

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ НА ОСНОВЕ ЭКСПРЕССИИ ЭКЗОСОМНЫХ БЕЛКОВ SUMO

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

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

Клеточная реакция на стресс, лежащий в основе сосудистой дисфункции плаценты, находится под контролем сумоилирования. Следовательно, SUMO-гомеостаз тесно связан с поддержанием ангиогенного баланса, нарушение которого характерно для преэклампсии (ПЭ). Цель работы — поиск экзосомных маркеров подобного нарушения. Оценивали экспрессию и прогностический потенциал экзосомных SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 у 39 беременных (когорта I) в первом триместре с помощью вестерн-блоттинга. В когорте II (27 беременных) оценивали экспрессию данных белков в плаценте на момент родов. Экспрессия экзосомных конъюгированных форм значимо изменялась у беременных с ранней (SUMO 1, $p = 0,03$; SUMO 2/3/4, $p = 0,03$) и поздней ПЭ (SUMO 1, $p = 0,03$; SUMO 2/3/4, $p = 0,04$; UBC9 и hnRNPA2/B1, $p < 0,0001$ соответственно), что может быть обусловлено функциональной специфичностью изоформ SUMO в контексте их субклеточных мишеней при воздействии стрессовых стимулов. В плаценте также обнаружены значимые изменения экспрессии конъюгированных форм данных белков. При ранней ПЭ установлены значимые корреляционные связи экспрессии экзосомных SUMO 2/3/4 ($r = -0,59$; $p = 0,01$) и UBC9 ($r = -0,88$; $p = 0,0001$) с уровнем PIGF, а при поздней ПЭ — hnRNPA2/B1 ($r = -0,48$; $p = 0,03$), UBC9 ($r = -0,48$; $p = 0,03$) с β -ХГЧ, и SUMO 2/3/4 ($r = -0,60$; $p = 0,006$) с концентрацией PAPP-A в сыворотке крови беременных. Анализируемые белки достоверно коррелировали с пульсационным индексом маточной артерии (SUMO 1 ($r = 0,59$; $p = 0,01$), SUMO 2/3/4 ($r = 0,54$; $p = 0,02$), hnRNPA2/B1 ($r = 0,75$; $p = 0,0001$)) и средним артериальным давлением (UBC9 ($r = 0,53$; $p = 0,03$)). На основе полученных данных созданы логистические модели прогнозирования риска развития ранней (UBC9 (AUC = 0,88; Se-0,72; Sp-1)) и поздней ПЭ (SUMO 1 (AUC = 0,79; Se-0,8; Sp-0,77)) на сроке 11–14 недель беременности.

Ключевые слова: экзосомы, сумоилирование, SUMO, прогнозирование, плацентарная дисфункция, преэклампсия

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта РФФИ [22-15-00363 «Эпигенетические и биохимические аспекты патологии беременности при нарушениях инвазивных свойств трофобласта: от ранней диагностики к профилактике материнской и перинатальной заболеваемости»].

Вклад авторов: В. А. Гусар, А. В. Тимофеева — концепция исследования; И. С. Федоров — статистический анализ, графическое оформление; В. А. Гусар, А. М. Тарасова — проведение исследований (вестерн-блоттинг); Ю. В. Сухова, Т. Ю. Иванец — формирование клинической базы, гормональные исследования; В. А. Гусар — анализ/интерпретация данных, подготовка статьи; А. В. Тимофеева — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова» Минздрава России (№ 13 от 12 октября 2015 г.); добровольное информированное согласие получено от всех пациентов, включенных в исследование.

✉ **Для корреспонденции:** Владислава Анатольевна Гусар
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; v_gusar@mail.ru

Статья получена: 29.01.2024 **Статья принята к печати:** 20.02.2024 **Опубликована онлайн:** 29.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.010

EMERGING PREDICTION OF PREECLAMPSIA BASED ON THE EXPRESSION OF EXOSOMAL SUMO PROTEINS

Gusar VA [✉], Timofeeva AV, Fedorov IS, Tarasova AM, Sukhova YuV, Ivanets TYu

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

The cellular response to various types of stress underlying placental vascular dysfunction is under the sumoylation control. Consequently, SUMO homeostasis is closely related to the maintenance of angiogenic balance, the disruption of which is a feature of preeclampsia (PE). The goal of the research is to search for exosomal markers of such a disorder. The expression and prognostic potential of exosomal SUMO 1–4, UBC9 and hnRNPA2/B1 were evaluated in 39 pregnant women (cohort I) in the first trimester using Western blotting technology. The expression of these proteins in the placenta (cohort II, 27 pregnant women) at the time of delivery was also assessed. The expression of their conjugated forms was significantly changed in pregnant women with early-onset (SUMO 1, $p = 0.03$; SUMO 2/3/4, $p = 0.03$) and late-onset PE (SUMO 1, $p = 0.03$; SUMO 2/3/4, $p = 0.04$; UBC9 and hnRNPA2/B1, $p < 0.0001$, respectively). This change may be due to the functional specificity of SUMO isoforms in the context of their subcellular targets upon exposure to stressful stimuli. Significant changes in the expression of these proteins were also found in the placenta. Significant correlations were established between the expression of exosomal SUMO 2/3/4 ($r = -0.59$; $p = 0.01$) and UBC9 ($r = -0.88$; $p = 0.0001$) with PIGF in early-onset PE. In late-onset PE, hnRNPA2/B1 ($r = -0.48$; $p = 0.03$) and UBC9 ($r = -0.48$; $p = 0.03$) was correlated with β -hCG, and SUMO 2/3/4 with PAPP-A ($r = -0.60$; $p = 0.006$) in the blood serum of pregnant women. The analyzed proteins also significantly correlated with uterine artery pulsation index (SUMO 1 ($r = 0.59$; $p = 0.01$), SUMO 2/3/4 ($r = 0.54$; $p = 0.02$), hnRNPA2/B1 ($r = 0.75$; $p = 0.0001$)) and mean arterial pressure (UBC9 ($r = 0.53$; $p = 0.03$)). Based on the data the logistic models have been created to predict the risk of developing early-onset (UBC9 (AUC = 0.88; Se-0.72; Sp-1)) and late-onset PE (SUMO 1 (AUC = 0.79; Se-0.8; Sp-0.77)) at 11–14 weeks of pregnancy.

Keywords: exosomes, sumoylation, SUMO, prediction, placental dysfunction, preeclampsia

Funding: the study was supported by the RSF grant [22-15-00363 “Epigenetic and biochemical aspects of abnormal pregnancy in disturbances of the trophoblast invasive properties: from early diagnosis to prevention of maternal and perinatal morbidity”].

Author contribution: Gusar VA, Timofeeva AV — study concept; Fedorov IS — statistical analysis, graphic design; Gusar VA, Tarasova AM — research procedure (western blotting); Sukhova YuV, Ivanets TYu — providing the clinical basis, assessment of hormones; Gusar VA — data analysis/interpretation, manuscript writing; Timofeeva AV — editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 13 dated 12 October 2015); the informed consent was obtained from all the patients enrolled.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladoslava A. Gusar
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; v_gusar@mail.ru

Received: 29.01.2024 **Accepted:** 20.02.2024 **Published online:** 29.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.010

Многочисленными исследованиями доказана роль плацентарной дисфункции в основе неблагоприятных исходов беременности, среди которых преэклампсия (ПЭ) и задержка роста плода (ЗРП). Молекулярная составляющая данных синдромов представлена ключевыми процессами, объединенными стрессом — гипоксическим, окислительным/нитратным, митохондриальным и эндоплазматического ретикулума [1–4], который возникает в результате аномальной эндovasкулярной инвазии спиральных артерий трофобластом. Вследствие этого в кровотоке матери выделяются различные факторы, нарушающие ангиогенный баланс [5]. Происходящие

при этом патологические изменения приводят к более высокому риску метаболических, сердечно-сосудистых и нефрологических заболеваний у женщин и их плодов в отдаленном периоде [6, 7].

В целом, ПЭ определяют как мультисистемное заболевание, с впервые возникшей артериальной гипертензией, сопровождающейся значительной протеинурией (или без нее) после 20 недель беременности [8, 9]. За прошедшие три десятилетия это определение было расширено по времени появления симптомов на ранних или поздних сроках беременности, с родоразрешением до или после 34 недель, а также различных фенотипов,

Таблица 1. Клинические характеристики беременных (когорта I)

