

Вариация числа копий рибосомных генов в геномах больных муковисцидозом

Кондратьева Е.И.^{1,2}, Ершова Е.С.¹, Воронкова А.Ю.^{1,2}, Шмарина Г.В.¹, Красовский С.А.^{1,3}, Жекайте Е.К.^{1,2}, Петрова Н.В.¹, Мельяновская Ю.Л.¹, Одинаева Н.Д.², Вейко Н.Н.¹, Костюк С.В.¹

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье 1.

2 — ГБУЗ Московской области «Детский клинический многопрофильный центр Московской области»
141009, Московская область, г. Мытищи, ул. Коминтерна 24 А, с1

3 — ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства»
115682, г. Москва, Ореховый бульвар, д. 28

Впервые определено число копий тандемного рибосомного повтора (рДНК) в ДНК лейкоцитов крови больных муковисцидозом различного возраста (от 0 до 66 лет). Показано, что геномы больных муковисцидозом содержат увеличенное количество копий рДНК (289 – 932; среднее: 563 ± 101 ; $N = 203$) по сравнению со здоровыми людьми (171–711; среднее 420 ± 107 копий; $N = 751$) того же возраста ($p < 10^{-33}$). В выборке больных и в контрольной выборке наблюдали сужение интервала варьирования числа копий рДНК в старших возрастных группах. В группе больных возраста 30–66 лет интервал варьирования числа копий рДНК в геноме сужен до 430–680 копий (среднее: 544 ± 72 копии; $N = 27$). Потенциально число копий рДНК в геноме больных муковисцидозом можно рассматривать как дополнительный прогностический маркер, отражающий продолжительность жизни больного.

Ключевые слова: рибосомные гены, рДНК, муковисцидоз, число копий рДНК.

Для цитирования: Кондратьева Е.И., Ершова Е.С., Воронкова А.Ю., Шмарина Г.В., Красовский С.А., Жекайте Е.К., Петрова Н.В., Мельяновская Ю.Л., Одинаева Н.Д., Вейко Н.Н., Костюк С.В. Вариация числа копий рибосомных генов в геномах больных муковисцидозом. *Медицинская генетика* 2021; 20(2): 49–60.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.02.49-60

Автор для корреспонденции: Кондратьева Е.И.; e-mail: elenafpk@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила: 15.01.2021.

Variation in the number of copies of ribosomal genes in the genomes of patients with cystic fibrosis

Kondratyeva E.I.^{1,2}, Ershova E.S.¹, Voronkova A.Yu.^{1,2}, Shmarina G.V.¹, Krasovsky S.A.^{1,3}, Zhekaite E.K.^{1,2}, Petrova N.V.¹, Melyanovskaya Yu.L.¹, Odinaeva N.D.², Veiko N.N.¹, Kostyuk S.V.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics
Moskvorechye str. 1, Moscow, 115478, Russia

2 — Children's Clinical Multidisciplinary Center of the Moscow Region
Comintern str. 24 A, bld.1, Mytishchi, Moscow Region, 141009, Russia

3 — Research Institute of Pulmonology of the Federal Medical and Biological Agency
Orekhovy Boulevard, 28, Moscow, 115682, Russia

The number of copies of tandem ribosomal repeat (rDNA) in the DNA of blood leukocytes of patients with cystic fibrosis of various ages (from 0 to 66 years) was determined for the first time. It was shown that the genomes of patients with cystic fibrosis contain an increased number of rDNA copies (289 - 932; mean: 563 ± 101 ; $N = 203$) compared with healthy people (171 - 711; mean 420 ± 107 copies; $N = 751$) of the same age ($p < 10^{-33}$). In the sample of patients and in the control sample, a narrowing of the range of variation in the rDNA copy number was observed in older age groups. In the group of patients aged 30–66 years, the interval of variation in the number of rDNA copies in the genome was narrowed to 430–680 copies (mean: 544 ± 72 copies; $N = 27$). Potentially, the number of rDNA copies in the genome of patients with cystic fibrosis can be considered an additional prognostic marker reflecting the patient's life expectancy.

Key words: ribosomal genes, rDNA, cystic fibrosis, rDNA copy number.

For citation: Kondratyeva E.I., Ershova E.S., Voronkova A.Yu., Shmarina G.V., Krasovsky S.A., Zhekaite E.K., Petrova N.V., Melyanovskaya Yu.L., Odinaeva N.D., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Variation in the number of copies of ribosomal genes in the genomes of patients with cystic fibrosis. *Medicinskaja genetika* [Medical genetics] 2021; 20(2): 49–60. (In Russ.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.02.49-60

Corresponding author: Kondratyeva E.I.; **e-mail:** elenafpk@mail.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of interest. Authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 15.01.2021

Синтез белка (трансляция) — центральное событие в эукариотической клетке. Трансляция осуществляется рибосомами. Количество белка в клетке зависит от двух основных факторов: (1) скорости процесса трансляции и (2) количества рибосом в клетке [1, 2]. Рибосома состоит из двух основных компонентов: около 80 рибосомных белков в комплексе с четырьмя РНК, которые получили название рибосомных РНК (рРНК) [3]. Биогенез рибосомы начинается с транскрипции двух предшественников рибосомной РНК (пре-рРНК) — одного для 5S рРНК и второго для 18S, 5,8S и 28S рРНК. Одновременно в цитоплазме происходит синтез всех рибосомных белков и транс-активирующих факторов, которые принимают участие в биогенезе рибосом. После импорта всех синтезированных белков в ядрышко, формы пре-рРНК подвергаются ряду модификаций и связываются с рибосомными белками. Сборка рибосом продолжается до момента выхода прерибосомных частиц из ядрышка в цитоплазму [4, 5].

Биогенез рибосом влияет на способность клеток человека пролиферировать и нормально выполнять свои функции. В отличие от большинства генов, транскрибируемых полимеразой II, транскрипция рибосомных генов происходит с участием фермента полимеразы I. В делящейся клетке синтез рРНК полимеразой I наиболее активен, количество транскрипта рРНК составляет 35–60% от общего количества РНК в клетках [6, 7]. Соответственно, скорость транскрипции полимеразой I тесно связана с ростом клеток и их пролиферативной активностью, зависит в значительной степени от различных факторов, таких, как окислительный стресс, старение, повреждения ДНК, ограничения в питании и т.д. [8–11]. Ингибирование транскрипции рибосомных генов приводит к аресту клеточного цикла, апоптозу, старению или аутофагии в зависимости от типа клеток [12, 13]. Дисрегуляция биогенеза рибосом, вызванная нарушением транскрипции рибосомных генов, приводит к развитию ряда заболеваний [14, 15].

Геном человека содержит сотни копий рибосомных генов (рДНК), которые кодируют в составе единого фрагмента три типа рибосомной РНК (18S рРНК, 5,8S рРНК, 28S рРНК). Гены 18S, 5,8S, 28S рРНК расположены на пяти парах акроцентрических хромосом в р-районах (рис. 1А) [16]. Каждая единица рДНК со-

стоит из двух основных частей: транскрибируемой области (длина последовательности 13314 п.н.) и не-транскрибируемого межгенного спейсера (рис. 1Б). Общая длина одного рибосомного повтора составляет около 43 т.п.н. Транскрибируемая область рДНК включает внешний транскрибируемый спейсер 1 и два внутренних транскрибируемых спейсера (рис. 1). В процессе биогенеза все транскрибируемые спейсеры деградируют и остаются только рРНК [16]. В р-районах акроцентрических хромосом человека может быть локализовано от 0 до нескольких десятков копий тандемных рибосомных повторов [17].

