

Копийность рибосомной ДНК (рДНК) в геномах женщин как фактор успешности ЭКО и наличия осложнений беременности

Пороховник Л.Н.¹, Вейко Н.Н.¹, Ершова Е.С.^{1,3}, Полеткина А.А.¹, Шмарина Г.В.¹, Долгих О.А.¹, Клименко П.А.², Клименко М.П.², Аветисова К.Г.², Костюк Э.В.², Курцер М.А.², Писарев В.М.³, Ижевская В.Л.¹, Куцев С.И.¹, Костюк С.В.^{1,3}

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова»
Москва, Россия

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

3 — НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского, Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии (ФНКЦ РР)
Москва, Россия

Определено количество копий рибосомных повторов (рДНК) в геномах женщин с нормальной и осложненной беременностью, а также женщин, подвергшихся процедуре экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Кроме того, измеряли содержание GC-богатой рДНК в образцах внеклеточной ДНК (вкДНК), полученных от женщин с нормальной и осложненной беременностью. Показано, что геномы более половины женщин с патологией беременности содержали либо больше, либо меньше копий рДНК, чем у любой женщины из контрольной группы. Также обнаружено более высокое содержание рДНК во вкДНК пациенток с осложненной беременностью, что свидетельствует о наличии хронического процесса аномальной гибели клеток в группе женщин с патологией беременности. Можно сделать принципиальный вывод: поскольку беременность является тяжелой нагрузкой на организм женщины, для успешного вынашивания требуется сбалансированный био-генез рибосом. Женщины как с низкой, так и с очень высокой копийностью рДНК имеют более высокую вероятность повышенного уровня апоптоза и попадания в группу риска. Параметр «число копий рДНК в геноме женщины» может служить дополнительным прогностическим маркером потенциальных осложнений беременности у женщины. Женщины с низким или высоким количеством копий рибосомных генов в геноме нуждаются в более внимательном ведении беременности. Показатели количества копий рДНК в геномах женщин с неудачными попытками ЭКО были значимо ниже, чем в геномах двух остальных групп. Этот факт говорит о том, что копийность рДНК в геноме является одним из факторов, влияющих на успех процедуры ЭКО. Если индивидуальное число копий рДНК в геноме женщины меньше, чем 330, высок риск неудачного ЭКО. Необходимы дальнейшие исследования данного вопроса.

Ключевые слова: ЭКО, осложнение беременности, рибосомные гены, число копий, рДНК

Для цитирования: Пороховник Л.Н., Вейко Н.Н., Ершова Е.С., Полеткина А.А., Шмарина Г.В., Долгих О.А., Клименко П.А., Клименко М.П., Аветисова К.Г., Костюк Э.В., Курцер М.А., Писарев В.М., Ижевская В.Л., Куцев С.И., Костюк С.В. Копийность рибосомной ДНК (рДНК) в геномах женщин как фактор успешности ЭКО и наличия осложнений беременности. *Медицинская генетика* 2019; 18(11): 14-25.

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.11.14-25

Автор для корреспонденции: Пороховник Лев Николаевич; **e-mail:** med-gen@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Минобрнауки России и поддержано грантом РНФ 18-15-00437 (применение метода нерадиоактивной количественной гибридизации для определения числа копий рибосомного повтора)

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 29.11.2019

Copy number of ribosomal genes in woman's genome is associated with IVF outcome and pregnancy complications

Porokhovnik L.N.¹, Veiko N.N.¹, Ershova E.S.^{1,3}, Poletkina A.A.¹, Shmarina G.V.¹, Dolgikh O.A.¹, Klimenko P.A.², Klimenko M.P.², Avetisova K.G., Kostyuk E.V.², Kurtser M.A.², Pisarev V.M.³, Izhevskaya V.L.¹, Kutsev S.I.¹, Kostyuk S.V.^{1,3}

1 – Research Centre for Medical Genetics n.a. N.P. Bochkov
Moscow, Russia

2 – N.I. Pirogov Russian National Research Medical University
Moscow, Russia

3 – V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology
Moscow, Russia

As pregnancy is a stressful load for a woman, any stress-resistance factor is relevant to it. According to recent reports, ribosomal gene copy number in the genome is associated with the individual stress-resistance. We determined copy numbers of ribosomal

DNA (rDNA) in genomes of pregnant women with normal and complicated pregnancy, and women after *in vitro* fertilization (IVF) procedure. We also measured the contents of GC-rich rDNA in cell-free DNA (cfDNA) derived from normal controls and complicated pregnancy cases. We have shown that genomes of more than a half of DNA samples from women with pregnancy pathology harbor either more, or less rDNA copies than any woman from the control group. We also found higher rDNA contents in cfDNA isolated from complicated pregnancy cases suggesting the presence of a permanent cell death process in pathology cases. A principal conclusion can be made: women with low rDNA copy numbers and with very high numbers can have higher cell death rates and belong to the risk group. The parameter «rDNA copy number in woman's genome» can be an additional prognostic marker for eventual pregnancy complications in the woman. The numbers of rDNA copies in the genomes of women with failed IVF attempts was significantly lower than in the genomes of patients with successful outcome, suggesting that rDNA copy number in the genome is one of the factors that affect the success of the IVF procedure. If the individual rDNA copy number is under 330, the risk of IVF failure is high. Further studies are warranted.

Key words: IVF, pregnancy complication, ribosomal genes, copy number, rDNA

For citation: Porokhovnik L.N., Veiko N.N., Ershova E.S., Poletkina A.A., Shmarina G.V., Dolgikh O.A., Klimenko P.A., Klimenko M.P., Avetisova K.G., Kostyuk E.V., Kurtser M.A., Pisarev V.M., Izhevskaya V.L., Kutsev S.I., Kostyuk S.V. Copy number of ribosomal genes in woman's genome is associated with IVF outcome and pregnancy complications. *Medical genetics* 2019; 18(11): 14-25. [In Rus]

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.11.14-25

Corresponding author: Porokhovnik Lev; **e-mail:** med-gen@mail.ru

Funding. The study was carried out within the state assignment of the Ministry of Education and Science of Russia and supported by a grant of the Russian Science Foundation 18-15-00437 (using the non-radioactive quantitative hybridization method to determine the number of copies of the ribosomal repeat)

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

Accepted: 29.11.2019.

