

РОЛЬ КЛАСТЕРИНА В ПРОГНОЗИРОВАНИИ РАЗВИТИЯ РАННЕЙ И ПОЗДНЕЙ ПРЕЭКЛАМПСИИ В ПЕРВОМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

А. В. Тимофеева[✉], И. С. Федоров, А. М. Тарасова, К. А. Горина, Ю. В. Сухова, В. А. Гусар, Т. Ю. Иванец

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Преэклампсия (ПЭ) встречается в 2–8% беременностей, является одной из важнейших причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. На сегодняшний день нет используемых в клинической практике тест-систем, позволяющих с высокой точностью прогнозировать на 11–14-й неделе беременности ранний дебют ПЭ (с 20-й по 34-ю неделю) или поздний дебют ПЭ (после 34-й недели). Целью исследования было оценить возможности использования количественного определения секреторной формы кластерина в прогнозировании развития ранней и поздней ПЭ в первом триместре беременности. Выбор данного белка обусловлен специфичностью его экспрессии для клеток цитотрофобласта, синцитиотрофобласта и внеклеточного трофобласта, а также доказанным негативным влиянием кластерина на инвазивные свойства трофобластных клеток и гестационные преобразования сосудов матки, играющих ключевую роль в патогенезе ПЭ. В исследование включены 40 беременных в возрасте от 27–40 лет, проходивших комплексное скрининговое обследование в первом триместре беременности. Методом Вестерн-блоттинга обнаружено значимое повышение уровня секреторного кластерина (40 кДа) в сыворотке крови беременных в случае развития ПЭ относительно физиологической беременности: при ранней ПЭ — двукратное увеличение уровня кластерина в везикулярной и вневезикулярной фракции сыворотки крови ($p = 0,03$ и $p = 0,004$ соответственно), при поздней ПЭ — трехкратное увеличение только во вневезикулярной фракции сыворотки крови ($p = 0,002$). Согласно моделям логистической регрессии уровень секреторного кластерина во вневезикулярной фракции сыворотки крови беременных в первом триместре обладает прогностической значимостью при оценке вероятности развития ранней ПЭ (AUC = 0,97, Se = 1, Sp = 0,875, cutoff = 0,3877) и поздней ПЭ (AUC = 1, Se = 1, Sp = 1, cutoff = 0,5).

Ключевые слова: сыворотка периферической крови, везикулы, плацента, кластерин, преэклампсия, Вестерн-блоттинг, мкРНК, количественная ПЦР в реальном времени

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках гранта № 22-15-00363 «Эпигенетические и биохимические аспекты патологии беременности при нарушениях инвазивных свойств трофобласта: от ранней диагностики к профилактике материнской и перинатальной заболеваемости» в соответствии с соглашением № 22-15-00363 между Российским научным фондом, руководителем проекта Тимофеевой А. В. и НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова о предоставлении гранта на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований от 13.05.2022 г.

Вклад авторов: А. В. Тимофеева — планирование исследования, проведение количественной ПЦР в реальном времени, проведение Вестерн-блоттинга, написание и редактирование рукописи; И. С. Федоров — пробоподготовка, проведение Вестерн-блоттинга, статистическая обработка данных; А. М. Тарасова — пробоподготовка и проведение Вестерн-блоттинга; К. А. Горина — клиническая характеристика пациенток; Ю. В. Сухова — формирование групп пациенток для исследования, В. А. Гусар — анализ полученных данных; Т. Ю. Иванец — скрининг в 1-м триместре беременности.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (протокол № 13 от 10 декабря 2020 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации 1964 г. ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 г. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Анжелика Владимировна Тимофеева
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; v_timofeeva@oparina4.ru, avtimofeeva28@gmail.com

Статья получена: 23.11.2022 **Статья принята к печати:** 17.12.2022 **Опубликована онлайн:** 28.12.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.061

ROLE OF CLUSTERIN IN PREDICTING DEVELOPMENT OF EARLY- AND LATE-ONSET PREECLAMPSIA IN THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY

Timofeeva AV[✉], Fedorov IS, Tarasova AM, Gorina KA, Suhova YuV, Gusar VA, Ivanets TYu

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Preeclampsia (PE) occurs in 2–8% of pregnancies. It is one of the leading causes of maternal and perinatal morbidity and mortality. Today, there are no tests adopted by the practitioners that enable accurate prediction of early (weeks 20 through 34) or late (after week 34) onset of PE when the pregnancy is in its 11th to 14th week. This study aimed to evaluate the feasibility of using secretory clusterin quantification to predict early or late PE during the first trimester of pregnancy. The choice of this protein is determined, on the one hand, by the specificity of its expression for cytotrophoblast, syncytiotrophoblast, and extracellular trophoblast cells, and, on the other hand, by the proven negative effect of clusterin on the invasive properties of trophoblastic cells and gestational transformations of uterine vessels, which play a key role in the pathogenesis of PE. The study included 40 pregnant women aged 27–40 years who underwent a comprehensive screening examination in the first trimester of pregnancy. Western blotting revealed a significant increase in the level of secretory clusterin (40 kDa) in the blood serum of pregnant women in the case of PE compared to physiological pregnancy: in early-onset PE, a twofold increase in the level of clusterin in the vesicular and extravascular fractions of blood serum ($p = 0.03$ and $p = 0.004$, respectively), with late-onset PE — a threefold increase only in the extravascular fraction of blood serum ($p = 0.002$). According to logistic regression models, the level of secretory clusterin in the extravascular fraction of blood serum of pregnant women in the first trimester has prognostic significance in assessing the likelihood of developing early-onset PE (AUC = 0.97, Se = 1, Sp = 0.875, cutoff = 0.3877) and late-onset PE (AUC = 1, Se = 1, Sp = 1, cutoff = 0.5).

Keywords: peripheral blood serum, vesicles, placenta, clusterin, preeclampsia, Western blotting, miRNA, quantitative real-time PCR

Funding: the work was financially supported by the Russian Science Foundation under grant #22-15-00363 "Epigenetic and biochemical aspects of the pathology of pregnancy in violations of the invasive properties of the trophoblast: from early diagnosis to the prevention of maternal and perinatal morbidity", under the Agreement #22-15-00363 of May 13, 2022 for provision of a grant to support fundamental and basic research, made between the Russian Science Foundation, Angelika Vladimirovna Timofeeva (principal researcher/manager for the study) and V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.

Author contribution: Timofeeva AV — study planning, quantitative real-time PCR, Western blotting, manuscript authoring and editing; Fedorov IS — preparation of samples, Western blotting, statistical processing of the data; Tarasova AM — preparation of samples and Western blotting; Gorina KA — clinical profiling of the patients; Suhova YuV — formation of groups of patients for the study, Gusar VA — analysis of the data obtained; Ivanets TYu — screening in the 1st trimester of pregnancy.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Minutes #13 of December 10, 2020), conducted in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki of 1964, Federal Law "On the Fundamentals of Protecting the Health of Citizens in the Russian Federation" #323 -FZ of November 21, 2011 All patients signed a voluntary informed consent form to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Angelika V. Timofeeva
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; v_timofeeva@oparina4.ru, avtimofeeva28@gmail.com

Received: 23.11.2022 **Accepted:** 17.12.2022 **Published online:** 28.12.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.061

Преэклампсия (ПЭ) является мультисистемным осложнением 3–8% всех беременностей [1], обуславливает 16–18% случаев материнской смертности и 40% случаев смерти плода и новорожденных [2]. В соответствии с Международным обществом по изучению гипертензии при беременности (ISSHP) ПЭ определяют как наличие вновь возникшей гипертензии (более 140/90 мм рт. ст.) после 20 недель беременности, сопровождающейся протеинурией (не менее 0,3 г/л в суточной моче) или признаками острой почечной недостаточности, дисфункцией печени, неврологическими расстройствами, гемолизом или тромбоцитопенией, или внутриутробной задержкой развития плода. В зависимости от времени возникновения клинических симптомов различают раннюю и позднюю ПЭ (дебют заболевания до или после 34-й недели беременности соответственно) [3] [https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/637_1], причем ранняя ПЭ характеризуется наиболее тяжелым течением и составляет 5–20% в структуре всех видов ПЭ. Неблагоприятные исходы для плода связаны с формированием хронической гипоксии и высокой частотой задержки развития, а также вызывают у плода осложнения, обусловленные недоношенностью, включая респираторный дистресс-синдром, инфекционно-воспалительные заболевания, внутрижелудочковые кровоизлияния, церебральный паралич, задержку когнитивных функций, аутизм, психомоторные, поведенческие расстройства и/или неспособность к обучению [4, 5].

Основополагающую роль в патогенезе ПЭ играют материнские и/или плацентарные факторы, что предопределяет время возникновения клинических проявлений ПЭ и их тяжесть. К плацентарным факторам относят нарушения пролиферации и дифференцировки клеток трофобласта на доимплантационном этапе при возникновении ошибок реализации эмбриональной программы и на последующих этапах имплантации вследствие воспалительных изменений в децидуальном слое, влияющих на взаимодействие клеток трофобласта и эндометрия [6–8]. Нарушение дифференцировки клеток вневорсинчатого трофобласта приводит к недостаточному ремоделированию спиральных маточных артерий: сначала в децидуальном сегменте на сроке до 10-й недели беременности, что проявляется в виде сниженной обструкции артерий эндovasкулярными клетками трофобласта и, как следствие, повреждению ворсин плаценты реактивными формами кислорода и азота [9], а затем в сегментах миометрия с 16-й по 18-ю неделю беременности [10]. Результатом аномальной реструктуризации маточных артерий является увеличение резистентности маточных артерий, механическое повреждение ворсин плаценты из-за повышенного давления крови, поступающей в межворсинчатое пространство [11–14], и в итоге гипоксически/ишемические изменения плацентарной ткани ввиду нарушений маточно-плацентарного кровотока [1, 15]. Из ишемизированной плаценты происходит выброс различных биологических факторов, вызывающих системное повреждение эндотелия сосудов и возникновение острой полиорганной недостаточности у матери. При ПЭ доказаны такие изменения уровня циркулирующих в крови плацентарных факторов, как снижение концентрации ассоциированного с беременностью белка А плазмы (PAPP-A) и плацентарного рогового фактора (PIGF) наряду с повышенным образованием растворимой fms-подобной тирозинкиназы-1, уровнем фактора роста

эндотелия сосудов А (VEGF-A), ингибина А, активина А, прокоагулянта Р-селектина, провоспалительного интерлейкина 2 и фактора некроза опухолей альфа и др. [1, 16–18]. К материнским патогенетическим факторам относят генетическую предрасположенность, иммунологические факторы, хронические заболевания у матери (метаболический синдром, сахарный диабет, хроническую артериальную гипертензию), которые могут вносить вклад в регуляцию процесса плацентации, равно как и усугублять восприимчивость материнского организма к факторам, выделяемым ишемизированной тканью плаценты, что ускоряет появление клинических симптомов у матери [19].