Рибосомные повторы являются ключевыми игроками в поддержании стабильности всего генома, который функционирует в эукариотической клетке. Изменения в числе копий рибосомных генов (уменьшение или увеличение) приводят к нестабильности генома, что, в свою очередь, индуцирует старение, рак и различные заболевания [18, 19]. Число копий рДНК, определенное рядом авторов варьирует от 9 до 800 единиц [17, 20–24]. Такой разброс связан, по-видимому, не только с реальной вариабельностью этого параметра внутри вида, но и с использованием различных методов анализа.

Ранее нами был разработан количественный метод (нерадиоактивная количественная гибридизация, NQN), позволяющий надежно анализировать тандемные повторы генома человека, которые не могут быть проанализированы методами количественной ПЦР [25, 26]. Метод NQN позволил определить вариабельность числа копий рДНК в различных популяциях человека. Распределение людей по числу копий рДНК значительно различается в различных возрастных группах [27].

В исследованиях, которые проводили в различные периоды и на различных выборках, было показано, что геномы больных шизофренией содержат увеличенное число копий рДНК [24, 26, 28]. Авторы предложили две гипотезы, которые могут объяснить данный факт. Известно, что организм больного шизофрениейотягощен окислительным стрессом, который приводит к повреждениям ДНК [29]. Природа окислительного стресса при шизофрении до конца не определена. Противостоять высокому уровню активных форм кислорода и азота в клетке позволяет большое количество копий рДНК [30], которое ассоциировано с высо-

ким уровнем синтеза белка. Большое количество рДНК позволяет выживать эмбрионам, геном которых отягощен мутациями, приводящими к развитию шизофрении. Высокий уровень синтеза белка также позволяет выжить новорожденному в условиях акушерских осложнений, которые приводят к повреждению мозга ребенка. Большое количество рДНК в клетке ассоциировано со значительной стабилизацией всего хроматина ядра [18] и препятствует хромосомным перестройкам, которые происходят вследствие повреждения ДНК. Можно было ожидать, что есть и другие патологические состояния, на которые влияет количество копий рДНК в геноме.

Муковисцидоз (МВ) — одно из наиболее распространенных аутосомно-рецессивных наследственных заболеваний. В России частота носительства мутаций, ассоциированных с развитием МВ, колеблется от 1:26 до 1:44 [31, 32]. Первичный генетический дефект при МВ связан с изменением нуклеотидной последовательности гена *CFTR*, который кодирует белок клеточной мембраны, представляющий собой цАМФ-зависимый анионный канал [33]. Показано, что белок CFTR не просто осуществляет транспорт хлоридов и бикарбонатов через апикальную поверхность эпителиальных клеток, но и регулирует дру-

гие ионные каналы, включая внешние регуляторные каналы для ионов хлора, каналы для ионов натрия, калия и кальция [34]. Патогенные варианты в гене *CFTR* значительно нарушают клеточный метаболизм, начиная с периода эмбрионального развития и в течение жизни пациента. Кроме того, пациенты с МВ предрасположены к развитию хронической инфекции дыхательного тракта [35]. Ответ клеток на эти нарушения и воздействия потенциально может зависеть от множества причин, в том числе, и от уровня синтеза белка, то есть от числа копий рДНК в геноме. Высокий уровень синтеза белка может способствовать выживанию клеток в неблагоприятных условиях. С другой стороны, высокий уровень синтеза белка может способствовать выживанию клеток с поврежденным геномом и блокировать процессы аутофагии и апоптоза. В результате в тканях могут накапливаться клетки, которые не выполняют свою функцию и мешают функционированию здоровых клеток.

Чтобы понять, изменяется ли содержание рДНК в геномах пациентов с МВ, определили число копий рДНК в геномах 203 больных различного возраста и сравнили с содержанием рДНК в геномах большой выборки людей (905 человек), не имеющих данной па-

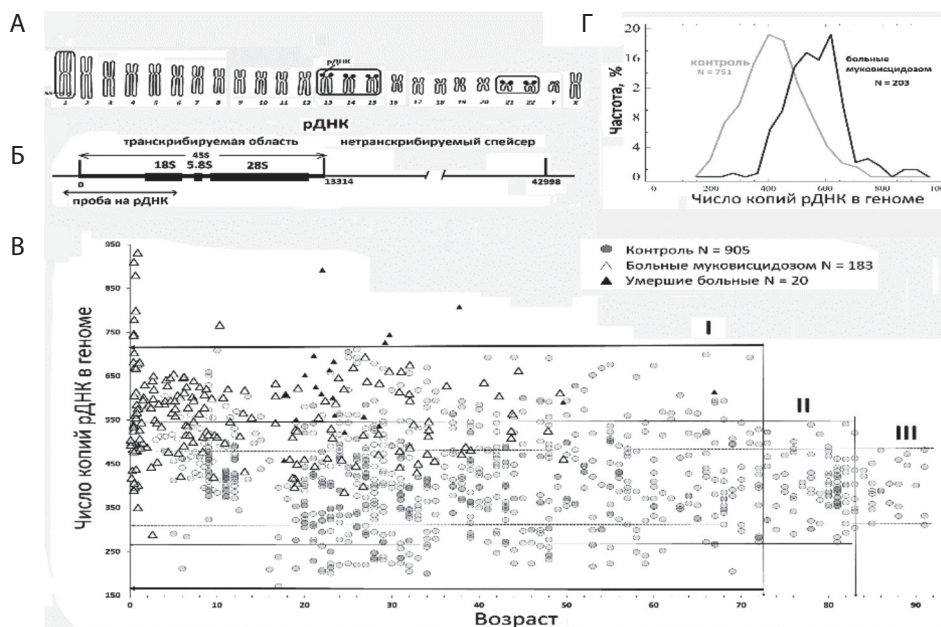


Рис. 1. А. Расположение рибосомных генов на хромосомах человека.

Б. Схема единицы рибосомного повтора. На схеме указан анализируемый фрагмент рДНК, который детектируется зондом pBR322-rDNA.

В. Зависимость числа копий рДНК в ДНК лейкоцитов двух выборок от возраста человека. Обозначения для выборок указаны на рисунке. Горизонтальные линии показывают интервалы варьирования количества рДНК в трех различных возрастных группах контрольной выборки.

Г. Распределение двух выборок образцов ДНК по числу копий рДНК в геноме.

тологии. В результате было впервые показано, что геномы пациентов с МВ содержат повышенные количества копий рибосомных генов.

Методы

Пациенты и контрольная группа

Образцы ДНК контрольной группы (905 образцов) были собраны сотрудниками лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ МГНЦ на протяжении 10 лет. Выборка включает здоровых людей (56 % мужчин) в возрасте от 1 до 91 года (среднее 39 ± 22 года), которые не имеют мутаций в гене *CFTR* и других мутаций, ассоциированных с генетической патологией. Контрольная группа была охарактеризована подробно в нескольких предыдущих исследованиях [27, 28, 36].

В исследовании принимали участие 123 ребенка (51 мальчик) в возрасте от 0 до 17 лет и 80 взрослых пациентов (44 мужчины) в возрасте от 18 до 66 лет. Средний возраст пациентов составил $14,8 \pm 1,9$ лет. Доля лиц мужского и женского пола не отличалась от контрольной выборки. Все пациенты находились на активном диспансерном наблюдении в научно-клиническом отделе муковисцидоза ФГБНУ МГНЦ (клиническая база — отделение муковисцидоза ГБУЗ МО «ДКМЦМО») и/или в «НИИ пульмонологии» ФМБА России. Диагноз муковисцидоз был поставлен согласно клиническими рекомендациям (2020) [37].

