

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2025.01.23-33>

Сравнительное исследование комплекса рибосомных генов в клетках периферической крови больных кататонической и параноидной формами шизофрении

Агафонова О.Н.¹, Ершова Е.С.¹, Мартынов А.В.¹, Салимова Т.А.¹, Костюк Г.П.², Захарова Н.В.³, Вейко Н.Н.¹, Костюк С.В.¹

1 – ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

2 – Психиатрическая клиническая больница № 1 имени Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения города Москвы
117152, г. Москва, Загородное шоссе, д. 2

3 – Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева,
Институт персонализированной психиатрии и неврологии
192019, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 3

Впервые проведено сравнительное исследование характеристик комплекса рибосомных генов (рДНК) в клетках крови больных кататонической и параноидной формами шизофрении и контрольной выборки. В исследовании приняли участие больные шизофренией, которые проживают в г. Москве и Московской области и проходили лечение в связи с обострением заболевания в Психиатрической клинической больнице № 1 имени Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения города Москвы. Было сформировано три группы: кататоническая шизофрения (N=124); диагноз (МКБ-10): F20.2; группа больных параноидной формой шизофрении (N=450), (F20.0) и группа контроля (N=240) – психически здоровые люди. Определили уровень повреждения рДНК и ДНК ядер (проточная цитометрия), число копий рДНК в клетке (нерадиоактивная гибридизация), уровень транскрипции рДНК и количество 18S рРНК (ОТ-ПЦР). Кататония ассоциирована с более высоким уровнем повреждения рДНК и ДНК и с большим содержанием рДНК и 18S рРНК в клетках крови больных. Предполагается, что повышенный уровень биогенеза рибосом, включая большое содержание копий рДНК в клетках больных с кататонией, необходим для эффективного ответа на более сильный окислительный стресс.

Ключевые слова: рибосомные гены, рибосомная РНК, шизофрения, кататония, параноидная шизофрения.

Для цитирования: Агафонова О.Н., Ершова Е.С., Мартынов А.В., Салимова Т.А., Костюк Г.П., Захарова Н.В., Вейко Н.Н., Костюк С.В. Сравнительное исследование комплекса рибосомных генов в клетках периферической крови больных кататонической и параноидной формами шизофрении. *Медицинская генетика*. 2025; 24(1): 23-33.

Автор для корреспонденции: Ершова Е.С.; e-mail: es-ershova@rambler.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке в рамках темы НИР № госрегистрации 123052200003-6.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 18.12.2024

Comparative study of the complex of ribosomal genes in peripheral blood cells of patients with catatonic and paranoid forms of schizophrenia

Agafonova O.N.¹, Ershova E.S.¹, Martynov A.V.¹, Salimova T.A.¹, Kostyuk G.P.², Zakharova N.V.³, Veiko N.N.¹, Kostyuk S.V.¹

1 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechie st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 – Psychiatric Hospital no. 1 Named after N.A. Alexeev of the Department of Health of Moscow
2, Zagorodnoye shosse, Moscow, 117152, Russian Federation

3 – V.M. Bekhterev National Medical Research Center for Psychiatry and Neurology, The Institute of Personalized Psychiatry and Neurology
3, Bekhtereva st., St Petersburg, 192019, Russian Federation

For the first time, a comparative study of the characteristics of the ribosomal gene complex (rDNA) in the blood cells of patients with catatonic and paranoid schizophrenia and a control sample was conducted. The study involved patients with schizophrenia who live in Moscow and the Moscow region and were treated for an exacerbation of the disease at the N.A. Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1 of the Moscow City Health Department. Two groups were formed: catatonic schizophrenia (N 124); diagnosis (ICD-10): F20.2; a group of patients with the paranoid form of schizophrenia (N 450), (F20.0) and a control group (N = 240) – mentally healthy people. The level of rDNA and nuclear DNA damage (flow cytometry), the number of rDNA copies in a cell (non-radioactive hybridization), the level of rDNA transcription and the amount of 18S rRNA (RT-PCR) were determined. Catatonia is associated with higher levels of rDNA and DNA damage and higher levels of rDNA and 18S rRNA in the blood cells of patients. It is suggested that increased levels

of ribosome biogenesis, including higher levels of rDNA copies in the cells of patients with catatonia, are necessary for an effective response to higher oxidative stress.

Keywords: ribosomal genes, ribosomal RNA, schizophrenia, catatonia, paranoid schizophrenia.

For citation: Agafonova O.N., Ershova E.S., Martynov A.V., Salimova T.A., Kostyuk G.P., Zakharova N.V., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Comparative study of the complex of ribosomal genes in peripheral blood cells of patients with catatonic and paranoid forms of schizophrenia. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2025; 24(1): 23-33. (In Russian).

Corresponding author: Ershova E.S.; **e-mail:** es-ershova@rambler.ru

Funding. The study was carried out with financial support within the framework of the search topic N 123052200003-6

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 18.12.2024

Введение

В конце прошлого века, благодаря методам медицинской генетики, было установлено ведущее значение генетических факторов в возникновении шизофрении. Обнаружилось, что не существует какого-то определенного локуса или одной хромосомы, которые бы были связаны с проявлением различных форм болезни, и можно было бы с уверенностью поставить диагноз. Выдвигалась гипотеза о влиянии множества разных генов, которые в определенной комбинации провоцируют проявления заболевания. Многие научные группы в настоящее время работают над поиском генетических вариантов, которые были бы надежно ассоциированы с шизофренией [1].

Шизофрения характеризуется высоким уровнем хронического окислительного стресса. Окислительный стресс является одной из основных причин хронического воспаления и активации иммунной системы организма, которые приводят к нарушению работы мозга [2-4]. Метаанализ данных показал наличие отклонений, связанных с окислительным стрессом, в различных биомаркерах периферической крови у пациентов с шизофренией, независимо от применяемых антипсихотических препаратов [5]. Причиной дисбаланса между прооксидантными и антиоксидантными сигнальными путями в клетках больных, по-видимому, являются особенности генома, включающие мутации, различные генетические и эпигенетические варианты, вариации числа копий различных участков генома. Окислительный стресс фиксируют не только в организме больного, но и в культивируемых вне организма первичных клетках и в клеточных линиях, например, в культивируемых фибробластах кожи больных [6,7]. Этот факт еще раз подчеркивает генетическую причину окислительного стресса в клетках больных шизофренией. Однако окислительный стресс ассоциирован

со многими хроническими заболеваниями человека, но не все эти заболевания сопровождаются психическими нарушениями. По-видимому, развитие шизофрении обусловлено также чувствительностью генов, регулирующих работу мозга, к функционированию в условиях высокого уровня активных форм кислорода и азота. Исследования показывают, что патофизиология шизофрении включает в себя сложное взаимодействие нарушений окислительно-восстановительной регуляции, нейровоспаления и гиподисфункции NMDA-рецепторов, образуя «центральный узел», который способствует аномальному развитию нервной системы [8].