Введение

Беременность — мощный стрессорный фактор для женщины. Известно, что индивидуальная стрессоустойчивость существенно варьирует в пределах популяции и генетически детерминирована. Стресс сопровождается массивной гибелью клеток. Плазма крови содержит циркулирующую внеклеточную ДНК (вкДНК). Основным источником вкДНК являются гибнущие клетки. Концентрация вкДНК отражает интенсивность гибели клеток, например, при воздействии ионизирующего излучения. Однако, зависимость порой носит непрямой характер. В одной из предыдущих работ мы исследовали плазму крови и лимфоциты, отобранные у людей, подвергавшихся воздействию высоких доз радиации, а также у лиц, работа которых была сопряжена с воздействием источников низких доз радиации. Было обнаружено, что уровень вкДНК повышается во время острой фазы клеточной гибели после воздействия высоких доз, тогда как хронический процесс гибели клеток, вызванный воздействием низких доз радиации, приводил к парадоксальному снижению уровней вкДНК по сравнению с контролем. При этом в результате хронического облучения оказались повышенными активность ДНКазы I и титры антител к ДНК. Мы выдвинули гипотезу, что в условиях хронического воздействия ионизирующего облучения развивается адаптивный от-

вет. Этот ответ направлен на выживание клеток и эффективное элиминирование вкДНК из кровотока [1]. Интересно, что не только количество, но и состав вкДНК меняется при хроническом процессе гибели клеток, вызванным воздействием низких доз гамма-нейтронного и тритиевого бета-излучения во время производственной деятельности исследованных лиц: доля AT-богатых регионов SatIII (1q12) снижена, а содержание GC-богатой рибосомной ДНК (рДНК) значительно увеличено в кровотоке облученных индивидов по сравнению с необлученным здоровым контролем [2]. Эти различия объясняются более высокой стабильностью GC-пар по сравнению с AT-парами. В свою очередь, циркулирующая рДНК является не просто маркером гибели клеток [3], но и биологически активной сигнальной молекулой, которая взаимодействует со специфическими рецепторами (TLR9, AIM2, RIG-I, DAI, STING), запуская каскад стресс-реакций [4–9]. Содержание внеклеточной рДНК и сила стресс-реакции зависят, в частности, от числа копий рДНК в геноме индивида.

Другая зависимость стрессоустойчивости и исхода беременности от количества рДНК в геноме опосредована основной функцией рДНК, формирующей структуру рибосомы. В пролиферирующих клетках млекопитающих доля рибосомной РНК (рРНК) до-

стигает 40% от общего количества транскриптов в клетке [10–12]. У дрожжей рДНК, состоящая из ~150 копий, продуцирует рРНК в объеме приблизительно 80% от общего количества внутриклеточной РНК [13]. Накоплен целый ряд экспериментальных доказательств в пользу того, что число копий рДНК в геноме имеет многочисленные и разнообразные фенотипические проявления в норме и патологии [14]. Поскольку количество копий рибосомных повторов лимитирует максимально возможный уровень биосинтеза белка в организме и служит характеристикой адаптивной способности индивида, мы предположили, что низкая копияность рибосомного повтора может быть причиной низкого уровня биосинтеза белков и, как следствие, снижать шансы успешного зачатия и вынашивания плода. Это предположение ранее было проверено нами путем сравнения выборок бесплодных и многодетных пар по одному расчетному параметру, связанному с количеством активных рибосомных генов в геноме, и результаты экспериментов косвенно показали связь бесплодия с копияностью рибосомных генов [15].

Общемировой современной тенденцией является рост числа бесплодных пар и, соответственно, растущее количество случаев ЭКО (экстракорпорального оплодотворения). У разных пар разные шансы на успех ЭКО. Результат зависит от состояния здоровья женщины, причины бесплодия, возраста женщины, эмоционального состояния, образа жизни, подготовки к ЭКО, качества спермы мужчины и многих других факторов.

Даже в случае успешного зачатия и начала вынашивания при ЭКО существует повышенный риск невынашивания беременности (остановка развития плода, спонтанный аборт, выкидыш). Поиск новых, еще не известных факторов бесплодия и неудач ЭКО необходим для дальнейшего прогресса в репродуктивной медицине.

Ранее мы установили путем анализа математической модели, что равновесный уровень активных форм кислорода (АФК) в клетке может зависеть от количества рибосомных генов в геноме клетки (подробности см. в разделе «Обсуждение»). Принимая во внимание растущее число экспериментальных фактов, связывающих бесплодие с окислительным стрессом, мы предположили, что копияность рДНК может быть связующим звеном между успешностью ЭКО и возможными осложнениями беременности, опосредованными свободнорадикальным стрессом и аномально повышенной гибелью клеток.

Таким образом, схема данного пилотного исследования основывается на сравнении количества копий рДНК в группах женщин с разной эффективностью ЭКО и в группах естественным образом забеременевших женщин с наличием осложнений беременности или без таковых.

Методы

Образцы крови брали у женщин с патологией беременности и женщин, прошедших процедуру ЭКО, в рамках программы сотрудничества МГНЦ с кафедрой акушерства и гинекологии педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Весь биологический материал для изучения был получен с соблюдением необходимых этических норм. Исследование одобрено Протоколом № 7 этического комитета ФГБНУ МГНЦ.

В исследование вошли 57 женщин, госпитализированных в стационар отделения патологии беременности (табл. 1). Их беременность была осложнена развитием нефропатии. Параллельно анализировали обследованы 52 женщины с нормальным течением беременности и отсутствием симптомов нефропатии или иных осложнений со стороны матери и плода.

Венозную кровь забирали в пробирки с гепарином. ДНК выделяли методом экстракции органическим растворителем. Раствор, содержащий 0,04 М ЭДТА, 2% натрий лаурил саркозилата и 150 мкг/мл РНКазы А («Sigma», США) добавляли к свежееотобранной крови на 45 минут при 37°C, обрабатывали протеиназой К (200 мкг/мл, «Promega», США) в течение 24 часов при 37°C, экстрагировали равными объемами смеси фено-

Таблица 1

Характеристика выборки женщин с патологией беременности

Показатель	Число женщин, n
Срок беременности, недель	
Дольше, чем 36	34
До 35	23
Количество белка в моче	
Высокий белок	42
Нормальное значение	15
Артериальное давление	
Высокое	33
Низкое	24
Клинические симптомы	
Жалобы на головную боль	16
Нет жалоб на головную боль	41
ВСЕГО ОБСЛЕДОВАНО	57

ла/хлороформа/изоамилового спирта (25:24:1), фенола и смеси хлороформа/изоамилового спирта (24:1). ДНК осаждали добавлением 1/10 объема 3 М ацетата натрия (рН 5,2) и 2,5 объемов ледяного этилового спирта. Фенол стабилизировали 8-гидроксихинолином. ДНК собирали путем центрифугирования при 10 000 G в течение 15 минут при 4°C, промывали 70% этанолом (об./об.), высушивали и растворяли в воде.

