человека к условиям внутриутробного развития.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн исследования

Проведение настоящего исследования одобрено комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр» (протокол №13 от 15.11.2021). От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие.

Общий дизайн работы включал в себя несколько экспериментальных блоков: сбор образцов плацентарной ткани, получение изолированных децидуальных клеток, выделение тотальной РНК, синтез библиотек, массовое параллельное секвенирование, валидацию методом ПЦР в реальном времени (Рисунок 2.1).

Сбор биоптатов плаценты проводился акушером-гинекологом на базе Областного перинатального центра имени И.Д. Евтушенко города Томска. Образцы брали в двух различных секциях материнской части плаценты в течение десяти минут после родов. Биоптаты промывали физиологическим раствором, помещали в криопробирки и хранили в жидком азоте. Затем криоконсервированные образцы плацентарной ткани доставляли в НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, где проводили все последующие этапы исследования.

Единичные децидуальные клетки суммарным количеством 1000-2000 однородных ДК на образец получены с помощью технологии лазерной микродиссекции препаратов тонких срезов, окрашенных гематоксилин-эозином. Затем выделена тотальная РНК с помощью набора фирмы Norgen (Канада) в соответствии с протоколом. Для синтеза библиотек одноцепочечных кДНК использовали набор SMARTer Takara Bio (США).

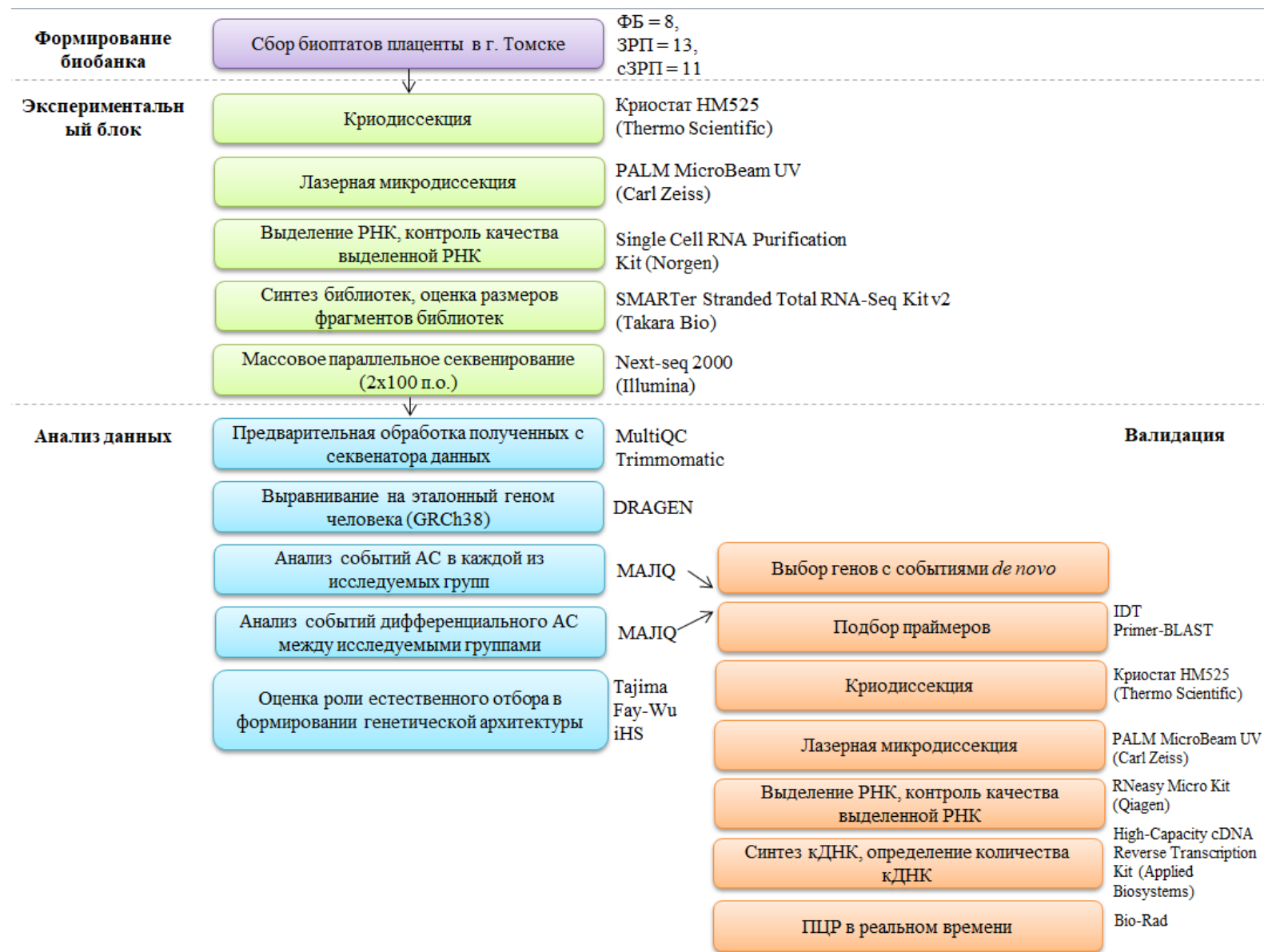


Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

Далее библиотеки объединяли в пул и выполняли двухконцевое секвенирование на платформе Illumina NextSeq 2000 (США). Полученные в ходе полнотранскриптного секвенирования данные прошли биоинформатическую и статистическую обработку, после чего результаты проанализированы и интерпретированы в соответствии с поставленными задачами. Валидация проведена расширенной выборке образцов, кДНК синтезирована с помощью набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), затем концентрация одноцепочечной ДНК измерена с помощью набора QuDye ssDNA Assay Kit (Lumiprobe). Ниже приводится подробное описание каждого из упомянутых выше этапов.

2.2 Характеристика обследованных групп

Формирование выборок и клиническая характеристика (осмотр, сбор анамнеза, жалоб и параклинических данных) женщин с физиологической беременностью (ФБ); изолированной задержкой роста плода (ЗРП) и сочетанной задержкой роста плода (сЗРП) проходила на базе Областного перинатального центра имени И.Д. Евтушенко города Томска.

В рамках исследования группа с задержкой роста плода поделена на две подгруппы в зависимости от наличия у пациенток сопутствующих заболеваний из группы больших акушерских синдромов в текущую беременность: подгруппа с изолированной задержкой роста плода, протекающей без сопутствующих акушерских осложнений; подгруппа с сочетанной задержкой роста плода, при которой ЗРП манифестирует совместно с преэклампсией и/или преждевременными родами. Далее по тексту группы обозначены как ЗРП и сЗРП, соответственно.

Группы сопоставимы по основным клиническим и антропометрическим характеристикам, кроме срока родоразрешения, роста и массы новорожденного (Таблица 2.1). Также не установлено значимых различий при сравнении частот сопутствующих соматических заболеваний (нарушение кроветворения, сердечно-сосудистые и эндокринные заболевания, ожирение, заболевания мочевыделительной системы). Несмотря на то, что родоразрешение в обеих

группах происходили в срок, наблюдаются статистически значимые различия по гестационному возрасту на момент родов. Однако более низкие антропометрические показатели новорождённых с ЗРП не обусловлены этой разницей в сроке: рост и вес отражают именно патологическое ограничение внутриутробного роста плода, а не более раннее наступление родов.

Таблица 2.1 – Общая характеристика групп исследования

Показатель	ФБ (N=8)	ЗРП (N=13)	p*	сЗРП (N=11)	p**	p***
Возраст матери, лет	33,5 (25,5;35,5)	29 (23,5;34,5)	0,547	34 (26;37)	0,600	0,392
Срок родоразрешения, недель	39,1 (38,2;39,6)	37,6 (37,1;39,1)	0,037	34,2 (31,5;36)	< 0,001	< 0,001
Количество предыдущих беременностей	3 (1;4)	2 (1;4)	0,500	2 (2;3)	0,657	0,608
Количество родов	2 (1;3)	1 (1;2)	0,140	2 (1;2)	0,238	0,776
ИМТ до беременности, кг/м ²	22,6 (18,3;27,9)	22,7 (21,6;26,0)	0,734	23,8 (20,8;30,9)	0,492	0,608
САД во время беременности, мм. рт. ст.	129 (120;140)	120 (119;130)	0,393	135 (123;145)	0,536	0,060
ДАД во время беременности, мм. рт. ст.	90 (71;98)	80 (77;88)	0,351	85 (80;95)	0,918	0,164
Протеинурия, г/сутки	0 (0;0,01)	0 (0;0,01)	1,000	0,3 (0,1;5,6)	0,010	0,010
Пол ребенка (мужской : женский)	4 : 4	6 : 7	0,916	4 : 7	0,657	0,691
Рост ребенка, см	54 (52;55)	47 (47;49)	< 0,001	39 (36;43)	< 0,001	< 0,001
Вес ребенка, г	3565 (3502;3775)	2290 (2065;2500)	< 0,001	1500 (1100;1740)	< 0,001	< 0,001

Окончание таблицы 2.1

Показатель	ФБ (N=8)	ЗРП (N=13)	p*	сЗРП (N=11)	p**	p***
Анемия, [абс.(%)]	4(50)	5(38)	0,697	2(18)	0,272	0,424
ССЗ, [абс.(%)]	2(25)	3(23)	0,972	5(45)	0,492	0,361
Эндокринные заболевания, [абс.(%)]	3(38)	3(23)	0,595	3(27)	0,717	0,865
Заболевания МПС, [абс.(%)]	0	5(38)	0,161	6(54)	0,051	0,531
Ожирение, [абс.(%)]	2(25)	2(15)	0,750	4(36)	0,840	0,459

Примечание: В таблице для каждого показателя приведен уровень значимости (p*, p**, p***), достигнутый при сравнениях индивидов с ФБ и ЗРП, ФБ и сЗРП, ЗРП и сЗРП, соответственно.

При сборе биологического материала для данного исследования соблюдались строгие критерии включения и исключения. В контрольную группу включали женщин русской национальности с физиологической одноплодной беременностью, оперативным родоразрешением (caesarea sectio) и неотягощенным акушерским анамнезом, подписавших информированное согласие на участие в исследовании в возрасте 18-45 лет. Показания к оперативному родоразрешению оценивались акушерами-гинекологами Областного перинатального центра и относились преимущественно к состоянию плода. В частности, были связаны с его тазовым предлежанием, устойчивым поперечным положением, также у одной женщины в анамнезе была пластика прямой кишки. Контрольная группа формировалась именно из пациенток с кесаревым сечением, чтобы исключить дополнительный источник вариативности транскриптома, связанный с процессом родов, и тем самым сделать её максимально сопоставимой с группами патологий.

Критериями исключения из контрольной группы являлись: возраст младше 18 и старше 45 лет, наличие неблагоприятного акушерского анамнеза в текущую и предыдущие беременности (преэклампсия, эклампсия, задержка роста плода, преждевременные роды, самопроизвольный аборт и

преждевременная отслойка плаценты), наличие у женщины и плода хромосомных аномалий, наличие тяжелых хронических заболеваний гинекологического и эндокринного профилей (синдром поликистозных яичников, сахарный диабет, эндометриоз), аутоиммунные заболевания, ДВС-синдром, вредные привычки (табакокурение, алкогольная и наркотические зависимости), наличие профессиональных вредностей, прием фетоповреждающих лекарственных средств во время беременности, перенесенные во время беременности инфекционные заболевания.

В группу с изолированной задержкой роста плода включали женщин русской национальности с одноплодной беременностью, наличием критериев ЗРП, оперативным родоразрешением (*caesarea sectio*), подписавших информированное согласие на участие в исследовании в возрасте 18-45 лет. Диагноз ОЗБ.5 (недостаточный рост плода, требующий предоставления медицинской помощи матери) выставлен акушером-гинекологом по МКБ-10 согласно следующему критерию, указанному в клинических рекомендациях РОАГ 2022 года [7]: замедление прироста показателей предполагаемой массы плода (ПМП) и/или окружности живота (ОЖ) либо значения ПМП и/или ОЖ <10-го перцентиля в сочетании с патологическими показателями кровотока по данным ультразвуковой доплерографии; или значения ПМП и/или ОЖ <3-го перцентиля.

В группу с сочетанной задержкой роста плода включали женщин русской национальности с одноплодной беременностью, наличием критериев ЗРП, а также манифестацией преэклампсии и/или преждевременных родов, оперативным родоразрешением (*caesarea sectio*), подписавших информированное согласие на участие в исследовании в возрасте 18-45 лет.

Критериями исключения из групп с задержкой роста плода являлись: возраст младше 18 и старше 45 лет, наличие неблагоприятного акушерского анамнеза в предыдущие беременности, наличие у женщины и плода хромосомных аномалий, наличие тяжелых хронических заболеваний гинекологического и эндокринного профилей (СПКЯ, сахарный диабет,

эндометриоз), аутоиммунные и инфекционные заболевания, ДВС-синдром, вредные привычки, наличие профессиональных вредностей, прием фетоповреждающих лекарственных средств во время беременности.

Критериями исключения для всех групп служил отказ от подписания информированного добровольного согласия на участие в исследовании.

Поскольку, согласно клиническим рекомендациям [7], группа ЗРП была поделена на две подгруппы: выраженная ЗРП (вЗРП, N=8) и умеренная ЗРП, для которой ПМП <10-го перцентиля (уЗРП, N=5) – для оценки дифференциального сплайсинга между разными степенями тяжести исследуемого заболевания. Группы сопоставимы по основным клиническим и антропометрическим характеристикам (Таблица 2.2). Также не установлено значимых различий при сравнении частот сопутствующих соматических заболеваний (нарушение кроветворения, сердечно-сосудистые и эндокринные заболевания, ожирение, заболевания мочевыделительной системы).

Таблица 2.2 – Общая характеристика групп с выраженной и умеренной задержкой роста плода

Показатель	вЗРП (N=8)	уЗРП (N=5)	p
Возраст матери, лет	30 (22,8;36,3)	24 (23,5;33,5)	0,622
Срок родоразрешения, недель	38,3 (37,1;39,3)	37,2 (37,1;38,1)	0,284
Количество предыдущих беременностей	2 (1;4)	3 (2;5)	0,354
Количество родов	1 (0;2)	2 (1;3)	0,222
ИМТ до беременности, кг/м ²	22,7 (21,6;25,8)	23,1 (19,8;33,0)	0,808
САД во время беременности, мм. рт. ст.	125 (117;130)	120 (120;130)	0,524
ДАД во время беременности, мм. рт. ст.	85 (70;90)	80 (80;85)	0,943
Протеинурия, г/сутки	0 (0;0,01)	0 (0;0,01)	1,000
Пол ребенка (мальчик : девочка)	4 : 4	2 : 3	0,833
Рост ребенка, см	47 (47;48,5)	49 (47;51)	0,171
Вес ребенка, г	2221 (1997;2372)	2540 (2285;2710)	0,030

Окончание таблицы 2.2

Показатель	вЗРП (N=8)	уЗРП (N=5)	p
Анемия, [абс.(%)]	2(25)	3(60)	0,354
ССЗ, [абс.(%)]	1(12,5)	2(40)	0,435
Эндокринные заболевания,[абс.(%)]	2(25)	1(20)	0,943
Заболевания МПС,[абс.(%)]	2(25)	2(40)	0,943
Ожирение, [абс.(%)]	1(12,5)	1(20)	0,833

Примечание: В таблице для каждого показателя приведен уровень значимости p, достигнутый при сравнениях индивидов с умеренной и выраженной ЗРП.

В свою очередь, группа с сочетанной задержкой роста плода включает в себя 11 человек, из них: N=7 – ПР в сочетании с выраженной ЗРП, N=1 – ПР в сочетании с тяжелой ПЭ и умеренной ЗРП, N=1 – ПР в сочетании с умеренной ПЭ и выраженной ЗРП, N=1 – ПР в сочетании с ПЭ и выраженной ЗРП, N=1 – умеренная ПЭ в сочетании с умеренной ЗРП.

Биобанк биоптатов плацентарной ткани: сбор, хранение.

Образцы, использованные в исследовании, получены при биопсии плаценты в двух макроскопически нормальных областях без кровоизлияний, в течение десяти минут после её отделения согласно протоколу, описанному S. Robson и соавторами [311]. Биоптаты ткани вырезали щипцами из материнской части плаценты вблизи пуповины размером 5×5 мм и глубиной около 3 мм. Полученный биологический материал немедленно промывали физиологическим раствором и помещали в криопробирки для хранения в жидком азоте вплоть до начала следующего этапа эксперимента для минимизации деградации РНК и изменения экспрессии определенных генов и их транскриптов вследствие некроза ткани.

2.3 Технология получения децидуальных клеток плаценты

Данная часть эксперимента выполнена по методике получения тотальной РНК из децидуальных клеток замороженной плацентарной ткани, полученных с помощью технологии лазерной микродиссекции, для последующего

секвенирования полного транскриптома, включая кластер некодирующих РНК. Данная методика разработана в лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ [2].

Криодиссекция

Из биоптатов плаценты, хранящихся в жидком азоте, делали срезы толщиной 7 мкм и помещали их на предварительно охлажденные стекла «Carl Zeiss» (Германия) с мембраной из полиэтиленнафталата (PEN), свободные от РНКаз/ДНКаз. Готовые стекла со срезами замораживали и оставляли в криостате Thermo Microm HM525 («Thermo Fisher Scientific») вплоть до этапа окрашивания.

На этапе криодиссекции соблюдены все необходимые условия проведения эксперимента:

1. Перед процедурой получения срезов столик криостата, лезвие ножа, патроны для тканей и пинцеты тщательно промывали спиртосодержащими детергентами;
2. Патроны и пинцеты также подвергались обработке раствором RNaseZap («Thermo Fisher Scientific») и ультрафиолетовому облучению для деконтаминации рабочих поверхностей;
3. Пинцеты, предметные стекла, а также растворы для фиксации и окрашивания предварительно охлаждали до температуры от -30°C до -45°C для предотвращения оттаивания срезов и деградации РНК в процессе работы с плацентарной тканью.

Окрашивание

Для визуализации ткани использовали стандартную методику окраски гематоксилин-эозином с изменениями. Сначала замороженные стекла со срезами извлекали из криостата и помещали на охлажденный до -30°C хладоэлемент, где немедленно фиксировали в 70%-ном этаноле в течение 2,5 минут. Затем стекло трехкратно промывали в 1 мл деионизированной и свободной от РНКаз, ДНКаз и пирогенов воде. Далее сразу наносили водный

раствор гематоксилина на 90 секунд, после чего повторяли процедуру промывки. После удаления гематоксилина на срезы наносили водный раствор эозина на 10 секунд, затем стекло быстро промывали этанолом в возрастающей концентрации: 70%→100%. Окрашенные стекла быстро и тщательно просушивали, чтобы предотвратить конденсацию в процессе их транспортировки и хранения. РНК в зафиксированных таким образом клетках оставалась стабильной в течение 24 часов.

Лазерная микродиссекция

Процедуру лазерной микродиссекции проводили с использованием прибора PALM MicroBeam UV («Carl Zeiss»), который оснащен инвертированным микроскопом Axio Observer Z1 и камерой AxioCam MRm. В рамках эксперимента проводили диссекцию 1500 морфологически однородных децидуальных клеток на один образец (Рисунок 2.2) в специальных пробирках с адгезивной крышкой («Carl Zeiss»), предварительно обработанных ультрафиолетом в течение 15 минут.

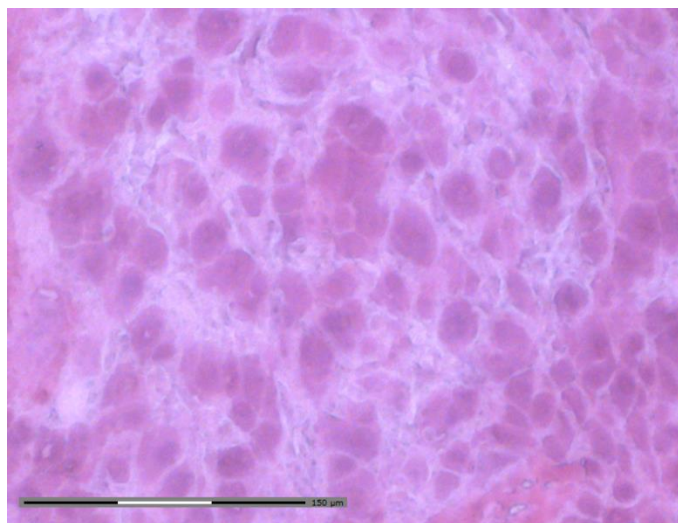


Рисунок 2.2 – Децидуальная ткань плаценты человека, скопление децидуальных клеток (срез). Окраска гематоксилин-эозином; микрофотография, увеличение в 20 раз

После диссекции полученный материал лизировали в 100 мкл свежеприготовленного RL-буфера («Norgen Biotek»), содержащего 1 мкл β-меркаптоэтанола. Лизат децидуальных клеток тщательно перемешивали, чтобы

приступить к следующему этапу – выделению РНК. Важно отметить, что при диссекции интересующих областей придерживались рекомендации [92], согласно которой время, затраченное на одно стекло, ограничивалось двумя часами для сохранения максимального качества РНК.

2.4 Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение РНК, контроль качества выделенной РНК

Для выделения тотальной РНК применяли набор Single Cell RNA Purification kit («Norgen Biotek»). Методика выделения РНК с использованием этого набора включает следующие шаги:

1. Клетки инкубировали при +42°C в течение 15 минут буфером RL-меркаптоэтанол, затем осаждали 70%-ным этанолом.
2. Полученный клеточный лизат помещали на колонки, где нуклеиновые кислоты сорбируются на мембране после нескольких циклов центрифугирования и отмывки Wash-буфером.
3. Для удаления геномной ДНК пропускали раствор ДНКазы I через колонку, затем повторно наносили на фильтр колонки и инкубировали при комнатной температуре 15 минут.
4. После этого колонку дважды промывали Wash-буфером и элюировали очищенную РНК.

Все шаги проводились в соответствии с протоколом и рекомендациями производителя с небольшими модификациями: перед процедурой элюирования РНК с колонки добавляли ингибитор РНКазы RiboLock («Thermo Fisher Scientific») в концентрации 20 U в 14 мкл элюирующего буфера.

Для оценки качества (RIN) и количества выделенной РНК использовали набор RNA 6000 Pico Kit («Agilent») с помощью автоматизированной системы гель-электрофореза на приборе Bioanalyzer 2100 (Рисунок 2.3).

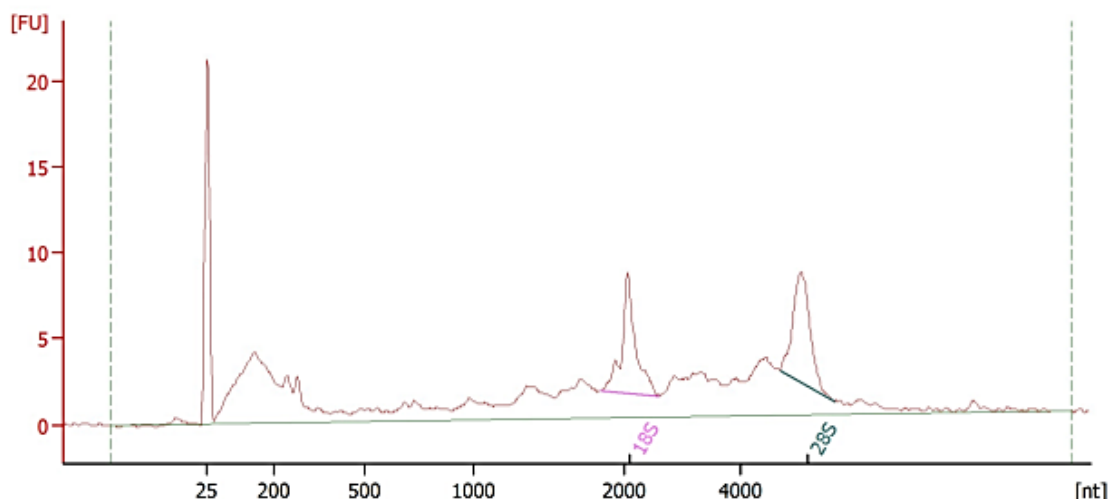


Рисунок 2.3 – Электрофореграмма тотальной РНК, выделенной из децидуальных клеток плаценты. Концентрация РНК в образце – 11 пкг/мкл, RIN – 7.1. Указаны позиции 18S и 28S рибосомных РНК

Подготовка библиотек, оценка размера фрагментов библиотек

Для синтеза библиотек с целью дальнейшего полнотранскриптомного анализа использовали набор SMARTer Stranded Total RNA-Seq kit v2 («Takara BIO»), специально адаптированный для работы с низкими входными концентрациями. SMARTer Stranded Total RNA-Seq kit v2 использует протокол stranded RNA-Seq, что означает, что он сохраняет информацию об исходных цепях РНК (смысловой и антисмысловой). Это достигается с помощью специальных этапов лигирования адаптеров, которые поддерживают ориентацию фрагментов РНК во время подготовки библиотеки.

Сразу после выделения тотальной РНК, в течение 1 часа, производилась её фрагментация при 82°C в течение 3,5 минут, после чего проводилась реакция обратной транскрипции. Условия фрагментации были определены экспериментально на основе оценки RIN. Подготовка библиотеки включает в себя лигирование индексов и адаптеров, очистку с помощью магнитных частиц, удаление рибосомальной РНК, конечную ПЦР-амплификацию и повторную очистку библиотек. Подготовленные библиотеки затем секвенируются с использованием высокопроизводительных платформ секвенирования.

Для оценки размера фрагментов библиотеки системой автоматического гель-электрофореза использовали набор High Sensitivity DNA kit («Agilent») для прибора Bioanalyzer 2100 (Рисунок 2.4).

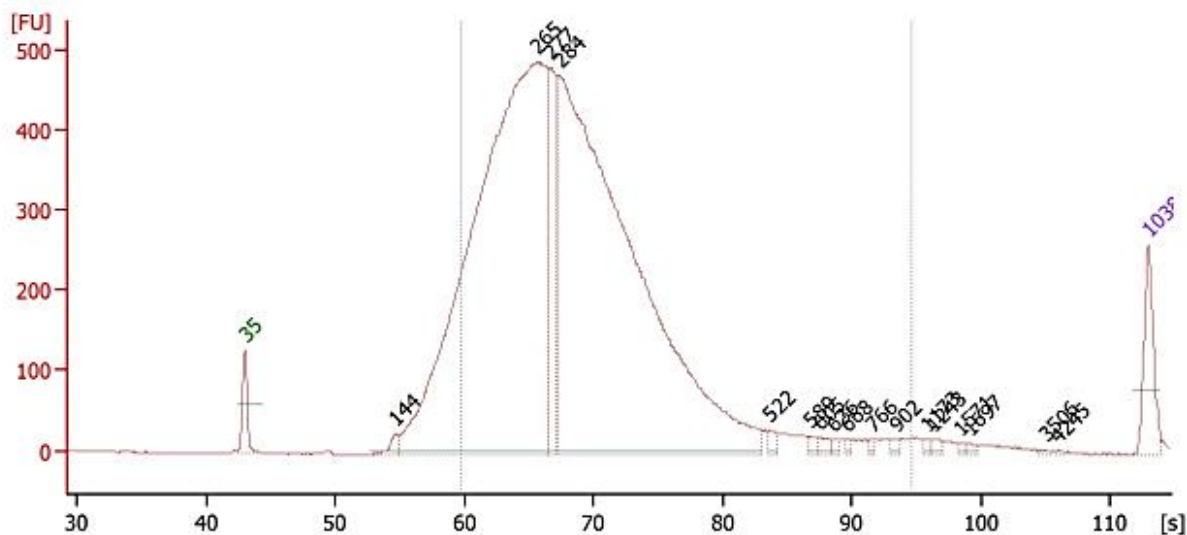


Рисунок 2.4 – Оценка размера библиотеки системой капиллярного гель-электрофореза на приборе Bioanalyzer 2100 с реагентами High Sensitivity DNA kit. Приведенные значения интенсивности флуоресценции нормализованы по стандарту для High Sensitivity DNA kit

РНК-секвенирование

Метод РНК-секвенирования (RNA-seq) представляет собой мощный высокопроизводительный метод секвенирования нового поколения (NGS), используемый для изучения РНК в отдельной клетке или популяции клеток [349]. RNA-seq дает исследователям представление об уровне экспрессии генов, событиях альтернативного сплайсинга, новых транскриптах, мутациях.

Библиотека RNA-seq – это, по определению, пул фрагментов кДНК с прикрепленными адаптерами. Каждую полученную библиотеку секвенируют с высокой пропускной способностью для получения коротких последовательностей. Секвенирование может быть как одноконцевое, так и двухконцевое. В первом случае считывание происходит с одного направления, в то время как во втором варианте считывания генерируются с обоих направлений библиотеки. В данном эксперименте каждая библиотека получена

из индивидуального биоптата плацентарной ткани и представляла собой транскриптом пула 1500 морфологически однородных децидуальных клеток. Затем готовые библиотеки были объединены в пул и проведено секвенирование в режиме двухконцевого прочтения (2x100 п.о.) на платформе Illumina NextSeq 2000. Расчетное число прочтений на образец составило не менее 60 млн.

2.5 Биоинформатическая и статистическая обработка полученных данных

Анализ данных РНК-секвенирования представлял собой последовательный процесс использования следующих биоинформатических инструментов: FastQC [52], Trimmomatic [55], DRAGEN [45], MAJIQ [378, 379].

FastQC необходим для анализа контроля качества необработанных данных секвенирования. Он обеспечивает всестороннюю оценку качества считываемых данных секвенирования путем генерации различных показателей и графической визуализации для оценки необходимости качественной обрезки и фильтрации, прежде чем переходить к последующим этапам анализа. Trimmomatic – это популярный инструмент для обрезки и фильтрации необработанных считываний последовательности. Он удаляет последовательности адаптеров и считывания ниже определенного порога качества. DRAGEN необходим выравнивания полученных при секвенировании данных на эталонный геном человека (GRCh38). Он точно выравнивает считывания по соединениям сплайсинга, что имеет решающее значение для точной количественной оценки экспрессии генов и идентификации альтернативных событий сплайсинга.

DRAGEN генерирует выходные файлы в формате BAM, которые могут быть использованы инструментом MAJIQ для комплексного анализа событий альтернативного сплайсинга в данных РНК-секвенирования. Существенными преимуществами являются визуализация с помощью программного пакета VOILA, наличие дополнительной программы MAJIQ-SPEL для подбора праймеров к событиям AC, написание кода в терминале Linux.

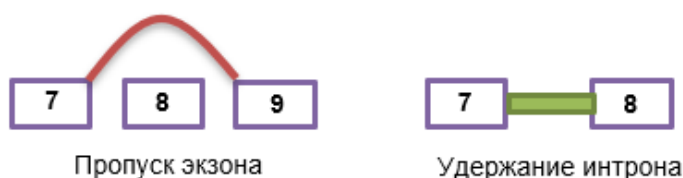
MAJIQ состоит из двух основных компонентов: конструктора (builder) и квантификатора (quantifier). MAJIQ builder анализирует экспериментальные данные в сравнении с аннотацией, чтобы обнаружить события (как известные, так и новые) и создать граф сплайсинга для каждого гена в базе данных. MAJIQ builder принимает в качестве входных данных выравненные считывания RNA-seq (формат BAM) и файл справочных аннотаций (формат GTF/GFF/GFF3), содержащий аннотации к генам и транскриптам – в данном случае использован файл аннотации GENCODE Release 43 (GRCh38.p13). Количественная оценка (MAJIQ quantifier) событий AC в конкретных условиях основана на предельном процентном индексе сплайсинга (PSI , Ψ) для каждого соединения, участвующего в событии, в то время как сравнение экспериментальных условий основано на относительных изменениях PSI ($dPSI$, $\delta\Psi$).

Данный инструмент не использует классическую статистику в виде точных p -значений или FDR, а основан на вероятностной модели распределения $\Delta\Psi$, позволяющей определить достоверность события при заданных порогах. На первом этапе построения графов сплайсинга (MAJIQ builder) скорректированы базовые настройки для более строгого анализа. Наиболее важными параметрами были определение минимального количества образцов с идентифицированными событиями в каждой исследуемой группе (min-experiments), а также количество прочтений на событие для надежного подтверждения, что это неслучайная находка (min-reads). Таким образом, заданы параметры --min-experiments для каждой исследуемой группы: 4, 7, 6, соответственно, для ФБ, ЗРП и сЗРП; и --min-reads 3. В нашем исследовании использованы стандартные настройки программы, включающие порог $|\Delta\Psi| \geq 0,20$ и вероятность достоверного различия не менее 0,95. Такой подход позволяет корректно оценивать достоверность событий без необходимости дополнительной коррекции по FDR.

Данная программа идентифицирует и количественно оценивает комплексные (сложные LSV – Local Splicing Variations) и бинарные («классические» типы событий или простые LSV) события альтернативного

сплайсинга (пропуск экзона, альтернативные 5'- и 3'-сайты сплайсинга, альтернативные первый и последний экзоны, удержание интрона, взаимоисключающие экзоны); аннотированные и новые события. Сложные LSVs определяются и визуализируются как расщепления (множественные ребра) в графе сплайсинга, где несколько ребер либо входят в один экзон, либо исходят из него, то есть включают два и более классических события AC, которые, в свою очередь, отображаются как особые случаи расщепления двоичного графа (Рисунок 2.5).

«Классическое» бинарное событие AC / Простое LSV событие



Комплексное событие AC / Сложное LSV событие

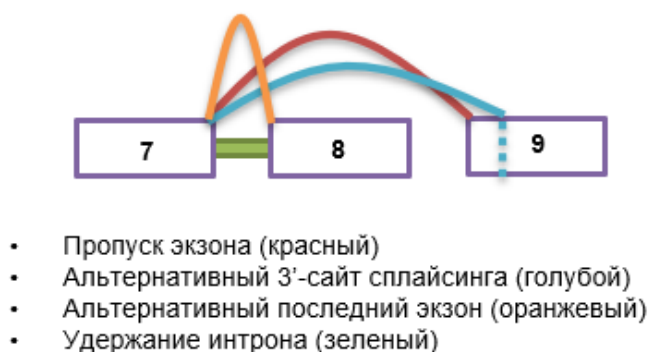
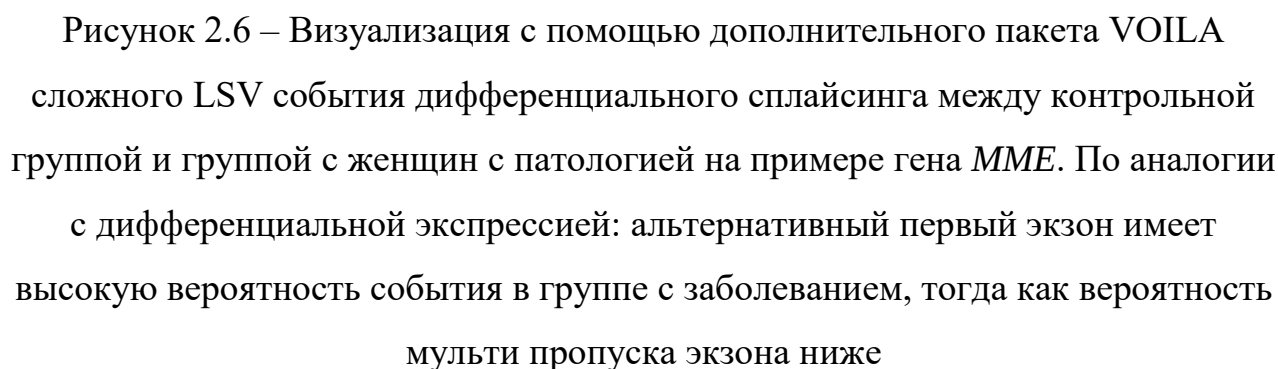


Рисунок 2.5 – Схематичное представление простых и сложных событий альтернативного сплайсинга, идентифицируемых в программе MAJIQ

Граф сплайсинга представляет все возможные места сплайсинга и альтернативные пути сплайсинга внутри гена или транскрипта. Моделируя график сплайсинга, MAJIQ может отразить сложность альтернативных событий сплайсинга и вывести количество изоформ из данных RNA-seq.

Количественная оценка событий AC в конкретных условиях основана на предельном процентном индексе сплайсинга (PSI, Ψ) для каждого соединения,



В связи с особенностью расчета дифференциального сплайсинга программой MAJIQ, при описании результатов, под термином «альтернативно сплайсированные гены» мы подразумеваем гены, для которых выявлены статистически значимые различия в структуре событий сплайсинга между женщинами с физиологической беременностью и пациентками с осложненной беременностью (дифференциально сплайсированные гены), а также гены, для которых события сплайсинга зафиксированы только в одной из рассматриваемых групп (специфичные альтернативно сплайсированные гены).

Сравнительный статистический анализ клинических показателей проведен с помощью программы IBM Statistics 26.0 (SPSS, Inc., Чикаго, Иллинойс, США). Для сравнения параметров между исследуемыми группами использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия показателей считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Функциональная аннотация категорий и биологических путей, в которые вовлечены найденные гены, проводилась с использованием инструмента «WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit», доступного онлайн (URL: <http://www.webgestalt.org/>) [223]. Категории описываемых генов соответствовали классификаторам баз данных «GeneOntology», «Reactome», «KEGG», «DisGeNET» [37, 177, 251, 294]. Построение сетей белок-белковых взаимодействий продуктов идентифицированных альтернативно сплайсированные генов осуществляли с помощью онлайн-ресурса STRING (URL: <https://string-db.org/>).

Для выявления возможных сигналов естественного отбора в исследуемых популяциях были использованы популяционно-генетические тесты: D-тест Таджимы [359], H-тест Фэй-Бу [114] и iHS (integrated Haplotype Score – интегрированная оценка гаплотипа) [382]. Эти методы позволяют оценить отклонения от нейтральной модели эволюции, отражающие влияние направленного, негативного или балансирующего отбора. Вычисления выполнялись с использованием онлайн-ресурса PopHuman (URL: <https://pophuman.uab.cat/>) [72].

D-тест Таджимы используется для выявления отклонений от нейтральных ожиданий в структуре генетической изменчивости в популяции. Тест Таджимы основан на сравнении двух оценок генетического разнообразия: числе сегрегирующих сайтов (S) и на среднем количестве попарных различий в нуклеотидах (π). В условиях нейтральной эволюции и постоянной численности популяции, оба показателя приблизительно равны и отражают одно и то же значение θ (уровень генетической изменчивости). Отклонения D от нуля свидетельствуют о воздействии селективных или демографических процессов.

Положительные значения коэффициента D (разнообразие последовательностей превышает ожидаемое при данном числе сегрегирующих сайтов) может свидетельствовать о действии балансирующего отбора или узком горлышке, а отрицательные значения (сниженное разнообразие) указывают на избыток редких аллелей, что может быть следствием направленного отбора или недавнего расширения популяции.

H -тест Фэй-Ву чувствителен к избытку высокочастотных производных аллелей, что характерно для селективного замещения (selective sweep). Этот тест сравнивает оценку θ на основе высокочастотных производных аллелей (θ_H) с оценкой на основе всех парных различий (π). Для корректного расчета теста H требуется наличие информации о предковом аллеле, который определялся путём сравнения с аутгруппой или с использованием данных референсного генома. Значения $H < 0$ указывают на избыток производных аллелей с высокой частотой, типичный для направленного отбора, значения выше 0 предполагают наличие балансирующего отбора.

Для оценки признаков недавнего и/или продолжающегося направленного/положительного отбора использовался тест iHS , основанный на сравнении уровней гаплотипной однородности между носителями производного и предкового аллеля вблизи исследуемого SNP. Метод опирается на измерение ЕНН (Extended Haplotype Homozygosity – расширенная гомозиготность по гаплотипу) – вероятности того, что две гаплотипные последовательности, несущие один и тот же аллель в фокусной позиции, будут идентичны на определённой длине. Тест iHS представляет собой нормализованное логарифмическое отношение интегралов ЕНН для производного и предкового аллеля. Высокие по модулю значения iHS указывают на наличие длинных, неразрушенных рекомбинацией гаплотипов, свидетельствующих о недавнем селективном замещении.

2.6 Валидация идентифицированных вариантов альтернативного сплайсинга

Для верификации идентифицированных вариантов альтернативного сплайсинга использовали комбинацию молекулярно-биологических и биоинформатических подходов (Рисунок 2.7). Для дальнейшего проведения эксперимента выборка была расширена с 8 до 12 образцов в контрольной группе и с 13 до 17 образцов в группе с изолированной задержкой роста плода, но в связи с малым количеством клеток и деградацией РНК некоторых образцов, только 9 образцов из группы с физиологической беременностью и 13 образцов из группы с задержкой роста плода выбраны для следующего этапа.

Группы сопоставимы по основным клиническим и антропометрическим характеристикам, кроме срока родоразрешения, роста и массы новорожденного (Таблица 2.3). Более низкие антропометрические показатели новорождённых с ЗРП не обусловлены разницей в сроке гестации: рост и вес отражают именно патологическое ограничение внутриутробного роста плода, а не более раннее наступление родов. Также не установлено значимых различий при сравнении частот сопутствующих соматических заболеваний (нарушение кроветворения, сердечно-сосудистые и эндокринные заболевания, ожирение, заболевания мочевыделительной системы).

Таблица 2.3 – Общая характеристика групп с выраженной и умеренной задержкой роста плода

Показатель	ФБ (N=9)	ЗРП (N=13)	p
Возраст матери, лет	29,5 (21,3;35,5)	29 (22,5;34,5)	0,262
Срок родоразрешения, недель	38,6 (38,0;39,5)	37,6 (37,1;39,3)	0,014
Количество предыдущих беременностей	3 (1;4)	2 (1;5)	0,235
Количество родов	2 (1;3)	2 (1;2)	0,292
ИМТ до беременности, кг/м ²	23,1 (19,7;36,5)	22,8 (20,5;25,4)	0,717
САД во время беременности, мм. рт. ст.	115 (110;124)	120 (110;120)	0,945

Окончание таблицы 2.3

Показатель	ФБ (N=9)	ЗРП (N=13)	p
ДАД во время беременности, мм. рт. ст.	78 (71;80)	70 (70;80)	0,454
Протеинурия, г/сутки	0 (0;0,01)	0 (0;0,01)	1,000
Пол ребенка (мальчик : девочка)	5 : 4	5 : 8	0,284
Рост ребенка, см	54 (52;55)	47 (47;49)	<0,001
Вес ребенка, г	3510 (3193;3588)	2290 (2090;2495)	<0,001
Анемия, [абс.(%)]	4(44)	5(38)	0,779
ССЗ, [абс.(%)]	1(11)	3(23)	0,474
Эндокринные заболевания,[абс.(%)]	2(22)	3(23)	0,962
Заболевания МПС,[абс.(%)]	1(11)	3(23)	0,474
Ожирение, [абс.(%)]	2(22)	2(15)	0,683

Примечание: В таблице для каждого показателя приведен уровень значимости p, достигнутый при сравнениях индивидов с ФБ и ЗРП.

На основании результатов анализа транскриптома методом высокопроизводительного секвенирования РНК были отобраны события сплайсинга, представляющие интерес. Дизайн олигонуклеотидных праймеров и проб для RT-qPCR осуществляли с использованием программ NCBI Primer-BLAST (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Integrated DNA Technologies (IDT) (URL: <https://eu.idtdna.com/>). Последовательности доступны по запросу у автора (maria.gavrilenko@medgenetics.ru).

На первом практическом этапе валидации осуществляли криодиссекцию замороженных в жидком азоте образцов тканей, окрашивание полученных срезов, с последующей лазерной микродиссекцией крупных областей децидуальных клеток. Следующим шагом проводили выделение тотальной РНК из микродиссектированных фрагментов с применением набора RNeasy Micro Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя с включением стадии обработки ДНКазой для удаления возможных следов геномной ДНК. Затем синтез кДНК выполняли с использованием набора High-Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Последовательность этапов представлена на рисунке 2.7.

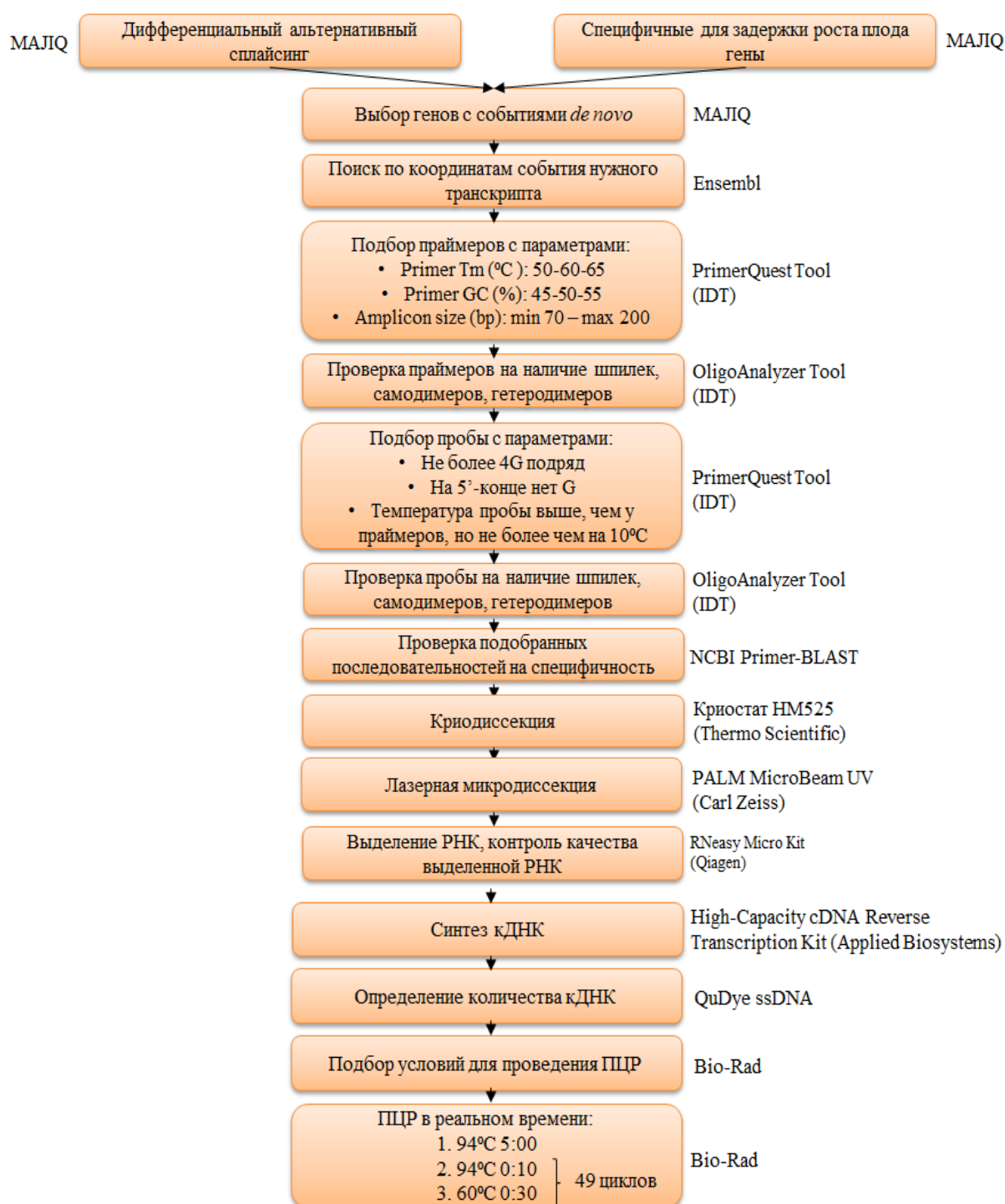


Рисунок 2.7 – Этапы валидации

Для оптимизации условий амплификации и проверки специфичности работы праймеров проводили градиентную ПЦР, посредством которой был установлен оптимальный температурный режим 60,2-61,5°C (Рисунок 2.8).

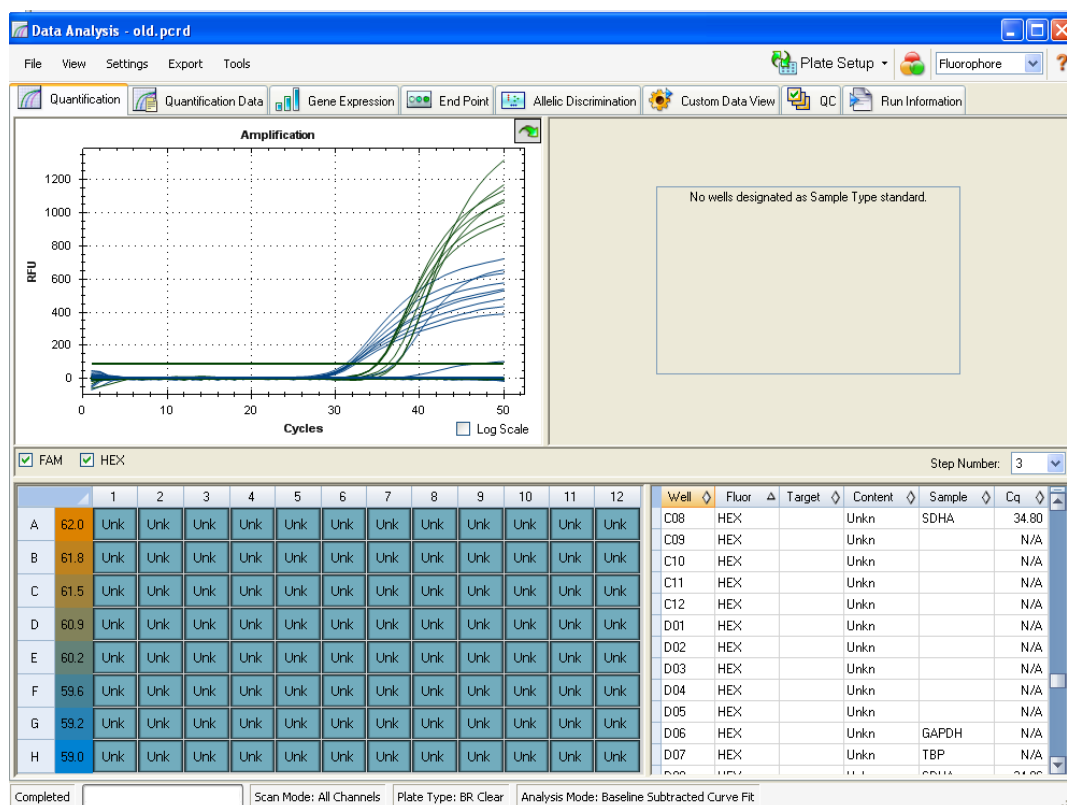


Рисунок 2.8 – Градиентная ПЦР

Качественную оценку наличия или отсутствия событий альтернативного сплайсинга выбранных генов осуществляли методом проведения ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR, RT-PCR) с использованием флуоресцентных TaqMan-зондов, меченных метками FAM и HEX. TaqMan-зонды содержат флуоресцентную метку в 5'-положении, гаситель флуоресценции и фосфатную группу в 3'-положении. На стадии отжига праймеров TaqMan-зонд связывается с комплиментарной цепью ДНК. В стадии элонгации происходит синтез комплиментарной цепи ДНК, при достижении полимеразой зонда происходит его расщепление благодаря 5'-экзонуклеазной активности полимеразы, при этом флуоресцентная метка отделяется от гасителя что приводит к ее флуоресценции, в то время как фосфатная группа в 3'-положении блокирует дальнейшую активность полимеразы (Рисунок 2.9).