Чтобы клетки организма, а первоначально клетки эмбриона, могли функционировать в условиях хронического стресса, обусловленного генетическими нарушениями, необходим позитивный генетический фактор, направленный на снижение уровня повреждений, вносимых активными формами кислорода и азота в клеточные структуры. В противном случае эмбриогенез может не реализоваться вследствие повреждений, не совместимых с развитием. Одним из таких гипотетических позитивных факторов является повышенный уровень биогенеза рибосом. Большое количество рибосом обуславливает более активный синтез белков, которые противодействуют окислительному стрессу и репарируют повреждения ДНК.

Количество рибосом в клетке зависит от ряда факторов, среди которых центральное место занимает транскрипция рибосомных генов, которые кодируют РНК рибосом (рРНК). В геноме человека повторы рибосомной ДНК (рДНК) представляют собой кластеры тандемно расположенных единиц (рис. 1А), ориентированных «голова — хвост», которые локализованы в r-районах акроцентрических хромосом (13, 14, 15, 21 и 22). Рибосомный повтор кодирует субъединицы 18S,

5,8S и 28S рРНК, которые, наряду с 5S рРНК и с 70–80 рибосомальными белками, являются важными компонентами эукариотической рибосомы.

В 2003 г. впервые описано повышенное содержание копий рибосомных генов в геномах 42 больных параноидной формой шизофрении по сравнению с контрольной выборкой [9]. Многократное увеличение выборки больных (до 956 человек) подтвердило первоначальное наблюдение о большом количестве копий рДНК в геномах больных шизофренией [10,11]. В последние годы появляются работы, в которых также сообщают об увеличенном числе копий рДНК в геномах больных шизофренией из японской популяции [12] и о резко увеличенной активности генов, вовлеченных в процессе биогенеза рибосом, в клетках больных шизофренией [13].

Когорты больных шизофренией не однородны с точки зрения уровня окислительного стресса в организме и тяжести состояния. Выделяют несколько форм заболевания, среди которых наиболее изучены параноидная и кататоническая. Кататоническая шизофрения – это подтип шизофрении, характеризующийся наличием кататонического синдрома. Этот синдром, помимо характерных для шизофрении нарушений работы мозга, включает в себя разнообразные двигательные расстройства, такие как кататонический ступор, возбуждение, катаlepsия, восковая гибкость и другие. Распространенность кататонии среди пациентов с психическими заболеваниями составляет 9% [14–16]. Кататония ассоциирована с более тяжелым состоянием больных и с более высоким уровнем окислительного стресса по сравнению с некататоническими формами шизофрении, включая параноидную [17].

Можно предположить, что ДНК клеток больных кататонической формой шизофрении подвержена большему воздействию окислительного стресса и содержит большее количество повреждений. Сравнительных исследований уровня повреждения ДНК при двух формах шизофрении пока не проводили, но можно предположить, что геномы больных кататонической формой содержат меньше копий рДНК, чем геномы больных с параноидной формой, что приводит к снижению уровня ответа клеток на окислительный стресс. Однако возможен и другой вариант: высокий уровень стресса ассоциирован с высоким уровнем биогенеза рибосом, включая увеличенное число копий рДНК.

В данном исследовании мы впервые сравнили уровни повреждения ДНК, содержание рДНК в ДНК и содержание рРНК в РНК клеток крови больных параноидной и кататонической формами шизофрении.

Материалы и методы

Исследуемые группы

В исследовании приняли участие больные шизофренией, которые проживают в г. Москве и Московской области. Больные шизофренией проходили лечение в связи с обострением заболевания в Психиатрической клинической больнице № 1 имени Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения г. Москвы. Обследование пациентов включало психопатологическое обследование (оригинальное и международное структурированное интервью), психометрическое обследование (PANSS, HAM-D, CGI, UKU, шкала мании Янга) для формализованной оценки психического статуса, регистрацию социально-демографических данных, объективную оценку когнитивных функций (проводилась после стабилизации психического состояния с использованием батареи когнитивных тестов), регистрацию данных о психофармакотерапии. Выраженность кататонических расстройств, оценивалась по шкале кататонии Буша–Фрэнсиса (Bush Francis Catatonia Rating Scale, BFCRS) [16].

После взятия венозной крови госпитализированным больным назначалась терапия антипсихотическими препаратами для купирования галлюцинаторно-бредовой и аффективно-бредовой симптоматики. Наиболее часто (65% наблюдений) назначались атипичные антипсихотики (рисперидон, кветиапин, оланзапин, зупентиксол, zipразидон, палиперидон, арипипразол, амисульпирид, клозапин). Типичные нейролептики (хлорпромазин, сульпирид, галоперидол, хлорпротиксен) применялись в качестве купирующей антипсихотической терапии в первые дни лечения. В результате анализа выборки обследованных больных шизофренией было сформировано две группы.

Группа больных с кататоническими проявлениями (N=124), SZ(C). Верифицированный диагноз шизофрении по Международной классификации болезней (МКБ-10): кататоническая шизофрения (F20.2). Возраст – от 24 до 52 лет (среднее 38 ± 17 лет), мужчин – 63%. Длительность заболевания – от 1 года до 10 лет.

Группа больных параноидной формой шизофрении (N=450), SZ(P). Диагноз (МКБ-10): параноидная шизофрения (F20.0). Возраст – от 18 до 62 лет (среднее 42 ± 14 лет), мужчин – 69%. Длительность заболевания – от 1 года до 15 лет.

Критерии не включения больных шизофренией в исследование: (1) сопутствующие психические расстройства (зависимости от наркотиков и психоактивных веществ); (2) органические психические рас-

стройства любого генеза, слабоумие или умственная отсталость; (3) соматические и неврологические заболевания, которые могут повлиять на диагностику и течение психического расстройства; (4) острое или хроническое тяжелое соматическое заболевание, препятствующее прохождению обследования; (5) отказ пациента от участия в исследовании в любой момент его проведения.

