

СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 8, 2021

Обзорные и теоретические статьи

- Генетические факторы риска развития ингибиторной формы гемофилии А
О. С. Пиеничникова, В. Л. Сурин 859
- Генетические факторы риска развития коронавирусной инфекции COVID-19
О. С. Готов, А. Н. Чернов, С. Г. Щербак, В. С. Баранов 871
- Молекулярные механизмы и генная регуляция меланиновой окраски оперения у птиц
И. В. Куликова 887

Общая генетика

- Белки синаптомембранного комплекса: уникальность или универсальность?
Т. М. Гришаева, Ю. Ф. Богданов 907

Генетика растений

- Генетическая структура и дифференциация реликтовых популяций липы на основе анализа изменчивости ядерных микросателлитных локусов
А. К. Экарт, А. Я. Ларионова, А. Н. Кравченко, С. А. Семерикова, М. И. Седаева 916
- Сравнительное изучение генетического разнообразия современных сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) России на основе отягощенности их генами гибридного некроза
В. А. Пухальский, Е. Н. Билинская, А. М. Кудрявцев 925

Генетика животных

- Тест-система для диагностики *VLAD*-мутации в популяциях крупного рогатого скота
К. Д. Сабетова, И. Ю. Подречнева, С. Г. Белокуров, П. О. Щеголев, И. А. Кофиади 934

Генетика человека

- Влияние полиморфных вариантов генов дофаминергической системы на риск развития расстройств с депрессивной симптоматикой
Е. И. Рафикова, Д. В. Шибалев, М. И. Шадрина, П. А. Сломинский, А. Б. Гехт, А. П. Рысков, В. А. Васильев 941
- Новая миссенс-мутация Gly238Ala в гене *TBX5* и ее фенотипическая характеристика
Н. Н. Чакова, Т. В. Долматович, С. С. Ниязова, С. М. Комиссарова, Е. С. Ребеко, А. А. Савченко 949
- Территориальная подразделенность популяции мегаполиса по этническому признаку в связи с проблемой создания генетических баз данных. Минск
И. С. Цыбовский, Е. А. Спивак, С. А. Котова, В. С. Крумплевский, А. С. Грачева, О. Л. Курбатова 955

Краткие сообщения

- Оценка распространенности и родительского происхождения хромосомных микроделетий и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*, в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития и у здоровых индивидов
М. Е. Лопаткина, С. А. Иванова, И. Н. Лебедев 964

Истоки формирования русского городского населения Северного Кавказа

Г. И. Ельчинова, В. В. Кадышев, Р. А. Зинченко

970

Вариант rs657152 не ассоциируется с уровнем вирусной нагрузки при COVID-19
или вероятностью заболевания в популяции европеоидов Восточной Сибири

*Е. А. Орлова, О. Б. Огарков, П. А. Хромова, В. В. Синьков,
М. А. Хаснатинов, С. Н. Жданова, Л. В. Рычкова, Л. И. Колесникова*

974

Contents

Vol. 57, No. 8, 2021

Reviews and Theoretical Articles

- Genetic Risk Factors for Inhibitor Development in Hemophilia A
O. S. Pshenichnikova and V. L. Surin 859
- Genetic Risk Factors for the Development of Coronaviral COVID-19 Infection
O. S. Glotov, A. N. Chernov, S. G. Scherbak, and V. S. Baranov 871
- Molecular Mechanisms and Gene Regulation of Melanin Plumage Coloration in Birds
I. V. Kulikova 887
-

General Genetics

- Synaptonemal Complex Proteins: Unicity or Universality?
T. M. Grishaeva and Yu. F. Bogdanov 907
-

Plant Genetics

- Genetic Structure and Differentiation of Relicts Lime Populations Based on the Analysis of Variability of Nuclear Microsatellite Loci
A. K. Ekart, A. Ya. Larionova, A. N. Kravchenko, S. A. Semerikova, and M. I. Sedaeva 916
- Comparative Study of the Genetic Diversity of Hybrid Necrosis Genes in Modern Russian Cultivars of Spring Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.)
V. A. Pukhalskij, E. N. Bilinskaya, and A. M. Kudryavtsev 925
-

Animal Genetics

- The Test System for *BLAD* Mutation Diagnosis in Cattle Populations
K. D. Sabetova, I. Yu. Podrechneva, S. G. Belokurov, P. O. Schiogolev, and I. A. Kofiadi 934
-

Human Genetics

- Influence of Polymorphic Gene Variants of the Dopaminergic System on the Risk of Disorders with Depressive Symptoms
E. I. Rafikova, D. V. Shibalev, M. I. Shadrina, P. A. Slominsky, A. B. Guekht, A. P. Ryskov, and V. A. Vasilyev 941
- New Missense Mutation Gly238Ala in the *TBX5* Gene and Its Phenotypical Characteristics
N. N. Chakova, T. V. Dolmatovich, S. S. Niyazova, S. M. Komissarova, E. S. Rebeko, and A. A. Savchenko 949
- Territorial Subdivision of the Megalopolis Population by the Ethnic Trait in Relation to the Problem of Creating Genetic Databases. Minsk
I. S. Tsybovsky, E. A. Spivak, S. A. Kotova, V. S. Krumpleyski, A. S. Gracheva, and O. L. Kurbatova 955
-

Short Communications

- Estimation of the Prevalence and Parental Origin of Chromosomal Microdeletions and Microduplications, Affecting *CNTN6* Gene, in Patients with Neurodevelopmental Disorders and Healthy Individuals
M. E. Lopatkina, S. A. Ivanova, and I. N. Lebedev 964

Immigration of the Russian Urban Population of the North Caucasus

G. I. Elchinova, V. V. Kadyshchev, and R. A. Zinchenko

970

SNP rs657152 Is Not Associated with the Level of Viral Load in COVID-19
or the Probability of Disease in the Population of Caucasians in Eastern Siberia

*E. A. Orlova, O. B. Ogarkov, P. A. Khromova, V. V. Sinkov,
M. A. Khasnatinov, S. N. Zhdanova, L. V. Rychkova, and L. I. Kolesnikova*

974

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 616.151.514-056.7,575.224.22,575.167

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ
ИНГИБИТОРНОЙ ФОРМЫ ГЕМОФИЛИИ А

© 2021 г. О. С. Пшеничникова¹, В. Л. Сурин¹. *

¹Национальный медицинский исследовательский центр гематологии, Москва, 125167 Россия

*e-mail: vadsurin@mail.ru

Поступила в редакцию 17.09.2020 г.

После доработки 14.01.2021 г.

Принята к публикации 04.02.2021 г.

Обзор посвящен описанию возможных механизмов возникновения ингибиторной формы гемофилии А. Наиболее полно описаны генетические факторы, но также уделено внимание и факторам иной природы, а также их сочетаниям, которые могут провоцировать синтез ингибирующих антител. Среди генетических детерминант особое внимание уделено характеру нарушений в гене фактора VIII, а также функциональным SNP в генах белков, регулирующих иммунную систему, которые изучались разными исследовательскими группами с применением как классических, так и самых современных молекулярно-генетических методов. Характер мутаций в гене *F8* остается наиболее объективным генетическим фактором риска возникновения ингибитора, причем особый интерес представляют работы по изучению сочетания вызывающих синтез антител миссенс-мутаций в гене *F8* с аллелями *HLA* II класса. Для других генетических маркеров требуются дальнейшие исследования с целью верификации их предполагаемой роли в развитии ингибиторной формы гемофилии А. Среди негенетических факторов развитие ингибитора в значительной степени зависит от типа препарата FVIII и интенсивности терапии. Однако, несмотря на многочисленные исследования, ингибиторная форма гемофилии остается наиболее сложным для терапии вариантом данного заболевания. В решении этой проблемы может помочь создание алгоритмов для предсказания риска развития ингибитора с помощью интеграционного анализа, учитывающего множественные факторы как генетической, так и другой природы и их взаимодействие.

Ключевые слова: гемофилия А, ингибиторная форма, генетические факторы риска, ген *F8*, гены регуляторов иммунной системы.

DOI: 10.31857/S0016675821080117

Гемофилия А представляет собой наследственное X-сцепленное нарушение системы свертывания крови, связанное с дефицитом или дисфункцией фактора свертывания крови FVIII, обусловленными мутациями в гене *F8* [1].

Современные достижения в лечении этого заболевания посредством внутривенного введения различных препаратов экзогенного фактора FVIII значительно улучшили качество жизни больных за последние годы, однако данный вид терапии привел к появлению одного из самых серьезных осложнений гемофилии А – выработке аллоантител анти-FVIII, ингибирующих активность фактора FVIII у 10–15% ранее нелеченных больных [1, 2]. Ингибитор развивается преимущественно у пациентов с тяжелой формой заболевания, но может появляться также при средней и легкой формах, если эндогенный FVIII имеет эпитопы, отличные от таковых на терапевтическом факторе [3]. Впервые действие ингибитора, названного “антикоагулянтом”, было зафиксировано в 1940-х гг. у

больного гемофилией через 3 часа после введения препарата фактора, в результате чего началось кровотечение и увеличилось время образования сгустка. Только в 1960–1970-х гг. было установлено, что “антикоагулянты” представляют собой антитела и вырабатываются у больных гемофилией в ответ на заместительную терапию [4].

Возникновение ингибиторов значительно осложняет контроль кровотечений и проведение хирургических процедур, а также увеличивает смертность больных и снижает качество их жизни. Ингибиторы FVIII преимущественно представлены поликлональными IgG, главным образом подклассов IgG4, IgG1 и в меньшей степени IgG2, к множественным эпитопам в пределах A2, A3 и C2 доменов FVIII [4–8]. Было показано, что у больных гемофилией А высокоаффинные антитела IgG4 к FVIII образуются задолго до проявления ингибиторного эффекта и, возможно, могут служить индикаторами риска его возникновения [7]. Спектр антител варьирует у разных больных и

может меняться в ходе развития иммунного ответа [9]. В настоящее время понимание патофизиологических механизмов, ведущих к возникновению ингибиторных антител, вышло на качественно новый уровень. Стало очевидным, что это многофакторный процесс, в нем участвуют клетки разных типов, цитокины и другие иммунные регуляторные молекулы, степень участия и действие которых определяются как генетическими, так и негенетическими факторами. Тем не менее надежно прогнозировать иммунный ответ больного на введение препарата фактора и риск развития ингибитора все еще невозможно.

Цель данного обзора — попытка обобщить все имеющиеся данные о факторах, влияющих на возникновение ингибиторов у больных гемофилией А.

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ

Иммунная толерантность к собственным антигенам (эндогенный фактор FVIII) обусловлена удалением из тимуса Т-клеток, распознающих их (аутореактивные Т-клетки). Однако у больных гемофилией антигенов FVIII в тимусе нет, соответственно комплексы пептид–МНС II не образуются, FVIII-специфичные Т-клетки остаются и обеспечивают базу для дальнейшего иммунного ответа на введение экзогенного фактора [10].

В инициацию иммунного ответа на введение экзогенного фактора FVIII вовлечены несколько типов клеток: антигенпрезентирующие клетки (АПК), Т- и В-лимфоциты [10]. Синтез IgG-антител с высокой аффинностью требует активации CD4+ Т-лимфоцитов соответствующими сигналами от АПК [11]. У ранее нелеченных больных в качестве АПК выступают преимущественно дендритные клетки, в то время как у больных с устоявшимся иммунным ответом основными АПК являются В-лимфоциты [12].

При заместительной терапии вводимый фактор FVIII связывается с поверхностью АПК, попадает внутрь путем эндоцитоза и протеолитически расщепляется на линейные олигопептиды длиной 13–18 аминокислот с коровой последовательностью из 7–10 аминокислотных остатков, взаимодействующей с главным комплексом гистосовместимости класса II (major histocompatibility complex class II, МНС II) [10]. После переноса на поверхность АПК комплексы пептид–МНС II презентуются антигенраспознающим рецепторам (T-cell receptors, TCR) CD4+ Т-клеток, что приводит к их пролиферации, дифференциации на эффекторные Т-клетки и Т-клетки памяти и передаче информации антиген-специфичным В-клеткам. Дальнейшая активация Т-лимфоцитов за счет образования комплексов между белка-

ми CD80/CD86 и CD28 сопровождается выбросом цитокинов (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ), связывание которых с соответствующими рецепторами (СК-R) приводит к активации генов иммунного ответа и костимулирующих белков на поверхности В-клеток (CD40, CD40L, CD154, CD28 и CD80/86), обеспечивая их пролиферацию, дифференциацию и продукцию антител к FVIII. Также формируются долгоживущие Т- и В-клетки памяти, которые остаются в костном мозге, лимфоузлах или селезенке. В-клетки памяти, прошедшие через лимфоузлы и соматический гипермутагенез, обладают более высокой аффинностью к антигену, чем наивные В-клетки [10]. Снижение активации Т-клеток осуществляется за счет конкурентного связывания цитотоксичного антигена Т-лимфоцитов (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, CTLA4) с молекулами CD80/CD86 на АПК. CTLA4 экспрессируется только на активированных Т-клетках и на меньшем уровне, чем CD28, однако его аффинность к CD80/CD86 в 20 раз выше. Важная роль пути CD28/CD80/CD86/CTLA4 во взаимодействии между АПК и CD4+ Т-клетками была показана в ряде работ [13–15].

Для того чтобы активировать CD4+ Т-клетки и придать им способность стимулировать антиген-специфичные В-клетки к дифференцировке в секретирующие антитела плазматические клетки и/или В-клетки памяти, часто требуются дополнительные триггеры, или сигналы тревоги [12, 16]. Эти сигналы могут иметь разную природу и возникать при взаимодействии с патогенами, повреждении ткани, стрессе или системных воспалительных ответах. Они представляют собой интерлейкины (IL), белки теплового шока, аденозинтрифосфат, реактивные формы кислорода и факторы роста [17]. Независимый от Т-клеток иммунный ответ на FVIII может быть важен для образования не-нейтрализующих и/или низкоаффинных антител [12]. Было показано, что активация врожденного иммунитета у больных гемофилией посредством распознающего патогены рецептора TLR9 (Toll-like receptor 9) коррелирует с развитием ингибитора, что свидетельствует в пользу участия системы распознавания сигналов тревоги в развитии иммуногенности FVIII.

Были описаны различные рецепторы эндоцитоза, ответственные за удаление и деградацию FVIII, однако лишь рецепторы, специфичные к маннозе (в частности, CD206), расщепляют FVIII и презентуют расщепленные пептиды Т-клеткам таким образом, чтобы запустить иммунный ответ [18]. Однако блокада этих рецепторов маннаном не препятствует поглощению FVIII дендритными клетками, что, вероятно, связано с тем, что в этом процессе участвуют какие-то другие, еще не описанные эндоцитозные рецепторы [19]. Эти предположения согласуются с негативным влиянием на эндоцитоз моноклонального анти-

тела KM33, мишенью которого является эпитоп на домене C1 FVIII [20]. Роль фактора фон Виллебранда (von Willebrand factor, VWF) в качестве иммунопротективного шаперона для FVIII до сих пор неясна, возможно он действует по принципу антигенной конкуренции и/или уменьшает эндцитоз фактора FVIII дозозависимым способом, предотвращая активацию иммунных эффекторов [19, 21].

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ

Нейтрализующие антитела к FVIII состоят, как упоминалось выше, преимущественно из поликлональных IgG-антител, главным образом подклассов IgG4, IgG1 и IgG2, к множественным эпитопам в пределах A2, A3 и C2 доменов FVIII [4–6, 8]. Считается, что главным механизмом, посредством которого антитела нейтрализуют фактор, является стерический эффект, т.е. пространственная блокировка молекулы, однако также был предложен вариант образования иммунных комплексов с последующим усиленным протеолизом FVIII [22].

Ингибиторы могут разными путями взаимодействовать с FVIII: блокировать сайт расщепления тромбином в области между доменами A1 и A2 за счет связывания ингибиторов с доменом A2; блокировать сайт связывания домена C2 с фосфолипидами; связываясь с доменами A3 и/или C2, нарушать взаимодействие FVIII с vWF или с активированным фактором IX; блокировать отделение FVIII от vWF в результате разрезания тромбином. Против домена C2 действуют два вида ингибиторов: классический и неклассический. Классические изоформы блокируют связи FVIII–vWF или FVIII–фосфолипиды, неклассические изоформы обладают большей специфичностью к комплексу FVIII–vWF, затрудняя его диссоциацию. Исследования на мышинных моделях показали, что при неклассических изоформах ингибитора требуется в 2 раза большая концентрация препарата фактора для предотвращения кровотечения [23].

ВЫЯВЛЕНИЕ ИНГИБИТОРА

Активность ингибитора определяется путем титрования плазмы пациента различными методами, среди которых наиболее распространены тест Бетезда и модифицированный тест Нимеген-Бетезда. Одна единица Бетезды (БЕ) блокирует 50% активности FVIII в нормальной плазме. Ингибитор классифицируется в зависимости от титра. Высокий титр ингибитора соответствует уровню 5 БЕ и выше, низкий титр ингибитора соответствует уровню ниже 5 БЕ, но выше уровня 0.6 БЕ. Титр ингибитора может изменяться с течением времени: некоторые ингибиторы с низким титром недолговечны и исчезают без лечения, другие

остаются с низким титром или прогрессируют до высокого титра после предъявления фактора FVIII. Эта характеристика важна, так как больных с низким титром и низким уровнем ответа можно лечить стандартным замещением фактора, хотя и в более высоких концентрациях, чтобы подавить ингибитор. Больных с высоким титром или с высоким уровнем ответа ингибитора можно эффективно лечить только с помощью шунтирующих препаратов или новых видов незаместительной терапии [1].

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА

Вклад генетических факторов в развитие ингибитора отмечался во многих исследованиях. Было показано, что риск развития ингибитора у детей в семьях, где он ранее выявлялся, в 3–6 раз выше [24–27]. В исследовании MIBS (Malmö International Brother Study) было установлено, что статус по отношению к ингибитору у братьев совпадал в 78% случаев, что значительно выше ожидаемого по сравнению с больными, не являющимися родственниками [24].

Раса и этническая принадлежность

Различия в риске развития ингибитора между представителями разных рас и этнических групп неоднократно отмечались исследователями. В частности, оказалось, что у больных гемофилией африканского и латиноамериканского происхождения ингибитор выявляется значительно чаще, что подчеркивает важность влияния генетических факторов [27–30]. На французской когорте пациентов было показано, что у лиц не-европеоидной расы риск развития ингибитора в 3.5–6.7 раз выше [26]. Предполагается, что в случае больных африканского происхождения это объясняется повышенной частотой встречаемости определенного гаплотипа F8. Выделяют шесть различных гаплотипов F8, которые определяются комбинацией из четырех несинонимичных SNP (табл. 1). Два из них (H1 и H2) встречаются во всех расовых группах, три (H3, H4 и H5) – только в африканской популяции, а H6 – только в китайской популяции [28].

Поскольку препараты FVIII (как плазматические, так и рекомбинантные) имеют преимущественно гаплотипы H1 и H2, это может приводить к развитию иммунного ответа у больных с другими гаплотипами [31]. С другой стороны, в одном из исследований данная гипотеза не подтвердилась, частота развития ингибитора не коррелировала с гаплотипами F8 у обследованных больных [30]. Другие генетические маркеры, такие как аллели HLA II и полиморфные профили генов-иммунорегуляторов, также могут варьировать по частоте в разных этнических группах [31].

Таблица 1. Гаплотипы *F8* и их распространение в мире

Полиморфизм	Гаплотип					
	H1	H2	H3	H4	H5	H6
p.Arg484His	Arg484	Arg484	Arg484	His484	Arg484	Arg484
p.Arg776Gly	Arg776	Arg776	Arg776	Arg776	Arg776	Gly776
p.Asp1241Glu	Asp1241	Glu1241	Glu1241	Glu1241	Asp1241	Glu1241
p.Met2238Val	Met2238	Met2238	Val2238	Val2238	Val2238	Met2238
Распространение	Весь мир	Весь мир	Африка	Африка	Африка	Китай

Типы мутаций в гене *F8*

Основным выявленным фактором риска возникновения ингибитора является тип нарушения в гене *F8*, который локализован на дистальном конце длинного плеча X-хромосомы (Xq28), имеет протяженность в 186 тпн (тыс. пар нуклеотидов) и состоит из 26 экзонов. Для гемофилии А описано более 3500 различных мутаций всех типов (Factor VIII Variant Database: www.factorviii-db.org; Human Gene Mutation Database: www.hgmd.cf.ac.uk), две из которых являются мажорными во всех популяциях. Это инверсия интрона 22 *inv22* [32] и инверсия интрона 1 *inv1* [33], встречающиеся у 45–50% и у 1–6% больных с тяжелой формой заболевания соответственно. Риск развития ингибитора у больных с тяжелой формой заболевания составляет 20–30%, в то время как у больных со средней и легкой степенью тяжести – 5–10% [34–36].

Вопрос о взаимосвязи между типом мутации в гене *F8* и риском возникновения ингибитора обсуждался очень активно. В 1995 г. впервые было показано, что встречаемость ингибитора у больных с тяжелой формой гемофилии А, обусловленной крупными делециями, нонсенс-мутациями и инверсией *inv22* (35.7, 38.4 и 34.4% соответственно), была в 7–10 раз выше, чем у больных с микроделециями/микроинсерциями (7.4%) и миссенс-мутациями (4.3%) [37]. Позже был проведен ряд исследований, посвященных этому вопросу, на различных выборках больных и с привлечением мутационных баз данных, в ходе которых корректировался состав групп высокого и низкого риска развития ингибитора. В частности, было показано, что нонсенс- и миссенс-мутации в легкой цепи FVIII значительно чаще приводят к развитию ингибитора, чем повреждения в тяжелой цепи, в связи с тем что в легкой цепи расположены эпитопы, участвующие в связывании с HLA MHC II [3, 34, 38].

В 2012 г. был проведен метаанализ данных для 5383 больных тяжелой формой гемофилии А, участвовавших в 30 исследованиях [39]. В этой работе было показано, что риск развития ингибитора максимален при носительстве мутаций, приво-

дящих к полному прекращению синтеза фактора, таких как крупные делеции и нонсенс-мутации. Достаточно высокая частота ингибитора была отмечена также при других мутациях: микроделециях/микроинсерциях (frameshift-мутации), мутациях сплайсинга в консервативных позициях +1, +2, –1, –2 и некоторых миссенс-мутациях (Arg593Cys, Tyr2105Cys, Arg2150His, Arg2163His, Trp2229Cys и Pro2300Leu), хотя в целом генные дефекты, приводящие к ограничению синтеза или нарушению структуры белка, были ассоциированы с меньшим риском развития ингибитора. По результатам данного метаанализа инверсия *inv22* реже вызывает образование ингибиторных антител, чем крупные делеции и нонсенс-мутации, что согласуется с недавним обнаружением факта синтеза FVIII у больных с инверсией в виде двух несекретируемых полипептидных цепей, что может приводить к развитию толерантности к FVIII [40].