В поисках причин временных различий проявления клинических симптомов ПЭ были сопоставлены данные профилирования метилома ДНК клеток трофобласта, плацентарного транскриптома и материнского протеома при ранней и поздней ПЭ [20]. Выявлено влияние секретора сыворотки крови женщин с ПЭ на возникновение стресса эндоплазматического ретикулума (функциональной перегрузки аппарата секреции белка из-за нарушения процессов укладки белковых молекул) в клетках трофобласта [21], причем степень активации системы утилизации неправильно уложенных белков оказалась различной при ранней и поздней ПЭ [22, 23].

Таким образом, тщательный анализ изменений секретора плаценты позволит понять различия патогенеза ранней и поздней ПЭ. В нашем предыдущем исследовании [24] мы обнаружили снижение уровня секреторной формы кластерина в плазме крови женщин при вращении плаценты — осложнении беременности, характеризующемся чрезмерной инвазией клеток трофобласта и повышенным уровнем ангиогенных факторов, т. е. кардинально противоположными процессами, наблюдаемыми при ПЭ. Кластерин является внутри- и внеклеточным шапероном. Он играет важную роль в индуцированном стрессом белковом гомеостазе (протеостазе), и его активность зависит от степени гликозилирования в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) [25, 26]. Кластерин экспрессируется во многих тканях человека, в том числе в клетках цитотрофобласта, синцитиотрофобласта и вневорсинчатого трофобласта [27]. Известно его свойство ингибировать эпителиально-мезенхимальный переход при фенотипической трансформации клеток трофобласта, что снижает их миграцию и инвазию путем подавления уровня экспрессии матриксной металлопротеиназы 9 и виментина и увеличения экспрессии Е-кадгерина [27]. При физиологических условиях кластерин в основном секретируется во внеклеточное пространство после посттрансляционной модификации в ЭПР и аппарате Гольджи, образует комплексы с неправильно свернутыми белками, которые интернализуются рецептор-опосредованным эндоцитозом и затем направляются в аутофагосомы для деградации. Во время стресса ЭПР, например, как следствие окислительного стресса, кластерин высвобождается из ЭПР в цитозоль для формирования комплексов с белками неправильной укладки и направленного транспорта в протеасомы для деградации [28]. Выраженная экспрессия маркеров стресса ЭПР приводит к активации сигнальных путей, участвующих в воспалении и апоптозе — процессах, поддерживающих накопление неправильно свернутых белковых молекул и усугубляющих патологический процесс.

Участие кластерина в процессах, индуцированных стрессом ЭПР, чрезмерные проявления которого

характерны для ПЭ, специфичность его экспрессии в клетках трофобласта и наличие секреторной формы данного белка послужили отправной точкой для проведения научного исследования, целью которого было оценить значение в прогнозировании развития ранней и поздней ПЭ уровня секреторного кластерина в разных фракциях сыворотки крови женщин (везикулярной и вневезикулярной) в первом триместре беременности.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Все пациентки, включенные в настоящее исследование, обратились в Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова (ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова») для ведения беременности и родов.

В первую когорту пациенток вошли 40 беременных в возрасте 27–40 лет, проходивших комплекс исследований

в рамках скрининга первого триместра беременности и сформировавших четыре группы (табл. 1): 1) 10 женщин с низким риском развития ПЭ по данным скрининга первого триместра (по данным программы Astraia) с физиологическим течением беременности и родивших доношенных детей; 2) девять женщин с высоким риском развития ПЭ с физиологическим течением беременности и родивших доношенных детей; 3) 10 женщин с высоким риском развития ПЭ и манифестацией ПЭ на сроке 34–37 недель; 4) 11 женщин с высоким риском развития ПЭ и манифестацией ПЭ на сроке 25–33 недели.

Во вторую когорту пациенток вошли 27 беременных в возрасте 25–38 лет, родоразрешенных путем кесарева сечения и сформировавших четыре группы (табл. 2): 1) шесть женщин с доношенной физиологической беременностью (37–39 недель); 2) семь женщин с предлежанием плаценты и преждевременным излитием околоплодных вод на сроке 25–31 неделя гестации без

Таблица 1. Клинические характеристики групп беременных женщин первой когорты, прошедших скрининг первого триместра беременности

	Норма, N (n = 10)	Норма с высоким риском развития ПЭ, Nhr (n = 9)	Поздняя преэклампсия, пПЭ (n = 10),	Ранняя преэклампсия, рПЭ (n = 11),
	Скрининг первого триместра беременности			
Срок беременности	12,5 (12,0; 13,4)	12,1 (11,2; 13,1)	12,2 (11,6; 12,5)	12,0 (11,2; 12,4)
КТР (43,0–84,0 мм)	62,5 (54,0; 74,7)	59,1 (50,0; 69,0)	59,6 (55,1; 64,0)	57,4 (50,0; 62,0)
ТВП (1,6–1,7 мм)	1,4 (1,1; 2,2)	1,5 (1,0; 2,0)	1,6 (1,3; 2,0)	1,7 (1,1; 2,9)
МА (ПИ), 0,9–2,6 (5-й и 95-й перцентили)	1,6 (0,4; 2,2)	1,8 (1,2; 2,5)	1,7 (0,7; 2,4)	2,1 (1,3; 3,5)
МА (ПИ) МоМ	0,9 (0,3; 1,3)	1,1 (0,8; 1,4)	1,0 (0,4; 1,5)	1,1 (0,3; 2,1)
б-ХГЧ (50,0–55,0 МЕ/мл)	68,7 (52,3; 89,8)	47,1 (23,1; 114,6)	36,4 (27,8; 53,6)	43,4 (15,6; 94,3)
б-ХГЧ (0,5–2,0 МоМ)	1,5 (1,1; 2,3)	1,1 (0,4; 2,5)	0,8 (0,5; 1,6)	0,9 (0,3; 1,7)
PAPP-A (0,7–6,0 МЕ/л)	3,1 (1,6; 6,9)	2,4 (1,1; 4,2)	2,7 (0,6; 5,0)	2,4 (0,8; 6,2)
PAPP-A (0,5–2,0 МоМ)	1,2 (0,5; 3,2)	1,2 (0,4; 2,4)	0,9 (0,4; 2,7)	1,1 (0,5; 2,9)
Родоразрешение				
Срок беременности	38,6 (36,0; 40,6)	37,7 (31,0; 40,2)	37,3 (35,4; 38,5)	31,9 (28,2; 35,6)
АЛТ (до 31,0 Ед/л)	31,8 (8,8; 95,0)	24,1 (11,8; 46,1)	34,2 (12,4; 165,1)	78,2 (11,8; 352,2)
АСТ (до 31,0 Ед/л)	19,7 (11,1; 25,5)	24,3 (13,0; 40,5)	48,9 (10,9; 262,3)	68,7 (13,6; 282,4)
Щелочная фосфатаза (до 239,0 ед/л)	182,3 (130,8; 292,6)	130,2 (94,2; 183,0)	208,8 (154,3; 319,6)	119,8 (87,1; 169,2)
ЛДГ (130,0–220,0 Ед/л)	345,6 (271,0; 408,2)	362,2 (296,8; 422,2)	435,8 (36,4; 743,1)	598,7 (351,4; 1680,0)
АД систолическое (от 20 до 40 лет: 120–127 мм рт. ст.)	118 (90; 140)	135 (105; 170)	140 (127; 160)	152 (140; 170)
АД диастолическое (75–80 мм рт. ст.)	77 (60; 90)	86 (70; 110)	91 (80; 105)	98 (90; 110)
Уровень белка в моче (0,0–0,2, г/л)	0,1 (0,1; 0,1)	0,1 (0,0; 0,1)	0,4 (0,2; 0,9)	2,1 (0,2; 3,4)
Лейкоциты периферической крови (4,0–9,0 тыс/мм ³)	9,5 (5,2; 15,6)	8,8 (7,8; 10,5)	10,8 (7,7; 24,4)	11,5 (3,3; 23,2)
Тромбоциты периферической крови (150–390 тыс/мм ³)	261,8 (201,0; 390,0)	209,9 (146,0; 287,0)	210,1 (93,0; 300,0)	203,5 (82,0; 359,0)
PLGF (250–1200 пг/мл)	115,3 (94,4; 143,8)	74,9 (43,2; 113,4)	83,6 (34,2; 152,0)	56,8 (22,2; 109,7)
sFLT-1 (950–2800 пг/мл)	6271,0 (5168,0; 7763,0)	11895,6 (5190,0; 19418,0)	9651,7 (4027,0; 14131,0)	10722,8 (5216,0; 19738,0)
sFLT-1/ PLGF	54,4 (53,9; 54,8)	173,4 (107,3; 430,1)	129,4 (66,8; 233,6)	285,4 (48,8; 636,2)
Наличие отеков голеней и стоп (число человек)	3	1	4	5
Масса доношенного плода, 3200–3500 г	3396,5 (2880,0; 3952,0)	2764,4 (780,0; 3550,0)	2744,9 (2132,0; 3518,0)	1424,2 (900,0; 2582,0)
Масса плаценты при доношенной беременности, 390–415 г	463,1 (303,0; 650,0)	324,4 (106,0; 449,0)	370,3 (257,0; 465,0)	230,2 (119,0; 371,0)
Среднее значение ПИ маточной артерии (39-я неделя, 5-й и 95-й перцентили: 0,47–0,91)	0,6 (0,5; 0,7)	0,8 (0,5; 1,7)	0,9 (0,6; 1,1)	1,2 (1,0; 1,5)
ПИ артерии пуповины (39-я неделя, 5-й и 95-й перцентили: 0,76–1,03)	0,8 (0,6; 1,4)	1,1 (0,7; 2,3)	0,9 (0,7; 1,0)	1,4 (0,8; 1,8)
ПИ среднемозговой артерии (39-я неделя, 5-й и 95-й перцентили: 0,93–1,73)	1,4 (1,2; 1,7)	1,4 (1,2; 1,6)	1,3 (0,6; 1,7)	1,6 (1,1; 2,4)
Церебро-плацентарное отношение, > 1	1,8 (1,1; 2,5)	1,4 (0,6; 2,0)	1,5 (1,1; 2,3)	1,3 (0,8; 1,9)

Примечание: все данные, за исключением «наличие отеков голеней и стоп», представлены в виде среднего значения (минимум; максимум).