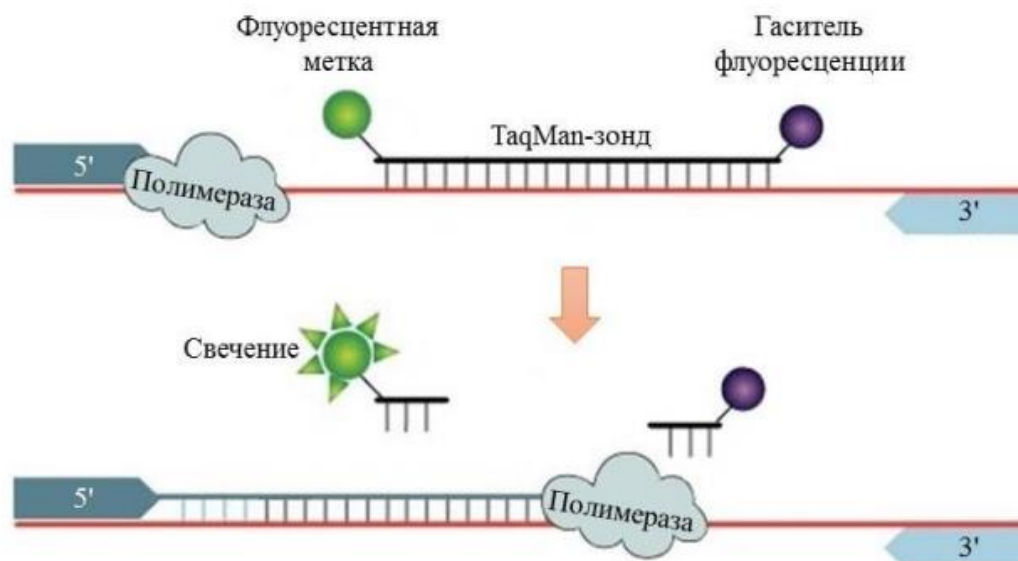


Рисунок 2.9 – Выявление продуктов амплификации в режиме реального времени методом выщепления 5'-концевой метки

Реакцию ПЦР в реальном времени (Рисунок 2.10) проводили в объеме 25 мкл в 96-луночных планшетах с использованием амплификатора «Bio-Rad CFX» (США). Смесь содержала следующие компоненты: кДНК (1 мкл с концентрацией 40 нг/мкл); 12,5 мкл реакционной смеси БиоМастер HS-qPCR («Биолабмикс», Новосибирск); смесь праймеров (по 1 мкл прямого, обратного праймера и флуоресцентного зонда для каждого варианта альтернативного сплайсинга); 8,5 мкл деионизованной воды. Температура отжига для используемых праймеров составляла 60°C.

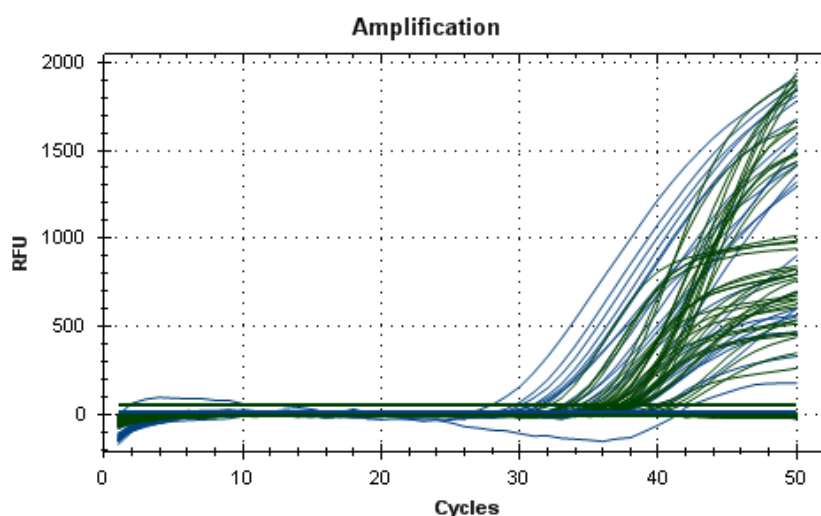


Рисунок 2.10 – График кривых накопления флуоресцентного сигнала

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты при физиологической беременности и задержке роста плода

В рамках данной работы было получено 32 транскриптома уникальных образцов децидуальных клеток плаценты. После выравнивания на геном человека среднее покрытие на образец составило 62 млн. прочтений. Всего в анализ было включено 57209 транскриптов с CPM (count per million – количество прочтений транскрипта в миллионе прочтений) > 1 . Из них 46176 транскриптов приходится на группу с физиологической беременностью, 52487 – на группу с задержкой роста плода; из них общими являются 44847 транскриптов. Анализ аннотаций транскриптов показал разнообразие типов РНК в исследуемой выборке. Ниже представлено распределение по категориям с указанием абсолютного количества и процента от числа транскриптов, приходящихся на ФБ и общую группу ЗРП, соответственно (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Аннотация транскриптов, полученных в результате RNA-seq

Идентифицированные транскрипты (категории Gencode)	Количество транскриптов (Процент от общего числа)	
	ФБ	ЗРП общая
Белок-кодирующие (protein_coding)	20221 (43,79%)	21067 (40,14%)
Длинные некодирующие РНК (lincRNA)	10431 (22,59%)	12145 (23,14%)
Процессированные псевдогены (processed_pseudogene)	6665 (14,43%)	8152 (15,53%)
Неидентифицированная РНК (misc_RNA)	1571 (3,40%)	1817 (3,46%)
Транскрибируемые непроцессированные псевдогены (transcribed_unprocessed_pseudogene)	1220 (2,64%)	1404 (2,67%)
Непроцессированные псевдогены (unprocessed_pseudogene)	1186 (2,57%)	1656 (3,16%)
Малые ядерные РНК (snRNA)	1119 (2,42%)	1444 (2,75%)
Транскрибируемые процессированные псевдогены (transcribed_processed_pseudogene)	893 (1,93%)	996 (1,90%)

Продолжение таблицы 3.1

Идентифицированные транскрипты (категории GENCODE)	Количество транскриптов (Процент от общего числа)	
	ФБ	ЗРП общая
Транскрипты с неустановленной функцией (TEC)	827 (1,79%)	895 (1,71%)
МикроРНК (miRNA)	686 (1,49%)	967 (1,84%)
Малые ядрышковые РНК (snoRNA)	479 (1,04%)	605 (1,15%)
Инактивированные гены рРНК (rRNA_pseudogene)	296 (0,64%)	381 (0,73%)
Транскрибируемые унитарные псевдогены (transcribed_unitary_pseudogene)	133 (0,29%)	163 (0,31%)
Гены вариабельной цепи иммуноглобулина (IG_V_gene)	67 (0,15%)	160 (0,30%)
Гены вариабельной цепи Т-клеточного рецептора (TR_V_gene)	63 (0,14%)	133 (0,25%)
Инактивированные гены иммуноглобулина (IG_V_pseudogene)	54 (0,12%)	137 (0,26%)
рРНК (rRNA)	44 (0,10%)	52 (0,10%)
Гены вариабельной цепи Т-клеточного рецептора (TR_J_gene)	40 (0,09%)	69 (0,13%)
Унитарные псевдогены (unitary_pseudogene)	38 (0,08%)	58 (0,11%)
Малые РНК, специфичные для тела Кахаля (scaRNAs)	30 (0,06%)	34 (0,06%)
Митохондриальная тРНК (Mt_tRNA)	22 (0,05%)	22 (0,04%)
Гены константного участка иммуноглобулина (IG_C_gene)	21 (0,05%)	22 (0,05%)
Инактивированные гены Т-клеточного рецептора (TR_V_pseudogene)	19 (0,04%)	30 (0,06%)
Артефакт (artifact)	17 (0,04%)	19 (0,04%)
Инактивированные гены иммуноглобулина (IG_C_pseudogene)	8 (0,02%)	10 (0,02%)
Гены константного участка Т-клеточного рецептора (TR_C_gene)	8 (0,02%)	8 (0,02%)
Гены вариабельной цепи иммуноглобулина (IG_D_gene)	0	8 (0,02%)
Небольшие нетранслируемые молекулы РНК (vault_RNA)	4 (0,01%)	4 (0,01%)

Окончание таблицы 3.1

Идентифицированные транскрипты (категории GENCODE)	Количество транскриптов (Процент от общего числа)	
	ФБ	ЗРП общая
Псевдогены (pseudogene)	3 (0,01%)	4 (0,01%)
Ген варибельной цепи иммуноглобулина (IG_J_gene)	2 (<0,01%)	6 (0,01%)
Инактивированный ген иммуноглобулина (IG_J_pseudogene)	2 (<0,01%)	4 (0,01%)
Рибозимы (ribozyme)	2 (<0,01%)	5 (0,01%)
Ген варибельной цепи Т-клеточного рецептора (TR_D_gene)	0	3 (0,01%)
Митохондриальная рРНК (Mt_rRNA)	2 (<0,01%)	2 (<0,01%)
Малые РНК (sRNA)	1 (<0,01%)	1 (<0,01%)
Инактивированный ген Т-клеточного рецептора (TR_J_pseudogene)	1 (<0,01%)	3 (0,01%)
Транслируемые процессированные псевдогены (translated_processed_pseudogene)	1 (<0,01%)	1 (<0,01%)

Анализ транскриптома децидуальных клеток выявил различия в структуре транскрипционной активности между физиологической беременностью и задержкой роста плода. Количество транскриптов, характерных для патологической беременности, оказалось значительно выше: 52487 транскриптов против 46176 при физиологической беременности. Такое увеличение числа транскриптов при ЗРП, вероятно, отражает активацию компенсаторных или стресс-индуцированных клеточных программ.

Несмотря на общее увеличение транскриптомного разнообразия при патологии, доля белок-кодирующих транскриптов, напротив, снижается: 40,14% против 43,79% при физиологической беременности ($pFDR = 1,47E-29$), что может указывать на возможное снижение эффективности белкового синтеза в условиях патологии плаценты. В группе с ЗРП выше доля длинных некодирующих РНК, а также процессированных и непроцессированных псевдогенов, что указывает на изменённую регуляцию экспрессии и вероятное

нарушение механизмов созревания транскриптов. Вариабельные сегменты иммуноглобулинов (IG) и Т-клеточных рецепторов (TR) представлены в транскриптоме плаценты относительно небольшим числом транскриптов, однако при задержке роста плода их доля закономерно увеличивается. Повышенная представленность этих генов в группе ЗРП может быть связана с повышением воспалительных и иммунорегуляторных процессов в плацентарной ткани. В совокупности эти особенности формируют специфический транскрипционный профиль децидуальных клеток плацентарной ткани при задержке роста плода, отличающийся большей сложностью, выраженной регуляторной нагрузкой и признаками нарушения нормальной функциональной организации плаценты.

Далее с помощью программы MAJIQ для 11521 транскрипта (20% от общего количества) были идентифицированы события альтернативного сплайсинга. В дальнейший анализ включены те события АС, которые присутствовали как минимум в половине образцов одной из исследуемых групп (4, 7 и 6, соответственно для ФБ, ЗРП и сЗРП). Согласно установленным ранее критериям, идентифицированы 4061 ген и 8483 события АС в контрольной группе, 4598 генов и 10039 событий АС в группе с изолированной ЗРП, 4653 гена и 10180 событий АС в группе с сочетанной ЗРП (Рисунок 3.1).

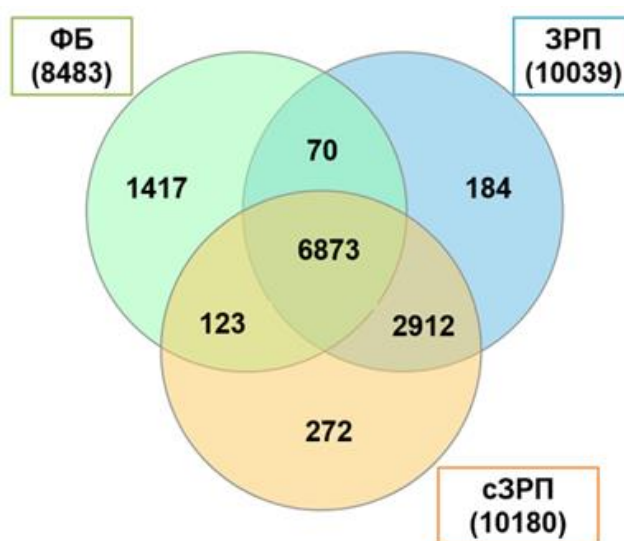


Рисунок 3.1 – Диаграмма Венна, демонстрирующая общность и специфичность событий альтернативного сплайсинга

На диаграмме Венна показано распределение событий альтернативного сплайсинга между группами физиологической беременности, изолированной и сочетанной задержки роста плода. Наибольшая часть событий является общей для всех трёх групп, что отражает базовый набор механизмов сплайсинга, характерных для плацентарной ткани. Вместе с тем, каждая из групп имеет и уникальные события, не встречающиеся в других состояниях. Особенно заметен большой пул общих событий между изолированной и сочетанной задержкой роста плода, что может указывать на сходные молекулярные механизмы. Кроме того, высокое число специфичных событий альтернативного сплайсинга при физиологической беременности может отражать более высокую транскрипционную пластичность здоровой плаценты.

Далее следует более детально рассмотреть непосредственно события альтернативного сплайсинга с целью выявления как общих, так и специфичных паттернов, характерных для исследуемых групп. Важным методологическим преимуществом используемого подхода является то, что программный пакет MAJIQ позволяет идентифицировать не только аннотированные события альтернативного сплайсинга, отражённые в референсных базах данных, но и ранее не описанные события *de novo*. Кроме того, данный алгоритм обеспечивает выявление как классических «бинарных» вариантов сплайсинга, предполагающих альтернативный выбор между двумя взаимоисключающими изоформами, так и более сложных, комплексных событий, отражающих высокую пластичность сплайсинговых паттернов.

Несмотря на то, что в большинстве транскриптомных исследований основной акцент делается на аннотированные бинарные события, включение *de novo* событий в анализ представляется принципиально важным в контексте изучения заболеваний. Такие события могут отражать тканеспецифичную, стресс-индуцированную или патологически обусловленную перестройку паттернов сплайсинга, не зафиксированную в референсных транскриптомах и характерную для патологического состояния организма.

В связи с этим в настоящей работе все события альтернативного сплайсинга были систематизированы по четырём основным категориям:

1. бинарные события, аннотированные;
2. бинарные события, *de novo*;
3. комплексные события, аннотированные;
4. комплексные события, *de novo*.

В качестве следующего шага выполнен сравнительный анализ соотношения аннотированных и *de novo* событий, а также бинарных и комплексных вариантов альтернативного сплайсинга в трёх исследуемых группах (Рисунок 3.2).

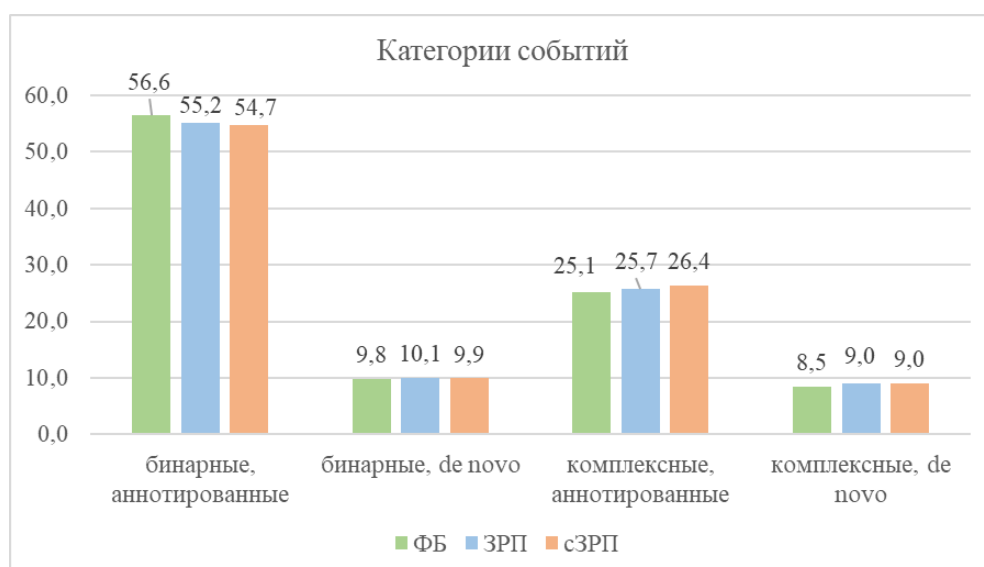


Рисунок 3.2 – Распределение событий АС по четырем категориям при физиологической беременности, изолированной и сочетанной ЗРП

На рисунке представлено распределение событий альтернативного сплайсинга по категориям в группах физиологической беременности, изолированной и сочетанной задержки роста плода. Во всех группах преобладают аннотированные бинарные события, доля которых несколько ниже при ЗРП по сравнению с физиологической беременностью.

Далее все бинарные события были классифицированы согласно 7 типам событий АС, как аннотированные (Рисунок 3.3), так и *de novo* (Рисунок 3.4). Выявлены статистически значимые отличия в частоте всех типов событий АС,

кроме взаимоисключающих экзонов, между аннотированными и *de novo* событиями. Наиболее часто встречающимся событием среди бинарных аннотированных является пропуск экзона, что согласуется с известными данными о преобладании данного типа события среди млекопитающих [390]. Среди бинарных *de novo* событий видим сильный рост встречаемости удержания интрона и резкое снижение доли остальных событий. Вероятно, это можно объяснить следующими причинами: аннотированные события чаще представляют консервативные, хорошо проверенные варианты сплайсинга, которые встречаются во многих тканях и организмах и отражают «стандартные» модели транскрипции, тогда как *de novo* события чаще бывают редкими, тканеспецифичными или недавно возникшими, поэтому их структура может быть более вариативной и уникальной для конкретного образца или состояния клетки.

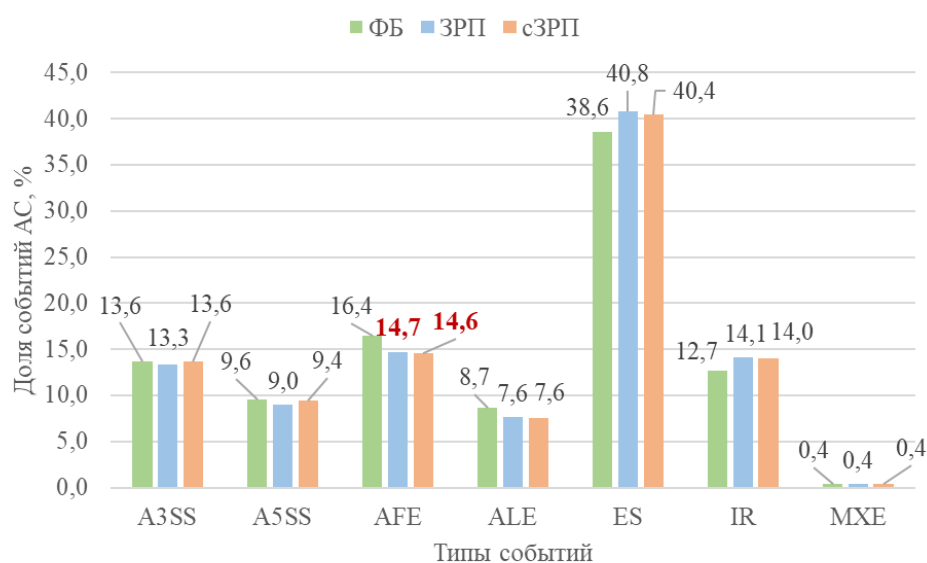


Рисунок 3.3 – Распределение бинарных аннотированных событий альтернативного сплайсинга по типам в группах с физиологической беременностью, изолированной и сочетанной задержкой роста плода (A3SS – альтернативный 3'-сайт сплайсинга; A5SS – альтернативный 5'-сайт сплайсинга; MXE – взаимоисключающие экзоны; IR – удержание интрона; ES – пропуск экзона; AFE – альтернативный первый экзон; ALE – альтернативный последний экзон); красным отмечены статистически значимые различия

Статистически значимые различия по частоте встречаемости разных типов событий сплайсинга выявлены только для альтернативного первого экзона при сравнении групп с ФБ и ЗРП ($\chi^2=3,95$, $p=0,049$); а также при сравнении групп с ФБ и сЗРП ($\chi^2=3,968$, $p=0,047$). Альтернативный первый экзон (AFE) определяет, с какой промоторной области начинается транскрипция. Если снижается частота AFE, это может говорить о том, что вариативность промоторного выбора уменьшается, и транскрипция начинает идти преимущественно из одного доминирующего промотора. Альтернативные первые экзоны часто ассоциированы с тканеспецифичностью [190]. Снижение их разнообразия может вести к потере вариативности белковых изоформ и сужению регуляторного потенциала.

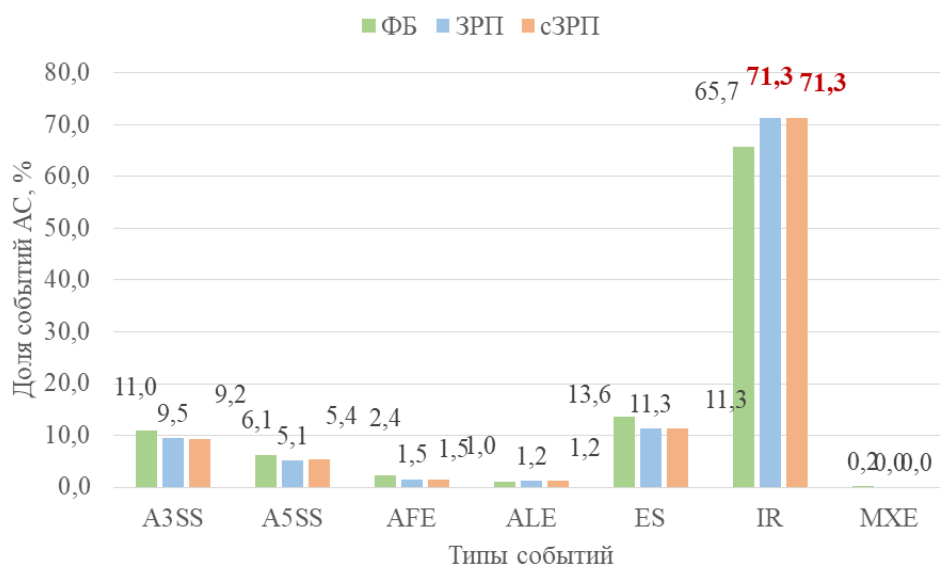


Рисунок 3.4 – Распределение бинарных *de novo* событий альтернативного сплайсинга по типам в группах с физиологической беременностью, изолированной и сочетанной задержкой роста плода (A3SS – альтернативный 3'-сайт сплайсинга; A5SS – альтернативный 5'-сайт сплайсинга; MXE – взаимоисключающие экзоны; IR – удержание интрона; ES – пропуск экзона; AFE – альтернативный первый экзон; ALE – альтернативный последний экзон); красным отмечены статистически значимые различия

Статистически значимые различия по частоте встречаемости разных типов событий сплайсинга выявлены только для удержания интрона при сравнении групп с ФБ и ЗРП ($\chi^2=7,862$, $p=0,006$); а также при сравнении групп с ФБ и сЗРП ($\chi^2=7,862$, $p=0,006$). Стоит отметить, что в этой группе событий наиболее часто встречающимся является удержание интрона для всех групп, что согласуется с новыми данными об увеличении числа событий удержания интрона среди млекопитающих [257]. Интроны часто содержат стоп-кодоны или элементы, вызывающие деградацию мРНК через NMD (nonsense-mediated decay), поэтому удержание интрона может приводить к синтезу усеченных белков [166]. Некоторые удержанные интроны могут быть транслированы, создавая альтернативные белковые изоформы с новыми N- или С-концевыми доменами. Это может менять функции белков, их локализацию или взаимодействия с другими белками. Притом в контрольной группе среди аннотированных событий средний размер удержанных интронов составляет 3557 нуклеотидов, тогда как в обеих группах с задержкой роста плода – 3895 нуклеотидов. Для *de novo* событий размеры удержанных интронов составили 3131 и 3516, соответственно для тех же самых групп, что также говорит об удлинении интронов при патологическом состоянии.

Стоит отметить, что для группы с ЗРП характерно большее количество альтернативно сплайсированных генов, имеющих комплексные события АС с более выраженной и сложной структурой, так как, в среднем, одно сложное событие состоит из девяти бинарных, тогда как более простые комплексы – в группе с ФБ (Рисунок 3.5).

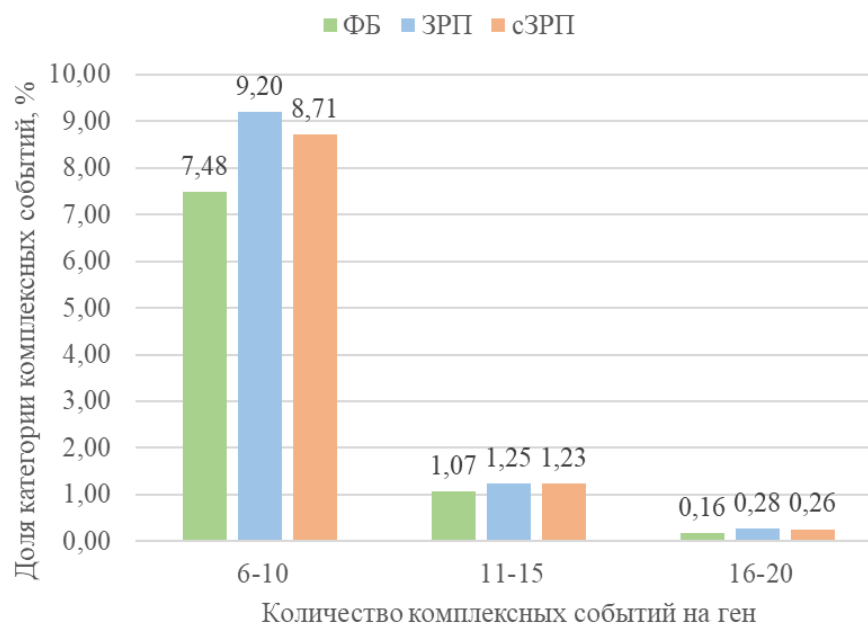


Рисунок 3.5 – Распределение количества комплексных событий на ген

Для большей наглядности на рисунке не представлена категория событий «1-5», в связи с тем, что эта категория составляет 89-91%. Анализ паттернов альтернативного сплайсинга в плацентарной ткани выявил тенденцию к увеличению количества комплексных событий и их сложности в ряду $\text{ФБ} < \text{сЗРП} < \text{ЗРП}$. Данная динамика может отражать прогрессирующее вовлечение регуляторных механизмов посттранскрипционного уровня в патогенез нарушений фетоплацентарного комплекса. Альтернативный сплайсинг регулируется множеством факторов, включая активность сплайсинг-факторов (SR-белков, hnRNP и др.), эпигенетическое состояние хроматина и сигнальные пути, чувствительные к изменениям микроокружения (гипоксия, воспаление, окислительный стресс). Усложнение архитектуры комплексных событий АС, вероятно, может свидетельствовать о попытках клеток адаптироваться к нарушениям гомеостаза путём генерации разнообразных изоформ белков, либо же – о нарушении точности и координации регуляции РНК-процессинга. Интересно, что наиболее высокая степень сложности комплексных событий сплайсинга наблюдается именно при изолированной ЗРП, что может указывать на специфическую, более ограниченную, но компенсаторно-активную

молекулярную адаптацию плаценты, в отличие от ситуаций с множественными осложнениями, где регуляторные системы, возможно, уже частично декомпенсированы.

3.2 Выявление паттернов альтернативного сплайсинга, специфичных для пациенток с задержкой роста плода.

Далее исследование сфокусировано на анализе специфичности ландшафта альтернативно сплайсированных генов для каждой из изученных групп (Рисунок 3.6). Для группы с изолированной ЗРП идентифицированы 88 специфичных плацентарных альтернативно сплайсированных генов. Из них гены *C18orf54* (6), *FAM89B* (6), *OAS3* (4) являются генами с наибольшим количеством событий АС. Согласно функциональной аннотации, эти 88 генов связаны с метаболизмом тРНК (GO:0006399, $p=0,0003$; GO:0000049, $p=0,006$), поддержанием клеточной полярности (GO:0007163, $p=0,003$), иммунным ответом (GO:0002764, $p=0,007$; GO:0032606, $p=0,018$; hsa04658, $p=0,013$; R-HSA-8983711, $p=0,0009$), фагоцитозом (GO:0006909, $p=0,02$), связыванием хроматина (GO:0031490, $p=0,018$), связыванием кадгерина (GO:0045296, $p=0,018$), каталитической активностью РНК (GO:0140101, $p=0,003$), сигнальным путем Hedgehog (hsa04340, $p=0,027$) и умственной отсталостью (umls:C3714756, $p=0,013$).

Сигнальный путь Hedgehog – это биологический путь, который играет роль в регуляции, клеточной пролиферации и дифференцировке эмбриона, органогенезе [57, 188]. В разных частях эмбриона концентрация сигнальных белков hedgehog различна. Лигандами сигнального пути являются Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog и Desert Hedgehog. Белок Indian Hedgehog является ключевым медиатором подготовки эндометрия к имплантации, экспрессируется в эпителиальных клетках матки, активируя паракринные сигналы в стромальных клетках и способствуя децидуализации [345].

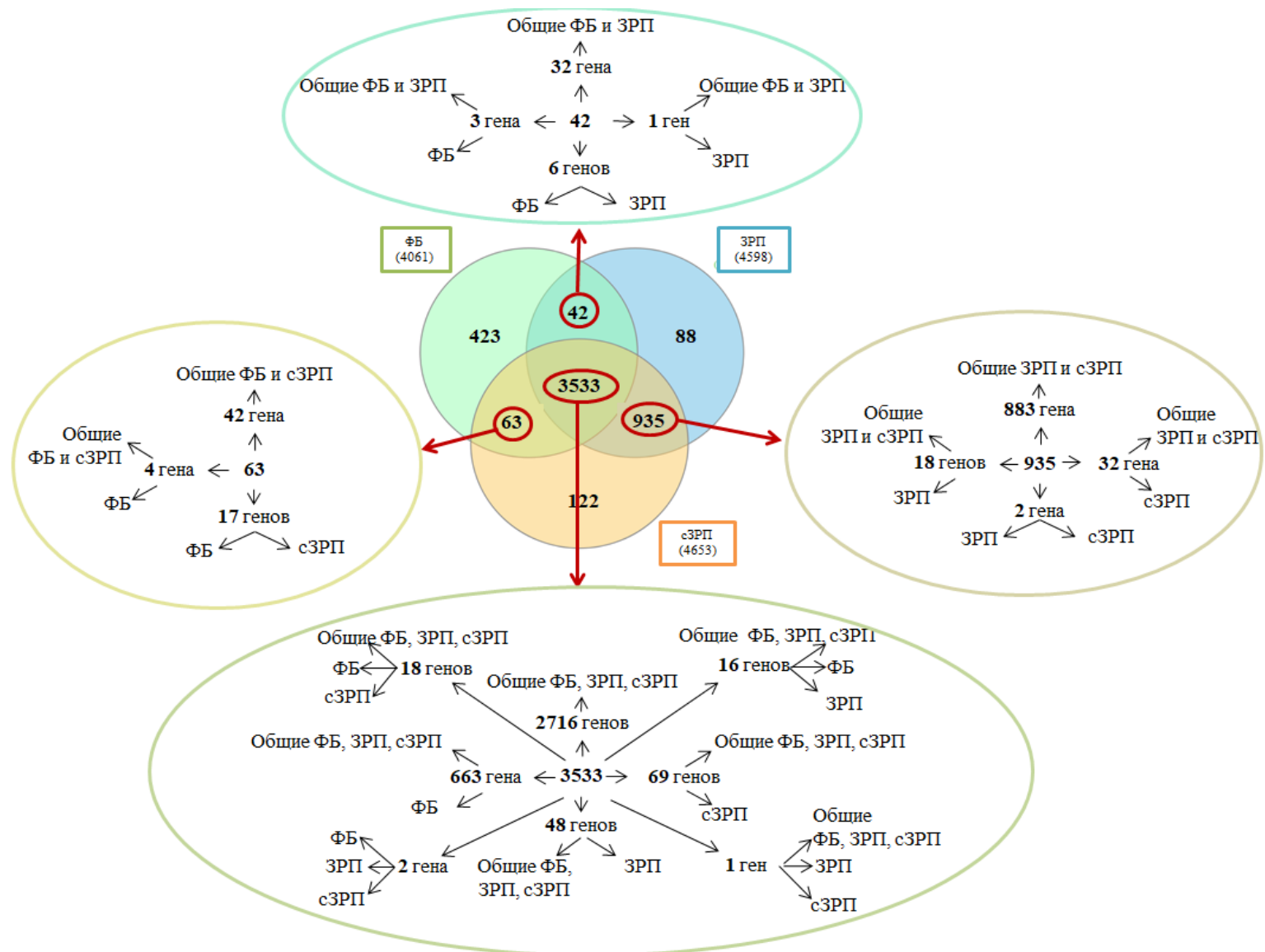


Рисунок 3.6 – Диаграмма Венна, демонстрирующая распределение событий альтернативного сплайсинга генов, продемонстрировавших ассоциации с несколькими изученными группами

Белок Sonic Hedgehog важен для адекватного развития нервной системы будущего плода [194]. На мышах показано, что белок Desert Hedgehog имеет решающее значение для полового развития самцов млекопитающих, в частности для развития клеток Лейдига и сперматогенеза [84]. Таким образом, нарушения в данном сигнальном пути могут привести к серьёзным осложнениям, включая привычное невынашивание беременности, выкидыш, преэклампсию, задержку роста плода и врождённые патологии.

Кадгерины – это семейство кальций-зависимых клеточно-адгезивных молекул, которые обеспечивают межклеточные контакты и регулируют процессы дифференцировки, миграции и инвазии клеток [29, 212]. Е-кадгерин играет центральную роль в поддержании межклеточных контактов, регуляции клеточной миграции и дифференцировки [376]. На ранних этапах беременности Е-кадгерин активно экспрессируется в эпителии эндометрия, поддерживая целостность и барьерную функцию слизистой оболочки матки. По мере подготовки к инвазии экспрессия Е-кадгерина снижается, а уровень N-кадгерина возрастает, что делает клетки более подвижными и способствует их проникновению в материнскую ткань [399]. Также есть VE-кадгерин – это специфический адгезионный белок, который экспрессируется преимущественно в эндотелиальных клетках сосудов и во время беременности динамически изменяется, обеспечивая ремоделирование сосудов и адаптацию маточно-плацентарного кровообращения к потребностям растущего плода [137, 144, 381].

Во время беременности материнский организм должен сбалансированно регулировать иммунный ответ, чтобы одновременно защищать себя от инфекций и обеспечивать толерантность к плоду, геном которого наполовину состоит из чужеродного отцовского генетического материала. Во время беременности на разных этапах происходит перестройка иммунного ответа [258, 301]. При хронической плацентарной недостаточности наблюдается повышенная выработка провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6, IFN- γ), которые вызывают повреждение эндотелия сосудов плаценты, в результате

нарушается кровоток маточно-плацентарной системы, что приводит к хронической гипоксии плода [318, 412]. Кроме того, воспалительные цитокины могут препятствовать нормальной инвазии цитотрофобласта, снижая его способность к ремоделированию материнских сосудов [1].

Для группы с сочетанной ЗРП идентифицированы 122 специфичных плацентарных альтернативно сплайсированных гена. Из них гены *INTS14* (10), *HELQ* (4), *ZNF462* (4) являются генами с наибольшим количеством событий АС. Согласно функциональной аннотации, эти 122 гена связаны с каталитической активностью, действующей на ДНК (GO:0140097, pFDR=0,04), канонической передачей сигнала NF-каппаВ (GO:0007249, p=0,013), синтезом ДНК (GO:0071897, p=0,001; GO:0006352, p=0,005; GO:0006353, p=0,009; GO:0140297, p=0,03), нуклеазной и хеликазной активностью (GO:0004518, p=0,002; GO:0004386, p=0,016), репарацией ДНК (GO:0051103, pFDR=0,02; GO:0006284, p=0,003; hsa03410, p=0,001; R-HSA-5696397, p=0,016; R-HSA-6781827, p=0,013), реабсорбцией воды, регулируемой вазопрессинном (hsa04962, p=0,001), различными видами рака (hsa05219, p=0,018; hsa05224, p=0,038; hsa05226, p=0,039), сигнальным путем Notch (R-HSA-1980143, p=0,011).

Каталитическая активность, действующая на ДНК, охватывает широкий спектр ферментов, которые обеспечивают модификацию, восстановление и поддержание целостности генетического материала [344]. К ним относятся ДНК-полимеразы, топоизомеразы, нуклеазы, геликазные и лигазные комплексы, играющие ключевую роль в репликации, транскрипции и контроле за стабильностью генома. В условиях плацентарной ткани такая активность приобретает особое значение, поскольку именно она определяет способность клеток к адекватному делению и функционированию в условиях стресса, гипоксии и окислительного повреждения. Сбои в работе этих ферментов могут приводить к ошибкам копирования генетической информации, нарушению экспрессии критически важных генов и, как следствие, к плацентарной дисфункции.

Беременность сопровождается воспалительным состоянием и повышенной чувствительностью к окислительному стрессу, который, в свою очередь, приводит к повреждению ДНК [139]. У здоровых женщин антиоксидантные системы и механизмы репарации способны компенсировать возникающие повреждения, однако при нарушениях образуется патологическая нагрузка на клетки, особенно плаценты, яйцеклеток и сперматозоидов [287]. Нарушения в работе эксцизионной, рекомбинационной или пострепликативной репарации препятствуют поддержанию стабильности генома, усиливают апоптоз и ограничивают пролиферацию клеток трофобласта. Это, в свою очередь, ведет к нарушению инвазии цитотрофобласта, дефектам васкуляризации и снижению эффективности плацентации. Повышенное повреждение ДНК коррелирует с бесплодием, невынашиванием, преэклампсией и задержкой роста плода [290].

Таким образом, дефицит систем репарации ДНК и снижение активности ферментов, действующих на ДНК, можно рассматривать как важное звено в патогенезе задержки роста плода, отражающее неспособность плацентарной ткани адекватно адаптироваться к неблагоприятным условиям внутриутробной среды.

Для группы с ФБ идентифицированы 423 специфичных плацентарных гена, подверженных АС. Из них гены *ARHGEF3* (14), *NPIP12* (12), *USP9Y* (12), *ZNF600* (12), *CDIPT* (10) являются генами с наибольшим количеством событий АС. Согласно функциональной аннотации, эти 423 гена связаны с организацией митохондрий (GO:0007005, $p=0,0003$), митохондриальным транспортом (GO:0006839), регулированием проницаемости мембран (GO:0090559, $p=0,0004$), переносом сложных фосфорорганических эфиров (GO:0015748, $p=0,006$; GO:0015605, $p=0,01$), каталитической активностью РНК (GO:0140098, $p=0,001$), трансферазной активностью (GO:0016765, $p=0,01$; GO:0016747, $p=0,01$; GO:0016769, $p=0,02$), связыванием коллагена (GO:0005518, $p=0,02$), метаболизмом (hsa01100, $p=0,0002$; hsa00020, $p=0,003$; hsa01210, $p=0,004$), эндоцитозом (hsa04144, $p=0,005$), сигнальным путем HIF-1 α (hsa04066, $p=0,02$).

Сигнальные пути представляют наибольший интерес для изучения, так как именно они лежат в основе координации и регуляции практически всех жизненно важных процессов в клетке. HIF-1 (классический сигнальный путь ответа на гипоксию) является важнейшим регулятором кислородного гомеостаза у всех многоклеточных эукариот и необходим для развития плаценты, участвуя в транскрипции многих кислородзависимых генов [90, 230, 386]. При гипоксии экспрессия HIF-1 α высока и способствует развитию плаценты на ранних сроках беременности [227]. Гипоксия индуцирует ангиогенез, регулируя ангиогенные белки, такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), плацентарный фактор роста (PIGF) и FLT1 [201]. Изменение концентрации этих белков вызывает ангиогенный дисбаланс, приводящий к повреждению эндотелия и развитию акушерских патологий. Таким образом, HIF-1 α играет важную роль в поддержании нормального течения беременности, обеспечивая адаптацию клеток и тканей к физиологической гипоксии.

Во время наступления успешной беременности эндометрий претерпевает ряд изменений, а внеклеточный матрикс (ВКМ) разрушается и реконструируется. Известно, что ВКМ может влиять на инвазию цитотрофобласта и участвовать в ремоделировании децидуальной оболочки на границе мать-плод [33, 276]. Коллаген является одним из наиболее распространенных компонентов ВКМ, регулирующим биологическое поведение клеток и обеспечивающим структурную целостность тканей человека [30, 263]. Новые данные свидетельствуют о том, что коллаген и его фрагменты экспрессируются на границе между матерью и плодом. Кроме того, их аномальная экспрессия связана с определенными патологическими состояниями, связанными с беременностью, включая привычное невынашивание беременности, гестационный сахарный диабет, преэклампсию [116, 340].

Ферменты-трансферазы играют жизненно важную роль в метаболических путях, участвующих в производстве энергии, метаболизме питательных веществ и биосинтезе макромолекул [337]. Эти метаболические процессы

необходимы для удовлетворения повышенных энергетических потребностей во время беременности, обеспечения питательными веществами развивающегося плода и синтеза молекул, необходимых для роста и развития плода. ДНК-метилтрансферазы и гистонметилтрансферазы, участвуют в эпигенетической регуляции, которая имеет важное значение для контроля дифференцировки клеток, развития тканей и установления идентичности клеток во время эмбриогенеза и внутриутробного развития плода [314, 396].

Подводя итог, можно обозначить основные биологические процессы, в которые вовлечены специфичные альтернативно сплайсированные гены (Рисунок 3.7). Общими являются такие пути как каталитическая активность РНК для всех трех исследуемых групп; формирование внеклеточного матрикса и эндоцитоз – для физиологической беременности и изолированной задержки роста плода; иммунный ответ – для групп ЗРП. Несмотря на это, при анализе функциональной аннотации превалируют специфичные пути, что обуславливает отличия между патогенезом изолированной и сочетанной задержки роста плода, а также указывает на важные для здорового течения беременности биологические процессы.

Характеристика альтернативного сплайсинга общих генов при изолированной и сочетанной задержке роста плода

Идентифицированы 935 общих альтернативно сплайсированных генов между изолированной и сочетанной задержкой роста плода, в связи с чем можно предполагать, что именно эти гены играют роль непосредственно в патогенезе данной акушерской патологии. Согласно функциональной аннотации, они связаны с апоптозом и сигнальным путем FAS (GO:0071887, $p=0,0001$; P00006, $p=0,031$; P00020, $p=0,038$), транспортом веществ (GO:0006907, $p=0,003$; hsa04144, $p=0,005$; R-HSA-5653656, $p=0,003$), метаболизмом фосфолипидов (GO:0005543, $p=0,0008$; R-HSA-1483257, $p=0,011$), сигнальным путем Ras/Raf/MAPK (GO:0017124, $p=0,002$; GO:0007264, $p=0,003$; hsa01521, $p=0,026$; R-HSA-9012999, $p=0,002$),



Рисунок 3.7 – Специфичные биологические пути для плацентарных альтернативно сплайсированных генов в группах с физиологической беременностью, изолированной и сочетанной задержкой роста плода (голубым показаны специфичные пути для каждой из групп, красным – специфичные пути, общие для нескольких групп)

процессингом мРНК (GO:0006397, $p=0,003$), сигнальным путем Notch (P00045, $p=0,023$).

Сигнальный путь Fas играет доминирующую роль в индукции апоптоза – программируемой клеточной смерти, необходимой для поддержания гомеостаза тканей, удаления поврежденных клеток и регуляции иммунного ответа [385, 387]. Этот путь относится к группе рецептор-зависимого апоптоза и активируется при взаимодействии лиганда FasL (Fas ligand) с его рецептором Fas (также известным как CD95 или APO-1), относящимся к семейству рецепторов факторов некроза опухоли. На ранних стадиях беременности уровень экспрессии Fas на инвазивных клетках цитотрофобласта низкий, что защищает их от преждевременного апоптоза и позволяет нормально проникать в децидуальную ткань [143]. На более поздних сроках уровень Fas повышается, что способствует регуляции инвазии и предотвращает чрезмерный рост плаценты. В здоровой плаценте существует баланс между пролиферацией и апоптозом клеток трофобласта [164]. Важную роль в этом процессе играет каспазно-зависимый механизм апоптоза, который регулирует обновление клеточного состава, предотвращает накопление поврежденных клеток и способствует правильному формированию плацентарных структур [219, 256].

Процессы апоптоза особенно активны на ранних стадиях эмбриогенеза, когда они способствуют формированию таких структур, как нервная трубка, зачатки конечностей и пальцы [142]. Апоптоз способствует поддержанию иммунной толерантности на уровне взаимодействия матери и плода. Клетки цитотрофобласта (в особенности синцитиотрофобласт, формирующий наружный слой ворсин хориона) экспрессируют FasL, который взаимодействует с Fas-рецепторами на активированных материнских иммунных клетках, индуцируя их апоптоз [317]. Этот механизм позволяет подавлять потенциально агрессивные материнские Т-клетки, которые могут распознать антигены плода как чужеродные и инициировать иммунную атаку. Таким образом, Fas/FasL система действует как своеобразный «иммунный барьер», защищая плод от материнского иммунного отторжения.

Дисбаланс в системе Fas/FasL и апоптотического ответа в плаценте может привести к ряду патологических состояний [335]. В плацентах женщин с преэклампсией наблюдается повышенная экспрессия Fas и усиленный апоптоз клеток цитотрофобласта, что приводит к нарушению его инвазии и ремоделирования спиральных артерий, ограничивая кровоснабжение плода и вызывая гипоксию [266]. При ЗРП наблюдается повышенная экспрессия Fas и каспаз-8 в плацентарной ткани, что приводит к преждевременному разрушению клеток, участвующих в формировании нормального кровоснабжения плода [219]. В случае иммунологически обусловленного выкидыша может наблюдаться снижение экспрессии FasL в трофобласте, что приводит к недостаточному апоптозу материнских Т-лимфоцитов и их атаке на эмбриональные ткани.

Характеристика общих альтернативно сплайсированных генов при физиологической беременности, изолированной и сочетанной задержке роста плода

Идентифицированы 3533 альтернативно сплайсированных гена (68%), которые являются общими для всех трех групп, включенных в исследование. Выявлено, что гены, имеющие наибольшие значения индекса сплайсинга, пересекаются между исследуемыми состояниями, но имеют различное количество событий в зависимости от группы, в которой они идентифицированы. Так, в таблице 3.2 приведены списки первых 10 генов для каждой группы, где в скобках указано количество событий АС на один ген.

Таблица 3.2 – Десять альтернативно сплайсированных генов в группах с ФБ, ЗРП и сЗРП с наибольшим количеством как бинарных, так и комплексных событий

ФБ	Изолированная ЗРП	Сочетанная ЗРП
<i>DDX60L (14)</i>	<i>DDX60L (18)</i>	<i>DDX60L (18)</i>
<i>RASA1 (14)</i>	<i>RASA1 (14)</i>	<i>RASA1 (14)</i>

Окончание таблицы 3.2

ФБ	Изолированная ЗРП	Сочетанная ЗРП
<i>NCOR2</i> (12)	<i>HERC1</i> (12)	<i>HERC1</i> (12)
<i>DOCK5</i> (11)	<i>DOCK5</i> (11)	<i>DOCK5</i> (11)
<i>LVRN</i> (11)	<i>FLT1</i> (9)	<i>FLT1</i> (9)
<i>HERC1</i> (10)	<i>LVRN</i> (9)	<i>LVRN</i> (9)
<i>TNKS2</i> (9)	<i>NCOR2</i> (9)	<i>NCOR2</i> (9)
<i>ATIC</i> (8)	<i>ATIC</i> (8)	<i>ATIC</i> (8)
<i>CBLB</i> (8)	<i>CBLB</i> (8)	<i>SLC43A3</i> (8)
<i>AFF1</i> (7)	<i>COL27A1</i> (8)	<i>TNKS2</i> (8)

Мы можем видеть, что 7 из 10 генов (*DDX60L*, *RASA1*, *NCOR2*, *DOCK5*, *LVRN*, *HERC1*, *ATIC*) являются общими среди лидирующих по событиям альтернативно сплайсированных генов, из них 4 гена *DDX60L*, *HERC1*, *LVRN*, *NCOR2* имеют разное количество событий между группами, в связи с чем можно предположить, что вклад даже общих генов в ландшафт альтернативного сплайсинга различается в зависимости от фенотипа.

События АС общих генов не всегда имеют идентичную структуру и наполняемость. Поскольку альтернативный сплайсинг в разных генах проявляется по-разному, то рассмотрим их общность и специфичность на примере гена *FLT1*, кодирующего рецептор фактора роста эндотелия сосудов-1 (VEGFR-1). В классическом представлении *FLT1* – это трансмембранный тирозинкиназный рецептор, распознающий VEGF-A, PlGF и другие родственные лиганды, тем самым регулируя ангиогенез, проницаемость сосудов и рост эндотелия [85, 152]. Для плаценты, однако, характерно формирование множества изоформ *FLT1*, включая растворимые варианты (sFlt-1), которые формируются в ходе альтернативного сплайсинга пре-мРНК гена *FLT1* [367, 395]. Такие укороченные белки не содержат мембранного и цитоплазматического доменов и функционируют как «ловушки» VEGF/PlGF, подавляя ангиогенные сигналы [8, 23, 341, 383]. Такой механизм можно

рассматривать как тонкий регуляторный переключатель между стимуляцией и подавлением ангиогенеза. Физиологически небольшое повышение уровня sFlt-1 ближе к концу беременности стабилизирует сосудистую сеть, но при нарушениях его избыток приводит к ангиогенной блокаде, плацентарной недостаточности и, как следствие, риску развития задержки роста плода ЗРП. Хотя роль sFlt-1 хорошо изучена при преэклампсии [28, 354], влияние изменения сплайсинга гена *FLT1* на развитие ЗРП исследовано недостаточно; однако в некоторых работах показана ассоциация повышенных концентраций sFlt1 с этим состоянием [56, 73].