Обобщение данных, полученных разными исследовательскими группами, привело к следующему распределению типов мутаций в гене *F8* по отношению к риску развития ингибитора [1]:

1) высокий риск возникновения ингибитора: крупные делеции (несколько экзонов), нонсенс-мутации на легкой цепи;

2) умеренный риск: крупные делеции (один экзон), нонсенс-мутации на тяжелой цепи, инверсия *inv22*; инверсия *inv1*;

3) низкий риск: микроделеции/микроинсерции, миссенс-мутации, мутации сплайсинга.

Классификация миссенс-мутаций по их способности провоцировать ингибиторный эффект наиболее сложна, поскольку связана с идентификацией иммуногенных эпитопов FVIII. При подобных нарушениях в организме циркулирует мутантный FVIII, отличающийся от нормального всего на одну аминокислоту, но в каких-то случаях это приводит к образованию ингибитора, а в каких-то – нет.

Была выполнена работа по изучению влияния нарушений в гене *F8* у больных со средней и легкой формой гемофилии, в которой было выявлено 19 ассоциированных с развитием ингибитора

миссенс-мутаций, семь из которых в предыдущих работах не указывались. Большая часть этих нарушений относилась к легкой цепи FVIII (домены A3, C1, C2) и лишь небольшая их часть затрагивала домен A2 тяжелой цепи [35]. В другой работе также было показано, что миссенс-мутации в доменах C1 и C2 чаще приводят к образованию антител. Значительно выше риск развития ингибитора был в том случае, когда исходная аминокислота относилась к классу небольших гидрофобных аминокислот (Ala, Val, Phe, Pro, Met, Ile, Leu, Trp). У больных с миссенс-мутациями, приводящими к тяжелой форме гемофилии, ингибитор встречался в 4 раза чаще, чем при сходных нарушениях, вызывающих среднюю и легкую форму заболевания [36]. В связи с этим актуальной представляется оценка степени патогенности миссенс-мутаций. Недавно с использованием анализа *in silico* было проведено исследование известных миссенс-мутаций в гене *F8* и показано, что классификация, основанная на оценке уровня их патогенности, позволяет более точно предсказывать риск развития ингибитора [41].

Классификация различных типов мутаций по их способности вызывать образование ингибитора продолжает совершенствоваться, но при этом многие вопросы остаются неясными. В частности, тот факт, что при нонсенс-мутациях антитела к фактору VIII возникают чаще, чем при микроделециях или микроинсерциях, хотя по своим последствиям эти типы нарушений родственны и приводят к синтезу укороченного белка с той лишь разницей, что в случае мутаций со сдвигом рамки считывания он будет иметь на карбоксильном конце какое-то количество лишних аминокислот.

Кроме типа мутации в гене *F8* на образование ингибитора могут оказывать влияние и другие генетические факторы.

Влияние изменчивости генов иммунного ответа на риск развития ингибитора

Была выявлена связь между повышенным риском возникновения ингибиторов к FVIII и SNP в других генах, помимо *F8*. Определяемые ими аминокислотные замены могут увеличивать риск развития ингибитора в результате конформационных изменений и/или нарушения функции соответствующих белков. В частности, такая корреляция была выявлена для гена лейкоцитарного антигена человека *HLA* (human leukocyte antigen) MHC II, молекулы которого играют важную роль при презентировании пептидов FVIII CD4+ Т-хелперам, а также для генов про- и противовоспалительных цитокинов (например, *IL-2*, *IL-10*, *TNF-α* и *CTLA4*) [42–45].

В европейских популяциях большая часть ассоциаций с риском возникновения ингибитора была выявлена для следующих аллелей *HLA* MHC II: *HLA-DRB1*14*, *HLA-DRB1*15*, *HLA-DQB1*06:02* и *HLA-DQB1*06:03* [1, 46, 47]. И напротив, аллели *HLA-DRB1*16* и *HLA-DQB1*05:02* ассоциировались с меньшим риском развития ингибитора [47]. В работе 2009 г., проведенной на когорте из 260 больных с тяжелой формой гемофилии, была показана высокая частота встречаемости генотипа *HLA-DRB1*15/HLA-DQB1*06:02*, аллеля –308A гена *TNF-α* и аллеля –1082G гена *IL-10* при ингибиторной форме заболевания [46]. Наиболее обособленной из европейских популяций оказалась греческая, для которой повышенная частота встречаемости ингибитора отмечалась у носителей аллелей *DRB1*01*, *DRB1*01:01* и *DQB1*05:01*, аллели *HLA* (*DRB1*15* и *DQB1*06:02*) были редкими в целом, а аллели *DRB1*11*, *DRB1*11:01*, *DQB1*03*, *DQB1*03:01* и генотип *DRB1*11/DQB1*03:01*, предположительно, обладали протективной функцией [48].

Результаты работ, проведенных в различных частях мира, свидетельствуют в пользу того, что распределение аллелей *HLA* MHC II различается в разных регионах, поэтому экстраполировать выводы, полученные на одной из популяций, нужно очень аккуратно. Так, на корейской популяции пациентов с тяжелой формой гемофилии было показано, что *HLA-DRB1*15* и *HLA-DRB1*05:01* обладают протективной функцией в противоположность результатам европейских исследований [49]. В Южной Бразилии у больных с ингибиторной формой заболевания чаще встречались аллели *HLA-C*16* *HLA* I класса и *HLA-DRB1*14* *HLA* II класса [50]. В одном из последних исследований показана ассоциация аллеля *HLA-DRB1*13* с высоким риском развития ингибитора и тенденция к пониженной вероятности возникновения антител у носителей *HLA-DRB1*07* в Индии [51].

В одном из обзоров было высказано предположение, что расхождения в результатах исследований влияния типа мутации в гене *F8* на риск развития ингибитора, а также различия в образовании ингибитора у сиблингов могут объясняться числом предполагаемых эпитопов на введенной молекуле, доступных для Т-клеток, а также способностью формировать стабильные комплексы *HLA*-пептид [12]. С использованием методов *in silico* было показано, что толерантность Т-клеток к FVIII и риск развития ингибитора коррелируют с аффинностью связывания олигопептидов FVIII с аллелями *HLA* у больных с точечными мутациями [52, 53]. Однако вероятнее всего способность молекул MHC II презентировать не менее одного экзогенного пептида FVIII является необходимым, но не достаточным условием для того, чтобы стимулировать Т-хелперы и выработать нейтрализующие антитела [47].

Также были предприняты попытки оценить риск развития ингибитора для отдельных сочетаний миссенс-мутаций в гене *F8* и известных 14 аллелей *HLA-DR*, что было выполнено *in silico* на базе машинного обучения с использованием информации из баз данных о различных миссенс-мутациях и встречаемости ингибитора при каждой из них. Была проанализирована возможность создания комплекса МНС II–пептид для всех возможных 15-меров, которые могут образоваться из препарата мутантного фактора, и всех аллелей *HLA-DR* [54]. Для небольшого набора миссенс-мутаций *F8* (6%) была определена степень их иммуногенности, в соответствии с которой они были отнесены к группам низкого/незначительного или высокого риска для всех аллелей *HLA-DR*. Мутации, попавшие в группу высокого риска, уже были описаны ранее как ассоциированные с развитием ингибитора. Для остальных проанализированных в этой работе мутаций отнесение к той или иной группе было затруднено, так как результат зависел от того, с каким именно аллелем *HLA-DR* взаимодействует фактор и на какие пептиды он расщепится для дальнейшего взаимодействия с комплексом МНС [54]. Данное исследование, безусловно, имело ряд ограничений, однако оно положило начало новым подходам к изучению комплексного влияния генетических факторов на возникновение ингибитора и структурных особенностей их взаимодействия с препаратом FVIII [30, 55].

Цитокины также могут играть определенную роль в формировании ингибитора, так как они участвуют в иммунном ответе, опосредованном антителами. В частности, была выявлена взаимосвязь с очень высоким уровнем статистической значимости между возникновением ингибитора и одним из аллельных вариантов микросателлита (CA)_n в гене *IL-10* [42, 45]. Ранее была показана взаимосвязь между наличием этого же аллеля и высоким уровнем продукции антител при некоторых аутоиммунных заболеваниях и множественной миеломе [56, 57]. Также в ряде исследований был показан повышенный риск развития ингибитора у носителей гаплотипов ACC и ATA в гене *IL-10* (SNP –1082G>A, –819C>T и –592C>A) [48, 58]. Еще в одном исследовании показали, что гаплотип CTT полиморфизмов rs6667202, rs4072226 и rs4072227 в гене *IL-10* ассоциирован с повышенным риском развития ингибитора, в то время как два редких гаплотипа (CGCGT и TACAT) полиморфизмов rs4072227, rs1701586, rs880790, rs885334 и rs12565617 были связаны с пониженным риском [45]. Молекула IL-10 является важным иммунным медиатором, и механизм ее действия включает в себя модификацию пролиферации Т-клеток и продукции цитокинов, усиление пролиферации регуляторных Т-клеток, пролиферацию и созревание В-клеток, а также влияние на АПК. Вариации

внутри промоторной области гена *IL-10* приводят к повышению уровня экспрессии, поэтому его потенциальная роль в развитии ингибитора выглядит весьма убедительной [12]. Предполагается, что IL-10 участвует в иммунном ответе при вирусных инфекциях, таких как ВИЧ, и даже были данные о том, что ассоциация IL-10 с развитием ингибитора сильнее для ВИЧ-позитивных больных, однако достоверность этого наблюдения остается под вопросом [45]. В другом исследовании на индийской популяции был показан значительный протективный эффект полиморфизма *IL-4*–590C/T (rs2243250) [51]. Этот цитокин продуцируется CD4⁺-Th2-клетками, НК-клетками, базофилами и тучными клетками, он играет важную роль в дифференцировке наивных Т-клеток, в переключении класса иммуноглобулина на IgE и IgG4 (последний рассматривается как основной изотип иммуноглобулинов против FVIII), приводит к усилению экспрессии молекул МНС II [51]. Кроме того, была выявлена протективная роль гаплотипа TGCCTG полиморфизмов rs10027390, rs2069772, rs2069779, rs2069778, rs2069762, rs4833248 в гене *IL2* по отношению к развитию ингибитора [45].

В одной из работ описан повышенный риск возникновения ингибитора при генотипе A/A полиморфизма с.–308G/A в гене *TNF-α*, кодирующем важный цитокин с потенциальным провоспалительным и иммуномодулирующим эффектом, хотя авторы подчеркивали необходимость дальнейших исследований, поскольку цитокины редко проявляют свои свойства изолированно от других факторов [43]. Однако в других исследованиях ассоциация этого полиморфизма с риском развития ингибитора не подтвердилась [45, 48].

Недавно было выполнено исследование, посвященное влиянию SNP в гене *MBL2*, который кодирует лектин, связывающий маннозу (MBL, mannose binding lectin), на риск развития ингибитора при гемофилии А [59], поскольку лишь рецепторы, специфичные к маннозе, расщепляют FVIII и презентуют расщепленные пептиды Т-клеткам необходимым для запуска иммунного ответа образом [18]. Минорные несинонимичные нуклеотидные замены в кодонах 54 (аллель В), 57 (аллель С) и 52 (аллель D) приводят к аминокислотным заменам, которые препятствуют олигомеризации белка, мешая его нормальному взаимодействию с протеазами. В группе больных с ингибиторной формой гемофилии частота встречаемости аллеля В была выше, чему у больных без ингибитора, а носители двух любых сочетаний из аллелей В, С, D относились только к группе с ингибитором. Кроме того, комбинация фенотипов с низкой продукцией MBL/высокой продукцией TNF-α (определяемой по полиморфизму с.–308G/A в гене *TNF-α*) встречалась значительно чаще в группе с ингибиторной формой гемофилии,

и наоборот, комбинация фенотипов с высокой продукцией MBL/низкой продукцией TNF- α статистически значимо чаще встречалась в группе без ингибитора [59].

Также было проведено исследование у больных с ингибиторной тяжелой формой гемофилии А SNP (–318C/T) гена *CTLA4*, для T-аллеля которого был показан эффект модуляции иммунного ответа при ряде аутоиммунных заболеваний [44]. В данной работе был показан значительный защитный эффект T-аллеля этого полиморфизма, который в другой работе, однако, не подтвердился [58].

Изучалась взаимосвязь между возникновением ингибитора к FVIII и микросателлитным полиморфизмом в промоторе гена *HMOX1*, кодирующего гемоксигеназу 1 – индуцируемый стрессом фермент с противовоспалительными свойствами, снижающий иммуногенность препарата фактора FVIII у экспериментальной линии мышей, дефицитных по FVIII. Генотипы с большим количеством (GT)-повторов чаще встречались у больных с ингибиторной формой гемофилии. Возможно, у больных с меньшим количеством повторов слабых воспалительных сигналов в месте повреждения достаточно для того, чтобы индуцировать гемоксигеназу 1 и, таким образом, замедлить созревание АПК и снизить вероятность развития иммунного ответа на препарат FVIII. Есть прямые указания на то, что большее количество (GT)-повторов в промоторе гена *HMOX1* ассоциировано с пониженной экспрессией фермента [60].

Кроме того, была выявлена ассоциация между возникновением ингибитора и полиморфизмом (с.392G>A) в гене *FCGR2A*, кодирующем один из группы рецепторов Fc γ R к IgG, экспрессирующихся в иммунных клетках [61]. Низкая аффинность рецепторов Fc γ модулирует про- и противовоспалительные ответы. Генотип A/A ассоциирован с трехкратным увеличением риска развития ингибитора в группе с тяжелой формой гемофилии А.

В одном из исследований было показано, что генотипы T/T и G/T SNP в гене *CD86* (rs2681401) ассоциированы с низким риском развития ингибитора [62].

Для того чтобы лучше понять генетическую основу возникновения ингибитора, большая панель SNP в генах, вовлеченных в иммунный ответ, была проанализирована в трех независимых когортах: MIBS, HIGS (Hemophilia Inhibitor Genetics Study) и HGDS (Hemophilia Growth and Development Study) [2]. 53 из 14626 SNP были предикторами возникновения ингибитора ($p > 0.05$ как минимум в двух когортах из трех), но только 13 из них имели высокую статистическую значимость при метаанализе ($p < 0.001$). Восемь из этих SNP, относящихся к генам *PDGFRB*, *PCGF2*,

HSP90B1, *F13A1*, *IGSF2*, *ALOX5AP*, *MAP2K4* и *PTPRN2*, предположительно обеспечивали защитный эффект, в то время как остальные пять SNP в генах *CD44*, *CSF1R*, *DOCK2*, *MAPK9* и *IQGAP2* ассоциировались с потенциальным риском возникновения ингибитора. Многие из этих маркеров вовлечены в различные процессы, опосредованные В- и/или Т-клетками, другие гены кодируют молекулы, участвующие во внутриклеточных сигнальных путях. Наличие SNP с протективной функцией, снижающих степень выраженности иммунного ответа, может отчасти объяснять, почему у некоторых больных хирургические вмешательства и серьезные травмы стимулируют развитие ингибитора, а у других нет, вне зависимости от тяжести гемофилии. Для полиморфизмов в иммунорегуляторных генах (–1082A/G в *IL-10*, –308G/A в *TNF- α* и –318C/T в *CTLA4*), ранее ассоциировавшихся с риском возникновения ингибитора в независимых когортах, в данном исследовании подобный эффект выявлен не был. Это может быть связано с различиями в формировании исследуемых когорт, а также с низкой частотой встречаемости минорных аллелей, ассоциированных с риском развития ингибитора. Кроме того, влияние негенетических факторов в данном исследовании не принималось во внимание [2].

Недавно в Иране была выполнена еще одна работа, в которой проверяли взаимосвязь между риском развития ингибитора и полиморфизмами в 16 генах, связанных с иммунным ответом или провоспалительными функциями (*ALOX5AP*, *CSF1R*, *CD44*, *HSP90B1*, *F13A1*, *MAP2K4*, *PTPRN2*, *PDGFRB*, *CTLA4*, *TNF- α* , *PCGF2*, *IQGAP2*, *MAPK9*, *DOCK2*, *IL-10* и *IL-5*). Повышенный риск развития ингибитора выявили только при генотипе T/T гена *F13A1* (rs13206518), генотипах C/C и C/T гена *DOCK2* (rs1863993) и генотипе T/T гена *MAPK9* (rs4147385) [63].

С целью выявления новых генетических вариаций, обуславливающих риск развития ингибитора, в Италии было проведено полноэкзомное секвенирование для двух небольших групп больных гемофилией с ингибитором и без него ($n = 17$ и $n = 9$ соответственно) [64]. Эти группы различались по 28 полиморфизмам в 26 генах, относящихся к генам иммуноглобулинов и иммуноглобулиноподобным генам, локусам HLA, хемокиновым рецепторам и их лигандам, интерлейкинам и другим модуляторам иммунной системы, а также к генам, участвующим в механизмах репарации ДНК при V(D)J рекомбинации. Из них 17 полиморфизмов относились к группе риска (встретились только в группе больных с ингибитором), а 11, вероятно, обладали протективным действием (встретились только у больных без ингибитора). Однако в ходе дальнейшего исследования на расширенной выборке с использованием метода генотипирования TaqMan данные полноэкзомного

секвенирования не нашли убедительного подтверждения [64].

Взаимосвязь между описанными выше генетическими вариантами и возникновением ингибитора продолжает вызывать серьезные дискуссии из-за слабой воспроизводимости результатов, несопоставимого размера выборок, использования разных аналитических и методических подходов в отдельных исследованиях. В связи с этим на сегодняшний день только характер мутации в гене *F8* остается наиболее объективным генетическим фактором риска возникновения ингибитора, причем особый интерес представляют работы по изучению сочетания вызывающих синтез антител миссенс-мутаций в гене *F8* с аллелями *HLA II*. Следует, однако, отметить, что адекватная оценка накопленных данных невозможна без учета многочисленных негенетических факторов.

НЕГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА

Развитие ингибитора определяется не только генетическими факторами, так как известны случаи расхождения (10% случаев) по ингибиторному статусу у однойцевых близнецов, чей генотип идентичен [24]. Другие факторы можно разбить на пять групп: 1) осложнения во время беременности/родов и грудное вскармливание; 2) возраст начала терапии, причина первого введения фактора, профилактическая терапия или терапия по требованию; 3) вакцинации, инфекции, экстравазальное введение, сопутствующие иммунологические нарушения; 4) тяжелые кровотечения, интенсивность терапии, операционные вмешательства, внутривенное капельное или болюсное введение дефицитного фактора; 5) тип препарата фактора [65]. Влияние всех этих факторов неоднократно исследовалось и обсуждалось, однако данные, полученные для большинства из них, весьма противоречивы [1]. Основная проблема с подобными исследованиями заключается в том, что они преимущественно являются ретроспективными, когорты анализируемых больных отличаются значительной гетерогенностью, и поэтому о достоверности их результатов судить сложно [4, 65].

Наиболее значимым негенетическим фактором риска развития ингибитора является тип препарата фактора FVIII (плазматический или рекомбинантный). Результаты SIPPET, первого рандомизированного клинического испытания по сравнению различных классов препаратов FVIII, и последнего исследования Французской национальной когорты свидетельствовали о повышенной иммуногенности рекомбинантных препаратов фактора FVIII для ранее нелеченных больных, причем в наибольшей степени это относилось к пациентам с мутациями в гене *F8*, ассоциированными с низким риском развития ингибитора [1, 66].

Один из экзогенных факторов, с объективностью которого согласны многие исследователи, — это интенсивность терапии, подразумевающая дозу препарата и частоту его введения. С увеличением дозы препарата и сокращением временных промежутков между введениями возрастает риск появления ингибитора [1, 4, 61, 67, 68].

Следует также отметить, что иммунная реакция при гемофилии может активироваться сигналами опасности от подвергшихся стрессу, поврежденных или умирающих клеток [69]. В связи с этим хирургические операции и тяжелые кровотечения могут инициировать сигнальную систему у больных гемофилией, приводя к иммунной реакции на введение FVIII [4, 65, 67].

СТРАТИФИКАЦИОННЫЕ АНАЛИЗЫ

Предпринимались попытки провести дискриминантный анализ с целью разработать методы классификации больных по группам риска развития ингибитора. С помощью регрессионного анализа было показано, что решающими являются три фактора: наличие семейной истории развития ингибитора, тип мутации в гене *F8* и интенсивность терапии в течение первых пяти дней после ее начала. К сожалению, в анализ не вошел ряд факторов, вариабельность которых в исследуемой когорте была недостаточно выражена [70, 71].