Пациенты были разделены на 4 возрастные группы: до 10 лет (группа 1), с 11 до 20 лет (группа 2), с 21 до 30 лет (группа 3), и 31–40 лет (группа 4). Кроме того, отдельно была проанализирована группа умерших пациентов (табл. 1). В последнюю вошло 20 пациентов в возрасте $25,3 \pm 7,6$ (Ме 23,2 (21,2; 27,7) лет. Диагноз МВ был установлен в возрасте $7,9 \pm 11,2$ (Ме 3,0 (0,4; 9,6) лет. Причиной смерти в 19 случаях была бронхолегочная патология, в 1 случае — суицид.

Из 199 генотипированных пациентов 64 оказались носителями генетического варианта F508del в гомозиготном состоянии, у 88 больных вариант F508del был обнаружен в гетерозиготном состоянии, а 47 пациентов были носителями других мутаций гена *CFTR*.

Сравнение групп пациентов проводилось по данным Национального регистра МВ 2011–2018 годов и данным из историй болезни (№003/у) и амбулаторных карт пациентов (№026/у). Формат регистра соответствовал Европейскому регистру больных МВ.

От каждого участника исследования и/или его законного представителя было получено информированное согласие на забор и использование биологического материала.

Анализ содержания рДНК в ДНК лейкоцитов крови

В рамках данного исследования было определено содержание рДНК в 91 образце контрольной группы. Остальные 814 образцов были проанализированы ранее [28]. Содержание рДНК было впервые определено в 203 образцах ДНК больных МВ.

Процедуры выделения ДНК из клеток крови, измерения концентрации ДНК в растворе и метод NQN очень подробно описаны ранее [26, 36]. ДНК выделяли стандартным методом экстракции органическими растворителями после предварительного лизиса клеток (саркозилат натрия и ЭДТА) и обработки лизата последовательно РНКазой А и протеиназой К. Экстракцию проводили дважды насыщенным водным (рН=7,5) раствором фенола, далее смесью хлороформа и изоамилового спирта. ДНК из водной фазы осаждали 70% этиловым спиртом. Осадок промывали 75 % этанолом и растворяли в воде. Концентрацию определяли флуориметрически в комплексе с флуоресцирующим ДНК-связывающимся красителем PicoGreen (Invitrogen). Перед нанесением на нитроцеллюлозный фильтр проводили денатурацию ДНК 0,1 М раствором NaOH с последующей нейтрализацией. Одновременно с анализируемыми образцами ДНК на фильтр наносили несколько образцов ДНК человека с известным содержанием рДНК в геноме.

В качестве ДНК-зонда на рДНК при проведении гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах применили плазмиду pBR322-gDNA, которая содержит фрагмент транскрибируемой области рДНК длиной 5836 п.н., клонированный в вектор pBR322 по сайтам рестрикции EcoRI (рис.1Б). Клонированный фрагмент локализован в позиции от начала транскрипции -515 до 5321 на рДНК человека (GenBank accession no. U13369). Плазмида-вектор применялась в качестве отрицательного контроля. Плазмиды биотинировали методом ник-трансляции с использованием меченного biotin-11-dUTP. После проведения гибридизации ДНК с биотинированной ДНК-пробой, биотин выявляли конъюгатом стрептавидина с щелочной фосфатазой (Sigma). В качестве субстрата использовали BCIP-NBT, которые при расщеплении щелочной фосфатазой образуют на фильтре нерастворимый осадок. Высушенный фильтр с пятнами сканировали. Анализ интенсивности пятен на фильтре проводили с использованием программы «Imager7.0» (МГНЦ). Относительная стандартная ошибка метода NQN составляет 5%. Средняя стандартная ошибка эксперимента, которая включает все процедуры (выделение ДНК, определение кон-

центрации ДНК и метод NQH) составляет 11% от измеряемой величины.

Статистический анализ

Статистическую обработку клинических данных пациентов с МВ проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA. В зависимости от вида распределения мерами центральной тенденции и рассеяния служили среднее значение (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD) или медиана (Me) (интерквартильный размах). Статистическую обработку проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Анализ образцов ДНК на содержание рДНК проводили дважды в независимых опытах. В рамках одного опыта на фильтр наносили по 4 параллельных пробы одного и того же образца. Выборки людей по содержанию рДНК сравнивали методом Манна–Уитни (p). Распределения образцов по содержанию рДНК сравнивали методом Колмогорова–Смирнова (D и α). Данные анализировали с применением программы StatPlus2007 (<http://www.analystsoft.com/>).

Результаты и обсуждение

Характеристика групп обследованных пациентов с МВ, представлена в **табл. 1**. Группы не отличались по полу, показателям потового теста. При этом число пациентов с «мягким» генотипом возрастало с возрастом от 2,6% в 1 группе (до 10 лет) до 75% в 4 группе (старше 31 года). С возрастом пациентов увеличивались число инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* ($p < 0,001$), число осложнений заболевания и снижалась функция лёгких по ОФВ₁ ($p = 0,009$), что соответствует данным российского регистра пациентов [38].

На рисунке 1В приводятся данные, отражающие зависимость числа копий рДНК в геноме от возраста для контрольной группы ($N = 905$), для группы больных МВ ($N = 183$) и для группы больных, которые умерли вследствие заболевания ($N = 20$).

Анализ контрольной выборки позволил выявить три возрастных интервала, которые значительно отличаются между собой по распределению числа копий рДНК в геноме, при этом средние значения параметра остаются неизменными. Интервал I включает людей в возрасте от 1 до 73 лет (88% всех образцов). Число копий рДНК для этой группы варьирует от 171 до 711 (коэффициент вариации $Kvar = 0,26$). Среднее значение составляет 419 ± 107 копий рДНК на геном. После 73 лет (возраст средней продолжительности жизни в РФ) наблюдается резкое снижение интервала варьирования параметра. Группа II (воз-

раст от 74 до 83 лет; 9,3% образцов) содержит в среднем 396 ± 59 копий рДНК на геном (от 272 до 541 копий, $Kvar = 0,15$). Средние значения параметра в двух группах не различаются, но распределения числа копий рДНК для этих групп достоверно различаются ($D = 0,23$, $\alpha < 0,001$). Группа III включает людей в возрасте от 84 до 91 года (2,7 % образцов). Среднее значение составляет 398 ± 51 копий рДНК на геном. У очень пожилых людей содержание рДНК в геноме варьирует в очень узком диапазоне от 311 до 482 (коэффициент вариации $Kvar = 0,12$).

Возраст людей в группе больных МВ варьировал от 0 до 66 лет. Число копий рДНК для этой группы ($N = 203$) варьирует от 289 до 932 ($Kvar = 0,18$). Среднее значение составляет 563 ± 101 копий рДНК на геном. В контрольной группе того же возраста (интервал I, 3 - 67 лет, $N = 751$) число копий рДНК варьировало от 171 до 711 ($Kvar = 0,18$), среднее значение составляло 420 ± 107 копий. Число копий рДНК в геномах пациентов с МВ достоверно выше, чем в геномах контрольной группы ($p < 10^{-33}$). Распределения параметра в двух группах значительно различаются ($D = 0,54$, $\alpha < 10^{-41}$) (рис. 1Г). В выборке больных МВ практически не встречаются геномы с низким содержанием рДНК (менее 350 копий). В контрольной выборке содержание таких образцов превышает 25 % от общего количества образцов ДНК.

Как следует из рис. 1В, максимальные количества копий рДНК (более 711 копий – верхняя граница нормы) встречаются в группе больных МВ в возрасте до 1 года и в группе умерших больных. Мы проанализировали число копий рДНК в группах, которые различаются по возрасту (группу умерших больных анализировали отдельно), и сравнили этот показатель с показателем в соответствующих возрастных группах контрольной выборки (**рис. 2**).

