

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ РИБОСОМНЫХ ЦИСТРОНОВ АКРОЦЕНТРИЧЕСКИХ ХРОМАТИД ЧЕЛОВЕКА У ПЛОДОВ, ИНДИВИДОВ СРЕДНЕГО (22–45 ЛЕТ) И ПОЖИЛОГО (80–106 ЛЕТ) ВОЗРАСТА

Т. ЛЕЖАВА¹, Т. БУАДЗЕ¹, Д. МОНАСЕЛИДЗЕ², Т. ДЖОХАДЗЕ¹, Н. СИГУА³, Н. ДЖАНГУЛАШВИЛИ³, М. ГАЙОЗИШВИЛИ¹, М. КОРИДЗЕ⁴, Н. ЗОСИДЗЕ⁴, М. РУХАДЗЕ³

¹ Кафедра генетики, Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили (ТГУ), пр. Чавчавадзе, 1, Тбилиси, 0128, Грузия

² Институт физики; Институт Генетики, Тбилисский государственный университет им. Джавахишвили, пр. Чавчавадзе, 1, Тбилиси, 0128, Грузия

³ Центр пренатальной диагностики – «Перинатология», ул. Горгасали, 93, Тбилиси, Грузия

⁴ Батумский государственный университет им. Шота Руставели, ул. Ниношвили, 35, Батуми, Грузия

E-mail: lezhavat@yahoo.com¹, jamlet_monaselidze@yahoo.com², sigua_nino@yahoo.com³, koridzemarina@gmail.com⁴

Был изучен уровень общего гетерохроматина, Ag-положительных областей ядрышкового организатора (ЯОР), уровень спутничных ассоциаций акроцентрических хроматид (некоторые хроматидные спутники связаны друг с другом, образуя спутничные ассоциации), интенсивность вступления в ассоциации каждой акроцентрической хроматиды и типов ассоциаций хроматид у 29 плодов, у 32-х здоровых индивидов 22–45-ти лет и 22-х индивидов 80–106-ти лет. Хромосомы были идентифицированы с помощью анализа G-окраски с использованием системы карiotипирования Ikaros (Meta system). Дифференциальная сканирующая калориметрия показала более высокую термостабильность хроматина (гетерохроматинизацию) у индивидов среднего и старческого возраста по сравнению с плодами. Количество Ag-положительных ЯОР на клетку как для ассоциированных, так и для неассоциированных хроматид было значительно выше в клетках плода, чем в среднем и в старческом возрасте. Количество спутничных ассоциаций хроматид на клетку у плодов и у индивидов старческой группы было ниже, чем у индивидов среднего возраста. Активность вступления в ассоциации хроматид 15-ой хромосомы у плодов и индивидов средней и старческой возрастных групп была значительно ниже по сравнению с другими акроцентрическими хроматидами ($p < 0,05$), тогда как хроматиды 21-й хромосомы участвовали в ассоциациях с высокой активностью ($p < 0,05$). Частота ассоциаций хроматид гомологичных хромосом (13:13; 14:14; 15:15 и 22:22) и некоторых негомологичных хромосом (15:22 и 21:22) у плода, индивидов 22–45 и 80–106 лет почти совпадала. Вышеотмеченные явления, по-видимому, указывают на то, что хроматидные спутничные рибосомные гены акроцентрических хромосом подвергаются специфической эпигенетической изменчивости в зависимости от возраста, определяя специфический синтез рРНК для конструирования спе-

цифических рибосом, что может иметь большое значение при оценке общего функционирования клеток при нормальных и патологических состояниях.

Ключевые слова: старение, ассоциация, гетерохроматинизация, плоды, рибосомные гены, спутничные нити.

Введение. Теломеры коротких плеч каждой акроцентрической хромосомы человека (13, 14, 15, 21 и 22) имеют спутничные нити, представляющие собой вторичные перетяжки и называемые ядрышкообразующими районами (ЯОР). ЯОР состоят из гетерохроматина и организованы в виде множественных, тандемно повторяющихся последовательностей нуклеотидов. ЯОР человека содержат ≥ 600 копий генов рибосомальной РНК (рРНК), каждый из которых состоит из транскрибируемой области размером 13 т.п.н. и межгенного спейсера размером 30 т.п.н. Последовательности межгенной спейсерной ДНК в значительной степени ингибируют транскрипцию в гетерохроматических областях спутничной ДНК, состоящей из тандемно повторяющихся последовательностей. Спутничные нити некоторых ЯОР полностью состоят из неактивных генов рРНК (нетранскрибирующиеся ЯОР), тогда как другие ЯОР содержат только активные гены (транскрибирующиеся ЯОР) или смесь активных и неактивных генов рРНК. Из всех копий генов рДНК фактически транскрибируются в основном 50 %, а оставшиеся гены инактивируются с помощью комбинации различных эпигенетических механизмов – специфическими факторами репрессии, интерференцией некодирующей РНК (RNAi), метилированием ДНК [1–3]. Метилирование на промоторах рДНК представляет собой динамический и обратимый процесс [4]. Гиперметилирование вызывает ге-

© Т. ЛЕЖАВА, Т. БУАДЗЕ, Д. МОНАСЕЛИДЗЕ, Т. ДЖОХАДЗЕ, Н. СИГУА, Н. ДЖАНГУЛАШВИЛИ, М. ГАЙОЗИШВИЛИ, М. КОРИДЗЕ, Н. ЗОСИДЗЕ, М. РУХАДЗЕ, 2020

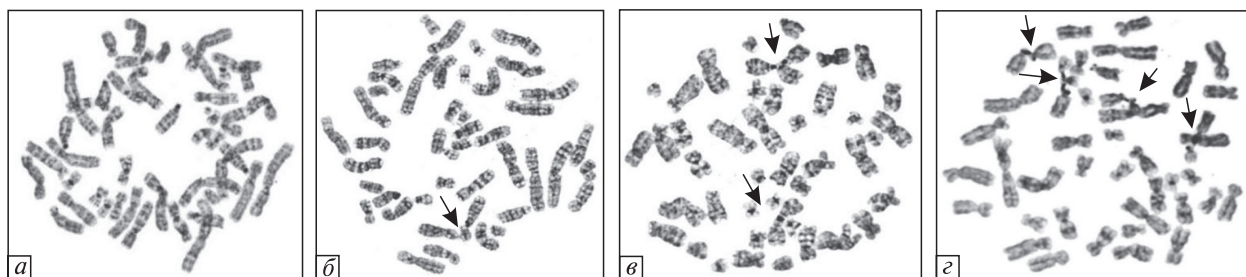


Рис. 1. Метафазы с разным количеством ассоциаций: *a* – без ассоциации; *b* – с одной ассоциацией; *v* – с двумя ассоциациями; *z* – с четырьмя ассоциациями. Ассоциации обозначены стрелками