Недавно была выполнена еще одна подобная работа с использованием более сложного алгоритма Generalized Partially Linear Tree-based Regression (GPLTR) с линейной регрессией для факторов, которые не взаимодействуют друг с другом, и с древовидной структурой для факторов, вероятность взаимодействия которых достаточно высока [62]. Ранее было показано, что использование таких моделей больше подходит для исследований по гемофилии, чем регрессионный анализ [71]. Как и в предыдущих исследованиях, тип мутации в гене *F8* и наличие семейной истории развития ингибитора в значительной мере влияли на риск развития ингибитора. Результаты по влиянию типа препарата были сходны с результатами исследования SIPPET. Также было показано, что варианты HLA-DRB1*15, CD86 (rs2681401, генотип *G/G*) и IL-10 (1082A>G, генотип *G/G*) ассоциированы с высоким риском образования антител. Эти три белка, вероятно, являются частями одного и того же иммунного каскада, причем CD86 участвует в активации АПК, HLA — в презентировании антигена Т-клеткам, а IL-10 — в регуляции иммунного ответа. Дополнительную информацию о риске развития ингибитора может предоставлять также HLA-DQB1*02. Ассоциации между риском развития ингибитора и SNP в генах *TNF-α*, *CTLA4* и *HMOX1* выявлено не было, но это может быть связано с малым размером выборки. По результатам гибридной модели наибольший риск развития

ингибитора был у группы больных с HLA-DRB1*15 и генотипами *G/A* и *A/A IL-10*. Наименьшая иммуногенность наблюдалась в группе больных, негативных по HLA-DRB1*15/HLA-DQB1*02 и с генотипами *T/T* или *G/T* CD86. Остальные группы занимали промежуточное положение [62]. Также была отмечена тенденция к меньшей иммуногенности у больных с группой крови 0, однако статистически это не было подтверждено, хотя ранее такая взаимосвязь уже отмечалась [72]. Кроме того, есть данные о потенциальной роли VWF в распознавании FVIII иммунной системой и в развитии ингибитора, а также о том, что уровень VWF различается у людей с разной группой крови [19]. В связи с этим вопрос об ассоциации между риском развития ингибитора и группой крови требует дальнейшего исследования [62].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие ингибитора у больных гемофилией остается серьезной проблемой, осложняющей терапию этого варианта заболевания. Известно, что это комплексная проблема, обусловленная сложным взаимодействием генетических факторов (наличия семейной истории возникновения ингибитора, типа мутации в гене *F8*, полиморфизмов в ряде генов, продукты которых участвуют в формировании иммунного ответа) и факторов другой природы (интенсивность лечения, тип препаратов FVIII и др.). Исследования роли генетических факторов в развитии ингибитора показали, что отсутствие циркулирующего FVIII из-за генетических нарушений в гене *F8* является фактором высокого риска. Также было показано, что вариации в генах белков-регуляторов иммунной системы определяют различия индивидуального ответа на первое введение фактора FVIII. Благодаря новым технологиям высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS), таким как полноэкзомное и таргетное секвенирование, эти гены были исследованы на новом уровне. Однако из-за редкости заболевания ограниченные размеры выборки не позволяют сделать однозначных выводов. Из негенетических факторов развитие ингибитора явно находится под сильным влиянием типа препарата FVIII, а также интенсивности терапии в течение первых нескольких дней введения фактора. Для оценки совместного или индивидуального влияния других потенциальных триггеров на развитие ингибитора, а также для оценки взаимодействия генетических и других факторов риска и его влияния на предрасположенность больного к развитию ингибитора необходимы дальнейшие исследования. Применение интеграционного анализа позволит создать предсказательные алгоритмы для определения риска развития ингибитора, что сделает возможным повышение качества обследо-

вания и ведения больных и позволит в дальнейшем перейти на индивидуализированное лечение.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Garagiola I., Palla R., Peyvandi F.* Risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A // *Thromb. Res.* 2018. V. 168. P. 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.05.027>
2. *Astermark J., Donfield S.M., Gomperts E.D. et al.* The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: Results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) combined cohort // *Blood.* 2013. V. 121. № 8. P. 1446–1454. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-434803>
3. *Goodeve A.C., Williams I., Bray G.L., Peake I.R.* Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate™) // *Thromb. Haemost.* 2000. V. 83. № 6. P. 844–848. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1613931>
4. *Peyvandi F., Garagiola I.* Product type and other environmental risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A // *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2018. V. 2. № 2. P. 220–227. <https://doi.org/10.1002/rth2.12094>
5. *Whelan S.F.J., Hofbauer C.J., Horling F.M. et al.* Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients // *Blood.* 2013. V. 121. № 6. P. 1039–1048. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-444877>
6. *Kahle J., Orłowski A., Stichel D. et al.* Epitope mapping via selection of anti-FVIII antibody-specific phage-presented peptide ligands that mimic the antibody binding sites // *Thromb. Haemost.* 2015. V. 113. № 2. P. 396–405. <https://doi.org/10.1160/TH14-01-0101>
7. *Hofbauer C.J., Whelan S.F.J., Hirschler M. et al.* Affinity of FVIII-specific antibodies reveals major differences between neutralizing and nonneutralizing antibodies in humans // *Blood.* 2015. V. 125. № 7. P. 1180–1188. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-598268>
8. *Hofbauer C.J., Kepa S., Schemper M. et al.* FVIII-binding IgG modulates FVIII half-life in patients with severe and moderate hemophilia A without inhibitors // *Blood.* 2016. V. 128. № 2. P. 293–296. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-675512>
9. *Lewis K.B., Hughes R.J., Epstein M.S. et al.* Phenotypes of allo- and autoimmune antibody responses to FVIII characterized by surface plasmon resonance // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. P. e61120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061120>

10. *Astermark J.* Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia // *Haemophilia*. 2006. V. 12. S3. P. 52–60.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01261.x>
11. *White G.C., Kempton C.L., Grimsley A. et al.* Cellular immune responses in hemophilia: Why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? // *J. Thromb. Haemost.* 2005. V. 3. № 8. P. 1676–1681.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01375.x>
12. *Astermark J.* FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance // *Blood*. 2015. V. 125. № 13. P. 2045–2051.
<https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-535328>
13. *Judge T.A., Tang A., Turka L.A.* Immunosuppression through blockade of CD28:B7-mediated costimulatory signals // *Immunol. Res.* 1996. V. 15. P. 38–49.
<https://doi.org/10.1007/BF02918283>
14. *Qian J., Collins M., Sharpe A.H., Hoyer L.W.* Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A // *Blood*. 2000. V. 95. № 4. P. 1324–1329.
https://doi.org/10.1182/blood.v95.4.1324.004k25_1324_1329
15. *Hausl C., Ahmad R.U., Schwarz H.P. et al.* Preventing restimulation of memory B cells in hemophilia A: A potential new strategy for the treatment of antibody-dependent immune disorders // *Blood*. 2004. V. 104. № 1. P. 115–122.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2456>
16. *Lövgren K.M., Søndergaard H., Skov S., Wiinberg B.* Non-genetic risk factors in haemophilia A inhibitor management – the danger theory and the use of animal models // *Haemophilia*. 2016. V. 22. № 5. P. 657–666.
<https://doi.org/10.1111/hae.13075>
17. *Pradeu T., Cooper E.L.* The danger theory: 20 years later // *Front. Immunol.* 2012. V. 3. P. 287.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00287>
18. *Dasgupta S., Navarrete A.M., Bayry J. et al.* A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes // *PNAS*. 2007. V. 104. № 21. P. 8965–8970.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0702120104>
19. *Dasgupta S., Repessé Y., Bayry J. et al.* VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors // *Blood*. 2007. V. 109. № 2. P. 610–612.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-022756>
20. *Herczenik E., Van Haren S.D., Wroblewska A. et al.* Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012. V. 129. № 2. P. 501–509.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.08.029>
21. *Delignat S., Repessé Y., Navarrete A.M. et al.* Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A // *Haemophilia*. 2012. V. 18. № 2. P. 248–254.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2011.02679.x>
22. *Lacroix-Desmazes S., Bayry J., Misra N. et al.* The prevalence of proteolytic antibodies against factor VIII in hemophilia A // *N. Engl. J. Med.* 2002. V. 346. № 9. P. 662–667.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa011979>
23. *Tabriznia-Tabrizi S., Gholampour M., Mansouritorgh-abehe H.* A close insight to factor VIII inhibitor in the congenital hemophilia A // *Expert Rev. Hematol.* 2016. V. 9. № 9. P. 903–913.
<https://doi.org/10.1080/17474086.2016.1208554>
24. *Astermark J., Berntorp E., White G.C. et al.* The Malmö International Brother Study (MIBS): Further support for genetic predisposition to inhibitor development // *Haemophilia*. 2001. V. 7. P. 267–272.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2001.00510.x>
25. *Santagostino E., Mancuso M.E., Rocino A. et al.* Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study // *Br. J. Haematol.* 2005. V. 130. № 3. P. 422–427.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05605.x>
26. *Goudemand J., Rothschild C., Laurian Y., Calvez T.* Influence of the type of factor VIII concentrates on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A // *Blood*. 2006. V. 107. № 9. P. 46–51.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1371>
27. *Ragni M.V., Ojeifo O., Feng J. et al.* Risk factors for inhibitor formation in hemophilia: a prevalent case-control study // *Haemophilia*. 2009. V. 15. № 5. P. 1074–1082.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2009.02058.x>
28. *Viel K.R., Ameri A., Abshire T.C. et al.* Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 360. № 16. P. 1618–1627.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa075760>
29. *Carpenter S.L., Michael Soucie J., Sterner S., Presley R.* Increased prevalence of inhibitors in Hispanic patients with severe haemophilia A enrolled in the Universal Data Collection database // *Haemophilia*. 2012. V. 18. № 3. P. 260–265.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2011.02739.x>
30. *Gunasekera D., Ettinger R.A., Fletcher S.N. et al.* Factor VIII gene variants and inhibitor risk in African American hemophilia A patients // *Blood*. 2015. V. 126. № 7. P. 895–904.
<https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-599365>
31. *Bardi E., Astermark J.* Genetic risk factors for inhibitors in haemophilia A // *Eur. J. Haematol.* 2015. V. 94. S77. P. 7–10.
<https://doi.org/10.1111/ejh.12495>
32. *Lakich D., Kazazian H.H., Antonarakis S.E., Gitschier J.* Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A // *Nat. Genet.* 1993. V. 5. № 3. P. 236–241.
<https://doi.org/10.1038/ng1193-236>
33. *Bagnall R.D., Waseem N., Green P.M., Giannelli F.* Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A // *Blood*. 2002. V. 99. № 1. P. 168–174.
<https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.168>
34. *Oldenburg J., Pavlova A.* Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX // *Haemophilia*. 2006. V. 12. S6. P. 15–22.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01361.x>
35. *Eckhardt C.L., Van Velzen A.S., Peters M. et al.* Factor VIII gene (*F8*) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A // *Blood*. 2013. V. 122.

- № 11. P. 1954–1962.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-483263>
36. *Schwaab R., Pavlova A., Albert T. et al.* Significance of *F8* missense mutations with respect to inhibitor formation // *Thromb. Haemost.* 2013. V. 109. № 3. P. 464–470.
<https://doi.org/10.1160/TH12-07-0521>
37. *Schwaab R., Brackmann H.H., Meyer C. et al.* Haemophilia A: Mutation type determines risk of inhibitor formation // *Thromb. Haemost.* 1995. V. 74. № 6. P. 1402–1406.
<https://doi.org/10.1055/s-0038-1649954>
38. *Oldenburg J., El-Maarri O., Schwaab R.* Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes // *Haemophilia*. 2002. V. 8. S2. P. 23–29.
<https://doi.org/10.1046/j.1351-8216.2001.00134.x>
39. *Gouw S.C., Van Den Berg H.M., Oldenburg J. et al.* *F8* gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis // *Blood*. 2012. V. 119. № 12. P. 2922–2934.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379453>
40. *Sauna Z.E., Lozier J.N., Kasper C.K. et al.* The intron-22-inverted *F8* locus permits factor VIII synthesis: explanation for low inhibitor risk and a role for pharmacogenomics // *Blood*. 2015. V. 125. № 2. P. 223–228.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-530113>
41. *Spena S., Garagiola I., Cannavò A. et al.* Prediction of factor VIII inhibitor development in the SIPPET cohort by mutational analysis and factor VIII antigen measurement // *J. Thromb. Haemost.* 2018. V. 16. № 4. P. 778–790.
<https://doi.org/10.1111/jth.13961>
42. *Astermark J., Oldenburg J., Pavlova A. et al.* Polymorphisms in the *IL10* but not in the *IL1beta* and *IL4* genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A // *Blood*. 2006. V. 107. № 8. P. 3167–3173.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3918>
43. *Astermark J., Oldenburg J., Carlson J. et al.* Polymorphisms in the *TNFA* gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A // *Blood*. 2006. V. 108. № 12. P. 3739–3746.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024711>
44. *Astermark J., Wang X., Oldenburg J. et al.* Polymorphisms in the *CTLA-4* gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A // *J. Thromb. Haemost.* 2007. V. 5. P. 263–265.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02290.x>
45. *Lozier J., Rosenberg P.S., Goedert J.J., Menashe I.* A case-control study reveals immunoregulatory gene haplotypes that influence inhibitor risk in severe hemophilia A // *Haemophilia*. 2011. V. 17. № 4. P. 641–649.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2010.02473.x>
46. *Pavlova A., Delev D., Lacroix-Desmazes S. et al.* Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor- α and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A // *J. Thromb. Haemost.* 2009. V. 7. № 12. P. 2006–2015.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03636.x>
47. *Goodeve A.C., Pavlova A., Oldenburg J.* Genomics of bleeding disorders // *Haemophilia*. 2014. V. 20. S4. P. 50–53.
<https://doi.org/10.1111/hae.12424>
48. *Pergantou H., Varela I., Moraloglou O. et al.* Impact of HLA alleles and cytokine polymorphisms on inhibitors development in children with severe haemophilia A // *Haemophilia*. 2013. V. 19. № 5. P. 706–710.
<https://doi.org/10.1111/hae.12168>
49. *Kim H.Y., Cho J.H., Kim H.J. et al.* Ethnicity-specific impact of HLA I/II genotypes on the risk of inhibitor development: data from Korean patients with severe hemophilia A // *Ann. Hematol.* 2018. V. 97. № 9. P. 1695–1700.
<https://doi.org/10.1007/s00277-018-3358-x>
50. *De Barros M.F., Herrero J.C.M., Sell A.M. et al.* Influence of class I and II HLA alleles on inhibitor development in severe haemophilia A patients from the South of Brazil // *Haemophilia*. 2012. V. 18. № 3. P. 236–240.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2011.02604.x>
51. *David S., Nair S.C., Singh G.S. et al.* Prevalence of FVIII inhibitors in severe haemophilia A patients: Effect of treatment and genetic factors in an Indian population // *Haemophilia*. 2019. V. 25. № 1. P. 67–74.
<https://doi.org/10.1111/hae.13633>
52. *Pandey G.S., Yanover C., Howard T.E., Sauna Z.E.* Polymorphisms in the *F8* gene and MHC-II variants as risk factors for the development of inhibitory anti-factor VIII antibodies during the treatment of hemophilia A: a computational assessment // *PLoS Comput. Biol.* 2013. V. 9. № 5. P. e1003066.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003066>
53. *Pashov A.D., Calvez T., Gilardin L. et al.* *In silico* calculated affinity of FVIII-derived peptides for HLA class II alleles predicts inhibitor development in haemophilia A patients with missense mutations in the *F8* gene // *Haemophilia*. 2014. V. 20. № 2. P. 176–184.
<https://doi.org/10.1111/hae.12276>
54. *Shepherd A.J., Skelton S., Sansom C.E. et al.* A large-scale computational study of inhibitor risk in non-severe haemophilia A // *Br. J. Haematol.* 2015. V. 168. № 3. P. 413–420.
<https://doi.org/10.1111/bjh.13131>
55. *Kempton C.L., Payne A.B.* HLA-DRB1-factor VIII binding is a risk factor for inhibitor development in nonsevere hemophilia: a case-control study // *Blood Adv.* 2018. V. 2. № 14. P. 1750–1755.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018019323>
56. *Zheng C., Huang D., Liu L. et al.* Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in multiple myeloma // *Int. J. Cancer*. 2001. V. 95. P. 184–188.
[https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20010520\)95:3<184::aid-ijc1031>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20010520)95:3<184::aid-ijc1031>3.0.co;2-v)
57. *Huang D., Zhou Y., Xia S. et al.* Markers in the promoter region of interleukin-10 (*IL-10*) gene in myasthenia gravis: implications of diverse effects of *IL-10* in the pathogenesis of the disease // *J. Neuroimmunol.* 1999. V. 94. P. 82–87.
[https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00228-8](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00228-8)
58. *Pinto P., Ghosh K., Shetty S.* Immune regulatory gene polymorphisms as predisposing risk factors for the development of factor VIII inhibitors in Indian severe haemophilia A patients // *Haemophilia*. 2012. V. 18.

- № 5. P. 794–797.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02845.x>
59. Ulrich-Merzenich G., Hausen A., Zeitler H. et al. The role of variant alleles of the mannose-binding lectin in the inhibitor development in severe hemophilia A // *Thromb. Res.* 2019. V. 179. P. 140–146.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.05.005>
 60. Repessé Y., Peyron I., Dimitrov J.D. et al. Development of inhibitory antibodies to therapeutic factor VIII in severe hemophilia A is associated with microsatellite polymorphisms in the *HMOX1* promoter // *Haematologica.* 2013. V. 98. № 10. P. 1650–1655.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2013.084665>
 61. Eckhardt C.L., Astermark J., Nagelkerke S.Q. et al. The Fc gamma receptor IIa R131H polymorphism is associated with inhibitor development in severe hemophilia A // *J. Thromb. Haemost.* 2014. V. 12. № 8. P. 1294–1301.
<https://doi.org/10.1111/jth.12631>
 62. Bachelet D., Albert T., Mbogning C. et al. Risk stratification integrating genetic data for factor VIII inhibitor development in patients with severe hemophilia A // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 6. P. e0218258.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218258>
 63. Naderi N., Yousefi H., Mollazadeh S. et al. Inflammatory and immune response genes: A genetic analysis of inhibitor development in Iranian hemophilia A patients // *Pediatr. Hematol. Oncol.* 2019. V. 36. № 1. P. 28–39.
<https://doi.org/10.1080/08880018.2019.1585503>
 64. Gorski M.M., Blighe K., Lotta L.A. et al. Whole-exome sequencing to identify genetic risk variants underlying inhibitor development in severe hemophilia A patients // *Blood.* 2016. V. 127. № 23. P. 2924–2933.
<https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-685735>
 65. Astermark J., Altisent C., Batorova A. et al. Non-genetic risk factors and the development of inhibitors in haemophilia: a comprehensive review and consensus report // *Haemophilia.* 2010. V. 16. № 5. P. 747–766.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2010.02231.x>
 66. ter Avest P.C., Fischer K., Mancuso M.E. et al. Risk stratification for inhibitor development at first treatment for severe hemophilia A: a tool for clinical practice // *J. Thromb. Haemost.* 2008. V. 6. P. 2048–2054.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03187.x>
 67. Gouw S.C., van der Bom J.G., van den Berg H.M. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study // *Blood.* 2007. V. 109. № 11. P. 4648–4654.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-056291>
 68. Chalmers E.A., Brown S.A., Keeling D. et al. Early factor VIII exposure and subsequent inhibitor development in children with severe haemophilia A // *Haemophilia.* 2007. V. 13. № 2. P. 149–155.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01418.x>
 69. Ragni M.V. FVIII, CD4, and liaisons dangereuses // *Blood.* 2011. V. 117. № 23. P. 6060–6061.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348458>
 70. Hashemi S.M., Fischer K., Moons K.G.M., van den Berg H.M. Improved prediction of inhibitor development in previously untreated patients with severe haemophilia A // *Haemophilia.* 2015. V. 21. № 2. P. 227–233.
<https://doi.org/10.1111/hae.12566>
 71. Henrard S., Speybroeck N., Hermans C. Classification and regression tree analysis vs. multivariable linear and logistic regression methods as statistical tools for studying haemophilia // *Haemophilia.* 2015. V. 21. № 6. P. 715–722.
<https://doi.org/10.1111/hae.12778>
 72. Franchini M., Coppola A., Mengoli C. et al. Blood group O protects against inhibitor development in severe hemophilia A patients // *Semin. Thromb. Hemost.* 2017. V. 43. № 1. P. 69–74.
<https://doi.org/10.1055/s-0036-1592166>

Genetic Risk Factors for Inhibitor Development in Hemophilia A

O. S. Pshenichnikova^a and V. L. Surin^{a,*}

^aNational Research Center for Hematology, Moscow, 125167 Russia

*e-mail: vadsurin@mail.ru

The review is devoted to the description of different possible mechanisms of inhibitor development in hemophilia A. We mainly describe genetic factors, and also nongenetic ones, which could provoke inhibitor antibodies synthesis, as well as their combinations. Among genetic determinants different research groups focused on a type of *F8* gene mutation and functional polymorphisms in immune regulator genes, which were studied using classical and modern molecular genetic methods. Type of *F8* gene mutation is one of the most objective genetic risk factor, and studies on combinations of missense mutations in *F8* gene provoking antibodies synthesis and HLA II alleles are quite interesting ones. Other genetic markers need to be verified as potential participants in inhibitor development in future studies. Among nongenetic factors inhibitor development is influenced by FVIII product type, as well as treatment intensity. However despite multiple studies, inhibitor form of hemophilia remains the most difficult variant of the disease for the treatment. Construction of predictive algorithms for identification of inhibitor development risk using integration analysis, taking into account multiple genetic, nongenetic factors and their interaction, could help to solve this problem.

Keywords: hemophilia A, inhibitory form, genetic risk factors, gene *F8*, immune regulator genes.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 578.834.1:578.7:578.52

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ
КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19

© 2021 г. О. С. Глотов^{1,2,*}, А. Н. Чернов¹, С. Г. Щербак^{1,3}, В. С. Баранов²

¹Городская больница № 40 Курортного административного р-на Сестрорецк, Санкт-Петербург, 197706 Россия

²Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, 199034 Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: olglotov@mail.ru

Поступила в редакцию 14.09.2020 г.

После доработки 28.12.2020 г.

Принята к публикации 18.01.2021 г.

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 распространилась на 215 стран мира и вызвала десятки миллионов случаев инфицирования и более миллиона летальных исходов во всем мире. В разгар COVID-19-инфекции крайне актуально для борьбы с данной пандемией выявление новых белковых и генных мишеней, которые могут оказаться высокочувствительными диагностическими и прогностическими маркерами тяжести и исхода заболевания. Выявление индивидуальной генетической предрасположенности позволяет персонализировать программы медицинской реабилитации и терапии. Сейчас уже показано, что на трансмиссивность и тяжесть COVID-19-инфекции могут влиять варианты как в генах организма человека *ACE2*, *HLA-B*4601*, *FcγRIIA*, *MBL*, *TMPRSS2*, *TNF-α*, *IL6*, антигена А группы крови и др., так и самого вируса (в РНК-полимеразе – *ORF8*, РНК-праймазе – *ORF6*, S-, N-, E-белках). Наличие мутаций в белках вируса может изменять аффинность и специфичность связывания с ними таргентных препаратов, являясь молекулярной основой индивидуальных различий в реакции организма человека на противовирусные препараты и/или вакцины. В обзоре обобщены данные о вариантах геномов коронавируса и человека, ассоциированных с индивидуальной предрасположенностью к повышенному или пониженному риску передачи, тяжести и исхода COVID-19-инфекции. Кратко рассматриваются таргетные лекарственные препараты и вакцины, создаваемые для терапии инфекции COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, коронавирусная инфекция, гены, полиморфизмы, предрасположенность к коронавирусной инфекции, лекарственные препараты, вакцины против COVID-19.

DOI: 10.31857/S0016675821080051

Коронавирусы (CoV) являются возбудителями острого тяжелого респираторного синдрома (SARS-CoV), впервые вызвавшего вспышку глобальной эпидемии в 2002 г., когда было инфицировано 8000 человек, 10% из которых завершились летальным исходом [1]. Позднее, в 2012 г. произошла вспышка ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), когда эпидемия охватила 26 стран [2]. В декабре 2019 г. в Китае была зафиксирована новая форма коронавируса (SARS-CoV-2), которая стала причиной глобальной пандемии коронавирусной болезни (COVID-19) в 2020 г. [3]. За короткое время COVID-19-инфекция распространилась на 215 стран мира, в том числе и на Россию. В мире и в России количество новых случаев инфицирования и летальности от коронавируса с каждым днем продолжает увеличиваться и на сегодняшний день достигло более 45 миллионов [4].

