

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТЕОМНЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

П. А. Клименко¹✉, А. В. Лисица², Н. А. Петушкова², Н. Н. Вейко³, С. В. Костюк³, Е. С. Ершова³, М. П. Клименко¹, А. А. Герасимова⁴, О. В. Юсеф¹, С. И. Ващенко¹, М. А. Курцер¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия

³ Институт биологии старения и медицины здорового долголетия с клиникой превентивной медицины ГНЦРФ РНЦХ имени Б. В. Петровского, Москва, Россия

⁴ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

В прегравидарный период для оценки репродуктивного здоровья пациенток используют комплекс мероприятий (биопсию эндометрия, ультразвуковое определение ооцитов, желтого тела, гормонального баланса). Однако они не дают гарантии получения здоровой яйцеклетки. Целью исследования было идентифицировать специфичные для развития беременности белки и определить рДНК в геноме матери и плода в процессе эмбриогенеза. В сплошном проспективном обследовании участвовало 45 пациенток. У 25 пациенток выполнено удаление неразвивающейся беременности. Еще у пяти проведено прерывание беременности из-за тератогенных эффектов. В 15 случаях (контроль) проведен артифициальный аборт. Для определения количества белков у всех обследуемых в процессе операции отбирали ткани хориона и/или эмбриона и децидуальной оболочки, а также кровь из кубитальной вены. Из всех образцов выделяли ДНК методом экстракции органическими растворителями. Число копий рДНК в ДНК определяли методом нерадиоактивной количественной гибридизации NQH, белки в хорионе — с помощью панорамной масс-спектрометрии. При замершей беременности выявлено снижение уровня некоторых специфичных белков беременности — бета-1-гликопротеинов (PSG). Содержание рДНК было одинаково в клетках крови и в клетках децидуальной оболочки одного и того же женского организма. Замершая беременность ассоциирована с выраженным дисбалансом по содержанию рДНК в геноме эмбриона и геноме матери. В большинстве случаев геном эмбриона содержит достоверно меньше копий рДНК, чем геном матери и геномы других эмбрионов, развитие которых не прерывалось самопроизвольно. Таким образом, определение специфических белков в ворсинах хориона и числа копий рДНК в геномах потенциальных родителей с последующим моделированием числа копий рДНК у эмбриона может помочь в определении возможных причин бесплодия у супружеских пар и повысить качество пренатальной диагностики.

Ключевые слова: анембриония, децидуальная оболочка, замершая беременность, рДНК, тератогенный эффект, ЭКО, эмбрион, масс-спектрометрия

Финансирование: работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100170-5).

Благодарности: масс-спектрометрические измерения выполняли на оборудовании ЦКП «Протеом человека» Института биомедицинской химии (Россия).

Вклад авторов: равнозначный.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 228 от 17 апреля 2023 г.). Все обследованные подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Петр Афанасьевич Клименко
ул. Новаторов, д. 3, г. Москва, 119421, Россия; klimenko_pa@rsmu.ru

Статья получена: 08.12.2025 **Статья принята к печати:** 19.01.2026 **Опубликована онлайн:** 28.01.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.002

Авторские права: © 2026 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

COMPARATIVE PROTEOMIC AND GENETIC TESTING METHODS IN MISCARRIAGE

Klimenko PA¹✉, Lisitsa AV², Petushkova NA², Beiko NN³, Kostyuk SV³, Ershova ES³, Klimenko MP¹, Gerasimova AA⁴, Yusef OV¹, Vaschenko SI¹, Kurtser MA¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

³ Institute of Biology of Aging and Healthy Longevity Medicine with a Clinic of Preventive Medicine, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

⁴ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Biopsy is used for the diagnosis when treating miscarriage. However, it does not guarantee that a healthy oocyte will be acquired. The study aimed to identify proteins that are specific for pregnancy development and determine rDNA in the maternal and fetal genomes during embryogenesis. A total of 45 patients took part in the continuous prospective survey. Non-viable pregnancy was terminated in 25 patients. Another five underwent abortion due to teratogenic effects. Artificial abortion was performed in 15 cases (controls). To quantify proteins, tissues of the chorion and/or embryo and the decidua were collected from all the assessed individuals during surgery, along with blood from the cubital vein. DNA was isolated from all samples by the extraction method involving the use of organic solvents. The rDNA copy number in the DNA was determined by non-radioactive quantitative hybridization (NQH), and the chorion proteins were determined by panoramic mass spectrometry. In individuals with frozen pregnancy, decreased levels of some proteins specific for pregnancy, beta-1-glycoproteins (PSG), were revealed. The rDNA content was the same in blood cells and decidual cells of the same woman. Frozen pregnancy is associated with severe imbalance of the rDNA content in the embryonic and maternal genomes. In most cases, there are significantly less rDNA copies in the embryonic genome, than in the maternal genome and genomes of other embryos, the development of which has not been spontaneously interrupted. Thus, determination of specific proteins in chorionic villi and the rDNA copy number in the potential parents' genomes with subsequent rDNA copy number modeling in the embryo can help determine possible causes of infertility in married couples and improve the prenatal diagnosis quality.

Keywords: anembryony, decidua, frozen pregnancy, rDNA, teratogenic effect, IVF, embryo, mass spectrometry

Funding: the study was conducted as part of the Program for Basic Research in the Russian Federation for the Long Term (2021–2030) (No. 122030100170-5).

Acknowledgements: mass spectrometry measurements were conducted using the equipment of the Human Proteome SRF of the Institute of Biomedical Chemistry (Russia).