Таблица 2. Клинические характеристики групп беременных женщин второй когорты с физиологической и осложненной беременностью

Родоразрешение	Женщины с физиологически протекающей беременностью	Женщины с осложненной беременностью		
	Плановое кесарево сечение	Экстренное кесарево сечение в связи с отсутствием возможности пролонгирования беременности	Кесарево сечение в связи с ранней преэклампсией	Плановое кесарево сечение в связи с поздней преэклампсией
Группа беременных женщин (число человек)	I (6), $n > 34$	II (7), $n < 34$	III (7), рПЭ	IV (7), пПЭ
Манифестация преэклампсии (недели)	Отсутствует	Отсутствует	24,5 (22,0; 28,0)*	36,1 (36,0; 37,0)*
Срок родоразрешения (недели)	38,0 (37,0; 39,0)*	29,0 (25,0; 32,0)*	28,2 (25,0; 30,0)*	36,9 (36,0; 38,0)*
Наличие тяжелой формы преэклампсии (число человек)	0	0	7	1
Наличие умеренной формы преэклампсии (число человек)	0	0	0	6
Наличие отеков голеней и стоп (число человек)	0	0	1	5
Уровень белка в моче (0,0–0,2 г/л)	Норма	Норма	2,3 (0,2; 4,6)*	1,4 (0,1; 4,1)*
Давление крови – систолическое – диастолическое	112 (107; 119)* 68 (65; 71)*	116 (112; 120)* 77 (74; 81)*	155 (125; 180)* 100 (80; 120)*	144 (120; 175)* 93 (70; 100)*
АЛТ (до 31 Ед/л)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	74 (11; 215)*	23 (12; 32)*
АСТ (до 31 Ед/л)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	55 (11; 194)*	29 (16; 48)*
Щелочная фосфатаза (до 239 ед/л)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	110 (54; 179)*	165 (79; 252)*
Тромбоциты периферической крови (150–390 тыс/мм ³)	228 (166; 290)*	238 (183; 293)*	145 (68; 243)*	238 (181; 308)*
PLGF (250–1200 пг/мл)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	30 (14; 47)*	101 (54; 216)*
sFLT-1 (950–2800 пг/мл)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	11957 (5615; 23226)*	14657 (7489; 24990)*
sFLT-1/ PLGF	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	444 (126; 847)*	193 (42; 348)*

Примечание: * — данные представлены в виде среднего значения (минимум; максимум) на момент поступления в стационар.

клинических проявлений преэклампсии; 3) семь женщин с ранней преэклампсией (25–30 недель); 4) семь женщин с поздней преэклампсией (36–38 недель).

Критерии невключения в исследование обеих когорт пациенток: наступление беременности с помощью вспомогательных репродуктивных технологий, многоплодная беременность, отягощенный соматический анамнез беременной женщины, анеуплодии плода. Методы исследования включали: клинический и биохимический анализы крови, УЗИ органов малого таза и плода, доплерометрию фето-плацентарного кровотока, кардиотокографию, измерение артериального давления, определение уровня белка в моче, определение концентрации PLGF, sFlt-1, PAPP, β -ХГЧ в сыворотке крови с помощью диагностических тест-систем.

Сыворотку крови (800 мкл) каждой пациентки из первой когорты центрифугировали 10 мин при 300 g при 4 °C и надосадочную жидкость повторно центрифугировали 10 мин при 3000 g при 4 °C — для очистки от примесей форменных элементов крови. Очищенную сыворотку (200 из 700 мкл) использовали для выделения РНК набором miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen; Германия) с предварительным добавлением $5,6 \times 10^8$ копий синтетической РНК cel-miR-39 (Qiagen; Германия) после инкубации сыворотки с фенольной

смесью Qiazol для контроля эффективности выделения РНК и синтеза кДНК в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Элюат РНК в объеме 7 мкл использовали в обратной транскрипции набором miScript II RT Kit (Qiagen; Германия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Синтезированная кДНК (2 мкл) служила в качестве матрицы для ПЦР-анализа в реальном времени с использованием смыслового праймера, специфичного для исследуемой мкРНК (miR-320a-3p, MIMAT0000510, 5'-aaaagctgggttgagagggcgca, температура отжига с матрицей — 59,5 °C; miR-17-5p, MIMAT0000070, 5'-caaagtgttacagtcgacgtag, 55 °C; miR-25-3p, MIMAT0000081, 5'-cattgcactgtctcggctctga, 56 °C; miR-92a-3p, MIMAT0000092, tattgcactgtcccggcctgt, 60 °C), cel-miR-39 (miScript Primer Assay, Ce_miR-39_1, 55 °C; Qiagen; Германия), и набора miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen; Германия), содержащего универсальный праймер miScript Universal Primer (антисмысловый) и ПЦР-смесь SYBR Green PCR MasterMix. Условия реакции ПЦР: 15 мин при 95 °C с последующим проведением 40 циклов (15 с — при 94 °C, 30 с — при температуре отжига праймера и 30 с — при 70 °C) в амплификаторе StepOnePlus™ (Applied Biosystems; США). Относительный уровень экспрессии кДНК оценивали методом $\Delta\Delta Ct$, где $\Delta\Delta Ct = (Ct)_{si} - (Ct)_{ri}$, где $(Ct)_{si}$ — значение порогового цикла

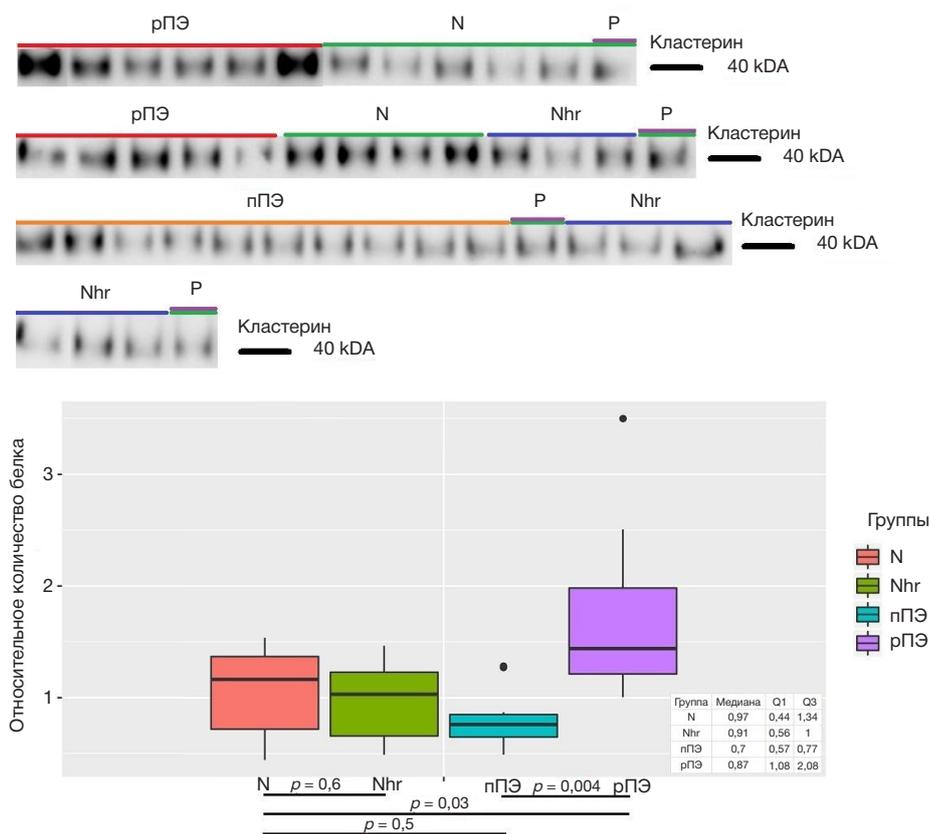


Рис. 1. Вестерн-блоттинг кластерина в везикулярной фракции сыворотки крови пациенток первой когорты на 12-й неделе беременности

амплификации кДНК анализируемой мкРНК в образце; (Ct)ri — значение порогового цикла амплификации кДНК референсной РНК cel-miR-39 в образце.