В группе с физиологической беременностью для гена *FLT1* идентифицированы четыре события (Рисунок 3.8.А). Два из них составляют комплексное LSV, которое включает в себя альтернативный последний экзон с уровнем PSI = 0,685 и удержание интрона с уровнем PSI = 0,292 (Рисунок 3.8.Б), красным цветом указано конститутивное событие соединения экзон-экзон, которое имеет низкий процент включения в транскрипт и PSI = 0,012. Третье событие является бинарным и соответствует удержанию интрона с PSI = 0,068, тогда как конститутивное событие экзон-экзон имеет PSI = 0,932 и более вероятно будет включено в транскрипт (Рисунок 3.8.В). Четвертое событие также является бинарным и соответствует пропуску экзона с PSI = 0,099, тогда как конститутивное событие экзон-экзон имеет PSI = 0,901 и более вероятно будет включено в транскрипт (Рисунок 3.8.Г).

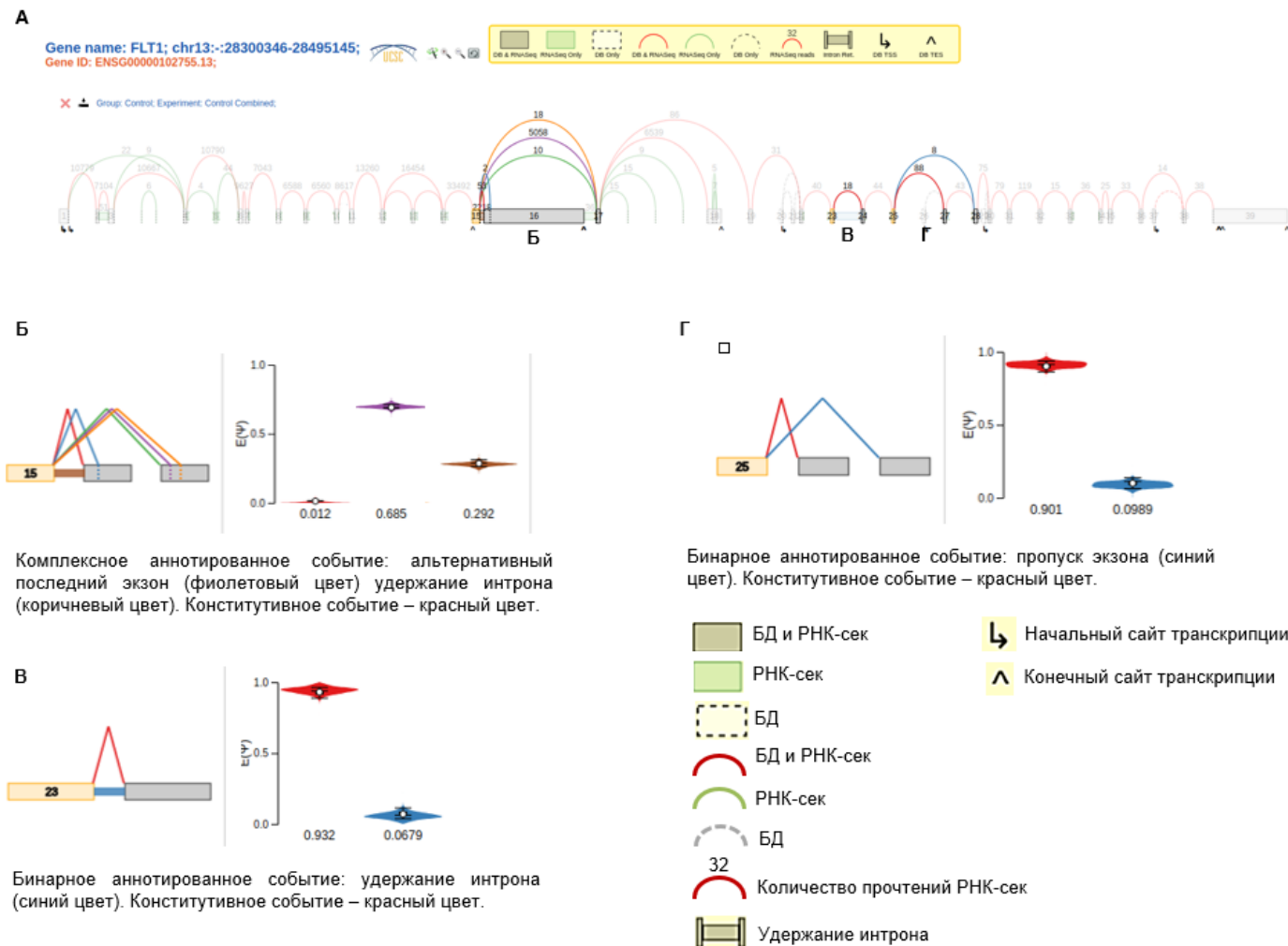


Рисунок 3.8 – Визуализация событий альтернативного сплайсинга для гена *FLT1* в группе с физиологической беременностью с помощью программы MAJIQ VOILA (А – статистически значимые события в интрон-экзонной структуре гена; Б – комплексное событие; В – удержание интрона, Г – пропуск экзона)

В группе с задержкой роста плода для гена *FLT1* идентифицированы девять событий (Рисунок 3.9.А). Два из них составляют комплексное LSV, аналогичное такому в других группах, которое включает в себя альтернативный последний экзон с уровнем $PSI = 0,715$ и удержание интрона с уровнем $PSI = 0,261$ (Рисунок 3.9.В), красным цветом указано конститутивное событие соединения экзон-экзон, которое имеет низкий процент включения в транскрипт и $PSI = 0,017$. Ещё два события образуют второй комплекс LSV, состоящий из пропуска экзона с $PSI=0,938$ и удержания интрона с $PSI=0,057$, тогда как для конститутивного события уровень $PSI=0,05$ (Рисунок 3.9.Б). Из оставшихся пяти событий, четыре являются удержанием интрона с уровнями PSI 0,08; 0,144; 0,072; 0,093, соответственно (Рисунок 3.9.Г). И последнее – это пропуск экзона, который также встречается в двух других группах, но при этом имеет в 2 раза больший индекс сплайсинга $PSI=0,207$, конститутивное событие экзон-экзон имеет $PSI = 0,793$ и более вероятно будет включено в транскрипт (Рисунок 3.9.Д).

Для группы с сочетанной задержкой роста плода картина аналогична изолированной ЗРП, но разница в PSI для событий не превышает 0,02. Таким образом, можно наблюдать четыре общих события для всех трех исследуемых групп, два из которых создают комплексное событие, одно является удержанием интрона и ещё одно – пропуском экзона, но при этом незначительно отличаются индексы сплайсинга, за исключением пропуска экзона в группе с задержкой роста плода, где PSI возрастает примерно в два раза. В группах с ЗРП и сЗРП также мы можем наблюдать ещё два события, образующих комплекс из удержания интрона и пропуска экзона, и три удержания интрона, которых нет в группе с ФБ.

Полученные данные показывают, что различия в альтернативном сплайсинге между группами с физиологической беременностью и задержкой роста плода позволяют говорить о вероятной перестройке посттранскрипционного контроля в децидуальных клетках.

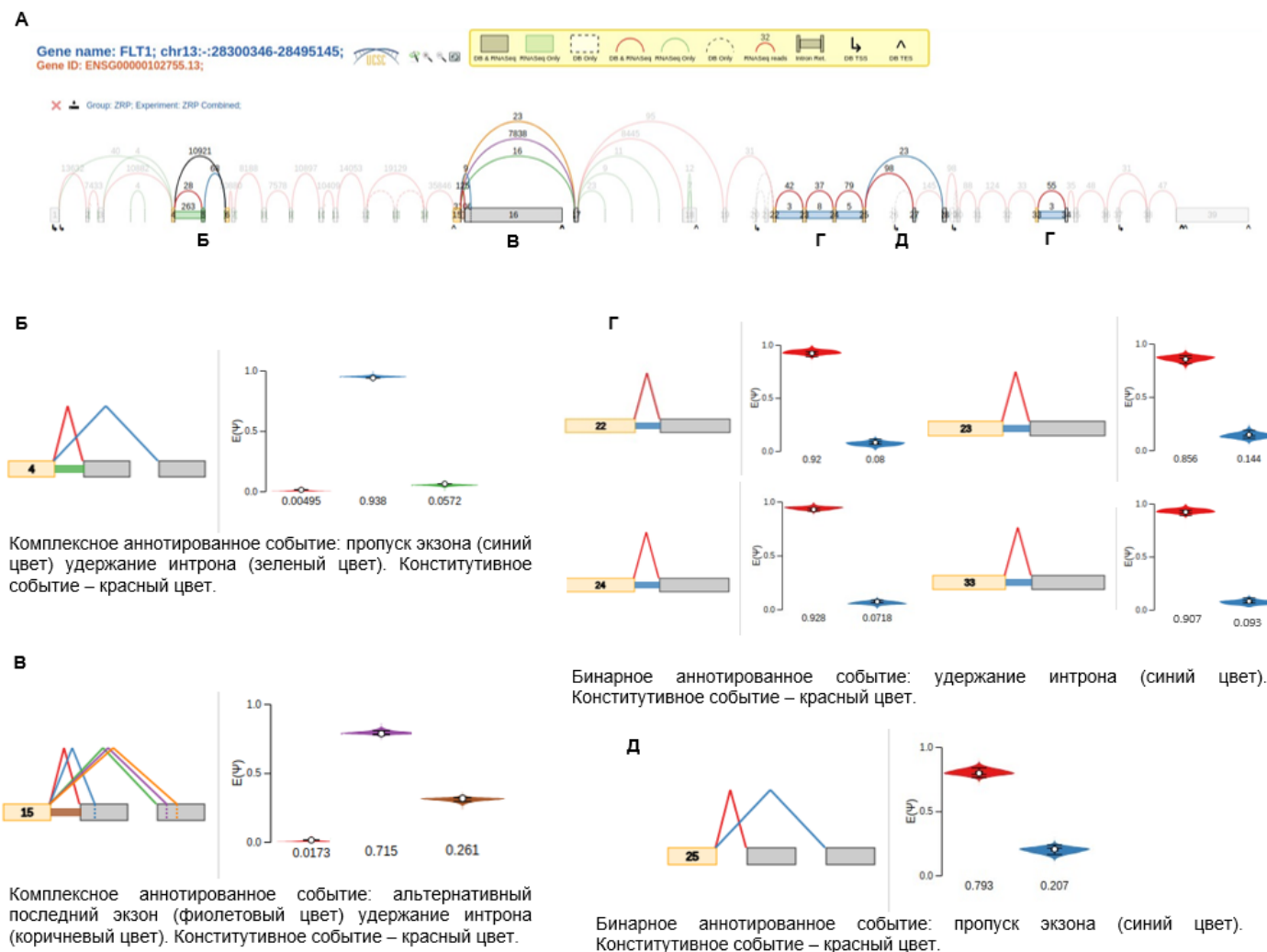


Рисунок 3.9 – Визуализация событий альтернативного сплайсинга для гена *FLT1* в группе с задержкой роста плода с помощью программы MAJIQ VOILA (А – статистически значимые события в интрон-экзонной структуре гена; Б – комплексное событие 1; В – комплексное событие 2; Г – удержание интрона; Д – пропуск экзона)

Особый интерес представляет почти двукратное увеличение индекса PSI для пропуска экзона в группе с ЗРП. Такой тип события может изменять длину белка, приводя к выпадению важных доменов и возникновению укороченных или функционально изменённых форм. В литературе есть данные о том, что пропуск экзонов 14-15 в гене *FLT1* формирует укороченные изоформы с изменённой способностью связывать VEGF и PlGF [104]. Нами было зафиксировано повышение вероятности пропуска экзона 26, который потенциально снижает ангиогенный потенциал плаценты. Дополнительное значение имеет SNP rs9554320, расположенный между экзонами 25 и 26: по литературным данным, он может влиять на регуляцию *FLT1* через взаимодействие с длинными некодирующими РНК [259].

Ещё одна характерная особенность группы с ЗРП – рост частоты удержания интронов. Это может отражать нарушения в работе факторов сплайсинга (SRSF, hnRNP и др.), чувствительных к гипоксии – ключевому элементу плацентарной недостаточности. Гипоксический стресс способен менять экспрессию и модификации регуляторов сплайсинга, что приводит к ошибкам в процессинге пре-мРНК [58, 167]. В совокупности это создает условия для аномального удержания интронов, что может служить молекулярным отражением адаптивного или патологического ответа плацентарных клеток на хронический стресс. Интроны содержат многочисленные регуляторные элементы, а также стоп-кодоны, запускающие деградацию мРНК по механизму нонсенс-опосредованного распада (NMD), что снижает количество полноразмерного белка и смещает баланс в сторону растворимых форм рецептора [123]. Ранее описаны удержания других интронов. Классический плацентарный вариант sFlt1-i13 образуется за счёт удержания интрона 13 и раннего полиаденилирования [36, 366]. В некоторых случаях также наблюдается удержание интрона 14, что создаёт ещё одну растворимую изоформу [303].

Также стоит отметить, что в области экзона 15 наблюдается заметная концентрация событий AC. Изоформа sFlt1-e15a, включающая дополнительный

экзон 15а (расположен после стандартного экзона 15) и завершающая транскрипцию раньше времени, хорошо описана при преэклампсии [280]. Наши данные показывают, что аналогичный механизм может быть важен и для задержки роста плода (Рисунок 3.10).



Рисунок 3.10 – Механизмы альтернативного сплайсинга гена *FLT1* и их связь с патофизиологическими звеньями задержки роста плода. На рисунке представлена схема интрон-экзонной структуры гена *FLT1* с событиями альтернативного сплайсинга, идентифицированных по нашим и литературным данным. днРНК – длинная некодирующая РНК

На представленном рисунке схематично показаны ключевые патофизиологические механизмы, связывающие альтернативный сплайсинг пре-мРНК гена *FLT1* с развитием задержки роста плода. В верхней части диаграммы отражены молекулярные события на уровне транскриптома децидуальных клеток, где зафиксированы события удержания интронов, пропуска экзонов и включения криптических экзонов, что формирует преждевременные стоп-кодены и инициирует нонсенс-опосредованный распад мРНК, а также процессы ранней терминации транскрипта. Эти процессы локализованы как по нашим данным, так и по данным литературы, в области

экзонов 13-15 и экзона 26, образуя «горячую точку» альтернативного сплайсинга. Даже количественно незначительные отличия в частоте отдельных событий альтернативного сплайсинга могут приводить к принципиальным сдвигам в функциональной организации плаценты.

На следующем уровне показано, что подобные изменения препятствуют формированию полноразмерного рецептора FLT1, смещая баланс в сторону образования его растворимых изоформ. В результате резко уменьшается биодоступность ключевых факторов роста сосудов, что снижает ангиогенную активность, ограничивая не только рост новых сосудов, но и стабильность уже сформированных капилляров.

С патофизиологической точки зрения это означает уменьшение плотности и ветвления сосудистого русла ворсинчатого дерева, а также ухудшение процессов васкулогенеза в ранние сроки и ангиогенеза в последующие этапы беременности. В клиническом контексте данные изменения проявляются в виде снижения маточно-плацентарного кровотока, создавая условия для хронической плацентарной гипоперфузии.

На системном уровне такие нарушения проявляются как хроническая гипоксия и энергетический дефицит у плода, что приводит к развитию задержки роста плода и повышенному риску перинатальных осложнений. Таким образом, рисунок иллюстрирует патогенетическую цепочку: от молекулярных событий альтернативного сплайсинга пре-мРНК гена *FLT1* до нарушения плацентарных функций и клинических проявлений ЗРП.

Интересным является факт появления дополнительных комплексных событий только в группе с ЗРП. Их наличие может указывать на снижение стабильности транскриптома под влиянием гипоксии, оксидативного стресса и воспалительных сигналов – своеобразную попытку адаптации ценой потери функциональности. Это подчеркивает, что альтернативный сплайсинг не просто отражает патологию, а активно участвует в её формировании, влияя на баланс между компенсаторными и декомпенсаторными механизмами.

В целях более детальной функциональной аннотации общих 3533 альтернативно сплайсированных генов проведен анализ реконструированной с использованием программы «NetworkAnalyst» белок-белковой сети (Рисунок 3.11), включающей 749 продуктов данных генов, что свидетельствует о высокой степени их взаимодействия. Центральное место в построенной сети с максимальным числом и силой взаимодействий ($\text{node_degree} \geq 15$, $\text{score} \geq 0,990$) занимают следующие 15 генов: *CTNNB1*, *UBC*, *RPS9*, *SRC*, *RPL11*, *EGFR*, *SNU13*, *UBA52*, *CDC42*, *ACTL6A*, *AKT1*, *SNRPG*, *SF3B1*, *TNFRSF1A*, *SF3B2*.

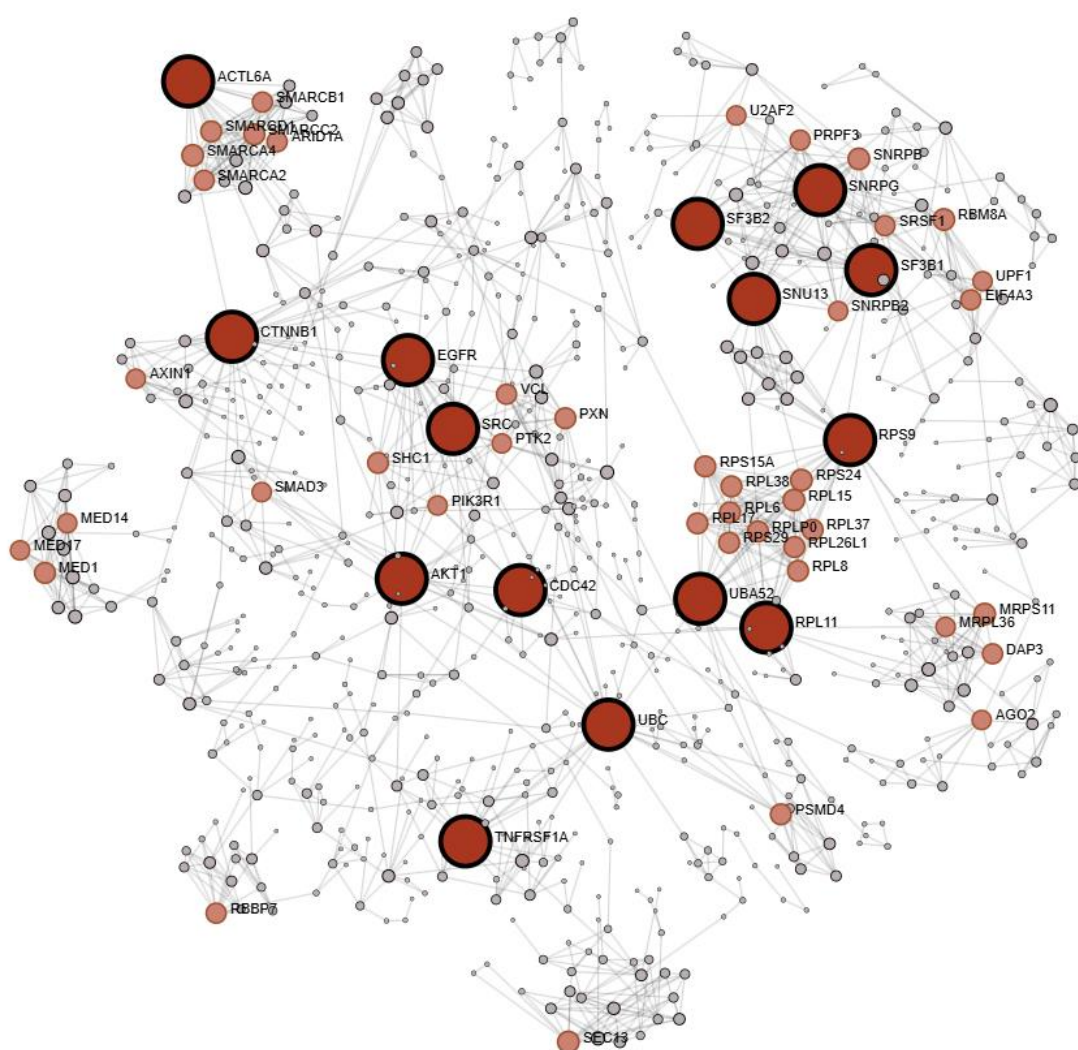


Рисунок 3.11 – Сеть белок-белковых взаимодействий продуктов 3533 общих альтернативно сплайсированных генов, экспрессирующихся в децидуальных клетках при физиологической беременности, изолированной и сочетанной задержке роста плода (темно-красным показаны гены с $\text{node_degree} \geq 15$, розовым – с $\text{node_degree} > 10$)

Ген *CTNNB1* (β -катенин) – центральный элемент сигнального пути Wnt, контролирующей клеточную пролиферацию и морфогенез; *EGFR* и *SRC* – регуляторы передачи сигналов роста и ангиогенеза; *AKT1* и *CDC42* – важные медиаторы клеточной выживаемости, миграции и цитоскелетной организации. Белки убиквитинового комплекса (*UBC*, *UBA52*) участвуют в деградации и контроле качества белков, что критично для поддержания клеточного гомеостаза. Гены рибосомальных белков (*RPS9*, *RPL11*) и факторов сборки сплайсосомы (*SNU13*, *SNRPG*, *SF3B1*, *SF3B2*) отражают значимость процессов трансляции и посттранскрипционной регуляции. Наконец, *ACTL6A* участвует в ремоделировании хроматина, а *TNFRSF1A* регулирует апоптоз и воспалительные реакции. Совокупность этих генов иллюстрирует, что нарушения в механизмах сигнальной трансдукции, РНК-метаболизма, белкового контроля качества и клеточного гомеостаза могут играть ключевую роль в формировании патологических изменений плаценты, лежащих в основе задержки роста плода.

Далее проведена подробная аннотация общих альтернативно сплайсированных генов в базах данных GeneOntology, KEGG, Reactome, Panther с помощью онлайн-ресурса WebGestalt (<https://www.webgestalt.org/>). В таблице 3.3 приведен перечень взвешенных биологических путей и ассоциированных с генами заболеваний с указанием коэффициента обогащения и $pFDR < 0,05$.

Таблица 3.3 – Результаты функциональной аннотации 3533 общих альтернативно сплайсированных генов, экспрессирующихся в ДК при ФБ, ЗРП и сЗРП

Категория	Описание	Коэффициент обогащения	FDR
Биологические процессы (GeneOntology)			
GO:0016071	Метаболизм мРНК	1,99	<0,001
GO:0071824	Организация комплексов белок-ДНК	1,84	<0,001

Продолжение таблицы 3.3

Категория	Описание	Коэффициент обогащения	FDR
GO:0006325	Организация хроматина	1,87	<0,001
GO:0008380	Сплайсинг РНК	2,06	<0,001
GO:0006338	Ремоделирование хроматина	1,89	<0,001
Молекулярные функции (GeneOntology)			
GO:0003723	Связывание с РНК	1,71	<0,001
GO:0045296	Связывание с кадгеринами	2,23	<0,001
GO:0003729	Связывание с мРНК	2,24	<0,001
GO:0003712	Активность ко-регуляторов транскрипции	1,96	<0,001
GO:0050839	Связывание с молекулами клеточной адгезии	1,77	<0,001
Пути Reactome			
R-HSA-170834	Сигналинг через комплекс рецептора TGF- β	2,75	<0,001
R-HSA-8953854	Метаболизм РНК	1,56	<0,001
R-HSA-72163	Сплайсинг мРНК – основной путь	2,08	<0,001
R-HSA-9012999	Цикл RHO ГТФаз	1,71	<0,001
R-HSA-72172	Сплайсинг мРНК	2,03	<0,001
Пути KEGG			
hsa04120	Убиквитин-зависимый протеолиз	2,53	<0,001
hsa04510	Фокальная адгезия	2,03	<0,001
hsa04140	Аутофагия	2,11	<0,001
hsa04520	Адгезионные контакты	2,41	<0,001

Окончание таблицы 3.3

Категория	Описание	Коэффициент обогащения	FDR
hsa03082	АТФ-зависимое ремоделирование хроматина	2,22	<0,001
Пути Panther			
P00034	Сигнальный путь интегринов	2,01	<0,001
P00047	Сигнальный путь PDGF	1,83	<0,001
P00018	Сигнальный путь рецептора EGF	1,82	<0,001
P04393	Сигнальный путь Ras	2,06	<0,001
P00033	Путь инсулина/IGF – каскад сигнального пути протеинкиназы B	2,50	<0,001

Как видно из результатов функциональной аннотации, выявленные биологические процессы и сигнальные пути, могут быть сгруппированы в пять крупных категорий:

- 1) Процессы, связанные с метаболизмом РНК и сплайсингом (GO:0016071, GO:0008380, GO:0003723, GO:0003729, GO:0003712, R-HSA-8953854, R-HSA-72163, R-HSA-72172);
- 2) Процессы, связанные с хроматином и ДНК (GO:0071824, GO:0006325, GO:0006338, hsa03082);
- 3) Процессы клеточной адгезии и межклеточных взаимодействий (GO:0045296, GO:0050839, hsa04510, hsa04520, P00034);
- 4) Процессы передачи сигнала (R-HSA-170834, R-HSA-9012999, P00034, P00047, P00018, P04393, P00033);
- 5) Процессы деградации белков (hsa04120, hsa04140).

Так как роль альтернативного сплайсинга в патогенезе задержки роста плода подробно рассматривается в рамках настоящего исследования, далее целесообразно сосредоточиться на анализе остальных выделенных функциональных категорий. Модификация хроматина относится к изменениям

в структуре хроматина, комплекса ДНК и белков, из которых состоят хромосомы [198]. Эти модификации могут влиять на экспрессию генов, включая или выключая их в ответ на различные сигналы. Во время беременности изменения хроматина играют важную роль в регуляции экспрессии генов в развивающемся плоде, плаценте и тканях матери. Одним из примеров модификации хроматина во время беременности является метилирование ДНК. Метилирование ДНК включает добавление метильных групп к определенным участкам ДНК, которые могут влиять на экспрессию генов, либо стимулируя, либо подавляя транскрипцию. Известно, что изменения в метилировании материнской ДНК могут привести к гестационному диабету, анемии, преждевременным родам, задержке роста плода и преэклампсии [41].

Клеточная адгезия является немаловажным процессом в таких ключевых этапах беременности, как оплодотворение, имплантация и развитие плаценты [413]. После оплодотворения эмбрион проходит процесс имплантации, в котором участвуют молекулы клеточной адгезии, такие как интегрины и селектины, способствующие прикреплению эмбриона к эпителию матки. После имплантации клетки цитотрофобласта проникают в ткани матери, образуя плаценту [157]. Нарушение регуляции процессов адгезии может способствовать развитию таких состояний, как преэклампсия или задержка роста плода.

Известно, что трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) играет решающую роль в различных аспектах беременности, особенно в регуляции иммунной толерантности, ремоделировании тканей и развитии плода [27, 346]. TGF- β помогает поддерживать иммунную толерантность на границе мать-плод, предотвращая отторжение иммунной системой матери полуаллогенного плода. Он подавляет активность иммунных клеток, таких как Т-клетки и естественные киллеры (NK-клетки), тем самым предотвращая опосредованное иммунитетом отторжение плода. Во время беременности в эндометрии происходят обширные изменения тканей, отвечающие требованиям растущего плода и способствующая развитию плаценты. Передача сигналов TGF- β участвует в

регуляции этого процесса, включая пролиферацию и дифференцировку клеток эндометрия, а также перестройку внеклеточного матрикса [129].

Убиквитинлигазы E3 являются важными компонентами системы убиквитинпротеаз [31, 410]. Недавние исследования показали, важность куллинов – семейство гидрофобных каркасных белков, которые обеспечивают поддержку убиквитинлигаз E3 [325]. Куллин 3 (CUL3) является основным представителем семейства. Иммуногистохимическое окрашивание CUL3 патологических срезов образцов с заболеваниями и нормальных плацентарных тканей на одних и тех же неделях беременности также показало, что низкая экспрессия *CUL3* была связана с низкой миграционной и инвазивной способностью клеток цитотрофобласта [25]. Используя методику нокаута специфичного для плаценты гена, опосредованного лентивирусом, была сконструирована мышьяная модель с плацентарно-специфичным нокаутом экспрессии *CUL3*. При анализе структуры плаценты с нокаутом *CUL3* было обнаружено, что количество гликогеновых клеток цитотрофобласта, которые проникают в децидуальную оболочку матери, значительно уменьшено [162]. Приведенные выше результаты указывают на то, что CUL3 может регулировать инвазию и миграцию клеток цитотрофобласта, поэтому нарушение его экспрессии и регуляции также может привести к возникновению акушерских патологий [418].

В заключение раздела можно еще раз подчеркнуть основные выявленные паттерны альтернативного сплайсинга при изучении физиологической беременности, изолированной и сочетанной задержки роста плода, в отдельности. Всего удалось идентифицировать более 11 тысяч событий, охватывающих свыше 5 тысяч генов, что отражает масштабное вовлечение АС в регуляцию плацентарной функции. Анализ частот различных типов бинарных событий показал различия в динамике включения отдельных форм альтернативного сплайсинга: при патологических состояниях наблюдалось увеличение частоты удержания интрона и снижение частоты альтернативного

первого экзона, что может отражать нарушение точности процессинга РНК и появление нефункциональных белков.

Для каждой из групп был получен собственный спектр специфичных генов и событий, в то время как значительная их часть оказалась общей. Функциональная аннотация показала, что специфичные для каждой группы гены формируют преимущественно различные паттерны ассоциированных биологических процессов. Для группы с физиологической беременностью выявлены гены, связанные с митохондриальным метаболизмом, транспортом и поддержанием клеточной энергетике, что подчеркивает их значение для нормального функционирования плаценты. Для изолированной ЗРП характерно вовлечение генов, регулирующих иммунный ответ, полярность клеток, фагоцитоз и взаимодействие с кадгеринами, а также сигнальные пути, связанные с нарушением когнитивного развития и регуляцией хроматина. В случае сочетанной ЗРП ключевую роль играли процессы синтеза и репарации ДНК, активация NF- κ B, сигнальный путь Notch, а также участие генов, ассоциированных с канцерогенезом, что свидетельствует о нарушении клеточного цикла и механизмов поддержания геномной стабильности.

Сравнительный анализ выявил 935 общих генов между изолированной и сочетанной ЗРП, которые преимущественно связаны с апоптозом, сигнальными путями Fas, Ras/Raf/MAPK, а также с метаболизмом фосфолипидов и процессингом мРНК. Эти процессы можно рассматривать как фундаментальные звенья патогенеза плацентарной дисфункции, приводящей к нарушению роста плода. Более того, наличие более чем трех с половиной тысяч общих альтернативно сплайсированных генов во всех трёх группах предполагает существование базового набора посттранскрипционных событий, которые в норме поддерживают гомеостаз плаценты, но в условиях патологий приобретают иное функциональное значение.

3.3 Анализ дифференциального сплайсинга в группах пациенток с физиологической беременностью и задержкой роста плода

Для решения данной задачи проведен анализ дифференциального сплайсинга (ДС) между группами женщин с ФБ и ЗРП, ФБ и сЗРП, а также ЗРП и сЗРП, при $\Delta PSI > 0,200$ (относительное изменение процентного индекса сплайсинга между группами) и $p < 0,05$.

3.3.1 Физиологическая беременность и изолированная задержка роста плода

При сравнении ДС между физиологической беременностью и изолированной задержкой роста плода идентифицировано 32 дифференциально сплайсированных гена (ДСГ) и 60 событий АС, которые были поделены на 4 категории, из которых наибольший удельный вес приходится на бинарные аннотированные события (42,4%), стоит отметить, что среди бинарных событий наиболее часто встречающимся является пропуск экзона (26,7%), событие взаимоисключающих экзонов отсутствует. Таблица с названиями генов, ID и типом событий, а также указанием бинарности/комплексности и наличия аннотации представлена в приложении А.

Результаты анализа функциональной аннотации этих 32 генов продемонстрировали, что они ассоциированы с такими биологическими процессами, как регуляция метаболизма РНК (GO:1903311, $p=0,015$), клеточный цикл (GO:0044772, $p=0,036$; hsa04110, $p=0,019$), клеточный гомеостаз и дифференцировка мышечных клеток (GO:0046716, $p=0,043$; GO:0042692, $p=0,03$), регуляция транспортной активности (GO:0032409, $p=0,005$; GO:0034762, $p=0,038$; GO:0043269, $p=0,039$), связывание РНК (GO:0003725, $p=0,0004$; GO:0003727, $p=0,0006$), протеолиз, опосредованный убиквитином (GO:0019783, $p=0,027$; hsa04120, $p=0,016$), трансэндотелиальная миграция лейкоцитов (hsa04670, $p=0,011$), сигнальный путь PI3K-Akt (R-HSA-1257604, $p=0,009$), сигнальный путь Wnt (P00057, $p=0,046$).

Сигнальные пути представляют наибольший интерес для изучения, так как именно они лежат в основе координации и регуляции практически всех жизненно важных процессов в клетке. Эти молекулярные маршруты позволяют клетке воспринимать сигналы внешней среды, интерпретировать их и запускать точные ответы – от деления и дифференцировки до выживания и апоптоза. Нарушения в сигнальных путях часто становятся пусковыми механизмами для развития различных заболеваний.

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR (РАМ) представляет собой высококонсервативную сеть передачи сигналов в эукариотических клетках [168, 236]. Двумя основными функциональными белками в этом пути являются PI3K и АКТ [363]. После полной активации Akt диссоциирует от мембраны и транслоцируется в цитоплазму и ядро, где регулирует широкий спектр клеточных процессов: пролиферацию, метаболизм, выживание клеток и ангиогенез через воздействие на различные мишени [377].

Известно, что аберрантная экспрессия или мутация многих компонентов РАМ-пути связаны с онкогенезом у человека [128, 160]. Кроме того, гиперактивность РАМ-пути также способствует эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) [100]. ЭМП – это процесс, при котором эпителиальные клетки постепенно теряют свой эпителиальный фенотип и трансформируются в мезенхимальные клетки. ЭМП можно наблюдать в таких жизненных процессах, как эмбриогенез, регенерация, прогрессирование рака и метастазирование [250, 270]. Во время формирования плаценты у человека клетки трофобласта теряют свой эпителиальный фенотип и трансформируются в интерстициальный с инвазивными характеристиками. На ранних сроках беременности, в случае нарушения процесса ЭМП цитотрофобласта, происходит недостаточная инвазия и неполное ремоделирование спиральных артерий, что может привести к развитию преэклампсии, а также задержке роста плода, преждевременным родам и спонтанному аборту [231]. Путь PI3K-Akt участвует в регуляции таких процессов, как восприимчивость эндометрия и прикрепление эмбриона к стенке матки [111].

Стоит отметить, что одним из важных аспектов активации РАМ-пути является взаимодействие с факторами роста, такими как эпидермальный фактор роста (EGF) и фибробластный фактор роста (FGF). EGF и FGF взаимодействуют с рецепторами тирозинкиназного типа (EGFR и FGFR), которые являются трансмембранными белками с тирозинкиназной активностью [151]. EGFR играет важную роль в развитии и выживании плаценты [86]. Нуллизиготные по EGFR мыши имеют дефекты плаценты, которые могут привести к летальному исходу для эмбриона [343]. Аберрантная передача сигналов EGFR или экспрессия лигандов были связаны с задержкой роста плода [113, 118], трофобластической болезнью [40] и преэклампсией [34, 113]. Учитывая высокую экспрессию EGFR в плаценте, возможно, что нарушение регуляции этого пути может лежать в основе патогенеза больших акушерских синдромов. Факторы роста фибробластов играют важную роль в регуляции процесса имплантации плаценты, включая дифференцировку клеток цитотрофобласта, выработку гормонов [298] и миграцию [409]. Кроме того, активированные сигнальные пути FGF2 участвуют в регуляции пролиферации эндотелиальных клеток плацентарных артерий человека и ангиогенеза [115, 242]. Исследования на животных и людях показали, что FGFR2 экспрессируется на мембране трофобласта [203, 291]. Кроме того, подавленная экспрессия FGFR2 приводит к задержке роста трофобласта [32], поэтому в перспективе стоит более внимательно изучить связь этого рецептора с развитием плаценты и плода.

Сигнальный путь Wnt/ β -катенина необходим для эмбрионального развития и восстановления гомеостаза тканей взрослого организма [87, 136, 228, 297]. На сегодняшний день факторы, управляющие активацией бластоцист, остаются малоизученными; однако недавние исследования показали, что сигнальный путь Wnt/ β -катенина может влиять на бластоцисты и быть одной из основных причин неглубокой инвазии трофобласта и нарушения ремоделирования спиральных артерий, что является одним из наиболее

существенных и критических патологических изменений, возникающих при ПЭ и сопровождающихся рядом осложнений [422].

Также интересным представлялся путь трансэндотелиальной миграции лейкоцитов, так как в 2005 году вышла интересная статья, с названием «Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players?» [103]. Авторы статьи проводят параллели между двумя на первый взгляд различными процессами – имплантацией эмбриона в эндометрий и трансэндотелиальной миграцией лейкоцитов. Они выявляют сходство на молекулярном и клеточном уровнях между этапами этих процессов: аппозиция/роллинг, адгезия и поляризация, а также инвазия/диапедез. Сравнение, проведенное в статье, демонстрирует, что воспалительные и репродуктивные процессы опираются на общий молекулярный «язык» взаимодействия клеток с окружающей средой. Это свидетельствует о высокой степени эволюционной консервативности сигнальных путей, опосредующих клеточную миграцию, адгезию и инвазию. Имплантация эмбриона является не просто пассивным процессом, а активным взаимодействием между бластоцистой и эндометрием, аналогичным иммунному ответу. Понимание общих молекулярных механизмов, лежащих в основе клеточной адгезии и инвазии, может способствовать более глубокому раскрытию патогенеза заболеваний, относящихся к группе больших акушерских синдромов.

Далее проведено сравнение идентифицированных нами ДСГ с литературными данными. Три гена (*ACTN4*, *CYBB*, *POLB*) оказались общими между данной работой и исследованием Ruano и коллег [315]. Ген *ACTN4* кодирует немышечную изоформу альфа-актинина, которая концентрируется в цитоплазме и, как полагают, участвует в процессах метастазирования; мутации в этом гене были связаны с фокальным и сегментарным гломерулосклерозом [93, 362]. Ген *CYBB* кодирует бета-цепь цитохрома В-245, который был предложен в качестве основного компонента бактерицидной оксидазной системы фагоцитов [361]. Дефицит *CYBB* является одним из пяти описанных

биохимических дефектов, связанных с хронической гранулематозной болезнью [397], при этом заболевании наблюдается снижение активности НАДФН-оксидазы фагоцитов. Белок, кодируемый геном *POLB*, является ДНК-полимеразой, участвующей в репарации; обычно он находится в цитоплазме, но при повреждении ДНК перемещается в ядро [178].

Далее выбраны гены с наибольшими показателями индекса сплайсинга для всех 4 групп. Для генов с бинарными событиями критерием является максимальное изменение индекса сплайсинга между группами (ΔPSI), для генов с комплексными событиями критерием является «сложность» события, которая рассчитывается из количества бинарных событий на одно сложное. В итоге выявлены следующие наиболее дифференциально сплайсированные гены для каждой категории:

- 1) Ген с бинарными событиями, аннотированными – *IMMP2L* ($\Delta PSI = 0,522$ (ALE – альтернативный последний экзон)) – Рисунок 3.12.А;
- 2) Ген с комплексными событиями, аннотированными – *STAU2* (4 комплекса и 12 событий) – Рисунок 3.12.Б;
- 3) Ген с бинарными событиями, *de novo* – *ENSG00000290591* ($\Delta PSI = 0,424$ (IR – удержание интрона)) – Рисунок 3.13.А;
- 4) Ген с комплексными событиями, *de novo* – *SDHAP1* (5 комплексов и 10 событий) – Рисунок 3.13.Б.

Ген *IMMP2L* кодирует субъединицу 2 пептидазы внутренней митохондриальной мембраны [130]. Этот белок является частью митохондриальной пептидазы IMMP (Inner Membrane Mitochondrial Peptidase Complex), которая играет ключевую роль в созревании определенных белков, регулирующих метаболизм и энергетический обмен клетки. Нарушения в работе *IMMP2L* могут приводить к дисфункции митохондрий, что связано с рядом неврологических расстройств, включая синдром Туретта и аутизм [289].

Ген *STAU2* кодирует белок Staufen-2, который необходим для зависимого от микротрубочек переноса нейрональной РНК из тела клетки в дендриты, что особенно важно для работы нейронов, поскольку позволяет им локализовать

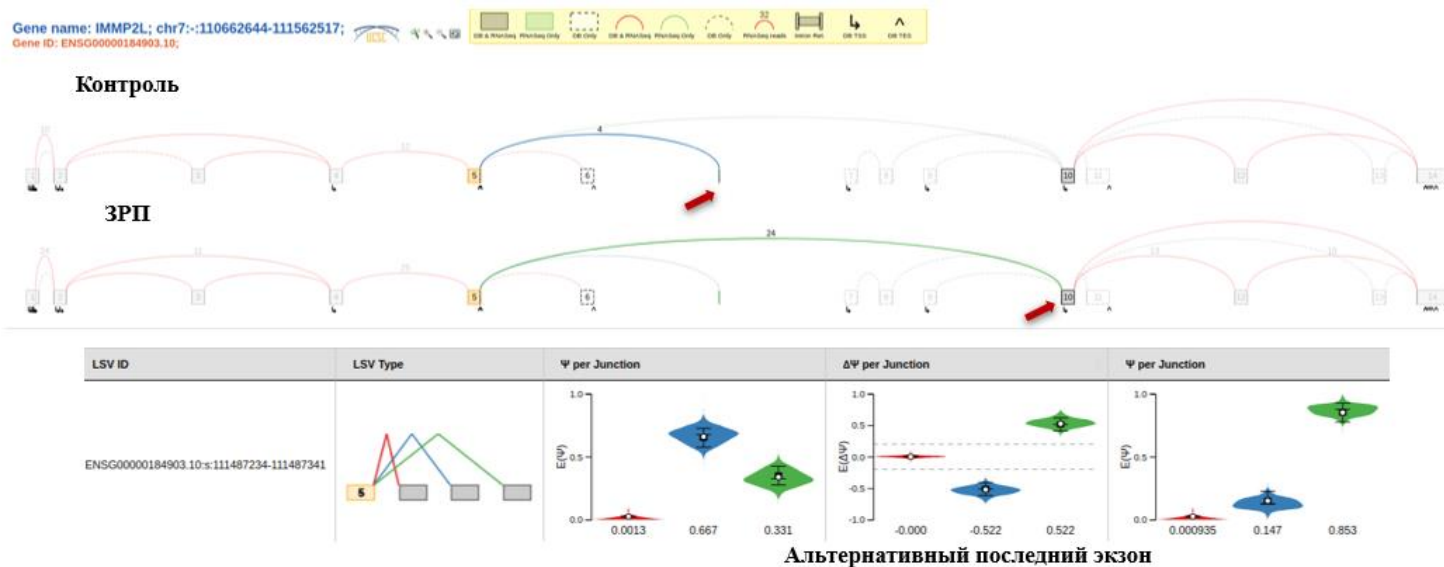
специфические белки в синапсах, что критично для нейропластичности и когнитивных функций [149]. Дефекты в *STAU2* связаны с нарушениями памяти и обучения, а также могут играть роль в развитии неврологических расстройств, таких как болезнь Альцгеймера [285].

Ген *SDHAP1* является псевдогеном, связанным с геном *SDHA*, который кодирует одну из субъединиц сукцинатдегидрогеназы (SDH) – фермента, участвующего в дыхательной цепи митохондрий и цикле Кребса. Псевдогены представляют собой нефункциональные копии генов, возникшие в результате дупликации или мутаций, которые лишили их способности кодировать полноценный белок.

Несмотря на это, некоторые псевдогены могут играть регуляторные роли, например, участвовать в механизмах регуляции экспрессии генов-предшественников или действовать как «ловушки» для микроРНК, тем самым влияя на транскрипционные процессы. В некоторых исследованиях продемонстрировано влияние гена *SDHAP1* на рак легких и рак яичников [147, 423]. Интересным представляется тот факт, что сам ген *SDHA* является высокостабильным геном домашнего хозяйства в плаценте [248].

Таким образом, ген *IMMP2L* отвечает за процессинг белков в митохондриях и связан с неврологическими заболеваниями, ген *STAU2* регулирует транспорт и стабильность мРНК, играя роль в работе нейронов, а ген *SDHAP1*, хотя и является псевдогеном, может оказывать влияние на энергетический метаболизм и онкогенез.

А



Б

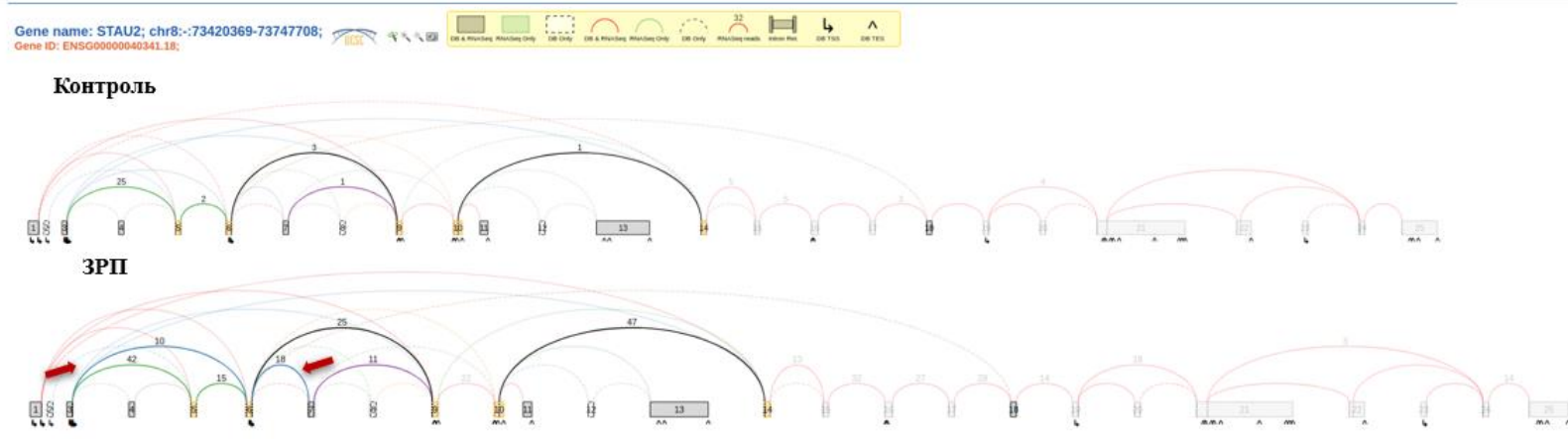
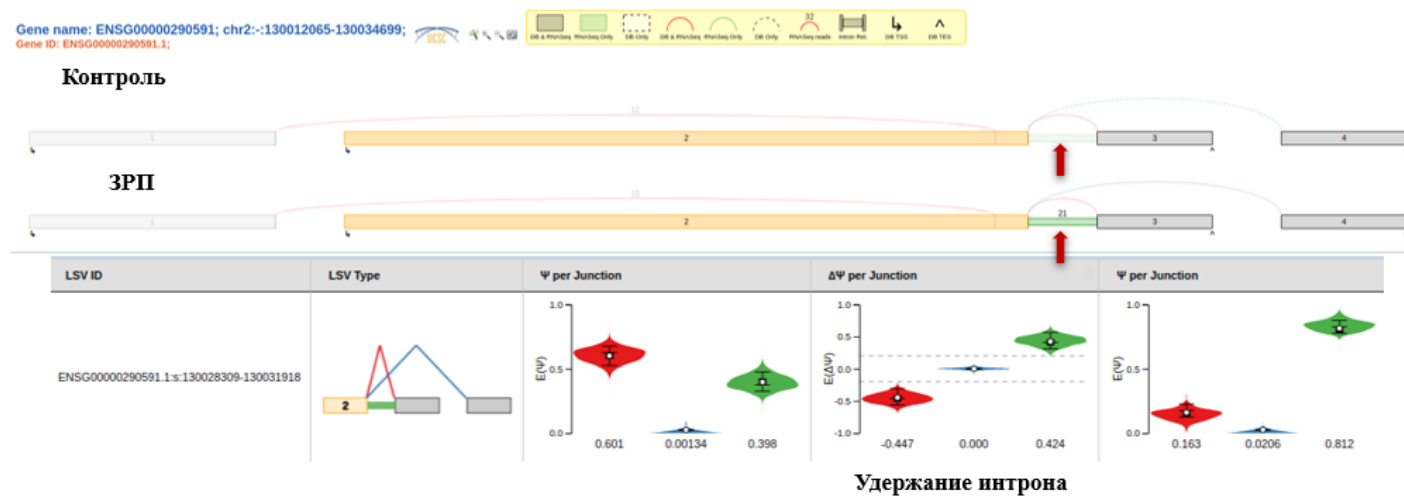


Рисунок 3.12 – Интрон-экзонная структура генов *IMMP2L* и *STAU2* с выделенными значимыми событиями альтернативного сплайсинга и скрипичными диаграммами распределения ΔPSI в контрольной группе и группе с задержкой роста плода

А



Б

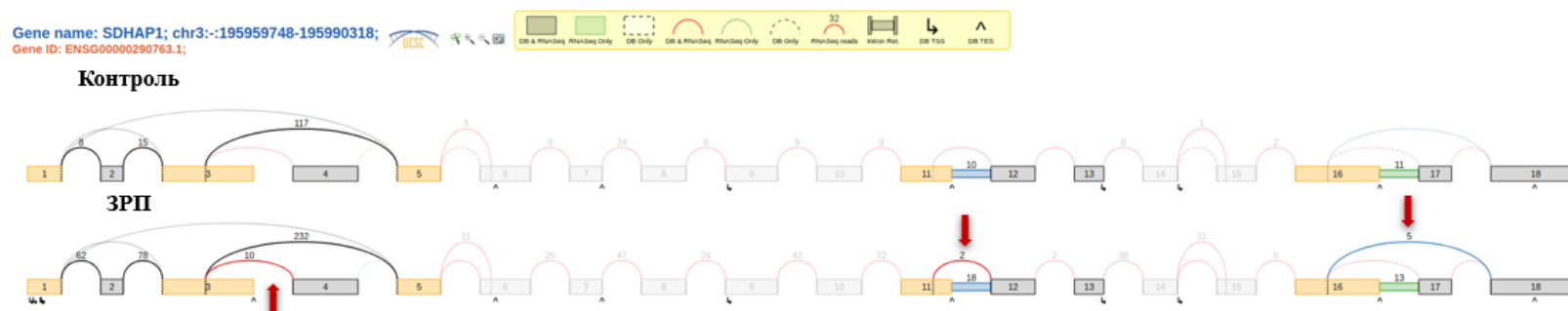


Рисунок 3.13 – Интрон-экзонная структура генов *ENSG00000290591* и *SDHAP1* с выделенными значимыми событиями альтернативного сплайсинга и скрипичными диаграммами распределения $\Delta\Psi I$ в контрольной группе и группе с изолированной задержкой роста плода

3.3.2 Физиологическая беременность и сочетанная задержка роста плода

При сравнении ДС между физиологической беременностью и сочетанной задержкой роста плода идентифицированы 33 дифференциально сплайсированных гена и 66 событий АС, которые были поделены на 4 категории, из которых больше половины приходится на комплексные аннотированные события (54,5%). Стоит отметить, что среди бинарных событий наиболее часто встречающимися являются пропуск экзона (50%), а также полное отсутствие таких типов событий как альтернативный 5' и 3' сайты сплайсинга, а также взаимоисключающие экзоны. Таблица с названиями генов, ID и типом событий, а также указанием бинарности/комплексности и наличия аннотации представлена в приложении Б.