Author contribution: equally.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 228 dated 17 April 2023). All the surveyed individuals submitted the informed consent to take part in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Pyotr A. Klimenko
Novatorov, 3, Moscow, 119421, Russia; klimenko_pa@rsmu.ru

Received: 08.12.2025 **Accepted:** 19.01.2026 **Published online:** 28.01.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.002

Copyright: © 2026 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

По некоторым данным, выкидыши в первом триместре чаще всего являются следствием естественного отбора, число эмбрионов с хромосомными аномалиями достигает 60–80% [1]. У пациенток с привычным невынашиванием структурные аномалии кариотипа встречаются в 10 раз чаще, чем в популяции, и составляют 2,4%. В стандартный набор кариотипирования эмбриона входит определение синдрома Дауна, Патау, Эдвардса, Тернера, Клайнфельтера. При наличии в анамнезе у пациентов более двух самопроизвольных абортов проводят медико-генетическое консультирование, которое включает цитогенетическое исследование супругов с объяснениями, что найдено в гениалогии и цитогенетике, оценку степени риска для последующих рождений ребенка с аномалиями развития, разъяснения о необходимости пренатальной диагностики (в том числе исследование хориона), а в тяжелых случаях использование донорских клеток. Во всех случаях мертворождения необходимы цитогенетическое исследование эмбриона, хориона, определение транслокаций у родителей.

Отбор хорионических ворсин в пренатальном тесте, который включает взятие образца ткани из плаценты для кариотипирования и выявления специфических генетических или биохимических отклонений у нерожденного ребенка, используют наиболее часто в акушерской практике [2]. Согласно анализу транскриптома, 65% ($n = 13\ 074$) всех белков человека ($n = 20\ 090$) экспрессируются в плаценте, и 288 из этих генов показывают повышенную экспрессию в плаценте по сравнению с другими типами тканей. В отличие от традиционных биохимических подходов, в которых отслеживают один или несколько конкретных белков, протеомика, в частности LC-MS/MS, является эффективным методом для распознавания измененной экспрессии белков, а также белков, участвующих в патогенезе заболеваний. В последние годы достигнуты большие успехи в масс-спектрометрической идентификации дифференциально регулируемых белков, биомаркеров, модификации белков и полиморфизмов в различных тканях человека и так называемых «отсутствующих белков» [3].

Отсутствующий белок — это неподтвержденная генетическая последовательность, для которой белок еще не обнаружен [4]. Согласно международному проекту Human Proteome Project (HUPO), в настоящее время имеется 1343 отсутствующих белка без аннотированной функции, предсказанной биоинформатическим анализом или экспериментально изученной. Сложность обнаружения отсутствующих белков может быть связана не только с их низкой распространенностью во многих тканях, но и с их экспрессией только в нескольких типах клеток в человеческом организме.

Рибосомные гены кодируют рибосомные РНК (18S, 28S и 5,8S рРНК), входящие в состав белоксинтезирующих органелл цитоплазмы — рибосом, и собраны в рибосомном повторе (рДНК), представленном в геномах эукариот большим числом копий. Количество повторов рДНК в диплоидных геномах человека варьирует в пределах 200–711 копий [5]. Кластеры tandemных повторов рДНК разного размера локализованы в коротких плечах пяти пар акроцентрических хромосом и формируют ядрышкообразующие районы (ЯОР) хромосом. Количество копий рДНК у человека (параметр R) задается комбинацией пяти пар родительских акроцентрических хромосом. Все копии рДНК в клетке делятся на потенциально активные и неактивные. Как правило, количество активных копий

рДНК пропорционально количеству неактивных копий и составляет примерно 30–40% от общего числа копий. Чем больше в геноме копий рДНК, тем больше и активных копий, которые транскрибируются и обеспечивают нужное количество рРНК для биогенеза рибосом [6].

Ранее было показано, что уровень биогенеза рибосом, который зависит от числа копий рДНК в геноме, может влиять на процессы зачатия и течения беременности. Анализ доли нежизнеспособных зигот в выборках супружеских пар с нормальной плодовитостью, с бесплодием и с невынашиванием показал, что зиготические потери в выборке здоровых пар значимо ниже, чем в выборках с репродуктивными нарушениями. Следовательно, зиготический отбор по геномной дозе активных копий рДНК может быть в числе факторов, определяющих репродуктивные нарушения у некоторых пар. Иными словами, очень низкое и очень высокое содержание рДНК в геноме эмбриона потенциально может препятствовать нормальному процессу эмбриогенеза [7]. Другое исследование показало, что при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) успешность процедуры зависит от общего числа копий рДНК в геноме женщины [8]. Женщины с низким количеством копий рДНК имели меньшие шансы для наступления беременности при процедуре ЭКО. Одна из гипотез, объясняющая этот факт, предполагала, что женщины с низким числом копий рДНК передают эмбриону более низкое их число, которого недостаточно для успешного эмбриогенеза.

Таким образом, уровень и наличие либо отсутствие специфических протеомов в хорионе должны соответствовать определенному количеству различных форм ДНК в составе внеклеточной ДНК.

Цель исследования — идентифицировать малораспространенные белки и определить рДНК в геноме матери и плода в процессе эмбриогенеза.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В период с мая по июль 2023 г. на базе ГБУЗ Центр планирования семьи и репродукции ДЗМ выполнено сплошное проспективное исследование пациенток с невынашиванием. Исключали наблюдения, в которых не удалось получить все три биологические среды за первые 3 ч. Критерии включения: неразвивающаяся беременность неясного генеза; тератогенный эффект; прерывание беременности (аборт) по собственному желанию. Критерии исключения: другие акушерские осложнения.

В исследование вошли 45 пациенток, которые были разделены на три группы. 25 (группа I) пациенток были госпитализированы по поводу неразвивающейся беременности сроком 5–13 недель. У пяти из них была зарегистрирована анэмбриония, у остальных 20 — неразвивающаяся беременность неясного генеза, кроме того у этих пациенток при УЗИ обнаружено несоответствие антропометрических данных мертвых эмбрионов с гестационным возрастом (в малых сроках отсутствовало сердцебиение, а при сроках свыше 7 недель выявлено снижение копчиково-теменного размера на 3–5 недель). У пяти пациенток (группа II) было проведено прерывание беременности после консультации с генетиком и проведения консилиума по медицинским показаниям (тератогенные эффекты) на сроке 13–21 неделя. Контрольной группой (группа III) служили 15 здоровых пациенток, у которых не было проблем с репродуктивной функцией, сделавших

искусственное прерывание беременности по собственному желанию (артифициальный аборт) на сроке 8–11 недель.