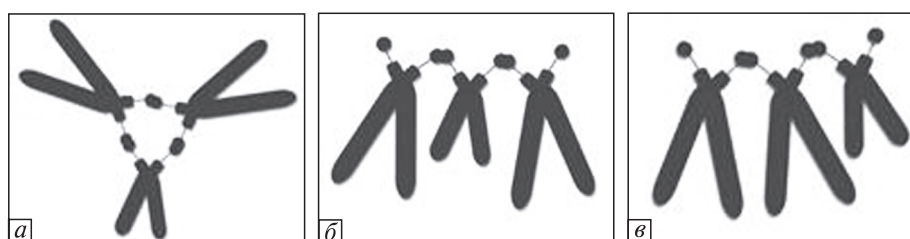


Рис. 2. Схематическое представление «закрытых» и «открытых» ассоциаций хроматидных спутников: *a* – ассоциации DD, DG, DG «закрытого» типа; *b* – ассоциации DG, GD «открытого» типа; *v* – ассоциации DD, DG «открытого» типа

терохроматинизацию хроматина, что приводит к «молчанию» генов [5]. Транскрипция генов нуклеолярных рРНК осуществляется с помощью Pol I, а их экспрессия регулируется факторами ремоделирования хроматина и некоторыми специфическими эпигенетическими процессами, аналогично тому, как это имеет место в случае регуляции активности ненуклеолярных генов. ДНК спутничной нити представляет особый интерес для понимания роли гетерохроматина, поскольку известно, что эпигенетическое регулирование связано как с активацией, так и с репрессией, обусловленной модификацией белков хроматина [6].

Метафазные ЯОР, которые были транскрипционно активны в предыдущем клеточном цикле, проявляются в виде вторичных хромосомных перетяжек, которые ахроматичны в бендированных хромосомах и способны избирательно окрашиваться серебром [7, 8]. Окрашивание серебром ЯОР происходит благодаря негистоновым белкам, называемым Ag-положительными (избирательно окрашиваемыми серебром) белками. Присутствующие в интерфазе два аргентофильных белка – нуклеолин (НКЛ) и нуклеофосмин (НФМ) участвуют в

транскрипции и процессинге рРНК. Ag-положительные белки ингибируют установление репрессивного гетерохроматинового состояния и ответственны за окрашиваемость ЯОР методом серебрения, что позволяет визуализировать интерфазные Ag-положительные ЯОР с помощью световой микроскопии [8]. Метод селективного окрашивания кислых белков нитратом серебра в области ядрышковых организаторов дает возможность изучать транскрипционную активность рибосомных генов непосредственно на препаратах метафазных хромосом.

У человека некоторые спутники акроцентрических хромосом связываются друг с другом и образуют «спутничные ассоциации». Также было показано, что спутники акроцентрических хромосом, участвующие в спутничной ассоциации, всегда транскрипционно активны [8]. Феномен ассоциации является весьма специфическим показателем структуры и функции ядра предшествующего интерфазного периода.

Нами впервые показано, что ассоциации образуются спутничными нитями хроматид двух и более (до десяти) акроцентрических хромосом формируя множество разных типов ассоциаций [8] (рис. 1). Нами впервые показано так-

же, что спутничные нити двух хроматид одной хромосомы функционально различаются [8].

Ассоциации спутничных нитей хроматид, представлены «открытыми» и «закрытыми» типами ассоциаций [8] (рис. 2). Ассоциации, сформированные спутничными нитями отдельных хроматид с оставшимися двумя свободными спутниками относятся к «открытому» типу и составляют в группе индивидов среднего возраста 83–85 %, а ассоциации с двойными хроматидными спутничными нитями, относящиеся к «замкнутому» типу, составляют 15–17 % [8].

Исходя из вышеизложенного, представляет интерес изучение у плодов, лиц среднего (22–45 лет) и старческого (80–106 лет) возрастов: 1) уровень общего гетерохроматина; 2) уровень Ag-положительных ЯОР как ассоциированных, так и неассоциированных хроматид; 3) количество акроцентрических хроматидных спутниковых ассоциаций; 4) частота Ag-положительных хроматид с 1-бальными (малыми) и 2-бальными (крупными) Ag-сегментами; 5) интенсивность вступления в ассоциации каждой хроматиды 13, 14, 15, 21 и 22 акроцентрических хромосом, и 6) частота типов спутничных ассоциаций с двумя хроматидами (13:13, 14:14, 15:15, 21:21, 22:22 – гомологичные и 13:14, 13:15, 13:21, 13:22; 14:15, 14:21, 14:22, 15:21, 15:22, 21:22 – негомологичные).

Материалы и методы. Нами изучены хромосомы 441 метафаз, полученных от 29 плодов. Изучены также 660 метафаз 32 лимфоцитарных культур клинически здоровых 32-х индивидов в возрасте 22–45 лет (средний возраст) и 710 метафаз 22-х лимфоцитарных культур 22-х индивидов в возрасте 80–106 лет.

Процедура культивирования. Для получения клеток плода производился забор пробы амниотической жидкости абдоминально (16–20 мл) на 15–18-ой неделях беременности.

Клетки плода из амниотической жидкости культивировали в среде («Chang Amnio», Irvin Scientific, США), содержащей питательные вещества для поддержания роста клеток, культивирование занимало около двух недель. Метафазы культивируемых эмбриональных клеток использовали для анализа хромосом. Культивирование кратковременных митоген-стимулированных лимфоцитов здоровых индивидов в

возрастах 22–45 и 80–106 лет проводилось в соответствии со стандартными процедурами с небольшими изменениями [8]. Хромосомы плода и здоровых индивидов 22–106 лет были идентифицированы с использованием системы кариотипирования Ikaros (Meta System).

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Для изучения процесса денатурации хроматина в клетках амниоцитарных культур плода и лимфоцитарных культур здоровых индивидов в возрасте 22–106 лет был использован дифференциальный сканирующий калориметр (ДСК) с чувствительностью 0,1 мкВт с измерительной ячейкой объема 0,2 мл. Было показано, что процесс денатурации показывает четкие и воспроизводимые эндотермы – пики поглощения тепла, и перегибы на кривой плавления. В частности, перегибы в интервале температур от 40 до 50 °С соответствуют плавлению мембран и некоторых белков цитоплазмы, плечо около 70 °С – комплексу рибонуклеопротеинов. Слабый максимум при $T_m = 56 \pm 1$ °С соответствует плавлению белков негистонового типа в составе клеточных ядер, а пики при $T_m = 63 \pm 1$ °С и $T_m(I) = 80 \pm 1$ °С соответствуют белкам цитоплазмы. Другие высокотемпературные пики при $T_m(II) = 95 \pm 1$ °С и $T_m(III) = 106 \pm 1$ °С мы приписываем денатурации хроматинового комплекса. На основе литературных и собственных исследований, мы утверждаем, что эндотермический пик при $T_m = 106 \pm 1$ °С соответствует плавлению волокон толщиной 30 нм, которые представляют наиболее конденсированное состояние хроматина в интерфазных ядрах (гетерохроматин), а эндотермический пик при 95 ± 1 °С соответствует плавлению Нуклеосомы тонкой нити 10 нм [9].