При инфицировании SARS-CoV-2 у пациента по истечению 2–14 суток инкубационного периода характерно проявление симптомов острого респираторного вирусного заболевания: повышенной температуры тела (90%); кашля (в 80% случаев), одышки (в 30% случаев), утомляемости (в 40% случаев), заложенности в грудной клетке (в 20%), боли в горле, насморка, снижения обоняния и вкуса, конъюнктивита. Данные симптомы могут свидетельствовать о развитии пневмонии без дыхательной недостаточности, острого респираторного дистресс-синдрома – ОРДС (пневмония с острой дыхательной недостаточностью), сепсиса, септического шока или полиорганной недостаточности [5]. Эти патологические состояния наиболее часто приводят к летальности пациентов трудоспособного возраста (59.7 ± 13.3 года) с хроническими заболеваниями: артериальной гипертензией (23.7–30%), сахарным диабетом

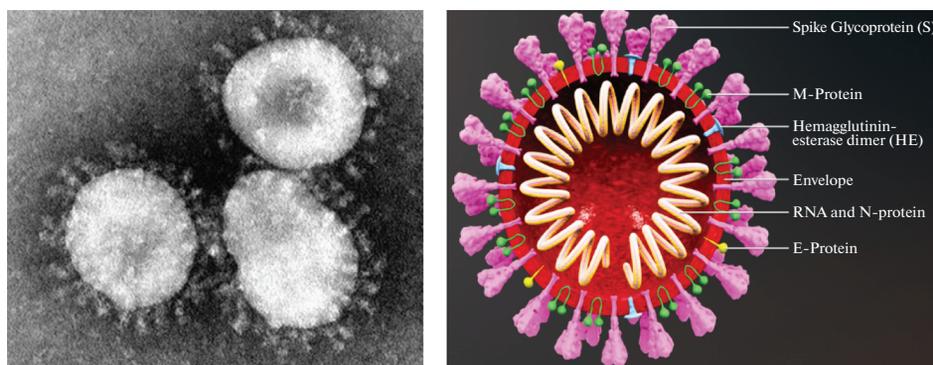


Рис. 1. Микрофотография (а) и схематическая структура коронавируса SARS-CoV-2 (б). Spike Glycoprotein (S) – S-белок (шиповый белок); M-Protein – мембранный М-белок; Hemagglutinin-esterase dimer (HE) – димер гемагглютинаина и эстеразы; Envelope – оболочка; RNA and N-protein – РНК и N-белок нуклеокапсида, E-Protein – E-белок оболочки.

(16.2%), метаболическим синдромом, ишемической болезнью сердца (5.8%), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), никотиновой зависимостью, воспалительными заболеваниями кишечника и онкологической патологией [6–8]. Кроме того, группы риска инфицирования COVID-19 могут составлять пациенты с генетическими заболеваниями. Например, в исследовании, проведенном учеными из университетского медицинского центра Утрехта (Нидерланды), 180 (45.6%) из 395 пациентов с синдромом Дауна заболели тяжелой респираторно-синцитиальной вирусной инфекцией [9]. Клиническая картина у пациентов, входящих в группы риска, характеризуется развитием “синдрома взаимного отягощения”, сопровождающегося прогрессирующей дыхательной и сердечной недостаточностью, что в конечном итоге утяжеляет их состояние и приводит к трудовым потерям, ранней инвалидности и высокой летальности. В связи с этим инфицированные COVID-19 пациенты с хроническими и генетическими заболеваниями особенно остро нуждаются в немедленной диагностике и реабилитации.

В разгар инфекции COVID-19 крайне актуальным для борьбы с данной пандемией является изучение патогенеза данного заболевания, выявление новых белковых и генных мишеней, которые могут оказаться высокочувствительными и специфическими диагностическими и прогностическими маркерами тяжести и исхода заболевания. Единственным точным методом, который позволяет четко верифицировать COVID-19-инфекцию, диагностировать генетические заболевания, сформировать новые группы риска на основе генетической предрасположенности среди пациентов с хроническими заболеваниями или по восприимчивости к инфицированию COVID-19, а также персонифицировать программы медицинской реабилитации, является генетический анализ.

В силу того, что патогенетические механизмы инфекции COVID-19 носят множественный ха-

актер, в обзоре рассматриваются генетические аспекты этого процесса на уровне геномов вируса и человека с акцентом на выявление ассоциаций потенциальных прогностических генетических маркеров с тяжестью и исходом заболевания и генетических мишеней для воздействия таргетных фармпрепаратов.

КОРОНАВИРУС SARS-CoV-2: СТРУКТУРА, ГЕНОМ, МУТАЦИИ И ВАРИАНТЫ, АССОЦИИРУЕМЫЕ С РАЗВИТИЕМ ИНФЕКЦИИ

Коронавирусы представляют собой крупные сферические частицы (диаметр 120 нм), состоящие из двухслойной липидной оболочки, включающей четыре белка: мембранный (М, Е), шиповый (S) и гемагглютининовую эстеразу (HE) вокруг нуклеокапсида (N), образованного множеством копий этого белка, связанных с одноцепочечной РНК [10] (рис. 1).

S-белки образуют выросты на оболочке вируса, создавая вид “короны”, благодаря которой вирус и получил свое название [11]. С помощью этих шипов вирусы прикрепляются к белкам-рецепторам клеток хозяина, которые обеспечивают слияние вирусной и клеточной мембран и проникновение вирусной РНК в клетку. S-белки содержат рецептор-связывающий домен (RBD, аминокислоты N318-T509), обеспечивающий взаимодействие с рецептор-связывающим мотивом (RBM, аминокислоты S432-T486) ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2) – клеточным рецептором для SARS-CoV-2 [12, 13]. Кроме того, S-гликопротеин содержит фурин-подобный сайт рестрикции [14], который необходим для распознавания при пироллизе и, следовательно, способствует зоонозной инфекции вируса.

Геном SARS-CoV-2 представлен одноцепочечной РНК длиной около 30 тыс. пн, содержащей на 5'-конце сар-область и на 3'-конце poly-A-по-

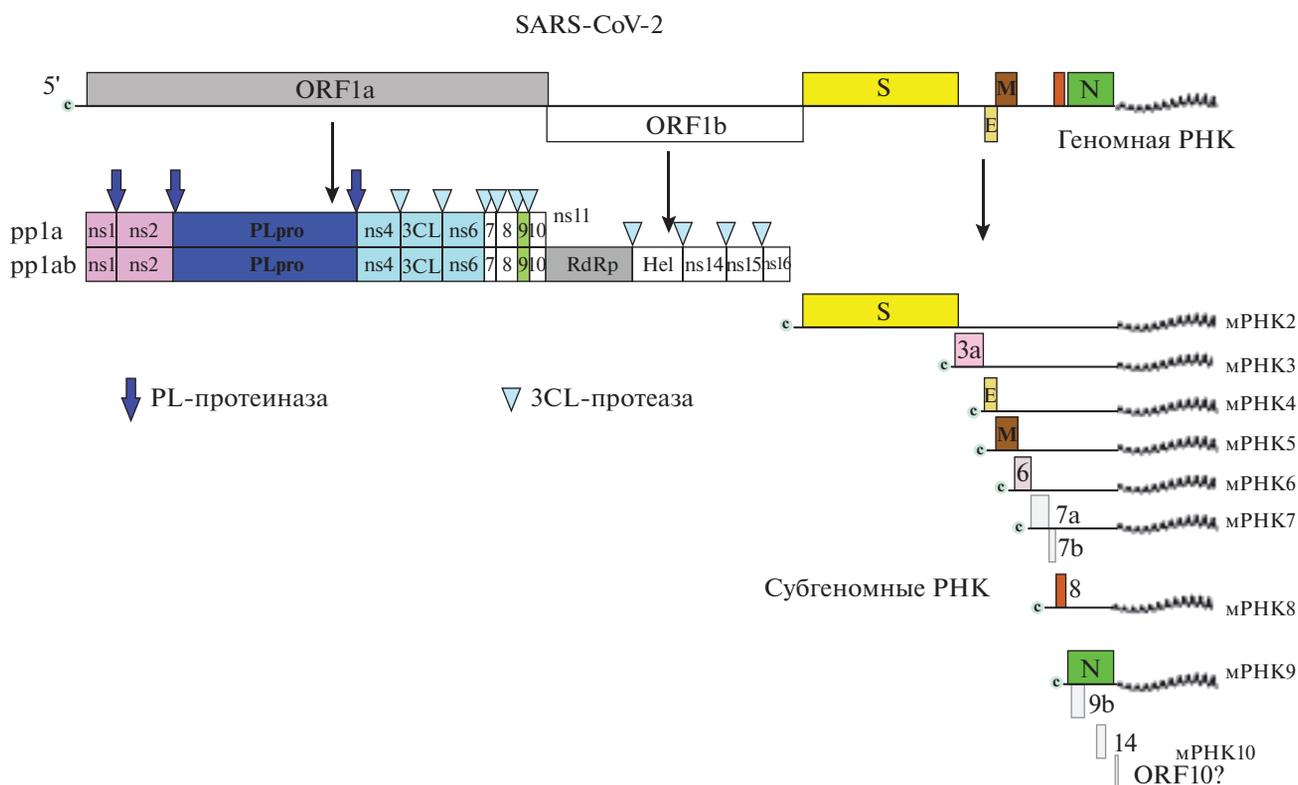


Рис. 2. Структура генов РНК коронавируса SARS-CoV-2 (по [15]).

следовательность, которые позволяют вирусной РНК транслироваться на рибосомах клеток хозяина. Вирусная РНК включает регуляторные последовательности, в которых происходит терминация транскрипции и 10 открытых рамок считывания (ORF), которые транскрибируются с образованием мРНК (рис. 2).

При трансляции вирусной РНК в клетке хозяина синтезируется полипротеин 1a/lab (pp1a/pp1ab). Гены *ORF1a* и *ORF1b* кодируют продукцию полипротеина репликазы/транскриптазы pp1a/pp1ab, который затем расщепляется вирусной химо- трипсиноподобной (3CLpro) основной (Mpro) или двумя папаиноподобными протеазами с образованием 16 неструктурных белков (Nsps). Другие *ORF* кодируют структурные протеины: S-белок, мембранный, белок оболочки и нуклеокапсида, а также вспомогательные белки, которые обладают более высокой иммуногенностью, чем неструктурные белки [10, 16]. Во время сборки вириона нуклеопротеин (*ORF9a*) упаковывает вирусную РНК в спиральный рибонуклеокапсид (РНП) посредством ее взаимодействия с вирусным геномом и мембранным белком М [17]. Нуклеопротеин участвует в повышении эффективности транскрипции субгеномной вирусной РНК и в репликации вируса. В образовании мультипротеинового репликационно-транскрипционного комплекса (RTC) также участвуют неструктурные белки. Основным бел-

ком этого комплекса является РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp), которая участвует в репликации и транскрипции вирусной РНК. Другие неструктурные белки комплекса выполняют вспомогательные функции при репликации и транскрипции. Например, белок экзорибонуклеаза, обладая корректирующей активностью, обеспечивает дополнительную точность репликации, отсутствующую у РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Мутации в генах коронавируса могут фенотипически проявляться в изменении аминокислот в кодируемых белках, а, следовательно, влиять на функции этих белков и процессы с их участием. X. Tang. с соавт. [18] провели популяционный анализ 103 геномов SARS-CoV-2 у больных из разных регионов мира. На основании различий штаммов ($r^2 = 0.954$) по двум SNP в точках 8782 (*ORFLab*, T8517C, синонимичная) и 28144 (*ORF8*, C251T, S84L) выделено два генетических типа вируса – L (частота 71%) и S (частота 29%). Вирусы L-типа, производные вирусов S-типа, более агрессивны и вирулентны вследствие более высоких скоростей передачи генетической информации и репликации [18]. В 103 секвенированных геномах SARS-CoV-2 идентифицированы мутации в 149 участках, причем родительские штаммы содержали 43 синонимичные, 83 несинонимичные и две стоп-мутации. Среди этих мутаций

Таблица 1. Мутации и функции белков SARS-CoV-2

Мутация, ген	Белок	Функция
241C>T, лидерная последовательность		Необходима для трансляции вирусной мРНК на рибосомах в клетках человека
A117T, I1607V, L3606F, I6075T, <i>ORFLab</i>	PL-протеиназа	Протеиназа PL в Nsp3 расщепляет Nsp3 1–3 и блокирует врожденный иммунный ответ хозяина, способствуя экспрессии цитокинов
H49Y, V367F, 23403A>G (D614G)	S-белок	Белок S представляет собой сильно гликозилированный белок, который образует шипы на поверхности вириона и обеспечивает проникновение вируса в клетки хозяина. Белок обладает высокой иммуногенностью по отношению к ответу Т-клеток
26144G>T (G251V), 3037C>T (F105F), <i>ORF3a</i>	Nsp3	Nsp3 – наиболее важный и самый крупный компонент комплекса репликации и транскрипции
8782C>T(S75S), <i>ORF4</i>	Nsp4	Белок Nsp4 кооперируется с Nsp3 и Nsp6 для индукции двух мембранных везикул (DMV) и мембранного комплекса, служащего платформой для репликации и сборки РНК
11083G>T (L37F), <i>ORF6</i>	Nsp6	
P34S, <i>ORF7a</i>	Nsp7	Nsp7 и Nsp8 необходимы для репликации и транскрипции SARS-CoV-2. Комплекс Nsp7 и Nsp8 представляет собой мультимерную РНК-полимеразу, участвующую в инициации <i>de novo</i> репликации и элонгации праймера
V62L, 28144T>C (S84L), <i>ORF8</i> , 28881G>A (R203K), 28882G>A (R202R), 28883G>C (G204R)	Nsp8, РНК-праймаза	РНК-зависимые РНК-полимеразы (RNAPol). В отличие от Nsp12, Nsp8 обладает способностью инициации репликации <i>de novo</i> без праймеров
14408C>T (P323L)	Nsp12, РНК-полимераза	РНК-зависимая РНК-полимераза
17747C>T (P504L), 17858A>G (Y541C)	Геликаза	Участвует в создании репликационного комплекса
S194L, S202N, P344S	N-белок	Нуклеопротеидный N-белок располагается в ядре и взаимодействует с вирусной РНК, образуя нуклеокапсид
27046C>T	M-белок (мембранный белок)	Входит в состав липидной мембраны вируса

наиболее частыми были синглтоны (65.1%, 28/43) синонимичных и 84.3% (70/83) несинонимичных мутаций, что указывает на их недавнее происхождение или рост числа случаев. Однако 16.3% (7 из 43) синонимичных мутаций и одна несинонимичная (*ORF8*, L84S, 28144) мутация имели частоту $\geq 70\%$ среди штаммов SARS-CoV-2. Другие несинонимичные мутации, имеющие аллели более чем в двух штаммах SARS-CoV-2, затрагивали шесть белков: Orf1ab (A117T, I1607V, L3606F, I6075T), S (H49Y, V367F), Orf3a (G251V), Orf4 (P34S), Orf8 (V62L, S84L) и N (S194L, S202N, P344S) [18] (табл. 1).

Другие авторы (О.А. MacLean et al. [19]) подвергли критике утверждение о том, что обнаружение большинства образцов с определенной му-

тацией не является доказательством более высокой скорости распространения вирусов с этой мутацией. Для такого утверждения необходимо сравнить результаты (числа инфицированных случаев) при нулевом распределении и равных скоростях передачи. Поскольку этого не было сделано, авторы считают, что нет достаточных доказательств о наличии разницы в скоростях передачи между разными генетическими типами SARS-CoV-2. Различия в наблюдаемом количестве образцов, содержащих и не содержащих эти мутации, скорее всего, могли быть результатом случайных эпидемиологических факторов [19].

В исследовании Уотсонского центра (Нью-Йорк, США) [20] просеквенировано 48 геномов SARS-CoV-2 и обнаружено 129 мутаций, в том

числе 80 уникальных, 43 миссенс, 21 синонимичная, три делеции, 11 некодирующих мутаций и две делеции в некодирующей ДНК. Наиболее распространенные варианты 8782C>T (*ORF1ab*) и 28144T>C (*ORF8*) были найдены в 13 образцах, а вариант 29095C>T (*N*) – в пяти образцах. Варианты 8782C>T и 29095C>T являются синонимичными, тогда как 28144T>C вызывает замену аминокислоты L84S в *Orf8*. 12 из 13 образцов с этими вариантами были выявлены за пределами Ухани. Из 43 миссенс-вариантов 30 обнаружены в локусе *ORF1ab*. Интересно, что число мутаций в *Nsp3*-домене больше, чем в других доменах. Все три обнаруженные делеции локализованы в домене *Nsp1* *ORF1ab*, а две делеции в некодирующей ДНК – в 3'-UTR и 5'-UTR областях, которые не влияют на функции белка [20].

Интерес вызывает исследование С. Yin (кафедра математики, статистики и информатики Иллинойского университета, Чикаго, США) [21]. При генотипировании 442 штаммов SARS-CoV-2 из мировой базы данных GISAID, в геномах SARS-CoV-2 обнаружено несколько частых мутаций (вариантов) и проведен сравнительный анализ их частот в образцах эпидемиологического региона. Эти SNP, по-видимому, могут влиять на трансмиссивность и патогенность SARS-CoV-2 (табл. 1).

Первая частая мутация (SNP, 241C>T) в геноме SARS-CoV-2 локализована в лидерной последовательности – важном сайте генома для прерывистой субгеномной репликации. Эта мутация ассоциирована с тремя мутациями: 3037C>T, 14408C>T и 23403A>G, вызывающими замены аминокислот в *Nsp3* (синонимичная мутация), РНК-полимеразе (P323L) и S-белке (D614G) соответственно. Поскольку эти три мутации (241C>T, 14408C>T и 23403A>G) находятся в белках, участвующих в репликации: в РНК (241C>T, 14408C>T) и в связывании с рецептором ACE2: в S-белке (23403A>G) и распространены в изолятах вируса из Европы, где наблюдалось большое число и более тяжелых случаев инфицирования COVID-19, чем в других географических регионах, то эти варианты могут способствовать повышенной трансмиссивности вируса [21]. Второй вариант (28144T>C) локализуется в белке *Nsp8*, вызывая замену аминокислоты лейцин (L) на серин (S). Белок *Nsp8* инициирует *de novo* репликацию РНК в отсутствие праймеров [22]. Этот результат согласуется с данными исследования, выполненного на 103 геномах SARS-CoV-2, в котором были выделены S- и L-типы вируса по двум ко-мутациям (8782C>T и 28144T>C) [18]. Интересно, что праймер-независимая РНК-полимераза (*Nsp8*) содержит больше мутаций, чем любые другие белки (28144T>C, 28881G>A, 28882G>A и 28883G>C), которые могут способствовать устойчивости к мутагенным воздействиям благодаря повышенной точности репликации.

Об этом свидетельствует исследование, в котором мутация в РНК-полимеразе повышала точность репликации в РНК-вирусе [23]. Третий SNP (26144G>T) присутствует в неструктурном белке 3 (*Nsp3*: G251V), который кооперируется с *Nsp4* и *Nsp6* для индукции двух мембранных везикул (DMV) и мембранного комплекса, служащего платформой для репликации и сборки РНК [24]. Мутация D614G локализована в области связывания S1–S2 вблизи фуринового сайта распознавания (R667), участвующего в расщеплении S-белка, которое необходимо для проникновения вириона в клетки и их персистенции в них [25]. Функциональное значение SNP (23403A>G), вызывающего аминокислотную замену в S-белке (D614G), неясно. Если мутация летальна или снижает способность вируса к распространению, то функциональное значение такой мутации не может быть установлено. Только мутации в S-белке, которые повышают аффинность к клеточным рецепторам ACE2 и снижают иммунный ответ, имеют шансы на существование. По всей вероятности, данные варианты являются результатом естественного отбора и эволюции вируса [21].

Анализ SNP в образцах из эндемического региона позволил выявить два SNP (8782C>T, 28144Tdel>C), распространенных в Китае, Европе и США. Позже один из этих штаммов мутировал (8782C>T, 28144T>C, 18060C>T), что привело к возникновению четырех генотипов SARS-CoV-2: генотип I (11083G>T), генотип II (26144G>T), генотип III (8782C>T, 28144T>C), генотип IV (241C>T, 3037C>T, 14408C>T, 23403A>G). Штаммы в пределах одного генотипа происходят от одного предка [21]. Предполагается существование восьми генетических штаммов SARS-CoV-2 [26].

Штаммы вируса с функционально значимыми SNP (241C>T, 3037C>T, 23403A>G) встречались преимущественно в изолятах SARS-CoV-2 из стран Европы. В этих штаммах выявлены дополнительные мутации в положениях (14408C>T, 23403A>G), которые затрагивали РНК-полимеразу (*Nsp8*), РНК-праймазу (*Nsp12*) и S-белок. Эти мутации, вероятно, могут быть ассоциированы с тяжестью инфекции COVID-19 в странах Европы. Анализируя профили SNP вирусов из изолятов мировой коллекции разных генераций вируса, установлено, что одна мутация может возникать в одном поколении [21].

Полногеномное секвенирование образцов мировой коллекции вируса SARS-CoV-2 (хранилище NCBI) позволило выявить 47 распространенных SNP, затрагивающих основные вирусные белки: S-белок, *Nsp1*, *RdRp* и *Orf8*. Белки сильно мутировали. Мутации возникали при распространении вируса от человека к человеку за последние 3 мес. (март–май) пандемии. Наличие этих мутаций в ключевых белках вируса может быть причиной

его различной вирулентности, особенностей реакции человека на противовирусные препараты и различной летальности от вирусной инфекции [27]. Китайскими учеными обнаружено 14 новых SNP (9 из 14 несинонимичных) в кодирующей области генома COVID-19 с частотами от 10 до 50%, которые объединены в четыре группы LG_1–LG_4 [28]. Показано, что при мутационном отборе штаммов из Европы возникли мутанты LG_1-группы, тогда как в результате отбора штаммов из Америки образовались мутанты LG_2 и LG_3 групп. Таким образом, увеличение числа новых аллелей COVID-19 обусловлено генетической дифференциацией штаммов Европы и Америки. Установлены положительная и отрицательная корреляции между инфицированностью пациентов группами мутантов LG_1 и LG_2 и LG_3 соответственно и показателем летальности от COVID-19. Эти наблюдения позволяют предположить, что по сравнению со штаммами LG_2 и LG_3 групп штаммы вируса LG_1 более вирулентны, что отчасти может объяснить более высокие показатели летальности от инфекции COVID-19 в странах Европы, чем в США [28].

Напротив, мутации в Orf1a/b могут ослаблять вирулентность коронавируса. Так, мутация Y6398H в белке Orf1a/b (p59/Nsp14/ExoN) ослабляет вирулентность мышинного коронавируса (MHV-A59), что было связано с уменьшением его репликации в течение пяти суток после заражения [29]. Мутация T8517C в Orf1ab SARS-CoV-2 не изменяет последовательности белка (замена кодона AGT (Ser) на AGC (Ser)), но, скорее всего, влияет на трансляцию белка Orf1ab [18].

ВАРИАНТЫ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ ИНФЕКЦИИ COVID-19

ACE2

Генетические факторы организма-хозяина могут способствовать развитию и определять тяжесть инфекции SARS-CoV-2. Установлено, что клеточным рецептором SARS-CoV-2 является ангиотензин-превращающий фермент-2 (ACE2) [30, 31]. В организме человека этот белок кодируется геном *ACE2*. Полиморфизмы *ACE2* могут влиять на аффинность и специфичность связывания S-белка с ACE2, а, следовательно, определять наследственную предрасположенность к риску инфицирования и летальности SARS-CoV-2, которые ассоциированы с развитием артериальной гипертензии, сахарного диабета, церебрального инсульта, составляющих группу высокого риска инфицирования и летальности инфекции COVID-19. Примечательно, что экспрессия *ACE2* существенно повышена у пациентов с диабетом 1-го и 2-го типов, при терапии которых используются инги-

биторы ACE2. В свою очередь лечение ингибиторами ACE повышает экспрессию ACE2. Следовательно, увеличенная экспрессия *ACE2* может способствовать повышению риска инфицирования и летальности от COVID-19. А восприимчивость человека к SARS-CoV-2 может быть результатом сочетанного влияния терапии и особенностей полиморфизма гена *ACE2* [32].