Максимальные средние значения содержания рДНК в геноме были обнаружены в группе умерших больных (635 ± 102 копии). Группа больных возраста 0 - 10 лет также отличалась повышенными значениями числа копий рДНК от остальной выборки (среднее 569 ± 106 копий). Эти две группы достоверно отличаются от остальных возрастных групп больных более высоким содержанием рДНК в геномах. В группах больных старше 11 лет не встречаются образцы ДНК с очень высокими значениями числа копий, однако во всех возрастных группах пациентов с МВ число копий рДНК достоверно превышает число копий рДНК в соответствующей по возрасту контрольной группе.

Интересно отметить, что, как и в контрольной выборке, в выборке пациентов с МВ с возрастом наблюдается сужение интервала варьирования числа ко-

Клинико-лабораторная и инструментальная характеристика групп исследования

Показатель	Группа 1 (до 10 лет)	Группа 2 (11–20 лет)	Группа 3 (21–30 лет)	Группа 4 (31–40 лет)	p	p между группами
Возраст, годы						
M ± SD	1,2 ± 1,9	18,9 ± 0,7	25,4 ± 3,1	38,5 ± 6,1	-	-
Me (IQR); Me (Q25;Q75)	0,7 (0,4); 0,7 (0,5; 0,9)	19,0 (0,6); 19,0 (18,6; 19,2)	24,6 (5,5); 24,6 (23,1; 28,5)	37,7 (10,8); 37,7 (33,0; 43,7)		
Пол						
Мужчины/ женщины	56,4%/ 43,6%	46,7%/ 53,3%	64,9%/35,1%	41,4%/ 58,6%	p=0,258	-
Возраст установления диагноза, годы						
M ± SD	0,3 ± 0,6	4,8 ± 5,3	6,9 ± 7,1	21,2 ± 15,9	p<0,001	p ₁₋₂ =0,002 p ₁₋₃ <0,001 p ₁₋₄ <0,001 p ₂₋₄ =0,046 p ₃₋₄ =0,017
Me (IQR); Me (Q25;Q75)	0,2 (0,2); 0,2 (0,1; 0,2)	1,3 (8,7); 1,3 (0,7; 9,0)	5,2 (10,6); 5,2 (0,4; 10,4)	21,4 (35,2); 21,4 (7,1; 38,9)		
Потовый тест						
Титрование	114,0 (28,3); 114,0 (94,0; 134,0)	84,8 (13,3); 85,0 (74,5; 95,0)	107,1 (35,9); 113,0 (66,7; 128,0)	91,5 (40,3); 91,5 (63,0; 120,0)	p=0,635	-
Проводимость	105,9 (17,2); 111,0 (86,0; 119,0)	98,8 (38,8); 95,0 (93,0; 132,0)	125,5 (7,5); 124,0 (119,5; 131,5)	99,0 (16,5); 90,0 (89,5; 104,0)	p=0,166	-
Генетически вариант гена <i>CFTR</i>						
F508del/F508del	20 (51,3%)	3 (20,0%)	9 (24,3%)	2 (6,9%)	p=0,002	p ₁₋₄ (F508del/ F508del) =0,001 p ₁₋₄ (Дру- гая/другая) =0,019
F508del/другая	14 (35,9%)	7 (46,7%)	20 (54,1%)	14 (48,3%)		
Другая/другая	5 (12,8%)	5 (33,3%)	8 (21,6%)	13 (44,8%)		
Генотип						
Тяжелый	38 (97,4%)	12 (85,7%)	27 (75,0%)	7 (25,0%)	p<0,001	p ₁₋₃ =0,026 p ₁₋₄ <0,001 p ₂₋₄ =0,001 p ₃₋₄ <0,001
Мягкий	1 (2,6%)	2 (14,3%)	9 (25,0%)	21 (75,0%)		
Микробиологическое исследование *						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> — хр.инфицирование, монокультура	5,3%	60,0%	62,2%	50,0%	p<0,001	p ₁₋₂ <0,001 p ₁₋₃ <0,001 p ₁₋₄ <0,001
Интермиттирующий высев	8,1%	6,7%	11,4%	32,1%	p=0,051	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	50,0%	60,0%	59,5%	57,1%	p=0,838	-
MRSA	96,3%	100,0%	93,8%	100,0%	p=0,480	-
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	10,5%	26,7%	27,0%	10,7%	p=0,151	-
Нетуберкулезные микобактерии	0,0%	0,0%	3,6%	13,0%	p=0,356	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5,3%	14,3%	11,1%	3,6%	p=0,491	-
<i>Achromobacter spp.</i>	2,6%	20,0%	17,6%	19,2%	p>0,127	-
Респираторная функция*						
	n=0	n=9	n=24	n=21	p=0,009	p ₂₋₄ =0,016
ОФВ, %долж.	(-)	77,0±20,7	50,1±25,4	44,7±28,0		

Продолжение табл. 1 см на стр. 55.

Показатель	Группа 1 (до 10 лет)	Группа 2 (11-20 лет)	Группа 3 (21-30 лет)	Группа 4 (31-40 лет)	p	p между группами
	n=0	n=9	n=24	n=21	p=0,051	-
ФЖЕЛ, %долж.	(-)	88,9±15,2	66,5±22,3	68,0±25,0		-
Осложнения заболевания в отчетном году						
Аллергический бронхолегочный аспергиллез,	0,0%	6,7%	2,7%	0,0%	p=0,304	-
Сахарный диабет с применением инсулина	0,0%	6,7%	10,8%	7,1%	p=0,245	-
Пневмоторакс	0,0%	6,7%	2,7%	3,6%	p=0,534	-
Легочное кровотечение	0,0%	0,0%	14,7%	17,9%	p=0,021	-
Онкологические заболевания	0,0%	0,0%	0,0%	3,7%	p=0,344	-
Остеопороз	0,0%	25,0%	26,9%	22,2%	p=0,847	-
Полипоз верхних дыхательных путей	0,0%	45,5%	37,5%	33,3%	p=0,008	-
Амилоидоз	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%	p=0,525	-
Цирроз печени с портальной гипертензией	0,0%	50,0%	50,0%	16,7%	-	-

Примечание: в таблицу не включены данные пациентов до 1 года и старше 40 лет. * - Количество указано в соответствии с данными регистра