Содержание ДНК измеряли флуориметрически на приборе «EpSpike» (Финляндия) на длинах волн возбуждения и испускания 488 и 528 нм, соответственно. Относительная среднеквадратическая ошибка измерений содержания геномной ДНК составила 3%.

Содержание GC-обогащенных повторяющихся последовательностей в геномной и внеклеточной ДНК определяли методом нерадиоактивной количественной гибридизации. Для выявления рДНК человека (образец «GenBank» № U13369) использовали смесь зондов к рДНК олиго(18S) биотин-CTGTAATGATCCTTCCGACAGGTTACCTAC и олиго(28S) биотин-TATCGGTCTCGTGCCGGTATTGA GCCTTAG. Денатурированную ДНК наносили на фильтр (Optitran BA-S85, «GE Healthcare») в количестве 4–6 точек на каждый образец. Стандартные образцы геномной ДНК (50 нг/мл) с известным содержанием рДНК наносили на тот же самый фильтр, чтобы построить калибровочную кривую зависимости интенсивности сигнала от числа копий рДНК. ДНК фага лямбда (50 нг/мл) также наносили на тот же самый фильтр, чтобы контролировать уровень шума. Затем фильтр прогрели при 80°C в вакууме в течение 1,5 ч. После завершения гибридизации мембранный фильтр обработали конъюгатом стрептавидина с щелочной фосфатазой («Sigma») и поместили в раствор субстратов для щелочной фосфатазы (БХИФ/НСТ). После этого фильтр промывали водой, высушивали в темноте и сканировали. Для количественного определения рДНК нами была написана специальная программа «Imager 6», позволяющая вычислять интегральную интенсивность сигнала от каждой точки. Сигналы от всех точек, соответствующих одному и тому же образцу, суммировали и вычисляли среднее арифметическое и среднеквадратическую ошибку каждого образца. Относительная среднеквадратическая ошибка была равна $11 \pm 8\%$.

Обработку статистических данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel, Statistica 6.0, StatGraph и StatPlus2007 Professional. Применяли непараметрические методы Манна–Уитни (U-критерий) и Колмогорова–Смирнова. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

а) Зависимость наличия осложнений беременности от числа копий рДНК в геноме

Распределение количеств копий рДНК в группе патологии беременности характеризовалась более широким разбросом (диапазоном варьирования от минимума до максимума) и большим CV (коэффициентом вариации) (табл. 2). В группе нормальной беременности не встречалось значений рДНК свыше 508 и ниже 341 копии на диплоидный геном, тогда как среди женщин с патологией беременности в 16 случаях (28%) копийность рДНК была ниже, чем у любой женщины с нормальной беременностью, а в 15 образцах (26%) копийность рДНК была выше, чем у любой женщины с нормальной беременностью, исследованной нами (рис. 1).

Таким образом, обе группы характеризовались одинаковыми средними значениями копийности рДНК в геномах, но разными дисперсиями вследствие того, что многие женщины с патологией беременности имели крайне высокие или низкие показатели копийности рДНК. Более половины образцов ДНК, взятых у женщин с патологией беременности, содержали либо больше, либо меньше копий рДНК, чем любой из образцов ДНК из контрольной группы.

б) Содержание GC-пар во вкДНК женщин с нормальной и осложненной беременностью

Поскольку ранее было показано, что доля CG-пар возрастает при наличии хронического процесса ано-

Таблица 2

Данные описательной статистики копийности рДНК в геномах беременных женщин и результаты сравнения выборочных средних и медиан по U-критерию Манна–Уитни

Число копий (копийность) рДНК в геноме	Патология	Норма
Размер выборки, n	57	52
Среднее арифметическое	419	428
Стандартное отклонение	107	48
Среднеквадратичная ошибка	14	7
Минимум	191	341
Максимум	656	508
Разброс (максимум — минимум)	465	167
CV (коэффициент вариации)	0.25	0.11
Медиана	423	428
F-статистика для дисперсии	4,97	
p-значение для F-статистики	$6,97 \times 10^{-8}$	
p-значение для U-критерия	> 0,70	

мальной гибели клеток на фоне компенсаторного повышения уровня ДНКазы I по причине более высокой устойчивости GC-фрагментов к воздействию ДНКазы I и распаду, мы сравнили содержание GC-пар во вкДНК беременных женщин с нормальной беременностью и женщин с патологией беременности. Данные показаны в табл. 3.

Результаты сравнения показывают значимо более высокое содержание CG-богатой вк рДНК у женщин с осложненной беременностью по сравнению с группой нормального протекания беременности.

с) Влияние копийности рДНК в геноме на исход процедуры ЭКО

Исследовали количество рДНК в геномах 38 женщин, обратившихся к эмбриологам за проведением процедуры ЭКО. Из 38 случаев ЭКО 15 случаев оказались неудачными после нескольких попыток, 10 были удачными с первой попытки и в 12 случаях первые попытки были неудачными, но одна из следующих (вторая или последующая) завершилась беременностью (рис. 2).

Значения копийности рДНК в геномах трех подгрупп пациенток, которые подверглись ЭКО, показаны на рис. 3. Распределения сравнили по методу Колмогорова–Смирнова. Из первой подгруппы удалили точку с аномально высоким содержанием рДНК

в геноме. Данные описательной статистики приведены в табл. 4.

Содержание рДНК в геномах подгруппы женщин с неудачными попытками ЭКО было значимо ниже, чем в геномах двух других подгрупп. В 6 из 15 (40%) образцах ДНК из подгруппы 1 число повторов рДНК было меньше, чем в любом из образцов ДНК из подгрупп 2 и 3.

Таким образом, полученные результаты дают основания предположить, что число копий рДНК в геноме входит в число факторов, определяющих успех ЭКО. Если копийность рДНК в геноме женщины менее 330, процедура ЭКО у неё с большой вероятностью может завершиться неудачей.