Оставшиеся 500 мкл очищенной сыворотки крови пациенток первой когорты были использованы для выделения микровезикул набором miRCURY Exosome Kits (Qiagen; Германия) с добавлением 200 мкл преципитирующего раствора и 14-часовой инкубацией при 4 °C — с последующим центрифугированием при 1500 g в течение 30 мин при 20 °C. Супернатант отбирали в чистую пробирку, и в конечном его разведении в 100 раз при добавлении Laemmli буфера (#1610737, BioRad; США) с 5% (v/v) 2-меркаптоэтанолом (Am-O482-0.1, VWR Life Science AMRESCO; США) использовали для анализа Вестерн-блоттингом. К осадку, содержащему везикулы, добавляли 270 мкл ресуспендирующего буфера, и в конечном разведении везикул в 1000 раз при добавлении Laemmli буфера (#1610737, BioRad; США) с 5% (v/v) 2-меркаптоэтанолом (Am-O482-0.1, VWR Life Science AMRESCO; США) образец использовали для анализа Вестерн-блоттингом.

Образцы ткани плаценты, взятые для исследования не позднее 10 мин после родоразрешения пациенток второй когорты, представляли собой тканевую срез толщиной 5 мм, проходящий через всю толщу плаценты и охватывающий плодную и материнскую части плаценты целиком от хориальной пластинки до децидуальной оболочки. Взятый образец ткани плаценты промывали в 0,9%-м NaCl и мгновенно замораживали в жидком азоте для последующего хранения при -80 °C. Ткань измельчали до порошковой консистенции в парах жидкого азота и 10 мг ткани лизировали в буфере RIPA Lysis Buffer System (sc-24948, Santa Cruz; США). После инкубации во льду в течение 30 мин и центрифугирования лизата при 10 000 g

измеряли концентрацию растворимой фракции белка биуретовым методом в спектрофотометре NanoDrop One (ThermoScientific; США). Для последующего анализа методом Вестерн-блоттинга брали 40 мкг белка из каждого образца.

Для количественной оценки уровня альфа-субъединицы секреторной формы кластерина в сыворотке периферической крови (первая когорта пациенток) и плаценте (вторая когорта пациенток) применяли метод Вестерн-блоттинга. Перед фракционированием в разделяющем 10%-м полиакриламидном геле в гидроксиметиламинометантрициновом буфере (100 мМ гидроксиметиламинометан, 100 мМ трицин, 0,1%-й додецилсульфат натрия) образцы были денатурированы при 70 °C в течение 10 мин в буфере Laemmli sample buffer (#1610737, BioRad; США), содержащем 5% (v/v) 2-меркаптоэтанол (Am-O482-0.1, VWR Life Science AMRESCO; США). С целью определения молекулярной массы анализируемого белка в лунку каждого ПААГ вносили маркер молекулярных весов белков PageRuler, 10–250 кДа (#26619, Thermo Fisher Scientific; США). По окончании электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 μm, BioRad; США) методом полусухого переноса с использованием 10 мМ 3-циклогексиламино-1-пропансульфоновой кислоты (SW18805, Sigma-Aldrich; США), pH 10,5, 10% этанола. После блокировки мембраны в 5%-м обезжиренном молоке (Blotting-Grade Blocker, #1706404, BioRad; США), 0,1% Tween20 (#1706531, BioRad; США), 50 мМ Tris (T4661, Sigma; США), pH 7,5, 150 мМ NaCl (A1371, AppliChem Panreac ITW Companies; Германия) в течение 2 ч, проводили инкубацию в течение 1 ч с первичными антителами к альфа-субъединице кластерина в разведении 1 : 400 (B-5, sc-5289, Santa Cruz Biotechnology; США) или к актину в разведении 1 : 400

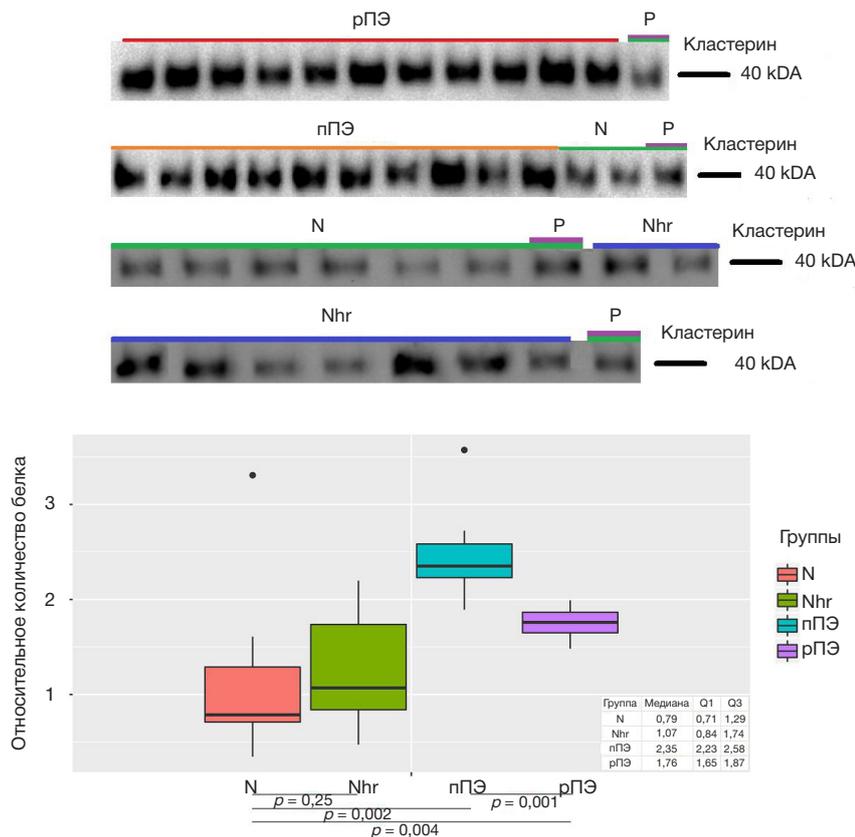


Рис. 2. Вестерн-блоттинг кластерина в свободной от везикул фракции сыворотки крови пациенток первой когорты на 12-й неделе беременности

(H-6, sc-376421, Santa Cruz Biotechnology; США) в 5%-м обезжиренном молоке, 0,1% Tween20, 50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, трехкратной промывкой мембраны в течение 5 мин в 0,05% Tween20, 50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl с последующей инкубацией в течение часа со вторичными поликлональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении 1 : 2000 (HAF007, R&D Systems; США) в 1%-м обезжиренном молоке, 0,1% Tween20, 50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl. После трехкратной промывки мембраны в течение 5 мин в 0,05% Tween20, 50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl активность пероксидазы измеряли путем добавления хемилюминисцентного субстрата Clarity Max™ Western ECL Substrate (#1705062, BioRad; США) и детекции хемилюминисценции в системе гель-документирования ChemiDoc MP (#12003154, BioRad; США).

Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных выполняли с помощью таблиц Microsoft Excel и программы RStudio (Posit; США). Статистический анализ проводили с помощью теста Манна–Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения. При распределении признаков, отличающемся от нормального, их описывали в виде медианы (Me) и квартилей Q_1 и Q_3 в формате Me (Q_1 ; Q_3). Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для оценки возможности классификации пациентов по группам на основании полученных данных разрабатывали модели логистической регрессии, качество которых оценивали с помощью ROC-анализа, а также расчета чувствительности и специфичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ содержания секреторной формы кластерина в сыворотке крови пациенток первой когорты

На первом этапе исследования ретроспективно была проведена количественная оценка секреторной формы кластерина в сыворотке крови пациенток в среднем на 12-й неделе беременности методом Вестерн-блоттинга с использованием первичных антител к альфа-субъединице белка. В зависимости от исхода беременности пациентки первой когорты (табл. 1) были разделены на четыре группы (см. «Пациенты и методы»). Используемый набор MIRCURY exosome kit (Qiagen; Германия), основанный на преципитации в присутствии полиэтиленгликоля, позволил получить две фракции сыворотки крови беременных: везикулярную фракцию, в состав которой вошли микровезикулы, экзосомы, апоптотические тельца, и свободную от везикул фракцию (супернатант). Результаты анализа везикулярной фракции сыворотки крови представлены на рис. 1. В верхней части изображения показаны блоты с хемилюминисцентными полосами, соответствующими альфа-субъединице кластерина массой 40 кДа, в образцах норм (N) с низким риском развития ПЭ по данным программы Astraia, в образцах норм (Nhr) с высоким риском развития ПЭ, а также в образцах беременных, у которых впоследствии проявились симптомы рПЭ или нПЭ. С целью учета эффективности переноса белков из геля на мембрану и различий в экспозиции при формировании изображения в гель-документирующей системе в одну из лунок каждого геля наносили один и тот же референсный образец (P) из группы норм (N), с которым сопоставляли значения хемилюминисценции в каждом образце. Выявлено статистически значимое