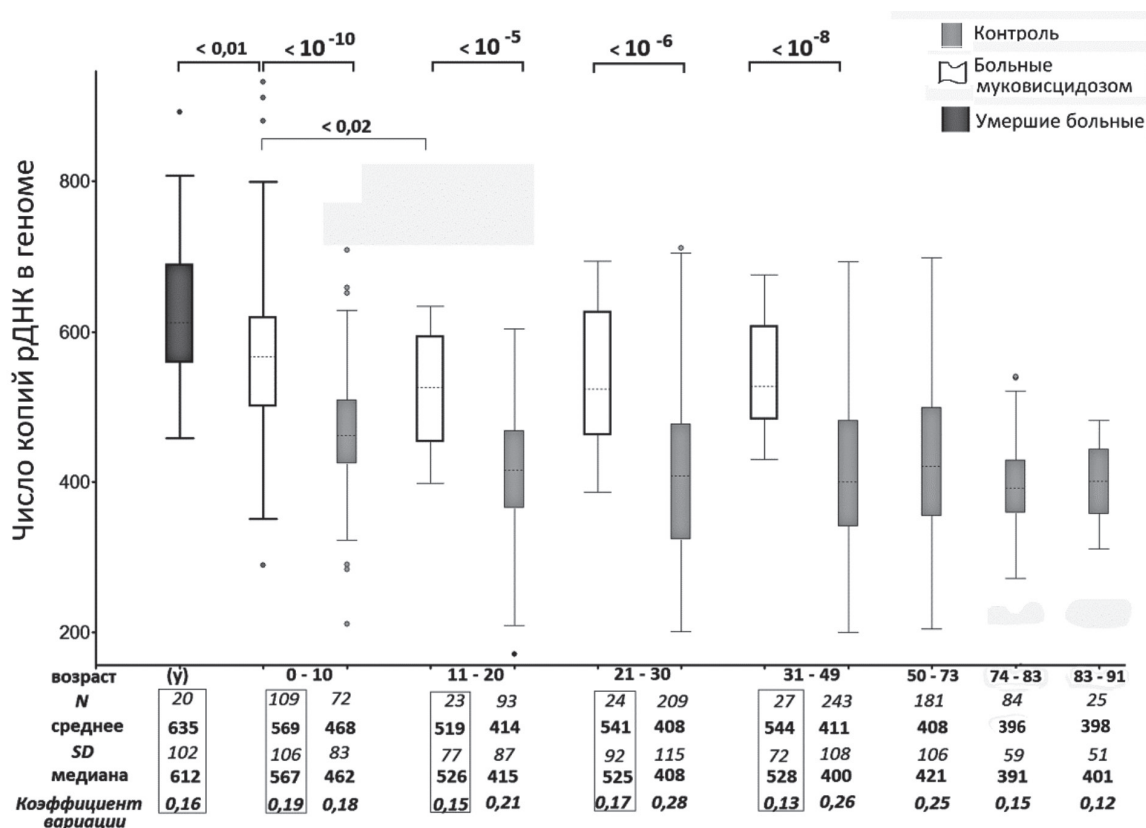


Рис. 2. Анализ числа копий рДНК в различных возрастных группах контрольной выборки и выборки больных МВ. Вверху приводятся результаты сравнения указанных групп методом непараметрической статистики (U-test). Внизу приводятся данные описательной статистики для групп. Данные для больных обозначены рамками.

пий рДНК (уменьшаются коэффициенты вариации в группах). В группе 0 — 10 лет показатель изменяется от 289 до 932 (диапазон — 643; $Kvar = 0,18$) копий рДНК на геном. В группе 31–49 лет показатель изменяется от 430 до 676 (диапазон — 246; $Kvar = 0,13$) копий рДНК на геном. При этом дети до 10 лет имели «тяжелый» генотип в 97,4% случаев (гомозиготы F508del — 51, 3%), в 4-й группе взрослых пациентов «тяжелый» генотип отмечен у 25% (гомозиготы F508del — 6,9%). В группе с частыми случаями смерти (3 группа, 21–30 лет) тяжелый генотип составил 75% (гомозиготы F508del — 24, 3%). Создается впечатление, что, возможно, «тяжелый» генотип по гену *CFTR* оказывает влияние на особенности варьирования числа копий рДНК в группе до 10 лет и в группе пациентов с частыми случаями летальных исходов заболевания, но в группе до 10 лет это носит компенсаторный характер, а в группе пациентов в возрасте 21–30 лет имеет негативное значение. Следует отметить, что хроническая инфекция, вызванная *Pseudomonas aeruginosa*, в группе до 10 лет реже регистрируется, чем в других возрастных группах. Параллельно с возрастом снижается и функция легких по показателю ОФВ₁ (табл. 1) на фоне сужения интервала варьирования числа копий рДНК (уменьшения коэффициента вариации). Предположение о влиянии активности синтеза рДНК на предотвращение развития синегнойной инфекции, требует дальнейшего изучения. Представляет интерес тот факт, что дети до 10 лет не имели полипоза околоносовых пазух носа и цирроза печени с портальной гипертензией, остеопороза, ассоциированного с МВ сахарного диабета.

Аналогичный эффект мы наблюдали для выборок больных шизофренией. Продолжительность жизни больных снижена примерно на 15 лет. Если сужение интервала варьирования в контрольной выборке наблюдается после 73 лет (рис.1В), то в выборке больных шизофренией интервал варьирования числа копий рДНК сужается после 60 лет [28]. При этом средний уровень содержания рДНК в геноме больных шизофренией по-прежнему превышает уровень в соответствующей по возрасту контрольной группе.

Наши исследования вариативности числа копий рДНК у человека указывают на то, что данный генетический признак является стабильным для индивида. Число копий рДНК одинаково в клетках различного типа одного организма. В условиях окислительного, генотоксического стресса число копий рДНК также не изменяется [36, 39]. Исключение составляют гиперметилированные копии рДНК, которые присутствуют в 10% геномов человека [40]. Эти копии неактивны и находятся на периферии ядрышка в составе гетерохроматина, который окружает ядрыш-

ко. При репликативном старении клеточных культур (фибробласты кожи) эти копии могут элиминироваться из генома, вследствие чего наблюдается снижение содержания рДНК в ДНК клеток примерно на 5–20% [27]. Изменение числа копий рДНК может происходить при канцерогенезе. В клетках опухоли число копий рДНК может изменяться по сравнению со здоровыми клетками организма [41]. Однако нет данных, которые бы подтверждали изменение числа копий рДНК по мере старения организма одного и того же человека.

Мы полагаем, что наблюдаемые на рис.1В значительные изменения распределения числа копий в различных контрольных возрастных группах можно трактовать следующим образом: до глубокой старости не доживают люди с низкими (менее 300) и высокими (более 500) значениями числа копий рДНК в геноме. Аналогично, до возраста более 30 лет не доживают больные МВ с относительно низким (менее 450 копий) и относительно высоким (более 650 копий) содержанием рДНК в геноме. При этом средний возраст пациентов этой группы составил $25,3 \pm 7,6$ года, то есть пациенты, в основном, соответствовали группе 3 (21–30 лет), единичные пациенты входили в группы старше 31 года и младше 20 лет.

Нет сомнений в том, что рибосомные гены не являются главной причиной данного заболевания. Однако число копий рДНК в геноме представляет тот фон, на котором протекают процессы эмбриогенеза и постнатального развития. По-видимому, эмбрион, геном которого содержит мутации в гене *CFTR*, для развития нуждается в высоком уровне синтеза белка, что может обеспечить большое количество рибосом, которое определяется большим числом копий рДНК. Кроме того, большой размер кластера рибосомных генов значительно повышает стабильность всего хроматина ядра и сдвигает баланс эухроматин-гетерохроматин в сторону гетерохроматина [18]. Возможно поэтому у пациентов с МВ практически не встречаются геномы с низким числом копий рДНК. Такие эмбрионы просто не выживают в условиях нарушенного метаболизма, который индуцируется аномальным функционированием гена *CFTR*.

В группе детей до года, больных МВ ($N = 39$), геномы с очень высоким содержанием рДНК (более 700 копий) встречаются в 21 % случаев (рис. 1В). По-видимому, высокое число копий рДНК в геноме дало возможность родиться детям с очень значительными нарушениями метаболизма. Однако, адаптироваться к внешней среде организм ребенка с такими нарушениями, по-видимому, не способен. В группе умерших больных наблюдались самые высокие зна-

чения числа копий рДНК. Если же организму удастся адаптироваться, то срок жизни не превышает 30 лет.