Обсуждение

Полученные данные показывают, что более половины образцов ДНК, взятых у женщин с патологией беременности, содержат либо больше, либо меньше копий рДНК в геноме, чем любой образец контрольной группы. Ранее нами было показано, что очень низкие и очень высокие количества копий рДНК практически отсутствуют в геноме индивидов в возрасте от 72 лет и старше. Мы объясняли это наблюдение большей продолжительностью жизни носителей средних (не очень высоких и не очень малых) количеств рибо-

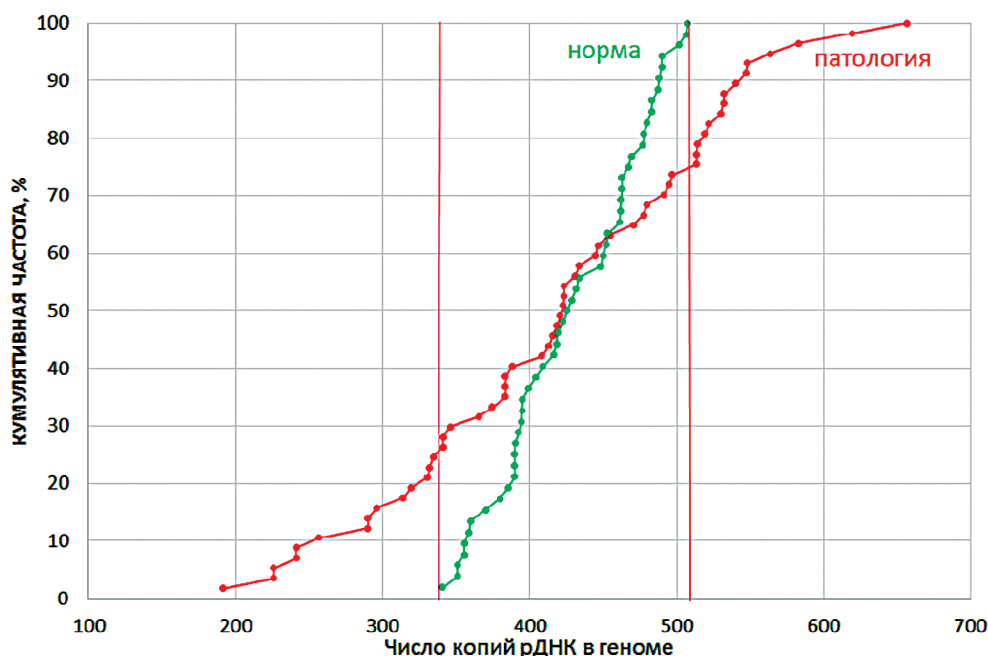


Рис. 1. Распределение количества копий рДНК в геномах женщин с осложненной беременностью (красная кривая) и с нормальной беременностью (зеленая кривая), представленные в виде кумулятивных гистограмм. Данные описательной статистики приводятся в таблице 2. Согласно критерию Колмогорова–Смирнова, распределения значимо различаются ($D=0,28$; $p=0,02$).

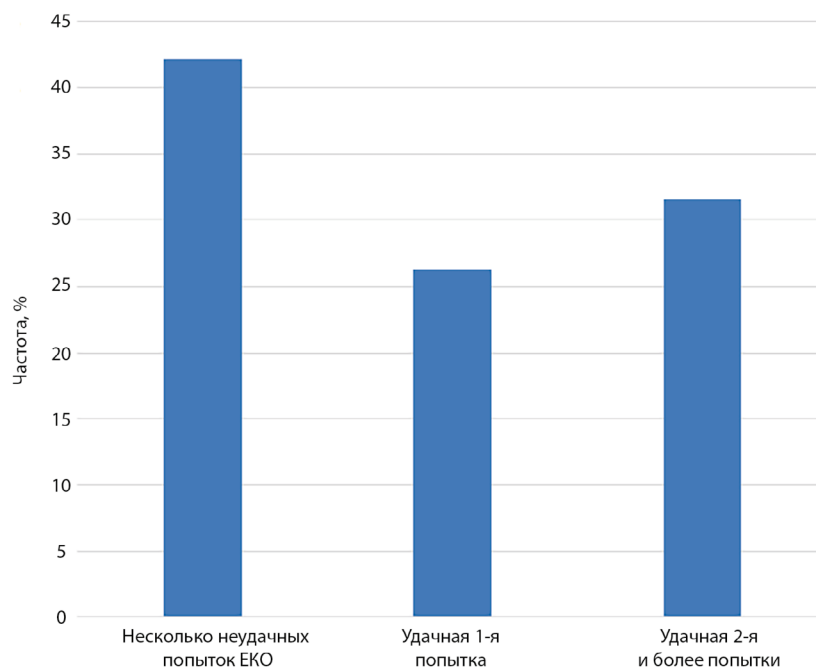


Рис. 2. Распределение случаев удачного и неудачного ЭКО в группе 38 женщин.

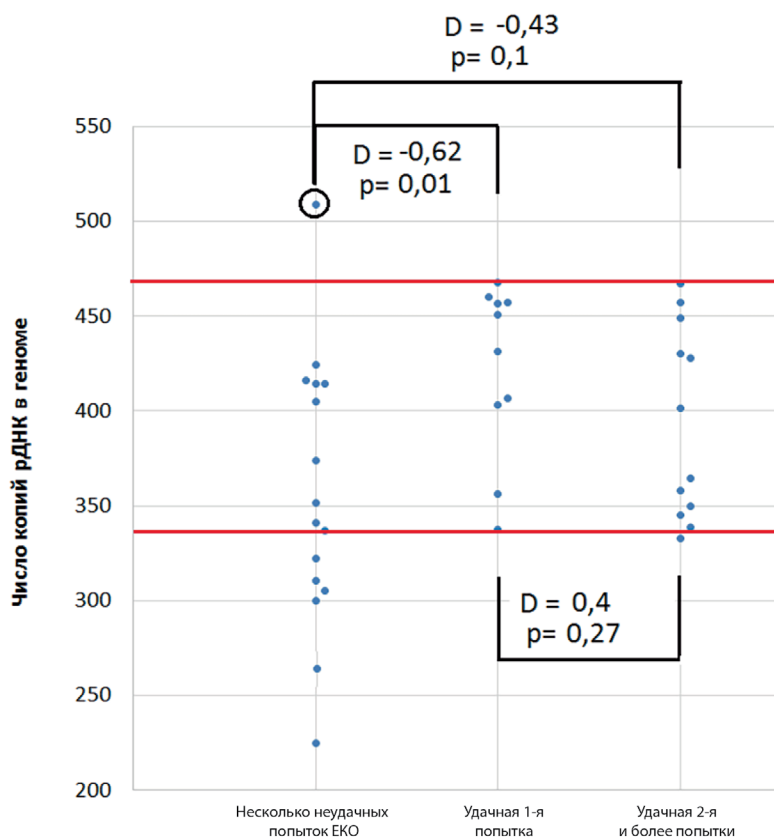


Рис. 3. Содержание рДНК в геномах женщин, проходящих процедуру ЭКО.