Ag – положительные аргентофильные ЯОР и ассоциации спутников акроцентрических хромосом. Окрашивание серебром спутников акроцентрических хромосом и G-бендирования проводили с незначительной модификацией [7, 8]. Для характеристики функционального состояния ЯОР метафазных хромосом была предложена система визуальной оценки размера сегмента гранул серебра, отражающая степень активности кластеров рибосомных генов в условных единицах. Величина Ag-сегментов оценивались по трехбальной шкале: 0 – отсутствие

Ag-сегмента; 1 – маленький (меньше ширины хроматиды) сегмент; и 2 – большой сегмент (равный или больше ширины хроматиды).

Для анализа ассоциаций отбирали метафазы с полным набором хромосом и удовлетворительным расположением акроцентрических хромосом. За ассоциации принимали межпутничные связи между акроцентрическими хроматидами после окрашивания серебром.

Статистический анализ. Частота активных спутничных нитей хроматид в ассоциациях. Для определения показателя того, насколько активно участвует хроматида в процессе формирования ассоциаций определенного типа (13:13; 13:14; 13:15; 13:21; 13:22; 14:14; 14:15; 14:21; 14:22; 15:15; 15:21; 15:22; 21:21; 21:22; 22:22) в клетках каждой исследуемой возрастной группы, из общего числа ассоциаций для данной хроматиды высчитывалась доля ее участия в каждом типе ассоциаций по формуле:

$$\mu_n = S_n/N,$$

где μ_n – интенсивность вхождения каждой хроматиды в ассоциацию; S_n – номер каждой хромосомы в ассоциации (например, для 13-й хромосомы – $S_{13} = V_{13:13} + V_{13:14} + V_{13:15} + V_{13:21} + V_{13:22}$); N – общее количество ассоциаций в группе; n – изученная акроцентрическая хромосома.

Аналогичным образом была определена частота типов ассоциаций хроматид (13:13; 13:14; 13:15; 13:21; 15:22; 14:14; 14:15; 14:21; 14:22; 15:15; 15:21; 15:22; 21:21; 21:22; 22:22) учитываемая их долю во всех ассоциациях наблюдаемых в возрастных группах.

Обработка статистических данных для процента клеток с ассоциациями акроцентрических хромосом проводилась по формуле альтернативного распределения

$$\pm \sqrt{\frac{n(100-n)}{N}},$$

где n – процент клеток с ассоциацией акроцентрической хромосомы; N – общее количество анализируемых клеток [10].

Результаты. 1. *Исследование хроматина ДСК методом.* Было проведено ДСК исследование лимфоцитов клеток плода в амниотической жидкости и здоровых людей (22–45 лет и 80–106 лет). Было показано, что у молодых инди-

видов хроматин плавится при 96 и 104 °С, у престарелых – при 96 ± 1 °С и 106 ± 1 °С, а у плодов – при 91 ± 1 °С и 104 ± 1 °С.

Расчет энтальпии плавления (ΔH_m) вышеупомянутых пиков показал, что у плода величина ΔH_m хроматина низкотемпературного пика (90 ± 1 °С) больше, чем у взрослых индивидов. В то время как величина энтальпии высокотемпературного пика у плода уменьшается на величину, которая добавляется к энтальпии денатурации низкотемпературного пика плода (т.е. интегральная величина энтальпии плавления хроматинового комплекса сохраняется).

На основе ДСК данных, делается заключение, что объемная доля активного транскрибируемого хроматина в клетках плодов примерно в 4 раза выше, чем объемная доля того же транскрибируемого хроматина у индивидов в возрасте 80–106 лет.

На рис. 3 представлены кривые плавления лимфоцитов индивидов в возрасте 22–45, 80–106 лет индивидов клеток плода. Сравнение этих кривых показывает значительную разницу между профилями кривых плавления плодов, 22–45 и 80–106-летних индивидов.

Заметим также, что профили кривых плавления сложны, у них есть перегибы/плечи и максимумы. Сравнение кривых показывает, что они имеют сходство и различие. Сходство наблюдается в основном в температурном интервале 40–85 °С (рис. 3), где плавятся белки, белковые и рибонуклеопротеиновые комплексы [9], что выражается в совпадении изгибов/плеч и максимумов, но не их интенсивностей.

В этой работе мы рассмотрели только диапазон плавления 85–115 °С, чтобы выявить тонкие изменения в динамической структуре хроматина, которые происходят во время развития организма от плода до старости.

Объем активно транскрибируемого хроматина в клетках плодов был примерно в четыре раза выше, чем у нетранскрибируемого участка. Снижение термостабильности транскрибируемого хроматина клеток плодов на 7 °С по сравнению с тем же хроматином у индивидов обеих возрастных групп было интерпретировано как дополнительная локальная деконденсация волокон 30 нм в волокна 10 нм и

5 нм. Повышение термостабильности гетерохроматина у индивидов в возрасте 22–45 лет и индивидов 80–106 лет по сравнению с плодами указывает на дополнительную гетерохроматинизацию хроматина.

2. *Ag-позитивные ЯОР ассоциированных и неассоциированных хроматид. Частота хроматид с Ag-положительными ЯОР на клетку.* Сравнение частоты и характера распределения Ag-положительных ЯОР акроцентрических хроматид на клетку у плодов и у индивидов в возрасте 22–45 и 80–106 лет показало, что аргентофильность некоторых акроцентрических хроматид меняется в зависимости от возраста. Количество Ag-положительных ЯОР на клетку как для ассоциированных, так и не ассоциированных хроматид всех акроцентрических хромосом было значительно выше у плодов ($9,38 \pm 0,27$), чем у индивидов среднего возраста — $7,0 \pm 0,16$ и в глубокой старости ($6,20 \pm 0,17$), ($p < 0,01$) (табл. 1). Показатель для Ag-положительных хроматид, не участвующих в ассоциациях у плодов был также значительно выше ($8,48 \pm 0,26$ на клетку), чем у индивидов среднего возраста ($4,2 \pm 0,10$) и в возрасте 80 лет и старше ($4,98 \pm 0,12$; $p < 0,01$) (табл. 1).

У плодов, индивидов в возрасте 22–45 лет и 80–106 лет, количество Ag-положительных хроматид, участвующих в ассоциациях, составило — $0,89 \pm 0,05$; $2,8 \pm 0,09$ и $1,22 \pm 0,12$ на клетку, соответственно, и было значительно меньше, чем количество неассоциированных Ag-положительных хроматид (табл. 1).