	11–14 недель беременности						
	Беременные с ранней ПЭ (n = 11)	Беременные с поздней ПЭ (n = 10)	Беременные с высоким риском развития ПЭ (n = 9)	Физиологическая беременность (n = 9)	p (рПЭ vs.ФБ)	p (пПЭ vs.ФБ)	p (высокий риск vs.ФБ)
Гестационный срок на момент скрининга, недели	12,1 (11,8; 12,25)	12,15 (12,1; 12,47)	12,1 (11,6; 12,3)	12,35 (12,03; 12,9)	0,1	0,3	0,3
ПЭ в анамнезе, n (%)	0	0	0	0	–	–	–
Среднее артериальное давление, МоМ	1,06 (1; 1,11)	0,98 (0,94; 1,1)	0,96 (0,95; 0,98)	1 (0,96; 1,04)	0,08	1	0,07
PIGF (17,6–70,0, пкг/мл; 12 недель гестации)	11,7 (6,3; 18,0)	15,8 (15,6; 23,08)	18,8 (18,8; 18,8)	18,05 (16,01; 26,5)	0,001	0,2	0,8
β-hCG (0,5–2,0, МоМ)	0,92 (0,65; 1,07)	0,72 (0,52; 0,8)	0,74 (0,58; 1,22)	1,38 (1,18; 1,8)	<0,001	<0,001	0,07
PAPP-A (0,5–2,0, МоМ)	0,9 (0,72; 1,1)	0,65 (0,57; 1,17)	1,07 (0,9; 1,32)	0,87 (0,74; 1,28)	0,7	0,3	0,5
УЗИ:							
КТР (43–84 мм)	57,7 (56,5; 60,2)	58,6 (57,7; 62,5)	57,6 (56; 61,2)	64,4 (55,7; 66,0)	0,11	0,3	0,4
ТВП (1,6–1,7 мм)	1,6 (1,38; 1,73)	1,5 (1,42; 1,85)	1,5 (1,29; 1,9)	1,25 (1,2; 1,6)	0,2	0,1	0,6
ПИ МА (0,76–1,1, МоМ)	1,14 (1; 1,21)	0,99 (0,76; 1,3)	1,1 (1,02; 1,19)	1,02 (0,91; 1,13)	0,3	0,7	0,3
ПИ ВП	0,98 (0,98; 0,98)	0,97 (0,97; 0,97)	0,95 (0,95; 0,95)	1,06 (0,99; 1,14)	0,02	0,02	0,03
	Клинические характеристики на момент родов						
Гестационный срок на момент родов, недели	32,1 (30,7; 33,35)	37,2 (36,47; 38,27)	38,3 (37,6; 39,2)	38,8 (38,35; 39,35)	<0,001	0,01	0,4
Систолическое артериальное давление (110–130 мм рт. ст.)	150 (145; 160)	140 (130; 150)	140 (115; 147)	115 (110; 131,2)	<0,001	0,006	0,08
Диастолическое артериальное давление (65–80 мм рт. ст.)	100 (90; 100)	90 (90; 95)	90 (75; 90)	77,5 (71,2; 85,2)	<0,001	0,003	0,1
Протеинурия (0–0,2 г/л)	1,98 (1,08; 2,5)	0,27 (0,13; 0,95)	0,09 (0; 0,1)	0 (0; 0,1)	<0,001	0,01	0,5
Периферические отеки, n (%)	5 (45,4)	4 (40,0)	1 (11,1)	3 (33,3)	–	–	–
Соотношение маркеров плацентарной дисфункции (sFLT-1/PIGF; 1,5–7)	316,6 (116,7; 433,9)	120,1 (78,8; 156,9)	133,7 (117,9; 173,4)	54,4 (54,4; 54,4)	0,01	<0,001	<0,001
Тромбоциты (150–400 × 10 ⁹ кл./л)	220 (146; 233)	244 (142; 262,5)	212 (186; 234)	247,5 (235,7; 270,2)	0,03	0,07	0,07
АЛТ (0–40 Ед/л)	30,9 (21,7; 68,05)	20,6 (15,4; 22,3)	19,2 (18,1; 26,1)	31,8 (18,2; 31,8)	0,09	1	0,7
АСТ (0–40 Ед/л)	27,3 (21,7; 43,15)	25,1 (20,05; 32,6)	17,4 (16,3; 34,5)	19,7 (19,7; 20,6)	0,08	0,3	0,8
УЗИ ПИ МА (среднее значение)	1,24 (1,05; 1,38)	0,9 (0,74; 0,99)	0,68 (0,55; 0,85)	0,57 (0,52; 0,6)	<0,001	0,001	0,1
Вес при рождении, граммы	1350 (1195; 1572)	2721 (2409,25; 2992,5)	3040 (2750; 3266)	3320 (3257; 3612,5)	<0,001	0,01	0,05
Апгар 1	7 (7; 7)	8 (8; 8)	8 (8; 8)	8 (8; 8)	<0,001	1	0,2
Апгар 5	8 (7; 8)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	<0,001	0,3	0,8
Неонатальные исходы:							
ВП, n (%)	7 (63,6)	0	0	0	–	–	–
ВЖК, n (%)	5 (45,4)	0	0	0	–	–	–
РДС, n (%)	2 (18,1)	0	0	0	–	–	–

Примечание: рПЭ — ранняя преэклампсия; пПЭ — поздняя преэклампсия; ФБ — физиологическая беременность; PIGF — плацентарный фактор роста; sFLT-1 — растворимая Fms-подобная тирозин киназа 1; PAPP-A — белок А, ассоциированный с беременностью; β-hCG — человеческий хорионический гонадотропин, субъединица β; КТР — копчико-теменной размер; ТВП — толщина воротникового пространства; ПИ МА — пульсационный индекс маточной артерии; ПИ ВП — пульсационный индекс венозного протока; ВП — внутриутробная пневмония; ВЖК — внутрижелудочковое кровоизлияние; РДС — респираторный дистресс-синдром; Медиана (Me) и квартили Q₁, Q₃ в формате Me (Q₁–Q₃) были использованы в случае ненормального распределения.

Таблица 2. Клинические характеристики беременных (когорта II)

	Беременные с рПЭ (n = 7)	Контрольная группа (n = 7)	<i>p</i>	Беременные с пПЭ (n = 7)	Контрольная группа (n = 6)	<i>p</i>
Гестационный срок на момент родов, недели	29 (27; 30)	30 (26,7; 30,5)	0,5	37 (36; 37,5)	38 (38; 38,75)	0,03
Манифестация ПЭ, недели	25 (23,5; 25)	отсутствует	–	36 (36; 36)	отсутствует	–
Систолическое артериальное давление (110–130 мм рт. ст.)	150 (145; 170)	115 (109,2; 117,5)	0,002	140 (140; 147,5)	110 (110; 113,7)	0,03
Диастолическое артериальное давление (65–80 мм рт. ст.)	100 (92,5; 106,5)	70 (67,5; 72,9)	0,002	100 (90; 100)	70 (70; 70)	0,005
Протеинурия (0–0,2 г/л)	2,08 (0,82; 3,72)	отсутствует	–	1,07 (0,39; 1,81)	отсутствует	–
Периферические отеки, <i>n</i> (%)	1 (14,2)	отсутствует	–	5 (71,4)	отсутствует	–
Соотношение маркеров плацентарной дисфункции (sFLT-1/PLGF; 1,5–7)	413 (315,65; 546,43)	НА	–	219,79 (80,9; 289,9)	НА	–
Тромбоциты (150–400 × 10 ⁹ кл./л)	129 (102,5; 185)	246 (190,5; 269)	0,01	233 (219; 254,5)	233,5 (192; 287,7)	1
АЛТ (0–40 Ед/л)	64,3 (22,15; 91,22)	НА	–	22,6 (20; 28,65)	НА	–
АСТ (0–40 Ед/л)	37,4 (24; 48,37)	НА	–	28,3 (22,6; 32,95)	НА	–
Вес при рождении, г	826,17 (590; 1068,5)	ОНМТ	–	2725 (2495; 2774,5)	3325 (2892,5; 3401,2)	0,1

Примечание: рПЭ — ранняя преэклампсия; пПЭ — поздняя преэклампсия; НА — не анализировали; ОНМТ — очень низкая масса тела при рождении; Медиана (Ме) и квартили Q_1 , Q_3 в формате Ме (Q_1 – Q_3) были использованы в случае ненормального распределения.

обусловленных неблагоприятным воздействием на плод (ПЭ в сочетании или без ЗРП) [8]. Следует отметить дискуссионные споры, возникающие в последнее время, согласно которым сердечно-сосудистая система матери является этиологической первопричиной ПЭ [5, 10]. Тем не менее, связующим механизмом между плацентарной дисфункцией и сердечно-сосудистой дезадаптацией матери служит ангиогенно-антиангиогенный дисбаланс [10]. При физиологической беременности уровни ангиогенного плацентарного фактора роста (PLGF) и антиангиогенного фактора sFlt-1 (растворимая fms-подобная тирозинкиназа1) сбалансированы, но в условиях гипоксии и окислительного стресса происходит увеличение секреции sFlt-1 цитотрофобластом, что приводит к нарушению ангиогенеза. Предполагается, что есть различные пути, модулирующие экспрессию PLGF [11]. Один из них опосредован транскрипционным фактором GCM-1, играющим критическую роль в поддержании баланса между пролиферацией и дифференцировкой синцитиотрофобласта в I триместре беременности [12] и его вышестоящей мишенью DREAM [13]. Важно подчеркнуть, что модуляция активности последних осуществляется на посттрансляционном уровне, в том числе с помощью сумоилирования [14]. Интересно, что данная модификация также является ключевым игроком в управлении клеточными реакциями на тепловой шок, воспаление и различные виды стресса (окислительный, гипоксический, митохондриальный), лежащего в основе плацентарной дисфункции [15–18].

Сумоилирование — динамичный обратимый процесс, осуществляемый белками SUMO (от англ. small ubiquitin-like modifier), имеющими четыре изоформы, а их конъюгацию (образование изопептидной связи между SUMO и целевым белком) осуществляет фермент UBC9 [19]. Сумоилирование привлекает все больше внимания в контексте регуляции экспрессии молекул, опосредующих функцию плаценты и ангиогенез. Однако количество данных по изучению сумоилирования при плацентарных заболеваниях ограничено. Так, опубликованы результаты исследования о значимом повышении уровня SUMO 1 и SUMO 2/3 в

плаценте при тяжелой ранней ПЭ [20]. А эволюционный подход WGCNA идентифицировал модули коэкспрессии генов, играющих решающую роль в патогенезе ПЭ, среди которых SUMO 1 и гетерогенный ядерный белок hnRNP, участвующий в связывании с микроРНК (мкРНК), в качестве кандидатных генов положительного отбора [21].

Скоординированный интерфейс между фетоплацентарной и материнской системой представляет собой сложный многомерный массив тканей, резидентных и циркулирующих факторов, охватывающий развивающийся плод, плаценту, децидуа и динамичную сердечно-сосудистую систему матери [1]. Он осуществляется посредством внеклеточных везикул (экзосомы, микровезикулы, апоптотические пузырьки), которые секретируются различными типами клеток, несут определенный груз (белки, липиды, транскрипты мРНК), а также имеют способность модулировать функцию клеток-мишеней и обладают терапевтическим потенциалом [22, 23]. В частности, экзосомы избирательно упакованы сигнальными молекулами, такими как мкРНК и белки. Их секреция синцитиотрофобластом увеличивается при плацентарной дисфункции [24–26]. И что наиболее примечательно, избирательность и загрузка мкРНК в экзосомы осуществляются посредством сумоилирования гетерогенного ядерного белка hnRNP2/B1 [27].

Прогресс в понимании молекулярных процессов, объединяющих плацентарную дисфункцию и сердечно-сосудистую систему матери, указывает на то, что нарушения ангиогенно-антиангиогенного баланса могут являться целью для поиска экзосомных прогностических маркеров. В наших предыдущих исследованиях было продемонстрировано наличие регуляторного механизма по оси miR-652-3p / SUMO 2/3/4 / UBC9 / GCM-1 / PIGF в ткани плаценты беременных с ранней ПЭ [28] и изменение экспрессии SUMO 1–4 и UBC9 в экзосомах беременных с ранней ПЭ на момент родов [29]. В продолжение данных исследований мы сфокусировали свое внимание на оценке экспрессии экзосомных белков SUMO 1–4, UBC9, а также hnRNP2/B1 в качестве предикторов плацентарной дисфункции на ранних гестационных сроках (11–14 недель) до проявления клинических признаков данной патологии.