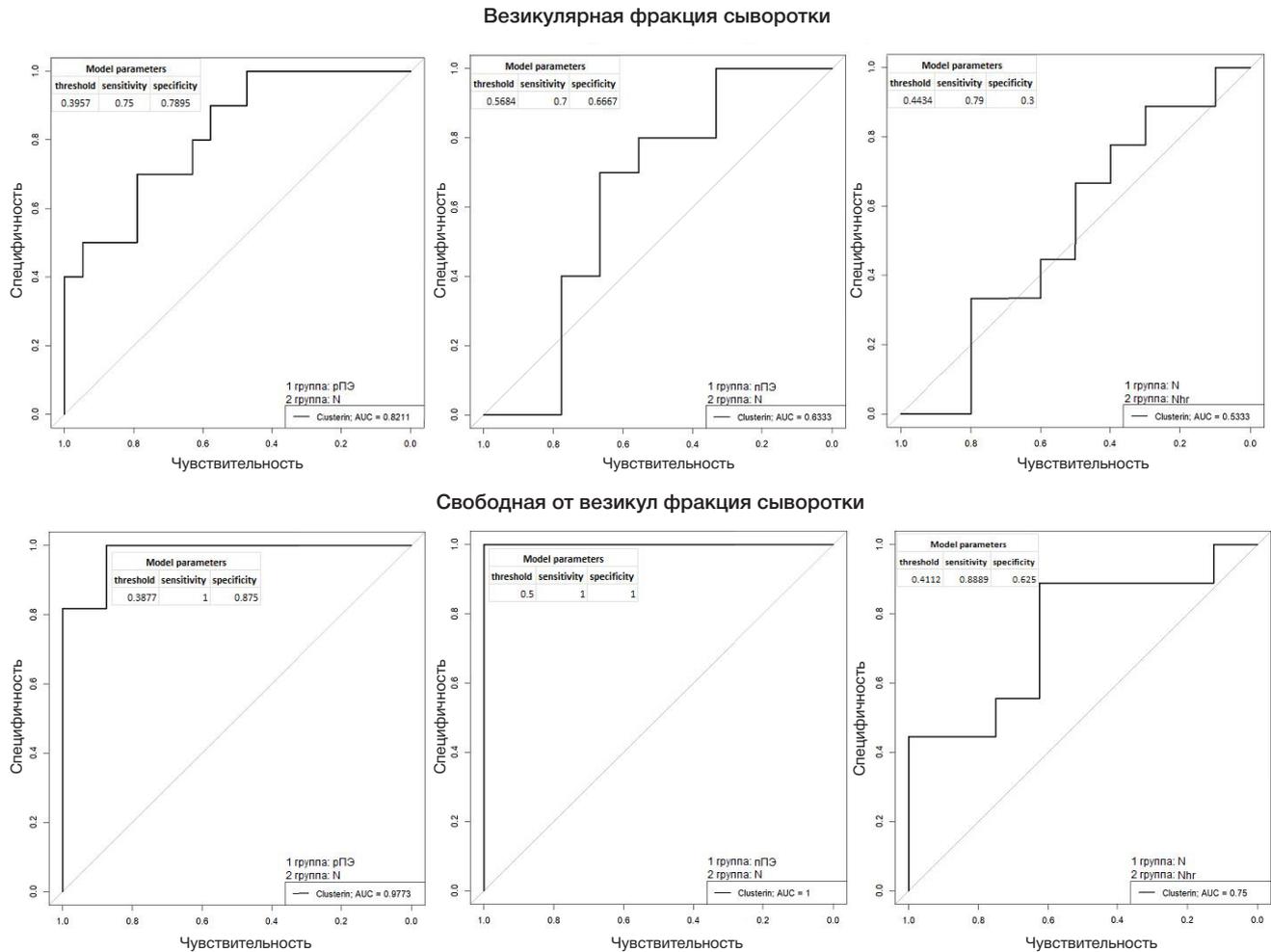


Рис. 3. Модели логистической регрессии прогнозирования развития рПЭ и пПЭ по уровню секреторной формы кластерина в везикулярной и свободной от везикул фракции сыворотки пациенток на 12-й неделе беременности

двукратное повышение уровня секреторного кластерина в везикулярной фракции сыворотки крови пациенток первого триместра беременности, у которых в дальнейшем развились клинические проявления ранней ПЭ, в сравнении с образцами N ($p = 0,03$), как указано на бокс-диаграмме (рис. 1). Статистически значимых отличий группы пПЭ от группы N по уровню секреторного кластерина в везикулярной фракции выявлено не было.

Методом ранговой корреляции Спирмена была обнаружена обратная корреляция уровня секреторного кластерина в везикулярной фракции сыворотки крови женщин и КТР ($r = -0,31$; $p = 0,052$), а также прямая корреляция уровня данной фракции кластерина и значения β -ХГЧ сыворотки крови женщин ($r = 0,28$; $p = 0,082$) на 12-й неделе беременности.

Результаты анализа уровня альфа-субъединицы секреторного кластерина в свободной от везикул фракции сыворотки крови методом Вестерн-блоттинга представлены на рис. 2. Выявлено статистически значимое повышение уровня секреторного кластерина (40 кДа) во вневезикулярной фракции сыворотки крови пациенток первого триместра беременности, у которых в дальнейшем развились клинические проявления рПЭ (увеличение в 2,2 раза) или пПЭ (увеличение в 3 раза), в сравнении с образцами N ($p = 0,004$ и $p = 0,002$ соответственно), как указано на бокс-диаграмме (рис. 2). При этом в случае пПЭ уровень кластерина во вневезикулярной фракции оказался в 1,5 раза выше такового при рПЭ ($p < 0,001$).

Статистически значимых различий группы Nhr и группы N по уровню секреторного кластерина в везикулярной и вневезикулярной фракции сыворотки крови выявлено не было (рис. 1 и рис. 2).

Методом ранговой корреляции Спирмена была обнаружена обратная корреляция уровня секреторного кластерина во вневезикулярной фракции сыворотки крови женщин и β -ХГЧ MoM ($r = -0,3$; $p = 0,0627$).

Количественная оценка miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-320a и miR-17-5p в сыворотке крови пациенток первой когорты

Согласно четырем электронным базам данных miRWalk, miRanda, RNA22 и Targetscan, потенциальными регуляторами уровня экспрессии кластерина являются мкРНК miR-320a, miR-30a-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-30c-5p, miR-1323, miR-25-3p, miR-138-5p, miR-34a-5p, miR-92a-3p. В исследовании по анализу взаимосвязей между уровнями кластерина и регулируемыми его мкРНК при вращении плаценты [24] нами выявлены статистически значимые обратные корреляции содержания секреторного кластерина в плазме периферической крови беременных со значениями « Δ Ct» miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-320a, miR-17-5p на момент родоразрешения. В связи с тем что трофобластные клетки при вращении плаценты и преэклампсии имеют прямо противоположные инвазивные свойства, нам представлялось интересным проследить за

возможными взаимосвязями данных мкРНК и кластерина в сыворотке крови пациенток первой когорты на 11–14-й неделе беременности. Методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени были получены значения относительного содержания miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-320a, miR-17-5p в сыворотке беременных в виде значений « $-\Delta Ct$ » (см. «Пациенты и методы»). Методом ранговой корреляции Спирмена была обнаружена статистически значимая положительная корреляция содержания секреторной формы кластерина во вневезикулярной фракции сыворотки крови беременных и значением « $-\Delta Ct$ » miR-17-5p ($r = 0,34$; $p = 0,0356$) сыворотки крови. Надо отметить, что, согласно базе данных miRTargetLink 2.0 (<https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2/network/a7aa6e41-7676-4e3b-875c-43c926dedae5>), кластерин является экспериментально доказанной мишенью miR-17-5p.

Методом ранговой корреляции Спирмена выявлены статистически значимые положительные корреляции « $-\Delta Ct$ » miR-16-5p сыворотки крови и индексом пульсации маточных артерий (МА (ПИ): $r = 0,37$, $p = 0,021$; МА (ПИ) МоМ: $r = 0,32$, $p = 0,046$). В свою очередь выявлены обратные взаимосвязи между индексом пульсации маточных артерий и ассоциированного с беременностью белка А плазмы (МА (ПИ) и RAPP-A: $r = -0,41$; $p = 0,01$; МА (ПИ) МоМ и RAPP-A МоМ: $r = -0,35$, $p = 0,0296$).

Оценка вероятности развития ранней и поздней ПЭ по уровню секреторного кластерина в двух фракциях (везикулярной и вневезикулярной) сыворотки крови женщин в первом триместре беременности

На основании полученных в работе значений содержания секреторного кластерина в сыворотке крови женщин первой когорты (табл. 1), проходящих скрининговое исследование в первом триместре беременности, были построены модели логистической регрессии расчета вероятности развития ранней и поздней ПЭ (рис. 3).

Выявлено, что наилучшей прогностической точностью с высокой специфичностью и чувствительностью обладают модели оценки вероятности возникновения клинических проявлений рПЭ и пПЭ после 20-й недели беременности по уровню секреторного кластерина в свободной от везикул фракции сыворотки крови пациенток, а не в везикулярной фракции, на 11–14-й неделях беременности. Формулы расчета вероятности развития ранней ПЭ (формула 1) и поздней ПЭ (формула 2) представлены ниже:

$$\frac{1}{1 + e^{15,71 - 10,9x}} \quad (1)$$

$$\frac{1}{1 + e^{267,11 - 152,58x}} \quad (2)$$

Анализ содержания секреторной формы кластерина в ткани плаценты пациенток второй когорты на момент родоразрешения

С целью идентификации секреторного кластерина в ткани плаценты от женщин с рПЭ и пПЭ в сравнении с группами соответствующего срока гестации ($N < 34$ недель, $N > 34$ недель) без признаков ПЭ была проанализирована вторая когорта пациенток (табл. 2). Полученные для кластерина данные хемилюминисценции были соотнесены с хемилюминисцентным сигналом от актина в одном и том же образце. Выявлено статистически значимое снижение уровня секреторного кластерина молекулярной массой

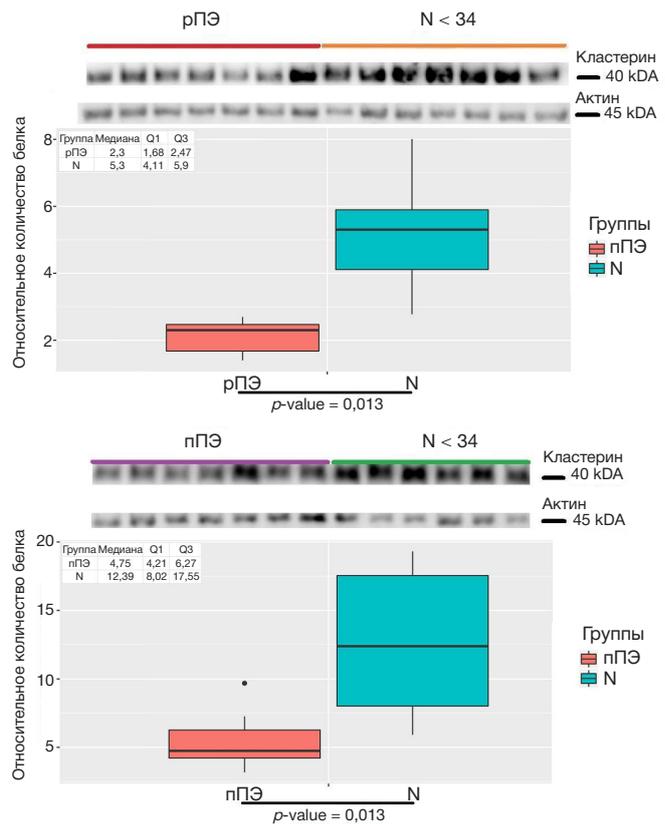


Рис. 4. Вестерн-блоттинг кластерина в блокартарной ткани на момент родоразрешения при рПЭ и пПЭ. На бокс-диаграммах представлено отношение количества кластерина к актину

40 кДа в плаценте при ПЭ относительно нормы: в 2,3 раза в случае рПЭ ($p = 0,001$) и в 2,6 раза в случае пПЭ ($p = 0,013$), как указано на бокс-диаграмме (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы решили сфокусировать свое внимание на количественной оценке секреторного кластерина в сыворотке крови женщин на 11–14-й неделе беременности с целью выявления возможных различий патогенеза рПЭ и пПЭ, что могло бы лечь в основу построения математических моделей прогнозирования данных осложнений беременности в первом триместре до начала клинических проявлений ПЭ.