2.2 *Ag-положительные ЯОР метафазных хромосом в условных единицах 0-, 1- и 2-балла.* Для

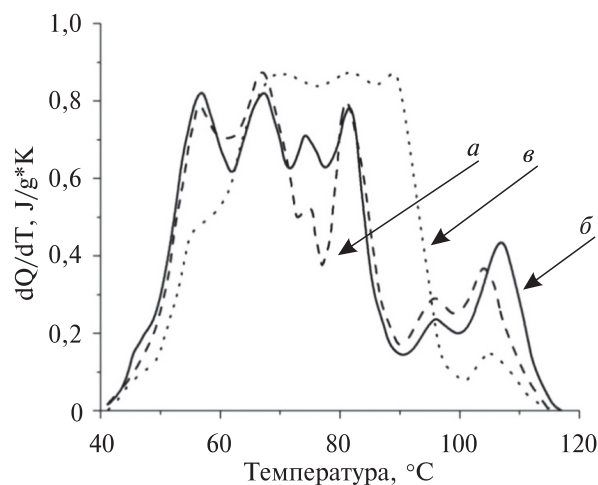


Рис. 3. Избыток теплоемкости, $\Delta C = dQ/dT$, был пересчитан как функция температуры для лимфоцитов, выделенных из крови индивидов 22–45 лет (а), 80–106 лет (б) и клеток плодов (в)

характеристики функционального состояния Ag-положительных метафазных хромосом ЯОР была предложена визуальная оценка размера посеребряных сегментов (гранул серебра), отражающих активность кластеров генов в условных единицах 0-, 1- и 2 балла (табл. 2). Следует отметить, что акроцентрики без аргентофильных сегментов в ассоциации не вступали. Напротив, при наличии даже небольших (1-балл) Ag-положительных ЯОР, акроцентрические хроматиды проявляли способность к ассоциации. Ассоциативная способность была значительно более выраженной у акроцентриков с размерами посеребряных сегментов в 2 балла (табл. 2). У плодов, а также у индивидов среднего и старческого возрастов час-

Таблица 1. Количество Ag-положительных акроцентрических хроматид в зависимости от возраста

Возраст	Количество ассоциированных и не ассоциированных Ag-положительных хроматид		Количество Ag-положительных хроматид на клетку					
			ассоциированных			не ассоциированных		
	общее	на клетку	общее количество	D	G	общее количество	D	G
Плод	1192	$9,38 \pm 0,27$	$0,89 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,03$	$8,48 \pm 0,26$	$5,22 \pm 0,2$	$3,26 \pm 0,14$
22–45 лет	2982	$7,0 \pm 0,16$	$2,8 \pm 0,09$	$2,5 \pm 0,07$	$0,3 \pm 0,05$	$4,20 \pm 0,1$	$2,40 \pm 0,1$	$1,80 \pm 0,08$
80–106 лет	1240	$6,20 \pm 0,17$	$1,22 \pm 0,12$	$0,9 \pm 0,09$	$0,32 \pm 0,08$	$4,98 \pm 0,12$	$2,9 \pm 0,09$	$2,08 \pm 0,07$

тота ассоциаций хроматид D и G групп с 2-бальными ЯОР составила: 66,70; 69,90; и 52,05 %, соответственно. Аналогичные показатели в случае 1-бальных ЯОР составили 33,28; 31,0 и 47,95 % соответственно (табл. 2).

Указанное свидетельствует о том, что частота ассоциированных хроматид возрастает параллельно с возрастанием размеров посеребряных ЯОР. При сравнительном анализе оказалось, что у индивидов в глубокой старости хроматиды хромосом G-группы с 1-бальными ЯОР вступали в ассоциации чаще, чем хроматиды с 2-бальными ЯОР ($17,21 \pm 2,4$ и $9,02 \pm 1,8$, соответственно).

Ассоциативная способность D-хромосом, содержащих 2-бальные Ag-положительные ЯОР, была увеличена как у плодов, так и в средней и старческой возрастных группах (табл. 2). G-хромосомы, содержащие 2-бальные Ag-положительные ЯОР, формировали ассоциации с более высокой частотой у плодов, чем у индивидов в возрасте 22–45 лет и 80–106 лет (табл. 2).

2.3. *Количество хроматидных ассоциаций в зависимости от возраста.* Показатель количество ассоциаций хроматид различался по воз-

растным группам. Как следует из данных табл. 3, количество ассоциаций на клетку составила: у плодов – $0,45 \pm 0,03$; у индивидов в возрасте 22–45 лет – $1,35 \pm 0,03$ и у индивидов в возрасте 80–106 лет – $0,61 \pm 0,1$. Способность вступать в ассоциацию Ag-положительных хроматид плодов и у индивидов старческого возраста достоверно ниже ($p < 0,01$), чем у индивидов среднего возраста (табл. 3). Также было показано, что спутники хроматид, участвующие в ассоциациях, всегда являются Ag-положительными.

3. *Интенсивность вхождения каждой акроцентрической хроматиды в ассоциацию.* Нами была проведена оценка активности вступления в ассоциации для каждой акроцентрической хроматиды. Определяли интенсивность участия в ассоциации каждой хроматиды в зависимости от возраста (рис. 4). Активность хроматид 13-й, 14-й, 15-й, 21-й и 22-й хромосом плодов и старческой группы статистически не различалась по интенсивности их вступления в ассоциации.

Активность образования ассоциаций для 13-ой, 14-ой и 22-ой акроцентрических хроматид

Таблица 2. Частота ассоциаций хроматид с посеребрями сегментами размером 1-, 2 балла

Возраст	Количество ассоциированных Ag-положительных хроматид	Частота ассоциаций хроматид с посеребрями сегментами размером 1-, 2 балла, %			
		D		G	
		1 балл	2 балла	1 балл	2 балла
Плод	114 (1078) *	$17,52 \pm 3,5$ ($30,2 \pm 3,7$)*	$43,9 \pm 4,6$ ($39,8 \pm 4,2$)*	$15,78 \pm 3,4$ ($8,9 \pm 2,1$)*	$22,80 \pm 3,9$ ($20,8 \pm 3,4$)*
22–45 лет	1202 (1780) *	$27,3\% \pm 2,1$ ($16,2 \pm 1,8$)*	$61,9\% \pm 2,3$ ($42 \pm 1,8$)*	$3,7\% \pm 0,6$ ($13,8 \pm 2,5$)*	$8,0 \pm 1,3$ ($29 \pm 2,1$)*
80–106 лет	244 (996) *	$30,74 \pm 2,9$ ($24,6 \pm 3,1$)*	$43,03 \pm 3,1$ ($33,5 \pm 2,6$)*	$17,21 \pm 2,4$ ($18,0 \pm 2,4$)*	$9,02 \pm 1,8$ ($23,6 \pm 2,6$)*

Примечание. * Частота неассоциированных хроматид с 1- и 2- бальными сегментами серебра

Таблица 3. Количество хроматидных ассоциаций в разных возрастных группах

Возраст	Количество		Количество хроматидных ассоциаций	
	индивидов	метафаз	общее	на клетку
Плод	29	441	199	$0,45 \pm 0,03$
22–45 лет	32	660	891	$1,35 \pm 0,03$
80–106 лет	22	710	435	$0,61 \pm 0,10$