Рис. 1. Блок-схема дизайна исследования

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования и когорты пациентов

В данное исследование включены беременные женщины, которые находились под наблюдением в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации. Общая выборка пациенток репродуктивного возраста составила 66 беременных, разделенных на две когорты (рис. 1). Критерии включения: одноплодная беременность; возраст пациенток 25–40 лет; родоразрешение естественным путем и с помощью операции кесарево сечение. Критерии исключения: в обе когорты не включали беременных с многоплодной беременностью, возникшей в результате вспомогательных репродуктивных технологий, отягощенным соматическим анамнезом и наличием генетических патологий у матери и плода. Когорта I включала 39 беременных и была разделена на группы: беременные, у которых в последующем манифестировала ранняя ПЭ (11 беременных) и поздняя ПЭ (10 беременных); беременные с высоким риском развития ПЭ по данным комбинированного пренатального скрининга I триместра и благоприятным исходом беременности (9 беременных); беременные с физиологическим течением беременности (9 беременных). Экспрессию белков SUMO, UBC9 и hnRNP A2/B1 оценивали в экзосомах беременных на сроке 11–14 недель гестации. В когорту II включили 27 беременных с ранней ПЭ (7 беременных), поздней ПЭ (7 беременных) и контрольную группу соответствующего срока (7 и 6 беременных соответственно) для оценки экспрессии белков в образцах плацент. Клинические характеристики беременных представлены в табл. 1 и 2.

Выделение экзосом из сыворотки крови беременных

Образцы цельной крови брали у беременных на сроке 11–14 недель беременности (когорты I). Предварительно их центрифугировали в течение 20 мин (+4 °C, 300 g). Затем

верхнюю фазу аккуратно переносили в чистую пробирку с коническим дном и повторно центрифугировали в течение 10 мин (+4 °C, 16 000 g) для удаления клеточного дебриса. Из приготовленных образцов в количестве 600 мкл использовали для очистки экзосом с помощью miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (кат. № 76603; Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя и последующего проведения вестерн-блоттинга.

Вестерн-блоттинг экзосомных и тканевых белков

Для оценки экспрессии белков использовали плацентарную ткань (поперечный срез материнской и плодной части плаценты толщиной не более 5 мм, полученный сразу после родов) беременных (когорты II). Порошкообразные образцы тканей, предварительно измельченные в жидком азоте, гомогенизировали в буферной системе для лизиса RIPA (sc-24948; Santa Cruz Biotechnology, США). Разделение белков (20 мкг на дорожку геля) проводили в буфере Трис/Трицин/SDS (12,5%). Перенос экзосомных и тканевых белков на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 мкм, кат. № 1620115; Bio-Rad, США) осуществляли с помощью Trans-Blot SD™ (кат. № 170-3957; Bio-Rad, США) в 10 mM CAPS + 10% C₂H₅OH (pH = 11). Мембраны блокировали 5%-м раствором NFDМ/TBST в течение 2 ч при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами SUMO 1 (1:500, sc-5308; Santa Cruz Biotechnology, США), SUMO 2/3/4 (1:500, sc-393144; Santa Cruz Biotechnology, США), UBC9 (1:500, sc-271057; Santa Cruz Biotechnology, США), hnRNP A2/B1 (1:500, sc-374053; Santa Cruz Biotechnology, США) и Actin (1:100, sc-376421; Santa Cruz Biotechnology, США) проводили в течение 2 ч при комнатной температуре. Со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2031; Santa Cruz Biotechnology, США), инкубировали в 1%-м NFDМ/TBST в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве реагента для обнаружения использовали SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit (кат. № 34096; Thermo Scientific™, США). Денситометрический анализ проводили

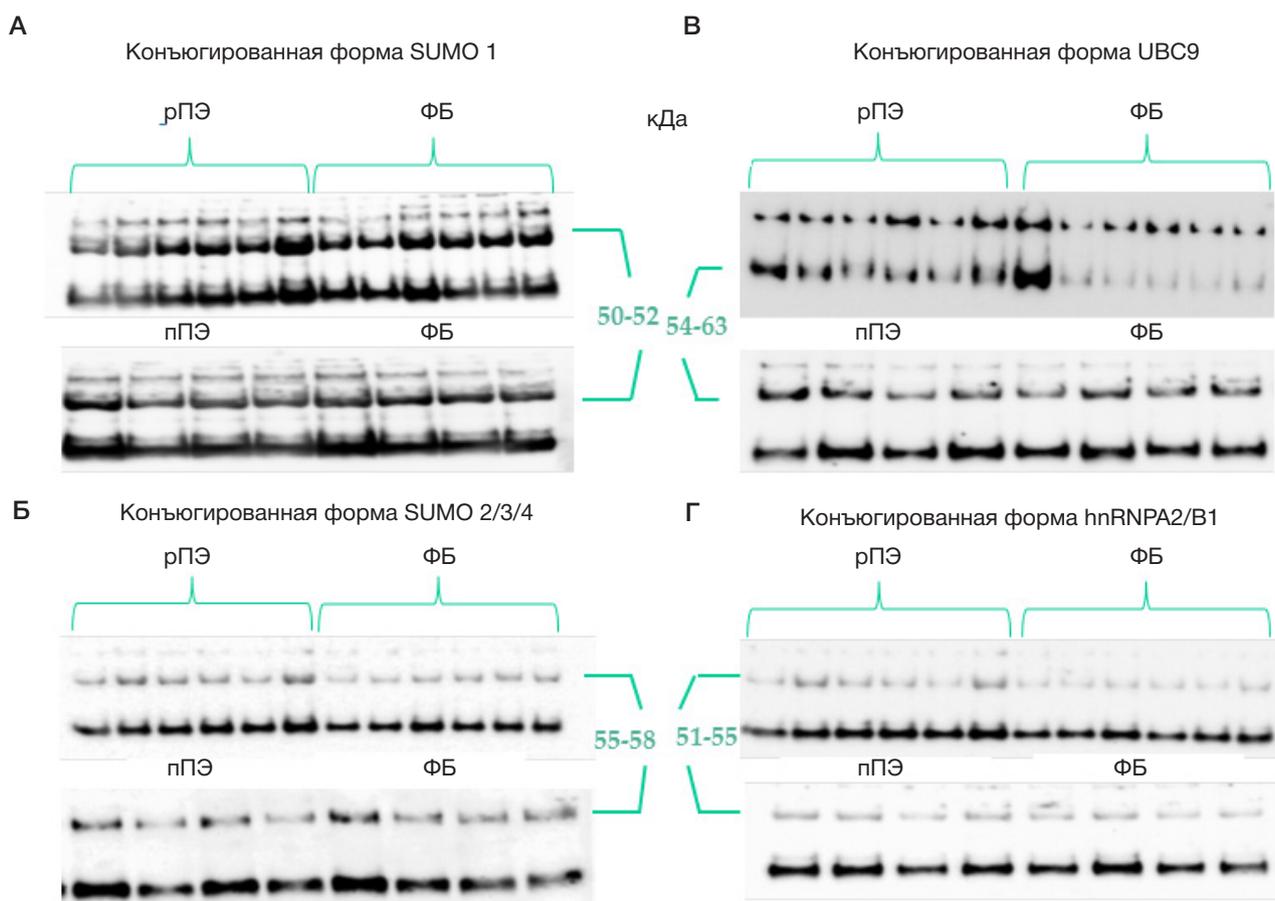


Рис. 2. Вестерн-блот мембран с конъюгированными экзосомными формами SUMO 1 (А), SUMO 2/3/4 (Б), UBC9 (В) и hnRNP A2/B1 (Г) у беременных с манифестировавшей впоследствии ранней преэклампсией (рПЭ), поздней (пПЭ) и физиологически протекающей беременностью (ФБ)

с использованием программного обеспечения Bio-Rad ImageLab 6.0 (Bio-Rad; США). Экспрессию тканевых белков SUMO 1–4, UBC9 и hnRNP A2/B1 нормировали по отношению к актину, а уровень SUMO 1–4, UBC9 и hnRNP A2/B1 в экзосомах нормировали на концентрацию общего белка.

Оценка биохимических показателей пренатального скрининга в сыворотке крови беременных женщин

Концентрацию плацентарных факторов (sFlt-1, PLGF) и гормонов (PAPP-A, b-HCG) в сыворотке крови у беременных на сроках 11–14 недель гестации определяли электрохемилюминесцентным методом на автоматическом иммунохимическом анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH; Германия) с использованием коммерческих наборов данного производителя.

Статистический анализ данных

Оценку статистической значимости между клиническими показателями и экспрессией белка в исследуемых группах проводили с помощью теста Уилкоксона–Манна–Уитни с использованием скриптов, написанных на языке R (<https://www.R-project.org>). Для оценки связи экспрессии белка с клиническими показателями беременных женщин использовали метод непараметрической ранговой корреляции Спирмена. Модели логистической регрессии экспрессии белков были созданы для проверки возможности их использования в качестве биомаркеров. Эффективность созданных моделей оценивали с помощью ROC-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка экспрессии SUMO 1–4, UBC9 и hnRNP A2/B1 в экзосомах на сроках 11–14 недель беременности

Экспрессия SUMO 1–4, UBC9 и hnRNP A2/B1 в экзосомах, выделенных из плазмы крови беременных на сроках 11–14 недель гестации, с физиологической беременностью, манифестировавшей впоследствии ранней и поздней ПЭ, а также беременных с высоким риском развития ПЭ по данным комбинированного пренатального скрининга, была оценена методом вестерн-блоттинга. Детектировано несколько конъюгированных форм указанных белков, различающихся по молекулярным массам, при этом свободных форм в экзосомах не обнаружено (рис. 2А–Г).

Сравнительный анализ показал, что в экзосомах беременных с ранней ПЭ экспрессия конъюгированной формы SUMO 1 (~50–52 кДа) значимо снижена ($p = 0,03$), а SUMO 2/3/4 (~55–58 кДа) повышена относительно физиологической беременности ($p = 0,03$). Экспрессия примерных по молекулярному весу конъюгированных UBC9 (~54–63 кДа) и hnRNP A2/B1 (~51–55 кДа) также была повышена, но без статистически значимых отличий ($p = 0,07$ и $p = 0,3$ соответственно). Предположительно, указанные формы являются конъюгатом SUMO 1 + UBC9, поскольку молекулярный вес их свободных форм составляет ~12 кДа и ~18 кДа соответственно. А при присоединении hnRNP A2/B1 (свободная форма ~36/38 кДа) как мишени SUMO 1 их суммарный молекулярный вес может составлять ~50–56 кДа.