Результаты анализа функциональной аннотации этих 33 генов продемонстрировали, что они ассоциированы с такими биологическими путями, как передача сигнала, опосредованная малой ГТФазой (GO:0007264, $p=0,0003$), регуляция активности ГТФаз (GO:0043087, $p=0,048$), активность нуклеотидилтрансферазы (GO:0016779, $p=0,038$; GO:0060589, $p=0,0006$), организация цитоскелета (GO:0031023, $p=0,036$; GO:0005200, $p=0,024$), протеолиз, опосредованный убиквитином (GO:0000209, $p=0,002$; hsa04120, $pFDR=0,016$), различные виды репарации ДНК (GO:0006289, $p=0,011$; hsa03420, $pFDR=0,018$; hsa03410, $p=0,002$; hsa03430, $p=0,034$; R-HSA-5696398, $p=0,0007$), клеточный гомеостаз мышечных клеток (GO:0046716, $p=0,047$), вирусный канцерогенез (hsa05203, $p=0,003$).

Учитывая, что роль механизмов репарации ДНК подробно освещена выше, следующим аспектом рассмотрим процесс протеолиза, опосредованный убиквитином. Он представляет собой ключевой клеточный механизм деградации белков, регулирующий множество процессов, включая контроль клеточного цикла, апоптоз, иммунный ответ и стрессовую адаптацию [150]. Этот путь обеспечивает селективное разрушение поврежденных, неправильно свернутых или больше не нужных белков посредством убиквитин-

протеасомной системы (УПС), предотвращая их накопление и обеспечивая динамическое обновление протеома клетки. Эта система играет центральную роль в тонкой настройке функций основных проангиогенных белков, включая VEGF, VEGFR-2, ангиогенных сигнальных белков, включая PI3-киназный/АКТ-пути, и других ангиогенных путей, не связанных с VEGF. Контроль УПС осуществляется через деубиквитинирующие ферменты, которые снимают убиквитин с белков, регулируя их стабильность [350].

Также немаловажным для формирования плаценты представляются процессы организации цитоскелета. Это динамическая система белковых филаментов, которая обеспечивает структуру, механическую поддержку и внутриклеточный транспорт в клетке [117]. Основные компоненты цитоскелета включают актиновые филаменты, микротрубочки и промежуточные филаменты. Каждый из этих компонентов играет уникальную роль в клеточной активности, но вместе они работают как единая система, регулируя процессы клеточного деления, дифференцировки, миграции и ответа на механические стимулы. В плаценте цитоскелет играет решающую роль в инвазии цитотрофобласта, васкуляризации и адаптации к механическим нагрузкам, что необходимо для нормального развития плода [187]. Актиновый цитоскелет формирует ламеллоподии и филоподии – клеточные отростки, которые помогают трофобласту продвигаться в ткани эндометрия. Помимо этого, актиновые и промежуточные филаменты участвуют в слиянии клеток, образуя многоядерный синцитиотрофобласт. Белки кортина, кортактин и миозин II регулируют реорганизацию цитоскелета во время слияния клеточных мембран [189]. Нарушение работы актинового цитоскелета, микротрубочек или промежуточных филаментов может приводить к патологиям беременности, включая преэклампсию и задержку роста плода [307].

Особое внимание заслуживает вирусный канцерогенез, поскольку именно вирусные инфекции способны запускать длительные изменения в экспрессии и сплайсинге генов, создавая предпосылки для опухолевой трансформации. Вирусный канцерогенез – это процесс, при котором вирусные инфекции

способствуют злокачественному преобразованию клеток [69]. Плацента выполняет барьерную функцию, предотвращая передачу патогенов от матери к плоду [99]. Однако некоторые вирусы способны обходить этот барьер. Вирусное инфицирование плаценты может привести к злокачественной трансформации клеток [193]. Онковирусы активируют протоонкогенные пути, такие как PI3K/Akt/mTOR, Wnt/ β -катенин и MAPK/ERK, что усиливает пролиферацию и подавляет апоптоз. В плаценте это может приводить к гиперплазии трофобласта и предраковым изменениям. Также вирусные инфекции вызывают длительное воспаление, повышая уровень цитокинов (IL-6, TNF- α), активируя NF- κ B и STAT3. Если воспаление становится хроническим, это приводит к нарушению её функций, повышенному риску осложнений беременности и развитию патологий у плода [50].

Также проведено сравнение идентифицированных нами ДСГ с литературными данными. Два гена (*PTPN12*, *SMPDL3A*) оказались общими между данной работой и исследованием Ruano и коллег [315]. Ген *PTPN12* кодирует белок тирозин-фосфатазу нерецепторного типа 12, которая участвует в регуляции фосфорилирования тирозиновых остатков белков [213]. Ген *SMPDL3A* кодирует белок сфингомиелиназу-подобную фосфодиэстеразу 3A, которая участвует в метаболизме липидов и мембранных фосфолипидов, регулируя структуру клеточной мембраны и сигнальные процессы [135]. Кроме того, идентифицирован общий ген *PPP1R12A* с экспериментальным исследованием, проведенным с помощью ПЦР в реальном времени, где сообщалось о роли транскриптов данного гена при осложненной беременности и выявлена роль одной из изоформ в тенденции к сокращению и сужению сосудов [119].

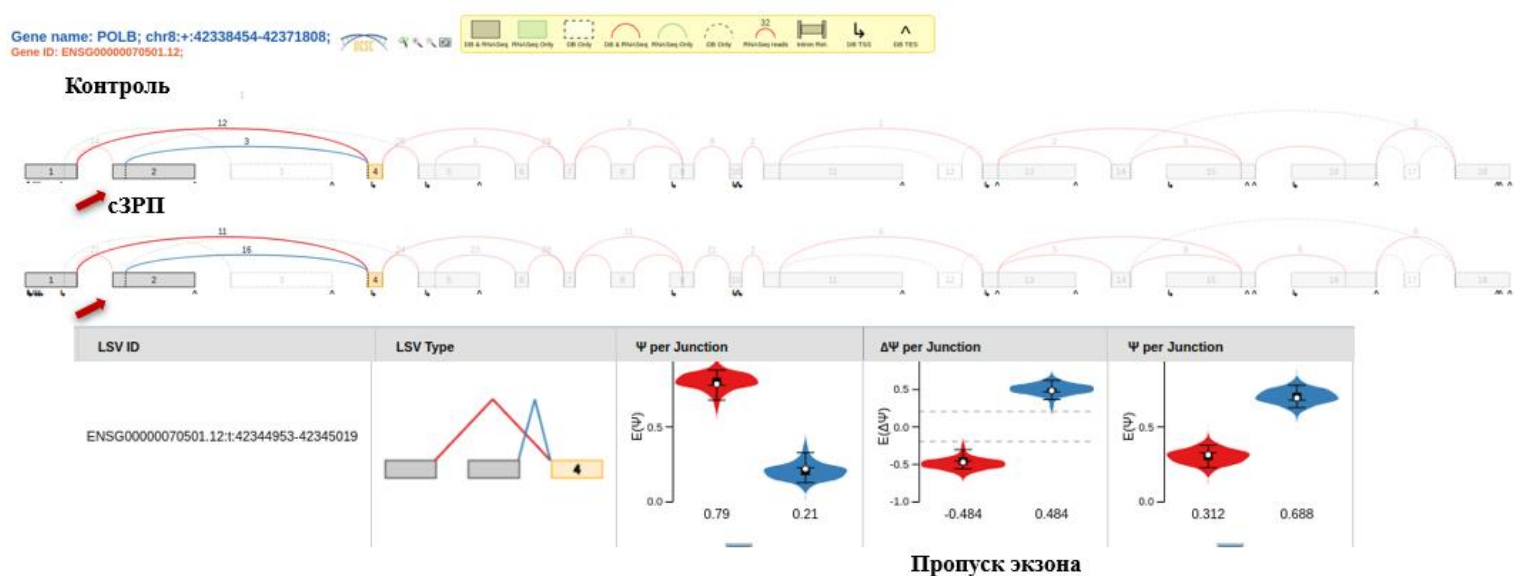
Далее выбраны гены с наибольшими показателями индекса сплайсинга для всех 4 групп. Для генов с бинарными событиями критерием является максимальное изменение индекса сплайсинга между группами (Δ PSI), для генов с комплексными событиями критерием является «сложность» события, которая рассчитывается из количества бинарных событий на одно сложное. В

итоге идентифицированы следующие наиболее дифференциально сплайсированные гены для каждой категории:

- 1) Ген с бинарными событиями, аннотированными – *POLB* ($\Delta PSI = 0,484$ (ES – пропуск экзона)) – Рисунок 3.14.А;
- 2) Ген с комплексными событиями, аннотированными – *ZC3H14* (3 комплекса и 21 событие) – Рисунок 3.14.Б;
- 3) Ген с бинарными событиями, *de novo* – *ENSG00000290591* ($\Delta PSI = 0,425$ (IR – удержание интрона)) – Рисунок 3.15.А;
- 4) Ген с комплексными событиями, *de novo* – *TMEM139* (2 комплекса и 5 событий) – Рисунок 3.15.Б.

Ген *POLB* кодирует ДНК-полимеразу β , которая играет важную роль в механизмах репарации ДНК [44]. Она участвует в процессе базовой эксцизионной репарации, устраняя повреждения, вызванные окислительным стрессом, алкилированием и радиацией [178]. В основном, мутации *POLB* ассоциированы с канцерогенезом из-за снижения эффективности ДНК-репарации [105], также дефицит *POLB* может привести к неврологическим нарушениям [358]. Ген *ZC3H14* кодирует РНК-связывающий белок, содержащий цинковые пальцы типа CCCH, который участвует в посттранскрипционной регуляции [180]. Он регулирует созревание и стабильность мРНК, процессинг РНК и альтернативный сплайсинг. Связан с развитием нейронов, участвуя в экспрессии генов в ЦНС [279]. Ген *TMEM139* кодирует трансмембранный белок, который участвует в транспорте веществ через клеточные мембраны, эндоцитозе и экзоцитозе. Важен для поддержания ионного баланса в клетках, особенно в почках [274]. Гены *POLB*, *ZC3H14* и *TMEM139* выполняют ключевые функции в клетке. *POLB* отвечает за репарацию ДНК, *ZC3H14* регулирует РНК, а *TMEM139* связан с мембранным транспортом. Их работа влияет на поддержание геномной стабильности, процессы транскрипции и транспорт веществ через мембранные структуры. Нарушения могут приводить к различным патологиям, включая рак, неврологические расстройства и метаболические заболевания.

А

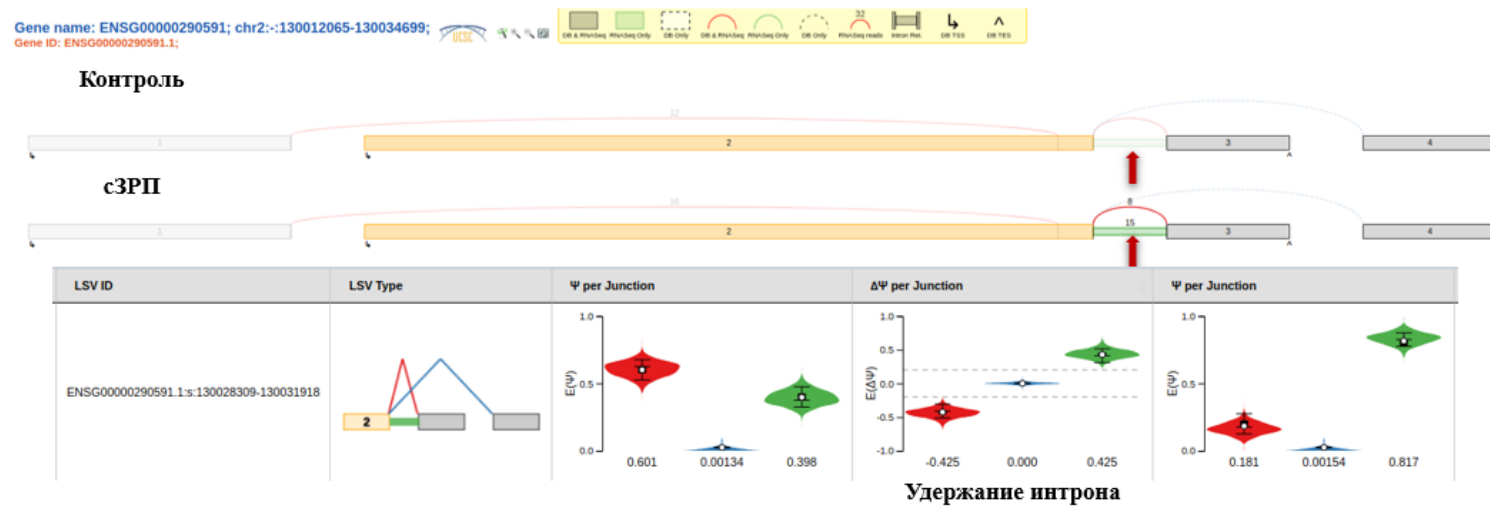


Б



Рисунок 3.14 – Интрон-экзонная структура генов *POLB* и *ZC3H14* с выделенными значимыми событиями альтернативного сплайсинга и скрипичными диаграммами распределения $\Delta\Psi$ в контрольной группе и группе с сочетанной задержкой роста плода

А



Б

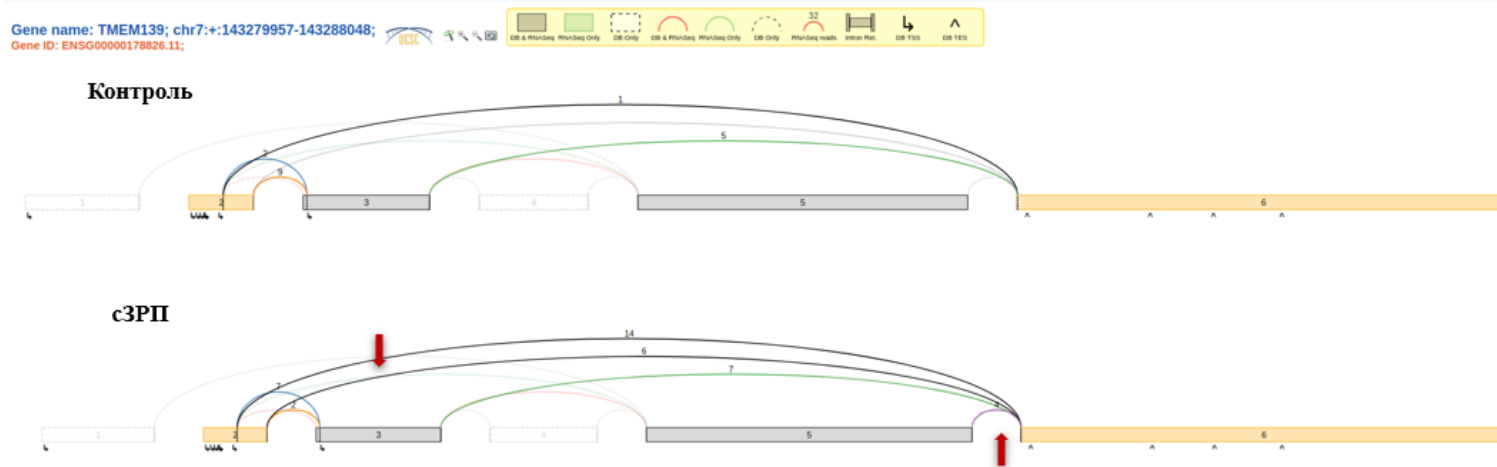


Рисунок 3.15 – Интрон-экзонная структура генов *ENSG00000290591* и *TMEM139* с выделенными значимыми событиями альтернативного сплайсинга и скрипичными диаграммами распределения $\Delta\Psi$ в контрольной группе и группе с сочетанной задержкой роста плода

3.3.3 Изолированная и сочетанная задержка роста плода

При сравнении ДС между изолированной и сочетанной задержкой роста плода идентифицированы 19 дифференциально сплайсированных генов и 30 событий АС, которые были поделены на 4 категории, из которых наибольший удельный вес приходится на комплексные аннотированные события (43,3%), при полном отсутствии бинарных *de novo* событий. Стоит отметить, что среди бинарных событий наиболее часто встречающимся является альтернативный первый экзон (50%), в то время как вообще не встречаются удержание интрона, взаимоисключающие экзоны и альтернативный последний экзон. Таблица с названиями генов, ID и типом событий, а также указанием бинарности/комплексности и наличия аннотации представлена в приложении В.

Результаты анализа функциональной аннотации этих 19 генов продемонстрировали, что они ассоциированы с такими биологическими путями, как регуляция воспалительной реакции (GO:0050727, $p=0,0002$; GO:0002764, $p=0,0007$; GO:0002532, $p=0,003$; GO:0032606, $p=0,0001$), регуляция реакции на цитокиновый стимул (GO:0060759, $p=0,0004$; GO:0001819, $p=0,0006$), запрограммированная некротическая гибель клеток (GO:0097300, $p=0,0009$), различные виды пептидазной активности (GO:0019783, $p=0,007$; GO:0008234, $p=0,014$), система врожденного иммунитета TLR и RLR (hsa04622, $p=0,001$; hsa04620, $p=0,002$; P00054, $p=0,003$).

Особый интерес представляют биологические пути, связанные с воспалительной реакцией, врожденным иммунным ответом, а также некротической гибелью клеток, так как они в совокупности могут привести к развитию сочетанной формы задержки роста плода с манифестацией преэклампсии и преждевременных родов.

Поскольку плацента является первым формирующимся органом, который отвечает за кровообращение матери и плода, то большинство заболеваний во время беременности вызываются плацентой, влияют на неё или отражаются на

ней. Воспалительные процессы в плаценте составляют основную диагностическую категорию при патологии плаценты [131]. Воспаление плаценты в целом можно разделить на острое и хроническое, при этом возможно и их одновременное существование в одной плаценте [182, 278].

Острое нейтрофильное воспаление (главным образом, острый хориоамнионит) является наиболее распространенным поражением плаценты и в подавляющем большинстве случаев вызвано бактериальной инвазией половых органов матери. Нейтрофилы являются основным типом клеток, участвующих в остром воспалении плаценты [417]. Гуморальные компоненты острого хориоамнионита хорошо изучены [181]: в крови повышены уровни IL-1, IL2R, IL-6, IL-8, TNF- α , MIP-1 β , RANTES и I-TAC [322].

Хроническое воспаление может быть инфекционной или неинфекционной этиологии и поражать все анатомические единицы плаценты, включая мембраны (хронический хориоамнионит), ворсинки хориона (хронический виллит), межворсинчатое пространство (хронический интервиллозит) и базальную пластинку (хронический децидуит) [89, 182]. Хронический виллит связан с повышением уровня хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 в плазме крови матери и плода [186]. Хронический виллит также связан с отложением компонента комплемента C4d на поверхности ворсин или эндотелии сосудов плода, что указывает на потенциальную роль процессов, опосредованных комплементом [316].

Соответственно, иммунная система играет важную роль в формировании и функционировании плаценты, обеспечивая защиту от патогенов и регулируя взаимодействие между материнским организмом и плодом. При этом воспалительные реакции, активируемые через сигнальные пути врожденного иммунитета Toll-подобных рецепторов (TLR) и RIG-I-подобных рецепторов (RLR), контролируют продукцию цитокинов, которые определяют исход беременности [254].

TLR – это семейство мембранных рецепторов врожденного иммунитета, распознающих патогенные молекулы (PAMP – паттерны, ассоциированные с

патогенами) и продукты поврежденных клеток (DAMP – паттерны, ассоциированные с повреждением) [374]. В плаценте TLR экспрессируются в децидуальных клетках и иммунных клетках, участвуя в поддержании иммунного гомеостаза [158]. Гиперактивация приводит к хроническому воспалению, повреждению сосудов и повышенному уровню фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). Инфицирование может стимулировать TLR4, что активирует NF- κ B и вызывает преждевременные роды. RLR – это семейство цитоплазматических рецепторов врожденного иммунитета, распознающих вирусные РНК и активирующих противовирусный иммунитет через продукцию интерферонов 1-го типа (IFN-I, IFN- α/β) и провоспалительных цитокинов [229]. При вирусных инфекциях RLR активируют защитные механизмы в децидуальных клетках и цитотрофобласте, но чрезмерное воспаление может повредить плацентарные сосуды и вызвать гипоксию плода [271]. Адекватная регуляция воспаления необходима во время беременности для предотвращения развития тяжелых патологических состояний [192, 306].

Термин «некроз» традиционно обозначает пассивную форму клеточной смерти, возникающую в ответ на тяжелое повреждение клетки – гипоксию, инфекцию, токсическое воздействие или оксидативный стресс [133]. Однако в настоящее время некроз рассматривается не только как случайный процесс, но и как часть программируемых путей [299]. Молекулярно некроз сопровождается развитием вторичного воспаления, так как высвобождение DAMP-молекул вызывает активацию врожденного иммунного ответа и активацией сигнальных путей NF- κ B, MAPK, JNK [174]. В плаценте некротическая гибель клеток может наблюдаться как в физиологических пределах – например, в третьем триместре, когда усиливаются процессы обновления ворсинок, так и в условиях патологии, где она приобретает массовый и разрушительный характер, вызывая дисфункцию плаценты и приводя к развитию акушерских заболеваний [78].

Таким образом, разница между изолированной и сочетанной ЗРП может определяться адекватностью ангиогенеза и балансом между

провоспалительными и противовоспалительными факторами, которые, как раз, могут играть важную роль в патогенезе преэклампсии и преждевременных родов.

Проведено сравнение идентифицированных нами ДСГ при сравнении ЗРП и сЗРП с литературными данными – общих генов выявлено не было. Далее выбраны гены с наибольшими показателями индекса сплайсинга для всех 4 групп. Для генов с бинарными событиями критерием является максимальное изменение индекса сплайсинга между группами (ΔPSI), для генов с комплексными событиями критерием является «сложность» события, которая рассчитывается из количества бинарных событий на одно сложное. Группа с бинарными *de novo* событиями в данном сравнении отсутствует. В итоге найдены следующие наиболее дифференциально сплайсированные гены для каждой категории:

- 1) Ген с бинарными событиями, аннотированными – *ENSG00000291117* ($\Delta PSI = 0,460$ (ES – пропуск экзона)) – Рисунок 3.16.А;
- 2) Ген с комплексными событиями, аннотированными – *FER1L4* (3 комплекса и 6 событий) – Рисунок 3.16.Б;
- 3) Ген с комплексными событиями, *de novo* – *SDHAP1* (5 комплексов и 13 событий) – Рисунок 3.16.В.

Ген *FER1L4* – некодирующая РНК, обладающая проостеогенными функциями, а также являющаяся одним из ключевых факторов онкогенеза, влияя на пролиферацию опухоли, инвазию, миграцию и апоптоз [260]. Ген *SDHAP1* является псевдогеном, связанным с геном *SDHA*, который кодирует одну из субъединиц сукцинатдегидрогеназы – фермента, участвующего в дыхательной цепи митохондрий и цикле Кребса. В некоторых исследованиях продемонстрирована влияние этого гена на рак легких и рак яичников [147, 423].

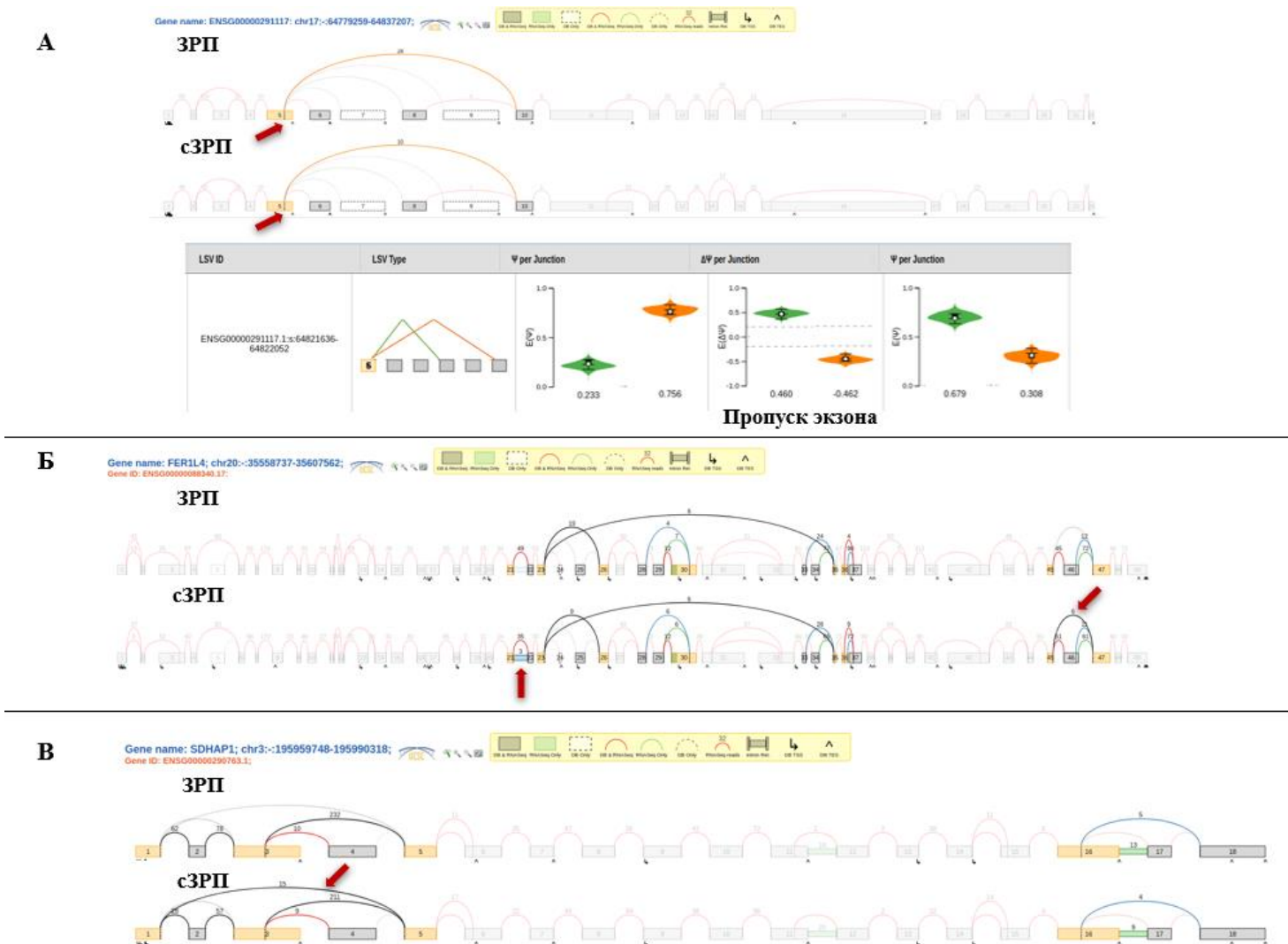


Рисунок 3.16 – Интрон-экзонная структура генов *ENSG00000291117*, *FER1L4* и *SDHAP1* с выделенными значимыми событиями альтернативного сплайсинга в группах с изолированной и сочетанной задержкой роста плода

При сопоставлении результатов попарных сравнений оказалось, что число общих генов между группами относительно невелико, тогда как преобладают специфичные для каждой группы гены и ассоциированные с ними биологические пути (Рисунок 3.17). Это свидетельствует о том, что патогенез изолированной и сочетанной задержки роста плода имеет как точки пересечения, так и существенные различия на молекулярном уровне. Интересно отметить, что при изменении состава генов, вошедших в анализ, часть биологических процессов изменилась по своей статистической значимости. Так, например, путь передачи сигнала, опосредованной малой ГТФазой, который при анализе 33 генов при сравнении ФБ-сЗРП не достигал порога значимости по FDR, при повторной оценке на меньшем числе – 20 генах – стал значимым ($pFDR=0,020$). Аналогичные изменения произошли и в группе сравнения изолированной и сочетанной ЗРП между собой. Так, пути регуляции воспалительной реакции, регуляции реакции на цитокиновый стимул и продукция интерферонов I типа достигли значения $pFDR=0,030$ каждый. В то же время другие процессы, ранее выделявшиеся отдельно, оказались в зоне пересечения с более общими путями. Это наблюдение подчёркивает высокую чувствительность функциональной аннотации к составу входных генов и указывает на сложность и многослойность молекулярных механизмов, вовлечённых в патогенез задержки роста плода.



Рисунок 3.17 – Диаграмма Венна, демонстрирующая общность и специфичность дифференциально сплайсированных генов при попарных сравнениях, описанных ранее; красным выделены FDR-значимые биологические процессы

На основании этих данных можно предположить следующую модель: исходным звеном выступают гены, общие для сравнений «физиологическая беременность – изолированная ЗРП» и «физиологическая беременность – сочетанная ЗРП», которые отражают базовые нарушения в развитии фетоплацентарного комплекса. Далее патогенез дифференцируется: формируются специфические для ЗРП и сЗРП механизмы, а объединяющим звеном остаются гены, общие для сравнения «ЗРП-сЗРП», что подчеркивает наличие перекрывающихся, но различно реализованных молекулярных процессов в этих формах патологии (Рисунок 3.18).

В основе общего патогенеза задержки роста плода лежат нарушения в базовых процессах регуляции плацентарных функций. Эпигенетические и репаративные механизмы, посттранскрипционный контроль мРНК и белков, а также регуляция цитоскелета и механо-сигналинга формируют общий пусковой контур патологии. Их дисфункция приводит к поверхностной инвазии цитотрофобласта и снижению ремоделирования спиральных артерий миометрия, что приводит к нарушению функций плаценты. При изолированной ЗРП доминируют процессы, связанные с нарушением морфогенеза ворсин, транспорта питательных веществ и формированием органов. В сочетанной форме ЗРП, напротив, ключевую роль играют воспалительные и иммунные механизмы. Такой сценарий ведёт к преэклампсии и преждевременным родам, что отличает сочетанную задержку роста плода от изолированной формы.



Рисунок 3.18 – Один из возможных вариантов патогенеза на примере 10 общих генов, полученных при сравнении ФБ-ЗРП и ФБ-сЗРП, с последующей дивергенцией на 15 генов при сравнении ЗРП-сЗРП

3.3.4 Валидация полученных результатов

Для подтверждения результатов, полученных методом РНК-секвенирования, была проведена валидация методом ПЦР в реальном времени. Сопоставление генов, специфичных для изолированной задержки роста плода (N=88), дифференциально сплайсированных генов при сравнении ФБ и изолированной ЗРП (N=32) и литературных данных, содержащих сведения о ранее описанных ассоциациях дифференциально сплайсированных генов при ЗРП согласно работам Ruano [315], Majewska [233] и Frew [119] (N=657, Ruano и коллеги в сопроводительных материалах предоставили список всего из 575 генов из 1409, с указанием $\Delta PSI > 3$) позволило выявить наиболее перспективные гены для дальнейшего анализа (Рисунок 3.19).

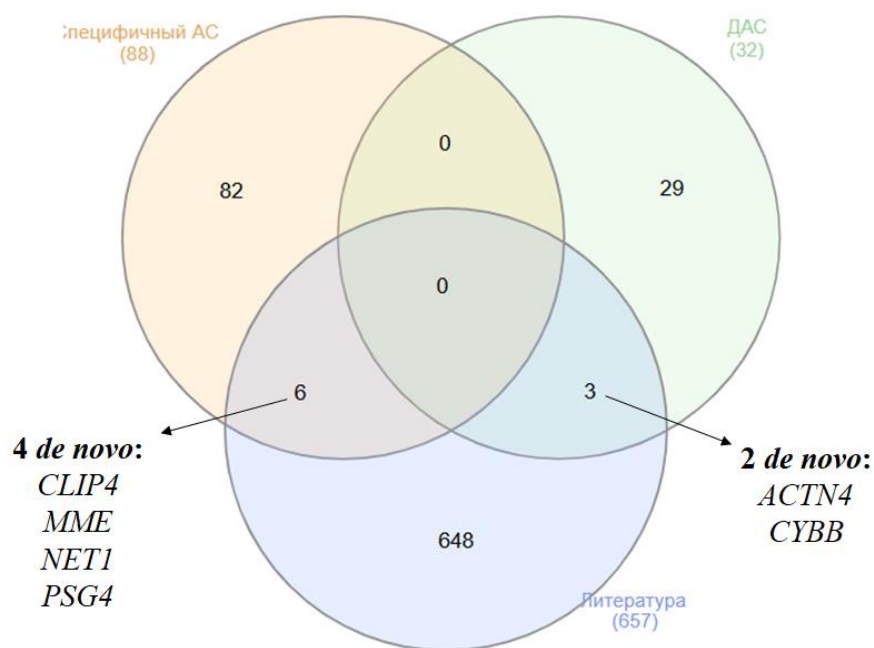


Рисунок 3.19 – Диаграмма Венна, демонстрирующая общность и специфичность дифференциально сплайсированных генов при изолированной задержке роста плода, в том числе при сопоставлении с литературными данными

Далее выбраны шесть генов с событиями *de novo* как представляющие наибольший интерес. Для четырех целевых генов (*ACTN4*, *CLIP4*, *CYBB*, *PSG4*) были подобраны праймеры на такое событие как «удержание интрона», а также

праймеры на каноническую изоформу для двух генов домашнего хозяйства соответствующие необходимым условиям специфичности амплификации в пределах выбранного транскрипта, оптимальной температуры отжига в диапазоне 60–62°C, отсутствия самодимеризации и димеризации с другими нуклеотидными последовательностями, а также расположения сайтов связывания праймеров на соответствующих экзоне и интроне. Генами домашнего хозяйства выбраны *GAPDH* и *SDHA*, которые являются высокостабильными генами в плаценте [248]. В рамках лабораторной части эксперимента проведены криодиссекция, окрашивание препаратов, лазерная микродиссекция, выделение РНК и оценка её качества, синтез кДНК и оценка её качества и количества (см. раздел «Материал и методы»).

Согласно результатам ПЦР в реальном времени, наработка ПЦР продуктов генов *PSG4* ($\chi^2=0,0$; $p=1,0$) и *CYBB* ($\chi^2=0,042$; $p=0,838$) была характерна как для образцов из групп с ФБ, так и для образцов от индивидов с патологией беременности. Несмотря на то, что эти гены были выбраны согласно литературным и экспериментальным данным, а также удовлетворяют всем условиям подбора праймеров, подобная картина может свидетельствовать о низкой специфичности этих маркеров в отношении диагностики ЗРП в тканях плаценты. Гены *ACTN4* ($\chi^2=2,557$; $p=0,110$) и *CLIP4* ($\chi^2=0,752$; $p=0,386$) сохранили тенденцию к разделению в группах сравнения, но не достигли статистической значимости (Рисунок 3.20). Подобный результат может быть обусловлен изменением выборки: если в изначальной выборке наблюдалась дивергенция между группами, то включение дополнительных образцов внесло биологическую вариабельность и снизило межгрупповые различия.

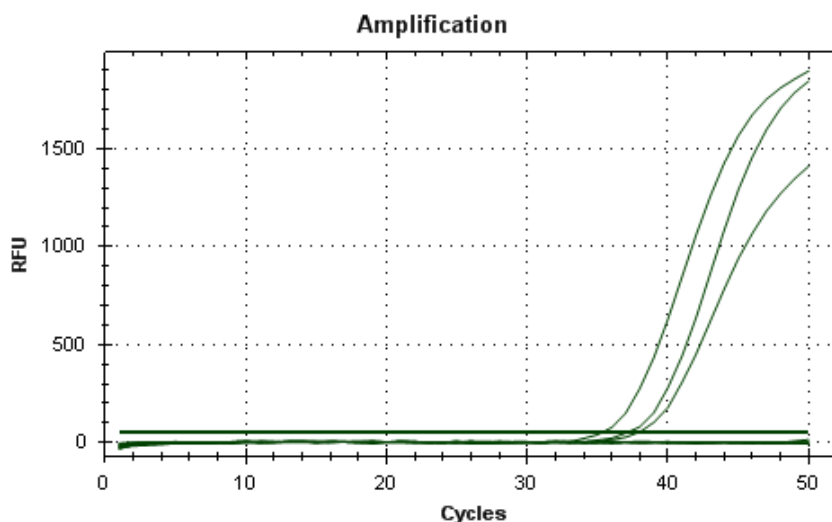


Рисунок 3.20 – График кривых накопления флуоресцентного сигнала для продукта гена *ACTN4*

Интересно, что присутствие в образцах гена домашнего хозяйства *SDHA* имеет статистически значимые отличия между физиологической беременностью и задержкой роста плода ($\chi^2=4,842$; $p=0,028$). Ген *SDHA* кодирует субъединицу митохондриального комплекса II и участвует в окислительном фосфорилировании и цикле Кребса, также относится к числу генов домашнего хозяйства в плаценте [248]. Его активность обеспечивает поддержание энергетического гомеостаза, что особенно критично для высокоэнергетозависимых тканей, таких как плацентарная. Полученные результаты демонстрируют сниженную экспрессию гена *SDHA* и даже её отсутствие в группе пациентов с задержкой роста плода по сравнению с контрольной группой. Данный факт может свидетельствовать о возможной причинной роли митохондриальной дисфункции, связанной с недостаточной активностью *SDHA*. В то же время нельзя исключать и вторичный характер изменения экспрессии, возникающий как следствие уже существующих нарушений в плацентарной ткани, вызванных гипоксией или другими патологическими процессами. Таким образом, ген *SDHA* в плаценте при ЗРП может рассматриваться как потенциальный маркер плацентарной дисфункции,

отражающий либо первичное нарушение энергетического обмена, либо реакцию на развивающуюся патологию.

3.4 Характеристика паттернов альтернативного сплайсинга при сравнении выраженной и умеренной форм задержки роста плода

Критерии разделения случаев задержки роста плода на выраженную и умеренную формы в настоящем исследовании подробно изложены в разделе «Материалы и методы» и основаны на действующих клинических рекомендациях. В этом же разделе представлено сравнение групп по ключевым клиническим и антропометрическим параметрам, что позволило обеспечить корректность стратификации пациенток и последующий анализ молекулярно-генетических различий между формами патологии. Стоит отметить, что в гистологическом исследовании последа в случае выраженной ЗРП преимущественно описаны как «выраженные/умеренные компенсаторные реакции и инволютивные изменения» и включали в себя участки интерстициального отека, застоя крови, снижение зрелости ворсин, наличие инфарктоподобных изменений и фибриноидов, тогда как в группе с умеренной ЗРП в основном встречаются «умеренные/слабо выраженные компенсаторные реакции».

На первом этапе был проведён анализ профиля альтернативного сплайсинга в каждой исследуемой группе отдельно, что позволило охарактеризовать ландшафт распределения событий сплайсинга и оценить общность и специфичность альтернативно сплайсированных генов, а также биологических процессов, с которыми они ассоциированы (Рисунок 3.21). В изученных выборках обнаружено 13688 событий АС в 4002 генах, экспрессирующихся в децидуальных клетках.

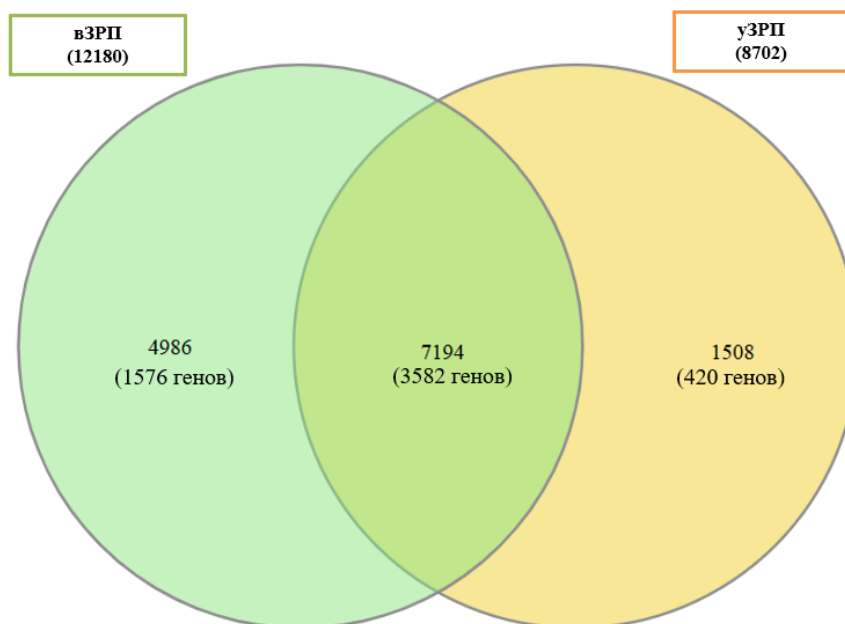


Рисунок 3.21 – Диаграмма Венна, демонстрирующая общность и специфичность событий альтернативного сплайсинга и генов, им соответствующих

На диаграмме Венна показано распределение событий альтернативного сплайсинга между группами выраженной и умеренной задержки роста плода. Большая часть событий (52%) является общей для обеих групп, что указывает на существование определенного набора молекулярных изменений, характерных для ЗРП независимо от степени её тяжести. В то же время каждая из групп имеет и собственные уникальные гены и события, что, вероятно, отражает специфические особенности паттернов альтернативного сплайсинга, связанные либо с компенсаторными механизмами при умеренной форме, либо с дополнительными нарушениями при выраженной форме патологии.

Далее все бинарные события были классифицированы согласно 7 типам событий АС, как аннотированные (Рисунок 3.22), так и *de novo* (Рисунок 3.23).

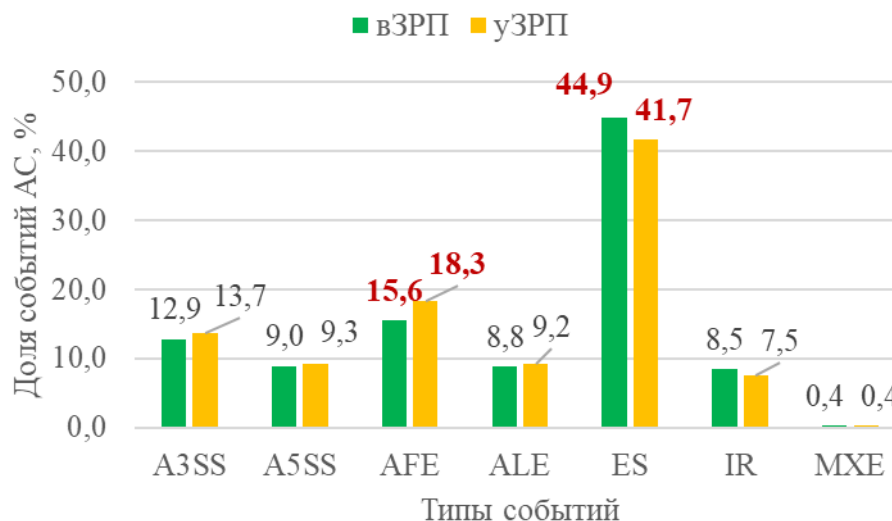


Рисунок 3.22 – Распределение бинарных аннотированных событий альтернативного сплайсинга по типам в группах с выраженной и умеренной задержкой роста плода (A3SS – альтернативный 3'-сайт сплайсинга; A5SS – альтернативный 5'-сайт сплайсинга; MXE – взаимоисключающие экзоны; IR – удержание интрона; ES – пропуск экзона; AFE – альтернативный первый экзон; ALE – альтернативный последний экзон); красным отмечены статистически значимые различия

Среди аннотированных событий статистически значимые различия по частоте встречаемости разных типов событий АС выявлены для альтернативного первого экзона ($\chi^2=8,48$, $p=0,004$) и пропуска экзона ($\chi^2=6,42$, $p=0,012$). Такое перераспределение может указывать, вероятно, на активацию более гибких механизмов регуляции транскрипции при умеренной форме ЗРП. Известно, что рост частоты альтернативного первого экзона отражает усиление тканеспецифической и контекст-зависимой регуляции экспрессии генов, позволяющей клеткам плаценты варьировать старт транскрипции и тем самым адаптироваться к неблагоприятным условиям [190]. Одновременно с этим снижение частоты пропуска экзонов при умеренной форме ЗРП может указывать на сохранение структурной целостности белков и предотвращение образования нефункциональных изоформ, что характерно для состояния с ещё эффективными компенсаторными механизмами. При выраженной форме ЗРП

подобная регуляторная пластичность, вероятно, утрачивается, что может приводить к росту структурно значимых событий АС и потере точности регуляции.

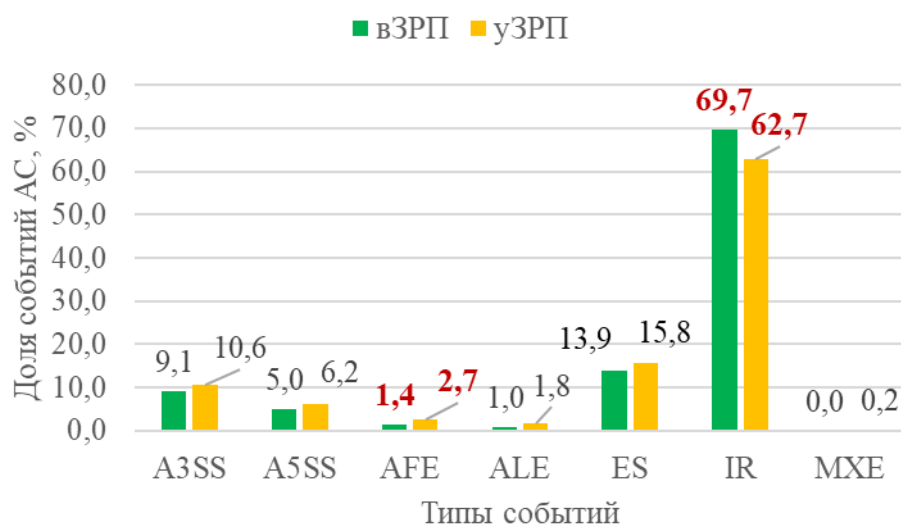


Рисунок 3.23 – Распределение бинарных *de novo* событий

альтернативного сплайсинга по типам в группах с выраженной и умеренной задержкой роста плода (A3SS – альтернативный 3'-сайт сплайсинга; A5SS – альтернативный 5'-сайт сплайсинга; MXE – взаимоисключающие экзоны; IR – удержание интрона; ES – пропуск экзона; AFE – альтернативный первый экзон; ALE – альтернативный последний экзон); красным отмечены статистически значимые различия

Статистически значимые различия по частоте встречаемости разных типов *de novo* событий АС выявлены для альтернативного первого экзона ($\chi^2=6,15$, $p=0,014$) и удержания интрона ($\chi^2=14,12$, $p<0,001$). Увеличение числа альтернативных первых экзонов указывает на активацию новых промоторов и формирование дополнительных транскрипционных вариантов, что может быть способом плаценты поддерживать разнообразие экспрессии в условиях гипоксии или нутритивной недостаточности. Снижение доли удержания интрона, напротив, свидетельствует о более точной работе сплайсосомы и уменьшении числа нефункциональных РНК. Таким образом, умеренная ЗРП

характеризуется более «щадящим» профилем альтернативного сплайсинга, тогда как выраженная форма ассоциирована с ростом ошибок и снижением регуляторной точности.

Для детальной оценки функциональной значимости альтернативно сплайсированных генов, специфичных для каждой из изученных групп, с помощью ресурса WebGestalt (<https://www.webgestalt.org/>) нами проведен анализ обогащения категорий биологических процессов, в которые вовлечены данные гены.

Гены, специфичные для выраженной задержки роста плода, задействованы в следующих биологических процессах: каталитическая активность, действующая на нуклеиновые кислоты (GO:0140640, pFDR=0,020); регуляция активности ГТФаз (GO:0030695, pFDR=0,021); регуляция активности нуклеозидтрифосфатазы (GO:0060589, pFDR=0,021); активность пептидной N-ацетилтрансферазы (GO:0034212, pFDR=0,028). Эти процессы отражают вовлечение фундаментальных клеточных регуляторных механизмов, связанных с белковыми комплексами, взаимодействующими с нуклеиновыми кислотами и участвующими в энергетическом обмене и передаче сигналов. Известно, что ГТФазы и нуклеозидтрифосфатазы напрямую участвуют в энергетическом цикле и контролируют процессинг нуклеиновых кислот, в то время как пептид N-ацетилтрансфераза может как регулироваться этими процессами, так и влиять на них, создавая сложные сигнальные сети. Кроме того, N-ацетилтрансфераза участвует в посттрансляционных модификациях, влияющих на стабильность и функции белков. Таким образом, эти взаимосвязанные процессы формируют комплексную сеть клеточного контроля, критически важную для ответа на повреждение ДНК и регуляции транскрипционных программ, обеспечивающих выживание клетки [305].

