

УДК 57.042

АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛЕЙКОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В ОТВЕТ НА ДЛИТЕЛЬНОЕ ПРЕБЫВАНИЕ В АНТАРКТИДЕ

© 2024 г. Н.Н. Вейко¹, Е.С. Ершова¹, Е.М. Малиновская¹, Е.А. Савинова¹,
Ю. М. Чудакова¹, Ю. И. Елисеева¹, С. В. Костюк¹, А. А. Садова², В. А. Шмаров^{2, *},
М. П. Рыкова², Н. Ю. Осецкий², С. А. Пономарёв²

¹ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

²ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: shmarov.v.a@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2024 г.

После доработки 28.06.2024 г.

Принята к публикации 01.07.2024 г.

Известно, что окислительный стресс и старение изменяют содержание повтора сателлита III (1q12) (SatIII(1q)) и теломерного повтора (*telomere repeat, TR*) в ДНК клеток человека. Экстремальные условия Антарктиды потенциально могут влиять на количество этих повторов в клетках крови человека, что может быть связано с угнетением антиоксидантной системы и активацией апоптоза. В данной работе были проанализированы содержание повтора рибосомной ДНК (рДНК), повторов SatIII(1q) и TR в лейкоцитах 11 мужчин – членов экспедиции на станцию Восток в 2019–2020 гг. Для наблюдения динамических изменений в количестве повторяющихся элементов генома и степени окисления ДНК проводили 6 заборов крови: до прибытия в Антарктиду, через 27, 85, 160, 270 и 315 дней зимовки. Для анализа адаптивных изменений измеряли уровни экспрессии генов белков BAX, BCL2, NOX4, NRF2, SOD1, HIF1. Удалось обнаружить снижение содержания SatIII(1q) и увеличение содержания TR на фоне стабильного содержания рДНК в клетках крови людей в ходе зимовки. Эти изменения наряду со снижением маркера окисления 8-oxodG в ДНК ассоциированы с увеличением активности гена *NOX4*, снижением активности гена *NRF2*, а также увеличением экспрессии гена проапоптотического белка BAX. Таким образом, зимовка в Антарктиде стимулирует в организме человека адаптивный ответ, который включает усиление элиминации из кровотока "балластных" клеток с высоким уровнем окисления ДНК, с высоким содержанием повтора SatIII(1q) и низким содержанием TR. В развитии ответа значительную роль может играть повышение уровня АФК вследствие хронической активации гена *NOX4* на фоне блокирования активности гена антиокислительного транскрипционного фактора NRF2.

Ключевые слова: рДНК, SatIII, теломерный повтор, NOX4, NRF2, Антарктида, апоптоз, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0131164624040107 **EDN:** BSPZVV

Вариация числа копий (CNVs) определенных фрагментов ДНК является важнейшим свойством генома человека [1, 2]. Тандемные повторы широко представлены в геноме и характеризуются выраженным количественным полиморфизмом [3–6]. Ранее мы исследовали CNVs трех типов тандемных повторов – повтора рибосомной ДНК (рДНК), сателлитного повтора III (Satellite III, SatIII) и теломерного повтора (*telomere repeat, TR*) – в условиях действия внешних и внутренних повреждающих факторов на организм человека и на культивируемые клеточные линии [7–13].

Число копий рДНК (rDNA CN) в геноме человека варьирует от 200 до 900 копий [9, 14]. Обнаружено, что геномы больных шизофренией содержат повышенное количество рДНК по сравнению со здоровым контролем [7, 15, 16]. Геномы пожилых людей с признаками когнитивных расстройств, напротив, содержат низкое количество копий рДНК [14], а в геномах долгожителей этот показатель варьирует в узком диапазоне от 300 до 500 копий [9]. На примере культивируемых клеток мы показали, что копийность рДНК – стабильная характеристика генома, которая не изменяется при действии генотоксичных агентов [17].

SatIII(1q) является частью прицентромерного гетерохроматина первой хромосомы (1q12) [18], его содержание в геноме человека не является стабильным генетическим признаком и варьирует от 5 до 50 пг/нг ДНК [10, 11, 17]. В отличие от повтора рДНК, число копий SatIII(1q) в клетках одной и той же клеточной популяции изменяется в зависимости от внешних и внутренних факторов, индуцирующих окислительный стресс. На клеточных линиях показано, что малые дозы повреждающих агентов, а также старение, приводят к увеличению в популяции числа клеток с большим содержанием SatIII(1q) [10]. Такие клетки не отвечают на пролиферативные стимулы и не способны к развитию адаптивного ответа, а при увеличении интенсивности стрессорного воздействия — гибнут и элиминируются из клеточной популяции [13], в результате чего популяция обогащается клетками с низким содержанием повтора SatIII(1q). Таким образом, низкое содержание SatIII(1q) в ДНК ассоциировано либо с эффективной нейтрализацией или отсутствием окислительного стресса (например, в клетках детей или культивируемых клетках ранних пассажей), либо с высоким уровнем стресса (при действии больших доз повреждающих агентов или при заболевании, которое сопровождается эндогенным окислительным стрессом). Так, психоэмоциональный стресс у студентов-медиков, связанный со сдачей экзаменов, сопровождается значительным снижением содержания SatIII(1q) в лимфоцитах по сравнению с числом копий этого повтора у тех же студентов в период отсутствия острого стресса [19].

Известно, что участки ДНК, содержащие повторы SatIII, могут транскрибироваться с образованием длинных некодирующих РНК (lncRNA) при действии стресс-фактора, например, теплового шока, окислительного стресса или тяжелых металлов [20]. То есть, транскрипция SatIII — один из признаков ответа клеток на стресс. Некоторые авторы полагают, что транскрипция SatIII(1q) является причиной амплификации этого повтора в ДНК [21].

TR (у человека — (TTAGGG) n) расположены на концах хромосом. Содержание TR в геноме так же, как и содержание SatIII, не является стабильным генетическим признаком [22–24] и зависит от многих факторов: возраст клеток, уровень окислительного стресса, эндогенные заболевания, мутации в генах репарации [25, 26]. Исследуя репликативное старение культивируемых фибробластов кожи человека, мы обнаружили отрицательную корреляцию между числом копий SatIII и TR [10, 11].

Исследование клеток крови зимовщиков на протяжении периода их работы в Антарктиде является уникальной возможностью проследить изменение числа tandemных повторов в геноме при действии экстремальных факторов внешней среды

(изоляция, холод, низкое атмосферное давление, УФ-излучение, измененное магнитное поле), которые индуцируют психоэмоциональный и физиологический стресс. Мы полагаем, что анализ CNVs повторов позволяет оценить уровень стресса в организме зимовщиков в сравнении с другими, уже известными состояниями человека. Опираясь на наши предыдущие исследования, мы проанализировали ассоциации CNVs трех tandemных повторов с рядом других параметров клеток, которые отражают уровень стресса в клеточной популяции. Прежде всего, мы оценили уровень повреждения клеточной ДНК, определив содержание маркера окисления 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-oxodG) [27, 28]. Кроме того, уровень окислительного стресса в клетках крови зимовщиков оценивался по изменениям в экспрессии генов, принимающих участие в метаболизме активных форм кислорода (АФК): НАДФН-оксидазы NOX4 [29], транскрипционного фактора NRF2 [30, 31], супероксиддисмутазы SOD1 [32, 33], фактора HIF-1A [34–36]. Активацию апоптоза оценивали по изменению соотношения РНК двух белков-антагонистов — BAX и BCL2 [37–40].

Целью настоящего исследования является совместный анализ изменений в содержании трех tandemных повторов генома в ДНК клеток крови, изменений количества РНК SATIII(1q) и изменений в уровне экспрессии некоторых генов, регулирующих уровень окислительного стресса и гибели клеток. В результате впервые было показано, что условия Антарктиды индуцируют в организме человека адаптивный ответ, который заключается в более эффективном элиминировании из кровотока белых клеток крови с высоким содержанием сателлита III(1q12), высоким уровнем окисления ДНК и низким содержанием TR. При этом число копий рДНК остается неизменным, что соотносится с полученными ранее данными.

МЕТОДИКА

Исследования проводили в ходе 64-й Российской Антарктической Экспедиции. Экспедиция проходила с 7 ноября 2018 г. по 6 июня 2020 г., из этого периода на станции "Восток" участники экспедиции находились с 7 февраля 2019 г. по 5 февраля 2020 г. (рис. 1). Исследования проводили на участниках полярной зимовки мужского пола (11 чел.) в возрасте от 32 до 64 лет (в среднем 49.7 ± 10.4 лет). Длина и масса тела составила 174.3 ± 1.9 см и 80.8 ± 2.9 кг соответственно. Уровень физической активности участников экспедиции в ходе пребывания на станции оставался низким на протяжении всего периода и ограничивался периодическими (1–2 раза в неделю) заготовками снега для обеспечения станции питьевой и технической водой. Состояние здоровья участников экспедиции