Мы обнаружили статистически значимое повышение уровня секреторного кластерина (40 кДа) во вневезикулярной фракции сыворотки крови пациенток в первом триместре беременности при дальнейшем возникновении как рПЭ, так и пПЭ относительно группы женщин с физиологической беременностью (двукратное и трехкратное увеличение соответственно). Несмотря на более выраженное увеличение уровня секреции кластерина в случае пПЭ в сравнении с рПЭ, общее количество секреторного кластерина, циркулирующего в сыворотке крови при рПЭ, намного больше такового при пПЭ за счет везикулярной фракции, где уровень кластерина в 2,7 раза выше при рПЭ в сравнении с пПЭ. Более того, поскольку в анализ методом Вестерн-блоттинга было взято везикулярной фракции сыворотки крови в 10 раз больше, чем вневезикулярной фракции, то можно сделать вывод о большей функциональной значимости кластерина в составе циркулирующих в крови внеклеточных везикул при рПЭ в сравнении с пПЭ.

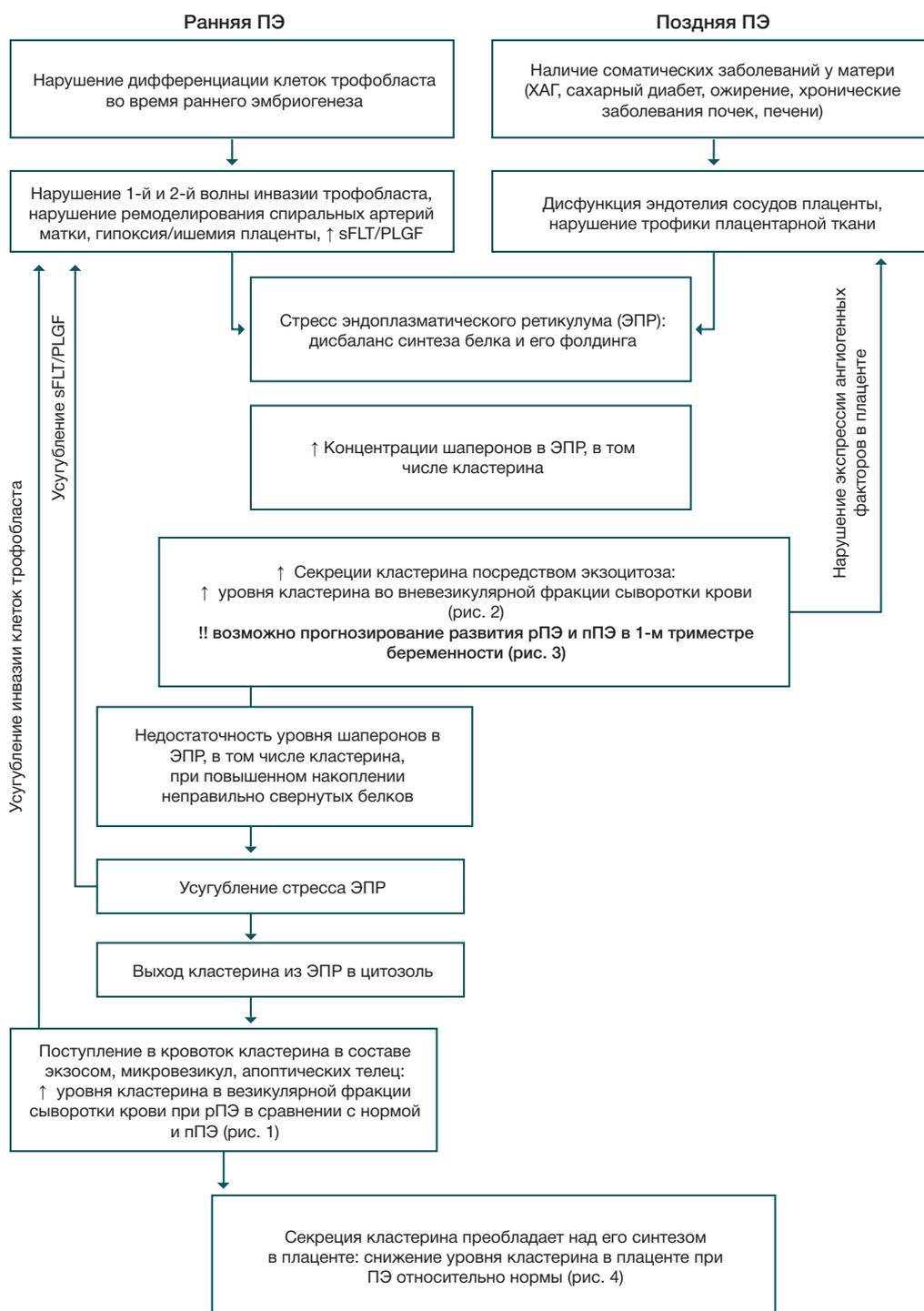


Рис. 5. Схематичное представление роли секреторного кластерина в патогенезе ранней и поздней ПЭ

Полученные в настоящей работе данные о повышении уровня кластерина в периферической крови беременных с ПЭ согласуются с результатами работы, где методом полуколичественной нано-ЖХ-МС выявлено статистически значимое повышение уровня кластерина в сыворотке крови женщин на 10–20-й неделе беременности с последующим развитием гипертензивных расстройств после 20-й недели беременности [29]. Но в указанной работе не были проанализированы беременные с рПЭ, а были взяты в исследование беременные с пПЭ и гипертензивными расстройствами без протеинурии. В других работах при анализе плазмы крови беременных на момент родоразрешения было выявлено статистически

значимое повышение уровня кластерина в группе женщин с ПЭ относительно группы женщин с физиологической беременностью [30, 31], причем беременные с ПЭ в сочетании с задержкой роста плода имели более значимое повышение уровня кластерина нежели беременные с ПЭ с нормальными фетометрическими показателями [31]. Индукция синтеза кластерина при ПЭ может быть обусловлена наличием в промоторной области кодирующего его гена участков связывания таких факторов, как SP1, NF1, AP-1, HSF1, YB-1, p53, B-MYB, уровень которых в условиях окислительного стресса, гипоксии и апоптоза резко повышается [32–35]. В свою очередь, кластерин регулирует активность фактора транскрипции

NF-κB, который играет важную роль в жизнеспособности клеток, их подвижности, пролиферации, фенотипической трансформации и воспалении [36]. Кроме того, уровень экспрессии кластерина, как и любого другого белка, может регулироваться на посттранскрипционном уровне активностью микроРНК. В данной работе при количественной оценке потенциальных регуляторов экспрессии кластерина (miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-320a-3p и miR-17-5p) в сыворотке крови женщин в первом триместре беременности выявлена статистически значимая корреляция содержания секреторной формы кластерина во вневезикулярной фракции сыворотки крови беременных и значением «-ΔCt» miR-17-5p. В одной из статей подробно описано участие miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-320a-3p и miR-17-5p в индукции эпителиально-мезенхимального перехода [37]. Возможно, участие данных микроРНК в фенотипической трансформации клеток вневорсинчатого трофобласта и последующего ремоделирования стенки маточных артерий отражается в обнаруженной нами положительной корреляции «-ΔCt» miR-16-5p сыворотки крови беременных и индексом пульсации маточных артерий (МА (ПИ): $r = 0,37, p = 0,021$; МА (ПИ) МоМ: $r = 0,32, p = 0,046$), значения которого обратно коррелировали с уровнем ассоциированного с беременностью белка А плазмы (МА (ПИ) и RAPP-A: $r = -0,41, p = 0,01$; МА (ПИ) МоМ и RAPP-A МоМ: $r = -0,35, p = 0,0296$).

Поскольку в клетках эукариот существует три формы кластерина (ядерная, секреторная и цитозольная) [25], нам представлялось интересным проанализировать возможные различия рПЭ и пПЭ по уровню секреторной формы кластерина (40 кДа) в ткани плаценты на момент родоразрешения в сравнении с образцами плацент от пациенток без признаков ПЭ соответствующего срока гестации. Мы выявили статистически значимое двукратное снижение уровня экспрессии кластерина в ткани плаценты беременных с рПЭ и пПЭ. Возможно, сниженный уровень экспрессии секреторной формы кластерина в плаценте при ПЭ обусловлен чрезмерным уровнем его секреции, что мы наблюдали в настоящей работе уже в первом триместре беременности у женщин с развившейся впоследствии ПЭ. Другой причиной может быть повышенное поступление секреторного кластерина из плаценты в материнскую кровь при ПЭ в связи с характерным для данного осложнения беременностью окислительным стрессом и гипоксическими/ишемическими процессами в ткани плаценты, что сопровождается поступлением кластерина сначала из ЭПР в цитозоль [38–40], а затем в материнский

кровоток в составе микровезикул и экзосом, или в составе апоптотических телец при выраженном стрессе ЭПР в синцитиотрофобласте и цитотрофобласте [1]. Выявлено, что окислительный стресс и активация маркеров стресса ЭПР, равно как и выброс в кровоток плацентарных микровезикул, более выражены при рПЭ, чем при пПЭ [22, 41]. При этом концентрация экзосом в сыворотке крови беременных увеличивается только при рПЭ, но не при пПЭ [42]. В настоящем исследовании мы обнаружили, что именно при рПЭ статистически значимо увеличен уровень кластерина в составе везикул при отсутствии значимых изменений кластерина в везикулярной фракции сыворотки при пПЭ. При этом доказано, что секреторный кластерин в сыворотке крови беременных может оказывать негативное влияние на пролиферацию, инвазию и выживаемость самих клеток трофобласта [27, 29], формируя положительную обратную связь: «стресс ЭПР клеток синцитиотрофобласта — увеличение внефобластного кластерина — усугубление стресса ЭПР клеток синцитиотрофобласта и апоптотических/некротических процессов в них — пополнение фракции внефобластного кластерина в материнском кровотоке».