С другой стороны, популяционные частоты 15 SNP гена *ACE2* в различных регионах мира, согласно китайским исследованиям, показали, что наибольшей восприимчивостью к SARS-CoV-2 обладает население Китая, Юго-Восточной Азии и Северной Америки, тогда как европейцы имеют наименьшие частоты этих SNP. Например, rs4646127, локализованный в интроне *ACE2*, имеет самые высокие частоты (AF) в популяциях Китая (0.997), Юго-Восточной Азии (0.994) и низкие AF в популяциях Европы (0.651) и Америки (0.754). Причем 11 SNP (AF > 0.05) и один редкий вариант (rs143695310) были ассоциированы с высокой экспрессией ACE2 в тканях [33] (табл. 2).

Методом РНК-секвенирования установлено, что азиаты имеют более высокую экспрессию ACE2, чем европейцы и афроамериканцы [34]. Установлен высокий уровень экспрессии ACE2 в клетках легких, печени, почек, миокарда, тонкого кишечника и семенников – органах с наибольшим тропизмом к SARS-CoV-2 [10, 35, 36]. Еще в 2005 г. было показано, что в легких, где реплицируется SARS-CoV, ген *ACE2* имеет различные варианты сплайсинга [37]. Установлены корреляции между наиболее часто встречающимися (38) вариантами *ACE2* и уровнем экспрессии белка в различных тканях человека [38]. Показано, что возраст, пол, раса и курение достоверно ($P = 0.008$) влияют на экспрессию гена *ACE2* [38]. Проведенный нами анализ 2754 вариантов *ACE2* из базы данных геномов популяции Европы выявил более низкое соотношение миссенс-SNP в популяции Южной Европы по сравнению с другими регионами Европы, что может, отчасти, объяснить более высокий уровень смертности от COVID-19 в Испании и Италии. Сравнив частоты пяти вариантов (rs35803318, rs41303171, rs113691336, rs971249, rs2285666) *ACE2* в русской и европейской популяциях, мы обнаружили, что русские похожи на другие европейские популяции, что указывает на схожий уровень инфицирования и тяжести заболевания [39]. Эти исследования отчасти могут объяснять основные симптомы COVID-19-инфекции, ее ассоциацию с тяжестью хронических заболеваний перечисленных выше органов. Анализ экспрессии гена *ACE2* в 119 типах клеток, 13 тканях человека, а также спектр коэкспрессии ACE2 с 51 рецептором РНК-вируса и 400 мембранными белками жителей Китая, подтвердил экспрессию ACE2 в легких, холангиоцитах печени, клетках толстой кишки, пищевода, эпителио-

Таблица 2. Полиморфизм генов человека, ассоциированный с развитием острой респираторной коронавирусной инфекции

Генетические варианты, ассоциированные с повышенным риском инфекции	Генетические варианты, ассоциированные с пониженным риском инфекции
<i>ACE2</i> (rs200180615, C>T, c.2002G>A, c.1669G>A, p.Glu668Lys, p.Glu557Lys, T = 0.00053) 34;	<i>AHSG</i> (rs2248690, T>A, g.186612299T>A, AA, T = 0.239816) 62;
<i>ACE2</i> (rs140473595, C>T, c.1501G>A, p.Ala501Thr, T = 0.000265) 34;	<i>CD209</i> (rs4804803, A>G, c.-336A>G, G = 0.233427, AG/GG – лучший прогноз, устойчивость к инфекции) 62;
<i>ACE2</i> (rs2285666, C>T, g.8790G>A, T = 0.350199) 34;	<i>Mx1</i> (rs17000900, C>A, c.-123C>A, A=0.171925) 94;
<i>ACE2</i> (rs4646127, A>G, g.15597330A>G, A = 0.190728) 13;	<i>OAS1</i> (3'-нетранслируемая область, 3'-UTR, AG, GGvsAA – низкий риск) 95
<i>AHSG</i> (rs4917, T>C, c.743T>C, c.746T>C, c.740T>C, p.Met248Thr, p.Met247Thr, p.Met249Thr, T = 0.264577) 61;	
<i>ALOXE3</i> (rs147149459, G>A, c.1889C>T, c.2285C>T, c.1886C>T, p.Pro630Leu, p.Pro762Leu, p.Pro629Leu, A = 0.000399) 98;	
<i>ALOXE3</i> (rs151256885, C>G,T, g.8109899C>G, T = 0.020367) 98;	
<i>ANPEP</i> (rs141945020, G>A,C,T, c.389C>T, c.389C>G, c.389C>A, p.Thr130Ile, p.Thr130Ser, p.Thr130Asn, T = 0.00004 – рецептор коронавируса 229E) 96;	
<i>BRF2</i> (rs138763430, C>T, c.25G>A, p.Asp9Asn, T = 0.001597) 98;	
<i>CCL2</i> (rs1024611, A>G, g.34252769A>G, G-2518A, G = 0.363618, GG-генотип) 51;	
<i>CD14</i> (rs2569190, A>G, c-159CC, g.140633331A>G, A = 0.46885, CC-генотип) 59;	
<i>CYP4F3A</i> (rs3794987, A>G, g.15640081A>G, G = 0.360823) 61;	
<i>ERAP2</i> (rs150892504, C>G,T, c.2251C>G,T, c.2116C>G,T, c.2182C>G,T, p.Arg751Gly, p.Arg751Cys, p.Arg706Gly, p.Arg706Cys, p.Arg728Gly, p.Arg728Cys, T = 0.002596) 21;	
<i>Fcgamma R1IA</i> (RR131) 58;	
<i>FGL2</i> (rs2075761, C>A,T, c.158G>A, c.158G>T, p.Gly53Val, p.Gly53Glu, T = 0.151757) 50;	
<i>HLA-B*4601</i> (OR = 2.08, P = 0.04 – тяжесть заболевания) 57;	
<i>HLA-B*5401</i> (OR = 5.44, P = 0.02 – тяжесть заболевания) 57;	
<i>ICAM3</i> (rs2304237, T>C, c.428A>G, c.443T>C, C = 0.179513, TT, CT, CC) 62;	
<i>IL1A</i> (rs1800587, c.-889T, TC, OR = 10.2, P = 0.031 – повышенная вирусная нагрузка) 51;	
<i>IL4</i> (rs2070874, C>T, c.-33C>T, T = 0.401158) 43;	
<i>IL18</i> (rs1946518, T>G, c.-607, T = 0.407947, c.607T – повышенная вирусная нагрузка, TT, GT) 51;	
<i>MBL</i> (codon 54, A/B, B-аллель) 51,52,58;	
<i>Mx1</i> (rs2071430, G>T, c.-88G>T, T = 0.238219, GT vs GG – высокий риск) 95;	
<i>RANTES</i> (rs2107538, C>G, c.-28, T = 0.307708, G-аллель, GG-генотип) 53;	

Таблица 2. Окончание

Генетические варианты, ассоциированные с повышенным риском инфекции	Генетические варианты, ассоциированные с пониженным риском инфекции
<p><i>RelB</i> (rs2288918, +23962T, TT, OR = 7.2, $P = 0.034$) 52;</p> <p><i>TMEM181</i> (rs117665206, C>T, с.874C>T, с.874C>T, с.850C>T, с.1207C>T, с.919C>T, p.Arg292Cys, p.Arg411Cys, p.Arg284Cys, p.Arg307Cys, p.Arg411Cys, T = 0.004593) 98;</p> <p><i>TNFA</i> (с.–1031CT/CC, остеонекроз головки бедра при SARS-CoV-инфекции) 98;</p> <p><i>TNFA</i> (rs1800630, C>A, с.–863A>C, A=0.154153 – при SARS-CoV-инфекции) 97</p>	

Примечание. Таблица составлена на основании следующих источников литературы: [13, 33, 43, 50–53, 56, 58, 59, 61–63, 94–98].

цитах подвздошной, прямой кишки, желудка и проксимальных канальцах почек. Потенциальными корецепторами SARS-CoV-2 с наиболее сходными паттернами экспрессии с ACE2 в 13 тканях человека могут быть пептидазы ANPEP, DPP4 и ENPEP [40]. Интерес вызывает работа итальянских ученых, проводивших полноэкзомное (3984 пациента) и полногеномное (3284 пациента) секвенирование для поиска генетических факторов тяжести инфекции COVID-19. Установлено, что уровни экспрессии трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2) и частоты ее четырех SNP (rs2298659 (p.Gly259Gly); rs17854725 (p.Ile256Ile), rs12329760 (p.Val160Met), rs3787950 (p.Thr75Thr)) достоверно ($P < 2.2 \times 10^{-16}$) отличались у итальянцев по сравнению с восточноазиатскими и европейскими популяциями. Поскольку уровень летальности от COVID-19 в Италии один из наиболее высоких среди иных популяций, варианты *TMPRSS2* могут служить возможными модуляторами тяжести заболевания у итальянцев [41]. Уровни экспрессии ACE2 и *TMPRSS2* также были изучены в CD11b-экспрессируемых в эпителиальных клетках кишечника и Т-клетках у пациентов с воспалительным заболеванием кишечника. Экспрессия ACE2 и *TMPRSS2* не была увеличена в образцах от пациентов по сравнению с группой контроля. Применение антител к TNF- α – ведолизумаба, устекинумаба и стероидов достоверно снижает экспрессию ACE2 в CD11b-клетках [42].

IL-4, IL-6, IL-18 и TNF- α

Международным коллективом авторов из Великобритании, Нидерландов и Хорватии проведен метаанализ, включавший 386 исследований в отношении поиска SNP, ассоциированных с развитием туберкулеза, гриппа, респираторно-синцитиального вируса, коронавируса и пневмонии. Один SNP (rs2070874) гена *IL4* был достоверно (OR = 1.66, 95% CI 1.29–2.14) ассоциирован с риском респираторных инфекций [43] (табл. 2).

Повышенная вирусная нагрузка SARS-CoV была ассоциирована с *TT*-, *GT*-генотипами rs1946518 (T>G, с.–607*ILI*, OR = 10.6, 95% CI 2.03–55.0, $P = 0.014$), *TC*-генотипом rs1800587 (с.–889T, OR = 10.2, 95% CI 1.82–56.8, $P = 0.031$) *IL1A* и *TT*-генотипом rs2288918 (+23962T, OR = 7.2, 95% CI 1.47–35.3, $P = 0.034$) *RelB* у 94 пациентов Тайваня, инфицированных SARS-CoV. Также обнаружено, что вирусная нагрузка была выше у мужчин ($P = 0.0014$) и пожилых (старше 65 лет) пациентов ($P = 0.015$). При COVID-19 наблюдается повышение уровня интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли- α (TNF- α) и интерферона- γ [44]. Такой “цитокиновый шторм” вызывает тяжелую воспалительную реакцию, наблюдающуюся при COVID-19-инфекции. В ряде исследований и метаанализе, включающем девять исследований и 1426 пациентов с инфекцией, показано, что ее тяжесть (30.66, 95% CI 7.53–53.78, $P = 0.009$) и процент летальных исходов (41.32, 95% CI 28.15–54.49, $P < 0.001$) положительно коррелируют с уровнем IL-6 у пациентов [45–48]. Однако дискуссионным остается вопрос об ассоциации вариантов гена *TNFA* с развитием инфекции SARS-CoV. Одни исследования не обнаружили ассоциации генотипов *TT*, *CT* локуса с.–204 *TNFA* (OR = 0.95, 95% CI 0.90–0.99) у 75 пациентов с интерстициальным фиброзом легких при развитии SARS-CoV-инфекции [49]. Напротив, M. Feldmann et al. полагают, что терапия инфликсимабом и адалимумабом – препаратами против TNF- α – способна уменьшать интенсивность “цитокинового шторма” и воспаления, тем самым может оказаться более эффективной при тяжелой форме COVID-19 [44]. Следовательно, вирусная нагрузка SARS-CoV, являясь предиктором клинических исходов у пациентов, ассоциирована с полиморфизмом в провоспалительных генах, участвующих во врожденном иммунитете, зависящем от возраста и пола [50].

CCL2, RANTES и MBL

Хемокины участвуют в воспалении и противовирусном иммунитете. Установлена ассоциация вариантов rs1024611 (A>G, g.34252769A>G, G-2518A) в гене хемокинового лиганда-2 (*CCL2*) и лектина, связывающего маннозу (*MBL*), с восприимчивостью к SARS-CoV у 932 пациентов и у 982 лиц, составляющих группу контроля (табл. 2). Генотип GG rs1024611 связан с высоким уровнем белка *CCL2*, а В-аллель *MBL* – с низким уровнем Mbl, оба ассоциированы с повышенным риском инфицирования SARS-CoV ($P = 1.6 \times 10^{-4}$ и 4.9×10^{-8} для *CCL2* и *MBL* соответственно). При этом сочетание вариантов продемонстрировало ($P = 1.3 \times 10^{-10}$) кумулятивный эффект риска инфицирования SARS-CoV. Не обнаружено ассоциации между полиморфизмом и тяжестью заболевания [51]. Полиморфизм rs1800450 A/B (230G>A) в промоторе 54-го кодона гена *MBL* выявлен у 123 (36.0%) из 352 пациентов и достоверно ($P = 0.00086$) ассоциирован (OR = 1.73, 95% CI 1.25–2.39) с их восприимчивостью к коронавирусной инфекции. При этом носители данного варианта имели умеренную или низкую экспрессию белка Mbl [52]. Поскольку Mbl узнает остатки маннозы в составе углеводов и гликопротеинов оболочек многих бактерий и вирусов, стимулируя селективный путь активации комплемента, уменьшение клеточной экспрессии Mbl будет способствовать снижению врожденного иммунитета и риску инфицирования SARS-CoV-2. В другом исследовании установлена ассоциация CG- ($P < 0.0001$, OR = 3.28, 95% CI 2.32–4.64) и GG-генотипов ($P < 0.0001$, OR = 3.06, 95% CI 1.47–6.39) rs2107538 (C>G, с.–28) *RANTES* с предрасположенностью к инфицированию SARS-CoV у 495 гонконгских пациентов с SARS-CoV и у 578 лиц контрольной группы (табл. 2). У 28 пациентов G-аллель rs2107538 и CG- (OR = 2.12, 95% CI 1.11–4.06) и GG-генотипы также ассоциированы с повышенной смертностью (OR = 4.01, 95% CI 1.30–12.4). Таким образом, *RANTES* участвует в патогенезе SARS-CoV инфекции [53].

ABO и HLA

Коронавирус может реплицироваться в клетках, экспрессирующих антигены группы ABO. Эпидемиологический анализ показал, что носители I (O) группы крови имели низкий риск (OR = 0.699, 95% CI 0.635–0.770, $P < 0.001$) инфицирования коронавирусом (SARS-CoV) [54]. Французские исследователи использовали клеточную модель CHO, чтобы изучить, могут ли антитела к антигенам ABO блокировать взаимодействие S-белка SARS-CoV с ACE2. С этой целью EGFP-меченный S-белок экспрессировали в клетках яичника китайского хомячка, трансфицированных α -1,2-фукозилтрансферазой и α -трансферазой. Моноклональ-

ные или анти-A антитела человека ингибировали адгезию клеток, экспрессирующих S-белок, с клетками, экспрессирующими ACE2. Эти данные показывают, что анти-A антитела блокируют взаимодействие между вирусом и его рецептором [55]. На 65 пациентах с коронавирусной инфекцией установлено, что повышенный риск инфицирования ассоциирован с аллелями *HLA-B*4601* (OR = 2.08, $P = 0.04$) и *HLA-B*5401* (OR = 5.44, $P = 0.02$), а тяжесть заболевания ассоциирована с аллелем *HLA-B*4601* ($P = 0.0008$) [56]. Интересно, что в семи итальянских и испанских центрах пандемии COVID-19 провели полногеномное секвенирование и проанализировали 8582968 SNP у 835 итальянцев и 775 испанцев, инфицированных SARS-CoV-2. Обнаружена ассоциация (OR = 1.77, 95% CI 1.48–2.11, $P = 1.15 \times 10^{-10}$; OR = 1.32, 95% CI 1.20–1.47, $P = 4.95 \times 10^{-8}$) соответственно между сайтами rs11385942 (del>A, g.45834969dup) в гене транскрипционного фактора *LZTFL1* (локус 3p21.31) и rs657152 (A>C,T, g.133263862A>C) *ABO* (локус 9q34.2). В локусе 3p21.31 ассоциация затрагивает гены *LZTFL1*, *SLC6A20*, *CCR9*, *FYCO1*, *CXCR6* и *XCR1*. Анализ групп крови показал, что более высокий риск инфицирования SARS-CoV-2 связан с группой крови II (A) (OR = 1.45, 95% CI 1.20–1.75, $P = 1.48 \times 10^{-4}$), тогда как группа крови I (O) по сравнению с другими группами крови оказывает защитный эффект (OR = 0.65, 95% CI 0.53–0.79, $P = 1.06 \times 10^{-5}$) [57].

FcγRIIA и CD14

Исследователями из Сиднея (Австралия) обнаружена ассоциация ($P = 0.03$, OR = 3.2, 95% CI 1.1–9.1) гомозиготного H/H131 генотипа Fc-γ-рецептора IIA (FcγRIIA) человека с тяжестью и исходом коронавирусной инфекции у 180 пациентов из Гонконга, инфицированных SARS-CoV [58]. В более поздней работе на 152 пациентах установлена ассоциация CC-генотипа rs2569190 (A>G, с.–159CC g.140633331A>G) гена *CD14*, кодирующего мембранный белок макрофагов с тяжестью коронавирусной инфекции ($P = 0.029$, OR = 2.74, 95% CI 1.15–6.57) [59]. Эти данные согласуются с тем, что избыточный уровень секреторного белка sCD14 в крови связан с воспалением и грамотрицательным септическим шоком при инфекционном процессе.

AHSG

Известно, что высокий уровень фетуина-A (AHSG) наблюдается при ожирении и ассоциирован с резистентностью к инсулину [60]. В жировой ткани фетуин-A ингибирует экспрессию адипонектина, усиливает воспаление и инактивирует макрофаги [60]. Ген семейства 3A цитохрома P450 (*CYP4F3A*) кодирует ω-оксидазу, которая инактиви-

Таблица 3. Препараты, таргетированные к вирусным и клеточным белкам (по [28])

Вирусный белок	Название	Препарат	Литературный источник
3CLpro	Протеаза 3CLpro	Лопинавир	[73, 74]
PLpro	Папаиноподобная протеаза PLpro	Лопинавир	[73, 74]
RdRp	РНК-зависимая РНК-полимераза	Ремдесивир, рибавирин	[73, 75, 76]
S-белок	S-белок	Арбидол	[77, 78]
TMPRSS2	Трансмембранная сериновая протеаза-2	Камостат мезилат	[79]
ACE2	Ангиотензинпревращающий фермент 2	Арбидол	[77, 78]
AT2	AT2-рецептор ангиотензина	L-163491	[80]

вирует лейкотриен В4 (LTB4) в печени. Установлена ассоциация трех SNP: rs2248690 (OR = 2.42, 95% CI 1.30–4.51), rs4917 (OR = 1.84, 95% CI 1.02–3.34) в гене *AHSG* и rs3794987 (A>G, g.15640081A>G) *CYP4F3* с восприимчивостью к SARS-CoV у 624 пациентов из провинции Гуанчжоу (табл. 2). Кроме того, rs2248690 оказывает влияние на транскрипционную активность промотора *AHSG*, регулирующего сывороточный уровень *AHSG* [61].

ICAM3

Полиморфизм rs2304237 (с.428A>G) гена, кодирующего молекулу межклеточной адгезии-3 был исследован на восприимчивость носителей полиморфизма к заболеванию и исходу SARS-CoV инфекции у 817 пациентов с тяжелым острым респираторным синдромом. Не обнаружено ассоциации полиморфизма *ICAM3* с восприимчивостью организма к коронавирусу. Тем не менее у пациентов с SARS-CoV, гомозиготных по Gly143 гена *ICAM3*, были определены высокий уровень лактатдегидрогеназы ($P = 0.0067$, OR = 4.31, 95% CI 1.37–13.56) и низкое количество лейкоцитов ($P = 0.022$, OR = 0.30, 95% CI 0.10–0.89), что подтверждает роль *ICAM3* в патогенезе коронавирусной инфекции [62].

Таким образом, полиморфизмы *ACE2* ассоциированы с динамикой и распространенностью, лейкоцитарного антигена – с восприимчивостью и тяжестью SARS-CoV, а гены, регулирующие сигнальные пути через Toll-подобные рецепторы, – с тяжестью инфекции COVID-19 [63].

ТАРГЕТНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ВАКЦИНЫ

Основные белки: S-гликопротеин, РНК-полимераза, РНК-праймаза, основная протеаза (Mpro, 3CLpro) SARS-CoV-2 рассматриваются в качестве привлекательных и эффективных мишеней для разработки противовирусных препаратов [21].

Ингибиторы 3CLpro

3С-подобная протеаза (3CLpro) участвует в процессинге полипротеинов, транслируемых с вирусной РНК, и необходима для репликации вируса. Например, ученые из Любекского университета (Любек, Германия) на основе рентгеноструктурного анализа 3CLpro SARS-CoV-2 разработали α -кетоамидные ингибиторы с P3-P2 амидной связью в пиридоновом кольце для увеличения периода их полураспада в плазме. Оценка фармакокинетические характеристики ингибитора, исследователи установили его выраженный тропизм к ткани легких и безопасность для ингаляционного введения [64]. Поскольку 3CLpro расщепляет коронавирусные полипротеины по высококонсервативным сайтам рестрикции, разработана *in silico* трехмерная модель 3CLpro SARS-CoV-2 на основе кристаллической структуры очень схожего ортолога SARS-CoV. С помощью этой модели проведен виртуальный скрининг на применяемые противовирусные препараты и найдены 16 кандидатов в качестве эффективных ингибиторов. Среди них ледипасвир и велпатасвир оказались наиболее привлекательными для терапии COVID-19-инфекции и имели минимальные побочные эффекты в виде усталости и головной боли (табл. 3).

Такие препараты как эпclus (велпатасвир/софосбувир) и ледипасвир (софосбувир) оказались особенно эффективными благодаря их двойному ингибирующему действию на оба вирусных фермента – РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) или 3CLpro, вызывая легкие побочные реакции. Тенипозид и этопозид (и его фосфат) были созданы на основе модели их химического связывания с 3CLpro. Однако эти препараты имеют много побочных эффектов и должны применяться внутривенно. Одобренный к применению препарат венетоклакса хорошо связывается с 3CLpro, но имеет побочные действия, включая инфекции верхних дыхательных путей [65]. Другие ингибиторы протеаз – лопинавир и ритонавир, применяемые при терапии ВИЧ-инфекции, могут снижать вирус-

ную нагрузку и улучшать исход COVID-19-инфекции [66].