У всех обследуемых в процессе операции отбирали ткань хориона и/или эмбриона (образец Э) и ткань децидуальной оболочки (образец Д). Кроме того, перед операцией у женщин брали кровь из кубитальной вены (образец К).

Белки хориона пациенток при замершей беременности и после артифициальных абортов исследовали с помощью tandemной масс-спектрометрии с электроспреевой ионизацией (LC-MS/MS), как описано ранее [9]. Протопоготовка ворсин хориона для последующего протеомного анализа включала экстракцию белков с помощью лизирующего буфера на основе 2% SDS (додецилсульфат натрия), обработку ультразвуком, процедуру 1DE-гель концентрирования для удаления SDS [9]. Содержание белка в экстрактах ворсин хориона определяли с помощью бицинхониновой кислоты в качестве стандарта [10].

Восстановление, алкилирование с йодацетамидом и триптический гидролиз в геле проводили, как описано ранее [11]. Смесь пептидов анализировали с использованием хроматографической системы Ultimate 3000 nano-flow HPLC (Dionex, США), интегрированной с масс-спектрометром Orbitrap Q Exactive HF (Thermo Scientific, США) и с источником электростатической ионизации Nanospray Flex ion source (Thermo Scientific, США) [9].

Масс-спектры в формате «.raw» конвертировали в соответствующие mgf-файлы с помощью программы ProteoWizard MS Convert v. 3.0.6867 (<http://proteowizard.sourceforge.net>). Файлы были импортированы в платформу SearchGUI (v. 3.3.17) [12] и проанализированы с помощью поисковых алгоритмов X!Tandem и MS-GF+ по базе данных SwissProt (v. 2.22.2022, формат FASTA) для вида *Homo sapiens*. Поиск проводили по базе данных инвертированных и случайных последовательностей аминокислот (decoy). Интегратор PeptideShaker [13] использовали для получения файлов электронных таблиц Excel с результатами идентификации белков.

Для определения относительного содержания белков, идентифицированных в хорионе, использовали нормированный спектральный количественный фактор NSAF, обладающий высокой воспроизводимостью [14].

Из образцов К, Э и Д выделяли ДНК методом экстракции органическими растворителями. Раствор, содержащий 0,04 М ЭДТА, 2% лаурилсаркозилата натрия и 150 мкг/мл РНКазы А (Sigma, США), добавляли к образцам на 45 мин при 37 °С, обрабатывали протеиназой К (200 мкг/мл, Promega, США) в течение 24 ч при 37 °С, экстрагировали равными объемами смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25 : 24 : 1), фенола и смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24 : 1). ДНК осаждали добавлением 1/10 объема 3 М ацетата натрия (рН 5,2) и 2,5 объемов ледяного этилового спирта. Фенол стабилизировали 8-гидроксихинолином. ДНК собирали путем центрифугирования при 10 000 G в течение 15 мин при 4 °С, промывали 70%-м этанолом (об./об.), высушивали и растворяли в воде.

Определение копийности рибосомных генов: в ДНК определяли число копий рДНК методом нерадиоактивной количественной гибридизации NQN [5]. Для выявления рДНК человека (образец GenBank № U13369) использовали смесь зондов к рДНК олиго(18S) биотин-CTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTCCACCTAC и олиго (28S) биотин-TATCGGTCTCGTGCCGGTATTAGCCTTAG.

Денатурированную ДНК наносили на фильтр (Optitran BA-S85, GE Healthcare, США) в количестве 4–6 точек на каждый образец. Стандартные образцы геномной ДНК (50 нг/мл) с известным содержанием рДНК наносили на тот же фильтр, чтобы построить калибровочную кривую зависимости интенсивности сигнала от числа копий рДНК. ДНК фага лямбда (50 нг/мл) также наносили на тот же фильтр, чтобы контролировать уровень шума. Затем фильтр прогревали при 80 °С в вакууме в течение 1,5 ч. После завершения гибридизации мембранный фильтр обрабатывали конъюгатом стрептавидина с щелочной фосфатазой (Sigma, США) и помещали в раствор субстратов для щелочной фосфатазы (бром-хлор-индолил-фосфат/нитро-блю-тетразолиум, BCIP/NBT). Затем фильтр промывали водой, высушивали в темноте и сканировали. Для количественного определения рДНК использовали программу «Imager 6», позволяющую вычислять интегральную интенсивность сигнала от каждой точки. Сигналы от всех точек, соответствующих одному и тому же образцу, суммировали и вычисляли среднее арифметическое и среднеквадратическую ошибку каждого образца.

Принципы расчета размера выборки не применяли. Методы статистического анализа данных: описательная статистика для количественных переменных представлена в формате среднего, медиан и разброса значений. Сравнение выборок попарно проводили с помощью рангового критерия Манна–Уитни (*U*-критерий) (*p*). Этот критерий наиболее соответствует нашей задаче, в связи с небольшим размером выборок в исследовании, при этом критерий допустимо применять при сравнении двух групп при наличии в каждой не менее трех разных значений признака. Для расчета применили программу StatPlus2007 (<http://www.analystsoft.com/>). Различия признавали статистически значимыми при *p* < 0,05. При прогнозировании замершей беременности у пациенток использовали количество копий рДНК в геноме эмбрионов. В связи с тем что размер выборки был ограничен, наши результаты носят предварительный и описательный характер.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бесплодие стало глобальной проблемой здравоохранения: число людей, страдающих от этого заболевания, растет с каждым годом. Процедура ЭКО открывает большие перспективы для лечения бесплодия. Однако регуляция раннего эмбрионального развития сложна, и в ней происходит ряд процессов, в том числе переход от матери к зиготе. Раннее эмбриональное развитие человека могут осложнять геномные ошибки, возникающие после оплодотворения. Ядерные аномалии, встречающиеся у эмбрионов человека, особенно полученных в результате ЭКО, связаны с повреждением ДНК, анеуплоидией и снижением потенциала развития. Во время раннего эмбрионального развития транскрипция и экспрессия определенных генов в зародыше претерпевают ряд изменений [15].