**Доля GC-пар во внеклеточной рДНК (вк рДНК) и геномной рДНК (г рДНК)
у беременных женщин с нормальной и осложненной беременностью.
Группа 1 – патология беременности; группа 2 – нормально протекающая беременность**

	Группа	N	Среднее±станд.откл.	Медиана	Минимум	Максимум
вк рДНК	1	56	1542±308	1561	621	2329
вк ДНК/г рДНК	1	45	4,0±1,4	3,8	1,1	7,2
вк рДНК	2	17	769±198	757	534	1264
вк рДНК/г рДНК	2	17	1,7±0,5	1,6	1,1	3,2
U-критерий Манна-Уитни, сравнение Группы 1 с Группой 2						
Параметр сравнения	p-значение, двустороннее					
вк рДНК	0.00000					
г рДНК	0.215					
вк рДНК/г рДНК	0.00000					

**Данные описательной статистики содержания рДНК
в трех анализируемых подгруппах женщин**

Число копий рДНК в геноме	(1) Несколько неудачных попыток	(2) Удачная первая попытка	(3) Удачные вторая или более поздняя попытки
Размер выборки	15(+1)	10	12
Среднее арифметическое	347	423	393
Стандартное отклонение	69	46	50
Среднеквадратичная ошибка	17	14	14
Минимум	225	337	333
Максимум	509	468	467
Разброс (максимум – минимум)	284	131	134
CV (коэффициент вариации)	0.19	0.11	0.13
Медиана	341	442	383
Сравнение средних (медиан) по U–критерию Манна–Уитни	p-значение		
Группы (1) и (2)	0,004		
Группы (1) и (3)	0,04		
Группы (2) и (3)	0,15		

сомных повторов в геноме. Среднее, сбалансированное содержание рДНК в геноме — признак большей ожидаемой продолжительности жизни носителя. Поэтому распределение числа копий рДНК в геномах пожилых субъектов значительно сужено по сравнению с таковым у индивидов молодого и среднего возраста (рис. 4). Иными словами, шансы дожить до преклонного возраста есть только у носителей средней (оптимальной) геномной дозы рДНК [16]. Средние количества рибосомных повторов в геноме определяют максимально сбалансированный уровень биогенеза рибосом и, по нашим представлениям, обеспечивают наибольшую устойчивость к стрессам, возникающим при старении.

Низкая копияность рДНК в геноме, по нашим представлениям, ассоциирована с недостаточно эффективным биогенезом рибосом. Беременность требует весьма интенсивного синтеза белков. При небольшом количестве повторов рДНК в геноме возможность необходимой интенсификации белкового синтеза ограничена из-за низкого содержания рибосом, потому что скорость процессов биосинтеза рРНК является главным лимитирующим фактором биогенеза рибосом [17] и, как известно, уровни рРНК и общего содержания белка в клетке тесно коррелируют. Поэтому неудивительно, что носители сниженного количества копий рДНК в геноме демонстрируют замедленное развитие. Данный феномен наблюдали у самых разных видов. Классическим примером могут служить самки *Drosophila*, гомозиготные по мутации *bobbed*. Их ге-

номы содержат половину нормальной дозы рибосомных генов: 130 копий вместо 260 у мух дикого типа. Мутантный фенотип характеризуется укороченными торакальными щетинками, замедленным развитием личинок и пониженными плодовитостью и жизнеспособностью, в результате чего мутанты быстро элиминируются из смешанной популяции с мухами дикого типа [18–20]. Другой пример — линии кур с нормальным, урезанным и увеличенным комплексом рДНК. Если линия, несущая 66% от нормального числа рибосомных генов, росла и развивалась нормально, то при дальнейшем снижении количества генов, кодирующих рРНК, в геномах кур до 45% от нормального количества развитие эмбрионов прерывалось уже на ранней стадии гастрюляции [21]. Кроме того, изучение тринадцати коммерческих бройлерных штаммов показало, что чистые линии цыплят-бройлеров, выведенные в результате прямой селекции на быстрый рост и продуктивные признаки, содержат больше копий рДНК в геноме, чем контрольная линия, не подвергавшаяся такой селекции [22].

Почему же повышенная копияность рибосомных повторов в геноме также является дезадаптивной? Ответ на этот вопрос не столь очевиден, как в случае пониженной копияности рДНК. Однако при внимательном рассмотрении данный факт не кажется неожиданным. Так, хорошо известны вредные и летальные эффекты трисомий, обусловленные не поломками какого-либо гена, а наличием избыточной, третьей копии каждого нормального

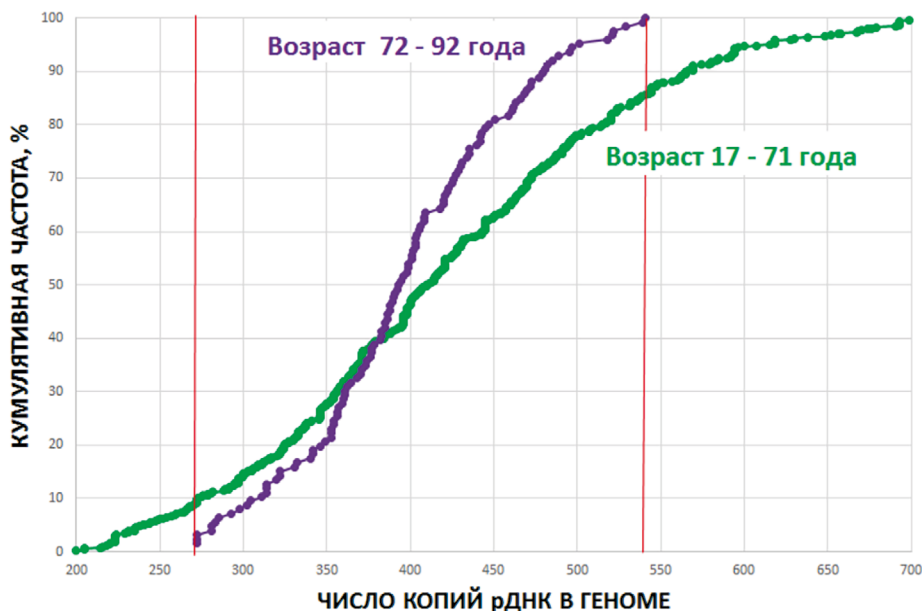


Рис. 4. Распределение числа копий рДНК в геномах людей молодого (N=525) и старшего (N=125) возраста (мужчины и женщины). По материалам [16].

гена на лишней хромосоме. Уже имеется ряд косвенных доказательств того, что чересчур большое количество рибосомных генов в геноме может быть вредным для организма, и предприняты некоторые попытки объяснить механизм данного явления.