Препараты, нацеленные на S-белок

В S1 домене S-гликопротеина SARS-CoV-2 содержатся уникальные N- и O-связанные сайты гликозилирования, которые взаимодействуют с CD26 человека, маскируя SARS-CoV-2 от иммунного ответа хозяина и развития вирулентности [67]. Также S-гликопротеин содержит сайт связывания с ACE2, так называемый рецептор-связывающий мотив (RBM, аминокислоты S432-T486), который является основной антигенной детерминантой, способной вызывать выработку нейтрализующих антител, например, моноклональных антител человека mAb80R, конкурирующих с ACE2 за связывание. Скрининг библиотек пептидов RBM позволил получить короткие аминокислотные последовательности (около 40 аминокислот), которые связываются с ACE2 и нейтрализующими антителами mAb80R [1]. В более ранних исследованиях (2009) показано, что RBD формирует комплекс с Fab-доменом нейтрализующего моноклонального антитела F26G19, полученного иммунизацией мышей инактивированным SARS-CoV. Кристаллическая структура комплекса показывает, что поверхность RBD, распознаваемая F26G19, перекрывается молекулярной структурой белка ACE2. Предполагается, что антитела F26G19 нейтрализуют SARS-CoV, блокируя взаимодействие вируса с клетками организма хозяина [68]. Белок S содержит фуриновый сайт рестрикции на границе между S1 и S2 субъединицами, который отличает SARS-CoV-2 от других SARS-CoV вирусов. Американские ученые показали, что мышинные поликлональные антитела против S-белка SARS-CoV-2 эффективно ингибируют проникновение вируса в клетки [69]. Приводятся данные, что блокаторы ангиотензинового рецептора могут оказаться эффективными при терапии коронавирусной инфекции. Например, ирбесартан, одобренный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для лечения гипертонии и диабетической нефропатии, ингибирует SLC10A1 – котранспортер натрия и желчной кислоты (NTCP), который взаимодействует с транскрипционным репрессором C11orf74, препятствуя образованию Nsp10 SARS-CoV [70, 71]. В июле–августе 2020 г. биотехнологическая компания Regeneron Pharmaceuticals (Нью-Йорк, США) выступила спонсором клинических испытаний по эффективности и безопасности применения двойных моноклональных антител REGN-COV-2, нацеленных на связывание с двумя сайтами S-белка SARS-CoV-2 у 2000 бессимптомных взрослых носителей COVID-19. Эффективность REGN-COV-2 антител оценивается по предотвращению развития инфекции или симпто-

мов у инфицированных пациентов в течение месяца после введения REGN-COV-2 или плацебо. Все участники испытания будут контролироваться на предмет безопасности в течение семи месяцев после окончания испытания [72].

Препараты к липидам и холестерину

Еще одной стратегией терапии коронавирусной инфекции может быть использование препаратов, связывающихся с липидной оболочкой вирусов. Например, циклодекстрин и стеролы снижают инфекционность коронавирусов путем ингибирования вирус-липид-зависимого прикрепления к клеткам-мишеням организма-хозяина [81].

Препараты к рецептору эстрогена

Установлено, что сверхэкспрессия рецептора эстрогена ESR1 ингибирует репликацию вируса [82]. Нестероидные ингибиторы эстрогеновых рецепторов (торемифен) могут эффективно блокировать вирусные инфекции, в том числе COVID-19 посредством дестабилизации гликопротеина вирусной мембраны и ингибирования связи вирусной оболочки с эндосомальной мембраной и, в конечном итоге, подавлять репликации вируса [83]. Торемифен также регулирует экспрессию RPL19, HNRNPA1, NPM1, EIF3I, EIF3F и EIF3E белков, участвующих в COVID-19-инфекции [84]. Следовательно, торемифен может быть потенциальным лекарственным средством для терапии COVID-19-инфекции [66].

Вакцины на основе вирусных белков

Эффективное сдерживание эпидемий коронавируса у сельскохозяйственных животных с помощью вакцин указывает на потенциальный успех вакцинации. S-белок рассматривается в качестве наиболее многообещающей мишени вакцин против коронавируса, а также как интраназальная вакцина против MERS-CoV [85]. Началу таких исследований способствовала разработка моделей на мелких животных, которые эффективно воспроизводят передачу MERS-CoV и симптомы заболевания человека [88]. В настоящее время разрабатываются разные варианты вакцин против SARS-CoV: векторные ДНК-вакцины, живые аттенуированные вакцины и вакцины против субъединицы S-белка MERS-CoV коронавируса человека [86]. Аденовирусная вакцина может эффективно индуцировать иммунный ответ на SARS-CoV-инфицированные T-клетки и на вирус-нейтрализующие антитела [87]. Оба иммунных ответа обеспечивают длительную защиту организма от вирусной инфекции. У выздоровевших пациентов с коронавирусной инфекцией ответы вирус-нейтрализующих антител снижа-

лись примерно через 6 лет, тогда как иммунные ответы на SARS-CoV-инфицированные Т-клетки сохранялись, что свидетельствует о том, что последние необходимы для длительного иммунитета [88, 89]. Кембриджская и Массачусетская биотехнологические компании ModernaInc (США) совместно с Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID) Национального института здравоохранения США разработали вакцину мРНК-1273 против COVID-19. Вакцина предназначена для доставки мРНК, кодирующей S-белок SARS-CoV-2 (S-2P), и вызывает сильный иммунный ответ. На третьей фазе рандомизированного, плацебо-контролируемого исследования на 30000 взрослых добровольцах в 89 клинических центрах США показано, что данная вакцина безопасна и иммуногенна, т.е. способна индуцировать выработку высокого титра антител, нейтрализующих вирус. Предполагается развитие иммунного ответа и предотвращение симптоматических проявлений COVID-19 после двукратной вакцинации [90, 91]. В России на базе Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова и Главного военного клинического госпиталя им. Н.Н. Бурденко на 76 добровольцах проводятся клинические испытания безопасности и переносимости двух вакцин – соответственно “Гам-КОВИД-Вак” и “Гам-КОВИД-Вак Лио”. Сообщается, что российская вакцина против SARS-CoV-2 вызывает иммунный ответ у 100% добровольцев и не обладает побочным действием [92]. Национальным исследовательским центром эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (НИЦЭМ) создана вакцина “Спутник-V”, о чем 11 августа 2020 г. объявил Президент России В.В. Путин. В настоящее время завершаются ее клинические испытания на 40000 добровольцах. Центром “Вектор” создана вакцина “ЭпиВакКорона”, а в октябре 2020 г. она зарегистрирована в Минздраве России. Сейчас обе вакцины проходят пострегистрационные испытания. Центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН разрабатывает собственную вакцину против SARS-CoV-2, которая в данное время находится на стадии клинических испытаний [93].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тяжесть инфекции COVID-19 зависит от полиморфизма генома вируса и некоторых аллелей генома человека. Мутации в вирусных РНК-полимеразе (*ORF8*, 241C>T, S84L, 14408C>T, C251T), РНК-праймазе (P323L), S-белке (23403A>G, D614G), а также в структурных белках (N, E) повышают иммуногенность белков в отношении иммунного Т-клеточного ответа, что может быть ассоциировано с повышенной трансмиссивностью и тяжестью COVID-19-инфекции в странах

Европы. Мутации в генах ключевых вирусных белков меняют аффинность и специфичность таргентных препаратов, являясь молекулярной основой различий заболеваемости и смертности, а также реакции организма на противовирусные препараты или вакцины. Установлено, что вирус SARS-CoV-2 проникает в клетку с помощью трансмембранного рецептора, которым является белок ACE2. В свою очередь экспрессия гена *ACE2* варьирует в зависимости от возраста, пола, этнической расы пациента и привычки курения. Корцепторами ACE2 для SARS-CoV-2 в тканях человека могут служить пептидазы ANPEP, DPP4 и ENPEP. Особенности экспрессии гена *ACE2* отчасти могут объяснять основные симптомы COVID-19-инфекции и ее ассоциацию с хроническими заболеваниями. Установлена ассоциация тяжести COVID-19-инфекции с локусами (*HLA-B*4601*), генами (*FcγRIIA*, *MBL*, *TMPRSS2*, *TNF-α*, *IL-6* и др.) и антигеном А групп крови человека. Таким образом, проведение генетического тестирования позволяет не только выявить COVID-19-инфекцию у пациентов, но и сформировать новые группы риска на основе как наличия тех или иных хронических заболеваний, так и генетической предрасположенности или по восприимчивости к инфицированию SARS-CoV-2, а также персонифицировать программы медицинской реабилитации.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Freund N. T., Roitburd-Berman A., Sui J. et al. Reconstitution of the receptor-binding motif of the SARS coronavirus // *Protein Eng. Des. Sel.* 2015. V. 28. № 12. P. 567–575. <https://doi.org/10.1093/protein/gzv052>
2. Mackay I. M., Arden K. E. MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission // *Virology*. 2015. V. 12. P. 222. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0439-5>
3. Liu Z., Xiao X., Wei X. et al. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2 // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92. № 6. P. 595–601. <https://doi.org/10.1002/jmv.25726>
4. <https://www.worldometers.info/coronavirus/#countries>.
5. Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 7, М. 03.06.2020. М., 2020. 166 с.

6. Yang X., Yu Y., Xu J. et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study // *Lancet Respir. Med.* 2020. V. 8. № 5. P. 475–481. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)
7. Fang L., Karakiulakis G., Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? // *Lancet Respir. Med.* 2020. V. 8. № 4: e21. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30116-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30116-8)
8. Shitao R.A.O., Alexandria L.A.U., Hon-Cheong S.O. Exploring diseases/traits and blood proteins causally related to expression of ACE2, the putative receptor of 2019-nCoV: A Mendelian Randomization analysis // *Diabetes Care.* 2020. V. 43. № 7. P. 1416–1426. <https://doi.org/10.2337/dc20-0643>
9. Beatris L.P. Bloemers, van Furth A.M., Weijerman M.E. et al. Strengers and Louis J. Bont. Down Syndrome: A Novel Risk Factor for Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis – A Prospective Birth-Cohort Study // *Pediatrics.* 2007. V. 120. № 4. P. e1076–e1081. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-0788>
10. Cascella M., Rajnik M., Cuomo A. et al. Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19) // *Stat-Pearls.* 2021. Apr 20. PMID: 32150360.
11. Ashour M.H., Elkhatib W.F., Rahman M.d.M., Elshabrawy H.A. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks // *Pathogens.* 2020. V. 9. № 3. P. 186. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030186>
12. Li F., Li W., Farzan M., Harrison S.C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor // *Science.* 2005. V. 309. P. 1864–1868. <https://doi.org/10.1126/science.1116480>
13. Chen Y., Guo Y., Pan Y., Zhao Z.J. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 525. № 1. P. 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.071>
14. Coutard B., Valle C., de Lamballerie X. et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade // *Antiviral. Res.* 2020. V. 176. P. 104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>
15. Schidtko P. SARS-CoV-2 – part 2 – From the viral genome to protein structures. MARCH 27, 2020. <https://www.discngine.com/blog?author=52850d39e4b0b817d0c61ff9>
16. Li C.K., Wu H., Yan H. et al. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 8. P. 5490–5500. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5490>
17. He R., Leeson A., Ballantine M. et al. Characterization of protein–protein interactions between the nucleocapsid protein and membrane protein of the SARS coronavirus // *Virus Res.* 2004. V. 105. № 2. P. 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.05.002>
18. Tang X., Wu C., Li X. et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2 // *Nat. Science Rev.* 2020. V. 7. № 6. P. 1012–1023. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>
19. MacLean O.A., Orton R., Singer J.B., Robertson D.L. Response to “On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2”. <https://virological.org/t/response-to-on-the-origin-and-continuing-evolution-of-sars-cov-2/418>
20. Koyama T., Parida L., Platt D.E. Variant analysis of COVID-19 genomes // *Bull. World Health Organ.* 2020. V. 98. № 7. P. 495–504. <https://doi.org/10.2471/BLT.20.253591>
21. Yin C. Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications // *Genomics.* 2020. V. 112. № 5. P. 3588–3596. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.016>
22. teVelthuis A.J.W., van den Worm S.H.E., Snijder E.J. The SARS-coronavirus nsp7+ nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 4. P. 1737–1747. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr89>
23. Pfeiffer J.K., Kirkegaard K. A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 12. P. 7289–7294. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232294100>
24. Angelini M.M., Akhlaghpour M., Neuman B.W., Buchmeier M.J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles // *mBio.* 2013. V. 4. № 4. P. e00524-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00524-13>
25. Follis K.E., York J., Nunberg J.H. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell–cell fusion but does not affect virion entry // *Virology.* 2006. V. 350. № 2. P. 358–369. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.003>
26. Weise E. 8 strains of the coronavirus are circling the globe. Here’s what clues they’re giving scientists. USA TODAY. <https://www.usatoday.com/story/news/nation/2020/03/27/scientists-track-coronavirus-strains-mutation/5080571002/>.
27. Vankadari N. Overwhelming mutations or SNPs of SARS-CoV-2: A point of caution // *Gene.* 2020. V. 752. P. 144792. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144792>
28. Zhu Z., Liu G., Meng K. et al. Rapid spread of mutant alleles in worldwide COVID-19 strains revealed by genome-wide SNP analysis // *Virology Bioinformatics.* 2021. V. 13. No 2 :evab015. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-23205/v1>
29. Denison M. The attenuated MHV virus exhibited reduced replication in mice at day five following intracerebral inoculation // *Patent US20060039926.* 2006.
30. Li F., Li W., Farzan M., Harrison S.C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor // *Science.* 2005. V. 309. P. 1864–1868. <https://doi.org/10.1126/science.1116480>
31. Yan R., Zhang Y., Li Y. et al. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 // *Science.* 2020. V. 367. P. 1444–1448. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>

32. Miller L.E., Bhattacharyya R., Milleret A.L. Diabetes mellitus increases the risk of hospital mortality in patients with Covid-19: Systematic review with meta-analysis // *Medicine (Baltimore)*. 2020. V. 99. № 40: e22439. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022439>
33. Cao Y., Li L., Feng Z. et al. Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations // *Cell Discov.* 2020. V. 6:11. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0147-1>
34. Zhao Y., Zhao Z., Wang Y. et al. Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the putative receptor of Wuhan 2019-nCoV // *bioRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.01.26.919985>
35. Li W., Zhang C., Sui J. et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2 // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 8. P. 1634–1643. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600640>
36. Feng Z., Wang Y., Qi W. The small intestine, an underestimated site of SARS-CoV-2 infection: from Red Queen effect to probiotics // *Preprints*. Posted. 10 March 2020. <https://doi.org/10.20944/preprints202003.0161.v1>
37. Itoyama S., Keicho N., Hijikata M. et al. Identification of an alternative 5'-untranslated exon and new polymorphisms of angiotensin-converting enzyme 2 gene: lack of association with SARS in the Vietnamese population // *Am. J. Med. Genet. A.* 2005. V. 136. № 1. P. 52–57. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30779>
38. Chen J., Jiang Q., Xia X. et al. Individual variation of the SARS-CoV2 receptor ACE2 gene expression and regulation // *Aging Cell.* 2020. V. 19. No 7: e13168. <https://doi.org/10.1111/accel.13168>
39. Shikov A.E., Barbitoff Y.A., Glotov A.S. et al. Analysis of the spectrum of rare and common variants on susceptibility to COVID-19 and severity of outcome // *Front. Genet.* 2020. V. 11:551220. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.551220>
40. Qi F., Qian S., Zhang S., Zhang Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 526. № 1. P. 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.044>
41. Asselta R., Paraboschi E.M., Mantovani A., Duga S. ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy // *Aging (Albany NY)*. 2020. V. 12. № 11. P. 10087–10098. <https://doi.org/10.18632/aging.103415>
42. Burgueño J.F., Reich A., Hazime H. et al. Expression of SARS-CoV-2 entry molecules ACE2 and TMPRSS2 in the gut of patients with IBD // *Inflamm. Bowel. Dis.* 2020. V. 26. № 6. P. 797–808. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa085>
43. Patarčić I., Gelemanović A., Kirin M. et al. The role of host genetic factors in respiratory tract infectious diseases: systematic review, meta-analyses and field synopsis // *Sci. Rep.* 2015. V. 5: 16119. <https://doi.org/10.1038/srep16119>
44. Feldmann M., Maini R.N., Woody J.N. et al. Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed // *The Lancet*. 2020. V. 395. P. 1407–1409. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30858-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30858-8)
45. Ulhaq Z.S., Soraya G.V. Interleukin-6 as a potential biomarker of COVID-19 progression // *Med. Mal. Infect.* 2020. V.50. № 4. P. 382–383. <https://doi.org/10.101>
46. Aziz M., Fatima R. Elevated interleukin-6 and severe COVID-19: a meta-analysis // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92. No 11. P. 2283–2285. <https://doi.org/10.1002/jmv.25948>
47. Zhu J., Pang J., Ji P. et al. Elevated interleukin-6 is associated with severity of COVID-19: a meta-analysis // *J. Med. Virol.* 2021. V. 93. No 1. P. 35–37. <https://doi.org/10.1002/jmv.26085>
48. Chen X., Zhao B., Qu Y. et al. Detectable serum SARS-CoV-2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 (IL-6) level in critically ill COVID-19 patients // *Clin. Infect. Dis.* 2020. V. 71. No 8. P. 1937–1942. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa449>
49. Wang S., Wei M., Han Y. et al. Roles of TNF-alpha gene polymorphisms in the occurrence and progress of SARS-Cov infection: a case-control study // *BMC Infect. Dis.* 2008. V. 29. № 8:27. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-27>
50. Chen W.J., Yang J.Y., Lin J.H. et al. Nasopharyngeal shedding of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus is associated with genetic polymorphisms // *Clin. Infect. Dis.* 2006. V. 42. № 11. P. 1561–1569.
51. Tu X., Chong W.P., Zhai Y. et al. Functional polymorphisms of the CCL2 and MBL genes cumulatively increase susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection // *J. Infect.* 2015. V. 71. № 1. P. 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.03.006>
52. Zhang H., Zhou G., Zhi L. et al. Association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection // *J. Infect. Dis.* 2005. V. 192. № 8. P. 1355–1361. <https://doi.org/10.1086/491479>
53. Ng M.W., Zhou G., Chong W.P. et al. The association of RANTES polymorphism with severe acute respiratory syndrome in Hong Kong and Beijing Chinese // *BMC Infect. Dis.* 2007. V. 7: 50.
54. Wu B.-B., Gu D.-Z., Yu J.-N. et al. Association between ABO blood groups and COVID-19 infection, severity and demise: A systematic review and meta-analysis // *Infect. Genet. Evol.* 2020. V. 84:104485. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104485>
55. Guillon P., Clément M., Sébille V. et al. Inhibition of the interaction between the SARS-CoV spike protein and its cellular receptor by anti-histo-blood group antibodies // *Glycobiology*. 2008. V.18. № 12. P. 1085–1093. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn093>
56. Lin M., Tseng H.K., Trejaut J.A. et al. Association of HLA class I with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection // *BMC Med. Genet.* 2003. V. 4:9.

57. *Ellinghaus D., Degenhardt F., Bujanda L. et al.* The severe Covid-19 GWAS group. Genomewide association study of severe Covid-19 with respiratory failure // *The New England J. Med.* 2020. V. 383. No 16. P. 1522–1534. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2020283>
58. *Yuan F.F., Tanner J., Chan P.K. et al.* Influence of Fc-gammaRIIA and MBL polymorphisms on severe acute respiratory syndrome // *Tissue Antigens.* 2005. V. 66. № 4. P. 291–296. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2005.00476.x>
59. *Yuan F.F., Boehm I., Chan P.K. et al.* High prevalence of the CD14-159CC genotype in patients infected with severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus // *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. V. 14. № 12. P. 1644–1645. <https://doi.org/10.1128/CDVI.00100-07>
60. *Bourebaba L., Marycz K.* Pathophysiological implication of fetuin-A glycoprotein in the development of metabolic disorders: a concise review // *J. Clin. Med.* 2019. V. 8. № 12. P. 2033. <https://doi.org/10.3390/jcm8122033>
61. *Zhu X., Wang Y., Zhang H. et al.* Genetic variation of the human α -2-Heremans-Schmid glycoprotein (AHSG) gene associated with the risk of SARS-CoV infection // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8: e23730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023730>
62. *Chan K.Y., Ching J.C., Xu M.S. et al.* Association of ICAM3 genetic variant with severe acute respiratory syndrome // *J. Infect. Dis.* 2007. V. 196. № 2. P. 271–280.
63. *Debnath M., Banerjee M., Berk M.* Genetic gateways to COVID-19 infection: Implications for risk, severity, and outcomes // *FASEB J.* 2020. V. 34. No 7. P. 8787–8795. <https://doi.org/10.1096/fj.202001115R>
64. *Zhang L., Lin D., Sun X. et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors // *Science.* 2020. V. 368. P. 409–412. <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>
65. *Chen Y.W., Yiu C.B., Wong K.Y.* Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CL pro) structure: Virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates // *F1000Res.* 2020. V. 9:129. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22457.1>
66. *Zhou J., Fang L., Yang Z. et al.* Identification of novel proteolytically inactive mutations in coronavirus 3C-like protease using a combined approach // *FASEB J.* 2019. V. 33. № 12. P. 14575–14587. <https://doi.org/10.1096/fj.201901624RR>
67. *Vankadari N., Wilce J.A.* Emerging WuHan (COVID-19) coronavirus: Glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26 // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9. № 1. P. 601–604. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1739565>
68. *Pak J.E., Sharon C., Satkunarajah M. et al.* Structural insights into immune recognition of the severe acute respiratory syndrome coronavirus S protein receptor binding domain // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 388. № 4. P. 815–823. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.042>
69. *Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A. et al.* Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein // *Cell.* 2020. V. 181. № 2. P. 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
70. *Zhou Y., Hou Y., Shen J. et al.* Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2 // *Cell Discov.* 2020. V. 6:14. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0153-3>
71. *Hong M., Li W., Wang L. et al.* Identification of a novel transcriptional repressor (HEPIS) that interacts with nsp-10 of SARS coronavirus // *Viral. Immunol.* 2008. V. 21. № 2. P. 153–162. <https://doi.org/10.1089/vim.2007.0108>
72. Study assessing the efficacy and safety of anti-spike SARS CoV-2 monoclonal antibodies for prevention of SARS CoV-2 infection asymptomatic in healthy adults who are household contacts to an individual with a positive SARS-CoV-2 RT-PCR assay. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04452318>. Data assess: 19.08.2020.
73. *Sheahan T.P., Sims A.C., Leist S.R. et al.* Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV // *Nat. Commun.* 2020. V. 11: 222. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13940-6>
74. *Maxmen A.* More than 80 clinical trials launch to test coronavirus treatments // *Nature.* 2020. V. 578. P. 347–348. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00444-3>
75. *Guo D.* Old weapon for new enemy: drug repurposing for treatment of newly emerging viral diseases // *Virol. Sin.* 2020. V. 35. № 3. P. 253–255. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00204-7>
76. *Wang M., Cao R., Zhang L. et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro // *Cell Res.* 2020. V. 30. № 3. P. 269–271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>
77. *Kadam R.U., Wilson I.A.* Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 2. P. 206–214. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617020114>
78. The Efficacy of Lopinavir Plus Ritonavir and Arbidol against Novel Coronavirus Infection (ELACOI). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04252885>.
79. *Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor // *Cell.* V. 181. No 2. P. 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
80. *De Witt B.J., Garrison E.A., Champion H.C., Kadowitz P.J.* L-163,491 is a partial angiotensin AT(1) receptor agonist in the hindquarters vascular bed of the cat // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. V. 404. № 1–2. P. 213–219. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00612-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00612-9)
81. *Baglivo M., Baronio M., Natalini G. et al.* Natural small molecules as inhibitors of coronavirus lipid-dependent attachment to host cells: A possible strategy for reducing SARS-COV-2 infectivity? // *Acta Biomed.* 2020. V. 91. № 1. P. 161–164. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9402>
82. *Lasso G., Mayer S.V., Winkelmann E.R. et al.* A structure-informed atlas of human-virus interactions // *Cell.* 2019. V. 178. № 6. P. 1526–1541.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.005>