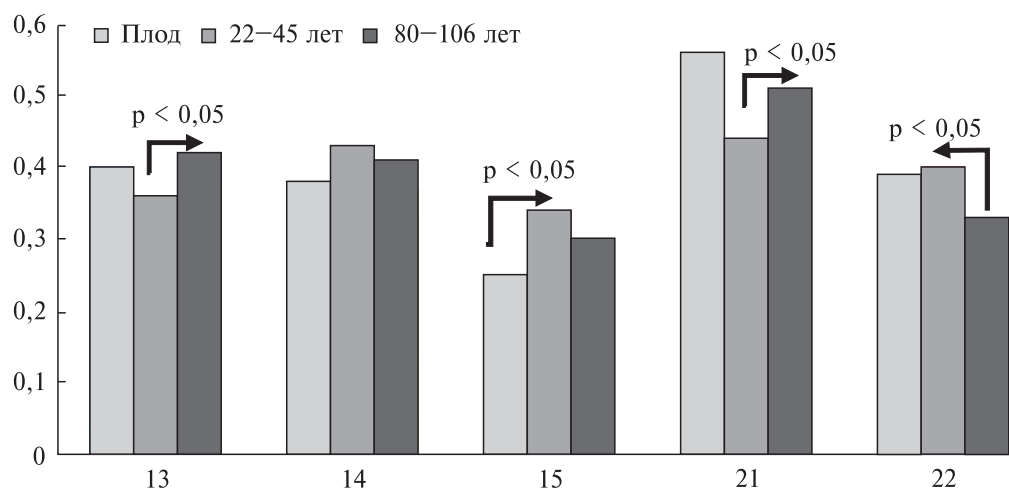


Рис. 4. Интенсивность вступления в ассоциации каждой хроматиды в зависимости от возраста

у плодов не отличалась друг от друга (13 = 14 = 22); однако интенсивность вступления в ассоциации хроматид 15-ой хромосомы была значительно снижена (13, 14, 22 > 15) ($p < 0,05$) (рис. 4). Наряду с этим, хроматиды 21-ой хромосомы у плодов вступали в ассоциации с высокой интенсивностью (21 > 13 = 14 = 22 > 15; $p < 0,05$). У индивидов старческого возраста ассоциативная активность хроматид соответствовала порядку: 13 = 14 = 15 = 22, а хроматиды 21-ой хромосомы проявили достоверно более высокую активность ($p < 0,05$). В группе среднего возраста (22–45 лет) включение хроматид в ассоциации соответствовало порядку: 14 = 21 = 22 > 13 = 15.

4. Типы ассоциаций акроцентрических хроматид. Нами проанализированы типы ассоциаций акроцентрических хроматид (13:13; 13:14; 13:15; 13:21; 13:22; 14:22; 14:14; 14:15; 14:21; 14:22; 15:15; 15:21; 15:22; 21:21; 21:22 и 22:22) (табл. 4). Согласно данным таблицы (табл. 4), частота ассоциаций хроматид гомологичных хромосом (13:13; 14:14; 15:15 и 22:22) и некоторых типов хроматидных ассоциаций негомологичных хромосом (15:22 и 21:22) у плода, индивидов средней (22–45 лет) и в старческой (80–106 лет) возрастных групп почти совпадала. Исключение составили ассоциации между хроматидами гомологичных хромосом – 21:21, частота которых в группах среднего и старческого возраста была достоверно ниже по сравнению с показателем плода ($p < 0,05$; табл.

4). У плодов и в старческой возрастной группе частота ассоциаций хроматид 13:21 и 14:21 была увеличена, а ассоциаций хроматид 15:21 уменьшена по сравнению с группой среднего возраста ($p < 0,05$). Частота ассоциаций хроматид 13: 14 у плодов и в группе среднего возраста была увеличена, а частота ассоциаций хроматид 13:15 была снижена по сравнению со старческой группой ($p < 0,05$). Интересно, что типы ассоциаций акроцентрических хроматид у плодов и у индивидов старческого возраста почти совпадали (табл. 4).

Обсуждение. Ядрышко самый большой функциональный домен в ядре и является участком биогенеза рибосом, транскрипции генов РНК (рДНК), процессинга прерибосомной РНК (пре-рРНК) и сборки прерибосом. При выходе из митоза ядрышки образуются вокруг отдельных активных ЯОР хромосом. Эти мини-ядрышки сливаются, образуя крупные ядрышки, включающие несколько ЯОР. Обычно считается, что объединение отдельных ЯОР в ядрышки зависит от транскрипции рибосомных генов [11, 12].

Функция рибосомной РНК – это трансляция генетического кода записанного в ДНК, в аминокислотную последовательность белков. Эукариотическая рибосома состоит из двух РНК-белковых субъединиц (60S и 40S), включающих четыре вида рибосомной РНК (рРНК) и до 80 рибосомных белков (р-белки) из них – 50 в большой и 30 в малой субъединицах.

Рибосомная РНК составляет до 60–80 % всей клеточной РНК. Существовало общепринятое мнение, что рибосомные РНК идентичны, однако в работах последних лет высказано предположение, что может существовать гетерогенность на уровне РНК. Это предположение представляет определенный интерес в отношении рибосом, поскольку рибосомы с различными вариантами рибосомных РНК могут обладать различными трансляционными свойствами [13–16].

Изменения общего количества копий рибосомных генов, а также количества активных копий могут стать основой изменения протекания нормальных и патологических процессов [16, 17].

Для того чтобы произошла транскрипция рРНК, необходимо несколько факторов связанных с: pol I, селективным фактором 1 промотора (SL1), факторами инициации транскрипции (IFs) и восходящим фактором связывания (UBF). РНК-полимераза I транскрибирует большинство транскриптов рРНК (28S, 18S и 5.8S), 5S рРНК, входящая в состав 60S субъединицы рибосомы, транскрибируется РНК-полимеразой III [17]. Каждая повторяющаяся единица рДНК состоит из кодирующей области, продуцирующей транскрипт-предшественник (пре-рРНК), часто называемый 45S (или 47S), который в результате процессинга разрезается на три зрелые молекулы рРНК, 18S, 5.8S и 28S. Происходит сборка РНК (РНК 28S, 18S и 5.8S) и рибосомных белков (RP) с образованием малых и больших прерибосомных субъединиц, каждая из которых экспортируется отдельно в цитоплазму и проходят финальные этапы формирования зрелых субъединиц рибосомы – 40S и 60S [18].

Несмотря на то, что биогенез рибосом является центральным событием в клеточной

биологии, многие аспекты нуклеолярной и геномной архитектуры ЯОР, их формирования, организации и функционирования остаются необъясненными.

Единицы, кодирующие рРНК, высоко консервативны, тогда как значительная межвидовая изменчивость наблюдается в спейсерных областях [19]. Биогенез рибосом включает такие механизмы, как эпигенетическая модификация хроматина в ЯОР, которая усиливает действие некоторых транскрипционных факторов, расположенных в спейсерных областях рДНК.

Было продемонстрировано, что транскрипты из межгенных спейсеров, которые разделяют отдельные гены рРНК, связаны с эпигенетической регуляцией транскрипции Pol I [19]. Гены рибосомной РНК в локусе рДНК могут быть либо активными, либо «молчащими» в зависимости от эпигенетической регуляции структуры хроматина. Локус рДНК также находится под эпигенетической регуляцией, обусловленной белковыми комплексами, такими как – нуклеолярный комплекс ремоделирования (НКР) и энергозависимый нуклеолярный молчащий комплекс. При инактивации рДНК к ней подключается НКР. Он вызывает гетерохроматинизацию за счет метилирования рДНК и хроматина, а также деацетилирования гистонов, посредством гистондеацетилаз и метилтрансфераз [20, 21]. Эксперименты показали, что блоки гетерохроматина с различным составом последовательностей отличаются по своей способности обуславливать разную образную экспрессию генов [22].