Сравнительный протеомный анализ

Многокопийные гены, кодирующие рРНК рибосом (рДНК), определяют биогенез рибосом, а значит, и уровень биосинтеза белка в организме, особенно на ранних стадиях эмбрионального развития [16, 17]. Сравнительный протеомный анализ может дать новое представление

Таблица 1. Специфические для беременности гликопротеины (PSG), выявленные в ворсинах хориона человека с помощью панорамной масс-спектрометрии (LC-MS/MS)

##	Идентификатор белка в базе знаний UniProt	Название гена	Название белка	Биологический процесс	Значение NSAF	
					Артифициальный аборт	Замершая беременность
1	Q00887	<i>PSG9</i>	Трофобластический бета-1-гликопротеин 9	Процесс в иммунной системе (GO:0002376)	0,0099	0,0051
2	Q9UQ74	<i>PSG8</i>	Трофобластический бета-1-гликопротеин 8	Процесс в иммунной системе (GO:0002376)	0,0053	не опр.
3	Q13046	<i>PSG7</i>	Трофобластический бета-1-гликопротеин 7	Репродуктивный процесс (GO:0022414)	0,0054	не опр.
4	Q00889	<i>PSG6</i>	Трофобластический бета-1-гликопротеин 6	Процесс в иммунной системе (GO:0002376)	0,0051	0,0058
				Репродуктивный процесс (GO:0022414)		
5	Q15238	<i>PSG5</i>	Трофобластический бета-1-гликопротеин 5	Клеточная адгезия (GO:0007155)	0,0129	0,0094
				Репродуктивный процесс (GO:0022414)		
6	Q00888	<i>PSG4</i>	Трофобластический бета-1-гликопротеин 4	Процесс в иммунной системе (GO:0002376)	0,0159	не опр.
				Репродуктивный процесс (GO:0022414)		
7	Q16557	<i>PSG3</i>	Трофобластический бета-1-гликопротеин 3	Процесс в иммунной системе (GO:0002376)	0,0132	0,0079
				Репродуктивный процесс (GO:0022414)		
8	P11465	<i>PSG2</i>	Трофобластический бета-1-гликопротеин 2	Клеточная адгезия (GO:0007155)	0,0146	0,0087
				Репродуктивный процесс (GO:0022414)		
9	Q9UQ72	<i>PSG11</i>	Трофобластический бета-1-гликопротеин 11	Клеточная адгезия (GO:0007155)	0,0108	0,0089
				Репродуктивный процесс (GO:0022414)		
10	P11464	<i>PSG1</i>	Трофобластический бета-1-гликопротеин 1	Процесс в иммунной системе (GO:0002376)	0,0072	0,0064
				Репродуктивный процесс (GO:0022414)		

Примечание: NSAF — нормированный спектральный количественный фактор, отражающий содержание белка.

о биологических путях, лежащих в основе патогенеза самопроизвольного выкидыша. Поэтому на первом этапе исследования методом панорамной масс-спектрометрии нами была проведена оценка изменений белкового профиля хориона человека при замершей беременности. Среди идентифицированных белков были выявлены гликопротеины, специфичные для беременности (PSG; табл. 1). PSG человека представляют собой группу молекул, почти исключительно экспрессируемых плацентарными трофобластами (ворсинами хориона) во время беременности. Десять кодирующих белок и тесно связанных генов PSG человека (PSG1–PSG9 и PSG11) образуют подгруппу семейства генов карциноэмбриональных антигенов CEA [18] (<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/placenta>), важного опухолевого маркера для колоректальных и некоторых других карцином [19]. Нам удалось идентифицировать всех членов подгруппы семейства CEA (табл. 1). Кроме того, при замершей беременности обнаружено заметное снижение содержания (оцененное по значениям NSAF) таких гликопротеинов, как PSG3 и PSG2, гликопротеины PSG7 и PSG4 не были детектированы в ткани хориона. Снижение PSG7 во время пренатального развития может приводить к потере беременности [20, 21]. Таким

образом, наши данные о том, что низкие уровни PSG связаны с плохими исходами беременности, согласуются с результатами других авторов [18].

Кроме того, в образцах хориона после абортов выявлена альфа-L-фукозидаза, которая играет важную роль в адгезии клеток во время прикрепления и отсоединения плодных оболочек [22]. Мы также обнаружили снижение экспрессии белка ретикулон-4 (RTN4) при гибели эмбрионов, который участвует в процессе апоптоза (GO: 0006915). Дефицит RTN4 может привести к таким фенотипам, как «аномальная морфология слоя трофобласта», «задержка роста эмбриона», «уменьшение размера плода» и «эмбриональная летальность» [23].

При гибели эмбрионов в образцах хориона белки PSG8, PSG7, PSG4 не определялись, Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 6 (Q00889, *PSG6*) отличался очень низким содержанием по отношению к контролю (табл. 1).

Кроме того, при замершей беременности в ворсинах хориона мы обнаружили снижение по сравнению с контрольными образцами хориона содержания таких белков, как Coactosin-like protein (*COTL1*), Protein capony homolog 2 (*CNPY2*), Sideroflexin-3 (*SFXN3*), Prohibitin-2 (*PHB2*) и Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (*HAPLN1*). Например, *HAPLN1* необходим для образования агрегатов

Таблица 2. Описательная статистика для параметра R

Тип ткани	Параметры	Группа I (n = 25)	Группа II (n = 5)	Группа III (n = 15)
Периферическая кровь матери	Среднее арифметическое	417 ± 88	373 ± 183	425 ± 78
	Интервал	322–629	191–713	314–612
	Медиана	398	442	412
Ткань эмбриона	Среднее арифметическое	373 ± 183	363 ± 82	468 ± 134
	Интервал	191–713	242–436	295–723
	Медиана	261	401	478
Децидуальная оболочка	Среднее арифметическое	405 ± 92	434 ± 36	422 ± 70
	Интервал	204–595	379–473	318–580
	Медиана	405	445	409

Примечание: данные представлены в виде значений медиан (min–max); описательная статистика для количественных переменных представлена в формате среднего арифметического и стандартного отклонения — M (SD); образец К — кровь из кубитальной вены пациентки; образец Э — ткань эмбриона; образец Д — ткань децидуальной оболочки.