При поздней ПЭ также наблюдается значимое снижение экспрессии конъюгированной формы SUMO 1 (~50–52 кДа;

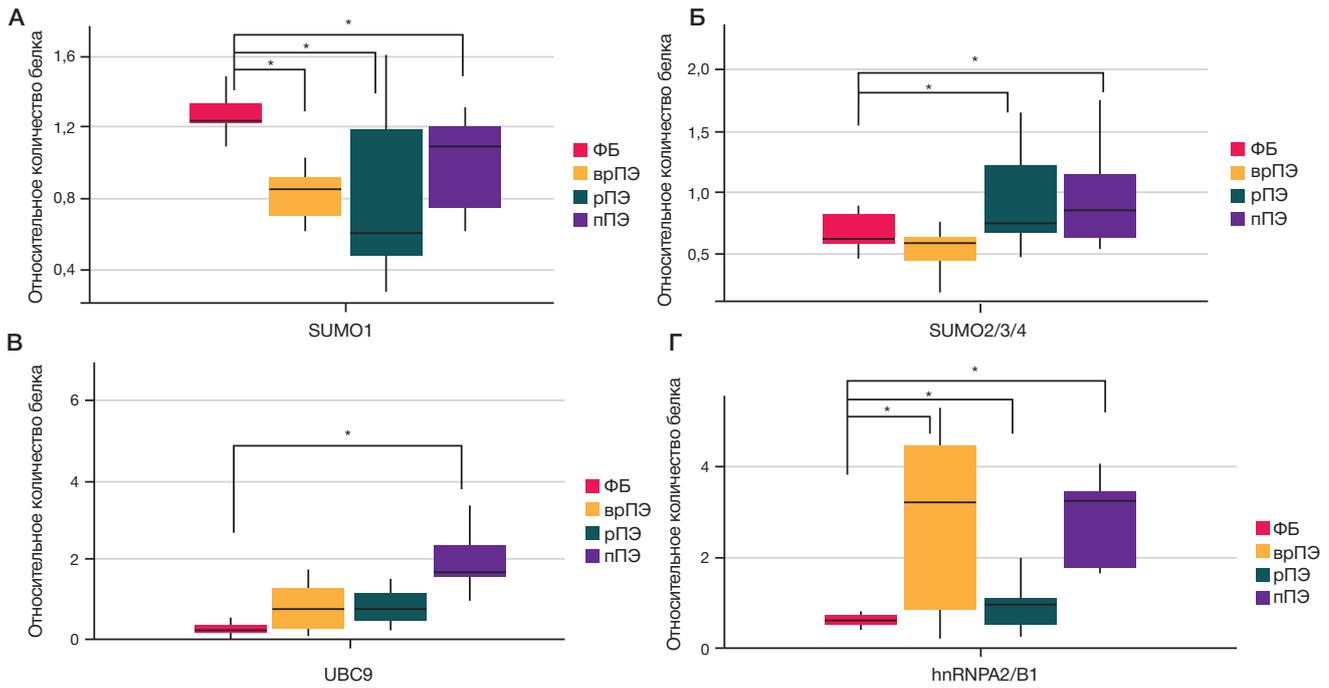


Рис. 3. Сравнительный анализ экспрессии SUMO 1 (А), SUMO 2/3/4 (Б), UBC9 (В) и hnRNPA2/B1 (Г) в экзосомах у беременных с манифестировавшей впоследствии ранней преэклампсией (рПЭ), поздней (пПЭ) и физиологически протекающей беременностью (ФБ). Количественная денситометрия белков, нормированных на контрольный образец. Данные представлены в формате Me (Q₁; Q₃); *: статистически значимый уровень $p \leq 0,05$ в сравнении с ФБ; врПЭ — высокий риск развития ПЭ

$p = 0,03$), при этом экспрессия конъюгированных форм SUMO 2/3/4 (~55–58 кДа; $p = 0,04$), UBC9 (~54–63 кДа; $p < 0,0001$) и hnRNPA2/B1 (~51–55 кДа; $p < 0,0001$) значимо повышена относительно физиологической беременности (рис. 3А–Г).

Интересно, что при анализе экспрессии исследуемых белков в группе беременных с высоким риском развития ПЭ также выявлено значимое снижение экспрессии конъюгированного SUMO 1 (~50–52 кДа; $p = 0,007$) и повышение экспрессии конъюгированных UBC9

(~54–63 кДа), hnRNPA2/B1 (~51–55 кДа) относительно физиологической беременности ($p = 0,01$ и $p = 0,001$ соответственно).

Оценка экспрессии SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 в плаценте при ранней и поздней ПЭ

В связи со значимыми изменениями экспрессии конъюгированных форм SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 в экзосомах беременных, секретируемых

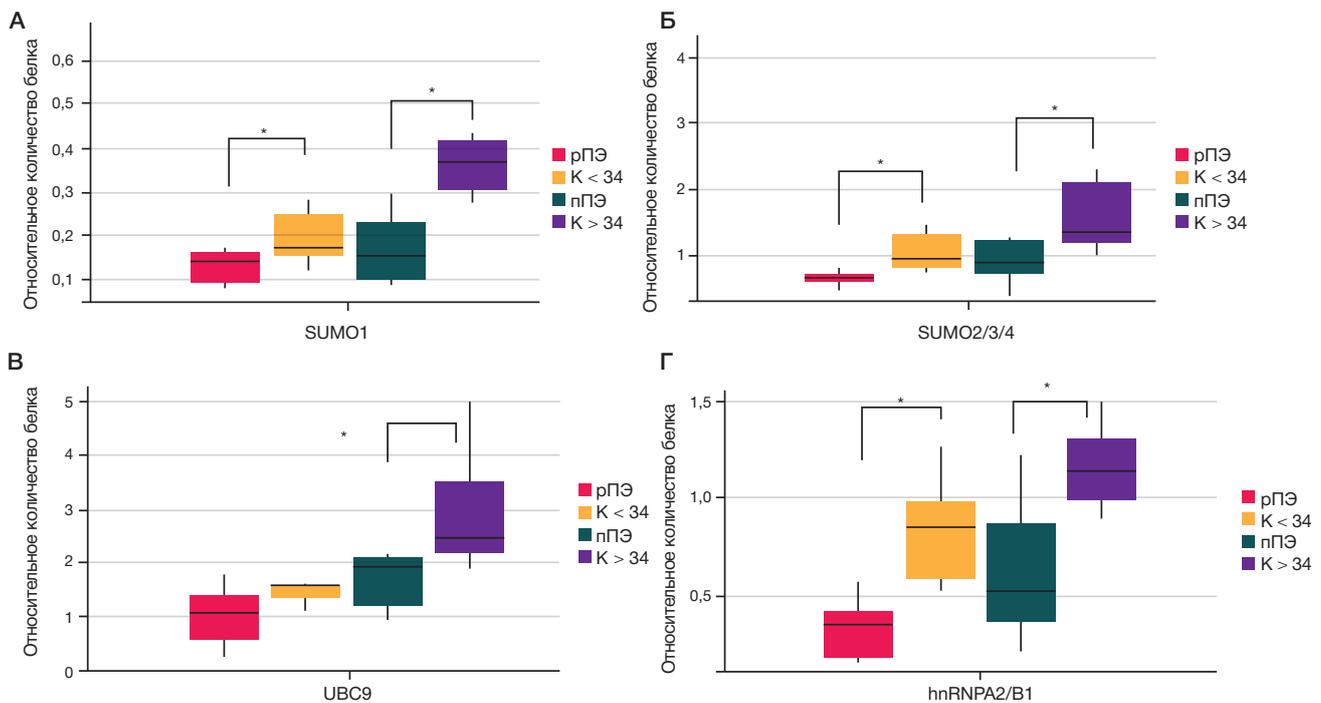


Рис. 4. Сравнительный анализ экспрессии SUMO 1 (А), SUMO 2/3/4 (Б), UBC9 (В) и hnRNPA2/B1 (Г) в ткани плаценты у беременных с ранней преэклампсией (рПЭ) и поздней преэклампсией (пПЭ), и контроля соответствующего срока ($n < 34$, $n > 34$). Количественная денситометрия белков, нормированных на актин. Данные представлены в формате Me (Q₁; Q₃); * — статистически значимый уровень $p \leq 0,05$ в сравнении с контролем соответствующего срока

Таблица 3. Результаты корреляции экспрессии белков в экзосомах с показателями комбинированного пренатального скрининга беременных с ранней и поздней ПЭ

Параметр	SUMO 1		SUMO 2/3/4		UBC9		hnRNPA2/B1	
	<i>r</i> *	<i>p</i> **						
Ранняя ПЭ								
Среднее артериальное давление	нс	нс	нс	нс	0,53	0,03	нс	нс
ПИ МА, МоМ	0,59	0,01	0,54	0,02	нс	нс	0,75	0,0001
PIGF	нс	нс	-0,59	0,01	-0,88	0,0001	нс	нс
Поздняя ПЭ								
β-hCG, МоМ	нс	нс	нс	нс	-0,48	0,03	-0,63	0,004
PAPP-A, МоМ	нс	нс	-0,60	0,006	нс	нс	нс	нс

Примечание: * *r* — коэффициент корреляции Спирмена; ** *p* — статистическая значимость корреляции; Нс — не значимо статистически.

синцитиотрофобластом на сроках 11–14 недель гестации, была оценена их экспрессия в плаценте у беременных с ранней и поздней ПЭ. Методом вестерн-блоттинга идентифицированы различающиеся по молекулярным массам конъюгированные фрагменты указанных белков, соответствующие выявленным таковым в экзосомах.

Сравнительный анализ позволил выявить в плаценте значимое снижение экспрессии конъюгированных форм SUMO 1 (~50–55 кДа, *p* = 0,04; *p* = 0,04 соответственно), SUMO 2/3/4 (~55–59 кДа; *p* = 0,008, *p* = 0,05 соответственно) и hnRNPA2/B1 (~54 кДа; *p* = 0,01, *p* = 0,009 соответственно) при ранней и поздней ПЭ, которые примерно соответствуют молекулярным весам фрагментов, детектированных в экзосомах. При этом экспрессия конъюгированного UBC9 (~53–55 кДа; *p* = 0,04) значимо снижена только при поздней ПЭ относительно группы сравнения соответствующего срока гестации (рис. 4А–Г).