Эффект токсичности для клетки избыточного количества транскрибируемых копий рДНК был показан в опытах на дрожжах [23]. Интересное открытие было сделано при исследовании прогерии Хатчинсона–Гилфорда, причиной которой является мутация в гене ламина А [24]. Из-за этой мутации синтезируется aberrантная форма данного белка, получившая название прогерин. Повышенная экспрессия прогерина в ядре сопровождается аномально повышенным биосинтезом рибосом [25, 26]. Дерепрессированная транскрипция рДНК в клетках пациентов с прогерией Хатчинсона–Гилфорда проявляется в виде возросшего количества зрелых форм рРНК. Увеличение продукции рРНК в свою очередь приводит к существенному усилению синтеза рибосомных белков (белкового компонента рибосом). Общий уровень белковой трансляции в клетках пациентов с прогерией Хатчинсона–Гилфорда также значительно увеличен [27]. Биогенез рибосом и трансляция – это два наиболее энергоёмких процесса, которые потребляют большие количества АТФ (по некоторым оценкам, до 80% от всей АТФ в клетке) [28]. Некоторые авторы полагают, что перепроизводство белков вызывает преждевременное старение пациентов с прогерией Хатчинсона–Гилфорда ввиду дефицита энергии, вызванного данным процессом. В клетках пациентов с прогерией Хатчинсона–Гилфорда обнаружены очень низкий уровень АТФ и повышенная интенсивность метаболизма [29, 30]. Очевидно, что большое количество транскрипционно активных копий рДНК может привести к аналогичной ситуации: истощение внутриклеточных источников энергии из-за гиперактивации биосинтеза рибосом и белковой трансляции.

В этой связи представляет интерес исследование Tiku с соавт. [31], которые показали, что увеличение продолжительности жизни с использованием различных подходов, в том числе ограничения калорийности рациона, влечет за собой падение экспрессии как рРНК, так и рибосомных белков. Снижение интенсивности биогенеза рибосом также наблюдали в результате использования методов, улучшающих обмен веществ у человека. Замедление биосинтеза рибосом и скорости синтеза белков можно рассматривать как способ увеличения индивидуальной продолжительности жизни. Следовательно, те индивиды, чьи геномы несут средние количества копий рДНК, обеспечивающие оптимальный уровень биогенеза рибосом, способны лучше реагировать на обычные стрессы, включая беременность.

Другим возможным механизмом, посредством которого может фенотипически проявляться избыточное количество копий рДНК в геноме, является изменение биологического действия внеклеточной циркулирующей ДНК. Чем больше копий рДНК в геноме, тем выше доля рДНК во вкДНК, потому что основным источником циркулирующей вкДНК служат гибнущие клетки. Ранее нами показано, что рибосомные повторы в составе вкДНК могут в некоторых условиях вызывать хроническое воспаление. Внеклеточная рДНК индуцировала синтез провоспалительных цитокинов IL6 и TNF-а в лимфоцитах человека путем активации фактора транскрипции NF-kB [32].

Более того, окисленная внеклеточная рДНК может повысить концентрацию активных форм кислорода (АФК) [33]. Таким образом, окислительный стресс и повышенные уровни провоспалительных цитокинов у пациентов могут поддерживаться как окисленными, так и неокисленными фрагментами рДНК, которая может составлять основную часть вкДНК.

Действительно, нами зафиксировано более высокое содержание CG-богатой вкДНК у женщин с осложнениями беременности по сравнению с женщинами из контрольной группы с нормальной беременностью. Увеличенная доля CG-пар у пациенток с патологическим протеканием беременности является признаком хронического процесса гибели клеток при осложненной беременности на фоне повышенного уровня ДНКазы I.

Ранее нами была разработана математическая модель динамики окислительного стресса на основе подхода Лотка–Вольтерра к взаимодействию «хищник–жертва». В нашей модели «жертву» представляют собой АФК, а в качестве «хищника» служат молекулы антиоксидантных ферментов, которые уничтожают АФК. Уровень биосинтеза этих антиоксидантных ферментов ограничен числом доступных рибосом, который, в свою очередь, лимитирован числом копий транскрипционно активных генов, кодирующих рРНК (рибосомных генов). Анализ модели показал, что существует единственная имеющая биологический смысл точка равновесия. Уровень АФК колебательно приближается к этому равновесному значению, которое обратно пропорционально копийности активных рибосомных генов (рДНК): чем больше в геноме рДНК, тем ниже равновесный уровень свободных радикалов [34].

Подводя итог, можно заключить, что такой параметр как число копий рибосомных генов в геноме женщины, определяемое методом нерадиоактивной количественной гибридизации, мог бы быть рекомендован для клинического использования. Малые количества копий рДНК в геноме (менее чем 330 копий на дипло-

идный геном) являются потенциальным фактором развития патологии беременности (нефропатии) и неудачных исходов ЭКО. Слишком большое число копий рДНК (свыше 510 копий на диплоидный геном) также могут приводить к развитию патологии во время беременности. Женщины с низкой копийностью рДНК, равно как и носители слишком большого числа повторов рДНК в геноме, вероятно, образуют группу риска, которой требуется более внимательное наблюдение во время беременности. При консультировании перед проведением ЭКО низкокопийных пациенток следует подготовить к тому, что для них вероятность неудачи выше среднестатистической (при прочих равных).

Безусловно, наши выводы носят предварительный характер. Рекомендованы дальнейшие систематические исследования на больших выборках для их верификации.