Поскольку для двух видов ПЭ (ранней и поздней) статистически значимые изменения уровня секреторного кластерина были обнаружены во вневезикулярной фракции сыворотки крови женщин в первом триместре беременности в сравнении с физиологической беременностью, именно эту фракцию целесообразно использовать для прогнозирования развития ПЭ на этапе первого скрининга беременности, ориентируясь на разработанные в настоящем исследовании модели логистической регрессии.

Выводы

В рамках настоящего исследования построены модели логистической регрессии по уровню секреторного кластерина, позволяющие прогнозировать раннюю и позднюю ПЭ задолго до начала клинических проявлений данных осложнений беременности. Но для внедрения построенных математических моделей в клиническую практику необходима проверка полученных данных на более широкой выборке. Уточнены новые патогенетические механизмы развития ранней и поздней ПЭ на основании количественного анализа секреторного кластерина в двух фракциях (везикулярной и вневезикулярной) сыворотки крови женщин в первом триместре беременности и в ткани плаценты на момент родоразрешения (рис. 5).

Литература

- Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, Moffett A. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. *BMJ*. 2019; 366: i2381. DOI: 10.1136/bmj.i2381.
- Ananth CV, Lavery JA, Friedman AM, Wapner RJ, Wright JD. Serious maternal complications in relation to severe pre-eclampsia: a retrospective cohort study of the impact of hospital volume. *BJOG*. 2017; 124: 1246–53. DOI: 10.1111/1471-0528.14384.
- Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens*. 2018; 13: 291–310. DOI: 10.1016/j.preghy.2018.05.004.
- Pierrat V, Marchand-Martin L, Arnaud C, Kaminski M, Resche-Rigon M, Lebeaux C, et al. Neurodevelopmental outcome at 2 years for preterm children born at 22 to 34 weeks' gestation in France in 2011: EPIPAGE-2 cohort study. *BMJ*. 2017; 358: j3448. DOI: 10.1136/bmj.j3448.
- Van Beek PE, Rijken M, Broeders L, Ter Horst HJ, Koopman-Esseboom C, de Kort E, et al. Two-year neurodevelopmental outcome in children born extremely preterm: the EPI-DAF study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2022; 107: 467–74. DOI: 10.1136/archdischild-2021-323124.
- Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertens*. (Dallas, Tex. 1979). 2008; 51: 970–75. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607.
- Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñero A, Diaz-Gimeno P,

- Kapidzic M, Gormley M, et al. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114: E8468–E8477. DOI: 10.1073/pnas.1706546114.
8. Ruane PT, Berneau SC, Koeck R, Watts J, Kimber SJ, Brison DR, et al. Apposition to endometrial epithelial cells activates mouse blastocysts for implantation. *Mol Hum Reprod*. 2017; 23: 617–27. DOI: 10.1093/molehr/gax043.
 9. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*. 2010; 31 Suppl: S66–9. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.12.021.
 10. Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*. 1983; 4: 397–413. DOI: 10.1016/s0143-4004(83)80043-5.
 11. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JCP. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*. 2009; 30: 473–82. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.02.009.
 12. James JL, Saghian R, Perwick R, Clark AR. Trophoblast plugs: impact on utero-placental haemodynamics and spiral artery remodelling. *Hum Reprod*. 2018; 33: 1430–41. DOI: 10.1093/humrep/dey225.
 13. Allerkamp HH, Clark AR, Lee TC, Morgan TK, Burton GJ, James JL. Something old, something new: digital quantification of uterine vascular remodelling and trophoblast plugging in historical collections provides new insight into adaptation of the utero-placental circulation. *Hum Reprod*. 2021; 36: 571–86. DOI: 10.1093/humrep/deaa303.
 14. Staff AC, Fjeldstad HE, Fosheim IK, Moe K, Turowski G, Johnsen GM, et al. Failure of physiological transformation and spiral artery atherosclerosis: their roles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2022; 226: S895–S906. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.09.026.
 15. Sidorova IS. Solved and unsolved problems of preeclampsia in Russia (Editorial). *Russ Bull Obstet*. 2015; 15: 4–9. DOI: 10.17116/rosakush20151524-9.
 16. Rana S, Burke SD, Karumanchi SA. Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders. *Am J Obstet Gynecol*. 2022; 226: S1019–S1034. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.10.022.
 17. Haram K, Mortensen JH, Myking O, Magann EF, Morrison JC. The role of oxidative stress, adhesion molecules and antioxidants in preeclampsia. *Curr Hypertens Rev*. 2019; 15: 105–12. DOI: 10.2174/1573402115666190119163942.
 18. Tomimatsu T, Mimura K, Matsuzaki S, Endo M, Kumasawa K, Kimura T. Preeclampsia: maternal systemic vascular disorder caused by generalized endothelial dysfunction due to placental antiangiogenic factors. *Int J Mol Sci*. 2019; 20. DOI: 10.3390/ijms20174246.
 19. Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *J Reprod Immunol*. 2019; 134–135: 1–10. DOI: 10.1016/j.jri.2019.07.004.
 20. Than NG, Romero R, Tarca AL, Kekesi KA, Xu Y, Xu Z, et al. Integrated systems biology approach identifies novel maternal and placental pathways of preeclampsia. *Front Immunol*. 2018; 9: 1661. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01661.
 21. Castro KR, Prado KM, Lorenz AR, Hoshida MS, Alves EA, Francisco RP, et al. Serum from preeclamptic women triggers endoplasmic reticulum stress pathway and expression of angiogenic factors in trophoblast cells. *Front Physiol*. 2021; 12: 799653. DOI: 10.3389/fphys.2021.799653.
 22. Yung HW, Atkinson D, Campion-Smith T, Olovsson M, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia. *J Pathol*. 2014; 234: 262–76. DOI: 10.1002/path.4394.
 23. Burton GJ, Yung H-W. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2011; 1: 72–78. DOI: 10.1016/j.preghy.2010.12.002.
 24. Timofeeva AV, Fedorov IS, Pirogova MM, Vasilchenko ON, Chagovets VV, Ezhova LS, et al. Clusterin and its potential regulatory microRNAs as a part of secretome for the diagnosis of abnormally invasive placenta: Accreta, Increta, and Percreta Cases. *Life (Basel, Switzerland)*. 2021; 11. DOI: 10.3390/life11040270.
 25. Janiszewska E, Kmiecik A, Kacperczyk M, Witkowska A, Kratz EM. The influence of clusterin glycosylation variability on selected pathophysiological processes in the human body. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; 2022: 7657876. DOI: 10.1155/2022/7657876.
 26. Zoubeydi A, Gleave M. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; 44: 1646–56. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.04.010.
 27. Zeng S, Pan Y, Liu F, Yin J, Jiang M, Long Y, et al. Role of clusterin in the regulation of trophoblast development and preeclampsia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021; 583: 128–34. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.10.064.
 28. Satapathy S, Wilson MR. The dual roles of clusterin in extracellular and intracellular proteostasis. *Trends Biochem Sci*. 2021; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.005>.
 29. Zeng S, Han M, Jiang M, Liu F, Hu Y, Long Y, et al. Serum complement proteomics reveal biomarkers for hypertension disorder of pregnancy and the potential role of Clusterin. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; 19: 56. DOI: 10.1186/s12958-021-00742-z.
 30. Watanabe H, Hamada H, Yamada N, Sohda S, Yamakawa-Kobayashi K, Yoshikawa H, et al. Proteome analysis reveals elevated serum levels of clusterin in patients with preeclampsia. *Proteomics*. 2004; 4: 537–43. DOI: 10.1002/pmic.200300565.
 31. Oztas E, Ozler S, Ersoy AO, Iskender CT, Sucak A, Ergin M, et al. Increased levels of serum clusterin is associated with intrauterine growth restriction and adverse pregnancy outcomes in preeclampsia. *J Perinat Med*. 2016; 44: 269–75. DOI: 10.1515/jpm-2015-0120.
 32. Trougakos IP. The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches — a mini-review. *Gerontology*. 2013; 59: 514–23. DOI: 10.1159/000351207.
 33. Shiota M, Zoubeydi A, Kumano M, Beraldi E, Naito S, Nelson CC, et al. Clusterin is a critical downstream mediator of stress-induced YB-1 transactivation in prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2011; 9: 1755–66. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0379.
 34. Criswell T, Klokov D, Beman M, Lavik JP, Boothman DA. Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther*. 2003; 2: 372–80. DOI: 10.4161/cbt.2.4.430.
 35. Cervellera M, Raschella G, Santilli G, Tanno B, Ventura A, Mancini C, et al. Direct transactivation of the anti-apoptotic gene apolipoprotein J (clusterin) by B-MYB. *J Biol Chem*. 2000; 275: 21055–60. DOI: 10.1074/jbc.M002055200.
 36. Santilli G, Aronow BJ, Sala A. Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for IκBα expression and regulation of NF-κB activity. *J Biol Chem*. 2003; 278: 38214–9. DOI: 10.1074/jbc.C300252200.
 37. Garg M. Targeting microRNAs in epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem cells: therapeutic approaches in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19: 285–97. DOI: 10.1517/14728222.2014.975794.
 38. Nizard P, Tetley S, Le Dréan Y, Watrin T, Le Goff P, Wilson MR, et al. Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol. *Traffic*. 2007; 8: 554–65. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00549.x.
 39. Wilson MR, Zoubeydi A. Clusterin as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. 2017; 21: 201–13. DOI: 10.1080/14728222.2017.1267142.
 40. Rohne P, Prochnow H, Wolf S, Renner B, Koch-Brandt C. The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment. *Cell Physiol Biochem Int J. Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2014; 34: 1626–39. DOI: 10.1159/000366365.
 41. Chen Y, Huang Y, Jiang R, Teng Y. Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. 2012; 119: 234–38. DOI: 10.1016/j.ijgo.2012.07.010.
 42. Pillay P, Maharaj N, Moodley J, Mackraj I. Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and early and late onset pre-eclamptic pregnancies. *Placenta*. 2016; 46: 18–25. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.08.078.