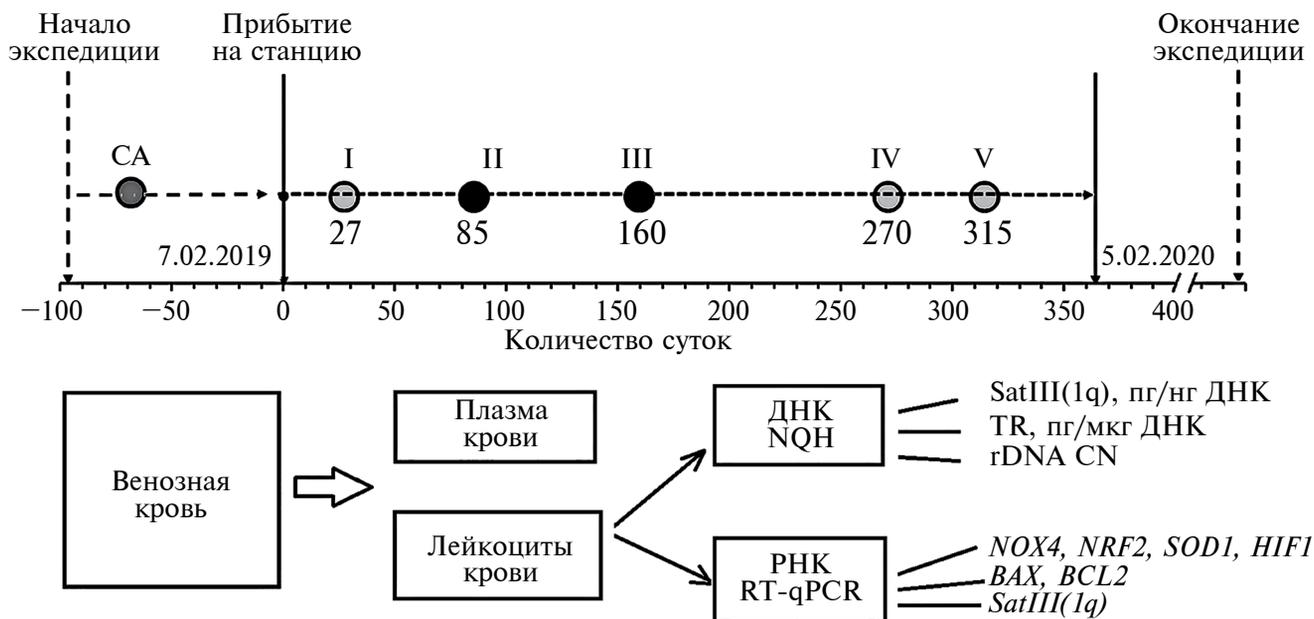


Рис. 1. Общая схема эксперимента.

оставалось удовлетворительным на протяжении всех месяцев зимовки.

Врачом экспедиции были взяты образцы крови у всех участников. Проба СА – кровь брали до прибытия на станцию (контрольная проба). Пробы I–V – кровь брали в различные периоды пребывания людей на станции. Пробы I (06.03.2019), IV (05.11.2019) и V (18.12.2019) позволяют проанализировать ответ организма на функционирование в условиях полярного дня. Пробы II (03.05.2019) и III (16.07.2019) – ответ на функционирование организма в условиях полярной ночи.

Сразу же после получения крови от участников было проведено отделение плазмы от клеток путем центрифугирования. Образцы клеток и плазмы были заморожены и проанализированы после доставки в Москву. Всего было проанализировано 64 образца плазмы крови и 64 образца лейкоцитарной массы (эритроциты были лизированы и отделены от белых клеток крови). Два образца (точки V у № 3 и № 11) не были получены по техническим причинам.

Выделение ДНК проводили методом экстракции органическими растворителями, который подробно описан ранее [15]. Кратко: к 1 мл осадка клеток крови добавляли 100 мкл лизирующего раствора (10% SLS, 0.2 М EDTA, 0.075 мг/мл РНказ А (*Sigma*, США)), инкубировали 1 ч при 37°C. Далее смесь обрабатывали протеиназой К (0.2 мг/мл, *Promega*, США) в течение 24 ч при 37°C. После фенольной очистки фрагменты ДНК преципитировали в двух объемах этанола в присутствии 2 М ацетата аммония. Осадок дважды промывали

75% этанолом, подсушивали и растворяли в воде. Концентрацию ДНК в растворе определяли дважды: методом спектрофотометрии для первичной оценки количества выделенной ДНК, затем – флуоресцентным методом с применением красителя *PicoGreen* (*Molecular Probes/Invitrogen*, США) и планшетном анализаторе *EnSpire* (*PerkinElmer*, США) при длинах волн возбуждения и излучения 488 и 528 нм, соответственно. Стандартная ошибка определения концентрации ДНК в водном растворе методом флуоресценции составляет 3–5% от измеряемой величины. Относительная стандартная ошибка, включающая этап выделения ДНК, составила $9 \pm 5\%$.

Содержание повторов ДНК в образцах проводили методом нерадиоактивной количественной гибридизации (*non-radioactive quantitative hybridization, NQH*), описанным ранее [8, 15]. Кратко: от 4 до 6 точек каждого образца денатурированной ДНК (в концентрации 50 нг/мл) наносили на фильтр (*Optitran BA-S85, GE healthcare*, США). Шесть стандартных образцов геномной ДНК с той же концентрацией с известным содержанием повторов рДНК и *SatIII* наносили на тот же фильтр и строили калибровочную кривую для определения зависимости интенсивности сигнала от числа копий повторов в отдельном образце. В качестве контроля неспецифического сигнала на фильтр также наносили ДНК фага λ (50 нг/мл). Фильтр нагревали в вакууме при 80°C в течение 1.5 ч, затем проводили гибридизацию с зондами, подсушенный фильтр сканировали и анализировали с помощью программы *Images6* (Медико-генетический научный центр им. акад.

Н.П. Бочкова, г. Москва). Сигналы от точек одного образца усредняли, содержание повторов высчитывали по калибровочной кривой. Стандартная ошибка метода — $11 \pm 8\%$. Для оценки копийности рДНК использовали зонд р(ETS-18S), соответствующий фрагменту рДНК длиной 5.8 т.п.н., расположенному в области +515–+5321 нуклеотидов от точки начала транскрипции, относительно HSU 13369 (*GenBank*, США). Эта область была клонирована в вектор рBR322. Зонд f-SatIII представлял собой фрагмент ДНК SatIII человека длиной 1.77 т.п.н., полученный в результате рестрикции по сайту EcoRI и клонированный в вектор. Зонды метили биотином с применением набора *Biotin NT Labeling Kit* (*Jena Bioscience GmbH*, Германия).

Метод количественного определения 8-oxodG подробно описан ранее [41]. Кратко: образцы ДНК в виде трех точек (10 нг/точка) наносили на фильтр (*Optitran BA-S85*, *GE Healthcare*, США). Четыре стандартных образца окисленной геномной ДНК (10 нг/точка) с известным содержанием 8-oxodG (определено методом *ESI-MS/MS* на приборе *AB SCIEX 3200 Qtrap*) наносили на тот же фильтр, чтобы построить калибровочную зависимость интенсивности сигнала от числа копий 8-oxodG в образце ДНК. Фильтр нагревали при 80°C в вакууме в течение 1.5 ч, затем инкубировали с антителами против 8-oxodG, конъюгированными с щелочной фосфатазой (*Abcam*). Для детекции использовали *NBT* и *BCIP* (США), по окончании реакции фильтр промывали водой и сушили в темноте, высушенный фильтр сканировали и обрабатывали в программе *Images6*, как описано ранее. Относительная стандартная ошибка составила $15 \pm 5\%$.

РНК выделяли с использованием наборов *YellowSolve* (*Klonogen*, Россия) или реагента *Trizol* (*Invitrogen*, США) согласно протоколам производителей. Концентрацию РНК в образцах определяли с помощью красителя *Quant-iT RiboGreen* (*R11491* *Invitrogen*, США) на планшетном анализаторе *EnSpire* (*PerkinElmer*, США), при длинах волн 487 и 524 нм. Обратную транскрипцию проводили с использованием реагентов компании *Sileks* (Россия) согласно рекомендациям производителя. Количественную ПЦР проводили с применением реагентов *Sybr-Green* ("Евроген", Россия) и прибора *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*, США). Специфические праймеры были подобраны и синтезированы компанией "Евроген" (Россия). Реакции проводили в объеме 25 мкл: 2.5 мкл буфера для ПЦР (700 ммоль/л Tris-HCl, pH 8.6; 166 ммоль/л сульфата аммония, 35 ммоль/л MgCl₂), 2 мкл 1.5 ммоль/л раствора дезоксинуклеотидов, 1 мкл 30 пмоль/л раствора праймеров. Условия подбирали индивидуально для каждой пары праймеров. После денатурации при 95°C в течение 4 мин следовало 40 циклов амплификации, состоящих из следующих этапов: 94°C — 20 с, 56–62°C — 30 с, 72°C — 30 с,

затем — финальная элонгация при 72°C в течение 5 мин. Результаты обрабатывали с использованием калибровочной кривой. Стандартная ошибка составила 2%.

Статистические данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Анализ данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (*p*) и анализа вариативности с поправкой Бонферони для множественной проверки статистически значимых различий между временными точками. Значение $p < 0.01$ принимали как достоверное. Анализ корреляций между параметрами проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Данные анализировали в программе *Excel*, *Microsoft Office* (*Microsoft*, США), *StatPlus2007 Professional software* (<http://www.analystsoft.com>) и *StatGraphics* (*Statgraphics Technologies*, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание тандемных повторов в клетках крови зимовщиков. Количество рДНК в составе ДНК, выделенной из клеток крови каждого участника экспедиции (рис. 2, *В*, *Г*), не изменялось в условиях зимовки и варьировало от 437 копий на диплоидный геном (9) до 505 копий (8) (среднее 472 ± 24 копий, медиана 475, $N = 11$). Содержание повтора SatIII(1q) в ДНК зимовщиков варьировало от 7 (1 в точке V) до 36 (2 в точке CA) пг/нг ДНК (среднее 23 ± 8 пг/нг, медиана 22 пг/нг, $N = 11$, $n = 64$). В отличие от рДНК, содержание SatIII(1q) в составе клеточной ДНК достоверно изменялось в процессе зимовки по сравнению с контролем (рис. 2, *А*, *Г*). У всех зимовщиков фиксировали волнообразное снижение содержания повтора SatIII(1q) в различные периоды зимовки. Содержание TR в ДНК зимовщиков варьировало от 190 (11 в точке II) до 932 (1 в точке V) пг/мкг ДНК (среднее 314 ± 162 пг/мкг, медиана 268 пг/мкг, $N = 11$, $n = 64$). Содержание TR в образцах ДНК, выделенных из клеток крови одних и тех же людей, возрастало в различные периоды зимовки по сравнению с контролем (рис. 2, *Б*, *Г*).