Можно предположить, что высокий уровень числа копий рДНК в геноме человека является скорее маркером неблагополучного эмбрионального развития, когда эмбриогенез требует высокого уровня белкового синтеза, чем причиной ранней гибели организма. Однако исключить это предположение не представляется возможным. Большое количество рДНК в геноме способствует более высокому уровню синтеза белка. Это очень энергозатратный процесс. Предполагается, что до 80% АТФ в клетке расходуется на процессы биогенеза рибосом и процессы трансляции [42]. Таким образом, клеткам с высоким уровнем рДНК может не хватать энергии для нормально функционирования. Высокое содержание рДНК в геноме человека, как и очень низкое содержание, не способствует долгожительству. Было показано, что снижение уровня биогенеза рибосом влияет в положительную сторону на метаболизм пожилых организмов и является одним из способов увеличения продолжительности жизни [43]. Возможно, снижение уровня биогенеза рибосом может в некоторых случаях улучшить состояние больных МВ.

В последние годы появляются данные, говорящие о том, что функции рибосомных генов в эукариотической клетке не ограничиваются только биогенезом рибосом [44]. Рибосомные гены играют важную роль в регуляции пространственной структуры всего хроматина ядра. Рибосомная ДНК образует множественные контакты с другими фрагментами хроматина. Показано, что изменение размера кластера рДНК сопровождается значительными изменениями уровня экспрессии многих генов, которые локализованы на значительном пространственном расстоянии от ядрышка [18, 45, 46]. Эпигенетические нарушения в работе ряда генов вследствие изменения структуры хроматина в клетках с большим количеством копий рДНК могут вызывать негативные изменения в клеточном метаболизме и способствовать снижению продолжительности жизни.

Еще одно неблагоприятное следствие высокого уровня рДНК в геноме — это увеличение выживаемости клеток с поврежденной ДНК и снижение уровня апоптоза и аутофагии. Накопление поврежденных клеток может приводить к аномальному функционированию тканей организма, что у пациентов с МВ сопровождается полиорганным поражением.

Заключение

Геномы пациентов с МВ содержат повышенное количество копий рибосомных генов по сравнению со

здоровым контролем. Можно предположить, число копий рДНК в геноме пациентов с МВ является дополнительным прогностическим маркером, влияющим на продолжительность жизни больного. Исследования изучаемых показателей на однородной группе пациентов с генотипом F508del в гомозиготном состоянии, а также на протяжении жизни пациентов с МВ позволит ответить в будущем на поставленную задачу.

Литература

1. Laferté A., Favry E., Sentenac A., et al. The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev.* 2006; 20(15):2030–2040. doi:10.1101/gad.386106
2. Larson D.E., Zahradka P., Sells B.H. Control points in eucaryotic ribosome biogenesis. *Biochem Cell Biol.* 1991;69(1):5–22. doi:10.1139/o91-002
3. de la Cruz J., Karbstein K., Woolford J.L. Jr. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:93–129. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033917.
4. Tafforeau L., Zorbas C., Langhendries J.L., et al. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Mol Cell.* 2013; 51(4): 539–551. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.011.
5. Piekna-Przybylska D., Decatur W.A., Fournier M.J. New bioinformatic tools for analysis of nucleotide modifications in eukaryotic rRNA. *RNA.* 2007; 13(3):305–312. doi: 10.1261/rna.373107.
6. Cavanaugh A.H.H.-L., Rothblum L.I. Ribosomal DNA Transcription in Mammals. In *The nucleolus*. Edited by Olson M.O.J. (Landes, Austin, TX): Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 2004.
7. Moss T., Stefanovsky V.Y. At the center of eukaryotic life. *Cell.* 2002; 109(5): 545–548. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00761-4..
8. Chan J.C., Hannan K.M., Riddell K., et al. AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Sci Signal.* 2011;4(188):ra56. doi:10.1126/scisignal.2001754.
9. Hannan R.D., Rothblum L.I. Regulation of ribosomal DNA transcription during neonatal cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1995; 30(4):501–510.
10. Hein N., Sanij E., Quin J., et al. The Nucleolus and Ribosomal Genes in Aging and Senescence. In *Senescence*. Edited by Nagata T. InTech; 2012. ISBN: 978-953-51-0144-4.
11. Roussel P., André C., Masson C., et al. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci.* 1993;104 (Pt 2):327–337.
12. Drygin D., Rice W.G., Grummt I. The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010; 50:131–156. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105844
13. Quin J.E., Devlin J.R., Cameron D., et al. Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(6):802–816. doi:10.1016/j.bbadis.2013.12.009
14. Hannan K.M., Sanij E., Rothblum L.I., et al. Dysregulation of RNA polymerase I transcription during disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1829 (3–4):342–360. doi:10.1016/j.bbagrm.2012.10.014
15. Diesch J., Hannan R.D., Sanij E. Perturbations at the ribosomal genes loci are at the centre of cellular dysfunction and human disease. *Cell Biosci.* 2014; 4:43. doi:10.1186/2045-3701-4-43
16. McStay B., Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008; 24:131–157. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259.