Группа контроля (N=240), (К) психически здоровые люди, которые проживают в г. Москве и Московской области и не имеют родственников с психическими заболеваниями. Возраст – от 25 до 59 лет (среднее 48 ± 19 лет), мужчин – 49%.

Этическая экспертиза

Участники исследования подписывали информированное согласие на отбор венозной крови (6 мл) и проведение научно-исследовательских экспериментов с биоматериалом. Исследование было одобрено Независимым междисциплинарным этическим комитетом по этической экспертизе клинических исследований [(Ленинградский проспект, д. 51, г. Москва, 125468, Россия, 8 (915) 346-30-30); Протокол №4 (от 15 марта 2019 г.) научного минимально интервенционного исследования «Молекулярные и нейрофизиологические маркеры эндогенных человеческих психозов»].

Количественный анализ числа копий рДНК в ДНК методом гибридизации

Методики, применяемые в данном исследовании, очень подробно изложены ранее [10]. ДНК выделяли из лизированной лейкоцитарной массы после обработки РНКазой А и протеиназой К, используя метод экстракции органическими растворителями (фенол, фенол/хлороформ) и осаждение ДНК 70% этанолом. Концентрацию ДНК в растворе измеряли в два этапа: (1) спектрофотометрически на приборе Shimadzu UV-160A при длине волны 260 нм с учетом светорассеяния (320 нм); (2) более точное определение концентрации проводили флуоресцентным методом с применением набора Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit. Для анализа рибосомного повтора методом дот-гибридизации применили ДНК-зонд, который содержал EcoRI фрагмент транскрибируемой области повтора (5836 п.н., позиции от –515 до 5321 п.н.; GenBank № U13369), клонированный в плазмиду pVR322 (рис.1А). В рамках одного эксперимента по гибридизации на фильтр наносили по 3 параллельных пробы каждого образца ДНК. Опыт повторяли 2 раза. Для определения содержания повторов по результатам гибридизации использовали программу «Image 6.0» (ФГБНУ МГНЦ).

Количественный анализ числа копий рДНК в ДНК методом ПЦР

Подбор и синтез праймеров для анализа участков рДНК проводила компания Evrogen (Москва, Россия). ПЦР в реальном времени проводили в растворе, содержащем 1-кратный Taq буфер, 6мМ MgCl₂, 3% ДМСО, 0,2мМ каждого dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), праймеры на анализируемый фрагмент генома в конечной концентрации 0,4мкМ каждого, 10-100нг исследуемого образца ДНК, 1-кратный SYBR green I (или 1мкМ TaqMan зонд), 1,5 ед. Taq полимеразы. Реакцию проводили в 96-луночных планках на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems) в двух повторностях для каждого образца ДНК. Условия амплификации: 95°C 5 мин, далее 44 цикла при 95°C 25 сек, 60°C 25 сек, 72°C 25 сек.

Количественный анализ рРНК в РНК, выделенной из лейкоцитов крови

РНК выделяли из клеток с использованием наборов YellowSolve (Klonogen, Санкт-Петербург, Россия) или реагента Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) по указанной методике (http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf). Проводили экстракцию фенол-хлороформом и осаждение хлороформом и изоамиловым спиртом (49:1). Концентрацию РНК определяли с использованием красителя Quant-iT RiboGreen RNA Reagent (R11491 Invitrogen, Carlsbad, California, USA) на планшетном ридере EnSpire (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA), $\lambda_{em} = 487$ нм, $\lambda_{fl} = 524$ нм. Реакцию обратной транскрипции проводили по стандартному протоколу с использованием реагентов компании Sileks (Москва, Россия). ПЦР проводили с использованием специфических праймеров и интеркалирующего красителя Sybr-Green на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Подбор и синтез праймеров для анализа участков рРНК проводила компания Evrogen (Москва, Россия). Реакционная смесь для ПЦР в объеме 25 мкл состояла из 2,5 мкл буфера для ПЦР (700 ммоль/л Tris-HCl, pH 8,6; 166 ммоль/л сульфата аммония, 35 ммоль/л MgCl₂), 2 мкл 1,5 ммоль/л раствора dNTP; и 1 мкл 30 ммоль/л раствора праймера, кДНК. Условия ПЦР подбирались индивидуально для каждой пары праймеров. После денатурации в течение 4 мин при 95°C были проведены 40 циклов амплификации в следующем порядке: 94°C в течение 20 с, 56–62°C в течение 30 с, 72°C в течение 30 с и 72°C в течение 5 мин. Результаты были обработаны с использованием калибровочного графика. Погрешность составила 2%.

Определение двухцепочечных разрывов ДНК ядер выделенных лимфоцитов

Лимфоциты выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности в системе фикол-верографин. Клетки фиксировали 3,7% формальдегидом («ХимМед», Россия) 10 мин при 37°C, пермеабелизовали 0,2% раствором Тритон X-100 («Merck», Германия) 10 мин при комнатной температуре, и инкубировали с флуоресцентно мечеными антителами DyLight488 γ H2AX (pSer139) (nb100-78356G NovusBio, USA) 2 ч при 24°C. Детектировали методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре CyFlow® (Sysmex Partec GmbH, Германия).

Статистические методы

Для анализа результатов применили методы непараметрической статистики Манна-Уитни (сравнение выборок по значению показателей, вероятность p), Колмогорова-Смирнова (сравнение распределений образцов ДНК по содержанию повторов, параметры D и α) и Краскела-Уоллиса (сравнение трех распределений, параметры H и p). Для анализа корреляций между величинами применили статистику Спирмена (параметры β и p). Данные анализировали с использованием пакета «StatPlus2007 Professional software» (<http://www.analystsoft.com/>).

Выбор метода анализа

В настоящее время для анализа вариации числа копий повторяющихся последовательностей генома в мировой литературе используют два подхода: количественную ПЦР и биоинформатический анализ данных секвенирования геномов. Оба метода имеют недостатки, связанные с использованием реакции амплификации как для анализа, так и для приготовления библиотек для секвенирования. Было показано, что эффективность ПЦР для рДНК нелинейно зависит от степени повреждения ДНК. При низком уровне окисления ДНК эффективность ПЦР значительно возрастает, что обуславливает получение завышенной в несколько раз оценки числа копий рДНК в геноме. При высоком уровне окисления ДНК, напротив, имеет место значительное снижение определяемого содержания рДНК [10]. Зарубежные авторы также отмечают значительное варьирование в содержании рДНК в одних и тех же геномах в зависимости от метода приготовления библиотек для секвенирования и от центров, где данный анализ проводился [18]. Трудности в анализе рДНК методом ПЦР связаны с аномально высоким GC-составом, наличием большого числа мотивов

Gn с самым низким потенциалом окисления нуклеотида pG, неравномерностью метилирования рДНК в различных копиях и с тандемным характером рибосомных повторов.