хрящевых протеогликанов, имеющих широкий спектр биологических функций. Отсутствие HARLN1 приводит к перинатальной летальности, сопровождающейся тяжелой хондродисплазией [24] и пороками развития сердца [25].

Таким образом, сравнительный протеомный анализ позволил установить перечень низкопредставленных специфичных для развития беременности белков, характеризующихся значительными изменениями содержания (снижение и/или отсутствие) в раннем эмбриональном развитии при самопроизвольном выкидыше.

Генетические исследования

Как известно, уровень биосинтеза белка в организме определяется биогенезом рибосом, многокопийными генами, кодирующими рРНК рибосом (рДНК), что является одной из характеристик адаптационных возможностей человека. В связи с этим на следующем этапе проводили определение рДНК в геноме матери и плода в процессе эмбриогенеза. В табл. 2 представлены экспериментальные данные, отражающие число копий рДНК (параметр R) в ДНК лейкоцитов крови, децидуальной оболочки и в ДНК эмбрионов.

Группа I (рисунок) — неразвивающаяся беременность (№ 1–25) или предполагаемое (визуально) отсутствие эмбриона (№ 20–25). Образцы ДНК, выделенной из клеток крови и из ткани Д одной и той же женщины, не различались по содержанию рДНК ($p > 0,05$). Этот факт подтверждает ранее полученные данные об одинаковом содержании рДНК в различных тканях одного и того же организма [26].

Геномы эмбрионов (ткань Э) значительно отличались от геномов матерей (ткани К и Д) по числу копий рДНК. Интересно отметить, что отличия были зафиксированы для пяти случаев (№ 20–25), когда визуально эмбрион не определялся. По-видимому, остановка деления клеток произошла на раннем сроке беременности. Среди материнских клеток, скорее всего, присутствуют и клетки другого организма. Возможно, содержание рДНК в этих клетках еще более низкое.

По соотношению содержания рДНК в геноме эмбриона и в клетках матери все эмбрионы в группе I четко разделились на две подгруппы. В подгруппе Ia ($n = 20$) параметр R(Э) был в 1,4–3,3 раза ниже (среднее — 1,7 раза; $p < 0,001$), чем R(К или Д). В подгруппе Ib ($n = 5$) параметр R(Э) был в 1,7–2 раза выше (среднее — 1,8 раза; $p = 0,02$), чем R(К). Таким образом, остановка эмбриогенеза ассоциирована либо со слишком низким, либо со слишком высоким

содержанием рДНК в геноме эмбриона по сравнению с геномом женщины.

Группа II — прерывание беременности по медицинским показаниям (энцефалоцеле, признаки рудиментарного поражения нижней конечности, ЦНС-акrania, синдром Эдвардса и сращение легочной артерии и аорты у плода). В этой группе геном у 4 эмбрионов содержал больше копий рДНК, чем в группе Ia ($p = 0,01$). Различия между группами IIК и IIЭ были недостоверны. Только один образец ДНК эмбриона отличался от ДНК лейкоцитов женщины более низким содержанием рДНК.

Для групп здоровой и замершей беременности наиболее значимые результаты получены только для эмбрионов (рисунок), при этом пороговое значение повторов рДНК составляло 322, при более низких значениях рДНК в наших наблюдениях происходила гибель эмбрионов.

Анализ изложенных данных позволяет сделать следующие выводы

В тканях хориона при гибели эмбрионов происходят глубокие нарушения состава белка и наличия генов, участвующих в развитии беременности. Так, низкие уровни PSG были связаны с плохими исходами беременности. В частности, в хорионе при замершей беременности не был зафиксирован специфический для беременности бета-1-гликопротеин 7 (PSG7), снижение которого во время пренатального развития может приводить к потере беременности.

Мы также обнаружили снижение экспрессии белка ретикуллона-4 (RTN4) при гибели эмбрионов, который участвует в процессе апоптоза (GO: 0006915). Дефицит RTN4 может привести к таким фенотипам, как «аномальная морфология слоя трофобласта», «задержка роста эмбриона», «уменьшение размера плода» и «эмбриональная летальность» [23].

Содержание рДНК одинаково в клетках крови и в клетках децидуальной оболочки одного и того же женского организма.

Определены пороговые значения повторов рДНК в тканях эмбрионов (322), после снижения которых происходило прерывание беременности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Замершая беременность ассоциирована с выраженным дисбалансом по содержанию рДНК в геномах эмбриона и матери. В большинстве случаев геном эмбриона содержит достоверно меньше копий рДНК, чем геном