Наряду с этим, альтернативно сплайсированные гены, специфичные для умеренной задержки роста плода сверхпредставлены в таких биологически путях, как внутриклеточный транспорт (GO:0046907, pFDR<0,001); локализация белков в клетке (GO:0045184, pFDR=0,008); регуляция

организации цитоскелета (GO:0051493, $pFDR=0,046$); транспорт белков (GO:0015031, $pFDR=0,046$). Максимальные значения коэффициента обогащения в данном случае выявлены для категории внутриклеточного транспорта, включающей локализацию и транспорт белков. Это может отражать нарушение компенсаторных механизмов перераспределения белковых комплексов и метаболитов – процесса, необходимого для адекватной работы синцитиотрофобласта, обеспечивающего транспорт питательных веществ от матери к плоду [304]. Значимым остаётся и нарушение регуляции организации цитоскелета, определяющей форму клеток, их миграцию и взаимодействие с внеклеточным матриксом. Совокупность этих изменений также может рассматриваться как проявление нарушений адаптивных процессов, значимых для поддержания физиологической беременности, при развитии умеренной формы ЗРП.

На следующем этапе среди 3582 генов, для которых события АС зафиксированы в обеих группах, был выполнен поиск дифференциально сплайсированных генов, ассоциированных со степенью тяжести патологии. Идентифицированы 84 дифференциально сплайсированных гена и 123 события АС, из которых наибольший удельный вес приходится на бинарные аннотированные события (44,7%). Среди бинарных событий наиболее часто встречающимся является пропуск экзона (39,5%), в то время как вообще не встречаются взаимоисключающие экзоны. Таблица с именами генов, ID и типом событий, а также указанием бинарности/комплексности и наличия аннотации представлена в приложении Г.

Далее проведена подробная аннотация этих 84 генов в базах данных GeneOntology, KEGG, Reactome, Panther. Результаты анализа продемонстрировали, что они ассоциированы с такими биологическими путями, как различные виды репарации ДНК (GO:0006289, $p=0,004$; GO:0006302, $p=0,007$; R-HSA-5696398, $p=0,0006$; R-HSA-5696399, $p=0,003$), сигнальный путь ионного канала (GO:1990806, $p=0,006$), регуляция метаболизма мРНК (GO:1903311, $p=0,006$; GO:0003729, $p=0,043$), организация

пероксисом (GO:0007031, $p=0,009$), организация лизосом (hsa04142), морфогенез (GO:0010171, $p=0,016$; GO:0060324, $p=0,017$), сигнальный путь SMAD (GO:0046332, $p=0,04$; R-HSA-2173795, $p=0,005$), метаболизм серы (hsa04122, $p=0,033$; hsa00920, $p=0,041$), АТФ-зависимое ремоделирование хроматина (hsa03082, $p=0,012$).

Сигнальный путь SMAD является основным механизмом передачи сигналов трансформирующего фактора роста β (TGF- β) и родственных ему цитокинов, таких как BMPs (костные морфогенетические белки), GDFs (ростовые факторы дифференцировки) и Активин/Nodal [404]. Этот путь играет важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза, ангиогенеза, формировании внеклеточного матрикса и поддержании тканевого гомеостаза. В каскад вовлечены три группы белков: рецепторные R-SMAD, общий ко-фактор SMAD4 и ингибиторные I-SMAD [403]. После активации рецепторов TGF- β /BMP фосфорилированные R-SMAD формируют с SMAD4 транскрипционный комплекс, который перемещается в ядро и взаимодействует с кофакторами (FoxH1, p300, CBP, Snail, Sox9), регулируя экспрессию генов, связанных с ростом, дифференцировкой и фиброзом. На мышах показано, что сигнальный путь SMAD важен для эмбриогенеза, включая формирование мезодермы, нейроэктодермы и осевых структур [308].

Клеточный морфогенез обеспечивает формирование формы и структуры клеток и тканей, что принципиально важно для адекватного внутриутробного роста [156]. Нормальное развитие плаценты зависит от сложных процессов клеточного морфогенеза, включая ветвление ворсинок плода и ремоделирование кровеносных сосудов матери [74, 91]. Дефекты в этих процессах могут привести к недостаточному снабжению плода питательными веществами и кислородом и, как следствие, развитию задержки роста плода.

Лизосомы и пероксисомы – это мембранные органеллы, участвующие в клеточном метаболизме, деградации биомолекул и защите клетки от токсических веществ [300, 330]. Хотя обе структуры участвуют в

катаболических процессах, они имеют разное происхождение, ферментный состав и функциональную специализацию.

Лизосомы представляют собой пузырьки, окруженные мембраной, которые содержат гидролитические ферменты, способные расщеплять белки, липиды, углеводы и нуклеиновые кислоты [210]. Основная роль лизосом заключается в аутофагии – процессе удаления поврежденных органелл и белков [321]. В процессе аутофагии лизосомы помогают предотвращать окислительный стресс и апоптоз в условиях гипоксии, характерной для ранних этапов плацентации. Кроме того, лизосомы обеспечивают иммунную защиту плаценты, участвуя в антигенной презентации и распознавании патогенов [75]. В одном исследовании зафиксирован повышенный уровень аутофагии при задержке роста плода, преэклампсии и их сочетании [163].

Пероксисомы в отличие от лизосом содержат окислительные ферменты, такие как каталаза и уратоксидаза [388]. Эти ферменты разлагают токсичные метаболиты, включая перекись водорода, которая образуется в процессе β -окисления жирных кислот и детоксикации ксенобиотиков, а также обеспечивают синтез плазмалогенов, важных для функционирования нервной системы [159].

Для уточнения функциональной роли 84 дифференциально сплайсированных генов проведен анализ реконструированной с использованием программы «STRING» белок-белковой сети (Рисунок 3.24), включающей три небольших кластера и пять попарных взаимодействий. Центральное место в построенной сети с максимальным числом и силой взаимодействий ($\text{node_degree} \geq 3$, $\text{score} \geq 0,400$) занимают следующие три гена: *AP1G2*, *PBRM1*, *SYNRG*.

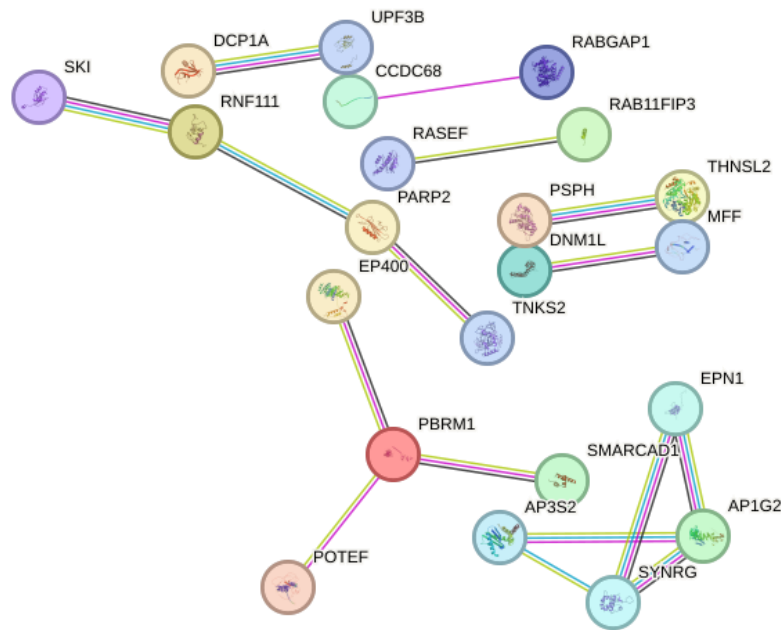


Рисунок 3.24 – Сеть белок-белковых взаимодействий продуктов дифференциально сплайсированных генов, экспрессирующихся в децидуальных клетках при выраженной и умеренной задержке роста плода

Ген *AP1G2* кодирует гамма-адаптин – компонент адапторного комплекса, участвующего в сортировке белков и транспортировке рецепторных комплексов от плазматической мембраны и транс-сети Гольджи к лизосомам. [330]. Ген *SYNRG* кодирует белок, который взаимодействует с гамма-субъединицей клатрин-адапторного комплекса AP1, обеспечивая связывание специфических белков с клатриновыми пузырьками [39]. Оба гена связаны с эндоцитозом и внутриклеточной сортировкой. Ген *PBRM1* кодирует субъединицу АТФ-зависимого комплекса ремоделирования хроматина и участвует в лигандзависимой активации транскрипции ядерными гормональными рецепторами [83].

Проведено сравнение идентифицированных нами ДСГ при сравнении вЗРП и уЗРП с литературными данными – найдены 2 общих гена с работой Ruano и коллег (*EP400*, *ZBTB20*) [303]. Белок, кодируемый геном *EP400*, предположительно обеспечивает активность связывания с хроматином, участвует в репарации двухцепочечных разрывов, также продемонстрировано

участие в регуляции качества яйцеклеток и активации зиготного генома у мышей [368]. Ген *ZBTB20* действует как репрессор транскрипции и играет важную роль во многих процессах, включая нейрогенез [170], гомеостаз глюкозы и постнатальный рост [356]. Мутации в этом гене были связаны с синдромом Примроуз и с синдромом микроделеции 3q13.31 [173].

Далее выбраны гены с наибольшими показателями индекса сплайсинга для всех 4 групп. Для генов с бинарными событиями критерием является максимальное изменение ΔPSI между группами, для генов с комплексными событиями критерием является «сложность» события. В итоге выявлены следующие наиболее дифференциально сплайсированные гены для каждой категории:

- 1) Ген с бинарными событиями, аннотированными – *AP1G2* ($\Delta PSI = 0,648$ (ES – пропуск экзона)) – Рисунок 3.25.А;
- 2) Ген с комплексными событиями, аннотированными – *ABI3BP* (4 комплекса и 15 событий) – Рисунок 3.25.Б;
- 3) Ген с бинарными событиями, *de novo* – *EPN1* ($\Delta PSI = 0,558$ (ES – пропуск экзона)) – Рисунок 3.25.В;
- 4) Ген с комплексными событиями, *de novo* – *ABI3BP* (3 комплекса и 6 событий) – Рисунок 3.25.Б.

Ген *AP1G2* кодирует $\gamma 2$ -субъединицу адаптерного белкового комплекса 1 (AP-1), который участвует в везикулярном транспорте внутри клеток [342]. Ген *ABI3BP* кодирует белок, взаимодействующий с ABI3, который участвует в цитоскелетной динамике, адгезии клеток и подавлении опухолевого роста [154]. Ген *EPN1* кодирует белок Epsin 1, который участвует в эндоцитозе, внутриклеточном транспорте и регуляции сигнальных путей [249]. Все три гена играют важные роли в клеточной динамике, транспорте и регуляции сигналов, а их дисфункция связана с различными патологическими процессами, включая нарушения адекватного формирования плаценты.

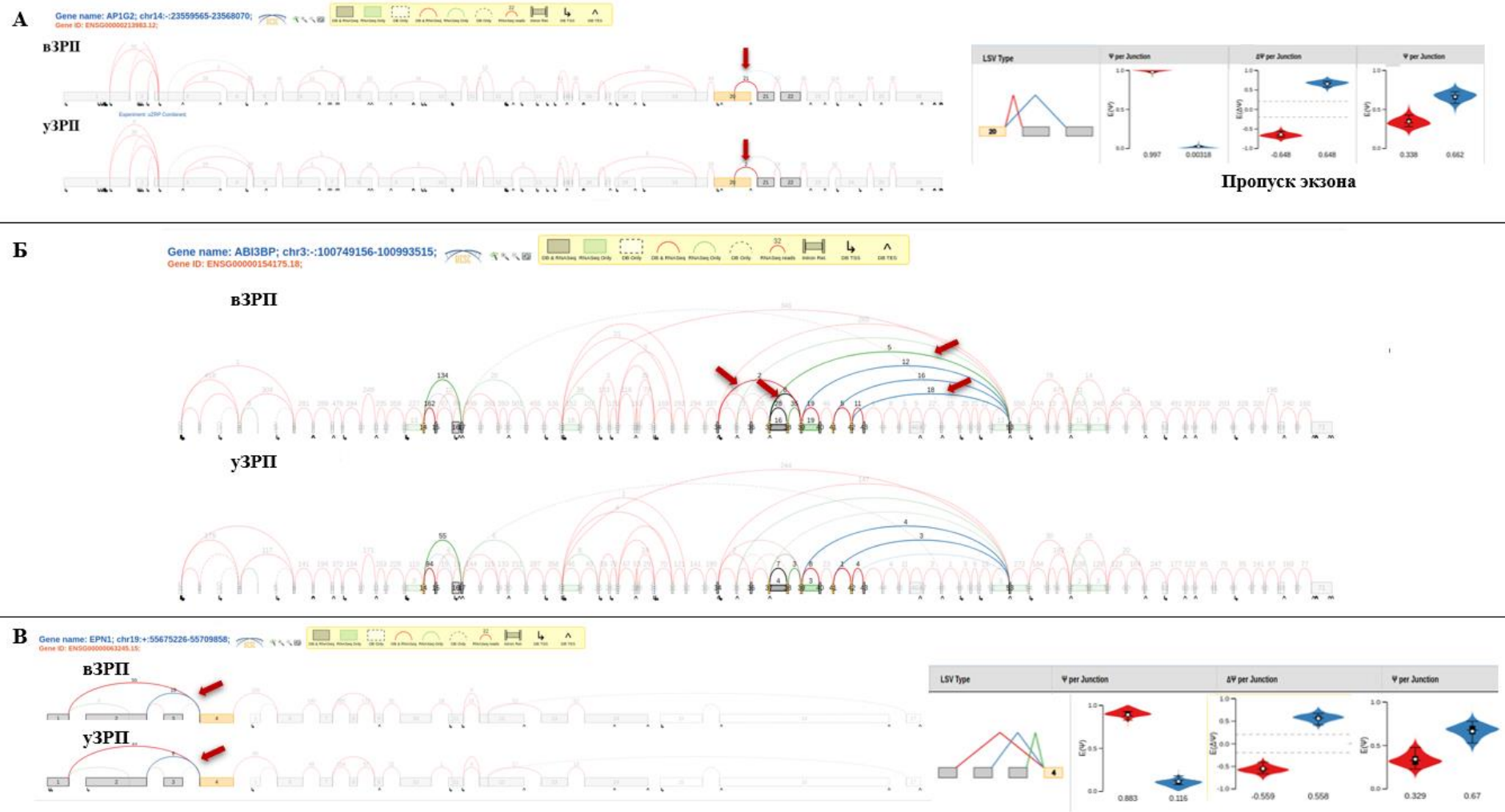


Рисунок 3.25 – Интрон-экзонная структура генов *AP1G2*, *ABI3BP* и *EPN1* с выделенными значимыми событиями альтернативного сплайсинга и скрипичными диаграммами распределения $\Delta\Psi$ в группах с выраженной и умеренной задержкой роста плода

В целом различия профиля альтернативного сплайсинга между умеренной и выраженной формами ЗРП отражают разные уровни нарушения клеточной регуляции. Тяжёлая форма характеризуется вовлечением транскрипционных и посттрансляционных механизмов, активацией ГТФаз и системой репарации ДНК, что свидетельствует о глубокой декомпенсации клеточного гомеостаза. Напротив, при умеренной форме доминируют изменения, затрагивающие внутриклеточный транспорт, организацию цитоскелета и локализацию белков – процессы, отражающие сохранённые компенсаторные возможности.

Дальнейший анализ показал, что 84 гена связаны с широким спектром путей: репарацией ДНК, контролем метаболизма мРНК, работой ионных каналов и сигнальным каскадом SMAD, а также клеточным морфогенезом, функционированием пероксисом и лизосом, метаболизмом серы и ремоделированием хроматина. Эти результаты указывают на то, что альтернативный сплайсинг влияет как на пост-транскрипционную регуляцию, так и на структурно-функциональную организацию клетки и её сигнальные взаимодействия.

В совокупности такие молекулярные изменения способны напрямую отражаться на морфологии плаценты (Рисунок 3.26).

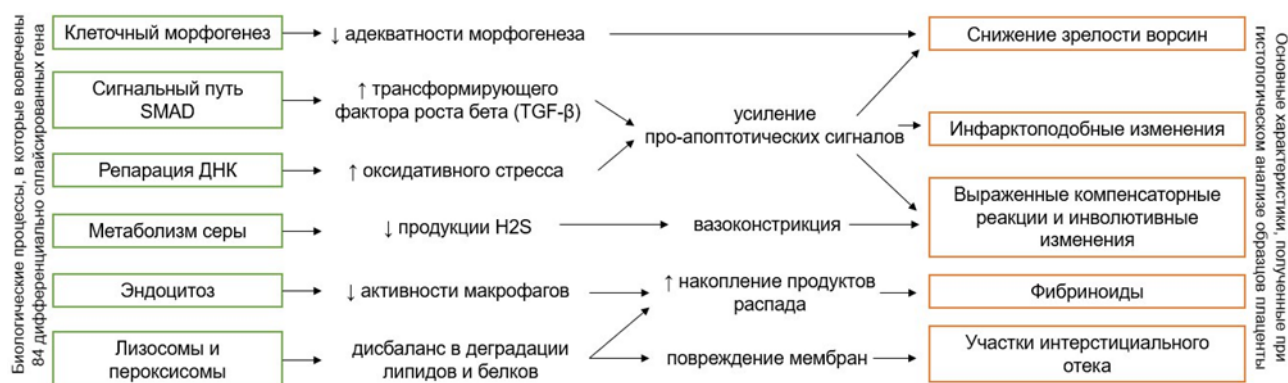


Рисунок 3.26 – Связь биологических процессов, ассоциированных с дифференциальным сплайсингом при сравнении выраженной и умеренной задержки роста плода, с гистологическими изменениями плаценты при выраженной форме

Представленный рисунок обобщает ключевые биологические процессы, которые дифференциально активированы при выраженной и умеренной форме ЗРП, и демонстрирует, как их нарушение приводит к формированию характерных морфологических изменений плаценты. Нарушение клеточного морфогенеза снижает адекватность формирования структур ворсин, что ведёт к их неполному созреванию и уменьшению зрелости цитотрофобласта. Изменения в сигнальном пути SMAD, сопровождающиеся повышением активности трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), усиливают про-апоптотические сигналы. Это вызывает выраженные компенсаторные реакции в плаценте и способствует развитию участков, напоминающих инфарктоподобные изменения. Нарушения в работе систем репарации ДНК повышают уровень окислительного стресса, что усиливает апоптоз цитотрофобласта и нарушает обновление клеток ворсин. Изменения в метаболизме серы приводят к снижению продукции H_2S – важного регулятора сосудистого тонуса, что вызывает вазоконстрикцию. Ограничение просвета сосудов способствует ишемии, застою крови и формированию зон, аналогичных очагам инфаркта в плацентарной ткани. Снижение активности эндоцитоза, включая функциональную активность макрофагов, вызывает накопление продуктов распада и образование фибриноидов. Нарушения в работе лизосом и пероксисом приводят к дисбалансу деградации липидов и белков, а также к повреждению мембран, что создаёт предпосылки для формирования интерстициального отёка и фибриноидных отложений. Таким образом, совокупность изменений формирует структурно-функциональную картину плаценты при выраженной ЗРП. Она характеризуется снижением зрелости ворсин, участками ишемии, фибриноидом, отёком и инфарктоподобными зонами. При умеренной форме ЗРП вовлечение тех же путей присутствует, но выражено значительно слабее, что проявляется лишь ограниченными компенсаторными перестройками без грубых морфологических повреждений.

3.5 Оценка роли естественного отбора в формировании генетической архитектуры паттернов альтернативного сплайсинга, ассоциированных с задержкой роста плода, в современных популяциях человека

Задержка роста плода является одним из ключевых осложнений беременности, непосредственно затрагивающим выживание плода и его репродуктивный потенциал в дальнейшем онтогенезе. Учитывая центральную роль плаценты в обеспечении внутриутробного развития, можно предположить, что часть регуляторных механизмов, вовлечённых в патогенез ЗРП, включая альтернативный сплайсинг, могла формироваться под действием эволюционных факторов. Это обосновывает целесообразность оценки роли естественного отбора в формировании генетических детерминант альтернативного сплайсинга, ассоциированных с развитием данной патологии.

Естественный отбор, фундаментальный механизм эволюции, формирует не только физические и физиологические характеристики организмов, но и их предрасположенность к различным заболеваниям. На уровне популяций отбор действует на гены и аллели, которые влияют на выживание и репродуктивный успех, что может приводить к накоплению как защитных, так и вредоносных вариаций в геноме. Естественный отбор может влиять на сложные многогенные болезни, включая сердечно-сосудистые заболевания, диабет и аутоиммунные расстройства, когда адаптивные черты, возникшие в ответ на исторические экологические или диетические условия, становятся вредными в современном образе жизни. Таким образом, взаимодействие между естественным отбором и болезнями подчёркивает, что здоровье человека и его восприимчивость к патологиям нельзя рассматривать изолированно – они являются результатом длительной эволюционной истории, в ходе которой генетические адаптации иногда несут двойственную природу, одновременно повышая приспособленность и создавая уязвимость к определённым заболеваниям.

Ключевой проблемой в изучении естественного отбора является понимание того, как генетическая изменчивость формируется под действием эволюционных сил. Выявление областей генома, которые недавно подверглись

направленному отбору, является ключевой задачей. Регионы с признаками селективных изменений характеризуются пониженным генетическим разнообразием, высокой степенью неравновесия по сцеплению и избытком высокочастотных производных аллелей. Для выявления таких регионов используются следующие методы: D-тест Таджимы [359], H-тест Фэй-Ву [114] и *i*HS [382]. Разные участки генома могут демонстрировать разные закономерности, поэтому три теста могут дополнять друг друга при выявлении отклонений от нейтральности. В ряде зарубежных исследований оценили временной диапазон: D-тесты Таджимы обнаруживает сигналы в диапазоне до 250 000 лет; H-тест Фэй-Ву – в период до 80 000 лет; а *i*HS – во временном отрезке до 30 000 лет [360, 365]. Поэтому предпочтительнее выявлять сигналы отбора в совокупности по результатам этих тестов.

Для дальнейшего анализа выбраны 150 дифференциально сплайсированных генов, ассоциированных с различными формами задержки роста плода, по результатам предыдущего анализа. Эти гены проанализированы с помощью веб-ресурса PopHuman (<https://pophuman.uab.cat>) [72] – базы данных, которая предоставляет доступ к данным по популяционной генетике человека, полученным на основе 1000 Genomes Project, с акцентом на вычисление статистик разнообразия, демографии и естественного отбора для различных популяций человека. Основана на версии сборки человека GRCh37/hg19, использует данные 1000 Genomes Project Phase III: 2 504 индивидуальных генома из 26 популяций, сгруппированных в 5 континентальных регионов или метапопуляции (AFR – Африканская, EUR – Европейская, EAS – Восточно-Азиатская, SAS – Южно-Азиатская, AMR – Американская) [364]. Оценка отбора с точки зрения частоты аллелей или протяженных гаплотипов позволяет исследователям эффективно выявлять и подтверждать предполагаемые локусы положительного отбора в эволюции человека, а также в дальнейшем раскрывать механизмы, лежащие в основе действия естественного отбора. Для повышения достоверности интерпретации полученных сигналов, в анализ были включены только те гены, у которых

значения D-теста Таджимы $\geq |2|$, H-теста Фэй-Бу $\geq |5|$, теста iHS $\geq |2|$ идентифицированы в не менее чем трёх популяциях, принадлежащих к одной метапопуляции. Такой пороговый подход позволяет минимизировать вероятность случайных флуктуаций, возникающих вследствие локальных особенностей выборки или технических артефактов, и повысить устойчивость результатов. Подобный критерий согласуется с методологией популяционно-генетических исследований, в которых воспроизводимость сигнала внутри мета-популяции рассматривается как индикатор биологической значимости [20, 269]. Таким образом, учет множественных независимых наблюдений экстремальных значений в пределах одной мета-группы позволяет с большей уверенностью предполагать наличие отбора, а не случайных демографических процессов.

3.5.1 D-тест Таджимы

В рамках настоящего исследования была проведена оценка распределения значений D-теста Таджимы по 150 генам в 26 популяциях человека, с целью выявления возможных отклонений от модели нейтральной эволюции. Этот тест позволяет оценить дисбаланс между числом редких и частых аллелей, что может свидетельствовать о действии эволюционных процессов, таких как направленный или балансирующий отбор, а также отражать демографические эффекты (например, экспансия численности популяции или бутылочное горлышко). Более 20% генов (31 из 150) продемонстрировал статистически значимые сигналы отбора, из них для 14 генов показаны положительные значения критерия D-теста (*ANGPT1*, *CER63*, *DMD*, *HDAC8*, *MBD5*, *PLCB1*, *PPIL2*, *RPMS*, *REEP1*, *RNF111*, *SDCCAG8*, *STAU2*, *TBCD*, *ZNF331*), тогда как для 17 генов – отрицательные (*AGO4*, *ALG13*, *CCDC68*, *COPS8*, *CUL4B*, *CYBB*, *ENAH*, *EPB41*, *IMMP2L*, *MED13L*, *MROH1*, *PBX4*, *POLB*, *POLD4*, *RABGAP1*, *SLC20A2*, *TCF3*), разнонаправленных значений в рамках одного гена выявлено не было, что свидетельствует о деятельности как балансирующего, так и направленного отбора.

Гены с положительными значениями D-теста и вероятным балансирующим отбором сверхпредставлены в следующих биологических процессах: регуляция процесса модификации белка (GO:1901873, $p=0,00007$; GO:0031400, $p=0,0003$; GO:0000209, $p=0,001$), фолдинг белков (GO:0051087, $pFDR=0,032$; GO:0031072, $p=0,004$; GO:0006457, $p=0,014$), организация цитоскелета (GO:0031023, $p=0,008$; GO:0060491, $p=0,017$; GO:0060249, $p=0,02$), негативная регуляция процессов в иммунной системе (GO:0002683, $p=0,008$), клеточный гомеостаз мышечной клетки (GO:0046716, $p=0,022$).

Анализ функциональной аннотации генов с отрицательными D значениями и предположительным направленным отбором продемонстрировал ассоциации с такими биологическими процессами как: биосинтез ДНК (GO:0071897, $p=0,015$), каталитическая активность, действующая на ДНК (GO:0140097, $p=0,023$), различные виды репарации ДНК (hsa03410, $p=0,0009$; hsa03420, $p=0,002$; hsa03430, $p=0,024$; R-HSA-6781827, $p=0,0001$; R-HSA-5696399, $p=0,0001$; R-HSA-5696398, $p=0,0003$), развитие иммунной системы (GO:0002520, $p=0,017$), иммунный ответ (GO:0002440, $p=0,02$), метаболический процесс активных форм кислорода (GO:0072593, $p=0,021$), ферроптоз (hsa04216; $p=0,042$).

Совокупность выявленных ассоциаций свидетельствует о том, что естественный отбор в популяциях человека действовал неравномерно, затрагивая ключевые биологические процессы, связанные с регуляцией клеточного гомеостаза, метаболизма и иммунного ответа. При этом гены с признаками балансирующего отбора преимущественно участвуют в таких путях, как посттрансляционная модификация и фолдинг белков, организация цитоскелета и поддержание клеточного равновесия в мышечной ткани. Сохранение аллельного разнообразия в этих процессах может обеспечивать эволюционные преимущества при колебаниях внешней среды и физиологического состояния, в том числе в период внутриутробного развития. Учитывая, что мышечный гомеостаз, структура цитоскелета и оксидативный стресс тесно связаны с развитием плаценты и адаптацией плода к

гипоксическим условиям [261, 307], такие сигналы отбора могут отражать исторически значимую роль этих процессов в выживаемости плода и регуляции его роста.

В свою очередь, гены, демонстрирующие признаки направленного отбора, показали функциональное обогащение по путям, связанным с репарацией ДНК, контролем за мутациями, развитием и активацией иммунной системы, а также метаболизмом активных форм кислорода и ферроптозом. Эти процессы критичны для быстроделющихся тканей, включая цитотрофобласт, эмбриональные органы и сосудистую сеть плаценты. Нарушения в указанных путях нередко ассоциированы с оксидативным стрессом, повышенным апоптозом и аномальной инвазией цитотрофобласта – ключевыми патогенетическими механизмами, лежащими в основе задержки роста плода [333]. Таким образом, направленный отбор на эти гены мог играть существенную роль в адаптации к условиям внутриутробного развития, определяя как успешность имплантации и плацентации, так и долгосрочные исходы роста и выживаемости плода.

На рисунке 3.27 представлены первые 10 генов, которые чаще всего показывают сигналы отбора по D-тесту Таджимы (значения < -2 или > 2) среди 26 популяций.

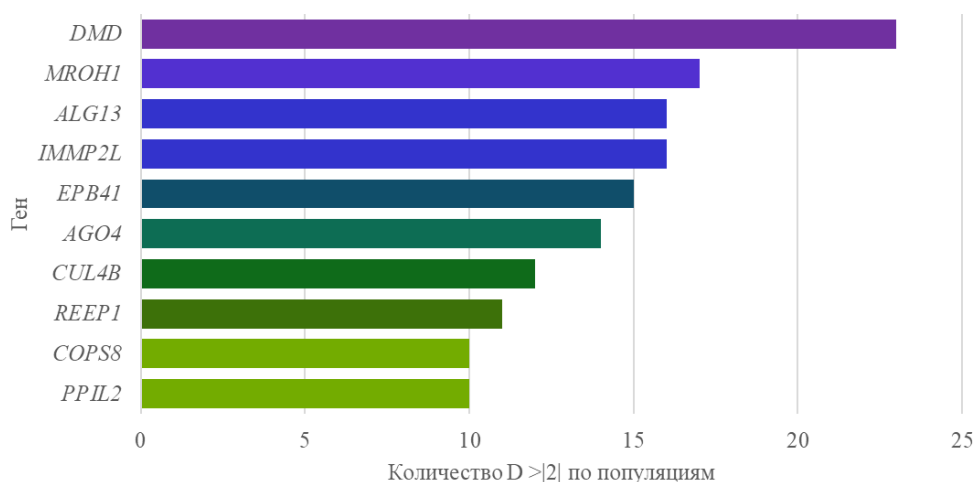


Рисунок 3.27 – Десять генов, демонстрирующих максимальное количество сигналов отбора по D-тесту Таджимы

Особый интерес представляет выявленный сигнал в области гена *DMD*, для которого действие отбора идентично в 23 из 26 исследованных популяций, что является наибольшим числом для данного анализа. Примечательно, что во всех случаях были зафиксированы положительные значения *D*, что указывает на возможный балансирующий отбор. Ген *DMD* (дистрофин), локализованный на X-хромосоме, кодирует ключевой структурный белок мышечной клетки – дистрофин, необходимый для поддержания целостности сарколеммы при сокращении мышц [273]. Нарушения в этом гене лежат в основе развития мышечной дистрофии Дюшенна и Беккера – тяжелых X-сцепленных прогрессирующих миопатий. Обнаруженные признаки балансирующего отбора могут свидетельствовать о поддержании генетического разнообразия в этом локусе, возможно, в связи с его критически важной функцией и/или адаптивными компромиссами [11]. В мышцах при мутациях *DMD* отмечается дисфункция митохондрий и усиленный окислительный стресс. В плаценте аналогичные механизмы могли бы приводить к повышенному апоптозу и плацентарной недостаточности. Кроме того, дистрофин участвует, косвенно, в сигнальных путях, связанных с ангиогенезом. Дефекты могут отражаться на формировании сосудов ворсин плаценты, снижая её способность к транспортной функции.

Далее проведен анализ количества сигналов отбора по популяциям (Рисунок 3.28).

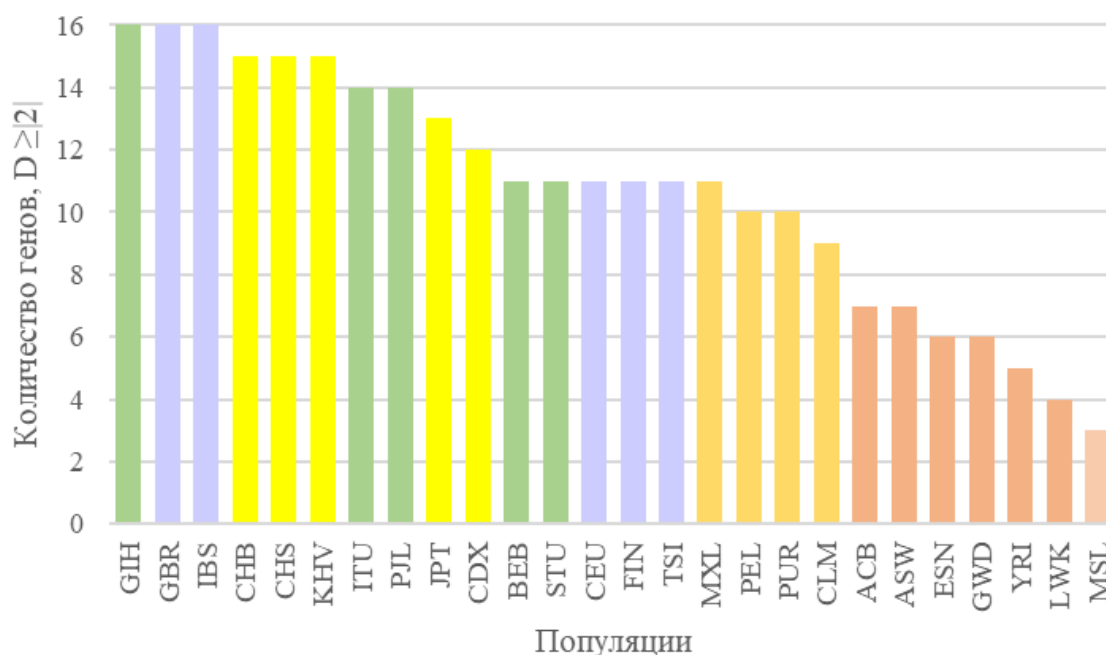


Рисунок 3.28 – Популяции с наибольшим числом сигналов отбора (зеленый цвет – метапопуляция SAS; сиреневый – метапопуляция EUR; желтый – метапопуляция EAS; оранжевый – метапопуляция AMR; красный – метапопуляция AFR)

Наибольшее количество сигналов отбора продемонстрировали гуджаратцы (SAS), британцы (EUR) и иберийцы (EUR), минимальное количество пришлось на все семь популяций Африки (AFR). Интересно, что при расчете среднего сигнала отбора на метапопуляцию, лидирует Восточно-Азиатская (EAS) – в среднем по 14 генов с признаками отбора на популяцию, далее идут Южно-Азиатская (SAS) и Европейская (EUR) метапопуляции – по 13 сигналов, далее Американская (AMR) показала умеренный уровень отбора – 10 сигналов и замыкает список Африканская (AFR) – всего 5 сигналов отбора. Также некоторые гены являются «специфичными» для одной метапопуляции: *ANGPT1*, *CCDC68*, *CYBB*, *RBPMS*, *RNF111*, *ZNF331* – EAS (6 генов); *ENAH*, *MED13L*, *PBX4*, *RABGAP1*, *TCF3* – AFR (5 генов); *PLCB1*, *POLB*, *SDCCAG8* – EUR (3 гена); *CEP63*, *HDAC8* – SAS (2 гена). Такое распределение может отражать как историко-демографические различия между континентальными группами, так и различия в действии селективных факторов (например,

адаптация к климату, питанию или патогенному фону), в том числе с учетом различий в размерах эффективной популяции и структуре генетического разнообразия. Одной из ключевых причин низкого количества выявленных сигналов отбора в африканских популяциях является их высокий уровень древнего генетического разнообразия, сформировавшийся в течение нескольких сотен тысяч лет, вероятно, более 300 000 [71, 329]. Длительная демографическая стабильность и большая эффективная численность популяций способствовали формированию механизмов канализации, при которых значительная часть генетической вариабельности не приводит к выраженным фенотипическим сдвигам и, соответственно, остаётся «невидимой» для отбора. В отличие от этого, неафриканские популяции, прошедшие через эффект «бутылочного горлышка» и резкую смену условий среды при миграции из Африки, испытали процессы деканализации, сопровождавшиеся перестройкой регуляторных и адаптивных траекторий. Это привело к накоплению большого количества нейтральных и слабо вредоносных вариантов, что, в свою очередь, сглаживает сигналы, которые могли бы быть интерпретированы как результат положительного или балансирующего отбора, так как отрицательные значения D часто возникают после расширения популяции, а положительные – при снижении численности. Поскольку африканские популяции не испытывали таких резких колебаний численности, как, например, европейские или американские (связанные с колонизацией, эпидемиями и миграциями), они демонстрируют более стабильные значения D -теста, близкие к нулю.

3.5.2 Н-тест Фэй-Ву

Далее была проведена оценка распределения значений Н-теста Фэй-Ву также по 150 генам в 26 популяциях человека. Этот тест позволяет оценить отклонение от нейтральной модели эволюции, особенно для выявления недавнего положительного отбора, затрагивающего преимущественно часто встречающиеся производные (derived) аллели. Только 5 генов из 150 (3,3%) продемонстрировали значимые сигналы отбора, для всех генов показаны

исключительно отрицательные показатели *H* (*ABI3BP*, *CDYL2*, *DNM1L*, *HDAC8*, *R3HDM1*). Такая картина типична для случаев направленного положительного отбора, когда новая благоприятная мутация быстро распространяется в популяции вместе с соседними сайтами за счёт сцепления. В результате этого события уменьшается генетическое разнообразие в окрестности выбранного локуса, но сам производный аллель достигает высокой частоты. В популяционно-генетических исследованиях такие сигналы используются для приоритизации участков генома, потенциально вовлечённых в адаптационные процессы. Эти гены сверхпредставлены в следующих биологических процессах: организация пероксисом (GO:0007031, $p=0,007$), запрограммированная некротическая гибель клеток (GO:0097300, $p=0,01$; hsa04217, $p=0,036$), организация различных клеточных структур, включая митохондрии, эндоплазматический ретикулум (GO:0051646, $p=0,01$; GO:0007029, $p=0,02$; GO:0070585, $p=0,025$), клеточный цикл (GO:0007062, $p=0,011$; GO:0032200, $p=0,032$; GO:0061025, $p=0,036$; hsa04110, $p=0,036$), сигнальный путь TNF (hsa04668, $p=0,026$). Таким образом, результаты анализа свидетельствуют о том, что направленный отбор в генах, вовлечённых в окислительный стресс, гибель и пролиферацию, мог способствовать адаптации к условиям, связанным с фетоплацентарной недостаточностью [240]. В то же время эти же гены при дисрегуляции могут быть вовлечены в развитие задержки роста плода, что указывает на возможный эволюционный компромисс между адаптацией и рисками патологии беременности.

Наибольший интерес представляет выявленный сигнал в области гена *ABI3BP*, который продемонстрировал признаки отбора в 9 из 26 исследованных популяций, что является наибольшим числом для данного анализа. Предполагается, что белок, кодируемый этим геном, находится в коллагенсодержащем внеклеточном матриксе и участвует в нескольких процессах, включая организацию внеклеточного матрикса; адгезию клетки к субстрату; и регуляцию постсинаптической организации [406]. Таким образом, сигнал положительного отбора в области *ABI3BP* может отражать адаптивные

изменения, направленные на оптимизацию межклеточных взаимодействий и матриксной архитектуры.

Далее проведен анализ количества сигналов отбора по популяциям (Рисунок 3.29).

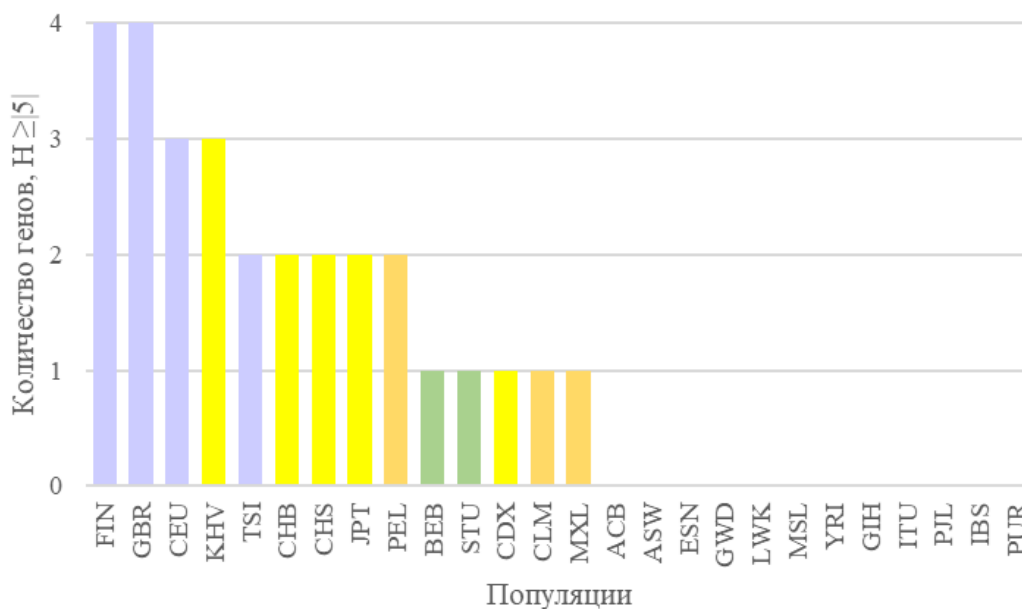


Рисунок 3.29 – Популяции с наибольшим числом сигналов отбора (зеленый цвет – метапопуляция SAS; сиреневый – метапопуляция EUR; желтый – метапопуляция EAS; оранжевый – метапопуляция AMR)

Наибольшее количество сигналов отбора продемонстрировали популяции финны (EUR), британцы (EUR), со стороны популяций Африки сигналов зафиксировано не было (AFR). Из пяти генов – четыре являются «специфичными» для одной метапопуляции: *CDYL2*, *DNM1L* – EAS (2 гена); *HDAC8*, *R3HDM1* – EUR (2 гена). Такое распределение может отражать локальные адаптационные процессы, происходившие в популяциях Европы и Восточной Азии, связанные с демографической историей, климатическими условиями или особенностями питания. Отсутствие сигналов в африканских популяциях может быть связано с более высоким уровнем генетического разнообразия и древностью разделения линий, что снижает чувствительность Н-теста Фэй-Ву к обнаружению недавнего отбора на этом континенте [268].

Обнаружение специфичных для отдельных метапопуляций генов свидетельствует о географической неоднородности эволюционного давления и подчёркивает важность учета популяционной структуры при интерпретации данных об отборе.

3.5.3 iHS тест

На следующем этапе была проведена оценка распределения значений iHS теста также по 150 генам в 26 популяциях человека. Этот тест позволяет выявлять сигналы недавнего положительного отбора в геноме человека до того, как отобранный аллель достиг фиксации в популяции. Основан на идее, что, если аллель находится под положительным отбором, он быстро распространяется в популяции вместе с соседними вариантами ДНК, образуя длинный участок с низкой рекомбинацией – удлинённый гаплотип. В отличие от других тестов может обнаруживать не завершённый селективный свип, то есть, когда благоприятный аллель находится на промежуточной частоте (обычно 30–80%). Только 10 генов из 150 (7%) продемонстрировали значимые сигналы отбора, для всех генов показаны исключительно положительные значения (*CEP63*, *DNAL1*, *EPB41*, *ERI3*, *MBD5*, *MED13L*, *MTA3*, *PBRM1*, *PPP2R5C*, *R3HDM1*). Положительные показатели указывают на то, что предковый аллель сохраняется в популяции в окружении удлинённого гаплотипа с высокой гомозиготностью, что свидетельствует о его недавнем распространении под действием положительного отбора. Такой результат интерпретируется как признак отбора в пользу предкового аллеля, поскольку именно он ассоциирован с длинным, слабо рекомбинированным гаплотипом, характерным для адаптивного распространения.

Эти гены сверхпредставлены в следующих биологических процессах: клеточный цикл (GO:1901987, $p=0,0007$; GO:0044772, $p=0,015$; GO:0045023, $p=0,018$; GO:0007346, $p=0,020$; R-HSA-68877, $p=0,007$), организация цитоскелета (GO:0030865, $p=0,024$; GO:0005200, $p=0,041$), ремоделирование хроматина (GO:0007059, $p=0,016$; hsa03082, $p=0,002$; hsa03083, $p=0,048$). Эти

функции являются фундаментальными для поддержания геномной стабильности, пролиферации клеток, особенно в активно делящихся тканях, а также для регуляции экспрессии генов через изменение доступности хроматиновых участков. Это указывает на то, что естественный отбор мог способствовать сохранению предковых форм аллелей, обеспечивающих оптимальную работу клеточного цикла и архитектуру клеточной структуры [275], что особенно актуально в контексте развития и функционирования высокоспециализированных тканей, например, в плаценте. Дисфункции в этих путях могут приводить к недостаточной плацентации, нарушению питания плода и гипоксии, что, в свою очередь, способствует формированию задержки роста плода [43, 245]. Таким образом, естественный отбор на предковые аллели в этих путях может отражать адаптивную стратегию, направленную на сохранение баланса между пролиферацией и стабильностью, особенно в условиях, которые угрожают нормальному течению беременности.

Более 10 сигналов отбора в популяциях продемонстрировали гены *EPB41* (13) и *PBRM1* (12). Белок, кодируемый геном *EPB41*, вместе со спектрином и актином образует цитоскелетную сеть мембраны эритроцитов [225]. Этот комплекс играет важную роль в формировании формы эритроцитов и их способности к деформации. Мутации в этом гене связаны с эллиптоцитозом 1-го типа (EL1). В данном случае отбор может быть связан с адаптацией к гипоксическим условиям, инфекционным агентам (например, малярии), либо с необходимостью эффективной транспортной функции крови в различных климатических и высотных условиях. Подобные экологические давления могли способствовать сохранению предковых вариантов, обеспечивающих лучшую механическую устойчивость эритроцитов. Ген *PBRM1* кодирует субъединицу АТФ-зависимых комплексов, ремоделирующих хроматин. Кодируемый белок был идентифицирован как неотъемлемый компонент комплексов, необходимых для лиганд-зависимой активации транскрипции ядерными гормональными рецепторами. Мутации в этом локусе были связаны с первичной светлоклеточной почечно-клеточной карциномой [286]. Его положительный

отбор может отражать адаптацию к изменениям в регуляции экспрессии генов, особенно в тканях с высокой пролиферативной активностью (включая циторофобласт и развивающиеся эмбриональные структуры). Предковый аллель в этом случае может обеспечивать более устойчивую работу регуляторных комплексов, снижая риск развития онкологических или пролиферативных патологий.

Далее проведен анализ количества сигналов отбора по популяциям (Рисунок 3.30).

Наибольшее количество сигналов отбора продемонстрировали афро-карибы (AFR), пенджабцы (SAS) и европеоиды из Юты (EUR), минимальное количество пришлось на почти все популяции восточной Азии (EAS). Интересно, что в противовес предыдущим тестам (D-тест Таджимы и H-тест Фэй-Ву) при расчете среднего сигнала отбора на метапопуляцию, лидирует Африканская (AFR) – в среднем по 5 генов с признаками отбора на популяцию, а замыкает список Восточно-Азиатская (EAS) – всего по 1 гену с сигналом отбора на популяцию.

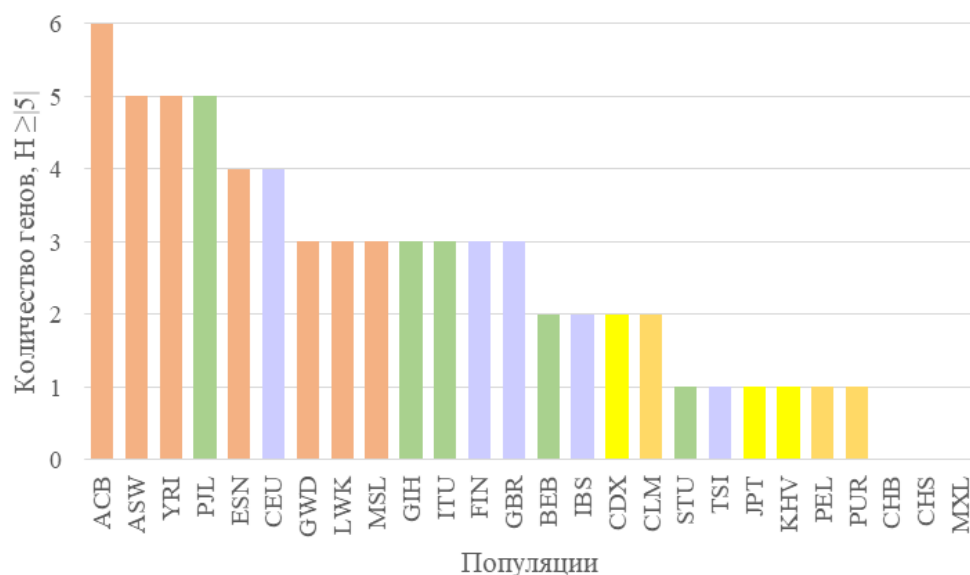


Рисунок 3.30 – Популяции с наибольшим числом сигналов отбора (зеленый цвет – метапопуляция SAS; сиреневый – метапопуляция EUR; желтый – метапопуляция EAS; оранжевый – метапопуляция AMR; красный – метапопуляция AFR)

Также некоторые гены являются «специфичными» для одной метапопуляции: *CEP63*, *PPP2R5C* – EAS (2 гена); *DNAL1*, *EPB41*, *ERI3*, *MBD5* – AFR (4 гена); *MED13L*, *R3HDM1* – EUR (2 гена). Такое распределение может отражать различия в направлении и интенсивности естественного отбора между метапопуляциями, обусловленные как экологическими и патогенетическими факторами, так и генетическим разнообразием самих популяций. Высокое среднее количество сигналов отбора в Африканской метапопуляции по тесту iHS может свидетельствовать о недавнем позитивном отборе на предковые аллели, происходящем внутри отдельных африканских популяций и отражающем локальную адаптацию к специфическим условиям окружающей среды. Такой контраст с результатами тестов Таджимы и Фэй-Ву (где в AFR было минимальное количество сигналов) объясняется отличающимся временным масштабом чувствительности: iHS тест детектирует относительно недавний положительный отбор, в то время как D и H тесты более чувствительны к старым событиям отбора, охватывающим десятки и сотни тысяч лет. Это подтверждает, что в африканских популяциях продолжается активный эволюционный процесс, несмотря на кажущуюся «молчащую» картину в других тестах.

Таким образом, полученные данные подчёркивают важность учета нескольких тестов отбора для разных временных шкал, а также необходимость регионального подхода к интерпретации эволюционных сигналов. В контексте заболеваний, включая задержку роста плода, подобные различия могут указывать на уникальные адаптационные траектории, в том числе на гены, потенциально важные для репродуктивного успеха и плацентарной функции, различающиеся между популяциями.