Разработанный нами вариант метода нерадиоактивной дот-гибридизации оказался малочувствительным к повреждению и фрагментации рДНК. Мы неоднократно сравнивали результаты определения числа копий рДНК методом дот-гибридизации и методом ПЦР и пришли к заключению о малой применимости ПЦР для анализа рДНК в составе поврежденных образцов ДНК. Повреждения ДНК могут быть вызваны хроническим окислительным стрессом, который ассоциирован со старением или с заболеванием [10].

На рис. 1Б приводятся данные, иллюстрирующие вышесказанное. В малоповрежденных образцах ДНК, выделенных из лейкоцитов крови здоровых людей в возрасте до 50 лет, имеет место положительная корреляция между значениями параметра, определенными двумя методами. Коэффициент корреляции снижается для группы больных с параноидной формой шизофрении. Зависимость практически отсутствует в группе больных с кататонией. Значения параметра, определенные методом ПЦР для одних и тех же образцов ДНК, снижены в группах больных по сравнению со значениями, полученными методом гибридации.

В 2021 г. авторы провели анализ числа копий рДНК в группе здоровых людей методом, не предполагающим использование ПЦР (Оксфордская нанопора) [19]. Результаты исследования этих авторов полностью подтвердили наши данные о числе копий рДНК в выборках здоровых людей. Таким образом, для исследуемых образцов ДНК мы предпочли метод нерадиоактивной гибридации.

Результаты и обсуждение

ДНК группы SZ(C) более повреждена, чем ДНК группы SZ(P)

Сравнительный анализ данных гибридации и ПЦР ранее было предложено использовать для оценки уровня повреждения рДНК [10]. Параметр, равный отношению количеств рДНК в одном и том же образце ДНК, которые определили методами гибридации и ПЦР, отражает уровень окисления рДНК. Как следует из данных, представленных на рис. 1В, максимальный уровень окисления рДНК можно предположить в группе SZ(C).

Чтобы подтвердить предположение о высоком уровне повреждения ДНК в лимфоцитах больных группы SZ(C), мы проанализировали уровень дунитевых раз-

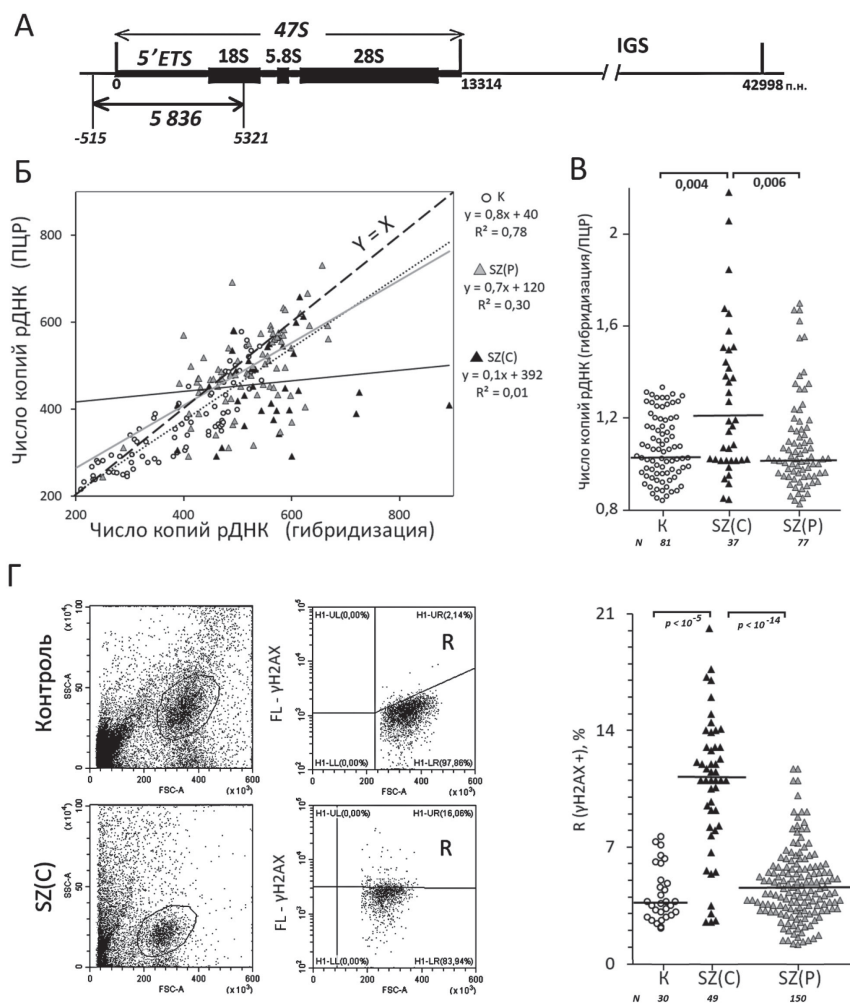


Рис. 1. У больных группы SZ(C) повышен уровень повреждения ДНК клеток крови. А – Схема рибосомного повтора человека. Показан ДНК-зонд, который использовали при анализе содержания рДНК методом нерадиоактивной количественной гибридизации в выделенной из лейкоцитов крови ДНК. Б – Сравнение двух методов количественного анализа рДНК в образцах ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови. Справа приводятся уравнения, описывающие зависимость содержания повтора, определенного методом ПЦР, от содержания повтора, определенного методом дот-гибридизации. В – Отношение, отражающее содержание рДНК в одних и тех же образцах ДНК, определенное методами гибридизации и ПЦР, отражающее уровень фрагментации рДНК в лейкоцитах крови. Горизонтальные линии – медианы. Группы сравнили методом Манна-Уитни. Г – Анализ уровня двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови трех групп методом проточной цитометрии. Слева для примера приводятся показания прибора для двух образцов клеток. Справа – данные о количестве клеток фракции R (γH2AX +) в лимфоцитах трех групп. Горизонтальные линии – медианы. Группы сравнили методом Манна-Уитни.