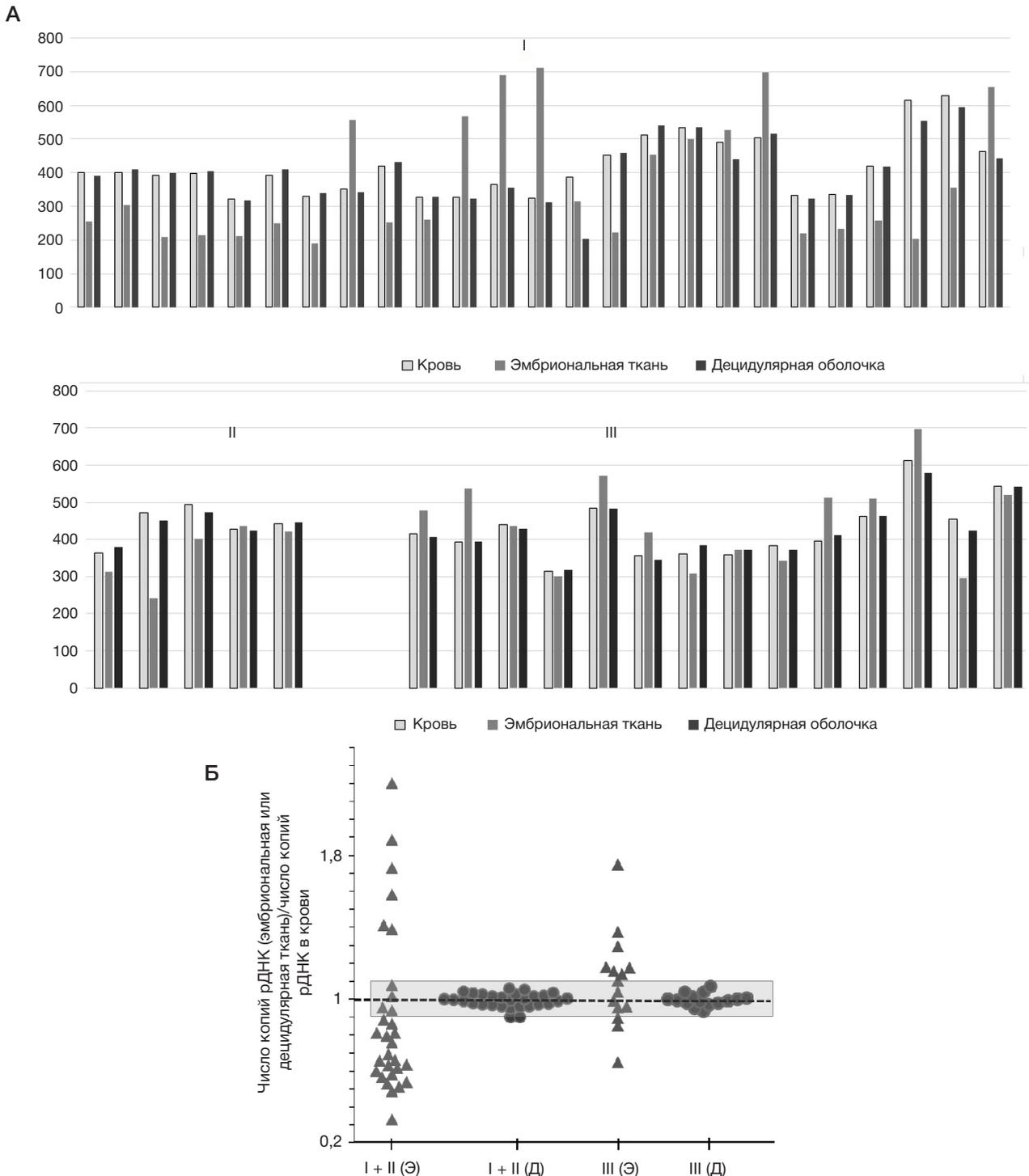


Рис. Число копий рДНК в ДНК, выделенной из трех типов клеток в группах I–III. **А.** Приводится среднее значение числа копий в образце ДНК ($n = 3$) и ошибка измерения. **Б.** Изменения в числе копий рДНК в эмбриональной (Э) и децидулярной (Д) тканях по отношению к содержанию рДНК в лейкоцитах крови

матери и геномы других эмбрионов, развитие которых не прерывалось самопроизвольно. Очень низкое содержание рДНК в геноме, по-видимому, ассоциировано с низким количеством рибосом, что не может обеспечить приемлемый для развития конкретно данного эмбриона уровень синтеза белка. Ранее было показано, что низкое число копий рДНК в геноме человека (менее 300 копий) ассоциировано с более низкой продолжительностью жизни и с развитием деменции в пожилом возрасте [7, 27]. Моногенное заболевание муковисцидоз, вызванное мутацией в гене *CFTR*, ассоциировано с большим количеством копий рДНК в геноме больного.

Мультифакториальное заболевание шизофрения также ассоциировано с увеличенным уровнем рДНК в геноме больного [27, 28]. По-видимому, малое количество рДНК в геноме не позволяет реализоваться геному с генетической патологией, эмбриогенез останавливается на ранней стадии. Только пять хромосом в геноме человека содержат рДНК, кодирующую рибосомную РНК, из которой при участии определенных белков собирается рибосома — молекулярная машина, синтезирующая все белки нашего организма [17, 29]. Очень высокое содержание рДНК в геноме эмбриона по сравнению с материнским геномом также негативно сказывается на процессе эмбриогенеза.

Возможны два объяснения этому факту. Во-первых, высокий уровень биогенеза рибосом, обусловленный большим количеством копий рДНК в геноме эмбриона, требует от материнского организма большого количества питательных веществ. Если геном матери содержит низкое количество копий рДНК, то он не сможет реализовать потребности эмбриона. Во-вторых, геномы с большим числом копий рДНК могут содержать мутации, которые блокируют эмбриогенез на более поздних стадиях, но позволяют развиваться зародышу на ранней стадии. Геномы с малым количеством рДНК и наличием этой генетической патологии отторгаются уже на ранней стадии эмбриогенеза.

ВЫВОДЫ

Определение содержания бета-1-гликопротеинов, специфичных для беременности PSG8 (Pregnancy-

specific beta-1-glycoprotein 8), PSG7 (Putative pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 7), PSG6 (Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 6) и PSG4 (Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 4), может быть полезным для пренатальной прогнозирования развития беременности. Неразвивающаяся беременность в большинстве случаев (в 16 из 20 исследованных) ассоциирована с низким содержанием рДНК в ДНК эмбриона по сравнению с контрольной группой (нормальная беременность). Низкий показатель R отражает неспособность клеток обеспечить приемлемый для развития эмбриона уровень биогенеза рибосом. Определение специфических белков в ворсинках хориона и числа копий рДНК в геномах потенциальных родителей с последующим моделированием числа копий рДНК у эмбриона может помочь в установлении причин бесплодия у супружеских пар и прогнозировании развития существующей беременности.