Принятие эукариотическими клетками решения о включении/выключении рибосомных генов, по-видимому, регулирует частоту, с которой РНК-полимераза I инициирует каждый активный ген для точной настройки коли-

Таблица 4. Количество типов хроматидных ассоциаций

Возраст	Количество хроматидных ассоциаций	Частота разных типов					
		13:13	13:14	13:15	13:21	13:22	14:14
Плод	199	0,015075	0,095477	0,055276	0,140703	0,080402	0,0201
22–45 лет	891	0,019522	0,097613	0,056399	0,090021	0,072668	0,019522
80–106 лет	435	0,016091	0,059771	0,082758	0,156321	0,091954	0,029885

чества продуцируемой рРНК. Транскрипция гена рибосомной РНК строго регулируется, чтобы обеспечить необходимое количество рРНК для сборки рибосомы в соответствии с потребностями клеток в синтезе белка. Исследования на млекопитающих показывают, что тонкая настройка осуществляется главным образом с помощью механизмов передачи сигнала, которые приводят к посттрансляционной модификации основных транскрипционных факторов РНК-полимеразы I [23, 24].

Кроме того, Caudron-Nergel и др. [25] показали, что РНК Alu повторов взаимодействуют с нуклеолином (НКЛ) и целевыми эктопическими геномными локусами в ядрышке. Было показано, что PolII-зависимые Alu-РНК регулируют нуклеолярную структуру и синтез рРНК посредством взаимодействия с НКЛ. НКЛ ответственен за увеличение гетерохроматинизации (H3K9me2) и уменьшение (дегетерохроматинизация) (H4K12Ac и H3K4me3) хроматина [26]. С другой стороны, белок нуклеофосмин (НФМ) содержит сигнал ядерной локализации и участвует в контроле биогенеза рибосом. Было показано, что транскрипты Alu регулируют экспрессию генов через посттранскрипционные пути, редактируя РНК и модифицируя эффективность трансляции [27–29]. Некоторые наблюдения авторов, которые сообщили о прогрессирующей гетерохроматинизации хроматина в зависимости от возраста [8], соответствуют с нашими результатами. Повышение термостабильности гетерохроматина соответствует порядку: старость > средний возраст > плод. Прогрессирующая гетерохроматинизация хромосом, в том числе спутничных нитей, может быть причиной некоторой старческой патологии.

Согласно литературным данным было установлено, что общая активность ЯОР на клетку в разных тканях у плодов при медицинских абортах (в возрасте 6–14 нед) составляет $8,71 \pm$

$\pm 0,10$, а при спонтанных – $8,99 \pm 0,08$ [30]. Результаты этих наблюдений соответствуют нашим исследованиям. В нашем случае количество Ag-положительных ЯОР с ассоциированными и не ассоциированными акроцентрическими хроматидами было значительно выше у плодов ($9,38 \pm 0,27$) по сравнению индивидами среднего возраста ($7,0 \pm 0,16$) и в глубокой старости ($6,20 \pm 0,17$; $p < 0,01$). У плодов, количество Ag-положительных ЯОР с неассоциированными акроцентрическими хроматидами было значительно выше ($8,48 \pm 0,26$) по сравнению со средним ($4,2 \pm 0,10$) и старческим возрастными ($4,98 \pm 0,12$; $p < 0,001$).

Частота вовлеченных в ассоциации хроматид 13–15 хромосом с 2-бальными Ag-положительными ЯОР превышала частоту других типов ассоциаций во всех возрастных группах; вместе с тем у плодов для хроматид 21–22 хромосом с 2-бальными ЯОР наблюдалось снижение ассоциативной активности по сравнению с показателями для средних и старческих возрастных групп ($p < 0,01$). Результаты данного исследования согласуются с литературными данными [8].

Число ассоциаций на клетку у плодов ($0,45 \pm 0,03$) и у индивидов в возрасте 80–106 лет ($0,61 \pm 0,10$) было значительно меньше, чем у индивидов 22–45 летнего возраста ($1,35 \pm 0,03$). Возрастные изменения количества Ag-положительных акроцентрических хроматид и частоты их ассоциаций отмечено также в работах некоторых авторов [8].

Низкая частота ассоциаций хроматид акроцентрических хромосом у плода и у индивидов старческого возраста обусловлена низкой активностью ЯОР. Максимальная активность ЯОР проявляется в среднем возрасте, что определяет максимальную частоту ассоциаций акроцентрических хроматид.

Сравнительный анализ активности образования ассоциаций акроцентрических хроматид

хроматидных ассоциаций

14:15	14:21	14:22	15:15	15:21	15:22	21:21	21:22	22:22
0,050251	0,125628	0,070351	0,015075	0,055276	0,065326	0,060301	0,120603	0,030150
0,093275	0,097613	0,09436	0,010845	0,086767	0,071583	0,024945	0,105206	0,022603
0,090322	0,137931	0,062068	0,004597	0,052873	0,064367	0,032183	0,108045	0,004597

показал, что у плодов и в старческой возрастной группе хроматиды 21-й хромосомы участвовали в ассоциациях с высокой частотой, тогда как хроматиды 15-й хромосомы в этом отношении были менее активными. Эти результаты также согласуются с предыдущими сообщениями [30].

Выявлена разница между показателями у плодов и группой среднего возраста, а также разница между индивидами старческого и среднего возраста по частоте типов ассоциаций в хроматидах 13:21, 14:21 и 15:21 ($p < 0,001$). Интересно, что типы ассоциаций акроцентрических хроматид у плодов и у индивидов старческого возраста почти совпадали.

Возрастные изменения в образовании ассоциаций, согласно литературным данным, обусловлены либо изменением свойств ядрышек или их организаторов на акроцентрических хромосомах, либо изменением свойств гетерохроматических областей акроцентрических хромосом [8].

Мы сочли возможным выдвинуть гипотезу о том, что наиболее важным фактором, вызывающим и стимулирующим ассоциацию хроматидных спутников между гомологичными и негомологичными акроцентрическими хромосомами, является избирательное притяжение в интерфазном ядре селективно специфических гетерохроматинизированных (эу- и гетерохроматических) областей спутничных нитей.

Феномен возрастных вариаций ассоциаций акроцентрических хроматид, выражающийся в эпигенетическом изменении активности рибосомных цистронов акроцентрических хроматид, является высокочувствительным индикатором общего состояния хромосомы у индивидов любого возраста. Исследования интенсивности вступления в спутничные ассоциации акроцентрических хроматид открывает возможность судить о степени функционирования ядра в норме при патологиях.

Эукариотическая клетка содержит от 1,5 до 3 миллионов рибосом. За один клеточный цикл синтезируется до 10 миллионов рибосом *de novo* (клетки HeLa могут продуцировать до 7500 рибосом в минуту [31]). По этой причине клетке необходимо много копий рибосомных генов, чтобы удовлетворить потребность в рибосомальной РНК для создания ри-

босом [16]. Ассоциации различных типов акроцентрических хроматид решают эту проблему, способствуя образованию множество различных типов транскрипционно активных единиц рибосомных генов [8].