Список литературы

- Korzeneva I.B., Kostuyk S.V., Ershova L.S., Osipov A.N., Zhuravleva V.F., Pankratova G.V., Porokhovnik L.N., Veiko N.N. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium β -radiation. *Mutat Res.* 2015; 779:1–15
- Korzeneva I.B., Kostuyk S.V., Ershova E.S., Skorodumova E.N., Zhuravleva V.F., Pankratova G.V., Volkova I.V., Stepanova E.V., Porokhovnik L.N., Veiko N.N. Human circulating ribosomal DNA content significantly increases while circulating satellite III (1q12) content decreases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium beta-radiation. *Mutat Res.* 2016;791-792:49–60
- Вейко Н.Н., Булычева Н.В., Рогинко О.А., Вейко П.В., Ершова Е.С., Коздоба О.А., Кузьмин В.А., Виноградов А.М., Юдин А.А., Сперанский А.И. Фрагменты транскрибируемой области рибосомного повтора в составе внеклеточной ДНК – маркер гибели клеток организма. *Биомед. химия* 2008; 54 (1): 78–92.
- Kostuyk S., Smirnova T., Kameneva L., Porokhovnik L., Speranskij A., Ershova E., Stukalov S., Izevskaya V., Veiko N. GC-Rich Extracellular DNA Induces Oxidative Stress, Double-Strand DNA Breaks, and DNA Damage Response in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:782123. doi:10.1155/2015/782123
- Kostjuk S., Loseva P., Chvartatskaya O., Ershova E., Smirnova T., Malinovskaya E., Roginko O., Kuzmin V., Izhevskaya V., Baranova A., Ginter E., Veiko N. Extracellular GC-rich DNA activates TLR9- and NF- κ B-dependent signaling pathways in human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs). *Expert Opin Biol Ther.* 2012; 12(Suppl 1): 99–111. doi: 10.1517/14712598.2012.690028
- Ahna J., Gutmana D., Saijob S., Barber G.N. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *PNAS* 2012; 109(47): 19386–19391
- Chiu Y.H., Macmillan J.B., Chen Z.J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 2009. 138 (3): 576–591.
- Kawai T., Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1143: 1–20
- Wu J., Sun L., Chen X., Du F., Shi H., Chen C., Chen Z.J. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013. 339:826–830
- Moss T.A., Langlois F., Gagnon-Kugler T., Stefanovsky V. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(1): 29–49
- Cavanaugh A., Hirschler-Laszkiwicz I., Rothblum L.I. Ribosomal DNA Transcription in Mammals // Olson M.O.J. (Ed.), *The Nucleolus*, Kluwer Academic / Plenum Publishers 2004. 89–129
- Moss T., Stefanovsky V.Y. At the center of eukaryotic life. *Cell* 2002. 109(5): 545–548
- Miyazaki T., Kobayashi T. Visualization of the dynamic behavior of ribosomal RNA gene repeats in living yeast cells. *Genes Cells* 2011. 16(5):491–502. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01506.x.
- Porokhovnik L.N., Lyapunova N.A. Dosage effects of human ribosomal genes (rDNA) in health and disease. *Chromosome Research.* 2019;27(1-2):5–17
- Пороховник Л.Н., Егорова Н.А., Косякова Н.В., Цветкова Т.Г., Ляпунова Н.А. Зиготический и эмбриональный отбор по геномной дозе активных рибосомных генов как один из возможных факторов сниженной плодовитости супружеских пар. *Медицинская генетика.* 2012; 11(6): 31–34
- Malinovskaya E.M., Ershova E.S., Golimbet V.E., Porokhovnik L.N., Lyapunova N.A., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Copy Number of Human Ribosomal Genes With Aging: Unchanged Mean, but Narrowed Range and Decreased Variance in Elderly Group. *Front Genet.* 2018; 9:306
- Larson D.E., Zahradka P., Sells B.H. Control points in eukaryotic ribosome biogenesis. *Biochem Cell Biol.* 1991; 69(1):5–22
- Ritossa F.M., Atwood K.C., Lindsley D.L., Spiegelman S. On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA. *Natl Cancer Inst Monogr* 1966; 23:449–471
- Ritossa F.M. Unstable redundancy of genes for ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;60(2):509–516
- Mohan J., Ritossa F.M. Regulation of ribosomal RNA synthesis and its bearing on the bobbed phenotype in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1970;22(3):495–512
- Delany M.E., Muscarella D.E., Bloom S.E. Effects of rRNA gene copy number and nucleolar variation on early development: inhibition of gastrulation in rDNA deficient chick embryos. *J Hered* 1994;85(3):211–217
- Su M.H., Delany M.E. Ribosomal RNA gene copy number and nucleolar-size polymorphisms within and among chicken lines selected for enhanced growth. *Poult Sci* 1998;77(12):1748–1754
- Ide S., Miyazaki T., Maki H., Kobayashi T. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science.* 2010; 327(5966): 693–696
- Eriksson M., Brown W.T., Gordon L.B., Glynn M.W., Singer J., Scott L. et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003; 423:293–298. doi:10.1038/nature01629
- Goldman R.D., Shumaker D.K., Erdos M.R., Eriksson M., Goldman A.E., Gordon L.B. et al. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101:8963–8968.
- Shumaker D.K., Dechat T., Kohlmaier A., Adam S.A., Bozovsky M.R., Erdos M.R., et al. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103:8703–8708. Doi 10.1073/pnas.0602569103
- Buchwalter A., Hetzer M.W. Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging. *Nat. Commun.* 2017; 8:328. Doi 10.1038/s41467-017-00322-z
- MacInnes A. The role of the ribosome in the regulation of longevity and lifespan extension. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2016; 7:198–212. Doi 10.1002/wrna.1325
- Abdenur J., Brown W. T., Friedman S., Smith M., Lifshitz F. Response to nutritional and growth hormone treatment in progeria. *Metabolism* 1997; 46:851–856. Doi 10.1016/S0026-0495(97)90069-X
- Merideth M.A., Gordon L.B., Clauss S., Sachdev V., Smith A.C., Perry M.B. et al. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N. Engl. J. Med* 2008; 358:592–604