References

- Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, Moffett A. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. *BMJ*. 2019; 366: l2381. DOI: 10.1136/bmj.l2381.
- Ananth CV, Lavery JA, Friedman AM, Wapner RJ, Wright JD. Serious maternal complications in relation to severe pre-eclampsia: a retrospective cohort study of the impact of hospital volume. *BJOG*. 2017; 124: 1246–53. DOI: 10.1111/1471-0528.14384.
- Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens*. 2018; 13: 291–310. DOI: 10.1016/j.preghy.2018.05.004.
- Pierrat V, Marchand-Martin L, Arnaud C, Kaminski M, Resche-Rigon M, Lebeaux C, et al. Neurodevelopmental outcome at 2 years for preterm children born at 22 to 34 weeks' gestation in France in 2011: EPIPAGE-2 cohort study. *BMJ*. 2017; 358: j3448. DOI: 10.1136/bmj.j3448.
- Van Beek PE, Rijken M, Broeders L, Ter Horst HJ, Koopman-Esseboom C, de Kort E, et al. Two-year neurodevelopmental outcome in children born extremely preterm: the EPI-DAF study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2022; 107: 467–74. DOI: 10.1136/archdischild-2021-323124.
- Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertens*. (Dallas, Tex. 1979). 2008; 51: 970–75. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607.
- Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñero A, Diaz-Gimeno P, Kapidzic M, Gormley M, et al. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114: E8468–E8477. DOI: 10.1073/pnas.1706546114.
- Ruane PT, Berneau SC, Koeck R, Watts J, Kimber SJ, Brison DR, et al. Apposition to endometrial epithelial cells activates mouse blastocysts for implantation. *Mol Hum Reprod*. 2017; 23: 617–27. DOI: 10.1093/molehr/gax043.
- Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*. 2010; 31 Suppl: S66–9. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.12.021.
- Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*. 1983; 4: 397–413. DOI: 10.1016/s0143-4004(83)80043-5.
- Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JCP. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*. 2009; 30: 473–82. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.02.009.
- James JL, Saghian R, Perwick R, Clark AR. Trophoblast plugs: impact on utero-placental haemodynamics and spiral artery remodelling. *Hum Reprod*. 2018; 33: 1430–41. DOI: 10.1093/humrep/dey225.
- Allerkamp HH, Clark AR, Lee TC, Morgan TK, Burton GJ, James JL. Something old, something new: digital quantification of uterine vascular remodelling and trophoblast plugging in historical collections provides new insight into adaptation of the uteroplacental circulation. *Hum Reprod*. 2021; 36: 571–86. DOI: 10.1093/humrep/deaa303.
- Staff AC, Fjeldstad HE, Fosheim IK, Moe K, Turowski G, Johnsen GM, et al. Failure of physiological transformation and spiral artery atherosclerosis: their roles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2022; 226: S895–S906. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.09.026.
- Sidorova IS. Solved and unsolved problems of preeclampsia in Russia (Editorial). *Russ Bull Obstet*. 2015; 15: 4–9. DOI: 10.17116/rosakush20151524-9.
- Rana S, Burke SD, Karumanchi SA. Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders. *Am J Obstet Gynecol*. 2022; 226: S1019–S1034. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.10.022.
- Haram K, Mortensen JH, Myking O, Magann EF, Morrison JC. The role of oxidative stress, adhesion molecules and antioxidants in preeclampsia. *Curr Hypertens Rev*. 2019; 15: 105–12. DOI: 10.2174/1573402115666190119163942.
- Tomimatsu T, Mimura K, Matsuzaki S, Endo M, Kumasawa K, Kimura T. Preeclampsia: maternal systemic vascular disorder caused by generalized endothelial dysfunction due to placental antiangiogenic factors. *Int J Mol Sci*. 2019; 20. DOI: 10.3390/ijms20174246.
- Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *J Reprod Immunol*. 2019; 134–135: 1–10. DOI: 10.1016/j.jri.2019.07.004.
- Than NG, Romero R, Tarca AL, Kekesi KA, Xu Y, Xu Z, et al. Integrated systems biology approach identifies novel maternal and placental pathways of preeclampsia. *Front Immunol*. 2018; 9: 1661. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01661.
- Castro KR, Prado KM, Lorenzon AR, Hoshida MS, Alves EA, Francisco RP, et al. Serum from preeclamptic women triggers endoplasmic reticulum stress pathway and expression of angiogenic factors in trophoblast cells. *Front Physiol*. 2021; 12: 799653. DOI: 10.3389/fphys.2021.799653.
- Yung HW, Atkinson D, Campion-Smith T, Olovsson M, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia. *J Pathol*. 2014; 234: 262–76. DOI: 10.1002/path.4394.
- Burton GJ, Yung H-W. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2011; 1: 72–78. DOI: 10.1016/j.preghy.2010.12.002.
- Timofeeva AV, Fedorov IS, Pirogova MM, Vasilchenko ON, Chagovets VV, Ezhova LS, et al. Clusterin and its potential regulatory microRNAs as a part of secretome for the diagnosis of normally invasive placenta: Accreta, Increta, and Percreta Cases. *Life (Basel, Switzerland)*. 2021; 11. DOI: 10.3390/life11040270.
- Janiszewska E, Krnieciak A, Kacperczyk M, Witkowska A, Kratz EM. The influence of clusterin glycosylation variability on selected pathophysiological processes in the human body. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; 2022: 7657876. DOI: 10.1155/2022/7657876.
- Zoubeidi A, Gleave M. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; 44: 1646–56. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.04.010.
- Zeng S, Pan Y, Liu F, Yin J, Jiang M, Long Y, et al. Role of clusterin in the regulation of trophoblast development and preeclampsia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021; 583: 128–34. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.10.064.
- Satapathy S, Wilson MR. The dual roles of clusterin in extracellular and intracellular proteostasis. *Trends Biochem Sci*. 2021; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.005>.
- Zeng S, Han M, Jiang M, Liu F, Hu Y, Long Y, et al. Serum complement proteomics reveal biomarkers for hypertension disorder of pregnancy and the potential role of Clusterin. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; 19: 56. DOI: 10.1186/s12958-021-00742-z.
- Watanabe H, Hamada H, Yamada N, Sohda S, Yamakawa-Kobayashi K, Yoshikawa H, et al. Proteome analysis reveals elevated serum levels of clusterin in patients with preeclampsia. *Proteomics*. 2004; 4: 537–43. DOI: 10.1002/pmic.200300565.
- Oztaş E, Özler S, Ersoy AO, Iskender CT, Sucak A, Ergin M, et al. Increased levels of serum clusterin is associated with intrauterine growth restriction and adverse pregnancy outcomes in preeclampsia. *J Perinat Med*. 2016; 44: 269–75. DOI: 10.1515/jpm-2015-0120.
- Trougakos IP. The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches — a mini-review. *Gerontology*. 2013; 59: 514–23. DOI: 10.1159/000351207.
- Shiota M, Zoubeidi A, Kumano M, Beraldi E, Naito S, Nelson CC, et al. Clusterin is a critical downstream mediator of stress-induced YB-1 transactivation in prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2011; 9: 1755–66. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0379.
- Criswell T, Klokov D, Beman M, Lavik JP, Boothman DA. Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther*. 2003; 2: 372–80. DOI: 10.4161/cbt.2.4.430.
- Cervellera M, Raschella G, Santilli G, Tanno B, Ventura A, Mancini C, et al. Direct transactivation of the anti-apoptotic gene

- apolipoprotein J (clusterin) by B-MYB. *J Biol Chem.* 2000; 275: 21055–60. DOI: 10.1074/jbc.M002055200.
36. Santilli G, Aronow BJ, Sala A. Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for I κ B expression and regulation of NF- κ B activity. *J Biol Chem.* 2003; 278: 38214–9. DOI: 10.1074/jbc.C300252200.
37. Garg M. Targeting microRNAs in epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem cells: therapeutic approaches in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2015; 19: 285–97. DOI: 10.1517/14728222.2014.975794.
38. Nizard P, Tetley S, Le Dréan Y, Watrin T, Le Goff P, Wilson MR, et al. Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol. *Traffic.* 2007; 8: 554–65. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00549.x.
39. Wilson MR, Zoubeidi A. Clusterin as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 2017; 21: 201–13. DOI: 10.1080/14728222.2017.1267142.
40. Rohne P, Prochnow H, Wolf S, Renner B, Koch-Brandt C. The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment. *Cell Physiol Biochem Int J. Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2014; 34: 1626–39. DOI: 10.1159/000366365.
41. Chen Y, Huang Y, Jiang R, Teng Y. Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe pre-eclampsia. *Int J. Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet.* 2012; 119: 234–38. DOI: 10.1016/j.ijgo.2012.07.010.
42. Pillay P, Maharaj N, Moodley J, Mackraj I. Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset pre-eclamptic pregnancies. *Placenta.* 2016; 46: 18–25. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.08.078.