Оценка взаимосвязи экспрессии экзосомных SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 с клиническими показателями комбинированного пренатального скрининга I триместра в группах беременных. Прогностическая значимость

Учитывая значимое изменение экспрессии исследуемых белков в экзосомах, мы оценили взаимосвязь данных изменений с показателями комбинированного пренатального скрининга I триместра в группах

беременных с манифестацией ранней и поздней форм ПЭ с использованием метода непараметрической ранговой корреляции Спирмена (табл. 3).

В сыворотке крови беременных с ранней ПЭ уровни экзосомных SUMO 1 (*r* = 0,59; *p* = 0,01), SUMO 2/3/4 (*r* = 0,54; *p* = 0,02) и hnRNPA2/B1 (*r* = 0,75; *p* = 0,0001) значимо коррелировали с пульсационным индексом маточной артерии, а уровень UBC9 — со средним артериальным давлением (*r* = 0,53; *p* = 0,03). При этом наблюдали высокую обратную корреляцию уровня SUMO 2/3/4 (*r* = -0,59; *p* = 0,01) и UBC9 (*r* = -0,88; *p* = 0,0001) с концентрацией PIGF. Интересно, что у беременных с поздней ПЭ была установлена взаимосвязь с биохимическими показателями комбинированного скрининга: концентрации b-hCG с уровнем экзосомных UBC9 (*r* = -0,48; *p* = 0,03) и hnRNPA2/B1 (*r* = -0,48; *p* = 0,03), а также концентрации PAPP-A с уровнем SUMO 2/3/4 (*r* = -0,60; *p* = 0,006).

С целью оценки возможности использования экзосомных SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 в качестве потенциальных предикторов развития ПЭ на ранних сроках беременности были разработаны модели логистической регрессии (рис. 5А–Г; табл. 4). ROC-кривые для логистических моделей представлены различными комбинациями, среди которых были выбраны значимые (формулы для них представлены в табл. 4). Особенно важно, что выбранные модели позволяют также дифференцировать беременных с высоким риском развития ПЭ по данным комбинированного пренатального скрининга I триместра от беременных с ПЭ и беременных с физиологически протекающей беременностью.

Таблица 4. Прогностические значения с параметрами логистических моделей для SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1

	AUC	Чувствительность	Специфичность	Cutoff	<i>p</i>	Параметры	Формулы
рПЭ vs. ФБ							
UBC9	0,88	0,72	1	0,72	0,03	<i>i</i> — 2,65 UBC9 — 6,73	$\frac{1}{1+e^{2,65-6,73x_1}}$
пПЭ vs. ФБ							
SUMO 1	0,79	0,8	0,77	0,43	0,05	<i>i</i> — 7,4 SUMO1 — 6,29	$\frac{1}{1+e^{7,4-6,29x_1}}$
врПЭ vs. ПЭ							
UBC9; hnRNPA2/B1	0,94	0,80	1	0,79	0,02/0,01	<i>i</i> — 0,18 UBC9 — 6,23 hnRNPA2/B1 — 2,19	$\frac{1}{1+e^{0,18-6,23x_1+2,19x_2}}$
врПЭ vs. ФБ							
SUMO 1	0,91	0,88	1	0,58	0,02	<i>i</i> — 9,78 SUMO1 — 9,073	$\frac{1}{1+e^{9,78-9,073x_1}}$

Примечание: рПЭ — ранняя преэклампсия; пПЭ — поздняя преэклампсия; врПЭ — высокий риск развития преэклампсии; ФБ — физиологическая беременность; AUC — площадь под кривой.

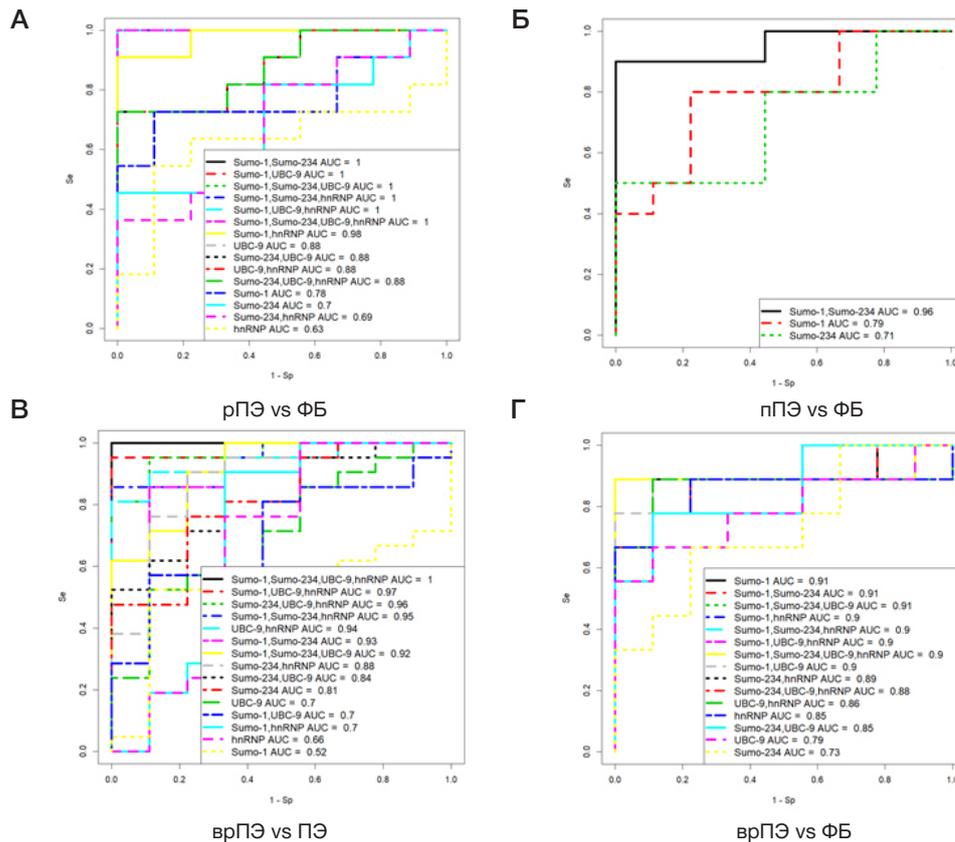


Рис. 5. ROC-кривые для логистических моделей оценки риска развития ПЭ на основе определения экспрессии SUMO 1–4, UBC9 и hnRNP2/B1 в экзосомах (А–Г) на ранних сроках беременности. рПЭ — ранняя ПЭ. пПЭ — поздняя ПЭ. врПЭ — высокий риск развития ПЭ. ФБ — физиологическая беременность.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В основе развития успешной беременности лежит механизм коммуникации между фетоплацентарным и материнским компартаментами, осуществляемый посредством высвобождения биоактивных молекул и внеклеточных везикул, которые отражают патофизиологическое состояние клеток-доноров и могут модулировать функцию клеток-мишеней [30]. Известно, что экзосомы плацентарного происхождения опосредуют адаптацию сосудов матери к беременности, а их концентрация в плазме увеличивается по мере прогрессирования беременности и коррелирует с кровотоком в маточных артериях [31]. Такая функциональная уникальность позволяет их рассматривать в качестве динамичных биомаркеров, осуществляющих мониторинг плацентарной дисфункции в режиме «реального времени» [32].

Интересным аспектом, обращающим на себя внимание, является экзосомный контент, который обуславливает биоактивность экзосом, а его загрузка находится под контролем одной из посттрансляционных модификаций — сумоилирования [27]. Обратимая конъюгация небольшого пептида SUMO с белками-мишенями имеет решающее значение для функции клеток и различных клеточных процессов, включая транскрипцию, репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла, ремоделирование хроматина, транспорт нуклеоплазмы, апоптоз [33]. Экспрессия изоформ SUMO 2 и SUMO 3, идентичных друг другу на 97%, а SUMO 1 на 46%, обнаружена во всех эукариотических клетках [19, 34]. Недавно продемонстрировано, что в плаценте экспрессируется еще одна изоформа — SUMO 4 [35]. При этом нарушения гомеостаза сумоилирования связаны с различными патологическими состояниями [36, 37].

Несмотря на имеющиеся данные о вовлеченности сумоилирования в плацентарную дисфункцию [13, 20], информации об экспрессии экзосомных белков SUMO при данной патологии нет.

В контексте вышесказанного мы оценили экспрессию белков SUMO в экзосомах беременных на сроке 11–14 недель гестации (когорта I). Следует отметить, что ранее нами было показано повышение экспрессии конъюгированных форм SUMO 1–4 и UBC9 в экзосомах беременных с ранней ПЭ на момент родов [29] и свободных форм SUMO 1–4, UBC9 в плаценте при ранней ПЭ [28]. В настоящем исследовании экспрессия конъюгированной формы SUMO 1 в экзосомах беременных с ранней ПЭ на сроке 11–14 недель гестации была значимо снижена, в то время как экспрессия SUMO 2/3/4 повышена относительно физиологически протекающей беременности. У беременных с поздней ПЭ выявлена аналогичная картина по направленности экспрессии конъюгированных форм SUMO 1 и SUMO 2/3/4 в экзосомах. Как показано ранее, характер экспрессии белков SUMO может быть обусловлен их уникальным пространственно-временным распределением в слоях трофобласта на протяжении беременности, а также активностью в ответ на окислительный стресс и воспаление. В частности, свободные формы SUMO 1 и SUMO 4 экспрессируются преимущественно в цитотрофобластах в I и II триместрах беременности со смещением в синцитиотрофобласт в III триместре. SUMO 2/3 демонстрирует стабильную экспрессию по всему слою трофобласта в течение беременности. Однако в ответ на гипоксический/окислительный стресс наблюдаются активность и перераспределение SUMO 1 и SUMO 4 в синцитий из цитотрофобласта, а экспрессия SUMO

2/3 увеличивается при воспалительном стрессе [38]. Примечательно, что результаты нашего исследования, в целом, согласуются с приведенными выше данными, демонстрируя разнонаправленную активацию экспрессии экзосомных конъюгированных белков SUMO 1 и SUMO 2/3/4 в ответ на клеточный стресс при плацентарной дисфункции. Тем не менее, под воздействием различных стрессовых стимулов в клетках должна увеличиваться экспрессия всех изоформ SUMO, и их последующая секреция соответственно. Однако в нашем исследовании экспрессия SUMO 1 в экзосомах была снижена, как при ранней, так и при поздней ПЭ. Ранее были обнаружены уменьшение пула свободной формы SUMO 2/3 в клетках и накопление его высокомолекулярных конъюгатов в ответ на клеточный стресс, в отличие от SUMO 1 [39]. Принимая во внимание эти данные, мы выдвинули предположение, что гипоксический и окислительный стресс, возникающий при плацентарной дисфункции на ранних сроках, активирует свободную форму SUMO 2/3 для формирования большого количества конъюгатов с белками-мишенями и индукции стресс-чувствительных сигнальных каскадов посредством экзосом, в то время как SUMO 1 способен избирательно конъюгироваться в ответ на стресс, о чем свидетельствует снижение экспрессии его конъюгированной формы в экзосомах. Интересно, что свободных форм указанных белков в экзосомах мы не обнаружили, а молекулярный вес конъюгированных форм, предположительно, соответствовал суммарному весу их свободной формы с UBC9. Кроме того, экспрессия самого конъюгированного UBC9 также была значимо повышена только при поздней ПЭ относительно физиологической беременности. Следует отметить, что UBC9 является единственным ферментом, который осуществляет конъюгацию изоформ SUMO 1–4 с белками-мишенями, в отличие от системы убиквитинирования [19]. Следовательно, уровень его экспрессии имеет решающее значение для сумоилирования. Основываясь на ранее продемонстрированном пространственно-временном распределении SUMO 1–4 в клетках трофобласта [38], мы предположили, что имеется определенная специфичность конъюгирования UBC9 с SUMO 1 и SUMO 2/3 в контексте их субклеточных мишеней. Тем более, что на модельных объектах уже получены доказательства его различной иммунореактивности с SUMO-белками в зависимости от популяции клеток [40].