83. Zhao Y., Ren J., Harlos K. et al. Toremifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein // *Nature*. 2016. V. 535. P. 169–172. <https://doi.org/10.1038/nature18615>
84. V'kovski P., Gerber M., Kelly J. et al. Determination of host proteins composing the microenvironment of coronavirus replicase complexes by proximity-labeling // *Elife*. 2019. V. 8:e42037. <https://doi.org/10.7554/eLife.42037>
85. Ma C., Wang L., Tao X. et al. Searching for an ideal vaccine candidate among different MERS coronavirus receptor-binding fragments—The importance of immunofocusing in subunit vaccine design // *Vaccine*. 2014. V. 32. № 46. P. 6170–6176. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.086>
86. Schindewolf C., Menachery V.D. Middle east respiratory syndrome vaccine candidates: cautious optimism // *Viruses*. 2019. V. 11. № 1: 74. <https://doi.org/10.3390/v11010074>
87. Gao W., Tamin A., Soloff A. et al. Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys // *Lancet*. 2003. V. 362. P. 1895–1896. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14962-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14962-8)
88. Zumla A., Azhar E.I., Arabi Y. et al. Host-directed therapies for improving poor treatment outcomes associated with the middle east respiratory syndrome coronavirus infections // *Int. J. Infect. Dis.* 2015. V. 40. P. 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.09.005>
89. Prajapat M., Sarma P., Shekhar N. et al. Drug targets for corona virus: A systematic review // *Indian J. Pharmacol.* 2020. V. 52. № 1. P. 56–65. https://doi.org/10.4103/ijp.IJP_115_20
90. Phase 3 clinical trial of investigational vaccine for COVID-19 begins. Multi-site trial to test candidate developed by Moderna and NIH. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/phase-3-clinical-trial-investigational-vaccine-covid-19-begins>.
91. Jackson L.A., Anderson E.J., Roupael N.G. et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 – preliminary report // *New Engl. J. Med.* 2020. NEJMoa2022483. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022483>
92. РБК: <https://www.rbc.ru/rbcfreenews/5f07c7e49a79474e5e57c745>. Дата обращения 31.07.2020.
93. РБК: <https://www.rbc.ru/society/14/10/2020/5f86e589a79471be7f80074>. Дата обращения 03.11.2020.
94. Ching J.C., Chan K.Y., Lee E.H. et al. Significance of the myxovirus resistance A (MxA) gene –123C>a single-nucleotide polymorphism in suppressed interferon beta induction of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. № 12. P. 1899–1908. <https://doi.org/10.1086/652799>
95. He J., Feng D., de Vlas S.J. et al. Association of SARS susceptibility with single nucleic acid polymorphisms of OAS1 and MxA genes: a case-control study // *BMC Infect. Dis.* 2006. V. 6. № 6:106. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-106>
96. Vijgen L., Keyaerts E., Zlateva K., Van Ranst M. Identification of six new polymorphisms in the human coronavirus 229E receptor gene (aminopeptidase N/CD13) // *Int. J. Infect. Dis.* 2004. V. 8. № 4. P. 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2004.03.004>
97. Wang S., Wei M., Han Y. et al. Roles of TNF-alpha gene polymorphisms in the occurrence and progress of SARS-Cov infection: a case-control study // *BMC Infect. Dis.* 2008. V. 8:27. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-27>
98. Lu C., Gam R., Pandurangan A.P., Gough J. Genetic risk factors for death with SARS-CoV-2 from the UK Biobank // *MedRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.07.01.20144592>

Genetic Risk Factors for the Development of Coronaviral COVID-19 Infection

O. S. Glotov^{a, b, *}, A. N. Chernov^a, S. G. Scherbak^{a, c}, and V. S. Baranov^b

^aCity Hospital № 40, Sestroretsk, Saint Petersburg, 197706 Russia

^bOtt Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, 199034 Russia

^cSaint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: olgotov@mail.ru

The new coronavirus infection COVID-19 spread worldwide over 215 countries and caused tens of millions of infections and more than million of deaths. In the midst of COVID-19 infection, it is extremely important to combat this pandemic to identify new protein and gene targets that may turn out to be highly sensitive and specific diagnostic and prognostic markers of severity, outcome of the disease and individual genetic predisposition, useful for identification of new at risk patients, elaboration of genetically personalized programs for its medical rehabilitation and therapy. The transmissibility and severity of COVID-19 infection can be influenced by allelic variants of different human genes and loci (*ACE2*, *HLA-B*4601*, *FcγRIIA*, *MBL*, *TMPRSS2*, *TNF-α*, *IL6*, and also blood group A antigen, etc.) and these ones of the virus (*ORF8* RNA polymerase, RNA-primase *ORF6*, S-, N-, E-proteins). The mutations in viral proteins can change the affinity and specificity of their binding to targeted drugs, being the molecular basis of individual differences in the response to antiviral drugs or vaccines, as well as mortality and morbidity of COVID-19 infection. Data on the genetic variants of the coronavirus and human genomes, associated with an individual predisposition to an increased or decreased risk of transmissibility, severity and outcome of COVID-19 infection, are summarized. The targeted drugs and vaccines created for the treatment of COVID-19 infection are briefly considered.

Keywords: COVID-19, coronavirus infection, genes, polymorphisms, predisposition to coronavirus infection, COVID-19 medicines and vaccines.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.162/.164:575.117.2:591.157:598.2

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ
МЕЛАНИНОВОЙ ОКРАСКИ ОПЕРЕНИЯ У ПТИЦ

© 2021 г. И. В. Куликова*

Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: Kulikova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 25.09.2020 г.

После доработки 07.12.2020 г.

Принята к публикации 08.12.2020 г.

Меланиновая окраска оперения птиц реализуется благодаря соотношению и распределению в структуре пера двух типов меланиновых пигментов — эумеланина и феомеланина. В обзоре рассмотрены разнообразные аспекты меланогенеза, транспортировки и депонирования меланинов и генная регуляция многочисленных сопряженных с ними процессов. Изложены современные представления о функциональной роли генов-кандидатов и описаны результаты анализа их изменчивости у представителей разных видов птиц. Приводятся данные об использовании полногеномного и транскриптомного анализов для изучения молекулярно-генетических основ расцветки и рисунка оперения.

Ключевые слова: окраска оперения, меланин, меланогенез, гены-кандидаты, полногеномное секвенирование.

DOI: 10.31857/S0016675821080075

Расцветка оперения птиц включает всю палитру цветов, видимую человеческим глазом. И даже больше, ведь тетрахроматическое зрение позволяет птицам различать цвета и оттенки значительно лучше, чем это удастся млекопитающим с их дихроматическим или трихроматическим зрением. Окраска оперения служит для маскировки, терморегуляции, защиты от УФ-излучения и микробных инвазий, добычи пропитания и социального общения, являясь зачастую определяющим фактором в выборе полового партнера [1]. Существуют три основных механизма окраски оперения: избирательное поглощение света пигментами пера, дифракционные и интерференционные оптические явления, обусловленные структурой пера, и одновременное действие обоих механизмов. Соответственно выделяют пигментную, структурную и смешанную окраску оперения.

В формировании пигментной окраски оперения участвуют меланины, каротиноиды, порфирины, пситтакофулвины и другие пигменты. Меланины — самый распространенный тип пигментов, они присутствуют практически у всех видов птиц. Эумеланин придает оперению цвет от серого до черного, феомеланин — от приглушенно-желтого до красновато-коричневого. Каротиноиды занимают второе после меланинов место по встречаемости в классе Aves и окрашивают оперение в желтый,

оранжевый и красный цвета. Остальные типы пигментов встречаются намного реже. Меланины являются лидерами среди пигментов птиц не только по встречаемости, но и по универсальности применения. Они используются для создания структурной окраски оперения в качестве подложного пигментного слоя, который служит для предотвращения некогерентного светорассеяния тканями, расположенными ниже светорассеивающих наноструктур пера, и тем самым способствует устойчивости диапозона и сохранению интенсивности и яркости отраженного света [1]. Формирование рисунка (узора) оперения также невозможно без меланинов. Анализ цвета оперения 9049 видов птиц показал, что в 98.2% случаев сложная окраска реализуется только в присутствии меланинов [2]. Меланины защищают ДНК поверхностно лежащих клеток от УФ-излучения, так как обладают широким спектром поглощения и отражения излучения в УФ и видимой части спектра. И, наконец, они выполняют функцию защиты от механических повреждений, поскольку придают прочность биологическим тканям [1].

В последние годы было проведено множество работ, посвященных изучению молекулярно-генетических основ формирования окраски оперения у птиц. Появилось много новых данных, особенно в результате применения методов секвенирования

нового поколения, позволяющих получать последовательности целых геномов и транскриптомов отдельных особей, а в последнем случае и отдельных клеток. В настоящем обзоре мы попытались наиболее полно обобщить и подытожить всю имеющуюся в научной литературе информацию по данной теме, начиная с характеристики пигментов, биохимических реакций и сигнальных путей, лежащих в основе меланогенеза, и заканчивая результатами исследований, в которых применялись самые современные методы молекулярно-генетического анализа.

МЕЛАНИНЫ И МЕЛАНОГЕНЕЗ

Меланины представляют собой полимеры фенольной и (или) индольной природы. В перьях в разном соотношении встречаются два типа меланинов: эумеланин (темно-коричневый и черный пигмент) и феомеланин (желтоватый, красно-коричневый пигмент). Оба типа меланинов поглощают УФ и часть видимого излучения и выделяют его в виде тепла, но спектр поглощения эумеланина шире, особенно в красной части спектра, что объясняют большим количеством индолхинонов и карбонильных групп [3]. У птиц, так же как и у всех позвоночных, меланины вырабатываются специализированными клетками меланоцитами в особых органеллах меланосомах. По мере созревания меланосома с помощью системы микротрубочек передается к концам отростков (дендритов) меланоцитов, затем зрелые органеллы поступают в межклеточное пространство, откуда их захватывают кератиноциты. Кератиноциты впоследствии претерпевают кератинизацию и гибнут, оставляя после себя ороговевший кератин с вкрапленными в него меланосомами и пузырьками воздуха — структурный материал растущих перьев, волос, шерсти и т.д. [1].

Процесс синтеза меланина в меланосомах — меланогенез — наиболее полно изучен на примере высших позвоночных, включая человека, хотя протекает он примерно одинаково у всех позвоночных (рис. 1). Субстратом для синтеза меланина является аминокислота L-тирозин, которая попадает в организм с пищей или синтезируется из L-фенилаланина. Фермент тирозиназа (TYR), мембранный гликопротеин меланоцитов, катализирует лимитирующую реакцию меланогенеза — окисление L-тирозина до L-диоксифенилаланина (DOPA). Далее DOPA окисляется в хинон (DOPA-хинон). Дальнейшие реакции идут по двум разным биохимическим путям, которые приводят к образованию эумеланина или феомеланина. Для синтеза эумеланина необходимы два интегральных гликопротеина TYRP1 и TYRP2/DCT, их аминокислотные последовательности на 40% гомологичны тирозиназе, поэтому их называют “TYRP, tyrosinase related proteins” — “белки род-

ственные тирозиназе”. Функция TYRP1 состоит в активации и стабилизации тирозиназы, поддержании структуры меланосом. TYRP2 катализирует превращение DOPA-хрома в 5,6-дигидроксииндол-2-карбоновую кислоту (DHICA), полимеризация которой приводит к образованию DHICA-меланина. DOPA-хром может также превращаться в 5,6-дигидроксииндол (DHI). Продуктом окислительной полимеризации DHI является DHI-эумеланин. Увеличение соотношения DHI/DHICA приводит к образованию черного эумеланина, а уменьшение — коричневого эумеланина. Синтез феомеланина протекает только в присутствии серосодержащей аминокислоты цистеин и в отсутствие активированной TYR по несколько иному пути. На стадии образования DOPA-хинона к нему неферментативно присоединяется цистеин, в результате чего образуется 5-S-цистеинил-DOPA и 2-S-цистеинил-DOPA, которые претерпевают дальнейшие спонтанные превращения, а образующиеся в итоге бензотиазины становятся мономерными единицами полимера феомеланина (рис. 1).

Основные сигнальные пути меланогенеза

К настоящему времени открыто и изучено множество сигнальных систем, приводящих к синтезу меланина в меланосомах. Их главной мишенью является активация транскрипционного фактора микрофтальмии (MITF), который запускает экспрессию ферментов меланогенеза TYR, TYRP1, TYRP2 (рис. 2). Сигнальные системы меланогенеза можно разделить на две группы по типу рецептора на поверхности клеток. В первой из них используются рецепторы, сопряженные с G-белками (семейство GPCR — G-Protein Coupled Receptors), например меланокортиновый рецептор (MC1R), B-рецептор к эндотелину (EDNRB), рецептор Frizzled (Fz). Во второй группе рецепторы обладают тирозинкиназной активностью (белковая тирозинкиназа C-KIT, основной фактор роста фибробластов (FGF2) и т.д.). Несмотря на то что главным сигнальным каскадом меланогенеза считают SCF/KIT [6], большинство работ по генетической регуляции окраски оперения так или иначе связано с изучением меланокортинового сигнального пути.

Меланокортиновая сигнальная система. Эта система — классический и наиболее полно изученный путь меланогенеза, опосредованный активацией меланокортинового рецептора первого типа (MC1R), встроенного в мембрану меланоцитов (рис. 2). MC1R относится к GPCR-семейству и состоит из семи трансмембранных доменов и внеклеточного N- и внутриклеточного C-концов, обладает высокой аффинностью к α -меланоцит-стимулирующему гормону (α -MSH) и к адренокортикотропину (АСТН). У птиц эти гормоны вырабатываются паракринно в фолликуле пера

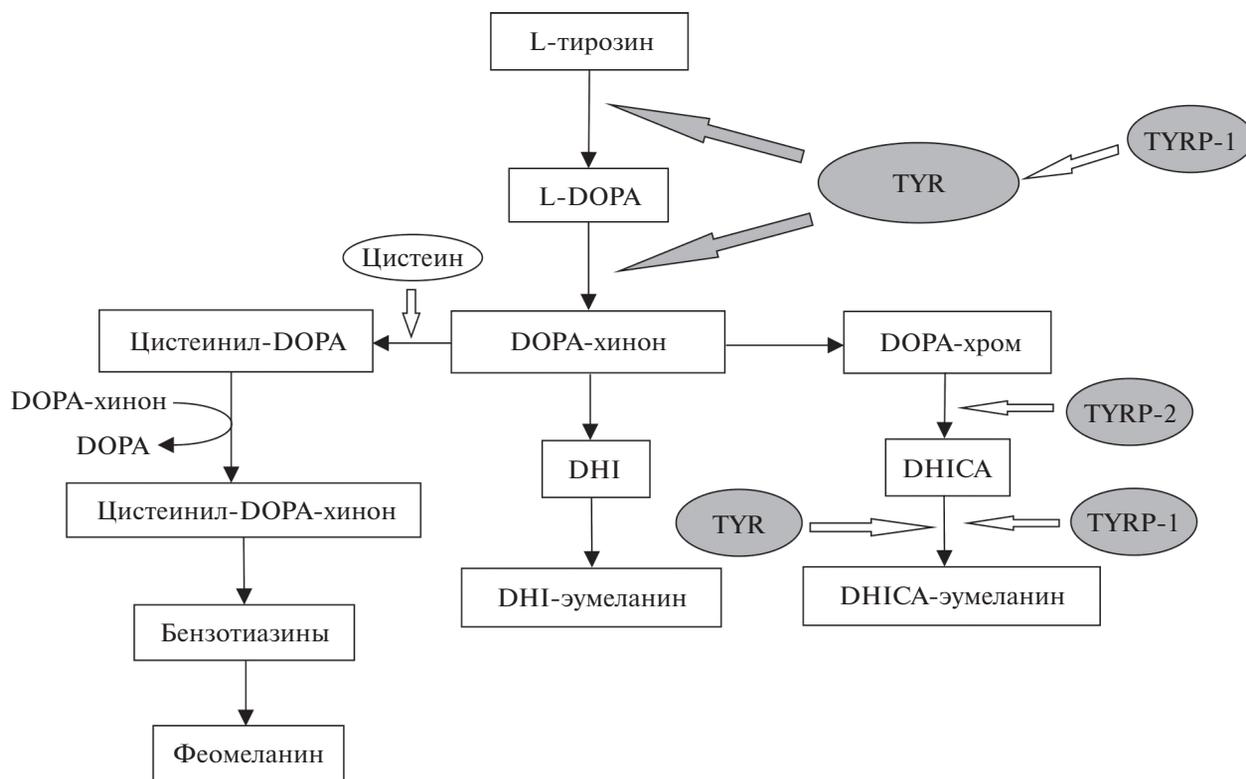


Рис. 1. Схема реакций и ферменты меланогенеза (из: [4], см. пояснения в тексте).

кератиноцитами, меланоцитами и фибробластами [7]. После взаимодействия со своими агонистами MC1R претерпевает конформационные изменения, что приводит к активации другого мембранного белка — аденилатциклазы (AC), превращающего АТФ в цАМФ. Повышение внутриклеточной концентрации цАМФ активирует протеинкиназу А (РКА), которая фосфорилирует транскрипционный фактор CREB. CREB запускает транскрипцию MITF, главного регулятора меланогенеза. В свою очередь MITF активирует экспрессию TYR, TYRP1, TYRP2, что приводит к синтезу эумеланина (рис. 2). Антагонист MC1R, сигнальный белок Агути (ASIP), стабилизирует неактивную конформацию рецептора, что в итоге вызывает снижение концентрации ключевого фермента меланогенеза TYR, прекращение синтеза эумеланина и при условии достаточной концентрации цистеина в клетке, которую обеспечивает работа белка-переносчика цистеина SLC7A11 [7], синтез желтого пигмента феомеланина.

Эндотелиновый сигнальный путь. Эндотелиновая регуляция меланогенеза птиц изучена недостаточно, однако предполагают, что она функционирует так же как и у млекопитающих [8]. Известно, что у птиц связывание сигнального полипептида эндотелина-3 (EDN3) с мембранным рецептором EDNRB2 активирует пролиферацию, дифференциацию и миграцию меланоцитов и их предше-

ственников, клеток нервного валика и меланобластов [9], а также запускает и регулирует меланогенез [10–12]. Связывание EDN с EDNRB активирует фосфолипазу C_γ (PLC γ), которая расщепляет полифосфоинозитид (PIP2) до инозитолтрифосфата (IP3) и диацилглицерола (DAG), что приводит к мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} и активации протеинкиназы С (PKC) (рис. 2). PKC фосфорилирует протеинкиназу RAF-1, далее RAF-1 запускает митоген-активируемый протеиназный каскад (MAPK). MAPK-протеинкиназы фосфорилируют MITF, причем активация ERK и JNK приводит к кратковременной экспрессии и последующей убиквитин-зависимой деградации MITF, выключая эумеланогенез, тогда как P38 фосфорилирует транскрипционный фактор CREB, который активирует экспрессию MITF и тем самым запускает меланогенез.

Канонический сигнальный путь WNT/ β -катенин. WNT-система задействована главным образом во время эмбрионального развития, а также в более поздних процессах органогенеза и в ходе регенерации тканей взрослого организма. WNT-каскад регулирует главным образом пролиферацию и дифференцировку клеток, в том числе и клеток нервного гребня будущих меланоцитов [13]. Для передачи сигнала внутрь клетки липогликопротеины семейства WNT должны связать соответствующие GPCR-рецепторы группы Frizzled

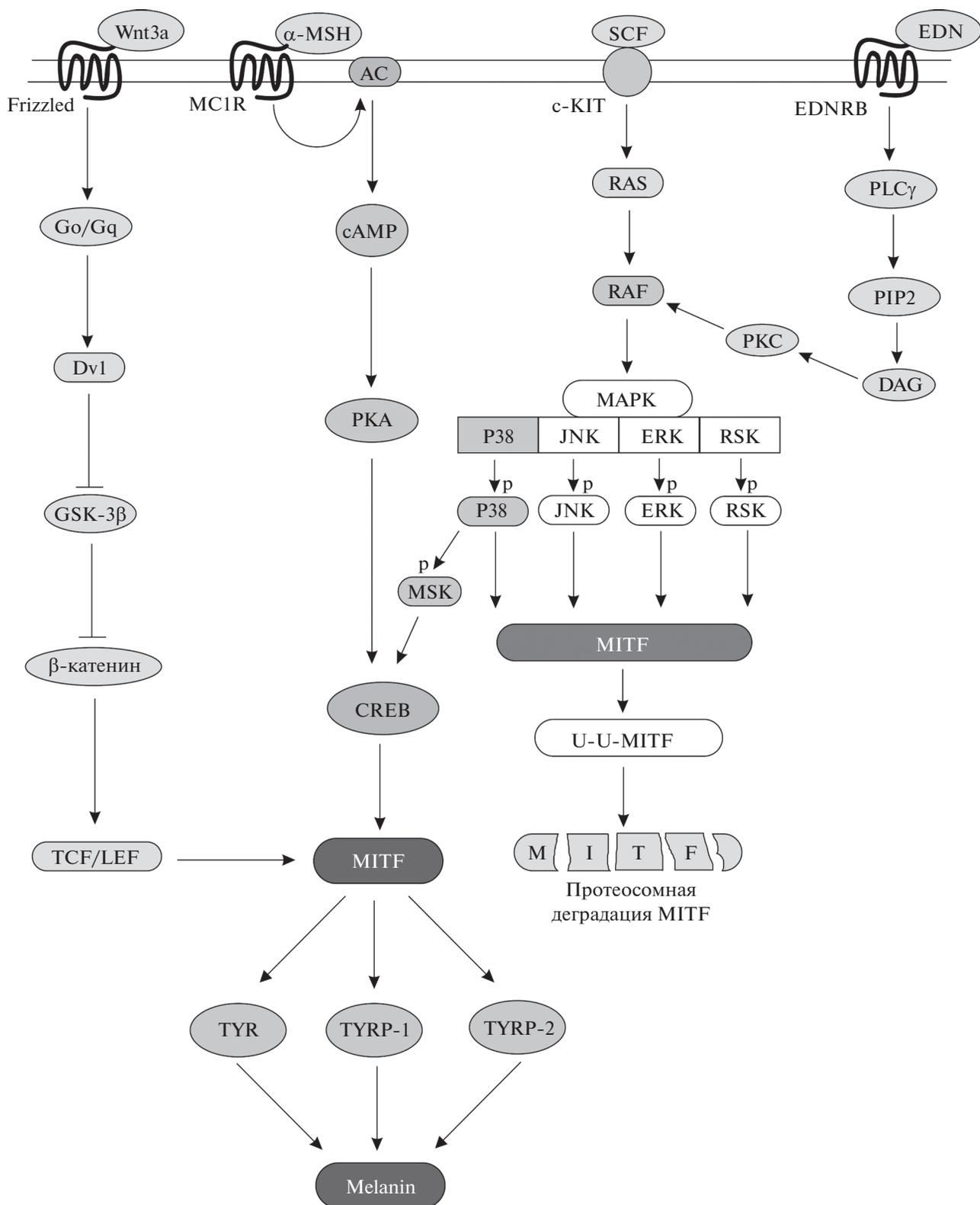


Рис. 2. Сигнальные пути меланогебеза (из: [5, 6], см. пояснения в тексте).