3.5.4 Анализ популяционно-временной компоненты

Проведено сопоставление дифференциально сплайсированных генов, демонстрирующих сигналы отбора, по результатам анализа трех

популяционных тестов. Общие гены для всех трех тестов не выявлены, но есть попарные пересечения (Рисунок 3.31).

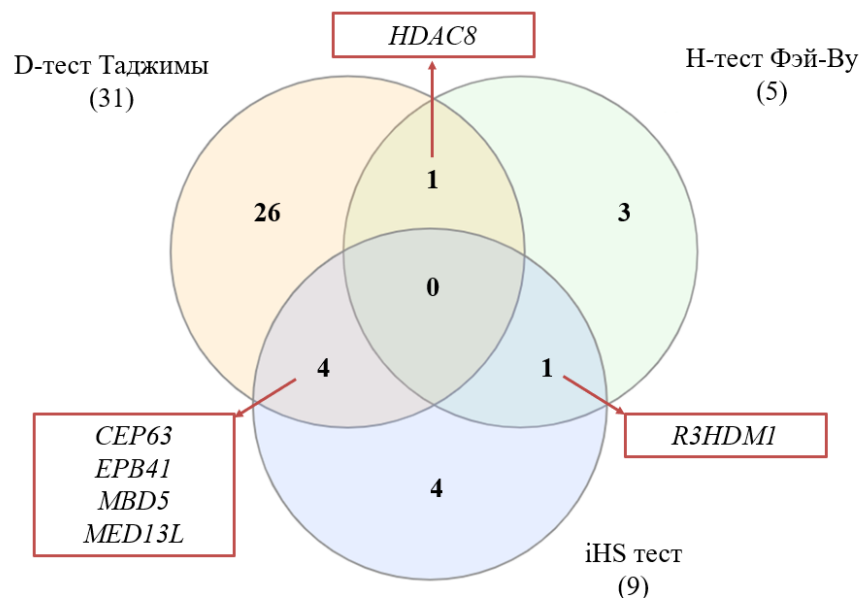


Рисунок 3.31 – Диаграмма Венна, демонстрирующая общность и специфичность генов, продемонстрировавших сигналы отбора по данным трех тестов

Интересно, что больше всего пересечений между D-тестом Таджимы, фиксирующим наиболее древнее действие естественного отбора, iHS тестом, детектирующим недавние события, что может говорить о стойком эволюционном давлении на определённые гены. Это может быть связано с многоступенчатой адаптацией, когда начальное действие отбора произошло в древних популяциях, а затем продолжилось или усилилось в более современных условиях; со стабилизирующим отбором, поддерживающим определённые аллели в популяции на протяжении тысячелетий; со сменой направленности отбора. Отсутствие при этом сигналов H-теста Фэй-Бу может объясняться следующими причинами: отбор действует на предковый аллель (iHS положительный), либо отбор ещё не привёл к высокой частоте производного аллеля.

Гены *CEP63* и *MBD5* демонстрируют положительные значения как D-теста Таджимы, так и теста iHS, что является интересным эволюционным

паттерном, указывающим на возможные процессы балансирующего или неоднозначного отбора, действовавшие в разные временные периоды. Сочетание положительных значений этих тестов может указывать на фазовую или циклическую селекцию, когда в разные периоды в истории популяции преимущество переходило от одного аллеля к другому, но оба сохранялись в популяции. Также стоит отметить, что ген *MBD5* демонстрирует интересный паттерн сигнала отбора, отражающий географически и временно разделённые селективные события: тест D положителен в Южно-Азиатской и Европейских метапопуляциях, а тест iHS – в Африканской метапопуляции. Такое сочетание балансирующего отбора в SAS и EUR и направленного отбора на предковый аллель в AFR может отражать гетерогенность селективного давления в разных мета-популяциях, возможно, в ответ на различные экологические, метаболические или иммунные стимулы. Продукт гена *MBD5* участвует в регуляции транскрипции и ремоделировании хроматина [126], влияет на нейрональное развитие. Ассоциирован с неврологическими и когнитивными нарушениями, включая аутизм и интеллектуальную недостаточность, что делает его вероятным объектом отбора, особенно в контексте адаптации ЦНС к средовым условиям. Ген *CER63* кодирует белок, участвующий в дупликации centrosомы и регуляции клеточного цикла [239]. Его мутации ассоциированы с микроцефалией, что делает этот ген чувствительным к естественному отбору, особенно в контексте развития мозга и пренатального роста.

У генов *EPB41* и *MED13L* наблюдается иная направленность значений двух тестов: отрицательные значения D-теста Таджимы и положительные значения теста iHS, что указывает на сложный и многоступенчатый характер отбора на данные локусы. С эволюционной точки зрения, такая комбинация может свидетельствовать о динамическом балансе между древним направленным отбором и более современными событиями, поддерживающими исходный (предковый) аллель, возможно, в связи с изменениями условий окружающей среды, эпигенетической регуляции или патогенами. К тому же, стоит уточнить, что для гена *MED13L* идентифицированы отрицательные D

значения только в Африканской метапопуляции, а положительные значения *iHS* исключительно в Европейской метапопуляции. Таким образом, противоположная направленность результатов по двум тестам может говорить о смене селекционных стратегий, действующих на разные временные шкалы и в разных популяциях, и отражать адаптивную значимость генов *EPB41* и *MED13L* в процессе эволюции. Ген *EPB41* кодирует белок, участвующий в формировании цитоскелета эритроцитов, критичен для механической устойчивости клеток крови [225]. Сигналы отбора на этот ген могут быть связаны с адаптацией к гематологическим нагрузкам, инфекциям, а также с потребностями в оптимальном кислородном транспорте. Продукт гена *MED13L* регулирует транскрипцию через медиаторный комплекс и играет ключевую роль в кардиогенезе и нейрогенезе [35]. Изменения в этом гене могут быть связаны с развитием врождённых пороков сердца и когнитивных нарушений.

Ген *HDAC8* демонстрирует сочетание положительных значений D-теста Таджимы и отрицательных значений H-теста Фэй-Ву. Такое расхождение между тестами может указывать на разновременные волны отбора, где в прошлом действовал балансирующий отбор, поддерживающий разнообразие, а затем – направленный отбор усилил распространение одного производного аллеля. Альтернативно, это может быть результатом «молодого» отбора в одной популяции при отсутствии отбора в других, что особенно актуально для гена *HDAC8*, сигналы отбора по которому H-теста Фэй-Ву были обнаружены только в европейской метапопуляции. Ген *HDAC8* кодирует гистондеацетилазу 8, участвующую в ремоделировании хроматина, экспрессии генов, дифференцировке и пролиферации клеток [185]. Нарушения функции *HDAC8* ассоциированы с синдромом Корнелии де Ланге [96].

У гена *R3HDM1* наблюдается сочетание отрицательных значений H-теста Фэй-Ву и положительных значений теста *iHS*, что указывает на признаки недавнего направленного отбора, направленного на предковый аллель. Данное сочетание может указывать на неполное замещение аллелей, когда несмотря на наличие производных аллелей, именно предковый вариант сохраняет

селективное преимущество в определённых условиях. Такое сочетание результатов обоих тестов может указывать на сложный процесс, возможно, связанный с локальной адаптацией, при которой сначала возник производный аллель и стал доминирующим в части популяций, но затем в определённой экологической или физиологической среде предковый аллель сохранился как более благоприятный. Также возможно, что мы наблюдаем разные фазы отбора в разных популяциях или влияние структуры популяции, когда сигналы одного теста отражают мета-популяционные, а другого – локальные эффекты. Ген *R3HDM1* кодирует белок с доменом R3H, предположительно участвующий в связывании нуклеиновых кислот и регуляции транскрипции. Хотя его функции изучены недостаточно, он рассматривается как элемент регуляторных сетей, особенно в нейроразвитии [122].

Далее проведен функциональный анализ обогащения генов, которые являются общими и специфичными для метапопуляций (Рисунок 3.32).

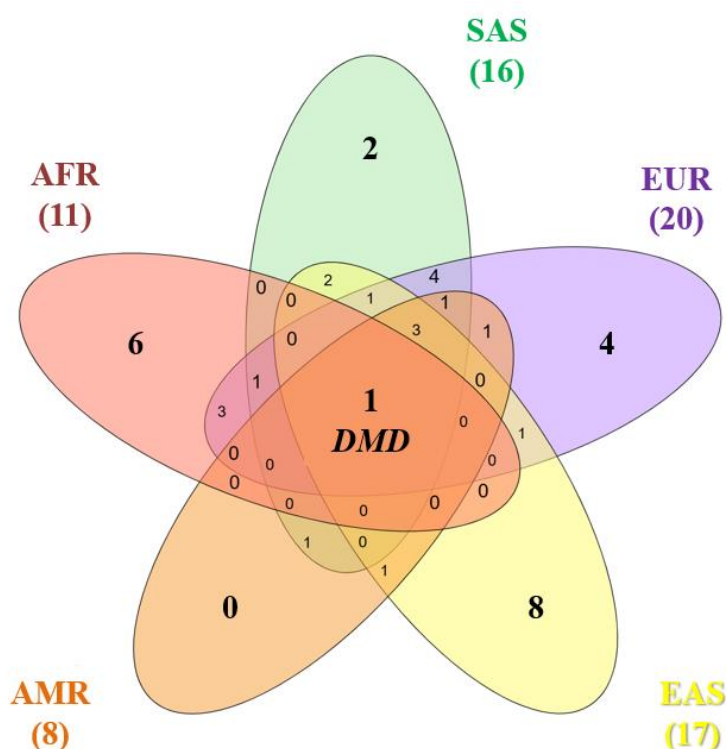


Рисунок 3.32 – Диаграмма Венна, демонстрирующая общность и специфичность дифференциально сплайсированных генов между метапопуляциями, проявивших сигналы отбора по трем тестам

На основании представленной диаграммы можно сделать несколько важных выводов о распределении признаков отбора между метапопуляциями. Универсальность сигнала по гену *DMD*, кодирующий белок дистрофин, во всех метапопуляциях указывает на его потенциальную эволюционную значимость и функциональную консервативность, вероятно, связанную с ключевыми биологическими функциями, включая поддержание мышечной структуры и физиологии, что может быть критически важно для жизнеспособности [191]. Превалирование уникальных генов в африканской метапопуляции (AFR, 50%) может отражать более древнее и богатое генетическое разнообразие, обусловленное тем, что именно Африка является прародиной современного человека [71]. Это также может свидетельствовать о локальных адаптациях, которые не наблюдаются в других регионах, а также о сложности интерпретации сигналов отбора в популяциях с высоким уровнем полиморфизма [268]. Высокая доля специфичных генов в восточноазиатской метапопуляции (EAS, 47%) может быть связана с специфическими экологическими и демографическими факторами, включая узкие генетические бутылочные горлышки или локальный отбор [179]. Европейская (EUR, 20%) и южноазиатская (SAS, 11,8%) метапопуляции демонстрируют меньшую долю уникальных генов, что может быть связано как с большей степенью схожести адаптивных процессов, так и с влиянием миграций и генетического смешения [293]. Отсутствие специфичных генов в американской метапопуляции (AMR) может объясняться её гибридным происхождением и высокой степенью генетической гетерогенности, обусловленной смешением европейских, африканских и индейских предков, что, возможно, нивелирует выраженность локальных сигналов отбора [391]. Таким образом, различия в количестве уникальных генов среди метапопуляций отражают не только историко-генетические и демографические различия, но также могут указывать на вариативные механизмы локальной адаптации, значимых для понимания эволюции и патогенеза сложных признаков.

Для генов *ABI3BP*, *AGO4*, *ALG13*, *COPS8*, *CUL4B*, *DMD*, *HDAC8*, *IMMP2L*, *MBD5*, *MED13L*, *MROH1*, *MTA3*, *PBRM1*, *POLD4*, *PPIL2*, *REEP1*, *SLC20A2*, *STAU2*, *TBCD* идентифицированы общие сигналы отбора для двух и более метапопуляций, что делает их особенно интересными с точки зрения эволюционной стабильности и функциональной значимости. Присутствие этих генов в различных континентальных популяциях может указывать на универсальные адаптивные преимущества, поддерживаемые в ходе эволюции человека [13, 14]. Особый интерес представляют ко-экспрессируемые пары *CUL4B-POLD4* и *CUL4B-COPS8*, что может свидетельствовать об их функциональной связанности в общих биологических путях, включая процессы репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и транскрипции. Такие молекулярные связи повышают вероятность того, что отбор действовал на функциональный модуль, а не на отдельный ген, влияя на фенотип. Большинство этих генов ассоциированы с фенотипическими признаками, отражающими нарушения краниофациального развития, опорно-двигательного аппарата и нейроразвития, включая: широко расставленные зубы, синофриз, гипертрихоз лица, неправильное расположение зубов; дистальный артрогрипоз, маленькую руку, гипертрофию скелетных мышц; нарушения речи, вокализации и коммуникации.

Наличие таких фенотипических ассоциаций указывает, что гены, общие для нескольких метапопуляций, являются консервативными и могут быть функционально значимыми для развития плода, включая формирование скелета, мышечной ткани, нейрональных цепей и речи. Это согласуется с тем, что задержка роста плода может быть не просто результатом неспецифических физиологических ограничений, а манифестацией адаптивных процессов, направленных на тонкую регуляцию развития в ответ на внешние или внутренние факторы.

Группы генов, демонстрирующих сигналы отбора исключительно в пределах отдельных метапопуляций, позволяют выявить регион-специфические эволюционные процессы и потенциальные адаптации к среде или патогенам,

характерным для определенных географических зон. Для Африканской метапопуляции (AFR) характерны гены: *ENAH*, *EPB41*, *ERI3*, *DNAL1*, *PBX4*, *RABGAP1*, *TCF3*. Эти гены преимущественно вовлечены в регуляцию транскрипции, клеточную миграцию, иммунный ответ, сигнальные пути роста и развитие нервной системы. Для Восточно-Азиатской метапопуляции (EAS) выявлены гены: *ANGPT1*, *CCDC68*, *CDYL2*, *CYBB*, *DNM1L*, *RBPMS*, *RNF111*, *ZNF331*, многие из которых связаны с ангиогенезом, эпигенетической регуляцией, митохондриальной функцией и иммунными механизмами. Для Южно-Азиатской метапопуляции (SAS) специфичными являются *CEP63*, *PPP2R5C* – гены, участвующие в контроле клеточного цикла и регуляции митотического деления. Для Европейской метапопуляции (EUR) идентифицированы *PLCB1*, *POLB*, *R3HDM1*, *SDCCAG8*. Они вовлечены в нейрональную сигнализацию, репарацию ДНК и организацию клеточного центра.

Несмотря на специфичность генов, можно выделить общие адаптационные направления: организация цитоскелета, регуляция клеточного цикла, ремоделирование хроматина, иммунный ответ и ангиогенез. Эти процессы критически важны для нормального эмбрионального и плацентарного развития, и нарушения в них лежат в основе акушерских патологий, в том числе, задержки роста плода. Таким образом, данные свидетельствуют о том, что в разных популяциях происходил отбор на одни и те же биологические функции, но через разные генетические мишени, что отражает универсальные механизмы адаптации к условиям, влияющим на внутриутробное развитие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые охарактеризован ландшафт альтернативного сплайсинга децидуальных клеток плаценты при неосложненной беременности и задержке роста плода, а также осуществлен поиск сигналов естественного отбора в формировании генетической архитектуры паттернов альтернативного сплайсинга, ассоциированных с задержкой роста плода, в современных популяциях человека. Комплексный подход, сочетающий транскриптомный и популяционно-генетический анализ, позволил выявить молекулярные особенности нарушений сплайсинга при ЗРП и сигналы естественного отбора, затрагивающие ключевые гены, вовлечённые в эти процессы.

Профили событий альтернативного сплайсинга показали, что бинарные аннотированные события являются наиболее частой категорией для всех исследуемых групп, тогда как самая редкая категория – комплексные события *de novo*. Среди бинарных аннотированных событий самым часто встречающимся событием стал пропуск экзона, тогда как для бинарных *de novo* событий – это удержание интрона. Интересно отметить, что как при изолированной, так и сочетанной задержке роста плода доля удержания интрона среди *de novo* событий АС превышает 70%, тогда как для физиологической беременности этот процент составляет 66%. Согласно литературным данным, удержание интрона может приводить к синтезу нефункциональных белков, поэтому можно предположить, что при ЗРП функциональность белков относительно снижена, либо некоторые белки не выполняют свои функции вообще. Самым редким событием в обоих случаях стал взаимоисключающий пропуск экзонов. Интересно, что среди *de novo* событий также почти не встречаются альтернативные первый и последний экзоны, тогда как их процент среди аннотированных событий превышает 14% и 7%, соответственно.

Анализ паттернов комплексных событий альтернативного сплайсинга в плацентарной ткани выявил тенденцию к увеличению количества комплексных

событий и их сложности в ряду $ФБ < сЗРП < ЗРП$. Такая динамика может отражать прогрессирующую активацию посттранскрипционных механизмов как части адаптационного ответа плаценты. Наиболее выраженная активация наблюдается при изолированной форме задержки роста плода, что может быть связано с большей сохранностью регуляторного потенциала по сравнению с сочетанной формой, при которой часть компенсаторных систем уже может быть нарушена.

Специфичные для физиологической беременности 423 гена преимущественно связаны с функционированием митохондрий, трансферазной активностью, связыванием коллагена, каталитической активностью РНК и сигнальным путем HIF-1 α . Специфичные для изолированной задержки роста плода 88 генов задействованы в поддержании клеточной полярности, иммунном ответе, фагоцитозе, связывании хроматина и кадгерина и сигнальном пути Hedgehog. Специфичные для сочетанной задержки роста плода 122 гена ассоциированы с процессами канонической передачи сигнала NF- κ B, синтеза и репарации ДНК, различными видами рака и сигнальным путем Notch. Общие для разных форм ЗРП 935 генов сверхпредставлены в таких биологических процессах, как апоптоз и сигнальный путь FAS, сигнальный путь Ras/Raf/MAPK, процессинг мРНК, метаболизм фосфолипидов. Почти 68% генов являются общими для трех фенотипов и задействованы в биологических процессах, связанных с метаболизмом РНК и сплайсингом, организацией и ремоделированием хроматина, клеточной адгезией и межклеточными взаимодействиями, передачей сигналов и деградацией белков. Кроме того, выявлено, что гены, обладающие максимальными значениями индекса сплайсинга, из числа общих пересекаются между исследуемыми состояниями, но имеют различное количество событий в зависимости от группы, в которой они идентифицированы.

Анализ дифференциального альтернативного сплайсинга генов децидуальных клеток плацентарной ткани в обследованных группах позволил выявить статистически значимые различия транскриптомного профиля при

сравнении здоровых и больных индивидов. Установлено, что 32 ДСГ между физиологической беременностью и изолированной задержкой роста плода связаны с клеточным циклом, регуляцией транспортной активности, трансэндотелиальной миграцией лейкоцитов и сигнальными путями PI3K-Akt и Wnt. Выявлено, что изменения в ландшафте альтернативного сплайсинга (33 ДСГ), связанные с патологическим процессом при сочетанной задержке роста плода в децидуальных клетках, находят отражение в процессах активности ГТФаз, организации цитоскелета, вирусном канцерогенезе, активности нуклеотидилтрансферазы. Выявлено, что три биологических процесса непосредственно совпадают между ДСГ при ФБ и ЗРП, и ФБ и сЗРП: клеточный гомеостаз мышечных клеток, репарация ДНК, протеолиз, опосредованный убиквитином – это связано с тем, что 10 генов являются общими между группами сравнений. Кроме того, в плацентарной ткани при сравнении двух групп задержки роста плода между собой идентифицированы 19 ДСГ, участвующие в таких процессах, как регуляция воспалительной реакции, регуляции реакции на цитокиновый стимул, запрограммированная некротическая гибель клеток, система врожденного иммунитета TLR и RLR, которые в совокупности могут привести к развитию сочетанной формы задержки роста плода с манифестацией преэклампсии и преждевременных родов.

Кроме того, для повышения достоверности полученных результатов и подтверждения их биологической значимости была проведена валидация на расширенной выборке для четырех генов с *de novo* событиями (*ACTN4*, *CLIP4*, *CYBB*, *PSG4*), характерных для изолированной задержки роста плода. Для трех генов (кроме *PSG4*) выявлены те же тренды дифференциального альтернативного сплайсинга между группами, что и на основной выборке, хотя не все различия достигли статистической значимости. Это может быть обусловлено расширением выборки с внесением биологической вариабельности или высокоэффективным синтезом кДНК, при котором сформировалось большое количество транскриптов и снизилась

чувствительность детекции. Интересным представляется то, что ген домашнего хозяйства *SDHA*, специфичный для плаценты и участвующий в окислительном фосфорилировании и цикле Кребса, продемонстрировал статистически значимое отличие между группами. Данный факт может свидетельствовать о возможной причинной роли митохондриальной дисфункции, связанной с недостаточной активностью *SDHA*. В то же время нельзя исключать и вторичный характер изменения экспрессии, возникающий как следствие уже существующих нарушений в плацентарной ткани, вызванных гипоксией или другими патологическими процессами.

Анализ дифференциального сплайсинга между выраженной и умеренной ЗРП продемонстрировал 84 ДСГ, ассоциированных с различными видами репарации ДНК, сигнальными путями ионных каналов, организацией пероксисом и лизосом, морфогенезом, ремоделированием хроматина и сигнальным путем SMAD. В гистологическом исследовании последа также обнаружены различия: в случае выраженной ЗРП преимущественно описаны как «выраженные/умеренные компенсаторные реакции и инволютивные изменения» и включали в себя участки интерстициального отека, застоя крови, снижение зрелости ворсин, наличие инфарктоподобных изменений и фибриноидов, тогда как в группе с умеренной ЗРП в основном встречаются «умеренные/слабо выраженные компенсаторные реакции».

Проведённый комплексный популяционно-генетический анализ с использованием D-теста Таджимы, H-теста Фэй-Бу, iHS теста позволил выявить гены, находящиеся под действием различных форм естественного отбора в популяциях человека, а также установить их возможную связь с биологическими процессами, ключевыми для эмбрионального развития и, в частности, патогенеза задержки роста плода. D-тест Таджимы позволил идентифицировать гены с признаками балансирующего отбора (положительные значения D) и направленного отбора (отрицательные значения D). Гены с положительными значениями D продемонстрировали свехпредставленность в биологических путях, связанных с регуляцией модификации белков,

фолдингом, организацией цитоскелета, негативной регуляцией иммунной системы и гомеостазом мышечных клеток. В то же время, гены с отрицательными значениями D были ассоциированы с репарацией ДНК, ферроптозом, биосинтезом ДНК, метаболизмом активных форм кислорода, а также развитием и функцией иммунной системы. H-тест Фэй-Ву позволил обнаружить гены с отрицательными значениями H, что указывает на позитивный отбор на производные аллели, особенно в регионах, где наблюдается избыток редких производных вариантов. Обогащение таких генов в путях, связанных с организацией пероксисом, митохондрий, эндоплазматического ретикулума, сигнальным путём TNF и клеточным циклом, указывает на активную адаптацию клеточных процессов, включая энергетический метаболизм и гибель клеток, к специфическим условиям окружающей среды. Тест iHS, чувствительный к недавнему интенсивному отбору, выявил гены с положительными значениями, что свидетельствует о длинных гаплотипах вокруг предковых аллелей, находящихся под отбором. Гены задействованы в процессах клеточного цикла, ремоделирования хроматина и организации цитоскелета.

Особый интерес представляет выявление перекрывающихся сигналов между самым «древним» и «молодым» тестами: в четырёх генах (*MED13L*, *MBD5*, *EPB41*, *R3HDM1*) наблюдались сигналы как D-теста Таджикимы, так и iHS теста. Это может свидетельствовать о продолжительном действии отбора и возможной консервации адаптивных эффектов. В частности, ген *MED13L*, важный для транскрипционной регуляции, показал разные направления отбора в разных метапопуляциях, что может отражать влияние факторов локальной адаптации. Также обнаружено, что гены с признаками отбора в разных метапопуляциях (AFR, EAS, EUR, SAS, AMR) могут быть уникальными, но при этом участвовать в сходных биологических процессах, таких как регуляция транскрипции, репарация ДНК, иммунные функции и клеточная организация. Это указывает на функциональную конвергенцию, при которой отбор действовал на различные гены, обеспечивая адаптацию к универсальным

биологическим требованиям. Такие данные подкрепляют гипотезу о наличии разных молекулярных путей, ведущих к одинаковым адаптивным фенотипам. Таким образом, мульти-тестовый подход, объединяющий различные временные масштабы отбора и популяционную структуру, позволил не только выявить ключевые гены-кандидаты, но и определить биологические процессы, играющие потенциальную роль в патогенезе задержки роста плода. Результаты подчеркивают значимость системного эволюционного подхода в исследованиях генетических основ сложных фенотипов.

Подводя итог, можно сказать о том, что проведенное исследование формирует представление о роли альтернативного сплайсинга в патогенетике многофакторных заболеваний и в частности расширяет понимание молекулярных механизмов задержки роста плода. Объединённый транскриптомный и популяционно-генетический анализ показал, что ландшафт альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плацентарной ткани при ЗРП представляет собой сложную адаптационную систему, чувствительную к действию как внутреннего патологического фона, так и к генетической архитектуре популяции. Выявленные транскриптомные изменения и сигналы отбора формируют основу для дальнейших исследований функциональной роли альтернативного сплайсинга в патогенезе задержки роста плода и возможных мишеней для терапии или диагностики.

ВЫВОДЫ

1. Задержка роста плода ассоциирована с увеличением числа событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты по сравнению с физиологической беременностью. В контрольной группе зафиксированы 8483 события у 4061 гена, тогда как при изолированной задержке роста плода отмечено 10039 событий у 4598 генов, а при сочетанной форме – 10180 событий у 4653 генов.
2. При задержке роста плода изменяется структура и относительная представленность отдельных типов событий альтернативного сплайсинга в сравнении с физиологической беременностью. Для аннотированных событий показано статистически значимое снижение частоты альтернативного первого экзона в группах с изолированной и сочетанной задержкой роста плода по сравнению с физиологической беременностью ($p=0,049$ и $p=0,047$, соответственно), тогда как для *de novo* событий – возрастание частоты удержания интрона ($p=0,006$ и $p=0,006$, соответственно).
3. Изолированная и сочетанная формы задержки роста плода различаются по спектру генов и событий альтернативного сплайсинга. При изолированной задержке роста плода 88 специфично альтернативно сплайсированных гена преимущественно связаны с иммунной регуляцией, фагоцитозом и клеточной адгезией, тогда как при сочетанной форме 122 гена задействованы в канонической передаче сигнала NF-карраВ, процессах синтеза и репарации ДНК и онкогенных путях.
4. При сравнении физиологической и патологической беременностей выявлены различия в профиле дифференциального альтернативного сплайсинга децидуальных клеток плаценты. Для изолированной формы задержки роста плода установлены 32 гена, вовлечённые в сигнальные пути PI3K-Akt и Wnt, регуляцию клеточного цикла и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов. При сочетанной задержке роста плода идентифицированы изменения в сплайсинге 33 генов,

- ассоциированных с регуляцией активности ГТФаз, нуклеотидилтрансфераз и организацией цитоскелета.
5. Тяжесть течения задержки роста плода ассоциирована с особенностями паттернов альтернативного сплайсинга: среди бинарных аннотированных событий статистически значимые различия приходятся на альтернативный первый экзон ($p=0,004$) и пропуск экзона ($p=0,012$), среди бинарных *de novo* событий – на альтернативный первый экзон ($p=0,014$) и удержание интрона ($p<0,001$).
 6. Дифференциально сплайсированные гены между выраженной и умеренной ЗРП ($N = 84$) вовлечены в регуляцию апоптоза, аутофагии, морфогенеза и клеточного гомеостаза, что согласуется с гистологической картиной последа.
 7. В развитии задержки роста плода имеет значение популяционно-специфичная компонента, поскольку 26% дифференциально сплайсированных генов демонстрируют сигналы естественного отбора. Эти гены ассоциированы с заболеваниями нервной системы, нарушениями когнитивного развития, врождёнными пороками и репродуктивными потерями, подчёркивая их клиническую значимость.
 8. Гены, для которых обнаружены сигналы отбора в двух и более метапопуляциях, принимают участие в формировании фенотипических признаков, отражающих нарушения краниофасциального развития, опорно-двигательного аппарата и развития нервной системы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A3SS – альтернативный 3'-сайт сплайсинга

A5SS – альтернативный 5'-сайт сплайсинга

AFE – альтернативный первый экзон

AFR – Африканская метапопуляция

ALE – альтернативный последний экзон

AMR – Американская метапопуляция

CEU – европеоиды (штат Юта, США)

CHB – китайцы (г. Пекин)

CHS – китайцы (Южный Китай)

CPM (count per million) – количество прочтений транскрипта в миллионе прочтений

deltaPSI (Delta Percent Spliced In) – относительный процентный индекс сплайсинга

EAS – Восточно-Азиатская метапопуляция

ES – пропуск экзона

EUR – Европейская метапопуляция

FDR (False Discovery Rate) – частота ложного обнаружения

FIN – финны (Финляндия)

GBR – британцы (Англия и Шотландия)

iHS (The Integrated Haplotype Score) – интегрированная оценка гаплотипа

IR – удержание интрона

JPT – японцы (г. Токио)

KEGG – Киотская энциклопедия генов и геномов (англ. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

LSV (Local Splicing Variations) – локальные вариации сплайсинга

MXE – взаимоисключающие экзоны

NGS – секвенирование следующего поколения, массовое параллельное секвенирование (англ. Next-Generation Sequencing)

NMD (nonsense-mediated decay) – нонсенс-опосредованный распад

PCR – (polymerase chain reaction) полимеразная цепная реакция

PSI (Percent Spliced In) – предельный процентный индекс сплайсинга

Real-Time PCR – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

RIN (The RNA Integrity Number) – индекс целостности РНК

RNA-seq (RNA-sequencing) – секвенирование РНК

SAS – Южно-Азиатская метапопуляция

sQTL (splicing quantitative trait locus) – локусы количественных признаков сплайсинга

TaqMan-зонд – флуоресцентно меченый зонд

Webgestalt – Набор инструментов для анализа генов SeT на веб-основе (англ. WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit)

YRI – йоруба (г. Ибадан, Нигерия)

ААС – аберрантный альтернативный сплайсинг

АС – альтернативный сплайсинг

БАС – большие акушерские синдромы

вЗРП – выраженная задержка роста плода

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ГТФ – гуанозинтрифосфат

гяРНП – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин

ДСГ – дифференциально сплайсированный ген

ДС – дифференциальный сплайсинг мРНК

ДК – децидуальные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗРП – задержка роста плода

ИМТ – индекс массы тела

кДНК – комплементарная ДНК

КС – конститутивный сплайсинг

МГВ – малый для гестационного возраста

мРНК – матричная РНК

МФЗ – многофакторное заболевание

мяРНП – малый ядерный рибонуклеопротеин

ОЖ – окружность живота

ПМП – предполагаемая масса плода

ПР – преждевременные роды

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭ – преэклампсия

РНК – рибонуклеиновая кислота

РОАГ – Российское общество акушеров-гинекологов.

сЗРП – сочетанная задержка роста плода

уЗРП – умеренная задержка роста плода

УПС – убиквитин-протеасомная система

ФБ – физиологическая беременность

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айламазян Э.К., Степанова О.И., Сельков С.А., Соколов Д.И. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «Конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т. 68. – №11. – С. 12–21.
2. Бабовская А.А., Трифонова Е.А., Сереброва В.Н., и др. Протокол полнотранскриптомного анализа децидуальных клеток плаценты // Молекулярная биология. – 2022. – Т. 56. – № 2 – С. 325–333.
3. Баранов В.С. Геномика и предиктивная медицина // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2021. – Т. 36. – №. 4. – С. 14–28.
4. Гавриленко М.М., Трифонова Е.А., Бабовская А.А., и др. Подходы к анализу событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты человека // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2025. – №. 69. – С. 48–57.
5. Гавриленко М.М., Трифонова Е.А., Степанов В.А. Полногеномный анализ в изучении патогенетики задержки роста плода // Генетика. – 2024. – Т. 60. – №. 8. – С. 3–17.
6. Горюнова А.Г., Симонова М.С., Мурашко А.В. Синдром задержки роста плода и адаптация плаценты // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. – 2016. – Т. 3. – №2. – С. 76–80.
7. Клинические рекомендации: Недостаточный рост плода, требующий предоставления медицинской помощи матери (задержка роста плода).
8. Курцер М.А., Сичинава Л.Г., Алажажи А.О. и др. Ангиогенные факторы (sFlt-1, PlGF) у беременных с двойней и плацента-ассоциированными осложнениями // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2022. – Т. 16. – №. 5. – С. 541–551.
9. Орлов А.В., Кудинова Е.И. Этиопатогенетические аспекты развития плацентарной недостаточности и задержки роста плода // Журнал

- фундаментальной медицины и биологии. – 2017. – №. 4. – С. 4–10.
10. Пузырев В. П. Медицинская патогенетика // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 18. – №. 1. – С. 7–21.
 11. Пузырев В.П., Кучер А.Н. Эволюционно-онтогенетические аспекты патогенетики хронических болезней человека // Генетика. – 2011. – Т. 47. – №. 12. – С. 1573–1573.
 12. Романов А.Ю., Долгушина Н.В. Фолиевая кислота, прегравидарная подготовка и беременность: современные аспекты // Медицинский совет. – 2021. – №. 3. – С. 50–53.
 13. Степанов В.А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонафицированная медицина // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2010. – Т. 2. – №. 4. – С. 18–34.
 14. Степанов В. А. Эволюция генетического разнообразия и болезни человека // Генетика. – 2016. – Т. 52. – №. 7. – С. 852–864.
 15. Трифонова Е.А., Бабовская А.А., Зарубин А.А., и др. Транскриптомное исследование клеток плаценты при преэклампсии как эффективный инструмент персонализированной медицины // Генетика. – 2023. – Т. 59. – №. 12. – С. 1427–1439.
 16. Трифонова Е.А., Гавриленко М.М., Бабовская А.А., и др. Ландшафт альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты при физиологической беременности // Генетика. – 2022. – Т. 58. – №. 10. – С. 1210–1220.
 17. Трифонова Е.А., Марков А.В., Зарубин А.А., и др. Транскриптомика плацентарной ткани как инструмент для идентификации молекулярных механизмов больших акушерских синдромов // Молекулярная биология. – 2025. – Т. 59. – №. 2. – С. 212–233.
 18. Трифонова Е.А., Марков А.В., Степанов И.А., и др. Транскриптомика плацентарной ткани: идентификация молекулярных механизмов и мишеней для таргетной терапии больших акушерских синдромов // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19. – №. 11. – С. 73–75.

19. Ødegård, R.A., Vatten, L.J., Nilsen, S.T., et al. Preeclampsia and fetal growth // *Obstetrics & Gynecology*. – 2000. – Vol. 96. – № 6 – P. 950–955.
20. Akey J.M. Constructing genomic maps of positive selection in humans: Where do we go from here? // *Genome Research*. – 2009. – Vol. 19. – № 5 – P. 711–722.
21. Albrecht E.D., Pepe G.J. Regulation of Uterine Spiral Artery Remodeling: a Review // *Reproductive Sciences*. – 2020. – Vol. 27. – № 10 – P. 1932–1942.
22. Albu A.R., Anca A.F., Horhoianu V.V., Horhoianu I.A. Predictive factors for intrauterine growth restriction // *Journal of medicine and life*. – 2014. – Vol. 7. – №. 2. – P. 165.
23. Álvarez-Aznar A., Muhl L., Gaengel K. VEGF Receptor Tyrosine Kinases // *Current Topics in Developmental Biology*. – 2017. – Vol. 123 – P. 433–482.
24. Ananth C.V., Wen S.W. Trends in fetal growth among singleton gestations in the United States and Canada, 1985 through 1998 // *Seminars in Perinatology*. – 2002. – Vol. 26. – № 4 – P. 260–267.
25. Andérica-Romero A.C., González-Herrera I.G., Santamaría A., et al. Cullin 3 as a novel target in diverse pathologies // *Redox Biology*. – 2013. – Vol. 1. – № 1 – P. 366–372.
26. Anders S., Reyes A., Huber W. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data // *Genome Research*. – 2012. – Vol. 22. – № 10 – P. 2008–2017.
27. Ando N., Hirahara F., Fukushima J., et al. Differential Gene Expression of TGF- β Isoforms and TGF- β Receptors During the First Trimester of Pregnancy at the Human Maternal-Fetal Interface // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 1998. – Vol. 40. – № 1 – P. 48–56.
28. Andraweera P.H., Dekker G.A., Roberts C.T. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes // *Human Reproduction Update*. – 2012. – Vol. 18. – № 4 – P. 436–457.
29. Angst B.D., Marcozzi C., Magee A.I. The cadherin superfamily: diversity in form and function // *Journal of Cell Science*. – 2001. – Vol. 114. – № 4 – P. 629–641.

30. Aplin J.D., Mylona P., Kielty C.M., et al. Collagen VI and Laminin as Markers of Differentiation of Endometrial Stroma // *Molecular and Cellular Aspects of Periimplantation Processes*. – 1995. – P. 331–351.
31. Ardley H.C., Robinson P.A. E3 ubiquitin ligases // *Essays in Biochemistry*. – 2005. – Vol. 41 – P. 15–30.
32. Arman E., Haffner-Krausz R., Chen Y., et al. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95. – № 9 – P. 5082–5087.
33. Armant D.R. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells // *Developmental Biology*. – 2005. – Vol. 280. – № 2 – P. 260–280.
34. Armant D.R., Fritz R., Kilburn B.A., et al. Reduced expression of the epidermal growth factor signaling system in preeclampsia // *Placenta*. – 2015. – Vol. 36. – № 3 – P. 270–278.
35. Asadollahi R., Oneda B., Sheth F., et al. Dosage changes of MED13L further delineate its role in congenital heart defects and intellectual disability // *European Journal of Human Genetics*. – 2013. – Vol. 21. – № 10 – P. 1100–1104.
36. Ashar-Patel A., Kaymaz Y., Rajakumar A. et al. FLT1 and transcriptome-wide polyadenylation site (PAS) analysis in preeclampsia // *Scientific reports*. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 12139.
37. Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology // *Nature Genetics*. – 2000. – Vol. 25. – № 1 – P. 25–29.
38. Avagliano L., Bulfamante G.P., Morabito A., et al. Abnormal spiral artery remodelling in the decidual segment during pregnancy: from histology to clinical correlation // *Journal of Clinical Pathology*. – 2011. – Vol. 64. – № 12 – P. 1064–1068.
39. Ayaz A. Uzunhan T.A., Aydin K. Interacting with AP1 complex mutated synergin gamma (SYNRG) reveals a novel coatopathy in the form of

- complicated hereditary spastic paraplegia // *Brain and Development*. – 2022. – T. 44. – №. 5. – C. 329–335.
40. Balaram P., John M., Rajalekshmy T.N., et al. Expression of epidermal growth factor receptor in gestational trophoblastic diseases // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 1997. – Vol. 123. – № 3 – P. 161–166.
 41. Barbitoff Y.A., Tsarev A.A., Vashukova E.S., et al. A Data-Driven Review of the Genetic Factors of Pregnancy Complications // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 9 – P. 3384.
 42. Barbosa-Morais N.L., Irimia M., Pan Q., et al. The Evolutionary Landscape of Alternative Splicing in Vertebrate Species // *Science*. – 2012. – Vol. 338. – № 6114 – P. 1587–1593.
 43. Barry J.S., Rozance P.J., Anthony R.V. An Animal Model of Placental Insufficiency-Induced Intrauterine Growth Restriction // *Seminars in Perinatology*. – 2008. – Vol. 32. – № 3 – P. 225–230.
 44. Beard W.A., Wilson S.H. Structure and Mechanism of DNA Polymerase β // *Chemical Reviews*. – 2006. – Vol. 106. – № 2 – P. 361–382.
 45. Behera S., Catreux S., Rossi M., et al. Comprehensive and accurate genome analysis at scale using DRAGEN accelerated algorithms // 2024.
 46. Bendix I., Miller S.L., Winterhager E. Editorial: Causes and Consequences of Intrauterine Growth Restriction // *Frontiers in Endocrinology*. – 2020. – Vol. 11 – P. 205.
 47. Bentley L. The imprinted region on human chromosome 7q32 extends to the carboxypeptidase A gene cluster: an imprinted candidate for Silver-Russell syndrome // *Journal of Medical Genetics*. – 2003. – Vol. 40. – № 4 – P. 249–256.
 48. Berget S.M., Moore C., Sharp P.A. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1977. – Vol. 74. – № 8 – P. 3171–3175.
 49. Bhadra M., Howell P., Dutta S., et al. Alternative splicing in aging and longevity // *Human Genetics*. – 2020. – Vol. 139. – № 3 – P. 357–369. –

50. Bhagirath A.Y., Medapati M.R., De Jesus V.C., et al. Role of Maternal Infections and Inflammatory Responses on Craniofacial Development // *Frontiers in Oral Health*. – 2021. – Vol. 2 – P. 735634.
51. Biamonti G., Amato A., Belloni E., et al. Alternative splicing in Alzheimer's disease // *Aging Clinical and Experimental Research*. – 2021. – Vol. 33. – № 4 – P. 747–758.
52. Bioinformatics B. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Электронный ресурс].
53. Blagitko N. Human GRB10 is imprinted and expressed from the paternal and maternal allele in a highly tissue- and isoform-specific fashion // *Human Molecular Genetics*. – 2000. – Vol. 9. – № 11 – P. 1587–1595.
54. Blencowe B.J. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2000. – Vol. 25. – № 3 – P. 106–110.
55. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30. – № 15 – P. 2114–2120.
56. Boulanger H., Drouin D., Largilliere C., et al. Intrauterine growth restriction, soluble fms-like tyrosine kinase-1 to placental growth factor ratio increase and preeclampsia // *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*. – 2019. – Vol. 48. – № 8 – P. 695–697.
57. Bourikas D., Pekarik V., Baeriswyl T., et al. Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord // *Nature Neuroscience*. – 2005. – Vol. 8. – № 3 – P. 297–304.
58. Boutz P.L., Bhutkar A., Sharp P.A. Detained introns are a novel, widespread class of post-transcriptionally spliced introns // *Genes & development*. – 2015. – T. 29. – № 1. – C. 63–80.
59. Bray N.L., Pimentel H., Melsted P., et al. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification // *Nature Biotechnology*. – 2016. – Vol. 34. – № 5 – P. 525–527.
60. Brighton P.J., Maruyama Y., Fishwick K., et al. Clearance of senescent

- decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium // *eLife*. – 2017. – Vol. 6 – P. e31274.
61. Brosens I., Pijnenborg R., Vercruysse L., et al. The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2011. – Vol. 204. – № 3 – P. 193–201.
 62. Brosens I., Puttemans P., Benagiano G. Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2019. – Vol. 221. – № 5 – P. 437–456.
 63. Brosens J.J., Parker M.G., McIndoe A., et al. A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2009. – Vol. 200. – № 6 – P. 615.e1-615.e6.
 64. Brosens J.J., Pijnenborg R., Brosens I.A. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2002. – Vol. 187. – № 5 – P. 1416–1423.
 65. Brun S., Pennamen P., Mattuizzi A., et al. Interest of chromosomal microarray analysis in the prenatal diagnosis of fetal intrauterine growth restriction // *Prenatal Diagnosis*. – 2018. – Vol. 38. – № 13 – P. 1111–1119. – DOI: 10.1002/pd.5372.
 66. Bryant A.S., Worjloh A., Caughey A.B., et al. Racial/ethnic disparities in obstetric outcomes and care: prevalence and determinants // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2010. – Vol. 202. – № 4 – P. 335–343.
 67. Buratti E., Baralle F.E. Influence of RNA Secondary Structure on the Pre-mRNA Splicing Process // *Molecular and Cellular Biology*. – 2004. – Vol. 24. – № 24 – P. 10505–10514.
 68. Burton G.J., Jauniaux E. What is the placenta? // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2015. – Vol. 213. – № 4 – P. S6.e1-S6.e4.
 69. Butel J.S. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease // *Carcinogenesis*. – 2000. – Vol. 21. – № 3 – P.

- 405–426.
70. Campagnoni A.T., Sorg B., Roth H.J., et al. Expression of myelin protein genes in the developing brain // *Journal de physiologie*. – 1987. – Vol. 82. – №. 4. – P. 229-238.
 71. Campbell M.C., Tishkoff S.A. African Genetic Diversity: Implications for Human Demographic History, Modern Human Origins, and Complex Disease Mapping // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. – 2008. – Vol. 9. – № 1 – P. 403–433.
 72. Casillas S., Mulet R., Villegas-Mirón P., et al. PopHuman: the human population genomics browser // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46. – № D1 – P. D1003–D1010.
 73. Chang Y.-S., Chen C.-N., Jeng S.-F., et al. The sFlt-1/PlGF ratio as a predictor for poor pregnancy and neonatal outcomes // *Pediatrics & Neonatology*. – 2017. – Vol. 58. – № 6 – P. 529–533.
 74. Charnock-Jones D.S., Burton G.J. Placental vascular morphogenesis // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. – 2000. – Vol. 14. – № 6 – P. 953–968.
 75. Chataway T.K., Whittle A.M., Lewis M.D., et al. Two-dimensional mapping and microsequencing of lysosomal proteins from human placenta // *Placenta*. – 1998. – Vol. 19. – № 8 – P. 643–654.
 76. Chathoth K.T., Barrass J.D., Webb S., et al. A Splicing-Dependent Transcriptional Checkpoint Associated with Prespliceosome Formation // *Molecular Cell*. – 2014. – Vol. 53. – № 5 – P. 779–790.
 77. Chebli K., Gattoni R., Schmitt P., et al. The 216-nucleotide intron of the E1A pre-mRNA contains a hairpin structure that permits utilization of unusually distant branch acceptors. // *Molecular and Cellular Biology*. – 1989. – Vol. 9. – № 11 – P. 4852–4861.
 78. Chen H., Chen Y., Zheng Q. The regulated cell death at the maternal-fetal interface: beneficial or detrimental? // *Cell Death Discovery*. – 2024. – Vol. 10. – № 1 – P. 100.