Известно, что сумоилирование модулирует транскрипционную активность и локализацию множества ядерных [41] и цитоплазматических белков [42], регулируя, таким образом, широкий спектр биологических процессов. И безусловный интерес представляет недавнее открытие процесса сумоилирования членов семейства гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNPs), который обеспечивает универсальный механизм регуляции их РНК-связывающей активности и последующей селективной сортировки транскриптов в экзосомы [27, 43]. Сумоилирование hnRNPA2/B1 с помощью SUMO 1 является необходимым условием для его связывания со специфичными экзомотивами мкРНК и осуществления их последующей загрузки в экзосомы, тогда как ингибирование сумоилирования может нарушить связывание белка с мкРНК. В нашем предыдущем исследовании были идентифицированы экзомотивы ряда мкРНК, чувствительных к гипоксии, а также установлены корреляции их экспрессии с уровнем SUMO 2/3/4 в плаценте беременных с ранней ПЭ [29].

Опираясь на данную связь, мы оценили экспрессию hnRNPA2/B1, которая, как и в случае с UBC9, была значимо повышена в экзосомах беременных с поздней формой ПЭ на сроке 11–14 недель. Поскольку hnRNPA2/B1 является субстратом SUMO [44], вполне вероятно, что регуляцию его экспрессии в экзосомах может также осуществлять SUMO 2/3/4, если уровень SUMO 1 снижен. Более того, учитывая специфичность конъюгирования UBC9, можно предположить, что при поздней форме ПЭ экспрессия hnRNPA2/B1 активируется посредством конъюгации с UBC9. И это необходимо для загрузки в экзосомы мкРНК, регулирующих ассоциированные с сосудистой дисфункцией мишени. Стоит отметить не менее интересные результаты по экспрессии белков у беременных с высоким риском развития ПЭ по данным комбинированного пренатального скрининга I триместра. Несмотря на наличие маркеров плацентарной дисфункции, исход их беременностей был благополучный. Однако направленность экспрессии конъюгированной формы SUMO 1, UBC9 и hnRNPA2/B1 совпала с таковой при ранней и поздней ПЭ, за исключением SUMO 2/3/4, уровень которого не изменялся.

В связи с установленными изменениями экспрессии конъюгированных форм белков в экзосомах беременных с ПЭ на сроках 11–14 недель гестации представилось интересным оценить их экспрессию в ткани плаценты беременных с ранней и поздней ПЭ (когорты II). Мы обнаружили снижение экспрессии конъюгированных форм SUMO 1–4 и hnRNPA2/B1 в плаценте как при ранней, так и при поздней ПЭ, а уровень UBC9 был значимо снижен только при поздней ПЭ. Результаты оказались и неожиданными, и интригующими. Как было ранее отмечено, процесс сумоилирования, являясь критическим регулятором ответа на клеточный стресс, обуславливает увеличение уровня высокомолекулярных конъюгатов SUMO, равно как и свободных форм. Более того, в предыдущем исследовании выявлено повышение свободных форм SUMO при ранней ПЭ [28]. Такую разнонаправленную экспрессию свободных и конъюгированных форм исследуемых белков в плаценте можно объяснить тем, что свободные формы экспрессируются исключительно в ответ на стрессовые стимулы, выполняя адаптационную функцию, в то время как формирование конъюгатов SUMO необходимо для запуска регуляторных каскадов. При этом изменение их экспрессии зависит от того, что необходимо в данный момент времени — сумоилирование или десумоилирование белка-мишени. Наше предположение нашло подтверждение в ряде исследований. Так, показано, что на ранних сроках беременности (9–10 недель) уровень свободных форм SUMO увеличивается, и это совпадает с физиологической плацентарной гипоксией. Однако на 10–12-й неделе гестации сверхэкспрессия SUMO 2/3 может ингибировать активность HIF 1A (фактора, индуцируемого гипоксией) и для сохранения стабильности последнего десумоилирующей белок SENP 3 снижает экспрессию SUMO 2/3 [45]. Другими авторами приведено доказательство роли десумоилирующего белка SENP 1 в эндотелиальных клетках как положительного регулятора обусловленной гипоксией экспрессии VEGF и ангиогенеза [46, 47]. Что касается плацентарной дисфункции, изменение экспрессии GCM-1, индуцированной гипоксией и регулируемой транскрипционным фактором p45 NF-E2 [48], связано, в том числе, с десумоилированием [49, 50]. Важно отметить, что факторы, повышающие глобальное сумоилирование, не обязательно приводят к изменениям в

сумоилировании всех субстратов SUMO. Сумоилирование отдельных белков осуществляется специфичным для субстрата образом и часто в отсутствие глобальных изменений [51].

Открытие плацентарных факторов способствовало всплеску исследований по их использованию в качестве биомаркеров для диагностики и прогнозирования риска развития ПЭ и ЗРП с 2003 г. [52]. Однако наиболее достоверных результатов удалось достичь в прогнозировании раннего начала ПЭ. Исследователи связывают это с тем, что изменение их уровней является отражением стресса синцитиотрофобласта, т. е. плацентарной дисфункции в целом, а не биомаркером ПЭ [53]. Кроме того, предлагаемый диагностически значимый уровень циркулирующих в крови матери про- и антиангиогенных факторов может быть достигнут в случае проявления патологического состояния, а не на начальном этапе нарушения эндovasкулярной инвазии спиральных артерий трофобластом [54]. В этой связи необходим поиск специфичных маркеров. Интересно, что снижение уровня ангиогенного PLGF и повышение антиангиогенного sFlt-1 в течение III триместра коррелирует с наблюдаемыми изменениями в перераспределении SUMO 1 и SUMO 4 из цитотрофобласта в синцитий, который является единственным типом клеток плаценты, находящимся в непосредственном контакте с материнским кровообращением [38]. А ранее мы обнаружили корреляционную связь между изменениями экспрессии miR-423-3p, miR-652-3p, уровнем SUMO 2/3/4, UBC9 в плаценте и снижением концентрации PLGF в крови беременных с ранней ПЭ на момент родов [28]. Опираясь на данные результаты, мы осуществили поиск корреляций с показателями комбинированного пренатального скрининга беременных I триместра. В сыворотке крови беременных на ранних сроках повышенный уровень экзосомных SUMO 2/3/4 и UBC9 обратно коррелировал с концентрацией PLGF, что хорошо согласуется с нашими предыдущими данными. Кроме того, обнаруженная взаимосвязь подтверждает регуляцию плацентарного фактора посредством сумоилирования и дает основание предполагать специфичность SUMO 2/3/4 и UBC9 по отношению к PLGF. Интересно, что эта взаимосвязь установлена только для ранней формы ПЭ. Примечательно, что помимо взаимосвязи с плацентарным фактором, обнаружены значимые корреляции экспрессии всех конъюгированных изоформ SUMO и hnRNPA2/B1 с пульсационным индексом маточной артерии, а UBC9 коррелировал с показателем среднего артериального давления. Особенность в том, что при поздней форме ПЭ повышенный уровень SUMO 2/3/4 обратно коррелировал с PAPP-A, а UBC9 и hnRNPA2/B1 — с концентрацией β -ХГЧ. При этом не обнаружено корреляций SUMO 1 ни с одним из показателей. Низкие концентрации β -ХГЧ и PAPP-A в I триместре беременности связывают с риском развития ПЭ и ЗРП [55–57].

Учитывая результаты корреляционного анализа, а также отсутствие данных о прогностическом потенциале модификаций SUMO, мы создали модели логистической регрессии с ROC-кривыми для оценки возможности использования исследуемых экзосомных белков в качестве потенциальных предикторов риска развития ПЭ на ранних сроках беременности. В модели предикции ранней ПЭ определены значимые коэффициенты для UBC9 (AUC = 0,88; Se-0,72; Sp-1), а поздней ПЭ — для SUMO 1 (AUC = 0,79; Se-0,8; Sp-0,77). Кроме этого, на основе оценки экспрессии UBC9, hnRNPA2/B1 (AUC = 0,94; Se-0,80; Sp-1) и SUMO 1 (AUC = 0,91; Se-0,88; Sp-1) возможно дифференцировать беременных с высоким риском развития ПЭ по данным комбинированного скрининга I триместра от беременных с ПЭ и с физиологической беременностью соответственно. Мы обратили внимание на то, что SUMO 2/3/4 не достиг значимого уровня ни в одной из моделей. Тем не менее, полученные результаты позволяют предположить дифференциальную специфичность UBC9 и SUMO 1 в патогенезе подтипов ПЭ, а также различную функциональную роль белков SUMO при плацентарной дисфункции в целом, что важно для превентивной терапевтической стратегии. Бесспорно, использование прогностических моделей потребует последующей валидации на большой когорте беременных с соответствующими клиническими исходами, включая изолированные формы ПЭ и ЗРП.