Эти данные демонстрируют снижение у зимовщиков содержания SatIII(1q) на фоне возрастания содержания TR в течение I–III периодов экспедиции (рис. 2, *Г*). Как показывает график зависимости (рис. 2, *Д*), между этими параметрами наблюдается отрицательная корреляция: чем больше количество SatIII(1q), тем меньше копий TR в геноме испытуемого. Увеличение содержания TR относительно контроля (CA) в процессе зимовки отрицательно коррелирует со снижением содержания SatIII(1q).

Таким образом, в процессе жизни человека в Антарктиде в ДНК, выделенной из клеток крови зимовщиков, возрастает содержание TR и

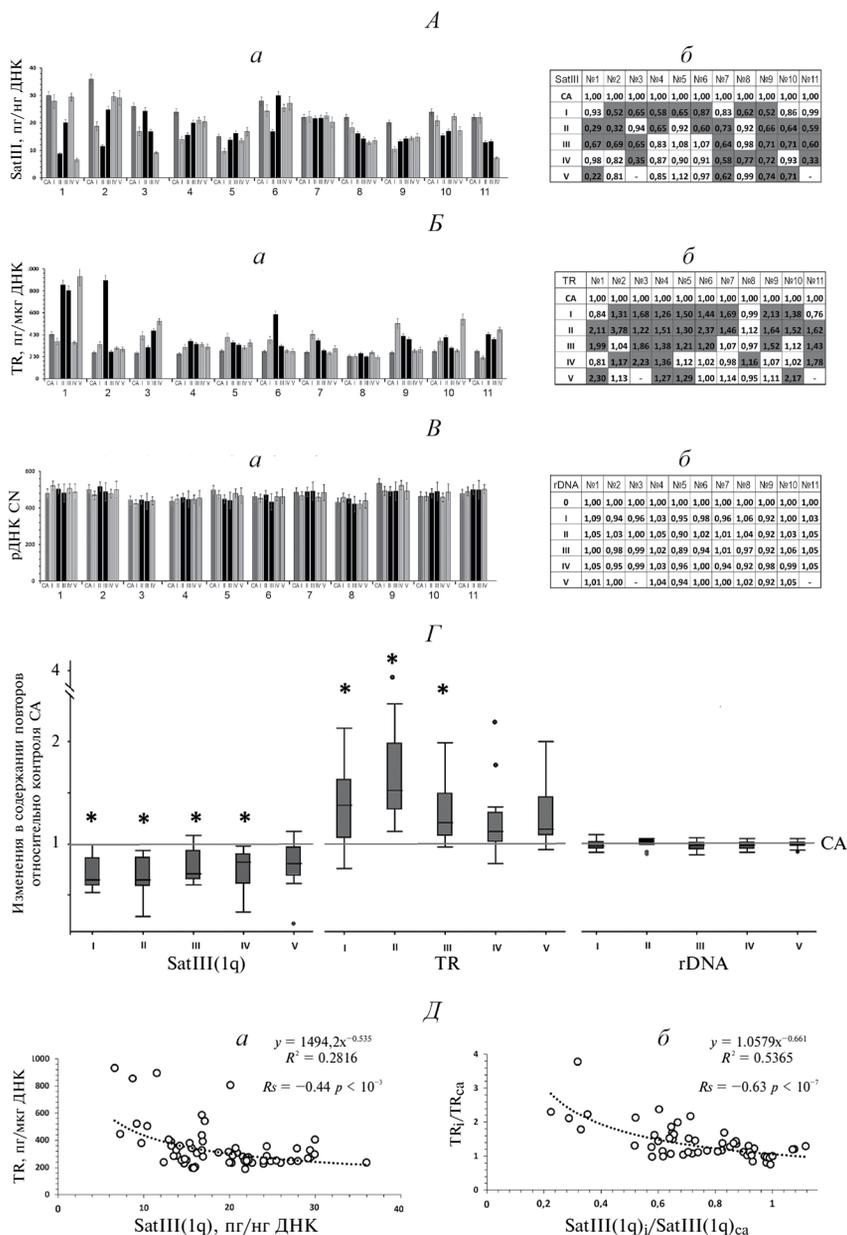


Рис. 2. Изменения содержания трех тандемных повторов в ДНК, выделенной из клеток крови зимовщиков. А – содержание повтора SatIII(1q) в образцах ДНК, выделенных из клеток крови каждого зимовщика (а), и анализ изменений содержания SatIII(1q) у зимовщиков в условиях работы на станции по сравнению с периодом до прибытия на станцию (б); Б – содержание повтора TR в образцах ДНК, выделенных из клеток крови каждого зимовщика (а), и анализ изменений содержания повтора TR в условиях работы на станции по сравнению с периодом до прибытия на станцию (б); В – содержание рДНК в образцах ДНК, выделенных из клеток крови каждого зимовщика (а), и анализ изменений содержания рДНК в условиях работы на станции по сравнению с периодом до прибытия на станцию (б); Г – изменения в содержании повторов в клетках, полученных от зимовщиков в точках I–V, по сравнению с контролем (CA). Точки I–IV: N = 11 образцов ДНК; V: N = 9. * – содержание повторов в группе I–V отличается от содержания в контрольной группе (p < 0.01). Д – зависимость содержания (а) и изменения содержания (б) TR в ДНК от содержания и изменения содержания повтора SatIII(1q). Приводятся данные корреляционного анализа Спирмена (Rs и p). На рисунках А–В приводятся среднее значение для трех измерений и ошибка измерения (SE). Темно-серый цвет столбиков – пробы крови, полученные до прибытия на станцию (проба CA). Серый цвет – пробы, полученные в период полярного дня. Черный цвет – пробы, полученные в период полярной ночи. На рисунках А–В белый цвет в таблицах – значение параметра не изменилось (p > 0.05, U-test); серый – значение параметра отличается от контроля (p < 0.05).

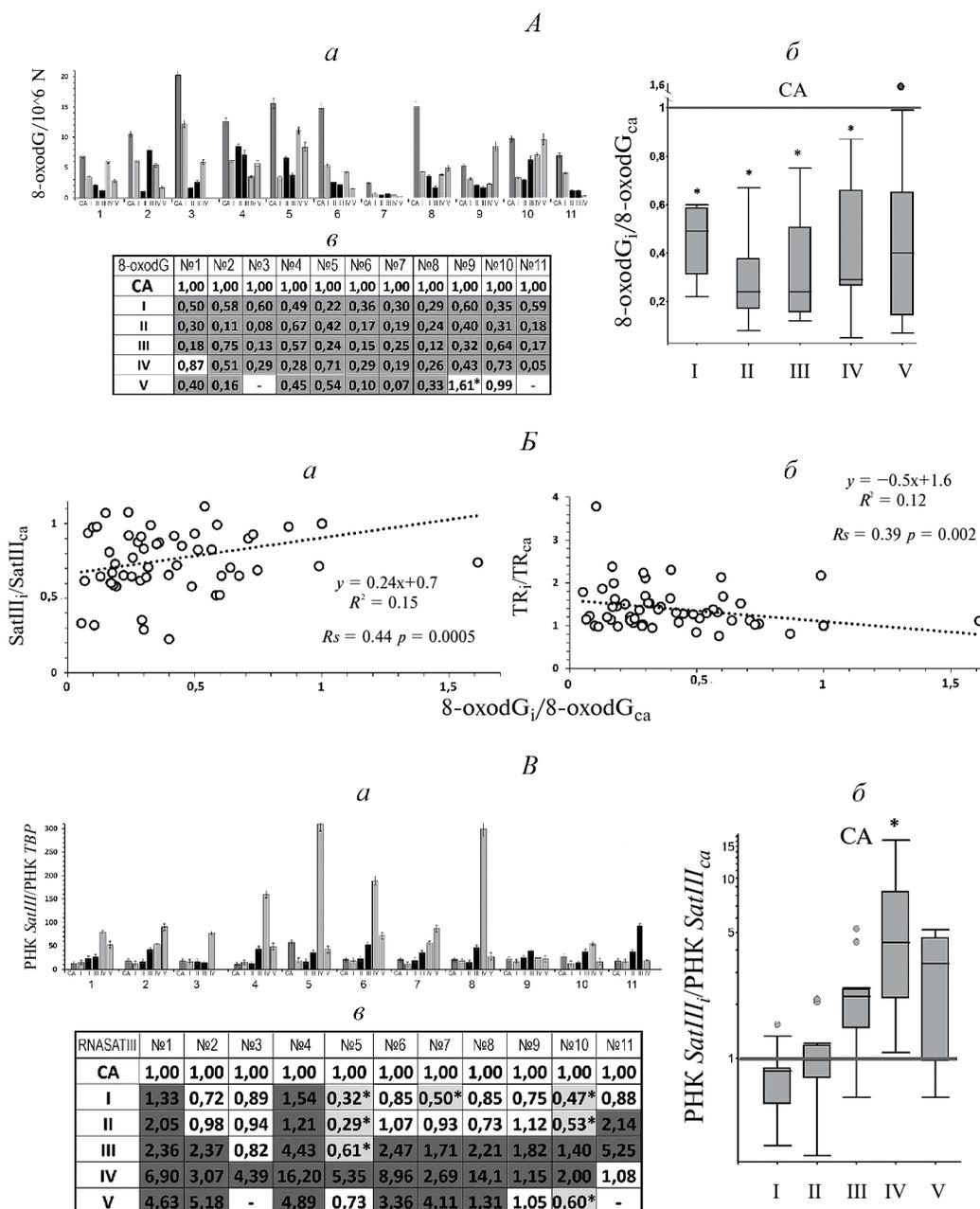


Рис. 3. Повреждения ДНК клеток крови зимовщиков.