17. Stults D.M., Killen M.W., Pierce H.H., Pierce A.J. Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome Res.* 2008; 18(1):13-18. doi:10.1101/gr.6858507
18. Paredes S., Branco A.T., Hartl D.L., et al. Ribosomal DNA deletions modulate genome-wide gene expression: "rDNA-sensitive" genes and natural variation. *PLoS Genet.* 2011; 7(4):e1001376. doi:10.1371/journal.pgen.1001376
19. Guetg C., Lienemann P., Sirri V., et al. The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats. *EMBO J.* 2010; 29(13):2135-2146. doi:10.1038/emboj.2010.17
20. Caburet S., Conti C., Schurra C., et al. Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. *Genome Res.* 2005; 15(8):1079-1085. doi:10.1101/gr.3970105
21. Ganley A.R., Kobayashi T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Res.* 2007; 17(2):184-191. doi:10.1101/gr.5457707
22. Gibbons J.G., Branco A.T., Godinho S.A., et al. Concerted copy number variation balances ribosomal DNA dosage in human and mouse genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(8):2485-2490. doi:10.1073/pnas.1416878112
23. Gibbons J.G., Branco A.T., Yu S., Lemos B. Ribosomal DNA copy number is coupled with gene expression variation and mitochondrial abundance in humans. *Nat Commun.* 2014; 5:4850. doi:10.1038/ncomms5850
24. Вейко Н.Н., Еголина Н.А., Радзивил Г.Г. и др. Количественное определение повторяющихся последовательностей в геномной ДНК человека. Обнаружение увеличенного количества рибосомных повторов в геномах больных шизофренией (результаты молекулярного и цитогенетического анализа). *Молекулярная биология.* 2003; 37(3):409-419.
25. Честков И.В., Вейко Н.Н., Ершова Е.С., Сергеева В.А., Вейко Р.В., Ижевская В.Л., Костюк С.В. Метод анализа числа копий GC-богатых повторяющихся последовательностей генома в составе поврежденной ДНК. Определение увеличенного содержания рибосомных генов в циркулирующей внеклеточной ДНК лиц с длительным стажем курения табака. *Медицинская генетика.* 2016; 15(1):43 – 49.
26. Chestkov I.V., Jestkova E.M., Ershova E.S., et al. Abundance of ribosomal RNA gene copies in the genomes of schizophrenia patients. *Schizophr Res.* 2018; 197:305-314. doi:10.1016/j.schres.2018.01.001
27. Malinovskaya E.M., Ershova E.S., Golimbet V.E., 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. doi:10.3389/fgene.2018.00306.
28. Ershova E.S., Malinovskaya E.M., Golimbet V.E., et al. Copy number variations of satellite III (1q12) and ribosomal repeats in health and schizophrenia [published online ahead of print, 2020 Aug 6]. *Schizophr Res.* 2020; S0920-9964(20)30415-1. doi:10.1016/j.schres.2020.07.022
29. Madireddy S., Madireddy S. Regulation of Reactive Oxygen Species-Mediated Damage in the Pathogenesis of Schizophrenia. *Brain Sci.* 2020; 10(10):742. doi:10.3390/brainsci10100742
30. Вейко Н.Н., Терехов С.М., Шубаева Н.О., и др. «Ранний» и «поздний» ответ культивируемых фибробластов кожи здоровых доноров и больных ревматоидным артритом на окислительный стресс. Взаимосвязь между интенсивностью гибели клеток и количеством активных копий рибосомных генов. *Молекулярная биология.* 2005; 39(2):264-275.
31. Петрова Н.В., Тимковская Е.Е., Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Анализ частоты некоторых мутаций в гене *CFTR* в разных популяциях России. *Медицинская генетика.* 2006; 2:32–39.
32. Castellani C., Macek M. Jr, Cassiman J.J., et al. Benchmarks for cystic fibrosis carrier screening: a European consensus document. *J Cyst Fibros.* 2010; 9(3):165-78. doi: 10.1016/j.jcf.2010.02.005.
33. Bell S.C., Mall M.A., Gutierrez H., et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med.* 2020; 8(1): 65-124. doi: 10.1016/S2213-2600(19)30337-6.
34. Saint-Criq V., Gray M.A. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74(1):93-115. doi: 10.1007/s00018-016-2391-y.
35. Lee T.W., Brownlee K.G., Conway S.P., Denton M., Littlewood J.M. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2003 Mar; 2(1):29-34. https://doi.org/10.1016/S1569-1993(02)00141-8
36. Ershova E.S., Malinovskaya E.M., Konkova M.S., et al. Copy Number Variation of Human Satellite III (1q12) With Aging. *Front Genet.* 2019; 10:704. doi:10.3389/fgene.2019.00704.
37. Клинические рекомендации «Кистозный фиброз (муковисцидоз)» (возрастная группа - взрослые и дети) 2020, КР372/1.
38. Воронкова А.Ю., Амелина Е.Л., Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И., Красовский С.А., Старинова М.А., Капранов Н.И., под ред. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2018. М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2019, 90 с.
39. Konkova M.S., Ershova E.S., Savinova E.A., et al. 1Q12 Loci Movement in the Interphase Nucleus Under the Action of ROS Is an Important Component of the Mechanism That Determines Copy Number Variation of Satellite III (1q12) in Health and Schizophrenia. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8:386. Published 2020 Jun 5. doi:10.3389/fcell.2020.00386
40. Ляпунова Н.А., Вейко Н.Н. Рибосомные гены в геноме человека: идентификация четырех фракций, их организация в ядрышке и метафазных хромосомах. *Генетика.* 2010; 46(9):1205-1209.
41. Xu B., Li H., Perry J.M., et al. Ribosomal DNA copy number loss and sequence variation in cancer. *PLoS Genet.* 2017; 13(6):e1006771. Published 2017 Jun 22. doi:10.1371/journal.pgen.1006771
42. MacInnes A.W. The role of the ribosome in the regulation of longevity and lifespan extension. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2016; 7(2):198-212. doi:10.1002/wrna.1325
43. Tiku V., Jain C., Raz Y., et al. Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nat Commun.* 2017; 8:16083. Published 2017 Aug 30. doi:10.1038/ncomms16083
44. Bersaglieri C., Santoro R. Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells.* 2019; 8(6):579. doi: 10.3390/cells8060579
45. Yu S., Lemos B. The long-range interaction map of ribosomal DNA arrays. *PLoS Genet.* 2018; 14(3):e1007258. doi:10.1371/journal.pgen.1007258
46. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Klushevskaya E.S., et al. rDNA Clusters Make Contact with Genes that Are Involved in Differentiation and Cancer and Change Contacts after Heat Shock Treatment. *Cells.* 2019; 8(11):1393. doi:10.3390/cells8111393

References

1. Laferté A., Favry E., Sentenac A., et al. The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev.* 2006; 20(15):2030-2040. doi:10.1101/gad.386106
2. Larson D.E., Zahradka P., Sells B.H. Control points in eucaryotic ribosome biogenesis. *Biochem Cell Biol.* 1991; 69(1):5-22. doi:10.1139/o91-002
3. de la Cruz J., Karbstein K., Woolford J.L. Jr. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annu Rev Biochem.* 2015; 84:93-129. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033917.
4. Tafforeau L., Zorbas C., Langhendries J.L., et al. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screen-