Выводы

Основная ценность настоящего исследования заключается в том, что оно открывает несколько поисковых направлений для предикции состояний, связанных с плацентарной дисфункцией, на основе изучения паттерна сумоилирования экзосомного контента. Это первые данные об экзосомной экспрессии конъюгированных изоформ SUMO 1–4, а также UBC9 и hnRNPA2/B1, дифференциально изменяющейся на ранних сроках у беременных с ПЭ. Возможность прогноза данной патологии может быть обусловлена функциональной специфичностью изоформ SUMO, а также механизмом конъюгации/деконъюгации, с помощью которого осуществляется координация сигнальных путей. Стоит отметить, что наше исследование имеет ограничение, которое связано с небольшим размером выборки в каждой когорте. Мы обратили на это внимание, поскольку для валидации прогностических моделей необходимо расширение когорт беременных. Кроме того, в данной работе мы не оценивали экспрессию белков в экзосомах, осуществляющих деконъюгацию SUMO с субстратами. Это можно рассматривать в качестве перспективы для будущих исследований, как и изучение самих субстратов, вовлеченных в регуляцию при плацентарной дисфункции.

Литература

1. Ilekis JV, Tsilou E, Fisher S, et al. Placental origins of adverse pregnancy outcomes: potential molecular targets: an Executive Workshop Summary of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2016; 215 (1): S1–S46.
2. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia: pathophysiology, challenges, and perspectives. 2019; *Circ Res*. 124 (7): 1094–1112.
3. Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *Journal of Reproductive Immunology*. 2019; 134–135: 1–10.
4. Tenório MB, Ferreira RC, Moura FA, Bueno NB, de Oliveira ACM, Goulart MOF. Cross-Talk between Oxidative Stress and Inflammation in Preeclampsia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019: 1–26.
5. Melchiorre K, Giorgione V, Thilaganathan B. The placenta and

- preeclampsia: villain or victim? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2022; 226 (2): S954–S962.
6. Chen CW, Jaffe IZ, Karumanchi SA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2014; 101 (4): 579–86.
 7. Ritz E, Amann K, Koleganova N, Benz K. Prenatal programming—effects on blood pressure and renal function. *Nat Rev Nephrol*. 2011; 7 (3): 137–44.
 8. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on preeclampsia: a pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int J Gynecol Obstet*. 2019; 145 (S1): 1–33.
 9. ACOG. *Obstetrics & Gynecology*. 2019; 133 (1): 1–1.
 10. Yagel S, Cohen SM, Goldman-Wohl D. An integrated model of preeclampsia: a multifaceted syndrome of the maternal cardiovascular-placental-fetal array. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2022; 226 (2): S963–S972.
 11. Gobble RM, Groesch KA, Chang M, Torry RJ, Torry DS. Differential regulation of human PIGF gene expression in trophoblast and nontrophoblast cells by oxygen tension. *Placenta*. 2009; 30 (10): 869–75.
 12. Chang M, Mukherjee D, Gobble RM, Groesch KA, Torry RJ, Torry DS. Glial cell missing regulates Placental Growth Factor (PGF) gene transcription in human trophoblast. *Biology of Reproduction*. 2008; 78 (5): 841–51.
 13. Baczyk D, Kibschull M, Mellstrom B, et al. DREAM mediated regulation of GCM1 in the human placental trophoblast. *PLoS ONE*. 2013; 8 (1): e51837.
 14. Chou C-C, Chang C, Liu J-H, Chen L-F, Hsiao C-D, Chen H. Small ubiquitin-like modifier modification regulates the DNA binding activity of glial cell missing *Drosophila* Homolog a. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282 (37): 27239–49.
 15. Enserink JM. Sumo and the cellular stress response. *Cell Div*. 2015; 10 (1): 4.
 16. He J, Cheng J, Wang T. SUMOylation-Mediated Response to Mitochondrial Stress. *IJMS*. 2020; 21 (16): 5657.
 17. Kunz K, Wagner K, Mendler L, Hölper S, Dehne N, Müller S. SUMO signaling by hypoxic inactivation of SUMO-specific isopeptidases. *Cell Reports*. 2016; 16 (11): 3075–86.
 18. Karhausen J, Ulloa L, Yang W. SUMOylation connects cell stress responses and inflammatory control: lessons from the gut as a model organ. *Front Immunol*. 2021; 12: 646633.
 19. Chang H-M, Yeh ETH. SUMO: from bench to bedside. *Physiological Reviews*. 2020; 100 (4): 1599–619.
 20. Baczyk D, Drewlo S, Kingdom JCP. Emerging role of SUMOylation in placental pathology. *Placenta*. 2013; 34 (7): 606–12.
 21. Kondoh K, Akahori H, Muto Y, Terada T. Identification of key genes and pathways associated with preeclampsia by a WGCNA and an evolutionary approach. *Genes*. 2022; 13 (11): 2134.
 22. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*. 2021; 19 (1): 47.
 23. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14 (3): 195–208.
 24. Salomon C, Kobayashi M, Ashman K, Sobrevia L, Mitchell MD, Rice GE. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes. *PLoS ONE*. 2013; 8 (11): e79636.
 25. Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and Endoglin. *PLoS ONE*. 2013; 8 (2): e56754.
 26. Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, et al. Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia: potential role of exosomal microRNAs across gestation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017; 102 (9): 3182–94.
 27. Villarroja-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, et al. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 2013; 4 (1): 2980.
 28. Gusar VA, Timofeeva AV, Chagovets VV, Kan NE, Ivanets TYu, Sukhikh GT. Regulation of the placental growth factor mediated by sumoylation and expression of miR-652-3p in pregnant women with early-onset preeclampsia. *Bull Exp Biol Med*. 2022; 174 (1): 174–8.
 29. Gusar V, Timofeeva A, Chagovets V, et al. Diagnostic potential of exosomal hypoxamiRs in the context of hypoxia–sumoylation–hypoxamiRs in early onset preeclampsia at the preclinical stage. *Life*. 2022; 12 (1): 101.
 30. Chiarello DI, Salsoso R, Toledo F, Mate A, Vázquez CM, Sobrevia L. Foetoplacental communication via extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018; 60: 69–80.
 31. Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, et al. A Gestational Ppofile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS ONE*. 2014; 9 (6): e98667.
 32. Tannetta D, Collett G, Vatish M, Redman C, Sargent I. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles — Circulating biopsies reflecting placental health. *Placenta*. 2017; 52: 134–8.
 33. Hendriks IA, D'Souza RCJ, Yang B, Verlaan-de Vries M, Mann M, Verteegaal ACO. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol*. 2014; 21 (10): 927–36.
 34. Hay RT. SUMO. *Molecular Cell*. 2005; 18 (1): 1–12.
 35. Baczyk D, Audette MC, Drewlo S, Levytska K, Kingdom JC. SUMO-4: a novel functional candidate in the human placental protein SUMOylation machinery. *PLoS ONE*. 2017; 12 (5): e0178056.
 36. Anderson DB, Wilkinson KA, Henley JM. Protein SUMOylation in neuropathological conditions. *Drug News & Perspectives*. 2009; 22 (5): 255.
 37. Bawa-Khalife T, Yeh ETH. SUMO losing balance: SUMO proteases disrupt SUMO homeostasis to facilitate cancer development and Progression. *Genes & Cancer*. 2010; 1 (7): 748–52.
 38. Baczyk D, Audette MC, Coyaud E, Raught B, Kingdom JC. Spatiotemporal distribution of small ubiquitin-like modifiers during human placental development and in response to oxidative and inflammatory stress: Placental distribution of small ubiquitin-like modifiers. *J Physiol*. 2018; 596 (9): 1587–600.
 39. Saitoh H, Hinchev J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275 (9): 6252–8.
 40. Hasegawa Y, Yoshida D, Nakamura Y, Sakakibara S. Spatiotemporal distribution of SUMOylation components during mouse brain development: Sumo-ylation during brain development. *J Comp Neurol*. 2014; 522 (13): 3020–36.
 41. Chalkiadaki A, Talianidis I. SUMO-dependent compartmentalization in promyelocytic leukemia protein nuclear bodies prevents the access of LRF-1 to chromatin. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25 (12): 5095–105.
 42. Snider NT, Omary MB. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15 (3): 163–77.
 43. Vassileva MT, Matunis MJ. SUMO modification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24 (9): 3623–32.
 44. Verteegaal ACO, Ogg SC, Jaffray E, et al. A Proteomic study of SUMO-2 target proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279 (32): 33791–8.
 45. Bhattacharjee J, Alahari S, Sallais J, Tagliaferro A, Post M, Caniggia I. Dynamic regulation of HIF1A stability by SUMO2/3 and SENP3 in the human placenta. *Placenta*. 2016; 40: 8–17.
 46. Xu Y, Zuo Y, Zhang H, et al. Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285 (47): 36682–8.
 47. Zhou HJ, Xu Z, Wang Z, et al. SUMOylation of VEGFR2 regulates its intracellular trafficking and pathological angiogenesis. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 3303.
 48. McCaig D, Lyall F. Hypoxia upregulates GCM1 in human placenta explants. *hypertension in pregnancy*. 2009; 28 (4): 457–72.
 49. Kohli S, Hoffmann J, Lochmann F, et al. p45 NF-E2 regulates syncytiotrophoblast differentiation by post-translational GCM1 modifications in human intrauterine growth restriction. *Cell Death Dis*. 2017; 8 (4): e2730–e2730.
 50. Chang C-W, Chang G-D, Chen H. A novel cyclic AMP/Epac1/CaMKI signaling cascade promotes GCM1 desumoylation and placental cell fusion. *Molecular and Cellular Biology*. 2011; 31 (18): 3820–31.

51. Luo J, Ashikaga E, Rubin PP, et al. Receptor trafficking and the regulation of synaptic plasticity by SUMO. *Neuromol Med.* 2013; 15 (4): 692–706.
52. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003; 111 (5): 649–58.
53. Redman CWG, Staff AC. Preeclampsia, biomarkers, syncytiotrophoblast stress, and placental capacity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2015; 213 (4): S9.e1-S9.e4.
54. Dymara-Konopka W, Laskowska M, Grywalska E, Hymos A, Błażewicz A, Leszczyńska-Gorzela B. Similar pro- and antiangiogenic profiles close to delivery in different clinical presentations of two pregnancy syndromes: preeclampsia and fetal growth restriction. *IJMS.* 2023; 24 (2): 972.
55. Keikkala E, Vuorela P, Laivuori H, Romppanen J, Heinonen S, Stenman U-H. First trimester hyperglycosylated human chorionic gonadotrophin in serum — a marker of early-onset preeclampsia. *Placenta.* 2013; 34 (11): 1059–65.
56. Morris RK, Bilagi A, Devani P, Kilby MD. Association of serum PAPP-A levels in first trimester with small for gestational age and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis: Systematic review association serum PAPP-A and adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn.* 2017; 37 (3): 253–65.
57. Krantz D, Goetzl L, Simpson JL, et al. Association of extreme first-trimester free human chorionic gonadotropin-β, pregnancy-associated plasma protein A, and nuchal translucency with intrauterine growth restriction and other adverse pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2004; 191 (4): 1452–8.