Fig. 1. Patients in the SZ(C) group have an increased level of DNA damage in blood cells. A – Diagram of the human ribosomal repeat. The DNA probe for the analysis of rDNA content in DNA isolated from blood leukocytes by non-radioactive quantitative hybridization is shown. B – Comparison of two methods for quantitative analysis of rDNA in DNA samples isolated from peripheral blood leukocytes. The equations describing the dependence of the repeat content determined by PCR on the repeat content determined by dot hybridization are shown on the right. B – The ratio reflecting the rDNA content determined by hybridization and PCR in the same DNA samples, reflecting the level of rDNA fragmentation in blood leukocytes. Horizontal lines are medians. The groups were compared by the Mann-Whitney method. Г – The level of double-stranded DNA breaks in blood lymphocytes of the three groups, obtained by flow cytometry. The instrument readings for two cell samples are shown on the left as an example. Data on the number of cells of fraction R (γH2AX +) in lymphocytes of three groups are shown on the right. Horizontal lines are medians. The groups were compared by the Mann-Whitney method.

рывов ДНК в ядрах лимфоцитов, выделенных из крови. Для анализа применили меченные антитела к фосфорилированной форме гистона γ H2AX, который предложено использовать в качестве маркера двуниевых разрывов ДНК (рис. 1Г). Анализировали содержание фракции клеток с большим количеством маркера. Популяции лимфоцитов больных группы SZ(C) содержат максимальное

количество двуниевых разрывов ДНК, что коррелирует с данными, представленными на рис. 1В.

Таким образом, рДНК больных с кататонией содержат больше повреждений, чем больных параноидной шизофренией и здоровых людей. Этот факт может говорить в пользу более высокого уровня окислительного стресса в организме больных группы SZ(C).

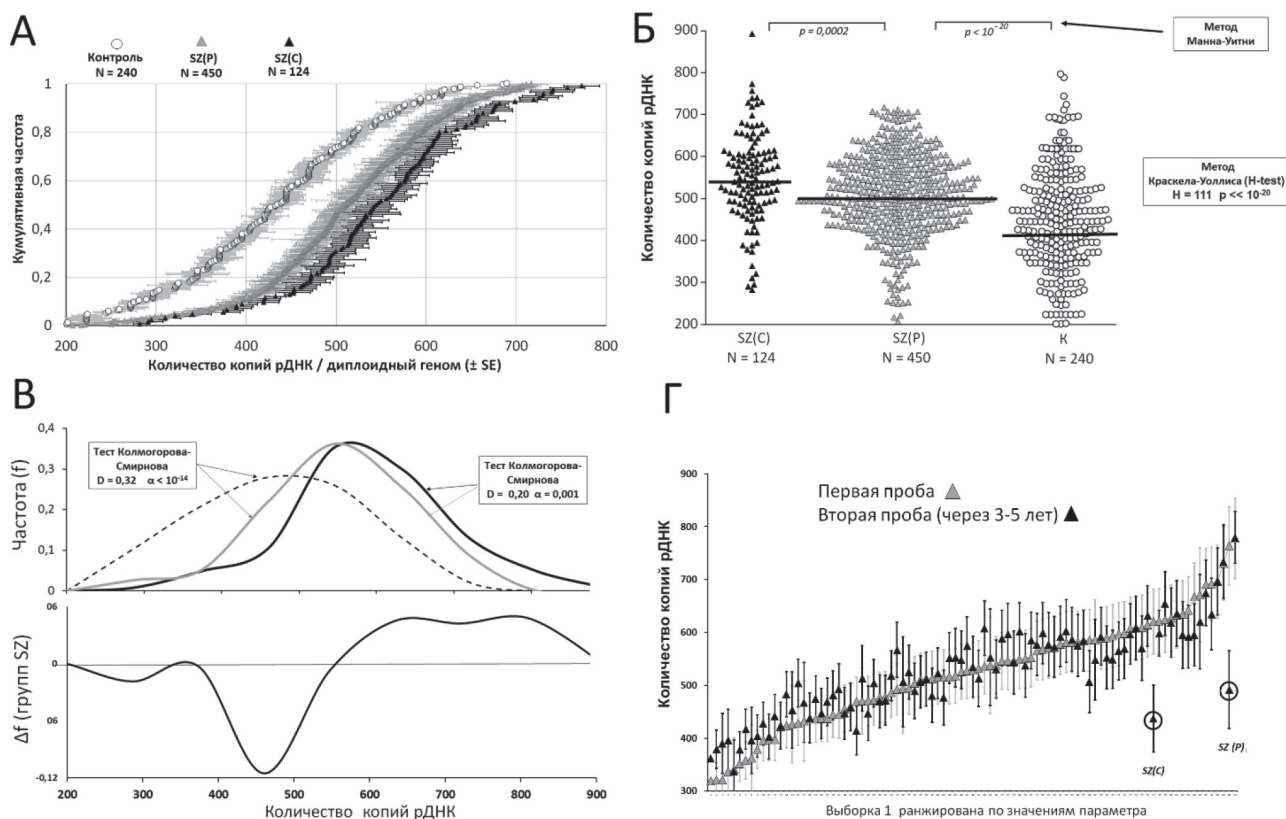


Рис. 2. Содержание рДНК в лейкоцитах крови больных трех исследуемых групп. А – Первичные экспериментальные данные, отражающие содержание рДНК в ДНК, выделенной из лейкоцитов крови всех участников исследования (N=814). Данные представлены в виде кумулятивных кривых. Приводятся среднее значение параметра для 3-5 измерений и стандартная ошибка (\pm SE) для каждого образца ДНК. Б – Анализ содержания рДНК у больных трех исследуемых групп с применением различных статистических методов (показаны справа). На графике приводятся экспериментальные данные и значения медиан (горизонтальные линии). В – Сравнение распределений числа копий рДНК в трех группах (верхний график). Нижняя кривая отражает различия в распределении параметра в группах больных шизофренией. Г – Изменения в содержании рДНК, наблюдаемые через 3–5 лет у больных шизофренией. Кругами обозначены достоверно отличающиеся значения параметра у одних и тех же больных (указана соответствующая SZ группа).

Fig. 2. The content of rDNA in the blood leukocytes of patients from the three studied groups. А – Primary experimental data reflecting the content of rDNA in DNA isolated from the blood leukocytes of all examined participants (N=814). The data are presented as cumulative curves. The average value of the parameter for 3-5 measurements and the standard error (\pm SE) for each DNA sample are given. Б – Analysis of the rDNA content in patients from the three studied groups using different statistical methods (shown on the right). The graph shows the experimental data and the median values (horizontal lines). В – Comparison of the distributions of the number of rDNA copies in the three groups (upper graph). The lower curve reflects the differences in the distribution of the parameter in the groups of patients with schizophrenia. Г – Changes in the content of rDNA after 3-5 years in patients with schizophrenia. Circles indicate significantly different values of the parameter in the same patients (the corresponding SZ group is indicated).