A – содержание маркера окисления 8-oxodG в образцах ДНК, выделенных из клеток крови каждого зимовщика (*a*), изменения в содержании 8-oxodG в образцах ДНК в точках I-V по сравнению с контролем (CA) (*б*), анализ изменений 8-oxodG в условиях работы на станции по сравнению с периодом до прибытия на станцию (*в*). **B** – зависимость изменения содержания SatIII(1q) (*a*) и содержания TR (*б*) в ДНК от изменения уровня маркера окисления 8-oxodG. Приводятся данные корреляционного анализа Спирмена (*R* и *p*). **B** – содержание PPK SATIII(1q) в образцах PPK, выделенных из клеток крови каждого зимовщика (*a*), изменения в содержании PPK SATIII(1q) в образцах PPK в точках I-V, по сравнению с контролем (CA) (*б*), анализ изменений содержания PPK SATIII(1q) в условиях работы на станции по сравнению с периодом до прибытия на станцию (*в*). На графиках *A, a* и *B, a* приводятся средние значения для трех измерений и ошибка измерения (*SE*). Темно-серый цвет столбиков – пробы крови получены до прибытия на станцию (проба CA), светло-серый цвет – пробы, полученные в период полярного дня, черный цвет – пробы, полученные в период полярной ночи. На графиках *A, б* и *B, б* точки I-IV: *N* = 11 образцов; *V*: *N* = 9, * – содержание повторов в группе I-V отличается от содержания в контрольной группе (*p* < 0.01). Белый цвет в таблицах (*A, в* и *B, в*) – значение параметра не изменилось (*p* > 0.05, *U-test*); темный – повышалось; * обозначены пробы, в которых параметр снижался.

Таблица 1. Изменения в уровне РНК генов, регулирующих уровень АФК в клетках

<i>NOX4</i>	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11
CA	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
I	2,40*	1,95*	1,55*	1,46*	2,08*	1,26*	1,47*	1,45*	1,59*	1,53*	1,01
II	1,44*	3,04*	1,51*	1,20*	2,13*	1,82*	1,99*	1,38*	1,97*	1,11*	1,65
III	1,95*	1,82*	1,41*	1,24*	3,08*	1,24*	3,08*	1,41*	1,68*	1,23*	0,85
IV	1,35*	2,37*	1,24*	1,11*	1,43*	1,39*	1,92*	1,50*	0,94	0,91	1,01
V	0,89	0,94	—	0,50°	1,24*	0,50°	1,24*	0,78	1,06	0,77	—
<i>NRF2</i>	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11
CA	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
I	0,21°	0,23°	1,06	0,41°	0,83°	0,66°	0,45°	0,33°	1,01	0,58°	0,50°
II	0,11°	0,22°	1,75*	0,50°	0,80°	0,62°	0,26°	0,17°	1,02	0,71°	0,87°
III	0,82°	0,73°	1,12	0,15°	0,98	0,27°	0,98	0,30°	1,11	0,84°	0,23°
IV	1,06	0,99	0,87	0,51°	0,79°	0,48°	0,59°	0,49°	1,15	0,52°	0,64°
V	1,02	1,00	—	0,51°	1,07	0,29°	1,07	0,58°	1,18	0,96	—
<i>SOD1</i>	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11
CA	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
I	1,11	1,45*	1,12	1,15*	1,12	1,52*	1,43*	1,08	1,27*	1,28*	1,24*
II	0,75°	0,69°	0,60°	0,23°	0,95	0,66°	0,93	0,97	1,18	1,02	0,94
III	0,72°	0,58°	0,81°	0,18°	0,98	0,57°	0,69°	0,72°	0,83°	0,88	0,93
IV	0,91	0,51°	0,68°	0,20°	0,99	0,53°	1,03	0,84°	1,23*	0,55°	0,80°
V	0,82°	0,62°	—	0,24°	0,78°	0,65°	1,60*	0,86°	0,70°	0,54°	—
<i>HIF1</i>	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11
CA	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
I	1,29*	1,24*	2,28*	1,05	3,63*	1,26*	1,52*	1,17	1,16	1,25*	0,98
II	1,73*	0,66°	2,77*	0,54°	1,75*	1,55*	0,65°	1,28*	0,96	0,97	1,28*
III	1,70*	0,65°	2,20*	0,39°	1,53*	0,46°	0,52°	0,85°	0,45°	0,96	1,02
IV	1,46*	0,55°	1,32*	0,37°	0,78°	0,36°	0,40°	0,79°	0,55°	0,52°	0,82°
V	1,59*	0,59°	—	0,58°	0,69°	0,32°	0,24°	0,73°	0,49°	0,52°	—

Примечание: * – величина больше, чем в контроле CA ($p < 0.01$), ° – величина меньше, чем в контроле CA ($p < 0.01$).

снижается содержание SatIII(1q) на фоне стабильного содержания рибосомного повтора.

Окислительное повреждение ДНК клеток крови. Уровень окисления ДНК, выделенной из клеток крови зимовщиков, оценили, определив содержание маркера окисления 8-oxodG методом иммуноферментного анализа (рис. 3, А). В контрольных образцах ДНК количество маркера варьирует от 2 (7 в точке CA) до 20 (3 в точке CA) остатков 8-oxodG на 1 млн нуклеотидов (среднее 11 ± 5 8-oxodG /млн N, медиана 11 8-oxodG /млн N, $N = 11$, $n = 64$).

Следует отметить, что зимовка в Антарктиде сопровождалась у всех участников экспедиции снижением уровня окисления ДНК клеток крови: в точках I–V, полученных во время зимовки, количество 8-oxodG варьирует от 0.2 (7 в точке V) до 12 (3 в точке I) остатков 8-oxodG на 1 млн нуклеотидов (среднее 4 ± 3 8-oxodG /млн N, медиана 3 8-oxodG /млн N, $N = 11$, $n = 64$).

Изменение уровня окисления ДНК положительно коррелирует с изменениями в содержании

Таблица 2. Изменения в уровне РНК генов, регулирующих апоптоз

<i>BAX</i>	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11
CA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
I	2.30*	2.60*	2.10*	1.50*	0.90	2.30*	2.40*	0.90	1.50*	1.50*	1.10
II	2.00*	5.20*	4.40*	1.70*	1.00	2.10*	2.40*	1.40*	2.80*	2.30*	2.40*
III	2.90*	2.30*	1.70*	0.80	2.70*	1.30*	2.60*	2.70*	2.40*	1.20*	1.40*
IV	1.80*	2.30*	2.00*	1.50*	1.60*	1.20*	0.80	1.00	2.70*	1.10	1.00
V	0.90	1,20	—	0.50°	0.90	1.10	1.00	0.90	2.80*	0.90	—
<i>BCL2</i>	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11
CA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
I	0.36°	0.58°	0.68°	0.70°	0.73°	0.89	0.85	0.83	0.65°	0.57°	0.67°
II	0.27°	0.53°	0.71°	0.56°	1.09	0.52°	0.40°	0.59°	0.79	0.37	0.77
III	0.77	0.80°	0.89	0.52°	0.94	0.70°	1.01	0.71°	0.77	0.82	0.86
IV	0.50°	0.51°	0.71°	0.65°	0.84	0.79	0.87	0.95	0.85	0.57°	0.90
V	0.58°	0.64°	—	1.05	0.72	1.44*	1.00	1.67*	1.15	0.69°	—
<i>BAX/BCL2</i>	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11
CA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
I	6.40*	4.40*	2.90*	2.10*	1.30*	2.60*	2.70*	1.10	2.20*	2.60*	1.70*
II	7.30*	9.60*	5.90*	3.00*	0.90	4.10*	6.00*	2.40*	3.60*	6.30*	3.10*
III	3.80*	2.90*	1.90*	1.50*	2.80*	2.00*	2.50*	3.70*	3.20*	1.50*	1.70*
IV	3.60*	4.40*	2.60*	2.30*	1.90*	1.50*	0.90	1.10	3.20*	2.00*	1.10
V	1.70*	1.80*	—	0.50°	1.30*	0.80	1.00	0.50°	2.50*	1.40*	—

Примечание: см. табл. 1.

участвующих в регулировании уровня АФК в клетках человека. На рис. 4, Д приводятся данные корреляционного анализа между изменениями параметров ДНК и изменениями в уровне РНК генов в процессе зимовки по сравнению с контролем. В процессе зимовки в образцах РНК, выделенных из клеток крови всех зимовщиков, достоверно возрастает количество транскриптов *NOX4* в 1.2–3.2 раза (среднее 1.7 ± 0.5 , медиана 1.5). Достоверные изменения в экспрессии этого фермента, катализирующего синтез пероксида водорода, наблюдали в точках I–IV (табл. 1, рис. 4, А). Изменения в уровне РНК *NOX4* отрицательно коррелируют с изменениями в содержании повтора SatIII(1q) и содержанием маркера окисления ДНК и положительно – с изменениями в содержании TR (рис. 4, Д). Следует подчеркнуть, что в процессе зимовки значительное снижение содержания SatIII(1q) и маркера 8-oxodG на фоне возрастания содержания TR в ДНК ассоциировано с увеличением активности гена *NOX4*.