Полученные нами экспериментальные данные позволяют предположить, что хроматидные спутничные рибосомные гены акроцентрических хромосом подвергаются специфической эпигенетической изменчивости в зависимости от возраста, определяя специфический синтез рРНК для конструирования специфических рибосом, что может иметь большое значение при оценке общего функционирования клеток при нормальных и патологических состояниях.

Соответствие этическим стандартам. Этический комитет Тбилисского государственного медицинского университета (ТГМУ), Грузия, утвердил протокол и согласие родителей каждого плода, а все взрослые индивиды 22–106 лет дали информированное согласие.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирования работы. Работа финансировалась Тбилисским государственным университетом им. Ив. Джавахишвили.

EPIGENETICS CHANGES OF ACTIVITY OF THE RIBOSOMAL CISTRONS OF ACROCENTRIC CHROMATIDS IN FETUS, MIDDLE AGE (25–40 YEARS) AND OLD INDIVIDUALS (88–106 YEARS)

T. Lezhava, T. Buadze, J. Monaselidze, T. Jokhadze, N. Sigua, N. Jangulashvili, M. Gaiozishvili, M. Koridze, N. Zosidze, M. Rukhadze

Deptment of Genetics, Iv. Javakhishvili Tbilisi State University, Tchavtchavadze ave.1, Tbilisi 0128, Georgia
Institute of Physics; Institute of Genetics, Iv. Javakhishvili Tbilisi State University, Tchavtchavadze ave.1, Tbilisi 0128, Georgia
«Perinatology» Centre of Prenatal Diagnosis; Gorgasalist. 93, Tbilisi, Georgia
Shota Rustaveli Batumi State University, Ninoshvili st. 35, Batumi, Georgia

E-mail: lezhavat@yahoo.com, jamlet_monaselidze@yahoo.com, sigua_nino@yahoo.com, koridzemarina@gmail.com

The level of total heterochromatin, Ag-positive nucleolar organizer regions (NORs), non-associated and as-

sociated heterochromatin satellite stalks of acrocentric chromatids (some acrocentric chromosomal chromatid satellite stalks are connected to each other forming a satellite association), the intensity of each acrocentric chromatid involved in the association were studied in 29 fetuses, 32 healthy 22-45-year-old individuals (middle-aged) and 22 healthy 80-106-year-old individuals. The chromosomes were identified by the analysis of G-banding, using the Ikaros karyotyping system (Meta system). The differential scanning calorimeter showed an increase in chromatin thermostability (heterochromatinization) in adults (middle-aged and elderly) compared with fetuses. The number of Ag-positive NORs per cell, for both associated and non-associated chromatids, was significantly increased in fetus cells compared to middle age and to extreme old age. The number of satellite associations of chromatids per cell in the fetus and in individuals of the senile group was reduced, compared with middle-aged individuals. The activity of entering the chromatid associations was significantly lower for 15th chromosome in all the studied groups compared to other acrocentric chromatids, while the chromatids of the 21st chromosome participated in associations with high activity. The frequency of associations of homologous chromosome chromatids (13:13; 14:14; 15:15 and 22:22) and of certain types of chromosome chromatids (15:22 and 21:22) in the fetus, middle-aged individuals and in the senile group was almost identical. The above phenomena seem to indicate that the ribosomal genes of chromatid satellite stalks undergo a specific epigenetic variability depending on the age, determining specific rRNA syntheses for the construction of specific ribosomes which may have great importance in assessing the overall functioning of cells in normal and pathological conditions.

ЕПІГЕНЕТИЧНІ ЗМІНИ АКТИВНОСТІ РИБОСОМНИХ ЦИСТРОН АКРОЦЕНТРИЧНИХ ХРОМАТИД ЛЮДИНИ У ПЛОДІВ, ІНДИВІДІВ СЕРЕДНЬОГО (22–45 РОКІВ) ТА ПОХИЛОГО (80–106 РОКІВ) ВІКУ

Т. Лежава, Т. Буадзеа, Д. Монаселідзеб, Т. Джохадзеа, Н. Сігуав, Н. Джангулашвілів, М. Гайозішвіліа, М. Корідзег, Н. Зосідзег, М. Рухадзе

Було вивчено рівень загального гетерохроматину, Ag-позитивних областей ядерцевого організатора (ЯОР), рівень супутникових асоціацій акроцентричних хроматид (деякі хроматидні супутники пов'язані один з одним, утворюючи супутникові асоціації), інтенсивність вступу в асоціації кожної акроцентричної хроматиди і типів асоціацій хроматид у 29 плодів, у 32-х здорових індивідів 22–45 років і 22-х індивідів 80–106 років. Хромосоми були ідентифіковані за допомогою аналізу G-збарвлення з використанням системи каріотипуван-

ня Ikaros (Meta system). Диференціальна скануюча калориметрія показала більш високу термостабільність хроматину (гетерохроматинізацію) у індивідів середнього і похилого віку в порівнянні з плодами. Кількість Ag-позитивних ЯОР на клітину як для асоційованих, так і для неасоційованих хроматид була значно вище в клітинах плода, ніж в середньому і в похилому віці. Кількість супутникових асоціацій хроматид на клітину плодів і у індивідів похилої групи була нижче, ніж у індивідів середнього віку. Активність вступу в асоціації хроматид 15-ої хромосоми у плодів і індивідів середньої і похилої вікових груп була значно нижче в порівнянні з іншими акроцентричними хроматидами ($p < 0,05$), тоді як хроматиди 21-ї хромосоми брали участь в асоціаціях з високою активністю ($p < 0,05$). Частота асоціацій хроматид гомологічних хромосом (13:13; 14:14; 15:15 і 22:22) і деяких хромосом (15:22 і 21:22) у плода, індивідів 22–45 і 80–106 років майже збігалася. Вищезазначені явища, мабуть, вказують на те, що хроматидні супутникові рибосомні гени акроцентричних хромосом піддаються специфічній епігенетичній мінливості в залежності від віку, визначаючи специфічний синтез рРНК для конструювання специфічних рибосом, що може мати велике значення при оцінці загального функціонування клітин при нормальних і патологічних станах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Prokofyeva-Belgovskaya A. Heterochromatin regions of chromosomes. М., «Наука», 1986.
2. Lyapunova, N., Veiko, N., Ribosomal genes in the human genome: identification of four fractions, their organization in the nucleolus and metaphase chromosomes, *Genetika*, 2010, vol. 46(9), pp. 1205–9.
3. Dimitrova, D., DNA replication initiation patterns and spatial dynamics of the human ribosomal RNA gene loci, *J. Cell Sci.*, 2011, vol. 16, pp. 2743–52. doi: 10.1242/jcs.082230.
4. Schmitz, K., Schmitt, N., Hoffmann-Rohrer, U., Schäfer, A., Grummt, I., and Mayer, Ch., TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation, *Mol. Cell*, 2009, vol. 33, pp. 344–53. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.015.
5. Mazin, A., Suicidal function of DNA methylation in age-related genome disintegration, *Ageing Res. Rev.*, 2009, vol. 8, no. 4, pp. 314–27. doi: 10.1016/j.arr.2009.04.005.
6. McStay, B., Grummt, I., The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology, *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2008, vol. 24, pp. 131–57. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259>.
7. Lezhava, T., Monaselidze, J., Jokhadze, T., and