- 79.Chen M., Manley J.L. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2009. – Vol. 10. – № 11 – P. 741–754.
- 80.Chiu I.M., Wang W.P., Lehtoma K. Alternative splicing generates two forms of mRNA coding for human heparin-binding growth factor 1 // *Oncogene*. – 1990. – Vol. 5. – №. 5. – P. 755–762.
- 81.Choi H., Rauh V., Garfinkel R., et al. Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Risk of Intrauterine Growth Restriction // *Environmental Health Perspectives*. – 2008. – Vol. 116. – № 5 – P. 658–665.
- 82.Chow L.T., Gelinas R.E., Broker T.R., et al. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA // *Cell*. – 1977. – Vol. 12. – № 1 – P. 1–8.
- 83.Chowdhury B., Porter E.G., Stewart J.C., et al. PBRM1 Regulates the Expression of Genes Involved in Metabolism and Cell Adhesion in Renal Clear Cell Carcinoma // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 4 – P. e0153718.
- 84.Clark A.M., Garland K.K., Russell L.D. Desert hedgehog (Dhh) Gene Is Required in the Mouse Testis for Formation of Adult-Type Leydig Cells and Normal Development of Peritubular Cells and Seminiferous Tubules // *Biology of Reproduction*. – 2000. – Vol. 63. – № 6 – P. 1825–1838.
- 85.Clark D., Smith S., Licence D., et al. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation // *Journal of Endocrinology*. – 1998. – Vol. 159. – № 3 – P. 459–467.
- 86.Clemente L., Bird I.M. The epidermal growth factor receptor in healthy pregnancy and preeclampsia // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2023. – Vol. 70. – № 1 – P. e220105.
- 87.Clevers H., Nusse R. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease // *Cell*. – 2012. – Vol. 149. – № 6 – P. 1192–1205.
- 88.Conroy A.L., Silver K.L., Zhong K., et al. Complement Activation and the

- Resulting Placental Vascular Insufficiency Drives Fetal Growth Restriction Associated with Placental Malaria // *Cell Host & Microbe*. – 2013. – Vol. 13. – № 2 – P. 215–226.
- 89.Cornish E.F., McDonnell T., Williams D.J. Chronic Inflammatory Placental Disorders Associated With Recurrent Adverse Pregnancy Outcome // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13 – P. 825075.
- 90.Cowden Dahl K.D., Fryer B.H., Mack F.A., et al. Hypoxia-Inducible Factors 1 α and 2 α Regulate Trophoblast Differentiation // *Molecular and Cellular Biology*. – 2005. – Vol. 25. – № 23 – P. 10479–10491.
- 91.Cross J.C., Nakano H., Natale D.R.C., et al. Branching morphogenesis during development of placental villi // *Differentiation*. – 2006. – Vol. 74. – № 7 – P. 393–401.
- 92.Cummings M., Mappa G., Orsi N.M. Laser Capture Microdissection and Isolation of High-Quality RNA from Frozen Endometrial Tissue // *Laser Capture Microdissection*. – 2018. – Vol. 1723 – P. 155–166.
- 93.Dai S., Wang Z., Pan X., et al. ACTN4 Gene Mutations and Single Nucleotide Polymorphisms in Idiopathic Focal Segmental Glomerulosclerosis // *Nephron Clinical Practice*. – 2009. – Vol. 111. – № 2 – P. c87–c94.
- 94.De Vienne D. What is a phenotype? History and new developments of the concept // *Genetica*. – 2022. – Vol. 150. – № 3–4 – P. 153–158.
- 95.De Wolf F., De Wolf-Peeters C., Brosens I., et al. The human placental bed: Electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 1980. – Vol. 137. – № 1 – P. 58–70.
- 96.Deardorff M.A., Bando M., Nakato R., et al. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle // *Nature*. – 2012. – Vol. 489. – № 7415 – P. 313–317.
- 97.Degtyareva E.A., Zakharova O.A., Kufa M.A., et al. The efficacy of prognosis and early diagnostics of fetal growth retardation // *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics)*. –

2018. – Vol. 63. – № 6 – P. 37–45.
- 98.Dejmek J., Solanský I., Benes I., et al. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. // *Environmental Health Perspectives*. – 2000. – Vol. 108. – № 12 – P. 1159–1164.
 - 99.Delorme-Axford E., Sadovsky Y., Coyne C.B. The Placenta as a Barrier to Viral Infections // *Annual Review of Virology*. – 2014. – Vol. 1. – № 1 – P. 133–146.
 - 100.Deng J., Bai X., Feng X., et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression // *BMC Cancer*. – 2019. – Vol. 19. – № 1 – P. 618.
 - 101.Denley A., Bonython E.R., Booker G.W., et al. Structural Determinants for High-Affinity Binding of Insulin-Like Growth Factor II to Insulin Receptor (IR)-A, the Exon 11 Minus Isoform of the IR // *Molecular Endocrinology*. – 2004. – Vol. 18. – № 10 – P. 2502–2512.
 - 102.Di Renzo G.C. The Great Obstetrical Syndromes // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. – 2009. – Vol. 22. – № 8 – P. 633–635.
 - 103.Dominguez F., Yáñez-Mó M., Sanchez-Madrid F., et al. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? // *The FASEB Journal*. – 2005. – Vol. 19. – № 9 – P. 1056–1060.
 - 104.Domokos A., Varga Z., Jambrovics K. et al. The transcriptional control of the VEGFA-VEGFR1 (FLT1) axis in alternatively polarized murine and human macrophages // *Frontiers in immunology*. – 2023. – T. 14. – C. 1168635.
 - 105.Donigan K.A., Sun K., Nemec A.A., et al. Human POLB Gene Is Mutated in High Percentage of Colorectal Tumors // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 28 – P. 23830–23839.
 - 106.Du H., Cline M.S., Osborne R.J., et al. Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 17. – № 2 – P. 187–

- 193.
107. Dunk C., Kwan M., Hazan A., et al. Failure of Decidualization and Maternal Immune Tolerance Underlies Uterovascular Resistance in Intra Uterine Growth Restriction // *Frontiers in Endocrinology*. – 2019. – Vol. 10 – P. 160.
 108. Edery P., Alix E., Clerget-Darpoux F., et al. Développement embryonnaire précoce: Un grand rôle pour un petit ARN // *médecine/sciences*. – 2012. – Vol. 28. – № 2 – P. 130–133.
 109. Ehrenreich I.M., Pfennig D.W. Genetic assimilation: a review of its potential proximate causes and evolutionary consequences // *Annals of Botany*. – 2016. – Vol. 117. – № 5 – P. 769–779.
 110. Ergun A., Doran G., Costello J.C., et al. Differential splicing across immune system lineages // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – № 35 – P. 14324–14329.
 111. Fabi F., Grenier K., Parent S., et al. Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 5 – P. e0177387.
 112. Fair B., Buen Abad Najar C.F., Zhao J., et al. Global impact of unproductive splicing on human gene expression // *Nature Genetics*. – 2024. – Vol. 56. – № 9 – P. 1851–1861.
 113. Faxén M., Nasiell J., Blanck A., et al. Altered mRNA Expression Pattern of Placental Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in Pregnancies Complicated by Preeclampsia and/or Intrauterine Growth Retardation // *American Journal of Perinatology*. – 1998. – Vol. 15. – № 01 – P. 9–13.
 114. Fay J.C., Wu C.-I. Hitchhiking Under Positive Darwinian Selection // *Genetics*. – 2000. – Vol. 155. – № 3 – P. 1405–1413.
 115. Feng L., Liao W., Luo Q., et al. Caveolin-1 orchestrates fibroblast growth factor 2 signaling control of angiogenesis in placental artery endothelial cell caveolae // *Journal of Cellular Physiology*. – 2012. – Vol. 227. – № 6 – P. 2480–2491.
 116. Feng Y., Chen X., Wang H., et al. Collagen I Induces Preeclampsia-Like

- Symptoms by Suppressing Proliferation and Invasion of Trophoblasts // *Frontiers in Endocrinology*. – 2021. – Vol. 12 – P. 664766.
- 117.Fletcher D.A., Mullins R.D. Cell mechanics and the cytoskeleton // *Nature*. – 2010. – Vol. 463. – № 7280 – P. 485–492.
- 118.Fondacci C., Alsat E., Gabriel R., et al. Alterations of human placental epidermal growth factor receptor in intrauterine growth retardation. // *Journal of Clinical Investigation*. – 1994. – Vol. 93. – № 3 – P. 1149–1155.
- 119.Frew E., Sainty R., Chappell-Maor L., et al. Differential expression of *PPP1R12A* transcripts, including those harbouring alternatively spliced micro-exons, in placentae from complicated pregnancies // *Placenta*. – 2024. – Vol. 151 – P. 1–9.
- 120.Frisbie W.P., Biegler M., De Turk P., et al. Racial and ethnic differences in determinants of intrauterine growth retardation and other compromised birth outcomes // *American Journal of Public Health*. – 1997. – Vol. 87. – № 12 – P. 1977–1983.
- 121.Fu R.-H., Liu S.-P., Huang S.-J., et al. Aberrant Alternative Splicing Events in Parkinson's Disease // *Cell Transplantation*. – 2013. – Vol. 22. – № 4 – P. 653–661.
- 122.Fukushi D., Inaba M., Katoh K., et al. *R3HDM1* haploinsufficiency is associated with mild intellectual disability // *American Journal of Medical Genetics Part A*. – 2021. – Vol. 185. – № 6 – P. 1776–1786.
- 123.Ge Y., Porse B.T. The functional consequences of intron retention: alternative splicing coupled to NMD as a regulator of gene expression // *Bioessays*. – 2014. – T. 36. – №. 3. – C. 236–243.
- 124.Gellersen B., Kempf R., Telgmann R., et al. Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. // *Molecular Endocrinology*. – 1994. – Vol. 8. – № 3 – P. 356–373.
- 125.Gellersen B., Brosens I., Brosens J. Decidualization of the Human Endometrium: Mechanisms, Functions, and Clinical Perspectives // *Seminars*

- in Reproductive Medicine. – 2007. – Vol. 25. – № 6 – P. 445–453.
126. Gigeck C.O., Chen E.S., Smith M.A.C. Methyl-CpG-Binding Protein (MBD) Family: Epigenomic Read-Outs Functions and Roles in Tumorigenesis and Psychiatric Diseases // Journal of Cellular Biochemistry. – 2016. – Vol. 117. – № 1 – P. 29–38.
 127. Gilbert W. Why genes in pieces? // Nature. – 1978. – Vol. 271. – № 5645 – P. 501–501.
 128. Glaviano A., Foo A.S.C., Lam H.Y., et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer // Molecular Cancer. – 2023. – Vol. 22. – № 1 – P. 138.
 129. Godkin J. Transforming growth factor beta and the endometrium // Reviews of Reproduction. – 1998. – Vol. 3. – № 1 – P. 1–6.
 130. Gokoolparsadh A., Fang Z., Braidy N., et al. Transcriptional response to mitochondrial protease IMMP2L knockdown in human primary astrocytes // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2017. – Vol. 482. – № 4 – P. 1252–1258.
 131. Goldstein J.A., Gallagher K., Beck C., et al. Maternal-Fetal Inflammation in the Placenta and the Developmental Origins of Health and Disease // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11 – P. 531543.
 132. Goldstein L.D., Cao Y., Pau G., et al. Prediction and Quantification of Splice Events from RNA-Seq Data // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11. – № 5 – P. e0156132.
 133. Golstein P., Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition // Trends in Biochemical Sciences. – 2007. – Vol. 32. – № 1 – P. 37–43.
 134. Gong S., Gaccioli F., Dopierala J. et al. The RNA landscape of the human placenta in health and disease // Nat Communications. – 2021. – Vol. 12. – A. 2639.
 135. Gorelik A., Illes K., Superti-Furga G., et al. Structural Basis for Nucleotide Hydrolysis by the Acid Sphingomyelinase-like Phosphodiesterase SMPDL3A

- // Journal of Biological Chemistry. – 2016. – Vol. 291. – № 12 – P. 6376–6385.
136. Gough N.R. Focus Issue: Wnt and β -Catenin Signaling in Development and Disease // Science Signaling. – 2012. – Vol. 5. – № 206.
 137. Groten T., Gebhard N., Kreienberg R., et al. Differential expression of VE-cadherin and VEGFR2 in placental syncytiotrophoblast during preeclampsia – New perspectives to explain the pathophysiology // Placenta. – 2010. – Vol. 31. – № 4 – P. 339–343.
 138. Grumbach M.M., Auchus R.J. Estrogen: Consequences and Implications of Human Mutations in Synthesis and Action¹ // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1999. – Vol. 84. – № 12 – P. 4677–4694.
 139. Grzeszczak K., Łanocha-Arendarczyk N., Malinowski W., et al. Oxidative Stress in Pregnancy // Biomolecules. – 2023. – Vol. 13. – № 12 – P. 1768.
 140. Gude N.M., Roberts C.T., Kalionis B., et al. Growth and function of the normal human placenta // Thrombosis Research. – 2004. – Vol. 114. – № 5–6 – P. 397–407.
 141. Gueroussov S., Gonatopoulos-Pournatzis T., Irimia M., et al. An alternative splicing event amplifies evolutionary differences between vertebrates // Science. – 2015. – Vol. 349. – № 6250 – P. 868–873.
 142. Haanen C., Vermes I. Apoptosis: Programmed cell death in fetal development // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 1996. – Vol. 64. – № 1 – P. 129–133.
 143. Hammer A., Blaschitz A., Daxböck C., et al. Fas and Fas-Ligand Are Expressed in the Uteroplacental Unit of First-Trimester Pregnancy // American Journal of Reproductive Immunology. – 1999. – Vol. 41. – № 1 – P. 41–51.
 144. Harris E.S., Nelson W.J. VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function // Current Opinion in Cell Biology. – 2010. – Vol. 22. – № 5 – P. 651–658.
 145. Hartley S.W., Mullikin J.C. Detection and visualization of differential splicing in RNA-Seq data with JunctionSeq // Nucleic Acids Research. – 2016.

- P. gkw501.
- 146.Hasimbegovic E., Schweiger V., Kastner N., et al. Alternative Splicing in Cardiovascular Disease—A Survey of Recent Findings // *Genes*. – 2021. – Vol. 12. – № 9 – P. 1457.
 - 147.He L., Zhou L., Lu Z.B., Xiong J.P. Influence of LncRNA SDHAP1 on multiplication, migration and invasiveness of non-small cell lung carcinoma cells // *American Journal of Translational Research*. – 2021. – Vol. 13. – №. 10. – P. 11245.
 - 148.Hendrix N., Berghella V. Non-Placental Causes of Intrauterine Growth Restriction // *Seminars in Perinatology*. – 2008. – Vol. 32. – № 3 – P. 161–165.
 - 149.Heraud-Farlow J.E., Kiebler M.A. The multifunctional Staufen proteins: conserved roles from neurogenesis to synaptic plasticity // *Trends in Neurosciences*. – 2014. – Vol. 37. – № 9 – P. 470–479.
 - 150.Hershko A. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1997. – Vol. 9. – № 6 – P. 788–799.
 - 151.Higgins G.S., Krause M., McKenna W.G., et al. Personalized Radiation Oncology: Epidermal Growth Factor Receptor and Other Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors // *Molecular Radio-Oncology*. – 2016. – Vol. 198 – P. 107–122.
 - 152.Hiratsuka S., Minowa O., Kuno J. et al. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – T. 95. – №. 16. – C. 9349–9354.
 - 153.Hocine S., Singer R.H., Grunwald D. RNA Processing and Export // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2010. – Vol. 2. – № 12 – P. a000752–a000752.
 - 154.Hodgkinson C.P., Naidoo V., Patti K.G., et al. Abi3bp Is a Multifunctional Autocrine/Paracrine Factor that Regulates Mesenchymal Stem Cell Biology // *Stem Cells*. – 2013. – Vol. 31. – № 8 – P. 1669–1682.
 - 155.Hoffman M.K. The great obstetrical syndromes and the placenta // *BJOG: An*

- International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 2023. – Vol. 130. – № S3 – P. 8–15.
- 156.Hogan B.L.M. Morphogenesis // Cell. – 1999. – Vol. 96. – № 2 – P. 225–233.
- 157.Hohn H.-P., Denker H.-W. Experimental Modulation of Cell-Cell Adhesion, Invasiveness and Differentiation in Trophoblast Cells // Cells Tissues Organs. – 2002. – Vol. 172. – № 3 – P. 218–236.
- 158.Holmlund U., Cebers G., Dahlfors A.R., et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta // Immunology. – 2002. – Vol. 107. – № 1 – P. 145–151.
- 159.Honsho M., Fujiki Y. Regulation of plasmalogen biosynthesis in mammalian cells and tissues // Brain Research Bulletin. – 2023. – Vol. 194 – P. 118–123.
- 160.Hoxhaj G., Manning B.D. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism // Nature Reviews Cancer. – 2020. – Vol. 20. – № 2 – P. 74–88.
- 161.Hu Y., Huang Y., Du Y., et al. DiffSplice: the genome-wide detection of differential splicing events with RNA-seq // Nucleic Acids Research. – 2013. – Vol. 41. – № 2 – P. e39–e39.
- 162.Huang K., Chen G., Fan W., et al. miR-23a-3p increases endometrial receptivity via CUL3 during embryo implantation // Journal of Molecular Endocrinology. – 2020. – Vol. 65. – № 2 – P. 35–44.
- 163.Hung T.-H., Chen S.-F., Lo L.-M., et al. Increased Autophagy in Placentas of Intrauterine Growth-Restricted Pregnancies // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 7 – P. e40957.
- 164.Huppertz B. Placental villous trophoblast: the altered balance between proliferation and apoptosis triggers pre-eclampsia // J Reproduktionsmed Endokrinol. – 2006. – Vol. 3. – №. 2. – P. 103–108.
- 165.Huppertz B. The anatomy of the normal placenta // Journal of Clinical Pathology. – 2008. – Vol. 61. – № 12 – P. 1296–1302.
- 166.Jacob A.G., Smith C.W.J. Intron retention as a component of regulated gene expression programs // Human Genetics. – 2017. – Vol. 136. – № 9 – P. 1043–

- 1057.
167. Jakubauskiene E., Vilys L., Makino Y. et al. Increased serine-arginine (SR) protein phosphorylation changes pre-mRNA splicing in hypoxia // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – T. 290. – №. 29. – C. 18079–18089.
 168. Janku F., Yap T.A., Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2018. – Vol. 15. – № 5 – P. 273–291.
 169. Jensen K.B., Dredge B.K., Stefani G., et al. Nova-1 Regulates Neuron-Specific Alternative Splicing and Is Essential for Neuronal Viability // *Neuron*. – 2000. – Vol. 25. – № 2 – P. 359–371.
 170. Jin Y.-J., Byun S., Han S., et al. Differential alternative splicing regulation among hepatocellular carcinoma with different risk factors // *BMC Medical Genomics*. – 2019. – Vol. 12. – № S8 – P. 175.
 171. Jones K.A., Luo Y., Dukes-Rimsky L., et al. Neurodevelopmental disorder-associated ZBTB20 gene variants affect dendritic and synaptic structure // *PLOS ONE*. – 2018. – Vol. 13. – № 10 – P. e0203760.
 172. Josephs E.B. Gene expression links genotype and phenotype during rapid adaptation // *Molecular Ecology*. – 2021. – Vol. 30. – № 1 – P. 30–32.
 173. Juven A., Nambot S., Piton A., et al. Primrose syndrome: a phenotypic comparison of patients with a ZBTB20 missense variant versus a 3q13.31 microdeletion including ZBTB20 // *European Journal of Human Genetics*. – 2020. – Vol. 28. – № 8 – P. 1044–1055.
 174. Kaczmarek A., Vandenabeele P., Krysko D.V. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38. – № 2 – P. 209–223.
 175. Kajihara T., Jones M., Fusi L., et al. Differential Expression of FOXO1 and FOXO3a Confers Resistance to Oxidative Cell Death upon Endometrial Decidualization // *Molecular Endocrinology*. – 2006. – Vol. 20. – № 10 – P. 2444–2455.
 176. Kanbay M., Mutlu A., Bakir C.N., et al. Klotho in pregnancy and intrauterine

- development-potential clinical implications: a review from the European Renal Association CKD-MBD Working Group // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2024. – Vol. 39. – № 10 – P. 1574–1582.
- 177.Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol. 28. – № 1 – P. 27–30.
- 178.Kaufman B.A., Van Houten B. POLB: A new role of DNA polymerase beta in mitochondrial base excision repair // DNA Repair. – 2017. – Vol. 60 – P. A1–A5.
- 179.Keinan A., Mullikin J.C., Patterson N., et al. Measurement of the human allele frequency spectrum demonstrates greater genetic drift in East Asians than in Europeans // Nature Genetics. – 2007. – Vol. 39. – № 10 – P. 1251–1255.
- 180.Kelly S.M., Leung S.W., Pak C., et al. A conserved role for the zinc finger polyadenosine RNA binding protein, ZC3H14, in control of poly(A) tail length // RNA. – 2014. – Vol. 20. – № 5 – P. 681–688.
- 181.Kim C.J., Romero R., Chaemsaihong P., et al. Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance // American Journal of Obstetrics and Gynecology. – 2015. – Vol. 213. – № 4 – P. S29–S52.
- 182.Kim C.J., Romero R., Chaemsaihong P., et al. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance // American Journal of Obstetrics and Gynecology. – 2015. – Vol. 213. – № 4 – P. S53–S69.
- 183.Kim E., Magen A., Ast G. Different levels of alternative splicing among eukaryotes // Nucleic Acids Research. – 2007. – Vol. 35. – № 1 – P. 125–131.
- 184.Kim H.K., Pham M.H.C., Ko K.S., et al. Alternative splicing isoforms in health and disease // Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. – 2018. – Vol. 470. – № 7 – P. 995–1016. – DOI: 10.1007/s00424-018-2136-x.
- 185.Kim J.Y., Cho H., Yoo J., et al. Pathological Role of HDAC8: Cancer and Beyond // Cells. – 2022. – Vol. 11. – № 19 – P. 3161.

- 186.Kim M.J., Romero R., Kim C.J., et al. Villitis of Unknown Etiology Is Associated with a Distinct Pattern of Chemokine Up-Regulation in the Feto-Maternal and Placental Compartments: Implications for Conjoint Maternal Allograft Rejection and Maternal Anti-Fetal Graft-versus-Host Disease // *The Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 182. – № 6 – P. 3919–3927.
- 187.King B.F. The organization of actin filaments in human placental villi // *Journal of Ultrastructure Research*. – 1983. – Vol. 85. – № 3 – P. 320–328.
- 188.King P., Paul A., Laufer E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – № 50 – P. 21185–21190.
- 189.Kirkbride K.C., Sung B.H., Sinha S., et al. Cortactin: A multifunctional regulator of cellular invasiveness // *Cell Adhesion & Migration*. – 2011. – Vol. 5. – № 2 – P. 187–198.
- 190.Kitagawa N., Washio T., Kosugi, S. et al. Computational analysis suggests that alternative first exons are involved in tissue-specific transcription in rice (*Oryza sativa*) // *Bioinformatics*. – 2005. – Vol. 21. – № 9. – P. 1758–1763.
- 191.Koenig M., Hoffman E.P., Bertelson C.J., et al. Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals // *Cell*. – 1987. – Vol. 50. – № 3 – P. 509–517.
- 192.Koga K., Mor G. REVIEW ARTICLE: Toll-Like Receptors at the Maternal–Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Disorders // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2010. – Vol. 63. – № 6 – P. 587–600.
- 193.Koi H., Zhang J., Parry S. The Mechanisms of Placental Viral Infection // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 943. – № 1 – P. 148–156.
- 194.Komada M. Sonic hedgehog signaling coordinates the proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells by regulating cell cycle kinetics during development of the neocortex // *Congenital Anomalies*. – 2012. – Vol.

52. – № 2 – P. 72–77.
- 195.Kono A., Shinya K., Nakayama T., et al. Haplotype-based, case–control study of myosin phosphatase target subunit 1 (*PPP1R12A*) gene and hypertensive disorders of pregnancy // *Hypertension in Pregnancy*. – 2021. – Vol. 40. – № 1 – P. 88–96.
- 196.Kopan R. Notch Signaling // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2012. – Vol. 4. – № 10 – P. a011213–a011213.
- 197.Kornblihtt A.R., Schor I.E., Alló M., et al. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2013. – Vol. 14. – № 3 – P. 153–165.
- 198.Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function // *Cell*. – 2007. – Vol. 128. – № 4 – P. 693–705.
- 199.Kramer M.S., Ananth C.V., Platt R.W., et al. US Black vs White disparities in foetal growth: physiological or pathological? // *International Journal of Epidemiology*. – 2006. – Vol. 35. – № 5 – P. 1187–1195.
- 200.Krecic A.M., Swanson M.S. hnRNP complexes: composition, structure, and function // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1999. – Vol. 11. – № 3 – P. 363–371.
- 201.Krock B.L., Skuli N., Simon M.C. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil // *Genes & Cancer*. – 2011. – Vol. 2. – № 12 – P. 1117–1133.
- 202.Kumar Singh P., Dangelmaier C.A., Reddy Vari H., et al. Biochemical characterization of spleen tyrosine kinase (SYK) isoforms in platelets // *Platelets*. – 2023. – Vol. 34. – № 1 – P. 2249549.
- 203.Kunath T., Yamanaka Y., Detmar J., et al. Developmental differences in the expression of FGF receptors between human and mouse embryos // *Placenta*. – 2014. – Vol. 35. – № 12 – P. 1079–1088.
- 204.La Cognata V., Gentile G., Aronica E., et al. Splicing Players Are Differently Expressed in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Molecular Clusters and Brain Regions // *Cells*. – 2020. – Vol. 9. – № 1 – P. 159.
- 205.Ladomery M. Aberrant Alternative Splicing Is Another Hallmark of Cancer //

- International Journal of Cell Biology. – 2013. – Vol. 2013 – P. 1–6.
- 206.Lamond A.I. The Spliceosome // BioEssays. – 1993. – Vol. 15. – № 9 – P. 595–603.
- 207.Lara-Pezzi E., Gómez-Salineró J., Gatto A., et al. The Alternative Heart: Impact of Alternative Splicing in Heart Disease // Journal of Cardiovascular Translational Research. – 2013. – Vol. 6. – № 6 – P. 945–955.
- 208.Laraia B.A., Siega-Riz A.M., Gundersen C., et al. Psychosocial Factors and Socioeconomic Indicators Are Associated with Household Food Insecurity among Pregnant Women // The Journal of Nutrition. – 2006. – Vol. 136. – № 1 – P. 177–182.
- 209.Lareau L.F., Brooks A.N., Soergel D.A.W., et al. The Coupling of Alternative Splicing and Nonsense-Mediated mRNA Decay // Alternative Splicing in the Postgenomic Era. – 2007. – Vol. 623 – P. 190–211.
- 210.Lawrence R.E., Zoncu R. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control // Nature Cell Biology. – 2019. – Vol. 21. – № 2 – P. 133–142.
- 211.Le K., Prabhakar B.S., Hong W., et al. Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery // Acta Pharmacologica Sinica. – 2015. – Vol. 36. – № 10 – P. 1212–1218.
- 212.Leckband D., Prakasam A. MECHANISM AND DYNAMICS OF CADHERIN ADHESION // Annual Review of Biomedical Engineering. – 2006. – Vol. 8. – № 1 – P. 259–287.
- 213.Lee C., Rhee I. Important roles of protein tyrosine phosphatase PTPN12 in tumor progression // Pharmacological Research. – 2019. – Vol. 144 – P. 73–78.
- 214.Leftwich H.K., Stetson B., Sabol B., et al. Growth restriction: identifying fetuses at risk // The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. – 2018. – Vol. 31. – № 15 – P. 1962–1966.
- 215.Leitao B., Jones M.C., Fusi L., et al. Silencing of the JNK pathway maintains progesterone receptor activity in decidualizing human endometrial stromal cells exposed to oxidative stress signals // The FASEB Journal. – 2010. – Vol.

24. – № 5 – P. 1541–1551.
216. Leoni G., Le Pera L., Ferrè F., et al. Coding potential of the products of alternative splicing in human // *Genome Biology*. – 2011. – Vol. 12. – № 1 – P. R9.
217. Lerner M.R., Boyle J.A., Mount S.M., et al. Are snRNPs involved in splicing? // *Nature*. – 1980. – Vol. 283. – № 5743 – P. 220–224.
218. Lessel D., Ozel A.B., Campbell S.E., et al. Analyses of LMNA-negative juvenile progeroid cases confirms biallelic POLR3A mutations in Wiedemann–Rautenstrauch-like syndrome and expands the phenotypic spectrum of *PYCR1* mutations // *Human Genetics*. – 2018. – Vol. 137. – № 11–12 – P. 921–939.
219. Lestari B., Fukushima T., Utomo R.Y., et al. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in placenta physiology and pathology // *Placenta*. – 2024. – Vol. 151 – P. 37–47.
220. Lewis B.P., Green R.E., Brenner S.E. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – № 1 – P. 189–192.
221. Li B., Dewey C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome // *BMC Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 12. – № 1 – P. 323.
222. Li W., Chung C.Y.L., Wang C.C., et al. Monochorionic twins with selective fetal growth restriction: insight from placental whole-transcriptome analysis // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2020. – Vol. 223. – № 5 – P. 749.e1–749.e16.
223. Liao Y., Wang J., Jaehnig E.J., et al. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – № W1 – P. W199–W205.
224. Lim S., MacIntyre D.A., Lee Y.S., et al. Nuclear Factor Kappa B Activation Occurs in the Amnion Prior to Labour Onset and Modulates the Expression of Numerous Labour Associated Genes // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 4 –

- P. e34707.
- 225.Liu J., Ding C., Liu X., et al. Cytoskeletal Protein 4.1R in Health and Diseases // *Biomolecules*. – 2024. – Vol. 14. – № 2 – P. 214.
 - 226.Liu Q., Fang L., Wu C. Alternative Splicing and Isoforms: From Mechanisms to Diseases // *Genes*. – 2022. – Vol. 13. – № 3 – P. 401.
 - 227.Loboda A., Jozkowicz A., Dulak J. HIF-1 and HIF-2 Transcription Factors - Similar but Not Identical // *Molecules and Cells*. – 2010. – Vol. 29. – № 5 – P. 435–442.
 - 228.Logan C.Y., Nusse R. THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2004. – Vol. 20. – № 1 – P. 781–810.
 - 229.Loo Y.-M., Gale M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors // *Immunity*. – 2011. – Vol. 34. – № 5 – P. 680–692.
 - 230.Lum D.H., Kuwabara P.E., Zarkower D., et al. Direct protein–protein interaction between the intracellular domain of TRA-2 and the transcription factor TRA-1A modulates feminizing activity in *C. elegans* // *Genes & Development*. – 2000. – Vol. 14. – № 24 – P. 3153–3165.
 - 231.Lyall F., Bulmer J.N., Duffie E., et al. Human Trophoblast Invasion and Spiral Artery Transformation // *The American Journal of Pathology*. – 2001. – Vol. 158. – № 5 – P. 1713–1721.
 - 232.Lyall F., Robson S.C., Bulmer J.N. Spiral Artery Remodeling and Trophoblast Invasion in Preeclampsia and Fetal Growth Restriction: Relationship to Clinical Outcome // *Hypertension*. – 2013. – Vol. 62. – № 6 – P. 1046–1054.
 - 233.Majewska M., Lipka A., Paukszto L., et al. Placenta Transcriptome Profiling in Intrauterine Growth Restriction (IUGR) // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 6 – P. 1510.
 - 234.Männik J., Vaas P., Rull K., et al. Differential Expression Profile of *Growth Hormone/Chorionic Somatomammotropin* Genes in Placenta of Small- and Large-for-Gestational-Age Newborns // *The Journal of Clinical Endocrinology*

- & Metabolism. – 2010. – Vol. 95. – № 5 – P. 2433–2442.
- 235.Männik J., Vaas P., Rull K., et al. Differential placental expression profile of human Growth Hormone/Chorionic Somatomammotropin genes in pregnancies with pre-eclampsia and gestational diabetes mellitus // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2012. – Vol. 355. – № 1 – P. 180–187.
- 236.Manning B.D., Cantley L.C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream // *Cell*. – 2007. – Vol. 129. – № 7 – P. 1261–1274.
- 237.Marasco L.E., Kornblihtt A.R. The physiology of alternative splicing // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2023. – Vol. 24. – № 4 – P. 242–254.
- 238.Marchenko M., Nefedova V., Artemova N., et al. Structural and Functional Peculiarities of Cytoplasmic Tropomyosin Isoforms, the Products of TPM1 and TPM4 Genes // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 10 – P. 5141.
- 239.Marjanović M., Sánchez-Huertas C., Terré B., et al. CEP63 deficiency promotes p53-dependent microcephaly and reveals a role for the centrosome in meiotic recombination // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – № 1 – P. 7676.
- 240.Marseglia L., D'Angelo G., Manti S., et al. Oxidative Stress-Mediated Aging during the Fetal and Perinatal Periods // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. – Vol. 2014 – P. 1–8.
- 241.Martin J.A., Hamilton B.E., Sutton P.D., et al. Births: final data for 2005 // *National vital statistics reports*. – 2007. – Vol. 56. – №. 6. – P. 1–103.
- 242.Mata-Greenwood E., Liao W.-X., Zheng J., et al. Differential Activation of Multiple Signalling Pathways Dictates eNOS Upregulation by FGF2 but not VEGF in Placental Artery Endothelial Cells // *Placenta*. – 2008. – Vol. 29. – № 8 – P. 708–717.
- 243.Matlin A.J., Clark F., Smith C.W.J. Understanding alternative splicing: towards a cellular code // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2005. – Vol. 6. – № 5 – P. 386–398.

- 244.Mattick J.S. Introns: evolution and function // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 1994. – Vol. 4. – № 6 – P. 823–831.
- 245.McCarthy C., Cotter F.E., McElwaine S., et al. Altered gene expression patterns in intrauterine growth restriction: Potential role of hypoxia // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2007. – Vol. 196. – № 1 – P. 70.e1-70.e6.
- 246.McGuire A.M., Pearson M.D., Neafsey D.E., et al. Cross-kingdom patterns of alternative splicing and splice recognition // *Genome Biology*. – 2008. – Vol. 9. – № 3 – P. R50.
- 247.Mehmood A., Laiho A., Venäläinen M.S., et al. Systematic evaluation of differential splicing tools for RNA-seq studies // *Briefings in Bioinformatics*. – 2020. – Vol. 21. – № 6 – P. 2052–2065.
- 248.Meller M., Vadachkoria S., Luthy D.A., et al. Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies // *Placenta*. – 2005. – Vol. 26. – № 8–9 – P. 601–607.
- 249.Messa M., Fernández-Busnadiego R., Sun E.W., et al. Epsin deficiency impairs endocytosis by stalling the actin-dependent invagination of endocytic clathrin-coated pits // *eLife*. – 2014. – Vol. 3 – P. e03311.
- 250.Micalizzi D.S., Farabaugh S.M., Ford H.L. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. – 2010. – Vol. 15. – № 2 – P. 117–134.
- 251.Milacic M., Beavers D., Conley P., et al. The Reactome Pathway Knowledgebase 2024 // *Nucleic Acids Research*. – 2024. – Vol. 52. – № D1 – P. D672–D678.
- 252.Miller J., Turan S., Baschat A.A. Fetal Growth Restriction // *Seminars in Perinatology*. – 2008. – Vol. 32. – № 4 – P. 274–280.
- 253.Modrek B., Lee C. A genomic view of alternative splicing // *Nature Genetics*. – 2002. – Vol. 30. – № 1 – P. 13–19. – DOI: 10.1038/ng0102-13.
- 254.Mogensen T.H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate

- Immune Defenses // Clinical Microbiology Reviews. – 2009. – Vol. 22. – № 2 – P. 240–273.
- 255.Mohammad N., Sohaila A., Rabbani U., et al. Maternal Predictors Of Intrauterine Growth Retardation // Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan. – 2018. – Vol. 28. – № 9 – P. 681–685.
- 256.Monson T., Wright T., Galan H.L., et al. Caspase dependent and independent mechanisms of apoptosis across gestation in a sheep model of placental insufficiency and intrauterine growth restriction // Apoptosis. – 2017. – Vol. 22. – № 5 – P. 710–718.
- 257.Monteuuis G., Wong J.J.L., Bailey C.G., et al. The changing paradigm of intron retention: regulation, ramifications and recipes // Nucleic Acids Research. – 2019. – P. gkz1068.
- 258.Mor G., Cardenas I. REVIEW ARTICLE: The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity // American Journal of Reproductive Immunology. – 2010. – Vol. 63. – № 6 – P. 425–433.
- 259.Morris B.J., Chen R., Donlon T.A. et al. Vascular endothelial growth factor receptor 1 gene (FLT1) longevity variant increases lifespan by reducing mortality risk posed by hypertension // Aging (Albany NY). – 2023. – T. 15. – №. 10. – C. 3967.
- 260.Mou J., Wang B., Liu Y., et al. FER1L4: A Long Non-coding RNA with Multiple Roles in the Occurrence andDevelopment of Tumors // Current Pharmaceutical Design. – 2022. – Vol. 28. – № 16 – P. 1334–1341.
- 261.Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta // Histochemistry and Cell Biology. – 2004. – Vol. 122. – № 4 – P. 369–382.
- 262.Naeye R. Causes of fetal and neonatal mortality by race in a selected U.S. population // American Journal of Public Health. – 1979. – Vol. 69. – № 9 – P. 857–861.
- 263.Nagy N., Barad C., Hotta R., et al. Collagen 18 and agrin are secreted by enteric neural crest cells to remodel their microenvironment and regulate their migration during ENS development // Development. – 2018. – P. dev.160317.

- 264.Nardoza L.M.M., Caetano A.C.R., Zamarian A.C.P., et al. Fetal growth restriction: current knowledge // Archives of Gynecology and Obstetrics. – 2017. – Vol. 295. – № 5 – P. 1061–1077.
- 265.Nasiri K., Moodie E.E.M., Abenhaim H.A. To What Extent Is the Association Between Race/Ethnicity and Fetal Growth Restriction Explained by Adequacy of Prenatal Care? A Mediation Analysis of a Retrospectively Selected Cohort // American Journal of Epidemiology. – 2020. – Vol. 189. – № 11 – P. 1360–1368.
- 266.Neale D.M., Mor G. The role of Fas mediated apoptosis in preeclampsia // Journal of Perinatal Medicine. – 2005. – Vol. 33. – № 6.
- 267.Niels G.H., Roignant J.Y. Anything but ordinary–emerging splicing mechanisms in eukaryotic gene regulation // Trends in Genetics. – 2021. – Vol. 37. – № 4. – P. 355–372.
- 268.Nielsen R., Hellmann I., Hubisz M., et al. Recent and ongoing selection in the human genome // Nature Reviews Genetics. – 2007. – Vol. 8. – № 11 – P. 857–868.
- 269.Nielsen R., Williamson S., Kim Y., et al. Genomic scans for selective sweeps using SNP data // Genome Research. – 2005. – Vol. 15. – № 11 – P. 1566–1575.
- 270.Nieto M.A., Huang R.Y.-J., Jackson R.A., et al. EMT: 2016 // Cell. – 2016. – Vol. 166. – № 1 – P. 21–45.
- 271.Nizyaeva N.V., Lomova N.A., Amiraslanov E.Yu., et al. Peculiarities of RIG-1 Expression in Placental Villi in Preeclampsia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2019. – Vol. 167. – № 6 – P. 791–794.
- 272.Norwitz E.R. Defective implantation and placentation: laying the blueprint for pregnancy complications // Reproductive BioMedicine Online. – 2006. – Vol. 13. – № 4 – P. 591–599.
- 273.Nowak K.J., Davies K.E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment: Third in Molecular Medicine Review Series // EMBO reports. – 2004. – Vol. 5. – № 9 – P. 872–876.

274. Nuiplot N., Junking M., Duangtum N., et al. Transmembrane protein 139 (TMEM139) interacts with human kidney isoform of anion exchanger 1 (kAE1) // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2015. – Vol. 463. – № 4 – P. 706–711.
275. O'Connell M.J. Selection and the Cell Cycle: Positive Darwinian Selection in a Well-Known DNA Damage Response Pathway // *Journal of Molecular Evolution*. – 2010. – Vol. 71. – № 5–6 – P. 444–457.
276. O'Connor B.B., Pope B.D., Peters M.M., et al. The role of extracellular matrix in normal and pathological pregnancy: Future applications of microphysiological systems in reproductive medicine // *Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 245. – № 13 – P. 1163–1174.
277. Okada H., Tsuzuki T., Murata H. Decidualization of the human endometrium // *Reproductive Medicine and Biology*. – 2018. – Vol. 17. – № 3 – P. 220–227.
278. Orsaria M., Liviero S., Rossetti E., et al. Placental acute inflammation infiltrates and pregnancy outcomes: a retrospective cohort study // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – № 1 – P. 24165.
279. Pak C., Garshasbi M., Kahrizi K., et al. Mutation of the conserved polyadenosine RNA binding protein, ZC3H14/dNab2, impairs neural function in *Drosophila* and humans // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108. – № 30 – P. 12390–12395.
280. Palmer K.R., Tong S., Kaitu'u-Lino T.J. Placental-specific sFLT-1: role in pre-eclamptic pathophysiology and its translational possibilities for clinical prediction and diagnosis // *Molecular Human Reproduction*. – 2016. – P. molehr;gaw077v2.
281. Palmer K.R., Kaitu'u-Lino T.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. – Vol. 66. – № 6 – P. 1251–1259.
282. Pan Q., Shai O., Lee L.J., et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing //

- Nature Genetics. – 2008. – Vol. 40. – № 12 – P. 1413–1415.
283. Patro R., Duggal G., Love M.I., et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression // Nature Methods. – 2017. – Vol. 14. – № 4 – P. 417–419.
284. Patthy L. Exon skipping-rich transcriptomes of animals reflect the significance of exon-shuffling in metazoan proteome evolution // Biology Direct. – 2019. – Vol. 14. – № 1 – P. 2.
285. Paul S., Dansithong W., Figueroa K.P., et al. Staufen2 dysregulation in neurodegenerative disease // Journal of Biological Chemistry. – 2025. – Vol. 301. – № 3 – P. 108316.
286. Pawłowski R., Mühl S.M., Sulser T., et al. Loss of PBRM1 expression is associated with renal cell carcinoma progression // International Journal of Cancer. – 2013. – Vol. 132. – № 2.
287. Pereira A.C., Martel F. Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies // Cell Biology and Toxicology. – 2014. – Vol. 30. – № 5 – P. 301–312.
288. Perera F.P., Rauh V., Tsai W.-Y., et al. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. // Environmental Health Perspectives. – 2003. – Vol. 111. – № 2 – P. 201–205.
289. Petek E., Windpassinger C., Vincent J.B., et al. Disruption of a Novel Gene (*IMMP2L*) by a Breakpoint in 7q31 Associated with Tourette Syndrome // The American Journal of Human Genetics. – 2001. – Vol. 68. – № 4 – P. 848–858.
290. Peter Stein T., Scholl T.O., Schluter M.D., et al. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome // Free Radical Research. – 2008. – Vol. 42. – № 10 – P. 841–848.
291. Pfarrer C., Weise S., Berisha B., et al. Fibroblast Growth Factor (FGF)-1, FGF2, FGF7 and FGF Receptors are Uniformly Expressed in Trophoblast Giant Cells During Restricted Trophoblast Invasion in Cows // Placenta. – 2006. – Vol. 27. – № 6–7 – P. 758–770.
292. Pickrell J.K., Pai A.A., Gilad Y., et al. Noisy Splicing Drives mRNA Isoform Diversity in Human Cells // PLoS Genetics. – 2010. – Vol. 6. – № 12 – P.

- e1001236.
293. Pickrell J.K., Reich D. Toward a new history and geography of human genes informed by ancient DNA // *Trends in Genetics*. – 2014. – Vol. 30. – № 9 – P. 377–389.
 294. Piñero J., Bravo À., Queralt-Rosinach N., et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45. – № D1 – P. D833–D839.
 295. Plaschka C., Lin P.-C., Charenton C., et al. Prespliceosome structure provides insights into spliceosome assembly and regulation // *Nature*. – 2018. – Vol. 559. – № 7714 – P. 419–422.
 296. Plaschka C., Lin P.-C., Nagai K. Structure of a pre-catalytic spliceosome // *Nature*. – 2017. – Vol. 546. – № 7660 – P. 617–621.
 297. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 2007. – Vol. 17. – № 1 – P. 45–51.
 298. Powers C.J., McLeskey S.W., Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. // *Endocrine-related cancer*. – 2000. – P. 165–197.
 299. Proskuryakov S.Y. a, Konoplyannikov A.G., Gabai V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? // *Experimental Cell Research*. – 2003. – Vol. 283. – № 1 – P. 1–16.
 300. Pu J., Guardia C.M., Keren-Kaplan T., et al. Mechanisms and functions of lysosome positioning // *Journal of Cell Science*. – 2016. – Vol. 129. – № 23 – P. 4329–4339.
 301. Racicot K., Kwon J., Aldo P., et al. Understanding the Complexity of the Immune System during Pregnancy // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2014. – Vol. 72. – № 2 – P. 107–116.
 302. Racicot K., Mor G. Risks associated with viral infections during pregnancy // *Journal of Clinical Investigation*. – 2017. – Vol. 127. – № 5 – P. 1591–1599.
 303. Rajakumar A., Powers R.W., Hubel C.A. et al. Novel soluble Flt-1 isoforms in plasma and cultured placental explants from normotensive pregnant and

- preeclamptic women // *Placenta*. – 2009. – T. 30. – №. 1. – C. 25–34.
- 304.Renaud S.J., Jeyarajah M.J. How trophoblasts fuse: an in-depth look into placental syncytiotrophoblast formation // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2022. – T. 79. – №. 8. – C. 433.
- 305.Ridley A.J. Rho GTPase signalling in cell migration // *Current opinion in cell biology*. – 2015. – T. 36. – C. 103–112.
- 306.Riley J.K., Nelson D.M. Toll-like Receptors in Pregnancy Disorders and Placental Dysfunction // *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. – 2010. – Vol. 39. – № 3 – P. 185–193.
- 307.Riquelme G., Vallejos C., De Gregorio N., et al. Lipid Rafts and Cytoskeletal Proteins in Placental Microvilli Membranes from Preeclamptic and IUGR Pregnancies // *The Journal of Membrane Biology*. – 2011. – Vol. 241. – № 3 – P. 127–140.
- 308.Robertson E.J. Dose-dependent Nodal/Smad signals pattern the early mouse embryo // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2014. – Vol. 32 – P. 73–79.
- 309.Robertson S.A., Skinner R.J., Care A.S. Essential Role for IL-10 in Resistance to Lipopolysaccharide-Induced Preterm Labor in Mice // *The Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 177. – № 7 – P. 4888–4896.
- 310.Robinson W.P., Peñaherrera M.S., Jiang R., et al. Assessing the role of placental trisomy in preeclampsia and intrauterine growth restriction // *Prenatal Diagnosis*. – 2010. – Vol. 30. – № 1 – P. 1–8.
- 311.Robson S.C., Simpson H., Ball E., et al. Punch biopsy of the human placental bed // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2002. – Vol. 187. – № 5 – P. 1349–1355.
- 312.Rogozin I.B., Carmel L., Csuros M., et al. Origin and evolution of spliceosomal introns // *Biology Direct*. – 2012. – Vol. 7. – № 1 – P. 11.
- 313.Roifman M., Choufani S., Turinsky A.L., et al. Genome-wide placental DNA methylation analysis of severely growth-discordant monochorionic twins reveals novel epigenetic targets for intrauterine growth restriction // *Clinical*

- Epigenetics. – 2016. – Vol. 8. – № 1 – P. 70.
314. Rose N.R., Klose R.J. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. – 2014. – Vol. 1839. – № 12 – P. 1362–1372.
315. Ruano C.S.M., Apicella C., Jacques S., et al. Alternative splicing in normal and pathological human placentas is correlated to genetic variants // *Human Genetics*. – 2021. – Vol. 140. – № 5 – P. 827–848.
316. Rudzinski E., Gilroy M., Newbill C., et al. Positive C4d Immunostaining of Placental Villous Syncytiotrophoblasts Supports Host-Versus-Graft Rejection in Villitis of Unknown Etiology // *Pediatric and Developmental Pathology*. – 2013. – Vol. 16. – № 1 – P. 7–13.
317. Runic R., Lockwood C.J., Ma Y., et al. Expression of Fas ligand by human cytotrophoblasts: implications in placentation and fetal survival. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1996. – Vol. 81. – № 8 – P. 3119–3122.
318. Rusterholz C., Hahn S., Holzgreve W. Role of placentally produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia // *Seminars in Immunopathology*. – 2007. – Vol. 29. – № 2 – P. 151–162.
319. Sable D. Growth Factor Receptor Messenger RNA Expression in Human Fetal Brain Regions // *Obstetrics & Gynecology*. – 1995. – Vol. 86. – № 2 – P. 240–247.
320. Sakabe N., De Souza S. Sequence features responsible for intron retention in human // *BMC Genomics*. – 2007. – Vol. 8. – № 1 – P. 59.
321. Sakai M., Araki N., Ogawa K. Lysosomal movements during heterophagy and autophagy: With special reference to nematolysosome and wrapping lysosome // *Journal of Electron Microscopy Technique*. – 1989. – Vol. 12. – № 2 – P. 101–131.
322. Salafia C., Sherer D., Spong C., et al. Fetal but not Maternal Serum Cytokine

- Levels Correlate with Histologic Acute Placental Inflammation // American Journal of Perinatology. – 1997. – Vol. 14. – № 07 – P. 419–422.
- 323.Saldanha P.A., Bolanle I.O., Palmer T.M., et al. Complex Transcriptional Profiles of the *PPP1R12A* Gene in Cells of the Circulatory System as Revealed by In Silico Analysis and Reverse Transcription PCR // Cells. – 2022. – Vol. 11. – № 15 – P. 2315.
- 324.Salmeri N., Carbone I.F., Cavoretto P.I., et al. Epigenetics Beyond Fetal Growth Restriction: A Comprehensive Overview // Molecular Diagnosis & Therapy. – 2022. – Vol. 26. – № 6 – P. 607–626.
- 325.Sarikas A., Hartmann T., Pan Z.-Q. The cullin protein family // Genome Biology. – 2011. – Vol. 12. – № 4 – P. 220.
- 326.Sato Y. Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2020. – Vol. 503 – P. 110699.
- 327.Schaschl H., Wallner B. Population-specific, recent positive directional selection suggests adaptation of human male reproductive genes to different environmental conditions // BMC Evolutionary Biology. – 2020. – Vol. 20. – № 1 – P. 27.
- 328.Schatz F., Guzeloglu-Kayisli O., Arlier S., et al. The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding // Human Reproduction Update. – 2016. – Vol. 22. – № 4 – P. 497–515.
- 329.Schlebusch C.M., Jakobsson M. Tales of Human Migration, Admixture, and Selection in Africa // Annual Review of Genomics and Human Genetics. – 2018. – Vol. 19. – № 1 – P. 405–428.
- 330.Schrader M., Fahimi H.D. Peroxisomes and oxidative stress // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. – 2006. – Vol. 1763. – № 12 – P. 1755–1766.
- 331.Schwabe D., Formichetti S., Junker J.P., et al. The transcriptome dynamics of single cells during the cell cycle // Molecular Systems Biology. – 2020. – Vol. 16. – № 11 – P. e9946.

- 332.Sciarrillo R., Wojtuszkiewicz A., Assaraf Y.G., et al. The role of alternative splicing in cancer: From oncogenesis to drug resistance // Drug Resistance Updates. – 2020. – Vol. 53 – P. 100728.
- 333.Scifres C.M., Nelson D.M. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death // The Journal of Physiology. – 2009. – Vol. 587. – № 14 – P. 3453–3458.
- 334.Sharma D., Shastri S., Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects // Clinical Medicine Insights: Pediatrics. – 2016. – Vol. 10 – P. CMPed.S40070.
- 335.Sharp A.N., Heazell A.E.P., Crocker I.P., et al. Placental Apoptosis in Health and Disease // American Journal of Reproductive Immunology. – 2010. – Vol. 64. – № 3 – P. 159–169.
- 336.Sharp P.A. On the origin of RNA splicing and introns // Cell. – 1985. – Vol. 42. – № 2 – P. 397–400.
- 337.Sheehan D., Meade G., Foley V.M., et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily // Biochemical Journal. – 2001. – Vol. 360. – № 1 – P. 1–16.
- 338.Shen S., Park J.W., Lu Z., et al. rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Vol. 111. – № 51.
- 339.Shepard P.J., Hertel K.J. The SR protein family // Genome Biology. – 2009. – Vol. 10. – № 10 – P. 242.
- 340.Shi J.-W., Lai Z.-Z., Yang H.-L., et al. Collagen at the maternal-fetal interface in human pregnancy // International Journal of Biological Sciences. – 2020. – Vol. 16. – № 12 – P. 2220–2234.
- 341.Shibuya M. Structure and Function of VEGF/VEGF-receptor System Involved in Angiogenesis. // Cell Structure and Function. – 2001. – Vol. 26. – № 1 – P. 25–35.
- 342.Shin J., Nile A., Oh J.-W. Role of adaptin protein complexes in intracellular

- trafficking and their impact on diseases // *Bioengineered*. – 2021. – Vol. 12. – № 1 – P. 8259–8278.
343. Sibilio M., Wagner E.F. Strain-Dependent Epithelial Defects in Mice Lacking the EGF Receptor // *Science*. – 1995. – Vol. 269. – № 5221 – P. 234–238.
344. Silverman S.K. Catalytic DNA: scope, applications, and biochemistry of deoxyribozymes // *Trends in biochemical sciences*. – 2016. – Vol. 41. – № 7. – P. 595–609.
345. Simon L., Spiewak K.A., Ekman G.C., et al. Stromal Progesterone Receptors Mediate Induction of Indian Hedgehog (IHH) in Uterine Epithelium and Its Downstream Targets in Uterine Stroma // *Endocrinology*. – 2009. – Vol. 150. – № 8 – P. 3871–3876.
346. Simpson H., Robson S.C., Bulmer J.N., et al. Transforming Growth Factor β Expression in Human Placenta and Placental Bed During Early Pregnancy // *Placenta*. – 2002. – Vol. 23. – № 1 – P. 44–58.
347. Singh N.N., Androphy E.J., Singh R.N. An extended inhibitory context causes skipping of exon 7 of SMN2 in spinal muscular atrophy // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – Vol. 315. – № 2 – P. 381–388.
348. Singh P., Börger C., More H., et al. The Role of Alternative Splicing and Differential Gene Expression in Cichlid Adaptive Radiation // *Genome Biology and Evolution*. – 2017. – Vol. 9. – № 10 – P. 2764–2781.
349. Slatko B.E., Gardner A.F., Ausubel F.M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies // *Current Protocols in Molecular Biology*. – 2018. – Vol. 122. – № 1 – P. e59.
350. Snyder N.A., Silva G.M. Deubiquitinating enzymes (DUBs): Regulation, homeostasis, and oxidative stress response // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 297. – № 3 – P. 101077.
351. Solano M.E. Decidual immune cells: Guardians of human pregnancies // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. – 2019. – Vol. 60 – P. 3–16.