Литература

1. Сидельникова В. М. Привычная потеря беременности. М.: Триада-Х, 2002; 32 с.
2. Tarrade A, Lai Kuen R, Malassiné A, et al. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest.* 2001; 81 (9): 1199–211. Available from: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780334>.
3. Elguoshy A, Magdeldin S, Xu B, et al. Why are they missing? Bioinformatics characterization of missing human proteins. *J Proteomics.* 2016; 149: 7–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.005>.
4. Zhou L, Wong L, Wen Bin Goh W. Understanding missing proteins: a functional perspective. *Drug Discov Today.* 2018; 23 (3): 644–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.011>.
5. Malinovskaya E, Ershova E, Golimbet V, et al. Copy number of human ribosomal genes with aging: unchanged mean, but narrowed range and decreased variance in elderly group. *Front Genet.* 2018; 9: 306. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00306>.
6. Лягунова Н. А., Вейко Н. Н. Рибосомные гены в геноме человека: идентификация четырех фракций, их локализация в ядрышке и метафазных хромосомах. *Генетика.* 2010; 46 (9): 1205–9.
7. Пороховник Л. Н., Еголина Н. А., Косякова Н. В., и др. Зиготический и эмбриональный отбор по геномной дозе активных рибосомных генов как один из возможных факторов сниженной плодovitости супружеских пар. *Медицинская генетика.* 2012; 11 (6): 31–4.
8. Veiko N, Ershova E, Porokhovnik L, et al. Ribosomal, telomere, and mitochondrial repeat copy number variations in female genomes during ovarian stimulation and the prediction of in vitro fertilization outcome: a pilot study. *Front Biosci (Schol Ed).* 2023; 15 (3): 9. Available from: <https://doi.org/10.31083/j.fbs1503009>.
9. Shkrigunov T, Pogodin P, Zgoda V, et al. Protocol for Increasing the Sensitivity of MS-Based Protein Detection in Human Chorionic Villi. *Curr Issues Mol Biol.* 2022; 44 (5): 2069–88. Available from: <https://doi.org/10.3390/cimb44050140>.
10. Smith P, Krohn R, Hermanson G, et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid Anal Biochem. 1985; 150 (1): 76–85. Available from: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
11. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 2006; 1 (6): 2856–60. Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>.
12. Vaudel M, Barsnes H, Berven F, et al. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. *Proteomics.* 2011; 11 (5): 996–9. Available from: <https://doi.org/10.1002/pmic.201000595>.
13. Vaudel M, Burkhart J, Zahedi R, et al. PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. *Nat Biotechnol.* 2015; 33 (1): 22–4. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt.3109>.
14. Neilson K, Keighley T, Pascovici D, et al. Label-free quantitative shotgun proteomics using normalized spectral abundance factors. *Methods Mol Biol.* 2013; 1002: 205–22. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-360-2_17.
15. Godini R, Fallahi H. Dynamics changes in the transcription factors during early human embryonic development. *J Cell Physiol.* 2019; 234 (5): 6489–502. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.27386>.
16. Пороховник Л. Н., Вейко Н. Н., Ершова Е. С., и др. Копийность рибосомной ДНК (рДНК) в геномах женщин как фактор успешности ЭКО и наличия осложнений беременности. *Медицинская генетика.* 2019; 18 (11): 14–25. Available from: <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.11.14-25>.
17. Liao C, Pang N, Liu Z, et al. Transient inhibition of rDNA transcription in donor cells improves biogenesis and preimplantation development of embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *FASEB J.* 2020; 34 (6): 8283–95. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.202000025RR>.
18. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9 (2): 67–81. Available from: <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0119>.
19. An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders: PREGNANCY-SPECIFIC BETA-1-GLYCOPROTEIN 11; PSG11. Available from: <https://omim.org/entry/176401>.
20. Su X, Zhang J, Yang W, et al. Identification of the Prognosis-Related lncRNAs and Genes in Gastric Cancer. *Front Genet.* 2020; 11: 22. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00027>.
21. Khan W, Hammarström S. Identification of a new carcinoembryonic antigen (CEA) family member in human fetal liver—cloning and sequence determination of pregnancy-specific glycoprotein 7. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 168 (1): 214–25. Available from: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)91696-p](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)91696-p).
22. Jamioł M, Wawrzykowski J, Mojsym W, et al. Activity of selected glycosidases and availability of their substrates in bovine placenta during pregnancy and parturition with and without retained foetal membranes. *Reprod Domest Anim.* 2020; 55 (9): 1093–102. Available from: <https://doi.org/10.1111/rda.13747>.
23. Sui L, An L, Tan K, et al. Dynamic Proteomic Profiles of In Vivo- and In Vitro-Produced Mouse Postimplantation Extraembryonic Tissues and Placentas. *Biol Reprod.* 2014; 91 (155): 1–16. Available from: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124248>.
24. Watanabe N, Kato T, Fujita A, et al. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol.* 1999; 1 (3): 136–43. Available from: <https://doi.org/10.1038/11056>.
25. Wirrig E, Snarr B, Chintalapudi M, et al. Cartilage link protein 1 (Crtl1), an extracellular matrix component playing an important role in heart development. *Dev Biol.* 2007; 310 (2): 291–303. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.041>.
26. Veiko N, Ershova S, Veiko R, et al. Mild cognitive impairment

is associated with low copy number of ribosomal genes in the genomes of elderly people. *Front Genet.* 2022; 13: 967448. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.967448>.

27. Ershova E, Malinovskaya E, Golimbet V, et al. Copy number variations of satellite III (1q12) and ribosomal repeats in health and schizophrenia. *Schizophr Res.* 2020; 223: 199–212. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.07.022>.