У больных группы SZ(C) выявлено большее количество рДНК, чем у больных группы SZ(P)

На **рис. 2А** и **2Б** приведены экспериментальные данные, отражающие содержание рДНК в трех исследуемых группах. В группе SZ(C) число копий рДНК варьирует от 282 до 893 (среднее 549 ± 106 , медиана 546, коэффициент вариации $K_v = 0,19$, $N=124$). В группе SZ(P) число копий рДНК варьирует от 207 до 717 (среднее 510 ± 96 , медиана 510, $K_v = 0,19$, $N=450$). Образцы ДНК группы контроля содержат от 201 до 690 копий рДНК (среднее 432 ± 107 , медиана 437, $K_v=0,25$, $N=240$).

Три группы достоверно различаются по содержанию рДНК в геноме лейкоцитов крови ($p < 10^{-20}$). У больных шизофренией выявлено больше копий рДНК, чем в группе здорового контроля ($p < 10^{-20}$). У больных группы SZ(C) наблюдалось большее количество рДНК, чем у больных группы SZ(P) ($p < 0,001$). Мы подтвердили данные об увеличенном числе копий рДНК в геномах больных параноидной шизофренией, которые были опубликованы ранее [9-11], и впервые обнаружили увеличенное число копий рДНК у больных кататонией по сравнению с больными параноидной формой.

При анализе многокопийных последовательностей важно проанализировать распределение числа копий в группах (**рис. 2В**). Все три распределения образцов ДНК по числу копий рДНК имеют нормальный характер. Группа SZ(C) по сравнению с группой SZ(P) содержит меньше образцов ДНК с содержанием рДНК 400-500 копий и больше образцов ДНК с содержанием рДНК более 550 копий. Процентное содержание относительно низкокопийных образцов (300 – 400 копий) в группах больных примерно одинаково.

В 41 образце ДНК группы SZ(C) и 50 образцах ДНК группы SZ(P) содержание рДНК было определено дважды с интервалом в 3–5 лет (**рис. 2Г**). Этот эксперимент позволяет оценить изменчивость данного показателя с течением времени в условиях хронического стресса, который сопутствует шизофрении. Из 91 пары проанализированных образцов ДНК только в двух (по одной из каждой группы) мы зафиксировали снижение содержания рДНК примерно на 20%. В целом, содержание рДНК не изменялось с учетом ошибки эксперимента. Снижение содержания рДНК в двух пробах, возможно, связано с потерей высоко метилированных копий, как было описано ранее [20].

Уровень транскрипционной активности рибосомных генов в лейкоцитах крови трех исследуемых групп

Можно предположить, что большое количество копий рДНК обуславливает повышенный уровень активности рибосомных генов в клетках. Однако это предположение требует проверки, поскольку в ядрышке не все копии рДНК активны, т.е. потенциально могут транскрибироваться и реально транскрибируются в определенный момент времени. Мы определили количество 5'ETS-рРНК в образцах РНК. Количество 5'ETS-рРНК отражает реальный уровень активности комплекса рибосомных генов. Полноразмерный транскрипт 47S рРНК процессируется до зрелых рРНК (18S, 5,8S, 28S), а остальные фрагменты 47S РНК очень быстро деградируют. На **рис. 3А** приводятся данные, отражающие количество 5'ETS-рРНК в образцах РНК, полученные методом ОТ-ПЦР.

Уровень транскрипции рДНК в лейкоцитах больных шизофренией достоверно выше, чем в контрольной выборке. Эти данные согласуются с ранее опубликованным фактом большего количества потенциально активных копий в геномах больных шизофренией [9] и с более высоким уровнем биогенеза рибосом у больных [13]. Группы SZ(C) и SZ(P) достоверно не различаются по содержанию 5'ETS-рРНК в образцах РНК. Однако анализ распределений показывает, что у половины больных группы SZ(C) содержание 5'ETS-рРНК в образцах РНК выше, чем в группе SZ(P) (**рис. 3А**).

На **рис. 3Б** приводится зависимость содержания 5'ETS-рРНК в лейкоцитах от количества копий рДНК. В контрольной выборке имеет место положительная корреляция между двумя показателями, описываемая логарифмическим уравнением. Чем больше в клетках копий рДНК, тем выше общий уровень транскрипции комплекса рибосомных генов. Однако в лейкоцитах больных шизофренией эта зависимость выражена в гораздо меньшей степени.

На **рис. 3В** приводятся экспериментальные данные, отражающие количество 18S рРНК в РНК клеток. Группа SZ(P) не отличается от контроля по этому показателю. В лейкоцитах крови больных группы SZ(C) содержание 18S рРНК достоверно больше, чем в лейкоцитах контроля и группы SZ(P). Имеет место значимая положительная корреляция ($p < 0,001$) между количеством копий рДНК и количеством 18S рРНК только для контрольной группы, хотя и менее выраженная, чем в случае 5'ETS-рРНК (**рис. 3Б**). В группах больных зависимость между двумя показателями менее выражена (**рис. 3Г**).

Заключение

Мы впервые показали, что у больных с кататонической формой шизофрении наблюдается в геноме больше копий рибосомных генов, чем у больных с параноидной формой. Большое количество копий рДНК в геномах больных из группы SZ(C) по сравнению со здоровыми людьми ассоциировано с более высоким уровнем транскрипции рДНК и с большим количеством рибосом в клетках. Повышенный уровень биогенеза рибосом, включая стадии транскрипции рДНК и созревания

рибосом, по-видимому, необходим для более успешной адаптации клеток крови больных SZ(C) к высокому уровню повреждения ДНК, вызванному высоким уровнем окислительного стресса у больных с кататонией.