В отличие от *NOX4*, экспрессия *NRF2*, регулирующего антиокислительный ответ в клетках,

снижается в 1.2–9 раз в точках I–IV (рис. 4, А). Изменение количества транскриптов *NRF2* положительно коррелирует с изменением уровня окисления ДНК (рис. 4, Б).

В начале зимовки (точка I) количество РНК *SOD1* достоверно возрастает у всех зимовщиков в 1.1–1.5 раза, однако в дальнейшем наблюдали снижение экспрессии этого гена в 1.2–5.3 раза в различные периоды зимовки (рис. 4, А). Изменения в количестве РНК *SOD1* отрицательно коррелируют с изменениями в уровне РНК *SATIII(1q)* (рис. 4, Д, Е, а), т.е. экспрессия *SOD1* в клетках ассоциирована со снижением уровня транскрипции сателлита.

У 9 чел. фиксировали достоверное увеличение количества РНК *HIF1* в начале зимовки (точка I). К концу зимовки экспрессия этого гена снижалась по сравнению с контролем. Исключение составили зимовщики 1 и 3, для которых обнаружили возрастание количества РНК *HIF1* в течение всего периода наблюдений (табл. 1). Изменения в количестве РНК *HIF1* отрицательно коррелируют с

изменениями в уровне РНК *SATIII(1q)* (рис. 4, *Д, Е, б*). Изменения экспрессии *HIF1* положительно коррелируют с изменениями в количестве РНК *SOD1* (рис. 4, *Д*).

Экспрессия генов, регулирующих апоптоз. В табл. 2 и на рис. 4, *Б* приводятся данные, отражающие изменения в уровне экспрессии проапоптотического гена *BAX* и антиапоптотического гена *BCL2*. Отношение РНК *BAX* к РНК *BCL2* отражает уровень апоптоза в клетках [39].

В процессе зимовки в образцах РНК, выделенных из клеток крови всех зимовщиков, в 1.2–5.2 раза (среднее 2.3 ± 0.8 , медиана 2.3) возрастает количество РНК *BAX*. Достоверные изменения в экспрессии этого гена наблюдали в точках I–IV, максимальные изменения фиксировали в точке II (табл. 2, рис. 4, *Б*). Изменения в уровне РНК *BAX* положительно коррелируют с изменениями в уровне РНК *NOX4* (рис. 4, *В*). Наблюдали отрицательную корреляцию изменений РНК *BAX* с изменением содержания *SatIII(1q)* и изменением окисления ДНК и положительную – с изменениями в количестве TR (рис. 4, *Д*).

В отличие от *BAX*, экспрессия гена *BCL2* в точках I–IV снижается в 1.2–3.7 раза (рис. 4, *Б*). Максимальные изменения фиксировали в точке II. Изменения в уровне РНК *BCL2* отрицательно коррелируют с изменениями в экспрессии генов *NOX4* и *BAX* (рис. 4, *В*) и изменениями в содержании TR и положительно – с изменениями в содержании ДНК повтора *SatIII(1q)* (рис. 4, *Д*).

Отношение РНК (*BAX/BCL2*) в процессе зимовки в периоды I–IV возрастает у всех участников в 1.3–9.6 раза (среднее 3.2 ± 1.8 , медиана 2.6). Этот показатель положительно коррелирует с изменениями в уровнях экспрессии *NOX4* (рис. 4, *В, Г*), а также с изменениями числа копий TR (рис. 4, *Д, Е, в*) и отрицательно коррелирует с изменениями *SatIII(1q)* и уровня окисления ДНК (рис. 4, *Д*). Следует также отметить, что экспрессия *BAX* и *BCL2*, как и их соотношение, возвращается в норму (к контрольным значениям) к концу экспедиции (в точке V).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Усиление процессов гибели клеток крови в условиях зимовки. В Антарктиде организм человека подвергается сочетанному действию многих факторов, которые индуцируют различные физиологические и психические изменения [42–51]. Один из значимых факторов – это пониженное атмосферное давление, которое является причиной хронической гипоксии [46]. Пребывание в экстремальных условиях включает два основных периода – острое воздействие, которое индуцирует в организме человека адаптивный ответ, и хроническое действие.

По данным авторов работы [46], ранний ответ организма человека на условия Антарктиды (3, 7 и 20 сут) сопровождается постепенным повышением уровня АФК в клетках крови на фоне снижения активности антиокислительных систем клеток крови. Максимальный эффект достигается на 20 день и далее держится на одном уровне в течение как минимум 100 дней и снижается к 300 дню пребывания в Антарктиде. В настоящей работе забор образцов крови производился во временных точках с 27 по 315 день, что соответствует периоду выхода уровня окислительного стресса на плато по данным работы [46]. Это позволило более подробно исследовать ответ клеток крови человека на хроническое действие экстремальных условий жизнедеятельности. К 27 дню, по-видимому, в организме развился адаптивный ответ, направленный на снижение хронического повреждающего воздействия внешних факторов. Анализ изменений экспрессии ряда генов позволил получить представления о некоторых процессах, происходящих в суммарной популяции клеток крови зимовщиков в течение длительного времени.

Прежде всего, практически у всех зимовщиков необходимо отметить значительное повышение активности гена фермента *NOX4*, который катализирует реакцию синтеза пероксида водорода (табл. 1, рис. 4, *А*). Повышение экспрессии *NOX4* происходит на фоне снижения активности гена, кодирующего транскрипционный фактор *NRF2*, который контролирует антиокислительный ответ. Ранее, исследуя заболевание, которое протекает на фоне хронического окислительного стресса (шизофрения), мы обнаружили нелинейную зависимость между уровнями экспрессии *NRF2* и *NOX4* [52]. Не слишком большое увеличение уровня РНК *NOX4* в клетках ассоциировано с увеличением количества РНК *NRF2*, что коррелирует с развитием адаптивного ответа. Однако высокое содержание транскриптов *NOX4* ассоциировано со снижением антиокислительного ответа, что, в свою очередь, коррелирует с усилением процессов элиминации поврежденных клеток из популяции.

С активностью гена *NRF2* связан уровень экспрессии генов *SOD1* и *HIF1* [32–36]. Среднее количество РНК этих генов достоверно возрастает только в точке I, соответствующей двадцать седьмому дню пребывания на станции (рис. 4, *А*), и затем опускается ниже контрольных значений. По-видимому, блокирование антиокислительного ответа поддерживает уровень АФК, необходимый для ответа клеток на стресс.

Высокий уровень АФК в условиях гипоксии приводит к повреждению клеточных структур. Клетки с высоким уровнем повреждения погибают и элиминируются из популяции. Ранее мы показали, что повышение экспрессии *NOX4* в клеточной популяции ассоциировано с усилением апоптоза

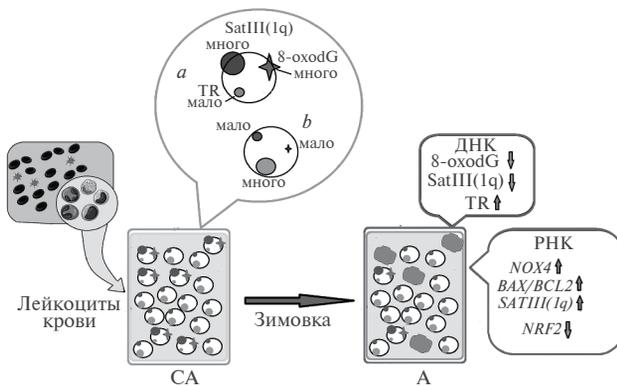


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая изменения в содержании повторов SatIII(1q) и TR в клетках крови зимовщиков.

[52]. В настоящем исследовании мы также обнаружили положительную корреляцию между повышением количества РНК *NOX4* и показателем, отражающим уровень апоптоза, — отношением РНК (*BAX/BCL2*) (рис. 4, А, Б). В точках I–IV возрастал уровень РНК *BAX* на фоне снижения уровня РНК *BCL2* (рис. 4, А), что свидетельствует об активации апоптоза.

Логично предположить, что активные процессы гибели клеток, которые ассоциированы с увеличением активности прооксидантного гена *NOX4* и блокированием антиоксидантной активности, приводят к очистке клеточных популяций от клеток с высоким уровнем окисления ДНК. Именно это предположение может объяснить интригующий факт значительного снижения уровня окисления ДНК клеток крови в процессе зимовки (рис. 3, А), несмотря на высокий уровень экспрессии *NOX4*.

Изменение количества повторов ДНК в условиях зимовки. В настоящей работе мы воспроизвели результаты, полученные в предыдущих исследованиях на клеточных культурах и первичных клетках человека. Во-первых, мы подтвердили стабильность содержания рДНК в клетках человека в условиях стресса (рис. 2, В). Отсутствие изменений в содержании рДНК в выделенной ДНК клеток говорит также об одинаковом содержании этого повтора во всех клетках крови. Таким образом, рибосомный повтор может использоваться в качестве внутреннего стандарта при исследовании изменений в геноме одного и того же человека под действием различных факторов.

Исследуя клетки крови зимовщиков, мы получили возможность проследить изменения в содержании повтора SatIII(1q) в лейкоцитах крови одних и тех же практически здоровых людей в зависимости от хронического стресса, вызванного зимовкой в Антарктиде. В отличие от рДНК, содержание

SatIII(1q) в выделенной ДНК значительно варьировало в процессе зимовки (рис. 2, А, Г). Ранее мы неоднократно отмечали гетерогенность клеток одной и той же популяции по содержанию повтора SatIII(1q) [10–13, 40]. Содержание повтора увеличено в стареющих клеточных популяциях и при достаточно низком уровне окислительного стресса, индуцированным повреждающим агентом. Если стресс возрастает, то клетки с большим содержанием повтора гибнут, поскольку не способны к развитию адаптивного ответа. Ранее мы также наблюдали отрицательную корреляцию между содержанием TR и повтора SatIII(1q), которая воспроизвелась и в настоящем исследовании (рис. 2, Е).