References

- Sidelnikova VM. Privychnaya poterya beremennosti. M.: Triada-H, 2002; 32 s. Russian.
- Tarrade A, Lai Kuen R, Malassiné A, et al. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest.* 2001; 81 (9): 1199–211. Available from: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780334>.
- Elguoshy A, Magdeldin S, Xu B, et al. Why are they missing? Bioinformatics characterization of missing human proteins. *J Proteomics.* 2016; 149: 7–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.005>.
- Zhou L, Wong L, Wen Bin Goh W. Understanding missing proteins: a functional perspective. *Drug Discov Today.* 2018; 23 (3): 644–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.011>.
- Malinovskaya E, Ershova E, Golimbet V, et al. Copy number of human ribosomal genes with aging: unchanged mean, but narrowed range and decreased variance in elderly group. *Front Genet.* 2018; 9: 306. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00306>.
- Lyapunova NA, Veiko NN. Ribosomnye geny v genome cheloveka: identifikaciya chetyrekh frakcij, ih lokalizaciya v yadryshke i metafaznyh hromosomah. *Genetika.* 2010; 46 (9): 1205–9.
- Porohovnik LN, Egolina NA, Kosyakova NV, i dr. Zigoticheskij i embrional'nyj otbor po genomnoj doze aktivnyh ribosomnyh genov kak odin iz vozmozhnyh faktorov snizhennoj plodovitosti supruzheskih par. *Medicinskaya genetika.* 2012; 11 (6): 31–4. Russian.
- Veiko N, Ershova E, Porokhovnik L, et al. Ribosomal, telomere, and mitochondrial repeat copy number variations in female genomes during ovarian stimulation and the prediction of in vitro fertilization outcome: a pilot study. *Front Biosci (Schol Ed).* 2023; 15 (3): 9. Available from: <https://doi.org/10.31083/j.fbs1503009>.
- Shkrigunov T, Pogodin P, Zgoda V, et al. Protocol for Increasing the Sensitivity of MS-Based Protein Detection in Human Chorionic Villi. *Curr Issues Mol Biol.* 2022; 44 (5): 2069–88. Available from: <https://doi.org/10.3390/cimb44050140>.
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid Anal Biochem. 1985; 150 (1): 76–85. Available from: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 2006; 1 (6): 2856–60. Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>.
- Vaudel M, Barsnes H, Berven F, et al. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. *Proteomics.* 2011; 11 (5): 996–9. Available from: <https://doi.org/10.1002/pmic.201000595>.
- Vaudel M, Burkhardt J, Zahedi R, et al. PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. *Nat Biotechnol.* 2015; 33 (1): 22–4. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt.3109>.
- Neilson K, Keighley T, Pascovici D, et al. Label-free quantitative shotgun proteomics using normalized spectral abundance factors. *Methods Mol Biol.* 2013; 1002: 205–22. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-360-2_17.
- Godini R, Fallahi H. Dynamics changes in the transcription factors during early human embryonic development. *J Cell Physiol.* 2019; 234 (5): 6489–502. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.27386>.
- Porohovnik LN, Veiko NN, Ershova ES, i dr. Kopijnost' ribosomnoj DNK (rDNK) v genomah zhenshchin kak faktor uspešnosti EKO i nalichiya oslozhnenij beremennosti. *Medicinskaya genetika.* 2019; 18 (11): 14–25. Available from: <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.11.14-25>. Russian.
- Liao C, Pang N, Liu Z, et al. Transient inhibition of rDNA transcription in donor cells improves ribosome biogenesis and preimplantation development of embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *FASEB J.* 2020; 34 (6): 8283–95. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.202000025RR>.
- Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9 (2): 67–81. Available from: <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0119>.
- An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders: PREGNANCY-SPECIFIC BETA-1-GLYCOPROTEIN 11; PSG11. Available from: <https://omim.org/entry/176401>.
- Su X, Zhang J, Yang W, et al. Identification of the Prognosis-Related lncRNAs and Genes in Gastric Cancer. *Front Genet.* 2020; 11: 22. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00027>.
- Khan W, Hammarström S. Identification of a new carcinoembryonic antigen (CEA) family member in human fetal liver--cloning and sequence determination of pregnancy-specific glycoprotein 7. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 168 (1): 214–25. Available from: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)91696-p](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)91696-p).
- Jamioł M, Wawrzykowski J, Mojsym W, et al. Activity of selected glycosidases and availability of their substrates in bovine placenta during pregnancy and parturition with and without retained foetal membranes. *Reprod Domest Anim.* 2020; 55 (9): 1093–102. Available from: <https://doi.org/10.1111/rda.13747>.
- Sui L, An L, Tan K, et al. Dynamic Proteomic Profiles of In Vivo- and In Vitro-Produced Mouse Postimplantation Extraembryonic Tissues and Placentas. *Biol Reprod.* 2014; 91 (155): 124–16. Available from: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124248>.
- Watanabe N, Kato T, Fujita A, et al. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol.* 1999; 1 (3): 136–43. Available from: <https://doi.org/10.1038/11056>.
- Wirrig E, Snarr B, Chintalapudi M, et al. Cartilage link protein 1 (Crtl1), an extracellular matrix component playing an important role in heart development. *Dev Biol.* 2007; 310 (2): 291–303. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.041>.
- Veiko N, Ershova S, Veiko R, et al. Mild cognitive impairment is associated with low copy number of ribosomal genes in the genomes of elderly people. *Front Genet.* 2022; 13: 967448. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.967448>.
- Ershova E, Malinovskaya E, Golimbet V, et al. Copy number variations of satellite III (1q12) and ribosomal repeats in health and schizophrenia. *Schizophr Res.* 2020; 223: 199–212. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.07.022>.
- Kondrateva E, Ershova E, Nikolaeva E, i dr. Rezul'taty izucheniya kompleksa ribosomnyh genov cheloveka pri mukoviscidoze. *Pul'monologiya.* 2023; 33 (1): 7–16. Available from: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2023-33-1-7-16>.
- Sun Y, Hu X, Qiu D, et al. rDNA Transcription in Developmental Diseases and Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2023; 19 (4): 839–52. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10504-6>.