References

1. Ilekis JV, Tsilou E, Fisher S, et al. Placental origins of adverse pregnancy outcomes: potential molecular targets: an Executive Workshop Summary of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2016; 215 (1): S1–S46.
2. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia: pathophysiology, challenges, and perspectives. *Circ Res.* 2019; 124 (7): 1094–1112.
3. Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *Journal of Reproductive Immunology.* 2019; 134–135: 1–10.
4. Tenório MB, Ferreira RC, Moura FA, Bueno NB, de Oliveira ACM, Goulart MOF. Cross-Talk between Oxidative Stress and Inflammation in Preeclampsia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2019; 2019: 1–26.
5. Melchiorre K, Giorgione V, Thilaganathan B. The placenta and preeclampsia: villain or victim? *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2022; 226 (2): S954–S962.
6. Chen CW, Jaffe IZ, Karumanchi SA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research.* 2014; 101 (4): 579–86.
7. Ritz E, Amann K, Koleganova N, Benz K. Prenatal programming—effects on blood pressure and renal function. *Nat Rev Nephrol.* 2011; 7 (3): 137–44.
8. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on preeclampsia: a pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int J Gynecol Obstet.* 2019; 145 (S1): 1–33.
9. ACOG. *Obstetrics & Gynecology.* 2019; 133 (1): 1–1.
10. Yagel S, Cohen SM, Goldman-Wohl D. An integrated model of preeclampsia: a multifaceted syndrome of the maternal cardiovascular-placental-fetal array. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2022; 226 (2): S963–S972.
11. Gobble RM, Groesch KA, Chang M, Torry RJ, Torry DS. Differential regulation of human PIGF gene expression in trophoblast and nontrophoblast cells by oxygen tension. *Placenta.* 2009; 30 (10): 869–75.
12. Chang M, Mukherjee D, Gobble RM, Groesch KA, Torry RJ, Torry DS. Glial cell missing regulates Placental Growth Factor (PGF) gene transcription in human trophoblast. *Biology of Reproduction.* 2008; 78 (5): 841–51.
13. Baczyk D, Kibschull M, Mellstrom B, et al. DREAM mediated regulation of GCM1 in the human placental trophoblast. *PLoS ONE.* 2013; 8 (1): e51837.
14. Chou C-C, Chang C, Liu J-H, Chen L-F, Hsiao C-D, Chen H. Small ubiquitin-like modifier modification regulates the DNA binding activity of glial cell missing *Drosophila* Homolog a. *Journal of Biological Chemistry.* 2007; 282 (37): 27239–49.
15. Enserink JM. Sumo and the cellular stress response. *Cell Div.* 2015; 10 (1): 4.
16. He J, Cheng J, Wang T. SUMOylation-Mediated Response to Mitochondrial Stress. *IJMS.* 2020; 21 (16): 5657.
17. Kunz K, Wagner K, Mendl L, Höpfer S, Dehn N, Müller S. SUMO signaling by hypoxic inactivation of SUMO-specific isopeptidases. *Cell Reports.* 2016; 16 (11): 3075–86.
18. Karhausen J, Ulloa L, Yang W. SUMOylation connects cell stress responses and inflammatory control: lessons from the gut as a model organ. *Front Immunol.* 2021; 12: 646633.
19. Chang H-M, Yeh ETH. SUMO: from bench to bedside. *Physiological Reviews.* 2020; 100 (4): 1599–619.
20. Baczyk D, Drewlo S, Kingdom JCP. Emerging role of SUMOylation in placental pathology. *Placenta.* 2013; 34 (7): 606–12.
21. Kondoh K, Akahori H, Muto Y, Terada T. Identification of key genes and pathways associated with preeclampsia by a WGCNA and an evolutionary approach. *Genes.* 2022; 13 (11): 2134.
22. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal.* 2021; 19 (1): 47.
23. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14 (3): 195–208.
24. Salomon C, Kobayashi M, Ashman K, Sobrevia L, Mitchell MD, Rice GE. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes. *PLoS ONE.* 2013; 8 (11): e79636.
25. Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and Endoglin. *PLoS ONE.* 2013; 8 (2): e56754.
26. Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, et al. Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia: potential role of exosomal microRNAs across gestation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2017; 102 (9): 3182–94.
27. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun.* 2013; 4 (1): 2980.
28. Gusar VA, Timofeeva AV, Chagovets VV, Kan NE, Ivanets TYu, Sukhikh GT. Regulation of the placental growth factor mediated by sumoylation and expression of miR-652-3p in pregnant women with early-onset preeclampsia. *Bull Exp Biol Med.* 2022; 174 (1): 174–8.
29. Gusar V, Timofeeva A, Chagovets V, et al. Diagnostic potential of exosomal hypoxamiRs in the context of hypoxia–sumoylation–hypoxamiRs in early onset preeclampsia at the preclinical stage. *Life.* 2022; 12 (1): 101.
30. Chiarello DI, Salsoso R, Toledo F, Mate A, Vázquez CM, Sobrevia L. Foetoplacental communication via extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine.* 2018; 60: 69–80.
31. Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, et al. A Gestational Pprofile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS ONE.* 2014; 9 (6): e98667.
32. Tannetta D, Collett G, Vatish M, Redman C, Sargent I. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles — Circulating biopsies reflecting placental health. *Placenta.* 2017; 52: 134–8.
33. Hendriks IA, D'Souza RCJ, Yang B, Verlaan-de Vries M, Mann M, Vertegaal ACO. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol.* 2014; 21 (10): 927–36.

34. Hay RT. SUMO. *Molecular Cell*. 2005; 18 (1): 1–12.
35. Baczyk D, Audette MC, Drewlo S, Lewytska K, Kingdom JC. SUMO-4: a novel functional candidate in the human placental protein SUMOylation machinery. *PLoS ONE*. 2017; 12 (5): e0178056.
36. Anderson DB, Wilkinson KA, Henley JM. Protein SUMOylation in neuropathological conditions. *Drug News & Perspectives*. 2009; 22 (5): 255.
37. Bawa-Khalife T, Yeh ETH. SUMO losing balance: SUMO proteases disrupt SUMO homeostasis to facilitate cancer development and progression. *Genes & Cancer*. 2010; 1 (7): 748–52.
38. Baczyk D, Audette MC, Coyaud E, Raught B, Kingdom JC. Spatiotemporal distribution of small ubiquitin-like modifiers during human placental development and in response to oxidative and inflammatory stress: Placental distribution of small ubiquitin-like modifiers. *J Physiol*. 2018; 596 (9): 1587–600.
39. Saitoh H, Hinchev J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275 (9): 6252–8.
40. Hasegawa Y, Yoshida D, Nakamura Y, Sakakibara S. Spatiotemporal distribution of SUMOylation components during mouse brain development: Sumo-ylation during brain development. *J Comp Neurol*. 2014; 522 (13): 3020–36.
41. Chalkiadaki A, Talianidis I. SUMO-dependent compartmentalization in promyelocytic leukemia protein nuclear bodies prevents the access of LRF-1 to chromatin. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25 (12): 5095–105.
42. Snider NT, Omary MB. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15 (3): 163–77.
43. Vassileva MT, Matunis MJ. SUMO modification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24 (9): 3623–32.
44. Vertegaal ACO, Ogg SC, Jaffray E, et al. A Proteomic study of SUMO-2 target proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279 (32): 33791–8.
45. Bhattacharjee J, Alahari S, Sallais J, Tagliaferro A, Post M, Caniggia I. Dynamic regulation of HIF1A stability by SUMO2/3 and SENP3 in the human placenta. *Placenta*. 2016; 40: 8–17.
46. Xu Y, Zuo Y, Zhang H, et al. Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285 (47): 36682–8.
47. Zhou HJ, Xu Z, Wang Z, et al. SUMOylation of VEGFR2 regulates its intracellular trafficking and pathological angiogenesis. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 3303.
48. McCaig D, Lyall F. Hypoxia upregulates GCM1 in human placenta explants. *hypertension in pregnancy*. 2009; 28 (4): 457–72.
49. Kohli S, Hoffmann J, Lochmann F, et al. p45 NF-E2 regulates syncytiotrophoblast differentiation by post-translational GCM1 modifications in human intrauterine growth restriction. *Cell Death Dis*. 2017; 8 (4): e2730–e2730.
50. Chang C-W, Chang G-D, Chen H. A novel cyclic AMP/Epac1/CaMKII signaling cascade promotes GCM1 desumoylation and placental cell fusion. *Molecular and Cellular Biology*. 2011; 31 (18): 3820–31.
51. Luo J, Ashikaga E, Rubin PP, et al. Receptor trafficking and the regulation of synaptic plasticity by SUMO. *Neuromol Med*. 2013; 15 (4): 692–706.
52. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003; 111 (5): 649–58.
53. Redman CWG, Staff AC. Preeclampsia, biomarkers, syncytiotrophoblast stress, and placental capacity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2015; 213 (4): S9.e1–S9.e4.
54. Dymara-Konopka W, Laskowska M, Grywalska E, Hymos A, Błażewicz A, Leszczyńska-Gorzela B. Similar pro- and antiangiogenic profiles close to delivery in different clinical presentations of two pregnancy syndromes: preeclampsia and fetal growth restriction. *IJMS*. 2023; 24 (2): 972.
55. Keikkala E, Vuorela P, Laivuori H, Romppanen J, Heinonen S, Stenman U-H. First trimester hyperglycosylated human chorionic gonadotrophin in serum — a marker of early-onset preeclampsia. *Placenta*. 2013; 34 (11): 1059–65.
56. Morris RK, Bilagi A, Devani P, Kilby MD. Association of serum PAPP-A levels in first trimester with small for gestational age and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis: Systematic review association serum PAPP-A and adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn*. 2017; 37 (3): 253–65.
57. Krantz D, Goetzl L, Simpson JL, et al. Association of extreme first-trimester free human chorionic gonadotropin-β, pregnancy-associated plasma protein A, and nuchal translucency with intrauterine growth restriction and other adverse pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004; 191 (4): 1452–8.