Совокупность фактов позволяет предположить, что условия зимовки в Антарктиде стимулируют усиленную гибель особой фракции клеток крови, которые в обычных условиях, в отсутствие стресса, накапливаются в крови и элиминируются достаточно медленно (рис. 5). ДНК этих клеток повышено окислена, содержит много SatIII(1q) и мало TR (рис. 5). Популяция белых клеток крови гетерогенна. Содержание SatIII(1q) потенциально может снижаться в одних клетках, например в лимфоцитах, а содержание TR повышаться в других клетках, например в нейтрофилах. Однако наши предыдущие исследования на клетках одного типа (культивируемые линии стволовых клеток и фибробластов кожи и выделенные лимфоциты человека) позволяют предположить, что перечисленные изменения происходят в одних и тех же клетках. В дальнейшем мы планируем исследовать отдельно различные типы белых клеток крови на предмет варьирования содержания SatIII(1q) и TR в нормальных условиях и в условиях стресса.

Клетки с большими блоками повтора SatIII(1q) появляются в клеточной популяции постоянно в результате нарушения стабильности и метилирования прицентромерного гетерохроматина в условиях окислительного стресса. Нарушению стабильности гетерохроматина способствует снижение длины теломеры. Возможно, поэтому деконденсация прицентромерного гетерохроматина проявляется в старых клеточных популяциях [53]. Нарушение стабильности сопровождается транскрипцией деконденсированных участков с образованием РНК *SATIII(1q)*. Далее активируется механизм, описанный ранее *F. Bersani et al.* [21]. С помощью обратной транскриптазы образуются РНК-ДНК дуплексы, которые встраиваются в область 1q12, содержащую повышенное число разрывов ДНК и отличающуюся низким уровнем репарации. Увеличение количества РНК *SATIII(1q)* в клетках в процессе зимовки (рис. 3, В) говорит о возможной активности этого механизма. Однако повышенный уровень АФК индуцирует постоянную элиминацию этих клеток из кровотока. Не исключено, что в условиях Антарктиды происходит и блокировка

определенных стадий механизма, ведущего к увеличению содержания ДНК повтора SatIII(1q) в клетках.

Клетки с высоким содержанием 8-oxodG, большим количеством повторов SatIII(1q) и сниженным количеством TR (клетки *a*-типа на рис. 5) являются балластом в нормальной клеточной популяции, поскольку не отвечают на различные стимулы, но потребляют питательные вещества [13]. Значительную роль в элиминации этих клеток из крови может играть фермент NOX4, который стимулирует дополнительный окислительный стресс в этих клетках, индуцируя их гибель. Клетки с малым содержанием SatIII(1q) и нормальным содержанием TR способны развить адаптивный ответ в условиях повышения уровня АФК. Адаптивный ответ включает антиокислительные, репарационные и антиапоптотические механизмы.

Ранее, исследуя выделенные лимфоциты человека, мы обнаружили, что популяции лимфоцитов с высоким уровнем белка NOX4 и белка BAX и низким уровнем белка NRF2 содержат мало клеток с высоким уровнем окисления и двунитевых разрывов ДНК. В ДНК этих клеток обнаружено низкое содержание SatIII(1q) [52]. Снижение содержания SatIII(1q) на фоне увеличения содержания TR и активации генов *NOX4* и *BAX* мы обнаружили при исследовании влияния психоэмоционального стресса у студентов на содержание трех тандемных повторов в ДНК, выделенной из лимфоцитов крови [19].

Таким образом, изменения в содержании повторов SatIII(1q) и TR в образцах ДНК, выделенных из клеток крови зимовщиков, являются еще одним примером общего механизма ответа клеток организма человека на стресс, обусловленный влиянием психоэмоциональных и природных факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В экстремальных условиях Антарктиды в клетках крови человека возрастает количество прицентромерного сателлитного повтора (1q12) в результате активации его экспрессии. Зимовка в Антарктиде стимулирует в организме человека адаптивный ответ, который включает усиление апоптоза и последующей элиминации из кровотока "балластных" клеток с высоким уровнем окисления ДНК, с высоким содержанием повтора SatIII(1q) и низким содержанием TR. В развитии ответа значительную роль может играть повышение уровня АФК вследствие хронической активации гена *NOX4* на фоне блокирования активности гена антиокислительного транскрипционного фактора *NRF2*.

Финансирование работы. Исследование выполнено при поддержке базовой тематики ГНЦ РФ

– ИМБП РАН (Москва) FMFR-2024-0039 и базовой тематики ФГБНУ «МГНЦ» (Москва).

Соблюдение этических стандартов. Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены локальным этическим комитетом Медико-генетического научно-го центра им. акад. Н.П. Бочкова (Москва), протокол № 6/4 от 15.11.2016 г.

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Вклад авторов в публикацию. Н.Н. Вейко, С.А. Пономарёв – концепция исследования. Е.С. Ершова, Е.М. Малиновская, Е.А. Савинова, Ю.М. Чудакова, Ю.И. Елисеева, А.А. Садова, Н.Ю. Осецкий – получение результатов. Н.Н. Вейко, Е.С. Ершова, Е.М. Малиновская, Е.А. Савинова – анализ данных. Ю.М. Чудакова, Ю.И. Елисеева – подготовка иллюстраций. С.В. Костюк, С.А. Пономарёв – написание текста. В.А. Шмаров, М.П. Рыкова – редактирование текста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *de Koning A.P., Gu W., Castoe T.A. et al.* Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome // PLoS Genet. 2011. V. 7. № 12. P. e1002384.
2. *Monlong J., Cossette P., Meloche C. et al.* Human copy number variants are enriched in regions of low mappability // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. № 14. P. 7236.
3. *Brahmachary M., Guilmatre A., Quilez J. et al.* Digital genotyping of macrosatellites and multicopy genes reveals novel biological functions associated with copy number variation of large tandem repeats // PLoS Genet. 2014. V. 10. № 6. P. e1004418.
4. *Warburton P.E., Hasson D., Guillem F. et al.* Analysis of the largest tandemly repeated DNA families in the human genome // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 533.
5. *Black E.M., Giunta S.* Repetitive fragile sites: Centromere satellite DNA as a source of genome instability in human diseases // Genes (Basel). 2018. V. 9. № 12. P. 615.
6. *Hannan A.J.* Tandem repeats mediating genetic plasticity in health and disease // Nat. Rev. Genet. 2018. V. 19. № 5. P. 286.
7. *Вейко Н.Н., Еголина Н.А., Радзивил Г.Г. и др.* Количественное определение повторяющихся последовательностей в геномной ДНК человека. Обнаружение увеличенного количества рибосомных

- повторов в геномах больных шизофренией (результаты молекулярного и цитогенетического анализов) // Молекулярная биология. 2003. Т. 37. № 3. С. 409.
8. *Korzeneva I.B., Kostuyk S.V., Ershova E.S. et al.* 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. V. 791–792. P. 49.
 9. *Malinovskaya E.M., Ershova E.S., Golimbet V.E. et al.* Copy number of human ribosomal genes with aging: Unchanged mean, but narrowed range and decreased variance in elderly group // *Front. Genet.* 2018. V. 9. P. 306.
 10. *Ershova E.S., Malinovskaya E.M., Konkova M.S. et al.* Copy number variation of human Satellite III (1q12) with aging // *Front. Genet.* 2019. V. 10. P. 704.
 11. *Ershova E.S., Agafonova O.N., Zakharova N.V. et al.* Copy number variation of Satellite III (1q12) in patients with schizophrenia // *Front. Genet.* 2019. V. 10. P. 1132.
 12. *Ershova E.S., Savinova E.A., Kameneva L.V. et al.* Satellite III (1q12) copy number variation in cultured human skin fibroblasts from schizophrenic patients and healthy controls // *Front. Biosci.* 2023. V. 28. № 8. P. 191.
 13. *Konkova M.S., Ershova E.S., Savinova E.A. et al.* 1Q12 loci movement in the interphase nucleus under the action of ROS is an important component of the mechanism that determines copy number variation of Satellite III (1q12) in health and schizophrenia // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 8. P. 386.
 14. *Veiko N.N., Ershova E.S., Veiko R.V. et al.* Mild cognitive impairment is associated with low copy number of ribosomal genes in the genomes of elderly people // *Front. Genet.* 2022. V. 13. P. 967448.
 15. *Chestkov I.V., Jestkova E.M., Ershova E.S. et al.* Abundance of ribosomal RNA gene copies in the genomes of schizophrenia patients // *Schizophr. Res.* 2018. V. 197. P. 305.
 16. *Li S., Otsuka I., Tanifuji T. et al.* Ribosomal DNA gene copies are increased in blood and brain of Japanese schizophrenia patients // *PLoS One.* 2023. V. 18. № 1. P. e0280694.
 17. *Porokhovnik L.N., Veiko N.N., Ershova E.S., Kostuyk S.V.* The role of human Satellite III (1q12) copy number variation in the adaptive response during aging, stress, and pathology: A pendulum model // *Genes (Basel).* 2021. V. 12. №10. P. 1524.
 18. *Cooke H.J., Hindley J.* Cloning of human satellite III DNA: different components are on different chromosomes // *Nucleic Acids Res.* 1979. V. 6. № 10. P. 3177.
 19. *Umriukhin P.E., Ershova E.S., Filev A.D. et al.* The psychoemotional stress-induced changes in the abundance of SatIII (1q12) and telomere repeats, but not ribosomal DNA, in human leukocytes // *Genes (Basel).* 2022. V. 13. № 2. P. 343.
 20. *Valgardsdottir R., Chiodi I., Giordano M. et al.* Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. № 2. P. 423.
 21. *Bersani F., Lee E., Kharchenko P.V. et al.* Pericentromeric satellite repeat expansions through RNA-derived DNA intermediates in cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. V. 112. № 49. P. 15148.
 22. *Turner K.J., Vasu V., Griffin D.K.* Telomere biology and human phenotype // *Cells.* 2019. V. 8. № 1. P. 73.
 23. *Blackburn E.H., Epel E.S., Lin J.* Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection // *Science.* 2015. V. 350. № 6265. P. 1193.
 24. *Shay J.W.* Telomeres and aging // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2018. V. 52. P. 1.
 25. *Gomes N.M., Ryder O.A., Houck M.L. et al.* Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination // *Aging Cell.* 2011. V. 10. № 5. P. 761.
 26. *Barnes R.P., Fouquerel E., Opreško P.L.* The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis // *Mech. Ageing Dev.* 2019. V. 177. P. 37.
 27. *Shigenaga M.K., Ames B.N.* Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage // *Free Radic. Biol. Med.* 1991. V. 10. № 3–4. P. 211.
 28. *Pilger A., Rüdiger H.W.* 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2006. V. 80. № 1. P. 1.
 29. *Guo S., Chen X.* The human Nox4: Gene, structure, physiological function and pathological significance // *J. Drug Target.* 2015. V. 23. № 10. P. 888.
 30. *Kasai S., Shimizu S., Tatara Y. et al.* Regulation of Nrf2 by mitochondrial reactive oxygen species in physiology and pathology // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 2. P. 320.
 31. *Mir S., Golden B.D.O., Griess B.J. et al.* Upregulation of Nox4 induces a pro-survival Nrf2 response in cancer-associated fibroblasts that promotes tumorigenesis and metastasis, in part via Birc5 induction // *Breast Cancer Res.* 2022. V. 24. № 1. P. 48.
 32. *Milani P., Ambrosi G., Gammoh O. et al.* SOD1 and DJ-1 converge at Nrf2 pathway: a clue for antioxidant therapeutic potential in neurodegeneration // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013. V. 2013. P. 836760.
 33. *Niwa J., Yamada S., Ishigaki S. et al.* Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 38. P. 28087.