- ing of Pre-rRNA processing factors. *Mol Cell*. 2013; 51(4): 539-551. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.011.
5. Piekna-Przybylska D., Decatur W.A., Fournier M.J. New bioinformatic tools for analysis of nucleotide modifications in eukaryotic rRNA. *RNA*. 2007; 13(3):305-312. doi: 10.1261/rna.373107.
 6. Cavanaugh A.H.H.-L., Rothblum L.I. Ribosomal DNA Transcription in Mammals. In *The nucleolus*. Edited by Olson M.O.J. (Landes, Austin, TX): Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 2004.
 7. Moss T., Stefanovsky V.Y. At the center of eukaryotic life. *Cell*. 2002; 109(5): 545-548. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00761-4.
 8. Chan J.C., Hannan K.M., Riddell K., et al. AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Sci Signal*. 2011; 4(188):ra56. doi:10.1126/scisignal.2001754.
 9. Hannan R.D., Rothblum L.I. Regulation of ribosomal DNA transcription during neonatal cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 1995; 30(4):501-510.
 10. Hein N., Sanij E., Quin J., et al. The Nucleolus and Ribosomal Genes in Aging and Senescence. In *Senescence*. Edited by Nagata T. InTech; 2012. ISBN: 978-953-51-0144-4.
 11. Roussel P., André C., Masson C., et al. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci*. 1993; 104 (Pt 2):327-337.
 12. Drygin D., Rice W.G., Grummt I. The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010; 50:131-156. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105844
 13. Quin J.E., Devlin J.R., Cameron D., et al. Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842(6):802-816. doi:10.1016/j.bbadis.2013.12.009
 14. Hannan K.M., Sanij E., Rothblum L.I., et al. Dysregulation of RNA polymerase I transcription during disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1829 (3-4):342-360. doi:10.1016/j.bbagr.2012.10.014
 15. Diesch J., Hannan R.D., Sanij E. Perturbations at the ribosomal genes loci are at the centre of cellular dysfunction and human disease. *Cell Biosci*. 2014; 4:43. doi:10.1186/2045-3701-4-43
 16. McStay B., Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008; 24:131-157. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259.
 17. Stults D.M., Killen M.W., Pierce H.H., Pierce A.J. Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome Res*. 2008; 18(1):13-18. doi:10.1101/gr.6858507
 18. Paredes S., Branco A.T., Hartl D.L., et al. Ribosomal DNA deletions modulate genome-wide gene expression: "rDNA-sensitive" genes and natural variation. *PLoS Genet*. 2011; 7(4):e1001376. doi:10.1371/journal.pgen.1001376
 19. Guetg C., Lienemann P., Sirri V., et al. The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats. *EMBO J*. 2010; 29(13):2135-2146. doi:10.1038/emboj.2010.17
 20. Caburet S., Conti C., Schurra C., et al. Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. *Genome Res*. 2005; 15(8):1079-1085. doi:10.1101/gr.3970105
 21. Ganley A.R., Kobayashi T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Res*. 2007; 17(2):184-191. doi:10.1101/gr.5457707
 22. Gibbons J.G., Branco A.T., Godinho S.A., et al. Concerted copy number variation balances ribosomal DNA dosage in human and mouse genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(8):2485-2490. doi:10.1073/pnas.1416878112
 23. Gibbons J.G., Branco A.T., Yu S., Lemos B. Ribosomal DNA copy number is coupled with gene expression variation and mitochondrial abundance in humans. *Nat Commun*. 2014; 5:4850. doi:10.1038/ncomms5850
 24. Veiko N.N., Egorina N.A., Radzivil G.G. et al. Kolichestvennoye opredeleniye povtoryayushchikhsya posledovatel'nostey v genomnoy DNK cheloveka. Obnaruzheniye uvelichennoy kolichestva ribosomnykh povtorov v genomakh bol'nykh shizofreniyei (rezul'taty molekulyarnogo i tsitogeneticheskogo analiza) [Quantification of repetitive sequences in human genomic DNA. Detection of an increased number of ribosomal repeats in the genomes of schizophrenic patients (results of molecular and cytogenetic analysis)]. *Molekulyarnaya biologiya* [Molecular biology]. 2003; 37 (3): 409-419 (In Russ.)
 25. Chestkov I.V., Veiko N.N., Ershova L.S., Sergeeva V.A., Veiko R.V., Izhevskaya V.L., Kostuyk S.V. Metod analiza chisla kopiy GC-bogatykh povtoryayushchikhsya posledovatel'nostey genoma v sostave povrezhdennoy DNK. Opredeleniye uvelichennoy soderzhaniya ribosomnykh genov v tsirkuliruyushchey vnekletochnoy DNK lits s dlitel'nyim stazhem kureniya tabaka [The method for analysis of the copy number variations of GC-rich repeat of human genome in damaged DNA. Detection of increasing copy number of ribosomal genes in extracellular DNA circulating in blood plasma of smokers' humans]. *Meditinskaya genetika* [Medical Genetics]. 2016; 15(1):43-50. (In Russ.)
 26. Chestkov I.V., Jestkova E.M., Ershova E.S., et al. Abundance of ribosomal RNA gene copies in the genomes of schizophrenia patients. *Schizophr Res*. 2018; 197:305-314. doi:10.1016/j.schres.2018.01.001
 27. Malinovskaya E.M., Ershova E.S., Golimbet V.E., 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. doi:10.3389/fgene.2018.00306.
 28. Ershova E.S., Malinovskaya E.M., Golimbet V.E., et al. Copy number variations of satellite III (1q12) and ribosomal repeats in health and schizophrenia [published online ahead of print, 2020 Aug 6]. *Schizophr Res*. 2020; S0920-9964(20)30415-1. doi:10.1016/j.schres.2020.07.022
 29. Madireddy S., Madireddy S. Regulation of Reactive Oxygen Species-Mediated Damage in the Pathogenesis of Schizophrenia. *Brain Sci*. 2020; 10(10):742. doi:10.3390/brainsci10100742
 30. Veiko N.N., Terekhov S.M., Shubaeva N.O., et al. "Ranniy" i "pozdnii" otvet kul'tiviruyemykh fibroblastov kozhi zdorovykh donorov i bol'nykh revmatoidnym artritom na oksidativnyy stress. Vzaimosvyaz' mezhdu intensivnost'yu gibeli kletok i kolichestvom aktivnykh kopi-y ribosomnykh genov ["Early" and "late" response of cultured skin fibroblasts of healthy donors and patients with rheumatoid arthritis to oxidative stress. The relationship between the rate of cell death and the number of active copies of ribosomal genes]. *Molekulyarnaya biologiya* [Molecular Biology]. 2005; 39 (2): 264-275. (In Russ.)
 31. Petrova N.V., Timkovskaya E.E., Zinchenko R.A., Ginter E.K. Analiz chastoty nekotorykh mutatsiy v gene CFTR v raznykh populyatsiyakh Rossii [Analysis of the frequency of some mutations in the CF-TR gene in different populations of Russia]. *Meditinskaya genetika* [Medical genetics]. 2006; 2: 32-39 (In Russ.)
 32. Castellani C., Macek M. Jr, Cassiman J.J., et al. Benchmarks for cystic fibrosis carrier screening: a European consensus document. *J Cyst Fibros*. 2010; 9(3):165-78. doi: 10.1016/j.jcf.2010.02.005.
 33. Bell S.C., Mall M.A., Gutierrez H., et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med*. 2020; 8(1): 65-124. doi: 10.1016/S2213-2600(19)30337-6.
 34. Saint-Criq V., Gray M.A. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(1):93-115. doi: 10.1007/s00018-016-2391-y.
 35. Lee T.W., Brownlee K.G., Conway S.P., Denton M., Littlewood J.M. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa*

- infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2003 Mar;2 (1):29-34. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(02\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(02)00141-8)
36. Ershova E.S., Malinovskaya E.M., Konkova M.S., et al. Copy Number Variation of Human Satellite III (1q12) With Aging. *Front Genet*. 2019; 10:704. doi:10.3389/fgene.2019.00704.
 37. Klinicheskiye rekomendatsii «Kistoznyy fibroz (mukovistsidoz)» (vozrastnaya gruppа - vzroslyye i deti) [Clinical guidelines “Cystic fibrosis (cystic fibrosis)” (age group - adults and children)] 2020, KR372/1 (In Russ.).
 38. Voronkova A.Y., Amelina E.L., Kashirskaya N.Y., Kondratyeva E.I., Krasovsky S.A., Starinova M.A., Kapranov N.I., ed. Registr bol'nykh mukovistsidozom v Rossiyskoy Federatsii. 2018 [Registry of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. 2018]. M.: ID «MEDPRAKTIKA-M» [M.: Publishing House “MEDPRACTICA-M”], 2019, 90 (In Russ.).
 39. Konkova M.S., Ershova E.S., Savinova E.A., et al. 1Q12 Loci Movement in the Interphase Nucleus Under the Action of ROS Is an Important Component of the Mechanism That Determines Copy Number Variation of Satellite III (1q12) in Health and Schizophrenia. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:386. Published 2020 Jun 5. doi:10.3389/fcell.2020.00386
 40. Lyapunova N.A., Veiko N.N. Ribosomnyye geny v genome cheloveka: identifikatsiya chetyrekh fraktsiy, ikh organizatsiya v yadryshke i metafaznykh khromosomakh [Ribosomal genes in the human genome: identification of four fractions, their organization in the nucleolus and metaphase chromosomes]. *Genetika [Genetics]*. 2010; 46 (9): 1205-1209 (In Russ.).
 41. Xu B., Li H., Perry J.M., et al. Ribosomal DNA copy number loss and sequence variation in cancer. *PLoS Genet*. 2017;13(6):e1006771. Published 2017 Jun 22. doi:10.1371/journal.pgen.1006771
 42. MacInnes A.W. The role of the ribosome in the regulation of longevity and lifespan extension. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016;7(2):198-212. doi:10.1002/wrna.1325
 43. Tiku V., Jain C., Raz Y., et al. Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nat Commun*. 2017; 8:16083. Published 2017 Aug 30. doi:10.1038/ncomms16083
 44. Bersaglieri C., Santoro R. Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells*. 2019; 8(6):579. doi: 10.3390/cells8060579
 45. Yu S., Lemos B. The long-range interaction map of ribosomal DNA arrays. *PLoS Genet*. 2018; 14(3):e1007258. doi:10.1371/journal.pgen.1007258
 46. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Klushevskaya E.S., et al. rDNA Clusters Make Contact with Genes that Are Involved in Differentiation and Cancer and Change Contacts after Heat Shock Treatment. *Cells*. 2019;8(11):1393. doi:10.3390/cells8111393