31. Tiku V., Jain C., Raz Y., Nakamura S., Heestand B., Liu W. et al. Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nat. Commun.* 2016; 8:16083
32. Сперанский А.И., Костюк С.В., Калашникова Е.А., Вейко Н.Н. Обогащение внуклеточной ДНК среды культивирования мононуклеаров периферической крови человека CpG-богатыми фрагментами генома приводит к увеличению продукции клетками IL-6 и TNF- α путём активации сигнального пути NF- κ B. *Биомедицинская химия.* 2016; 62 (3): 331–340
33. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Izevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:649747. doi: 10.1155/2013/649747
34. Porokhovnik L.N., Passekov V.P., Gorbachevskaya N.L., Sorokin A.B., Veiko N.N., Lyapunova N.A. Active ribosomal genes, translational homeostasis and oxidative stress in the pathogenesis of schizophrenia and autism. *Psychiatr Genet.* 2015; 25(2):79–87
10. Moss T.A., Langlois F., Gagnon-Kugler T., Stefanovsky V. A house-keeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(1): 29–49
11. Cavanaugh A., Hirschler-Laszkiewicz I., Rothblum L.I. Ribosomal DNA Transcription in Mammals // Olson M.O.J. (Ed.), *The Nucleolus*, Kluwer Academic / Plenum Publishers 2004. 89–129
12. Moss T., Stefanovsky V.Y. At the center of eukaryotic life. *Cell* 2002. 109(5): 545–548
13. Miyazaki T., Kobayashi T. Visualization of the dynamic behavior of ribosomal RNA gene repeats in living yeast cells. *Genes Cells* 2011. 16(5):491–502. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01506.x.
14. Porokhovnik L.N., Lyapunova N.A. Dosage effects of human ribosomal genes (rDNA) in health and disease. *Chromosome Research.* 2019;27(1-2):5–17
15. Porokhovnik L.N., Egorina N.A., Kosyakova N.V., Tsvetkova T.G., Lyapunova N.A. Zigoticheskiy i embrional'nyy otbor po genomnoy doze aktivnykh ribosomnykh genov kak odin iz vozmozhnykh faktorov snizhennoy plodovitosti supruzheskikh par. [Zygotic and embryonic selection by the copy number of active ribosomal genes as one of the possible factors of subfertility in man]. *Meditsinskaya genetika [Medical genetics]*. 2012; 11(6): 31–34 (In Russ)
16. Malinovskaya E.M., Ershova E.S., Golimbet V.E., Porokhovnik L.N., Lyapunova N.A., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Copy Number of Human Ribosomal Genes With Aging: Unchanged Mean, but Narrowed Range and Decreased Variance in Elderly Group. *Front Genet.* 2018; 9:306
17. Larson D.E., Zahradka P., Sells B.H. Control points in eukaryotic ribosome biogenesis. *Biochem Cell Biol.* 1991; 69(1):5–22
18. Ritossa F.M., Atwood K.C., Lindsley D.L., Spiegelman S. On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA. *Natl Cancer Inst Monogr* 1966; 23:449–471
19. Ritossa F.M. Unstable redundancy of genes for ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;60(2):509–516
20. Mohan J., Ritossa F.M. Regulation of ribosomal RNA synthesis and its bearing on the bobbed phenotype in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1970;22(3):495–512
21. Delany M.E., Muscarella D.E., Bloom S.E. Effects of rRNA gene copy number and nucleolar variation on early development: inhibition of gastrulation in rDNA deficient chick embryos. *J Hered* 1994;85(3): 211–217
22. Su M.H., Delany M.E. Ribosomal RNA gene copy number and nucleolar-size polymorphisms within and among chicken lines selected for enhanced growth. *Poult Sci* 1998;77(12):1748–1754
23. Ide S., Miyazaki T., Maki H., Kobayashi T. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science.* 2010; 327(5966): 693–696
24. Eriksson M., Brown W.T., Gordon L.B., Glynn M.W., Singer J., Scott L. et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003; 423:293–298. doi:10.1038/nature01629
25. Goldman R.D., Shumaker D.K., Erdos M.R., Eriksson M., Goldman A.E., Gordon L.B. et al. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101:8963–8968.
26. Shumaker D.K., Dechat T., Kohlmaier A., Adam S.A., Bozovsky M.R., Erdos M.R., et al. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103:8703–8708. Doi 10.1073/pnas.0602569103
27. Buchwalter A., Hetzer M.W. Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging. *Nat. Commun.* 2017; 8:328. Doi 10.1038/s41467-017-00322-z
1. Korzeneva I.B., Kostyuk S.V., Ershova L.S., Osipov A.N., Zhuravleva V.F., Pankratova G.V., Porokhovnik L.N., Veiko N.N. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium β -radiation. *Mutat Res.* 2015; 779:1–15
2. Korzeneva I.B., Kostyuk S.V., Ershova E.S., Skorodumova E.N., Zhuravleva V.F., Pankratova G.V., Volkova I.V., Stepanova E.V., Porokhovnik L.N., Veiko N.N. Human circulating ribosomal DNA content significantly increases while circulating satellite III (1q12) content decreases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium beta-radiation. *Mutat Res.* 2016;791-792:49–60
3. Veiko, N. N., Bulychева, N. A., Roginko, O. A., Veiko, R. V., Ershova, E. S., Kozdoba, O. A., Kuzmin, V. A., Vinogradov, A. M., Yudin, A. A., Speranskiy, A. I. Fragmenty transkribiruyemoy oblasti ribosomnogo povtora v sostave vnekletochnoy DNK - markor gibeli kletok organizma [Ribosomal repeat in the cell free DNA as a marker for cell death]. *Biomeditsinskaya khimiya [Biomedical chemistry]*. 2008; 54(1): 78–93 (In Russ)
4. Kostyuk S., Smirnova T., Kameneva L., Porokhovnik L., Speranskiy A., Ershova E., Stukalov S., Izevskaya V., Veiko N. GC-Rich Extracellular DNA Induces Oxidative Stress, Double-Strand DNA Breaks, and DNA Damage Response in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:782123. doi:10.1155/2015/782123
5. Kostyuk S., Loseva P., Chvartatskaya O., Ershova E., Smirnova T., Malinovskaya E., Roginko O., Kuzmin V., Izevskaya V., Baranova A., Ginter E., Veiko N. Extracellular GC-rich DNA activates TLR9- and NF- κ B-dependent signaling pathways in human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs). *Expert Opin Biol Ther.* 2012; 12(Suppl 1): 99–111. doi: 10.1517/14712598.2012.690028
6. Ahna J., Gutmana D., Saijob S., Barber G.N. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *PNAS* 2012; 109(47): 19386–19391
7. Chiu Y.H., Macmillan J.B., Chen Z.J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 2009. 138 (3): 576–591.
8. Kawai T., Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1143: 1–20
9. Wu J., Sun L., Chen X., Du F., Shi H., Chen C., Chen Z.J. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013. 339:826–830

28. MacInnes A. The role of the ribosome in the regulation of longevity and lifespan extension. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2016; 7:198–212. Doi 10.1002/wrna.1325
29. Abdenur J., Brown W. T., Friedman S., Smith M., Lifshitz F. Response to nutritional and growth hormone treatment in progeria. *Metabolism* 1997; 46:851–856. Doi 10.1016/S0026-0495(97)90069-X
30. Merideth M.A., Gordon L.B., Clauss S., Sachdev V., Smith A.C., Perry M.B. et al. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N. Engl. J. Med* 2008; 358:592–604
31. Tiku V., Jain C., Raz Y., Nakamura S., Heestand B., Liu W. et al. Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nat. Commun.* 2016; 8:16083
32. Speranskii, A.I., Kostyuk, S.V., Kalashnikova, E.A., Veiko, N.N. (2016). Enrichment of extracellular DNA from the cultivation medium of human peripheral blood mononuclears with genomic CpG rich fragments results in increased cell production of IL-6 and TNF- α via activation of the NF- κ B signaling pathway [Enrichment of extracellular DNA of the cultivation medium of human peripheral blood mononuclear cells with CpG-rich fragments of the genome leads to an increase in the production of IL-6 and TNF- α cells by activating the NF- κ B signaling pathway]. *Biomeditsinskaya khimiya* [Biomedical Chemistry]. 2016; 62(3): 331–340 (In Russ)
33. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Izevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:649747. doi: 10.1155/2013/649747
34. Porokhovnik L.N., Passekov V.P., Gorbachevskaya N.L., Sorokin A.B., Veiko N.N., Lyapunova N.A. Active ribosomal genes, translational homeostasis and oxidative stress in the pathogenesis of schizophrenia and autism. *Psychiatr Genet.* 2015; 25(2):79-87