34. *Bi Z., Zhang Q., Fu Y. et al.* Nrf2 and HIF1 α converge to arsenic-induced metabolic reprogramming and the formation of the cancer stem-like cells // *Theranostics*. 2020. V. 10. № 9. P. 4134.
35. *Yu H., Chen B., Ren Q.* Baicalin relieves hypoxia-aroused H9c2 cell apoptosis by activating Nrf2/HO-1-mediated HIF1 α /BNIP3 pathway // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2019. V. 47. № 1. P. 3657.
36. *Di Gregorio J., Cilenti L., Ambivero C.T. et al.* UBXN7 cofactor of CRL3KEAP1 and CRL2VHL ubiquitin ligase complexes mediates reciprocal regulation of NRF2 and HIF-1 α proteins // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2021. V. 1868. № 4. P. 118963.
37. *Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J.* Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death // *Cell*. 1993. V. 74. № 4. P. 609.
38. *Hardwick J.M., Soane L.* Multiple functions of BCL-2 family proteins // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. V. 5. № 2. P. a008722.
39. *Korsmeyer S.J., Shutter J.R., Veis D.J. et al.* Bcl-2/Bax: A rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death // *Semin. Cancer Biol.* 1993. V. 4. № 6. P. 327.
40. *Ershova E.S., Savinova E.A., Kameneva L.V. et al.* Antipsychotics affect Satellite III (1q12) copy number variations in the cultured human skin fibroblasts // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 14. P. 11283.
41. *Ershova E.S., Jestkova E.M., Chestkov I.V. et al.* Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients // *J. Psychiatr. Res.* 2017. V. 87. P. 15.
42. *Kuwabara T., Naruiwa N., Kawabe T. et al.* Human change and adaptation in Antarctica: Psychological research on Antarctic wintering-over at Syowa station // *Int. J. Circumpolar Health.* 2021. V. 80. № 1. P. 1886704.
43. *Yadav A.P., Mishra K.P., Ganju L., Singh S.B.* Wintering in Antarctica: Impact on immune response of Indian expeditioners // *Neuroimmunomodulation.* 2012. V. 19. № 6. P. 327.
44. *Ikeda A., Ohno G., Otani S. et al.* Disease and injury statistics of Japanese Antarctic research expeditions during the wintering period: evaluation of 6837 cases in the 1st–56th parties – Antarctic health report in 1956–2016 // *Int. J. Circumpolar Health.* 2019. V. 78. № 1. P. 1611327.
45. *Van Ombergen A., Rossiter A., Ngo-Anh T.J.* “White Mars” – nearly two decades of biomedical research at the Antarctic Concordia station // *Exp. Physiol.* 2021. V. 106. № 1. P. 6.
46. *Mrakic-Spota S., Montorsi M., Porcelli S. et al.* Effects of prolonged exposure to hypobaric hypoxia on oxidative stress: Overwintering in Antarctic Concordia Station // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2022. V. 2022. P. 4430032.
47. *O'Brien K.A., Pollock R.D., Stroud M. et al.* Human physiological and metabolic responses to an attempted winter crossing of Antarctica: the effects of prolonged hypobaric hypoxia // *Physiol. Rep.* 2018. V. 6. № 5. P. e13613.
48. *Моруков Б.В., Рыкова М.П., Антропова Е.Н. и др.* Иммунологические аспекты пилотируемого марсианского полета // *Физиология человека.* 2013. Т. 39. № 2. С. 19.
49. *Ponomarev S., Kutko O., Rykova M. et al.* Changes in the cellular component of the human innate immunity system in short-term isolation // *Acta Astronautica.* 2020. V. 166. P. 89.
50. *Ponomarev S., Kalinin S., Sadova A. et al.* Immunological Aspects of Isolation and Confinement // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 697435.
51. *Junghans P., Schrader G., Faust H. et al.* Studies of the protein and the energy metabolism in man during a wintering in Antarctica // *Isotopes Environ. Health Stud.* 2012. V. 48. № 2. P. 208.
52. *Ershova E.S., Shmarina G.V., Martynov A.V. et al.* NADPH-oxidase 4 gene over-expression in peripheral blood lymphocytes of the schizophrenia patients // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 6. P. e0269130.
53. *Enukashvily N.I., Donev R., Waisertreiger I.S., Podgornaya O.I.* Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells // *Cytogenet. Genome Res.* 2007. V. 118. № 1. P. 42.

REFERENCES

1. *de Koning A.P., Gu W., Castoe T.A. et al.* Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 12. P. e1002384.
2. *Monlong J., Cossette P., Meloche C. et al.* Human copy number variants are enriched in regions of low mappability // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. № 14. P. 7236.
3. *Brahmachary M., Guilmatre A., Quilez J. et al.* Digital genotyping of macrosatellites and multicopy genes reveals novel biological functions associated with copy number variation of large tandem repeats // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 6. P. e1004418.
4. *Warburton P.E., Hasson D., Guillem F. et al.* Analysis of the largest tandemly repeated DNA families in the human genome // *BMC Genomics.* 2008. V. 9. P. 533.
5. *Black E.M., Giunta S.* Repetitive fragile sites: Centromere satellite DNA as a source of genome instability in human diseases // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 12. P. 615.