- 352.Sones J.L., Lob H.E., Isroff C.E., et al. Role of decidual natural killer cells, interleukin-15, and interferon- γ in placental development and preeclampsia // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. – 2014. – Vol. 307. – № 5 – P. R490–R492.
- 353.Sorek R., Shamir R., Ast G. How prevalent is functional alternative splicing in the human genome? // Trends in Genetics. – 2004. – Vol. 20. – № 2 – P. 68–71.
- 354.Souders C., Maynard S., Yan J., et al. Circulating Levels of sFlt1 Splice Variants as Predictive Markers for the Development of Preeclampsia // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Vol. 16. – № 6 – P. 12436–12453.
- 355.Stotland N.E., Caughey A.B., Lahiff M., et al. Weight Gain and Spontaneous Preterm Birth: The Role of Race or Ethnicity and Previous Preterm Birth // Obstetrics & Gynecology. – 2006. – Vol. 108. – № 6 – P. 1448–1455.
- 356.Sutherland A.P.R., Zhang H., Zhang Y., et al. Zinc Finger Protein Zbtb20 Is Essential for Postnatal Survival and Glucose Homeostasis // Molecular and Cellular Biology. – 2009. – Vol. 29. – № 10 – P. 2804–2815.
- 357.Syed N.H., Kalyna M., Marquez Y., et al. Alternative splicing in plants – coming of age // Trends in Plant Science. – 2012. – Vol. 17. – № 10 – P. 616–623.
- 358.Sykora P., Misiak M., Wang Y., et al. DNA polymerase β deficiency leads to neurodegeneration and exacerbates Alzheimer disease phenotypes // Nucleic Acids Research. – 2015. – Vol. 43. – № 2 – P. 943–959.
- 359.Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. // Genetics. – 1989. – Vol. 123. – № 3 – P. 585–595.
- 360.Tanaka T., Hayakawa T., Teshima K.M. Power of neutrality tests for detecting natural selection // G3: Genes, Genomes, Genetics. – 2023. – Vol. 13. – № 10 – P. jkad161.
- 361.Tarazona-Santos E., Bernig T., Burdett L., et al. CYBB, an NADPH-oxidase gene: restricted diversity in humans and evidence for differential long-term

- purifying selection on transmembrane and cytosolic domains // *Human Mutation*. – 2008. – Vol. 29. – № 5 – P. 623–632.
362. Tentler D., Lomert E., Novitskaya K., et al. Role of ACTN4 in Tumorigenesis, Metastasis, and EMT // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – № 11 – P. 1427.
363. Tewari D., Patni P., Bishayee A., et al. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy // *Seminars in Cancer Biology*. – 2022. – Vol. 80 – P. 1–17.
364. The 1000 Genomes Project Consortium, Corresponding authors, Auton A., et al. A global reference for human genetic variation // *Nature*. – 2015. – Vol. 526. – № 7571 – P. 68–74.
365. The International HapMap Consortium, Sabeti P.C., Varilly P., et al. Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations // *Nature*. – 2007. – Vol. 449. – № 7164 – P. 913–918.
366. Thomas C.P., Andrews J.I., Liu K.Z. Intronic polyadenylation signal sequences and alternate splicing generate human soluble Flt1 variants and regulate the abundance of soluble Flt1 in the placenta // *The FASEB Journal*. – 2007. – T. 21. – №. 14. – C. 3885–3895.
367. Thomas C.P., Andrews J.I., Raikwar N.S. et al. A recently evolved novel trophoblast-enriched secreted form of fms-like tyrosine kinase-1 variant is up-regulated in hypoxia and preeclampsia // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2009. – T. 94. – №. 7. – C. 2524–2530.
368. Tian Q., Yin Y., Tian Y., et al. Chromatin Modifier EP400 Regulates Oocyte Quality and Zygotic Genome Activation in Mice // *Advanced Science*. – 2024. – Vol. 11. – № 20 – P. 2308018.
369. Tok Çelebi J., Wanner M., Ping, X.L., et al. Association of splicing defects in PTEN leading to exon skipping or partial intron retention in Cowden syndrome // *Human Genetics*. – 2000. – Vol. 107. – № 3 – P. 234–238.
370. Trapnell C., Hendrickson D.G., Sauvageau M., et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq // *Nature Biotechnology*.

- 2013. – Vol. 31. – № 1 – P. 46–53.
371. Tress M.L., Abascal F., Valencia A. Alternative Splicing May Not Be the Key to Proteome Complexity // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2017. – Vol. 42. – № 2 – P. 98–110.
372. Trincado J.L., Entizne J.C., Hysenaj G., et al. SUPPA2: fast, accurate, and uncertainty-aware differential splicing analysis across multiple conditions // *Genome Biology*. – 2018. – Vol. 19. – № 1 – P. 40.
373. Turco M.Y., Moffett A. Development of the human placenta // *Development*. – 2019. – Vol. 146. – № 22 – P. dev163428.
374. Uematsu S., Akira S. Toll-Like Receptors (TLRs) and Their Ligands // *Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity*. – 2008. – Vol. 183 – P. 1–20.
375. Ule J., Blencowe B.J. Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution // *Molecular Cell*. – 2019. – Vol. 76. – № 2 – P. 329–345.
376. Van Roy F., Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2008. – Vol. 65. – № 23 – P. 3756–3788.
377. Vanhaesebroeck B., Guillermet-Guibert J., Graupera M., et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2010. – Vol. 11. – № 5 – P. 329–341.
378. Vaquero-Garcia J., Aicher J.K., Jewell S., et al. RNA splicing analysis using heterogeneous and large RNA-seq datasets // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – № 1 – P. 1230.
379. Vaquero-Garcia J., Barrera A., Gazzara M.R., et al. A new view of transcriptome complexity and regulation through the lens of local splicing variations // *eLife*. – 2016. – Vol. 5 – P. e11752.
380. Venables J.P. Aberrant and Alternative Splicing in Cancer // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64. – № 21 – P. 7647–7654.
381. Vestweber D. VE-Cadherin: The Major Endothelial Adhesion Molecule Controlling Cellular Junctions and Blood Vessel Formation // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2008. – Vol. 28. – № 2 – P. 223–232.

- 382.Voight B.F., Kudaravalli S., Wen X., et al. A Map of Recent Positive Selection in the Human Genome // PLoS Biology. – 2006. – Vol. 4. – № 3 – P. e72.
- 383.Vuorela P., Hatva E., Lymboussaki A., et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Placenta Growth Factor in Human Placenta1 // Biology of Reproduction. – 1997. – Vol. 56. – № 2 – P. 489–494.
- 384.Wahl M.C., Will C.L., Lührmann R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine // Cell. – 2009. – Vol. 136. – № 4 – P. 701–718.
- 385.Wajant H. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm // Science. – 2002. – Vol. 296. – № 5573 – P. 1635–1636.
- 386.Wakeland A.K., Soncin F., Moretto-Zita M., et al. Hypoxia Directs Human Extravillous Trophoblast Differentiation in a Hypoxia-Inducible Factor–Dependent Manner // The American Journal of Pathology. – 2017. – Vol. 187. – № 4 – P. 767–780.
- 387.Wallach D., Varfolomeev E.E., Malinin N.L., et al. Tumor necrosis factor receptor and fas signaling mechanisms // Annual Review of Immunology. – 1999. – Vol. 17. – № 1 – P. 331–367.
- 388.Wanders R.J.A., Baes M., Ribeiro D., et al. The physiological functions of human peroxisomes // Physiological Reviews. – 2023. – Vol. 103. – № 1 – P. 957–1024.
- 389.Wang E.T., Sandberg R., Luo S., et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes // Nature. – 2008. – Vol. 456. – № 7221 – P. 470–476.
- 390.Wang J., Ye Z., Huang T.H., et al. Computational Methods and Correlation of Exon-skipping Events with Splicing, Transcription, and Epigenetic Factors // Cancer Gene Networks. – 2017. – Vol. 1513 – P. 163–170.
- 391.Wang S., Lewis C.M., Jakobsson M., et al. Genetic Variation and Population Structure in Native Americans // PLoS Genetics. – 2007. – Vol. 3. – № 11 – P. e185.
- 392.Wang Z., Rolish M.E., Yeo G., et al. Systematic Identification and Analysis

- of Exonic Splicing Silencers // *Cell*. – 2004. – Vol. 119. – № 6 – P. 831–845.
393. Warf M.B., Berglund J.A. Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2010. – Vol. 35. – № 3 – P. 169–178.
394. Watson P.M., Watson D.K. Alternative Splicing in Prostate and Breast Cancer // *The Open Cancer Journal*. – 2010. – Vol. 3. – № 1 – P. 62–76.
395. Wazan L. E.I., Widhibrata A., Liu G.S. Soluble FLT-1 in angiogenesis: pathophysiological roles and therapeutic implications // *Angiogenesis*. – 2024. – T. 27. – №. 4. – C. 641–661.
396. Weaver J.R., Susiarjo M., Bartolomei M.S. Imprinting and epigenetic changes in the early embryo // *Mammalian Genome*. – 2009. – Vol. 20. – № 9–10 – P. 532–543.
397. Weening R.S., De Boer M., Kuijpers T.W., et al. Point mutations in the promoter region of the *CYBB* gene leading to mild chronic granulomatous disease // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2001. – Vol. 122. – № 3 – P. 410–417.
398. West-Eberhard M.J. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity // *Annual Review of Ecology and Systematics*. – 1989. – Vol. 20. – № 1 – P. 249–278.
399. Wheelock M.J., Shintani Y., Maeda M., et al. Cadherin switching // *Journal of Cell Science*. – 2008. – Vol. 121. – № 6 – P. 727–735.
400. Wilkinson M.E., Fica S.M., Galej W.P., et al. Postcatalytic spliceosome structure reveals mechanism of 3'–splice site selection // *Science*. – 2017. – Vol. 358. – № 6368 – P. 1283–1288.
401. Williams R.L., Creasy R.K., Cunningham G.C., et al. Fetal growth and perinatal viability in California // *Obstetrics & Gynecology*. – 1982. – Vol. 59. – №. 5. – P. 624–634.
402. Willimott S., Merriam T., Wagner S.D. Apoptosis induces Bcl-XS and cleaved Bcl-XL in chronic lymphocytic leukaemia // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011. – Vol. 405. – № 3 – P. 480–

- 485.
- 403.Wrana J.L. Regulation of Smad Activity // Cell. – 2000. – Vol. 100. – № 2 – P. 189–192.
- 404.Wrana J.L., Attisano L. The Smad pathway // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2000. – Vol. 11. – № 1–2 – P. 5–13.
- 405.Wright C.J., Smith C.W.J., Jiggins C.D. Alternative splicing as a source of phenotypic diversity // Nature Reviews Genetics. – 2022. – Vol. 23. – № 11 – P. 697–710.
- 406.Wu J., Yan X., Cheng Z. ABI3BP can inhibit the proliferation, invasion, and epithelial–mesenchymal transition of non-small-cell lung cancer cells // Open Life Sciences. – 2025. – Vol. 20. – № 1 – P. 20221034.
- 407.Yamakawa K. DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system // Human Molecular Genetics. – 1998. – Vol. 7. – № 2 – P. 227–237.
- 408.Yang L., Yang L., Zhao C., et al. Differential alternative splicing genes and isoform co-expression networks of Brassica napus under multiple abiotic stresses // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 13 – P. 1009998.
- 409.Yang Q.E., Giassetti M.I., Ealy A.D. Fibroblast growth factors activate mitogen-activated protein kinase pathways to promote migration in ovine trophoblast cells // REPRODUCTION. – 2011. – Vol. 141. – № 5 – P. 707–714.
- 410.Yang Q., Zhao J., Chen D., et al. E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions // Molecular Biomedicine. – 2021. – Vol. 2. – № 1 – P. 23.
- 411.Yashiro M., Kuroda K., Masuda G., et al. Clinical difference between fibroblast growth factor receptor 2 subclass, type IIIb and type IIIc, in gastric cancer // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – № 1 – P. 4698.
- 412.Yockey L.J., Iwasaki A. Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development // Immunity. – 2018. – Vol. 49. – № 3 – P. 397–412.

- 413.Yoshimura Y. Integrins: Expression, Modulation, and Signaling in Fertilization, Embryogenesis and Implantation. // The Keio Journal of Medicine. – 1997. – Vol. 46. – № 1 – P. 16–24.
- 414.Yzydorczyk C., Armengaud J.B., Peyter A.C., et al. Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: cardiovascular and renal consequences and preventive approaches // Journal of Developmental Origins of Health and Disease. – 2017. – Vol. 8. – № 4 – P. 448–464.
- 415.Zhan X., Yan C., Zhang X., et al. Structure of a human catalytic step I spliceosome // Science. – 2018. – Vol. 359. – № 6375 – P. 537–545.
- 416.Zhan X., Yan C., Zhang X., et al. Structures of the human pre-catalytic spliceosome and its precursor spliceosome // Cell Research. – 2018. – Vol. 28. – № 12 – P. 1129–1140.
- 417.Zhang C., Cao J., Xu M., et al. The role of neutrophils in chorioamnionitis // Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 14 – P. 1198831.
- 418.Zhang Q., Yu S., Huang X., et al. New insights into the function of Cullin 3 in trophoblast invasion and migration // REPRODUCTION. – 2015. – Vol. 150. – № 2 – P. 139–149.
- 419.Zhang X., Yan C., Hang J., et al. An Atomic Structure of the Human Spliceosome // Cell. – 2017. – Vol. 169. – № 5 – P. 918-929.e14
- 420.Zhang Y., Lv J., Fan Y.-J., et al. Evaluating the Effect of Gestational Exposure to Perfluorohexane Sulfonate on Placental Development in Mice Combining Alternative Splicing and Gene Expression Analyses // Environmental Health Perspectives. – 2023. – Vol. 131. – № 11 – P. 117011.
- 421.Zhang Y., Qian J., Gu C., et al. Alternative splicing and cancer: a systematic review // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2021. – Vol. 6. – № 1 – P. 78.
- 422.Zhang Z., Wang X., Zhang L., et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway in trophoblasts and abnormal activation in preeclampsia // Molecular Medicine Reports. – 2017. – Vol. 16. – № 2 – P. 1007–1013.
- 423.Zhao H., Innes J., Brooks D.C. et al. A novel promoter controls Cyp19a1 gene

- expression in mouse adipose tissue // Reproductive Biology and Endocrinology. – 2009. – T. 7. – №. 1 – C. 37.
- 424.Zhao H., Wang A., Zhang Z. LncRNA SDHAP1 confers paclitaxel resistance of ovarian cancer by regulating EIF4G2 expression via miR-4465 // The Journal of Biochemistry. – 2020. – Vol. 168. – № 2 – P. 171–181.
- 425.Zhao Y., Mendelson C.R., Simpson E.R. Characterization of the sequences of the human CYP19 (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. // Molecular Endocrinology. – 1995. – Vol. 9. – № 3 – P. 340–349.
- 426.Zheng C.L., Fu X.-D., Gribskov M. Characteristics and regulatory elements defining constitutive splicing and different modes of alternative splicing in human and mouse // RNA. – 2005. – Vol. 11. – № 12 – P. 1777–1787.
- 427.Zhou Z., Fu X.-D. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases // Chromosoma. – 2013. – Vol. 122. – № 3 – P. 191–207.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 – Список дифференциально сплайсированных генов при сравнении физиологической беременности и изолированной задержки роста плода

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>ACTN4</i>	chr19	ENSG00000130402.14:t:38714469-38714561	True	False	0,20190	AFE
<i>AGO4</i>	chr1	ENSG00000134698.11:s:35850854-35851195	False	False	0,33240	IR
<i>AGO4</i>	chr1	ENSG00000134698.11:s:35850854-35851195	False	True	-0,33240	IR
<i>ARHGEF16</i>	chr1	ENSG00000130762.15:t:3468544-3468936	False	False	0,42600	AFE
<i>ARHGEF16</i>	chr1	ENSG00000130762.15:t:3468544-3468936	False	True	-0,42600	AFE
<i>CDYL2</i>	chr16	ENSG00000166446.15:t:80633019-80633236	False	False	0,39900	AFE
<i>CTBS</i>	chr1	ENSG00000117151.13:s:84570582-84570720	False	False	-0,30210	ES
<i>CTDP1</i>	chr18	ENSG00000060069.18:s:79717810-79718016	False	False	0,32920	ALE
<i>CUL4B</i>	chrX	ENSG00000158290.19:t:120560083-120561079	False	False	0,46120	AFE
<i>CYBB</i>	chrX	ENSG00000165168.9:s:37783490-37783600	True	False	0,23640	IR
<i>DDX60L</i>	chr4	ENSG00000181381.15:s:168400826-168400978	False	False	-0,33020	A3SS
<i>DMD</i>	chrX	ENSG00000198947.18:s:31129927-31134689	False	False	0,31870	ES
<i>DMD</i>	chrX	ENSG00000198947.18:t:31120768-31121930	False	False	0,33710	ES
<i>ENSG00000290591</i>	chr2	ENSG00000290591.1:s:130028309-130031918	False	False	-0,44730	IR
<i>ENSG00000290591</i>	chr2	ENSG00000290591.1:s:130028309-130031918	False	True	0,42380	IR
<i>EXPH5</i>	chr11	ENSG00000110723.12:t:108528136-108528184	False	False	-0,32920	AFE
<i>HDAC8</i>	chrX	ENSG00000147099.21:s:72567889-72568030	True	False	0,21493	ALE

Продолжение таблицы A1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>IMMP2L</i>	chr7	ENSG00000184903.10:s:111487234-111487341	False	False	0,52210	ALE
<i>IMMP2L</i>	chr7	ENSG00000184903.10:s:111487234-111487341	False	True	-0,52170	ALE
<i>KMT2E</i>	chr7	ENSG00000005483.23:s:105014164-105014535	False	False	-0,36890	ALE
<i>LPAR2</i>	chr19	ENSG00000064547.14:s:19628092-19628221	True	False	0,28500	ALE
<i>MORN1</i>	chr1	ENSG00000116151.14:s:2391458-2391707	False	False	0,48790	ES
<i>OTUD3</i>	chr1	ENSG00000169914.6:s:19882395-19882734	False	False	-0,33530	A5SS
<i>OTUD3</i>	chr1	ENSG00000169914.6:s:19882395-19882734	False	True	0,33530	A5SS
<i>POLB</i>	chr8	ENSG00000070501.12:s:42338454-42338685	False	False	0,31030	ES
<i>POLB</i>	chr8	ENSG00000070501.12:t:42344953-42345019	False	False	0,47010	ES
<i>PPIL2</i>	chr22	ENSG00000100023.20:s:21669913-21669962	True	False	-0,39090	A3SS
						ES
<i>PPP2R5C</i>	chr14	ENSG00000078304.20:s:101762905-101762970	False	False	0,42680	ALE
<i>PRUNE2</i>	chr9	ENSG00000106772.19:s:76629192-76629290	True	False	0,26470	ES
						IR
<i>PRUNE2</i>	chr9	ENSG00000106772.19:t:76614008-76614600	True	False	0,34520	ES
<i>PRUNE2</i>	chr9	ENSG00000106772.19:t:76614008-76614600	True	True	-0,37110	ES
<i>PUF60</i>	chr8	ENSG00000179950.15:t:143818373-143818534	False	False	-0,40510	ES
<i>REEP1</i>	chr2	ENSG00000068615.20:s:86232625-86232802	False	False	0,35010	ES
<i>SDCCAG8</i>	chr1	ENSG00000054282.16:s:243304713-243304777	True	False	0,28360	ALE

Продолжение таблицы A1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
SDHAP1	chr3	ENSG00000185485.15:s:195990190-195990258	True	False	0,46060	ALE
						ES
SDHAP1	chr3	ENSG00000185485.15:s:195990190-195990258	True	True	-0,33720	ALE
SDHAP1	chr3	ENSG00000185485.15:t:195985627-195985789	True	False	0,28670	ES
SDHAP1	chr3	ENSG00000185485.15:t:195985627-195985789	True	True	-0,28670	ES
SDHAP1	chr3	ENSG00000290763.1:s:195990190-195990318	True	False	0,46060	ES
SDHAP1	chr3	ENSG00000290763.1:s:195990190-195990318	True	True	-0,33720	ES
SDHAP1	chr3	ENSG00000290763.1:t:195984112-195984276	True	False	0,20090	ES
SDHAP1	chr3	ENSG00000290763.1:t:195984112-195984276	True	True	-0,20070	ES
SDHAP1	chr3	ENSG00000290763.1:t:195985446-195985789	True	False	0,28670	ES
SDHAP1	chr3	ENSG00000290763.1:t:195985446-195985789	True	True	-0,28670	ES
SENP7	chr3	ENSG00000138468.16:s:101417593-101417790	True	False	-0,61030	ES
SENP7	chr3	ENSG00000138468.16:t:101372008-101372126	True	False	-0,34400	ES
SLC2A11	chr22	ENSG00000133460.20:s:23856703-23856991	True	False	0,36050	ES
SLC2A11	chr22	ENSG00000133460.20:t:23862104-23862325	True	False	-0,21750	ALE
						ES
STAU2	chr8	ENSG00000040341.18:s:73738284-73738349	True	False	0,43120	ES
STAU2	chr8	ENSG00000040341.18:t:73688651-73688813	True	False	0,20620	ALE
STAU2	chr8	ENSG00000040341.18:t:73738284-73738349	True	False	0,25519	ALE
STAU2	chr8	ENSG00000040341.18:t:73739756-73739868	True	False	-0,22837	ALE

Окончание таблицы A1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>STIMATE</i>	chr3	ENSG00000213533.13:t:52842811-52842960	False	False	-0,43540	AFE
<i>TOR1AIP1</i>	chr1	ENSG00000143337.19:s:179884692-179884769	False	False	0,33200	A3SS
<i>ZC3H14</i>	chr14	ENSG00000100722.20:s:88577985-88578141	True	False	-0,35570	ALE
						ES
<i>ZC3H14</i>	chr14	ENSG00000100722.20:t:88607243-88607363	True	False	-0,35090	AFE
						ES

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б1 – Список дифференциально сплайсированных генов при сравнении физиологической беременности и сочетанной задержки
роста плода

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>ADAM15</i>	chr1	ENSG00000143537.14:s:155060205-155060343	False	False	0,31980	ES
<i>ADAM15</i>	chr1	ENSG00000143537.14:t:155062161-155062369	False	False	0,25480	ES
<i>ADGRG1</i>	chr16	ENSG00000205336.14:t:57650253-57650355	True	False	-0,45190	AFE
<i>ARHGEF16</i>	chr1	ENSG00000130762.15:t:3468544-3468936	False	False	0,39630	AFE
<i>ARHGEF16</i>	chr1	ENSG00000130762.15:t:3468544-3468936	False	True	-0,39630	AFE
<i>CDYL2</i>	chr16	ENSG00000166446.15:t:80633019-80633236	False	False	-0,39420	AFE
<i>CEP63</i>	chr3	ENSG00000182923.20:t:134495296-134495364	True	False	-0,39200	AFE
<i>CUL4B</i>	chrX	ENSG00000158290.19:t:120560083-120561079	False	False	-0,33170	AFE
<i>DMD</i>	chrX	ENSG00000198947.18:s:31129927-31134689	False	False	0,32290	ES
<i>DMD</i>	chrX	ENSG00000198947.18:t:31120768-31121930	False	False	0,35610	ES
<i>EEF1AKMT2</i>	chr10	ENSG00000203791.15:s:124765392-124765791	False	False	-0,42020	ES
<i>EEF1AKMT2</i>	chr10	ENSG00000203791.15:t:124756254-124760503	False	False	0,03614	ES
<i>ENSG00000290591</i>	chr2	ENSG00000290591.1:s:130028309-130031918	False	False	-0,42520	IR
<i>ENSG00000290591</i>	chr2	ENSG00000290591.1:s:130028309-130031918	False	True	0,42510	IR
<i>ENSG00000291117</i>	chr17	ENSG00000291117.1:s:64821636-64822052	False	False	0,48500	ES
<i>ENSG00000291117</i>	chr17	ENSG00000291117.1:t:64804830-64805100	False	False	0,29130	ES

Продолжение таблицы Б1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>EPB41</i>	chr1	ENSG00000159023.23:s:29053104-29054514	True	False	0,21560	ES
<i>EPB41</i>	chr1	ENSG00000159023.23:t:29060422-29060484	True	False	0,02504	ES
<i>EPB41</i>	chr1	ENSG00000159023.23:t:29064957-29065616	True	False	-0,25100	ES
<i>FAM13A</i>	chr4	ENSG00000138640.15:s:88822976-88823361	True	False	0,13120	ES
<i>FAM13A</i>	chr4	ENSG00000138640.15:t:88790586-88790627	True	False	0,05888	AFE
						ES
<i>FAM13A</i>	chr4	ENSG00000138640.15:t:88805011-88805052	True	False	-0,30800	AFE
<i>GMIP</i>	chr19	ENSG00000089639.11:s:19636707-19636796	False	False	-0,40940	ALE
<i>GTF2H2</i>	chr5	ENSG00000145736.15:s:71067655-71067689	True	True	0,37450	ES
<i>GTF2H2</i>	chr5	ENSG00000145736.15:t:71062708-71062799	True	False	0,12140	AFE
						ES
<i>HDAC8</i>	chrX	ENSG00000147099.21:s:72567889-72568030	True	False	0,03189	ALE
<i>PCGF5</i>	chr10	ENSG00000180628.15:t:91222689-91222983	False	False	0,39250	AFE
<i>POLB</i>	chr8	ENSG00000070501.12:s:42338454-42338685	False	False	0,33660	ES
<i>POLB</i>	chr8	ENSG00000070501.12:t:42344953-42345019	False	False	0,48420	ES
<i>POLD4</i>	chr11	ENSG00000175482.9:t:67352893-67353160	False	False	-0,29490	AFE
<i>PPIL2</i>	chr22	ENSG00000100023.20:s:21669913-21669962	True	False	-0,34850	A3SS
						ES

Продолжение таблицы Б1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>PPIL2</i>	chr22	ENSG00000100023.20:t:21670566-21670611	True	False	0,03044	ES
<i>PPP1R12A</i>	chr12	ENSG00000058272.19:s:79806816-79807330	True	False	0,31740	ES
						A3SS
						ES
<i>PTPN12</i>	chr7	ENSG00000127947.16:s:77538029-77538106	True	False	0,13290	ES
<i>PTPN12</i>	chr7	ENSG00000127947.16:s:77538765-77538845	True	False	-0,50500	ALE
						IR
<i>PTPN12</i>	chr7	ENSG00000127947.16:s:77538765-77538845	True	True	0,50500	ALE
						IR
<i>PTPN12</i>	chr7	ENSG00000127947.16:t:77571078-77571186	True	False	0,03162	AFE
<i>RGL2</i>	chr6	ENSG00000237441.10:t:33297032-33297115	True	False	-0,39980	AFE
<i>RHOBTB1</i>	chr10	ENSG00000072422.17:t:60941804-60941854	False	False	-0,35170	AFE
<i>SEN7</i>	chr3	ENSG00000138468.16:s:101417593-101417790	True	False	0,45890	ES
<i>SEN7</i>	chr3	ENSG00000138468.16:s:101458955-101459052	True	False	0,05550	ES
<i>SEN7</i>	chr3	ENSG00000138468.16:t:101372008-101372126	True	False	0,02893	ES
<i>SLC20A2</i>	chr8	ENSG00000168575.10:s:42541538-42541711	True	False	0,25420	ALE
<i>SLC20A2</i>	chr8	ENSG00000168575.10:s:42541538-42541711	True	True	-0,25480	ALE
<i>SLC20A2</i>	chr8	ENSG00000168575.10:t:42472102-42472654	True	False	0,18220	AFE

Продолжение таблицы Б1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>SLC20A2</i>	chr8	ENSG00000168575.10:t:42472102-42472654	True	True	-0,43910	AFE
<i>SLC20A2</i>	chr8	ENSG00000168575.10:t:42535172-42535335	True	False	-0,26560	AFE
<i>SMPDL3A</i>	chr6	ENSG00000172594.13:s:122789049-12279058	False	False	-0,25540	ES
<i>SMPDL3A</i>	chr6	ENSG00000172594.13:t:122796824-122797345	False	False	0,30240	ES
<i>TBCD</i>	chr17	ENSG00000141556.22:t:82870224-82870380	False	False	-0,35460	AFE
<i>TCF3</i>	chr19	ENSG00000071564.19:s:1615285-1615520	True	False	0,14030	ES
<i>TCF3</i>	chr19	ENSG00000071564.19:s:1615686-1615804	True	False	0,16350	A3SS
						ES
<i>TCF3</i>	chr19	ENSG00000071564.19:t:1611687-1611849	True	False	0,16780	ES
<i>TMEM139</i>	chr7	ENSG00000178826.11:s:143284947-143284998	True	False	-0,27430	A5SS
						ES
<i>TMEM139</i>	chr7	ENSG00000178826.11:s:143284947-143284998	True	True	0,25150	ES
<i>TMEM139</i>	chr7	ENSG00000178826.11:t:143286424-143288048	True	False	0,05258	A5SS
						AFE
						ES
<i>TMEM139</i>	chr7	ENSG00000178826.11:t:143286424-143288048	True	True	0,23510	A5SS
						AFE
						ES

Окончание таблицы Б1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>TNK2</i>	chr3	ENSG00000061938.21:t:195888426-195888606	True	False	-0,39100	AFE
<i>UBE3B</i>	chr12	ENSG00000151148.14:s:109477402-109478109	True	False	0,30140	A5SS
						ES
<i>UBE3B</i>	chr12	ENSG00000151148.14:t:109483531-109483712	True	False	0,02046	ES
<i>UBL7</i>	chr15	ENSG00000138629.16:t:74458684-74458896	False	False	-0,35390	AFE
<i>ZC3H14</i>	chr14	ENSG00000100722.20:s:88577985-88578141	True	False	0,32910	ALE
						ES
<i>ZC3H14</i>	chr14	ENSG00000100722.20:s:88596734-88596808	True	False	0,17260	ALE
<i>ZC3H14</i>	chr14	ENSG00000100722.20:t:88601924-88602009	True	False	0,12460	ES
<i>ZC3H14</i>	chr14	ENSG00000100722.20:t:88607243-88607363	True	False	0,12470	A5SS
						AFE
						ES

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица В1 – Список дифференциально сплайсированных генов при сравнении изолированной и сочетанной задержки роста плода

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>ALG13</i>	chrX	ENSG00000101901.13:s:111681118-111681424	True	False	-0,22430	MXE
<i>ALG13</i>	chrX	ENSG00000101901.13:t:111682132-111682235	True	False	-0,36020	A5SS
<i>CCDC144A</i>	chr17	ENSG00000170160.19:s:16705151-16707398	True	False	0,28580	A3SS
						ALE
<i>CLASP2</i>	chr3	ENSG00000163539.18:t:33551252-33551395	False	False	-0,34590	ES
<i>CYLD</i>	chr16	ENSG00000083799.18:s:50742762-50742841	False	False	0,32250	ES
<i>CYLD</i>	chr16	ENSG00000083799.18:t:50749549-50749798	False	False	-0,27890	ES
<i>DDX60L</i>	chr4	ENSG00000181381.15:s:168400826-168400978	False	False	-0,29120	A3SS
<i>ENSG00000291136</i>	chr7	ENSG00000291136.1:t:66553485-66554837	False	False	-0,35280	AFE
<i>EPB41</i>	chr1	ENSG00000159023.23:t:29064957-29065616	True	False	-0,36710	ES
<i>FER1L4</i>	chr20	ENSG00000088340.17:s:35595477-35595593	True	False	-0,40730	ES
<i>FER1L4</i>	chr20	ENSG00000088340.17:t:35582295-35582710	True	False	-0,20400	A3SS
						ES
<i>FER1L4</i>	chr20	ENSG00000088340.17:t:35583940-35584093	True	False	0,47600	ES
<i>IL17RA</i>	chr22	ENSG00000177663.15:t:17107727-17107768	False	False	0,35160	AFE
<i>RIF3</i>	chr19	ENSG00000126456.16:t:49663343-49663869	True	False	0,31670	AFE

Окончание таблицы В1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>PPIL3</i>	chr2	ENSG00000240344.10:t:200887613-200888004	False	False	0,35600	AFE
<i>PRKD2</i>	chr19	ENSG00000105287.13:s:46716815-46717127	False	False	0,36190	A5SS
<i>RERE</i>	chr1	ENSG00000142599.20:t:8508627-8508675	False	False	-0,33530	AFE
<i>SDHAP1</i>	chr3	ENSG00000185485.15:s:195990190-195990258	True	False	-0,34580	ALE
						ES
<i>SDHAP1</i>	chr3	ENSG00000290763.1:s:195990190-195990318	True	False	-0,34580	ES
<i>SDHAP1</i>	chr3	ENSG00000185485.15:s:195990190-195990258	True	True	0,25740	ALE
						ES
<i>SDHAP1</i>	chr3	ENSG00000185485.15:t:195985627-195985789	True	True	0,28050	ES
<i>SDHAP1</i>	chr3	ENSG00000290763.1:s:195990190-195990318	True	True	0,27840	ES
<i>SDHAP1</i>	chr3	ENSG00000290763.1:t:195984112-195984276	True	True	0,25110	ES
<i>SDHAP1</i>	chr3	ENSG00000290763.1:t:195985446-195985789	True	True	0,28050	ES
<i>SLC20A2</i>	chr8	ENSG00000168575.10:s:42541538-42541711	True	False	-0,41940	ALE
<i>TLR4</i>	chr9	ENSG00000136869.16:s:117704175-117704565	True	False	0,21430	ALE
						ES
						IR
<i>TLR4</i>	chr9	ENSG00000136869.16:t:117708563-117708979	True	False	0,42520	ES

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Таблица Г1 – Список дифференциально сплайсированных генов при сравнении выраженной и умеренной задержки роста плода

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>ABI3BP</i>	chr3	ENSG00000154175.18:s:100821054-100821113	True	False	0,41870	ALE
<i>ABI3BP</i>	chr3	ENSG00000154175.18:s:100822589-100822672	True	False	-0,23110	ES
<i>ABI3BP</i>	chr3	ENSG00000154175.18:s:100824858-100824941	True	True	0,20305	IR
<i>ABI3BP</i>	chr3	ENSG00000154175.18:s:100828393-100828452	True	True	0,24680	IR
<i>ABI3BP</i>	chr3	ENSG00000154175.18:t:100824858-100824941	True	False	0,25106	AFE
<i>ABI3BP</i>	chr3	ENSG00000154175.18:t:100825785-100825844	True	True	0,23860	IR
<i>ABI3BP</i>	chr3	ENSG00000154175.18:t:100829581-100829664	True	False	0,22422	AFE
<i>AEBP2</i>	chr12	ENSG00000139154.16:t:19462510-19462717	True	False	0,40320	AFE
<i>ANGPT1</i>	chr8	ENSG00000154188.10:t:107336150-107336271	False	False	0,35140	AFE
<i>AP1G2</i>	chr14	ENSG00000213983.12:s:23562187-23562415	False	False	0,64780	ES
<i>AP1G2</i>	chr14	ENSG00000213983.12:t:23561512-23561635	False	False	0,34590	ES
<i>AP3S2</i>	chr15	ENSG00000157823.17:s:89888521-89888653	True	False	-0,30290	ALE
						ES
<i>ATP11A</i>	chr13	ENSG00000068650.19:s:112875776-112876094	True	False	-0,38380	A3SS
						ALE
<i>ATP11A</i>	chr13	ENSG00000068650.19:s:112875776-112876094	True	True	0,38920	A3SS
						ALE

Продолжение таблицы Г1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>C1orf52</i>	chr1	ENSG00000162642.14:s:85259358-85259672	False	False	-0,39320	ES
<i>C2</i>	chr6	ENSG00000166278.16:t:31933610-31933783	True	False	0,35070	AFE
<i>CALHM2</i>	chr10	ENSG00000138172.11:s:103452156-103452402	True	False	0,32970	A3SS
						ALE
						ES
<i>CCDC68</i>	chr18	ENSG00000166510.14:t:54936833-54937277	False	False	0,50680	AFE
<i>CCDC68</i>	chr18	ENSG00000166510.14:t:54936833-54937277	False	True	0,50680	AFE
<i>CLN3</i>	chr16	ENSG00000188603.22:t:28489290-28489386	False	False	0,39560	AFE
<i>COPS8</i>	chr2	ENSG00000198612.11:t:237087127-237087197	False	False	0,33280	ES
<i>CPZ</i>	chr4	ENSG00000109625.19:s:8592660-8592921	True	False	0,58700	ES
						IR
<i>CPZ</i>	chr4	ENSG00000109625.19:s:8592660-8592921	True	True	-0,58210	IR
<i>CSNK1E</i>	chr22	ENSG00000213923.13:s:38298786-38298934	False	False	0,30930	ES
<i>CYB5R2</i>	chr11	ENSG00000166394.15:t:7672628-7672891	True	False	-0,32510	AFE
<i>DCP1A</i>	chr3	ENSG00000272886.6:s:53312241-53312379	False	False	-0,32190	ES
<i>DKK3</i>	chr11	ENSG00000050165.19:t:12008370-12008630	True	False	0,28340	AFE
<i>DNAL1</i>	chr14	ENSG00000119661.15:s:73644875-73645042	False	False	-0,46420	ES
<i>DNAL1</i>	chr14	ENSG00000119661.15:t:73654847-73654885	False	False	-0,48200	ES

Продолжение таблицы Г1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>DNM1L</i>	chr12	ENSG00000087470.21:s:32737105-32737306	True	False	0,36380	ALE
						ES
<i>ENAH</i>	chr1	ENSG00000154380.19:t:225500992-225501256	False	False	0,44640	AFE
<i>ENSG00000286058</i>	chr2	ENSG00000286058.1:s:130045357-130045580	False	False	0,45940	IR
<i>ENSG00000286058</i>	chr2	ENSG00000286058.1:s:130045357-130045580	False	True	0,45940	IR
<i>ENSG00000287839</i>	chr1	ENSG00000287839.2:s:155634770-155634846	False	False	0,33620	IR
<i>ENSG00000287839</i>	chr1	ENSG00000287839.2:s:155634770-155634846	False	True	0,33620	IR
<i>ENSG00000290415</i>	chr22	ENSG00000290415.1:s:15820621-15820884	True	False	0,34780	IR
<i>ENSG00000290415</i>	chr22	ENSG00000290415.1:t:15813394-15813481	True	True	-0,24100	IR
<i>ENSG00000290854</i>	chr1	ENSG00000290854.1:s:1745724-1745992	False	False	0,37170	ALE
<i>ENSG00000291117</i>	chr17	ENSG00000291117.1:s:64821636-64822052	False	False	-0,30940	ES
<i>ENSG00000291136</i>	chr7	ENSG00000291136.1:t:66573139-66573550	False	False	0,42540	AFE
<i>ENSG00000291205</i>	chr14	ENSG00000291205.1:s:19301704-19301967	True	False	0,26850	ES
						IR
<i>ENSG00000291205</i>	chr14	ENSG00000291205.1:s:19301704-19301967	True	True	-0,30550	IR
<i>ENSG00000291205</i>	chr14	ENSG00000291205.1:t:19309106-19309193	True	False	0,21360	IR
<i>EP400</i>	chr12	ENSG00000183495.15:s:131979694-131979793	True	False	0,52660	ES

Продолжение таблицы Г1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>EP400</i>	chr12	ENSG00000183495.15:t:131982093-131982478	True	False	0,41170	A5SS
						ES
<i>EP400</i>	chr12	ENSG00000183495.15:t:131982093-131982478	True	True	-0,48210	A5SS
<i>EPN1</i>	chr19	ENSG00000063245.15:t:55678527-55678855	False	False	-0,55900	ES
<i>EPN1</i>	chr19	ENSG00000063245.15:t:55678527-55678855	False	True	-0,55790	ES
<i>ERI3</i>	chr1	ENSG00000117419.16:s:44354892-44355260	True	False	-0,40430	A5SS
<i>ERI3</i>	chr1	ENSG00000117419.16:s:44354892-44355260	True	True	0,23540	A5SS
						ES
<i>ESAM</i>	chr11	ENSG00000149564.12:s:124754630-124754763	False	False	0,38830	A5SS
<i>FAM118B</i>	chr11	ENSG00000197798.9:s:126211724-126211830	False	False	0,26540	ES
<i>FAM118B</i>	chr11	ENSG00000197798.9:t:126234995-126235087	False	False	0,53680	ES
<i>GPANK1</i>	chr6	ENSG00000204438.11:t:31664841-31665003	False	False	0,44160	AFE
<i>HPS5</i>	chr11	ENSG00000110756.18:t:18317751-18317907	True	False	0,37140	AFE
<i>HPS5</i>	chr11	ENSG00000110756.18:t:18317751-18317907	True	True	-0,24020	A5SS
						AFE
<i>HYCC2</i>	chr2	ENSG00000155744.10:t:200973718-200981871	False	False	0,40560	AFE
<i>MBD5</i>	chr2	ENSG00000204406.14:t:148178700-148178793	True	False	-0,35920	AFE

Продолжение таблицы Г1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>MED13L</i>	chr12	ENSG00000123066.9:s:116236821-116236890	True	False	0,37350	ALE
						IR
<i>MED13L</i>	chr12	ENSG00000123066.9:s:116236821-116236890	True	True	-0,24840	ALE
						IR
<i>MFF</i>	chr2	ENSG00000168958.21:s:227340292-227340561	True	False	0,24480	ES
<i>MFF</i>	chr2	ENSG00000168958.21:t:227346725-227347384	True	False	-0,40930	ES
<i>MPST</i>	chr22	ENSG00000128309.17:t:37024192-37024810	False	False	0,42480	AFE
<i>MROH1</i>	chr8	ENSG00000179832.18:s:144242211-144242515	False	False	-0,23380	ES
<i>MROH1</i>	chr8	ENSG00000179832.18:t:144243494-144243616	False	False	-0,36820	ES
<i>MTA3</i>	chr2	ENSG00000057935.14:s:42697776-42697834	False	False	-0,46530	A3SS
<i>MTRF1L</i>	chr6	ENSG00000112031.16:s:152998293-152998742	False	False	0,34810	A3SS
<i>NKTR</i>	chr3	ENSG00000114857.19:s:42621005-42621516	True	False	0,38990	ES
						IR
<i>NKTR</i>	chr3	ENSG00000114857.19:s:42621005-42621516	True	True	-0,44530	IR
<i>NKTR</i>	chr3	ENSG00000114857.19:t:42630546-42630575	True	False	0,31330	ES
						IR
<i>PARP2</i>	chr14	ENSG00000129484.14:s:20344932-20345126	False	False	0,60530	A5SS
<i>PBRM1</i>	chr3	ENSG00000163939.19:s:52561767-52561968	True	False	0,25460	ES

Продолжение таблицы Г1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>PBRM1</i>	chr3	ENSG00000163939.19:t:52550747-52550817	True	False	-0,56680	ES
						MXE
<i>PDE6D</i>	chr2	ENSG00000156973.14:s:231737422-231738138	False	False	0,52920	ALE
<i>PFKFB3</i>	chr10	ENSG00000170525.21:t:6213623-6213748	False	False	0,42950	AFE
<i>PI4KAP2</i>	chr22	ENSG00000183506.17:s:21475992-21476160	False	False	-0,32290	A5SS
<i>PLCB1</i>	chr20	ENSG00000182621.18:t:8150294-8150383	False	False	-0,47030	AFE
<i>PLD3</i>	chr19	ENSG00000105223.21:s:40348456-40348724	True	False	0,44350	ES
						MXE
<i>POTEF</i>	chr2	ENSG00000196604.13:t:130102110-130102180	True	False	0,36890	AFE
						IR
<i>POTEF</i>	chr2	ENSG00000196604.13:t:130102110-130102180	True	True	-0,36890	AFE
						IR
<i>PPIP5K2</i>	chr5	ENSG00000145725.21:s:103180021-103180188	False	False	0,33540	ES
<i>PPIP5K2</i>	chr5	ENSG00000145725.21:t:103184243-103184744	False	False	0,39350	ES
<i>PREPL</i>	chr2	ENSG00000138078.16:s:44361380-44361494	True	False	0,32300	ES
<i>PREPL</i>	chr2	ENSG00000138078.16:t:44346268-44346390	True	False	-0,30350	A5SS
						AFE
<i>PROSER2-AS1</i>	chr10	ENSG00000225778.5:s:11869366-11869501	False	False	0,39600	IR

Продолжение таблицы Г1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>PROSER2-AS1</i>	chr10	ENSG00000225778.5:s:11869366-11869501	False	True	0,39600	IR
<i>PSPH</i>	chr7	ENSG00000146733.14:s:56033961-56034172	False	False	-0,26980	ES
<i>PSPH</i>	chr7	ENSG00000146733.14:t:56031929-56032054	False	False	-0,33200	ES
<i>PUF60</i>	chr8	ENSG00000179950.15:t:143818373-143818534	False	False	0,49510	AFE
<i>R3HDM1</i>	chr2	ENSG00000048991.17:s:135604856-135606676	True	False	-0,40320	ALE
						ES
<i>R3HDM1</i>	chr2	ENSG00000048991.17:t:135621494-135621608	True	False	0,28150	ES
<i>RAB11FIP3</i>	chr16	ENSG00000090565.17:s:488851-489101	False	False	0,56580	ALE
<i>RABGAP1</i>	chr9	ENSG00000011454.18:t:122957011-122957209	True	False	-0,40450	AFE
<i>RABGAP1</i>	chr9	ENSG00000011454.18:t:122957011-122957209	True	True	-0,40400	AFE
<i>RASEF</i>	chr9	ENSG00000165105.10:s:83062437-83063177	False	False	0,36910	ALE
<i>RBPMs</i>	chr8	ENSG00000157110.16:s:30558181-30558956	True	False	-0,34970	ALE
						IR
<i>RBPMs</i>	chr8	ENSG00000157110.16:s:30558181-30558956	True	True	0,35860	ALE
						IR
<i>RC3H1</i>	chr1	ENSG00000135870.12:s:173946476-173946608	False	False	-0,39510	A3SS

Продолжение таблицы Г1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
RECQL	chr12	ENSG00000004700.16:s:21501413-21501669	True	False	0,41460	A3SS
						A5SS
						ES
RNF111	chr15	ENSG00000157450.16:s:59091059-59091154	False	False	0,39830	A3SS
RNH1	chr11	ENSG00000023191.17:t:502214-503570	True	False	0,37960	AFE
						ES
RNH1	chr11	ENSG00000023191.17:t:504824-504996	True	False	0,20230	AFE
SKI	chr1	ENSG00000157933.11:s:2303646-2304108	False	False	-0,38530	A5SS
SLFN5	chr17	ENSG00000166750.10:s:35260971-35261096	False	False	-0,37690	ES
SMARCAD1	chr4	ENSG00000163104.18:s:94278616-94278733	False	False	0,47760	A3SS
STRA6	chr15	ENSG00000137868.19:t:74202155-74202405	False	False	0,39430	AFE
SYNRG	chr17	ENSG00000275066.5:s:37584322-37584759	False	False	-0,29090	ALE
THNSL2	chr2	ENSG00000144115.18:t:88185898-88186636	True	False	0,49870	AFE
TMEM18	chr2	ENSG00000151353.15:s:677289-677406	False	False	0,45780	ALE
TMEM251	chr14	ENSG00000153485.6:t:93186260-93188463	False	False	-0,39720	AFE
TNKS2	chr10	ENSG00000107854.6:s:91836796-91836884	True	True	0,39810	IR
TOR1AIP1	chr1	ENSG00000143337.19:s:179884692-179884769	False	False	-0,28420	A3SS
ULK4	chr3	ENSG00000168038.11:t:41912807-41913204	False	False	-0,46500	AFE

Окончание таблицы Г1

gene_name	seqid	lsv_id	complex	de novo	median_dpsi	type
<i>ULK4</i>	chr3	ENSG00000168038.11:t:41912807-41913204	False	True	-0,46490	AFE
<i>UPF3B</i>	chrX	ENSG00000125351.14:t:119838266-119838527	False	False	0,44730	AFE
<i>UVSSA</i>	chr4	ENSG00000163945.19:t:1348090-1348189	True	False	-0,34620	AFE
<i>VEZT</i>	chr12	ENSG00000028203.19:s:95251940-95252440	True	False	-0,29920	ES
						IR
<i>VEZT</i>	chr12	ENSG00000028203.19:t:95257150-95257239	True	False	-0,26220	ES
<i>VPS13D</i>	chr1	ENSG00000048707.15:s:12335705-12337988	True	False	-0,36290	A3SS
						ALE
<i>VPS13D</i>	chr1	ENSG00000048707.15:s:12335705-12337988	True	True	0,23980	A3SS
						ALE
<i>YY1AP1</i>	chr1	ENSG00000163374.20:s:155670320-155671091	False	False	0,41070	A3SS
<i>ZBTB20</i>	chr3	ENSG00000181722.18:t:114500352-114500391	True	False	0,35700	AFE
<i>ZNF28</i>	chr19	ENSG00000198538.11:s:52817944-52818031	True	False	-0,33010	ES
<i>ZNF331</i>	chr19	ENSG00000130844.19:t:53555845-53555908	False	False	-0,31230	AFE

БЛАГОДАРНОСТИ

Прежде всего, выражаю искреннюю благодарность моим научным руководителям, академику РАН, доктору биологических наук, профессору Вадиму Анатольевичу Степанову за предоставленную возможность участия в значимой научной работе, за внимательное руководство, ценные советы и критические замечания, оказавшие неоценимую помощь при планировании и выполнении исследования; и старшему научному сотруднику лаборатории эволюционной генетики, кандидату медицинских наук Екатерине Александровне Трифоновой за формирование моих научных интересов, постоянную поддержку, ценные рекомендации и помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы.

Благодарю коллектив лаборатории эволюционной генетики за содействие в освоении методик, участие в экспериментальной части исследования и создание атмосферы доброжелательности и профессиональной вовлечённости. Отдельную благодарность выражаю сотрудникам НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ за практические советы, готовность делиться знаниями и поддержку, способствующую успешной реализации исследования.

Особая признательность – врачу акушеру-гинекологу Областного перинатального центра имени И.Д. Евтушенко г. Томска Екатерине Владимировне Ижойкиной за сотрудничество и предоставленные материалы, необходимые для выполнения настоящей работы.

И, наконец, благодарю своих родных и близких за понимание, терпение и всестороннюю поддержку как в процессе подготовки данной диссертации, так и на протяжении моей профессиональной деятельности.