Число копий рДНК в геноме является стабильным врожденным генетическим показателем, который мало изменяется в процессе жизни человека. В редких случаях можно наблюдать снижение содержания рДНК за счет потери гиперметилованных копий, но не амплификацию рибосомного повтора. Большое количество копий рДНК в геномах больных с кататонией,

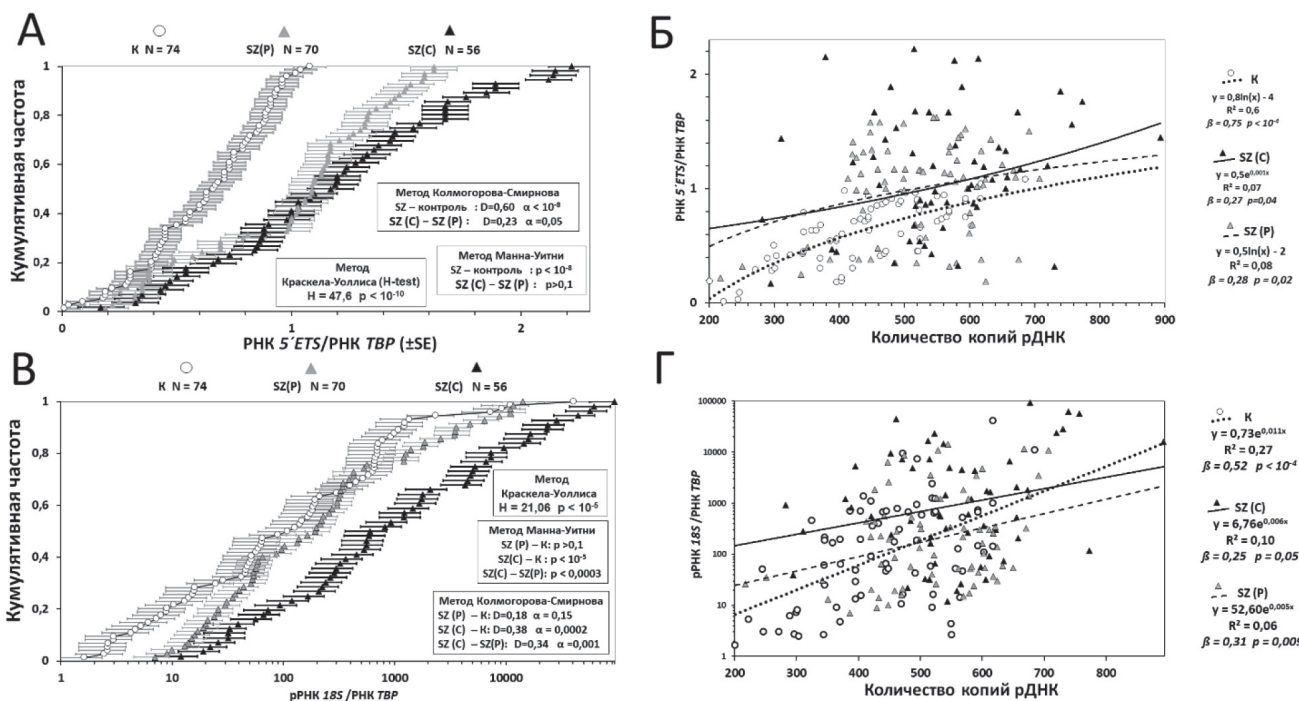


Рис. 3. Уровень транскрипционной активности рибосомных генов и количество рибосомной 18S рНК в лейкоцитах крови трех исследуемых групп. А и В – Первичные экспериментальные данные, отражающие содержание 5'ETS-рНК (А) или 18S-рНК (В) в рНК, выделенной из лейкоцитов крови (N=200). Данные представлены в виде кумулятивных кривых. Приводятся среднее значение параметра для трех измерений и стандартная ошибка (\pm SE) для каждого образца рНК. На графике приводятся данные непараметрической статистики для сравнения групп по содержанию рНК и для сравнения соответствующих распределений двух параметров в группах. Б и Г – Зависимость содержания 5'ETS-рНК (Б) или 18S-рНК (Г) в рНК, выделенной из лейкоцитов крови от количества копий рДНК в ДНК тех же образцов лейкоцитов. Справа на графиках приведены данные корреляционно-го анализа (β , p) и уравнения кривых, которые соответствуют максимальному коэффициенту корреляции.

Fig. 3. The level of transcriptional activity of ribosomal genes and the amount of ribosomal 18S rRNA in blood leukocytes of the three studied groups. A and B – Primary experimental data reflecting the content of 5'ETS-rRNA (A) or 18S-rRNA (B) in RNA isolated from blood leukocytes (N=200). The data are presented as cumulative curves. The mean value for three measurements and the standard error (\pm SE) for each RNA sample are given. The graph shows the data of nonparametric statistics for comparing the groups by rRNA content and for comparing the corresponding distributions of the two parameters in the groups. Б and Г – Dependence of the content of 5'ETS-rRNA (Б) or 18S-rRNA (Г) in RNA isolated from blood leukocytes on the number of rDNA copies in the DNA of the same leukocyte samples. The data of the correlation analysis (β , p) and the equations of the curves that correspond to the maximum correlation coefficient are shown on the right side of the graphs.

по-видимому, было нужно для успешного протекания процесса эмбриогенеза при наличии в геноме плода генетической патологии, приводящей к заболеванию в последующей жизни. При более низком содержании рДНК в геноме процесс эмбриогенеза может не реализоваться вследствие нехватки рибосом для ответа на стресс, индуцируемый этой патологией. Высказанное предположение о причинах высокого содержания рДНК в геноме больных шизофренией и, в частности, в геноме больных с кататонией, нуждается в дальнейшем экспериментальном подтверждении.