6. *Hannan A.J.* Tandem repeats mediating genetic plasticity in health and disease // *Nat. Rev. Genet.* 2018. V. 19. № 5. P. 286.
7. *Veiko N.N., Egolina N.A., Radzivil G.G. et al.* Quantitative analysis of repetitive sequences in human genomic DNA and detection of an elevated ribosomal repeat copy number in patients with schizophrenia (the results of molecular and cytogenetic analysis) // *Mol. Biol.* 2003 V. 37. № 3. P. 409.
8. *Korzeneva I.B., Kostuyk S.V., Ershova E.S. et al.* 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. V. 791–792. P. 49.
9. *Malinovskaya E.M., Ershova E.S., Golimbet V.E. et al.* Copy number of human ribosomal genes with aging: Unchanged mean, but narrowed range and decreased variance in elderly group // *Front. Genet.* 2018. V. 9. P. 306.
10. *Ershova E.S., Malinovskaya E.M., Konkova M.S. et al.* Copy number variation of human Satellite III (1q12) with aging // *Front. Genet.* 2019. V. 10. P. 704.
11. *Ershova E.S., Agafonova O.N., Zakharova N.V. et al.* Copy number variation of Satellite III (1q12) in patients with schizophrenia // *Front. Genet.* 2019. V. 10. P. 1132.
12. *Ershova E.S., Savinova E.A., Kameneva L.V. et al.* Satellite III (1q12) copy number variation in cultured human skin fibroblasts from schizophrenic patients and healthy controls // *Front. Biosci.* 2023. V. 28. № 8. P. 191.
13. *Konkova M.S., Ershova E.S., Savinova E.A. et al.* 1Q12 loci movement in the interphase nucleus under the action of ROS is an important component of the mechanism that determines copy number variation of Satellite III (1q12) in health and schizophrenia // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 8. P. 386.
14. *Veiko N.N., Ershova E.S., Veiko R.V. et al.* Mild cognitive impairment is associated with low copy number of ribosomal genes in the genomes of elderly people // *Front. Genet.* 2022. V. 13. P. 967448.
15. *Chestkov I.V., Jestkova E.M., Ershova E.S. et al.* Abundance of ribosomal RNA gene copies in the genomes of schizophrenia patients // *Schizophr. Res.* 2018. V. 197. P. 305.
16. *Li S., Otsuka I., Tanifuji T. et al.* Ribosomal DNA gene copies are increased in blood and brain of Japanese schizophrenia patients // *PLoS One.* 2023. V. 18. № 1. P. e0280694.
17. *Porokhovnik L.N., Veiko N.N., Ershova E.S., Kostuyk S.V.* The role of human Satellite III (1q12) copy number variation in the adaptive response during aging, stress, and pathology: A pendulum model // *Genes (Basel).* 2021. V. 12. №10. P. 1524.
18. *Cooke H.J., Hindley J.* Cloning of human satellite III DNA: different components are on different chromosomes // *Nucleic Acids Res.* 1979. V. 6. № 10. P. 3177.
19. *Umriukhin P.E., Ershova E.S., Filev A.D. et al.* The psychoemotional stress-induced changes in the abundance of SatIII (1q12) and telomere repeats, but not ribosomal DNA, in human leukocytes // *Genes (Basel).* 2022. V. 13. № 2. P. 343.
20. *Valgardsdottir R., Chiodi I., Giordano M. et al.* Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. № 2. P. 423.
21. *Bersani F., Lee E., Kharchenko P.V. et al.* Pericentromeric satellite repeat expansions through RNA-derived DNA intermediates in cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. V. 112. № 49. P. 15148.
22. *Turner K.J., Vasu V., Griffin D.K.* Telomere biology and human phenotype // *Cells.* 2019. V. 8. № 1. P. 73.
23. *Blackburn E.H., Epel E.S., Lin J.* Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection // *Science.* 2015. V. 350. № 6265. P. 1193.
24. *Shay J.W.* Telomeres and aging // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2018. V. 52. P. 1.
25. *Gomes N.M., Ryder O.A., Houck M.L. et al.* Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination // *Aging Cell.* 2011. V. 10. № 5. P. 761.
26. *Barnes R.P., Fouquerel E., Opreško P.L.* The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis // *Mech. Ageing Dev.* 2019. V. 177. P. 37.
27. *Shigenaga M.K., Ames B.N.* Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage // *Free Radic. Biol. Med.* 1991. V. 10. № 3–4. P. 211.
28. *Pilger A., Rüdiger H.W.* 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2006. V. 80. № 1. P. 1.
29. *Guo S., Chen X.* The human Nox4: Gene, structure, physiological function and pathological significance // *J. Drug Target.* 2015. V. 23. № 10. P. 888.
30. *Kasai S., Shimizu S., Tatara Y. et al.* Regulation of Nrf2 by mitochondrial reactive oxygen species in physiology and pathology // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 2. P. 320.
31. *Mir S., Golden B.D.O., Griess B.J. et al.* Upregulation of Nox4 induces a pro-survival Nrf2 response in cancer-associated fibroblasts that promotes tumorigenesis and metastasis, in part via Birc5 induction // *Breast Cancer Res.* 2022. V. 24. № 1. P. 48.
32. *Milani P., Ambrosi G., Gammoh O. et al.* SOD1 and DJ-1 converge at Nrf2 pathway: a clue for antioxidant

- therapeutic potential in neurodegeneration // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013. V. 2013. P. 836760.
33. Niwa J., Yamada S., Ishigaki S. et al. Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 38. P. 28087.
34. Bi Z., Zhang Q., Fu Y. et al. Nrf2 and HIF1 α converge to arsenic-induced metabolic reprogramming and the formation of the cancer stem-like cells // *Theranostics.* 2020. V. 10. № 9. P. 4134.
35. Yu H., Chen B., Ren Q. Baicalin relieves hypoxia-aroused H9c2 cell apoptosis by activating Nrf2/HO-1-mediated HIF1 α /BNIP3 pathway // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2019. V. 47. № 1. P. 3657.
36. Di Gregorio J., Cilenti L., Ambivero C.T. et al. UBXN7 cofactor of CRL3KEAP1 and CRL2VHL ubiquitin ligase complexes mediates reciprocal regulation of NRF2 and HIF-1 α proteins // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2021. V. 1868. № 4. P. 118963.
37. Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death // *Cell.* 1993. V. 74. № 4. P. 609.
38. Hardwick J.M., Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. V. 5. № 2. P. a008722.
39. Korsmeyer S.J., Shutter J.R., Veis D.J. et al. Bcl-2/Bax: A rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death // *Semin. Cancer Biol.* 1993. V. 4. № 6. P. 327.
40. Ershova E.S., Savinova E.A., Kameneva L.V. et al. Antipsychotics affect Satellite III (1q12) copy number variations in the cultured human skin fibroblasts // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 14. P. 11283.
41. Ershova E.S., Jestkova E.M., Chestkov I.V. et al. Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients // *J. Psychiatr. Res.* 2017. V. 87. P. 15.
42. Kuwabara T., Naruiwa N., Kawabe T. et al. Human change and adaptation in Antarctica: Psychological research on Antarctic wintering-over at Syowa station // *Int. J. Circumpolar Health.* 2021. V. 80. № 1. P. 1886704.
43. Yadav A.P., Mishra K.P., Ganju L., Singh S.B. Wintering in Antarctica: Impact on immune response of Indian expeditioners // *Neuroimmunomodulation.* 2012. V. 19. № 6. P. 327.
44. Ikeda A., Ohno G., Otani S. et al. Disease and injury statistics of Japanese Antarctic research expeditions during the wintering period: evaluation of 6837 cases in the 1st–56th parties – Antarctic health report in 1956–2016 // *Int. J. Circumpolar Health.* 2019. V. 78. № 1. P. 1611327.
45. Van Ombergen A., Rossiter A., Ngo-Anh T.J. “White Mars” – nearly two decades of biomedical research at the Antarctic Concordia station // *Exp. Physiol.* 2021. V. 106. № 1. P. 6.
46. Mrakic-Sposta S., Montorsi M., Porcelli S. et al. Effects of prolonged exposure to hypobaric hypoxia on oxidative stress: Overwintering in Antarctic Concordia Station // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2022. V. 2022. P. 4430032.
47. O'Brien K.A., Pollock R.D., Stroud M. et al. Human physiological and metabolic responses to an attempted winter crossing of Antarctica: the effects of prolonged hypobaric hypoxia // *Physiol. Rep.* 2018. V. 6. № 5. P. e13613.
48. Morukov B.V., Rykova M.P., Antropova E.N. et al. Immunological aspects of a space flight to Mars // *Human Physiology.* 2013. V. 39. № 2. P. 126.
49. Ponomarev S., Kutko O., Rykova M. et al. Changes in the cellular component of the human innate immunity system in short-term isolation // *Acta Astronautica.* 2020. V. 166. P. 89.
50. Ponomarev S., Kalinin S., Sadova A. et al. Immunological Aspects of Isolation and Confinement // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 697435.
51. Junghans P., Schrader G., Faust H. et al. Studies of the protein and the energy metabolism in man during a wintering in Antarctica // *Isotopes Environ. Health Stud.* 2012. V. 48. № 2. P. 208.
52. Ershova E.S., Shmarina G.V., Martynov A.V. et al. NADPH-oxidase 4 gene over-expression in peripheral blood lymphocytes of the schizophrenia patients // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 6. P. e0269130.
53. Erukashvily N.I., Donev R., Waisertreiger I.S., Podgornaya O.I. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells // *Cytogenet. Genome Res.* 2007. V. 118. № 1. P. 42.

Adaptive Changes in Human Leukocytes in Response to a Long-Term Stay in Antarctica

N. N. Veiko^a, E. S. Ershova^a, E. M. Malinovskaya^a, E. A. Savinova^a,
J. M. Chudakova^a, J. I. Eliseeva^a, S. V. Kostyuk^a, A. A. Sadova^b, V. A. Shmarov^{b, *},
M. P. Rykova^b, N. Yu. Osetskiy^b, S. A. Ponomarev^b

^aMedical Genetic Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

^bInstitute of Biomedical Problems, RAS, Moscow, Russia

*E-mail: dr.grey@bk.ru

Oxidative stress and aging are known to alter the copy number (CN) of satellite III repeat (1q12) (SatIII(1q)) and telomeric repeat (TR) in the DNA of human cells. The extreme conditions of Antarctica could potentially affect the CN of these repeats in human blood cells, which may be associated with inhibition of the antioxidant system and activation of apoptosis. In this work, we analyzed the CN of ribosomal DNA (rDNA), SatIII(1q), and TR repeats in the leukocytes of 11 male members of the expedition to Vostok station in 2019–2020. To observe dynamic changes in the number of repeating elements of the genome and the degree of their oxidation, six blood samples were taken: before arrival in Antarctica, after 27, 85, 160, 270, and 315 days of wintering. To analyze adaptive changes, the expression levels of the BAX, BCL2, NOX4, NRF2, SOD1, and HIF1 genes were measured. We detected a decrease in SatIII(1q) CN and an increase in TR CN against the background of a stable rDNA CN in human blood cells during wintering. These changes, along with a decrease in the 8-oxodG in DNA, are associated with an increase in the activity of the *NOX4* gene, a decrease in the activity of the *NRF2* gene, and an increase in the expression of the proapoptotic protein BAX. Thus, wintering in Antarctica stimulates an adaptive response in the human body, which includes increased elimination from the bloodstream of “ballast” cells with a high level of DNA oxidation, a high SatIII(1q) content, and a low TR content. An increase in ROS levels due to chronic activation of the *NOX4* gene along with the blocked *NRF2* gene may play a significant role in the development of the response.

Keywords: rDNA, SatIII, telomeric repeat, NOX4, NRF2, Antarctica, apoptosis, oxidative stress.