- Gaiozishvili, M., Epigenetic Regulation of «Age» Heterochromatin by Peptide Bioregulator Cortagen, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2015, vol. 21, pp. 157–63.
8. Lezhava, T., Jokhadze, T., Monaselidze, J., The Functioning of «Aged» heterochromatin, *Senescence, Intech Open Science*, 2012, Chapter 26, pp. 631–46. ISBN 978-953-51-0144-4.
 9. Kikalishvili, L., Ramishvili, M., Nemsadze, G., Lezhava, T., Khorava, P., Gorgoshidze, M., Kiladze, M., and Monaselidze, J., Thermal stability of blood plasma proteins of breast cancer patients, DSC study, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2015, vol. 120, no. 1, pp. 501–5.
 10. Kobzar, A.I., *Applied Mathematical Statistics. For engineers and scientists* M. Fizmatlit, 2006. 816 p.
 11. Olson, M., The nucleolus, *Springer Sci. LTC*, 2011.
 12. Tiku, V., Antebi, A., Nucleolar Function in lifespan regulation, *Trends Cell Boil.*, 2018, vol. 28, no. 8, pp. 662–72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.03.007>.
 13. Xu, B., Li, H., Perry, J., Singh, V.P., Unruh, J., Yu, Z., Zakari, M., McDowell, W., Li, L., and Gerton, J.L., Ribosomal DNA copy number loss and sequence variation in cancer, *PLoS Genet.*, 2017, vol. 13, no. 6, e1006771. doi: [10.1371/journal.pgen.1006771](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006771).
 14. Kim, J., Dilthey, A., Nagaraja, R., Lee, H.-Sh., Koren, S., Dudekula, D., Wood III, W.H., Piao, Y., Ogurtsov, A.Y., Utani, K., Noskov, V.N., Shabalina, S.A., Schlessinger, D., Phillippy, A.M., and Larionov, V., Variation in human chromosome 21 ribosomal RNA genes characterized by TAR cloning and long-read sequencing, *Nucl. Acid. Res.*, 2018, vol. 46, pp. 6712–25. doi: [10.1093/nar/gky442](https://doi.org/10.1093/nar/gky442).
 15. Parks, M., Kurylo, C., Dass, R., Bojmar, L., Lyden, D., Vincent C.Th., and Blanchard, S.C., Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression, *Sci. Adv.*, 2018, vol. 4, no. 2, eaao0665. doi: [10.1126/sciadv.aao0665](https://doi.org/10.1126/sciadv.aao0665).
 16. Porokhovnik, L., Gerton, J., Ribosomal DNA-connecting ribosome biogenesis and chromosome biology. *Chrom. Res.*, 2019, vol. 27, no. 1–2, pp. 1–3. doi: [10.1007/s10577-018-9601-4](https://doi.org/10.1007/s10577-018-9601-4).
 17. Villicaca, C., Cruz, G., and Zurita, M., The basal transcription machinery as a target for cancer therapy. *Cancer Cell Inter.*, 2014, vol. 14, no. 1, pp. 18. doi: [10.1186/1475-2867-14-18](https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-18).
 18. Dai, M., Zeng, S., Jin, Y., Sun, X.X., David, L., and Lu, H., Ribosomal Protein L23 Activates p53 by Inhibiting MDM2 Function in Response to Ribosomal Perturbation but Not to Translation Inhibition, *Mol. Cell*, 2011, vol. 40, pp. 216–27.
 19. Németh, A., Längst, G., Genome organization in and around the nucleolus, *Trends Genet.*, 2011, vol. 27, no. 4, pp. 149–56. doi: [10.1016/j.tig.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.01.002).
 20. Hirota, K., Miyoshi, T., Kugou, K., Hoffman, C., Shibata, T., and Ohta, K., Stepwise chromatin remodeling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNA, *Nature*, 2008, vol. 456, pp. 130–4. doi: [10.1038/nature07348](https://doi.org/10.1038/nature07348).
 21. Salminen, A., Kaarniranta, K., SIRT1 regulates the ribosomal DNA locus: epigenetic candles twinkle longevity in the Christmas tree, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, vol. 378, no. 1, pp. 6–9. doi: [10.1016/j.bbrc.2008.11.023](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.023).
 22. Lemos, B., Araripe, L., Hartl, D., Polymorphic Y chromosomes harbor cryptic variation with manifold functional consequences, *Science*, 2008, vol. 319, no. 5859, pp. 91–3. doi: [10.1126/science.1148861](https://doi.org/10.1126/science.1148861).
 23. Boulon, S., Westman, B., Hutten, S., Boisvert, F.M., and Lamond, A.I., The nucleolus under stress, *Mol. Cell*, 2010, vol. 40, no. 2, pp. 216–27. doi: [10.1016/j.molcel.2010.09.024](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.024).
 24. Donati, G., Montanaro, L., and Derenzini, M., Ribosome biogenesis and control of cell proliferation: p53 is not alone, *Cancer Res.*, 2012, vol. 72, no. 7, pp. 1602–7. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-11-3992](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3992).
 25. Caudron-Herger, M., Pankert, T., Seiler, J., Németh, A., Voit, R., Grummt, I., and Rippe, K., Alu element-containing RNAs maintain nucleolar structure and function, *EMBO J.*, 2015, vol. 34, no. 22, pp. 2758–74. doi: [10.15252/embj.201591458](https://doi.org/10.15252/embj.201591458).
 26. Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J., and Bouvet, Ph., Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase 1 transcription, *Nucl. Acid. Res.*, 2012, vol. 40, no. 19, pp. 9441–54. doi: [10.1093/nar/gks720](https://doi.org/10.1093/nar/gks720).
 27. Barsaglieri, C., Santoro, R., Genome organization in and around the nucleolus, *Cells*, 2019, vol. 8, no. 6, pii: E579. doi: [10.3390/cells8060579](https://doi.org/10.3390/cells8060579).
 28. Caudron-Herger, M., Diederichs, S., Mitochondrial mutations in human cancer: Curation of translation, *RNA Biolog.*, 2018, vol. 15, no. 1, pp. 62–9. doi: [10.1080/15476286.2017.1373239](https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1373239).
 29. Allshire, R., Madhani, H., Ten principles of heterochromatin formation and function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018, vol. 19, no. 4, pp. 229–44. doi: [10.1038/nrm.2017.119](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.119).
 30. Baranov, V., Kuznecova, T., Cytogenetics of human Embryonic Development. *Book, Published by Nauka, Leningrad*, 2006.
 31. Mayer, C., Grummt, I., Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases, *Oncogene*, 2006, vol. 25, no. 48, pp. 6384–91.

Поступила в редакцию 26.06.19
 После доработки 04.11.19
 Принята к публикации 18.05.20