Литература

1. Резник А.М., Костюк Г.П., Морозова А.Ю., Захарова Н.В. Проблемы предпосылок шизофрении по данным молекулярно-генетических исследований. *Heal Food Biotechnol.* 2019;1(1):27–45.
2. Ermakov E.A., Dmitrieva E.M., Parshukova D.A., et al. Oxidative stress-related mechanisms in schizophrenia pathogenesis and new treatment perspectives. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:8881770.
3. Jorgensen A., Broedbaek K., Fink-Jensen A., et al. Increased systemic oxidatively generated DNA and RNA damage in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2013;209(3):417–423.
4. Ma J., Yan L., Guo T., et al. A pilot study of biomarkers of oxidative stress in serum and schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2020;284:112757.
5. Flatow J., Buckley P., Miller B. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2013;74(6):400–409.
6. Ershova E.S., Shmarina G.V., Martynov A.V., et al. NADPH-oxidase 4 gene over-expression in peripheral blood lymphocytes of the schizophrenia patients. *PLoS One.* 2022;17(6):e0269130.
7. Ershova E.S., Savinova E.A., Kameneva L.V., et al. Satellite III (1q12) copy number variation in cultured human skin fibroblasts from schizophrenic patients and healthy controls. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2023;28(8):191.
8. Steullet P., Janel N., Berthold C., et al. Redox dysregulation, neuroinflammation, and NMDA receptor hypofunction: A 'central hub' in schizophrenia pathophysiology? *Schizophr Res.* 2016;176(1):41–51.
9. Veiko N.N., Egolina N.A., Radzivil G.G., et al. Quantitation of repetitive sequences in human genomic DNA and detection of an elevated ribosomal repeat copy number in schizophrenia: The results of molecular and cytogenetic analyses. *Molecular Biology.* 2003;37:349–357.
10. Chestkov I.V., Jestkova E.M., Ershova E.S., et al. ROS-induced DNA damage associates with abundance of mitochondrial DNA in white blood cells of the untreated schizophrenic patients. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:8587475.
11. 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. *Schizophr Res.* 2020 Sep;223:199–212.
12. Li S., Otsuka I., Tanifuji T., et al. Ribosomal DNA gene copies are increased in blood and brain of Japanese schizophrenia patients. *PLoS One.* 2023;18(1):e0280694.
13. Dor H., Hertzberg L. Schizophrenia biomarkers: Blood transcriptome suggests two molecular subtypes. *Neuromolecular Med.* 2024;26(1):50.
14. Beckmann H., Franzek E., Stöber G. Genetic heterogeneity in catatonic schizophrenia: A family study. *Am J Med Genet – Semin Med Genet.* 1996;67(3):289–300.
15. Rogers J.P., Pollak T.A., Begum N., et al. Catatonia: demographic, clinical and laboratory associations. *Psychol Med.* 2023 Apr;53(6):2492–2502.
16. Bush G., Fink M., Petrides G., et al. Catatonia. I. Rating scale and standardized examination. *Acta Psychiatr Scand.* 1996;93(2):129–136.
17. Захарова Н.В., Зозуля С.А., Сарманова З.В., и др. Особенности иммунного профиля больных шизофренией с кататоническим синдромом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2020;120(6-2):46–53.
18. Hall A.N., Turner T.N., Queitsch C. Thousands of high-quality sequencing samples fail to show meaningful correlation between 5S and 45S ribosomal DNA arrays in humans. *Scientific Reports.* 2021;11:449.
19. Hori Y., Shimamoto A., Kobayashi T. The human ribosomal DNA array is composed of highly homogenized tandem clusters. *Genome Research.* 2021;31:1971–1982.
20. 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.

References

1. Reznik A.M., Kostyuk G.P., Morozova A.Y., Zakharova N.V. Problemy predposylok shizofrenii po dannym molekulyarno-geneticheskikh issledovaniy [Problems of Genetic Prerequisites of Schizophrenia – Data of Molecular Genetic Researches]. *Health, Food & Biotechnology.* 2019;1(1):27–45. (In Russ.)
2. Ermakov E.A., Dmitrieva E.M., Parshukova D.A., et al. Oxidative stress-related mechanisms in schizophrenia pathogenesis and new treatment perspectives. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:8881770.
3. Jorgensen A., Broedbaek K., Fink-Jensen A., et al. Increased systemic oxidatively generated DNA and RNA damage in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2013;209(3):417–423.
4. Ma J., Yan L., Guo T., et al. A pilot study of biomarkers of oxidative stress in serum and schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2020;284:112757.
5. Flatow J., Buckley P., Miller B. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2013;74(6):400–409.
6. Ershova E.S., Shmarina G.V., Martynov A.V., et al. NADPH-oxidase 4 gene over-expression in peripheral blood lymphocytes of the schizophrenia patients. *PLoS One.* 2022;17(6):e0269130.
7. Ershova E.S., Savinova E.A., Kameneva L.V., et al. Satellite III (1q12) copy number variation in cultured human skin fibroblasts from schizophrenic patients and healthy controls. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2023;28(8):191.
8. Steullet P., Janel N., Berthold C., et al. Redox dysregulation, neuroinflammation, and NMDA receptor hypofunction: A 'central hub' in schizophrenia pathophysiology? *Schizophr Res.* 2016;176(1):41–51.
9. Veiko N.N., Egolina N.A., Radzivil G.G., et al. Quantitation of repetitive sequences in human genomic DNA and detection of an elevated ribosomal repeat copy number in schizophrenia: The results of molecular and cytogenetic analyses. *Molecular Biology.* 2003;37:349–357.
10. Chestkov I.V., Jestkova E.M., Ershova E.S., et al. ROS-induced DNA damage associates with abundance of mitochondrial DNA in white

- blood cells of the untreated schizophrenic patients. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:8587475.
11. 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. *Schizophr Res.* 2020 Sep;223:199-212.
 12. Li S., Otsuka I., Tanifuji T., et al. Ribosomal DNA gene copies are increased in blood and brain of Japanese schizophrenia patients. *PLoS One.* 2023;18(1):e0280694.
 13. Dor H., Hertzberg L. Schizophrenia biomarkers: Blood transcriptome suggests two molecular subtypes. *Neuromolecular Med.* 2024;26(1):50.
 14. Beckmann H., Franzek E., Stöber G. Genetic heterogeneity in catatonic schizophrenia: A family study. *Am J Med Genet – Semin Med Genet.* 1996;67(3):289–300.
 15. Rogers J.P., Pollak T.A., Begum N., et al. Catatonia: demographic, clinical and laboratory associations. *Psychol Med.* 2023;53(6):2492–2502.
 16. Bush G., Fink M., Petrides G., et al. Catatonia. I. Rating scale and standardized examination. *Acta Psychiatr Scand.* 1996;93(2):129–136.
 17. Zakharova N.V., Zozulya S.A., Sarmanova Z.V., et al. Osobennosti immunnogo profilya bol'nykh shizofreniyey s katatonicheskim sindromom [Features of the immune profile of schizophrenic patients with catatonic syndrome]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova.* [S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry]. 2020;120(6-2):46-53. (In Russ.)
 18. Hall A.N., Turner T.N., Queitsch C. Thousands of high-quality sequencing samples fail to show meaningful correlation between 5S and 45S ribosomal DNA arrays in humans. *Scientific Reports.* 2021;11:449.
 19. Hori Y., Shimamoto A., Kobayashi T. The human ribosomal DNA array is composed of highly homogenized tandem clusters. *Genome Research.* 2021;31:1971–1982.
 20. 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.