(рис. 2). Экспрессию MITF в меланобластах и их последующую дифференцировку в меланоциты инициирует связывание лиганда Wnt3a с рецептором Frizzled [14]. Меланогенез в дифференцированных меланоцитах также может запускаться с помощью WNT-канонического пути в результате взаимодействия Wnt3a с Frizzled-3 [15]. Связанный с гетеротримерным G-белком рецептор Frizzled вызывает диссоциацию G-белка и последующий распад деструктивного Axin-комплекса, связывающего и фосфорилирующего цитоплазматический β -катенин. Свободный β -катенин диффундирует в ядро, где он образует комплекс с транскрипционными факторами семейства TCF/LEF и активирует транскрипцию MITF [16].

SCF-KIT сигнальный путь. SCF-KIT также играет важную роль в выживании, пролиферации и дифференцировке клеток разного типа [17]. Связывание тирозинкиназного рецептора c-KIT меланоцитов с лигандом SCF (Stem Cell Factor) приводит к димеризации и активации рецептора [18]. Активированный KIT фосфорилирует разные субстраты, включая и серин-треонинкиназу RAF при посредничестве белка RAS. RAF запускает сигнальный каскад MAPK. Далее события происходят по общему с эндотелиновым сигнальным путем сценарию (см. выше), поэтому SCF-KIT и эндотелиновый сигнальные пути рассматривают как синергичные [19].

Генетические основы меланиновой окраски оперения. Формирование меланиновой окраски оперения – это результат действия и взаимодействия множества генов, как структурных, так и регуляторных. Сюда относятся гены, отвечающие за спецификацию клеток нервного гребня и их дальнейшую дифференциацию, т.е. превращение в меланобласты и меланоциты, за миграцию меланобластов в дерму, в область фолликула пера; гены, продукты которых являются либо непосредственными участниками, либо регуляторами синтеза меланина; гены, контролирующие формирование, нормальное функционирование и транспортировку меланосом. По меньшей мере 200 генов, ответственных за пигментацию, идентифицированы у млекопитающих [20], большинство из них имеет ортологов у птиц [21].

Миграция и дифференциация меланоцитов

Процесс спецификации клеток нервного гребня, дающих начало меланобластам, запускается экспрессией большого числа генов и активацией целого ряда сигнальных каскадов. У птиц одним из маркеров, начавших миграцию в дорсолатеральном направлении меланобластов, является рецептор к эндотелину EDNRB2 (рис. 2). Ген рецептора начинает экспрессироваться в клетках нервного гребня, начавших спецификацию по типу меланобластов, еще до начала их миграции, а связывание

EDNRB2 с его лигандом EDN3 стимулирует размножение и дифференциацию меланоцитов. Мутации в гене *EDNRB2* приводят к гипопигментации кожных покровов и их производных у птиц [10, 11], но в отличие от млекопитающих, у которых экспрессируется паралог EDNRB2 – EDNRB, не связаны с такими физиологическими нарушениями как глухота, мегаколон и нарушение моторики кишечника [22, 23]. Так, у японского перепела *Coturnix coturnix* аутосомная рецессивная мутация (*s*) в гене *EDNRB2* приводит к аминокислотной замене Arg332His и связана с окраской оперения по типу “панды” (небольшие области пигментированного оперения в области головы, спины и хвоста на фоне белого оперения). При этом экспрессия *EDNRB2* в коже перепелов с фенотипом “панда” снижена в 38 раз по сравнению с нормально окрашенными особями [10]. Эта же мутация обуславливает крапчатую окраску оперения у нескольких пород домашних кур [11] и пятнистую окраску оперения у домашней утки [12]. Данная замена находится в шестом домене *EDNRB2* и, по-видимому, создает пространственные сложности для домена и третьей цитоплазматической петли рецептора, что отрицательно сказывается на его активности [12]. Аутосомная рецессивная мутация (*mo^w*) в гене *EDNRB2* у домашней курицы породы Minohoku вызывает аминокислотную замену Cys244Phe в наружной петле между четвертым и пятым мембранными доменами рецептора, что приводит к ухудшению способности EDNRB2 связываться со своим лигандом EDN3. Фенотипически *mo^w* мутанты имеют белое оперение с несколькими небольшими участками частично или полностью пигментированных перьев в отличие от типичных представителей данной породы со светло-коричневой окраской оперения [11]. Среди серых домашних гусей породы Ганг встречаются особи с белым оперением, за исключением нескольких серых пятен на спине. Оказалось, что почти полное отсутствие пигментации оперения объясняется инсерцией длиной 14 пн в третьем экзоне гена *EDNRB2*, которая сдвигает рамку считывания и приводит к появлению дефектной мРНК. Все гуси с белым оперением – гомозиготы по данной мутации, у гетерозигот наблюдается промежуточная окраска оперения [24]. По-видимому, дефекты гена *EDNRB2* нарушают миграцию меланобластов, поэтому меланоциты в фолликуле пера полностью или частично отсутствуют, и пигмент не продуцируется или продуцируется в небольшом количестве, соответственно.

Свое название транскрипционный фактор MITF (microphthalmia-associated transcription factor) получил от генетического заболевания – микрофтальмии, проявляющегося в виде аномального недоразвития глазного яблока, нарушений пигментации кожных покровов и радужной оболочки глаз. Микрофтальмию вызывают мутации в гене

MITF [25, 26]. Он экспрессируется практически во всех типах клеток позвоночных, но главную роль играет именно в пигментных клетках, регулируя спецификацию, размножение, выживание, миграцию, меланогенез и злокачественное перерождение меланоцитов [27]. С гена *MITF* считается девять изоформ транскрипционного фактора, которые отличаются по последовательности N-конца [28]. *MITF-M* – самая распространенная изоформа в меланоцитах, ключевой регулятор генов меланогенеза и транспорта меланосом [29]. Экспрессия *MITF-M* регулируется множеством других транскрипционных факторов, включая и сам *MITF*, и с помощью сигнальных путей меланогенеза (рис. 2) [27].

Ген *MITF* обычно начинает экспрессироваться в клетках, покинувших нервный гребень и специализирующихся по типу меланобластов. У кур и перепелов это происходит на третий день эмбрионального развития [30, 31]. Предполагается, что у птиц *MITF* регулирует именно дифференциацию меланоцитов и меланогенез, но не влияет на их миграцию [30]. Дифференцированная экспрессия *MITF* отмечена на ранней стадии развития меланоцитов в фолликуле растущего после удаления пера у серой вороны *Corvus cornex*: в фолликулах черных перьев уровень экспрессии *MITF* в меланоцитах выше, чем в фолликулах серых перьев [32].

Впервые среди птиц мутации в гене *MITF* были обнаружены у японского перепела. Одна из них представляла собой несинонимичную замену в основном домене, другая – делецию двух нуклеотидов в районе С-конца транскрипционного фактора, которая вызывала сдвиг рамки считывания. У гомозигот по мутантному аллелю *SILVER* (B) наблюдались дефекты развития глаз, отсутствие пигментации оперения [33] и нарушение остеокластогенеза, приводящее к разрушению костной ткани [34]. Впоследствии было показано, что именно вторая мутация (делеция двух нуклеотидов в 11-м экзоне гена) является функционально значимой [35]. Также у гусей и уток разных пород были обнаружены несколько синонимичных и несинонимичных замен как в кодирующих, так и в некодирующих участках *MITF*, коррелировавших в разной степени с окраской оперения [36–39]. В результате полногеномного сравнительного исследования домашней утки пекинской породы и ее предка, кряквы *Anas platyrhynchos*, у всех представителей пекинской породы была идентифицирована инсерция размером 6.6 тпн между первым и вторым экзонами гена. Эта инсерция способствует значительному снижению экспрессии изоформы *MITF-M* в меланоцитах и отключению всех регулируемых *MITF* генов меланогенеза, что объясняет белую окраску оперения пекинской утки [40]. Совсем недавно был выявлен возможный эпигенетический механизм регуляции окраски оперения у домашней утки с помо-

щью метилирования *MITF*. Показано, что один из двух CpG-островков в районе промотора *MITF* отличается значительным повышением степени метилирования в фолликулах белых перьев по сравнению с фолликулами пигментированных перьев [39]. Известно, что метилирование CpG-островков промоторной зоны гена обычно приводит к подавлению экспрессии соответствующего гена [41]. Степень метилирования CpG-островка негативно коррелировала с экспрессией изоформы *MITF-M*, что свидетельствует в поддержку предположения об эпигенетической регуляции.

Экспрессии *MITF* предшествует появление в клетках нервного гребня двух важнейших транскрипционных факторов *PAX3* и *SOX10*. Их взаимодействие и связывание с цис-регуляторным участком *MITF* запускает транскрипцию последнего. *PAX3* (paired box protein 3) координирует развитие множества типов клеток нервного гребня, включая и меланоциты [42]. У человека мутации *PAX3* вызывают синдром Ваарденбурга I и III типа, редкое аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся потерей слуха и нарушениями пигментации кожи, волос и радужной оболочки глаза [43]. У млекопитающих они являются причиной пятнистой окраски шерсти [44], а некоторые из них в гомозиготном состоянии приводят к летальному исходу [45]. У птиц мутации в гене *PAX3* не изучены.

SOX10 (Sry related HMG box 10) – более узкоспециализированный транскрипционный фактор, регулирующий преимущественно спецификацию и дифференциацию меланоцитов [30]. Помимо *MITF*, *SOX10* ко-активирует экспрессию генов тирозиназы *TYR*, родственного тирозиназе белка *TYRP1*, DOPA-хром-таутомеразы *TYRP2/DCT* [46]. У птиц обнаружена цис-регуляторная мутация гена *SOX10*, которая представляет собой делецию его предполагаемого энхансера. У домашних кур такая аутосомная рецессивная мутация *DB* (Dark Brown) приводит к уменьшению продукции эумеланина и увеличению продукции феомеланина в оперении определенных участков тела [47]. По-видимому, из-за отсутствия энхансера уровень экспрессии *SOX10* снижается и, как следствие, падает экспрессия *MITF* и ключевых ферментов эумеланогенеза. Делеция энхансера *SOX10* была также обнаружена у сизого голубя *Columba livia*. В фолликулах перьев мутантных птиц экспрессия *SOX10* и его гена-мишени *TYRP1*, кодирующего белок, необходимый для эумеланогенеза, значительно снижена, а цвет оперения – рыжий, феомеланиновый [48]. Транскриптомный анализ показал, что в регенерирующих перьях мутантных голубей значительно снижена экспрессия генов меланогенеза: *TYRP1*, *SLC24A5*, *PMEL17*, *NR4A3* и *GSTA2*. У всех этих генов недалеко от сайта инициации транскрипции были обнаружены сайты связыва-

ния SOX10, что доказывает прямую регуляцию их экспрессии с помощью SOX10 [49]. Остается открытым вопрос о переключателе синтеза пигмента, т.е. посреднике между SOX10 и синтезом эумеланина или феомеланина; ведь гены, чьи продукты известны как переключатели (TYR, MC1R, SLC7A11, ASIP, POMC), экспрессировались у диких и мутантных особей одинаково. Согласно одной из гипотез снижение экспрессии генов *TYRP1* и *PMEL17*, которые способствуют стабильности тирозиназы (TYR) и ее транспортировке, отрицательно сказывается на активности TYR и тем самым запускает синтез феомеланина [49].

Меланогенез

Меланокортиновый рецептор первого типа MC1R – трансмембранный белок рецептор из семейства GPCR. При связывании MC1R с α -MSH и АСТН происходит активация меланокортинового сигнального пути, которая в итоге приводит к продукции эумеланина в меланоцитах (рис. 2). В среднем длина кодирующего участка гена *MC1R* составляет 1 тпн, а его продукт состоит примерно из 310 аминокислотных остатков [50]. Сначала считали, что ген состоит только из одного экзона [51], однако оказалось, что у человека он состоит из четырех экзонов и подвергается как внутри-, так и межгенному сплайсингу [52]. У птиц мультиэкзонная структура *MC1R* не выявлена, кодирующий экзон состоит из 945 пн [53]. Данный ген обладает высокой степенью полиморфизма, подробно изучены многочисленные как синонимичные, так и несинонимичные замены и их связь с изменчивостью окраски оперения у птиц [21]. Полагают, что большое число замен объясняется минимальным плеiotропным действием гена [54], а мутации влияют главным образом на локализацию рецептора в мембране меланоцитов, его способность связывать лиганды и передавать сигнал через гетеротримерные G-белки [55]. Большинство обнаруженных мутаций, ассоциированных с окраской оперения, являются несинонимичными заменами и, как правило, усиливают или ослабляют общую пигментацию или пигментацию отдельных участков тела птиц [56–73]. Так, например, замена Glu92Lys переводит рецептор MC1R в состояние конститутивной активации, вызывая меланизм у бананового певуна и домашней курицы [54, 60, 74], в меньшей степени ее эффект выражен у перепелов [59, 62]. Есть мутации, которые у одних видов вызывают меланизм, но не влияют на пигментацию других видов, например Arg230His [53, 63]. Замену Val85Met ассоциируют с меланизмом у белого гуся *Chen c. caerulescens* и красноногой олуши *Sula sula* [53, 56] и с феомеланизмом у сизого голубя *Columba livia* [57]. Ввиду популярности данного гена-кандидата в генетических исследованиях описано до-

вольно много признаков окраски оперения, не связанных с его изменчивостью [63, 75–78].

В немногочисленных работах выявлена связь между мутациями в гене *MC1R* и другими генами и признаками. Так, у темноокрашенной морфы чеглока Элеоноры *Falco eleonoraе* обнаружена делеция 12 пн, которая приводит к потере четырех аминокислот рецептором и снижению иммунного ответа на фитоагглютинин, тогда как у светлой морфы делеция отсутствует, а иммунный ответ гораздо сильнее [64]. Возможно, такая ассоциация между аллельным вариантом *MC1R* и интенсивностью воспалительной реакции объясняется плеiotропным действием гена *MC1R*, который экспрессируется не только в меланоцитах, но и во многих клетках иммунной системы [79]. Мутация Val126Ile в гене *MC1R* обыкновенной сипухи *Tyto alba* обуславливает 30% изменчивости окраски оперения живота *Tyto alba*, носители *W*-аллеля *MC1R* с валином в 126-й позиции обладают более светлой окраской, присутствие же изолейцина (*R*-аллель) коррелирует с рыжей окраской оперения [66]. Оказалось, что у гомозигот *WW* в 2.5 раза сильнее выражен половой диморфизм в отношении окраски оперения, что возможно объясняется эпистатическим эффектом аллеля *W* на гены, определяющие половой диморфизм. У носителей *R*-аллеля выявлены не только повышенная экспрессия генов меланогенеза, но и изменение уровня экспрессии плеiotропных меланокортиновых генов, кодирующих гормоны, которые регулируют множество различных процессов в организме [67].

Сигнальный белок Агути ASIP – паракринный пептид, который продуцируется в фолликуле пера и служит эндогенным антагонистом α -MSH (рис. 2), конкурируя с ним за связывание с MC1R [80]. ASIP инактивирует меланокортиновый рецептор, что приводит к блокировке экспрессии MITF и ферментов эумеланогенеза и прекращению синтеза эумеланина. Будет ли вместо эумеланина синтезироваться феомеланин или меланоцит просто прекратит синтез пигментов – зависит уже от работы других генов.

Ген *ASIP* состоит из трех кодирующих и трех классов некодирующих экзонов, которые подвергаются альтернативному сплайсингу, и имеет три промотора. В среднем с гена *ASIP* у птиц считается до семи изоформ мРНК, которые отличаются последовательностями некодирующих участков [80]. С дистального промотора или промотора 1-го класса *ASIP* считается изоформа, которая экспрессируется главным образом в вентральной области тела птицы и обеспечивает защитную окраску [80, 81], т.е. темный верх (спина) и светлый низ (нижний отдел груди, живот). Эта же изоформа участвует в формировании межполовых отличий по окраске оперения у домашних

кур. У куриц и цыплят она транскрибируется только в вентральной области, а у петухов еще и в фолликулах ярко-золотых и оранжевых перьев спины, причем в присутствии эстрогена этого не происходит, и у петушков развивается окраска перьев по типу самок [82].

Впервые роль ASIP в формировании окраски оперения птиц была подтверждена в результате анализа изменчивости кодирующей последовательности гена и окраски оперения японского перепела *Coturnix japonica*. Было показано, что причиной черно-коричневой окраски оперения у перепелов является рецессивная мутация *rb* (*recessive black*) в виде делеции 8 пн, которая сдвигает рамку считывания ASIP и приводит к удалению стоп-кодона и изменению аминокислотной последовательности концевой участка пептида. У сигнального белка нарушается третичная структура, что негативно влияет на его способность связываться с MC1R и, как следствие, делает невозможным прекращение меланоцита с синтеза эумеланина на синтез феомеланина [83]. Генетической основой летальной в гомозиготном состоянии мутации Y (yellow) оказалась делеция размером 90 тпн, которая приводит к удалению двух расположенных рядом с ASIP локусов: RALY и EIF2B. В результате экспрессию ASIP контролирует промотор RALY, что вызывает значительное повышение экспрессии пептида во многих тканях птицы [81]. У гетерозигот (Y/+) наблюдается более светлая окраска оперения и нарушение обмена веществ. По-видимому, избыточная продукция ASIP приводит к связыванию пептида с другими меланокортиновыми рецепторами, в том числе с MC3R и MC4R в гипоталамусе, что вызывает, среди прочего, повышение аппетита и ожирение.

К настоящему времени изучен целый ряд функциональных мутаций как в кодирующих, так и в регуляторных участках гена ASIP. Например, замену Pе55Thr в первом кодирующем экзоне ASIP ассоциируют с меланизмом в одной из островных популяций черноспинного монарха *Monarcha castaneiventris*. Эта мутация каким-то образом нарушает способность регулятора связываться с MC1R и блокировать синтез эумеланина [84]. Мутация *fawn-2/beige* вызывает у японского перепела осветление окраски оперения со смещением в сторону желтизны. Это tandemная дупликация размером 71 тпн, которая включает одну полную копию гена *AHCY* на одной цепи ДНК и части генов ASIP и *ITCH* на другой цепи ДНК. Таким образом, у мутантов появляются еще два некодирующих (e4 и e5) и три кодирующих экзона ASIP, которые расположены сразу за некодирующим экзоном 1 гена *ITCH*. Авторы полагают, что дублированная последовательность стимулирует повышенную экспрессию ASIP, что и приводит к изменению окраски оперения птиц [85].

Гены тирозиназы (*Tyrosinase, TYR*) и родственных тирозиназе белков (*Tyrosinase related proteins, TYRP1 и TYRP2*) кодируют ферменты, необходимые для синтеза меланинов (рис. 1). Ген *TYR* состоит из пяти экзонов и четырех интронов, имеет открытую рамку считывания из 1590 пн и кодирует фермент, состоящий из 529 аминокислотных остатков [86]. Мутации в кодирующих и некодирующих участках гена *TYR* ассоциируют с полиморфизмом окраски оперения и кожи у домашнего гуся и курицы [36, 87, 88]. Снижение уровня экспрессии *TYR* коррелирует с белой или осветленной, менее пигментированной окраской оперения у обыкновенного перепела *Coturnix coturnix* и домашней утки [89, 90]. Полный альбинизм или отсутствие меланиновой пигментации в радужной оболочке глаз, коже и ее производных вызывают, как правило, мутации, блокирующие экспрессию гена *TYR* или приводящие к трансляции дефектного белка, неспособного выполнять свои функции. Такова, например, мутация *recessive white* у домашней курицы. Она обусловлена инсерцией последовательности ретровируса из семейства вирусов лейкоза птиц длиной 7.7 тпн в четвертом интроне гена. В результате пятый экзон гена не транскрибируется, образуется дефектная мРНК [87]. Также у кур-альбиносов обнаружена делеция шести нуклеотидов, которая приводит к удалению двух аминокислот из предполагаемого связывающего медь домена А тирозиназы [91]. Недавно у домашних гиперпигментированных кур (*black-bone chicken*) были выделены и клонированы пять изоформ мРНК тирозиназы. Все изоформы экспрессируются в перьевых фолликулах, коже и мышцах, причем в светлой коже и в фолликулах белых перьев значительно менее интенсивно, чем в пигментированной коже и перьях. Функции изоформ остаются невыясненными [92].

Родственный тирозиназе белок *TYRP1* активирует и стабилизирует тирозиназу, поддерживает структуру меланосом, участвует в полимеризации ДНКА с образованием эумеланина (рис. 1). Ген *TYRP1* имеет примерно 40% сходства по нуклеотидной последовательности с геном *TYR* и кодирует белок из 535–536 аминокислотных остатков [93]. Мутации в гене *TYRP1* вызывают изменение темно-серой или черной окраски оперения на коричневую или светло-коричневую [48, 94, 95]. Несинонимичная замена Phe282Ser в третьем экзоне гена обуславливает светло-коричневую окраску оперения у японского перепела [94]. Балобаны *Falco cherrug* – гомозиготные носители рецессивной точечной мутации C79T и инсерции 79insT80 в первом экзоне гена имеют светло-коричневую окраску оперения в отличие от темно-коричневой “дикий” окраски. Наличие обеих мутаций вызывает сдвиг рамки считывания, преждевременное появление стоп-кодона и трансляцию белка из 81

аминокислотного остатка вместо 536 [96]. У сизого голубя *Columbia livia* обнаружены три рецессивные мутации в гене *TYRP1*, которые также приводят к сдвигу рамки считывания и преждевременному появлению стоп-кодона и ассоциируются с коричневой окраской оперения. Мутация Ala23Pro в сайте расщепления сигнальной последовательности белка приводит к пепельно-рыжей окраске оперения *Columbia livia*. Она не влияет на каталитическую активность *TYRP1*, а нарушает его способность активировать и стабилизировать тирозиназу и поддерживать структуру меланосом. В меланосомах гомозигот по данной мутации снижено содержание эумеланина, а матрикс меланосом имеет неупорядоченную структуру [48]. У домашних кур-носителей рецессивной мутации His214Arg в третьем экзоне гена формируется шоколадная окраска оперения вместо ожидаемой черной. Оказывается, данная мутация изменяет конформацию цинк-содержащего активного центра фермента, что приводит к синтезу аномального эумеланина, его неправильной укладке в меланосомах, остановке созревания меланосом и увеличению их числа с целью компенсации [95].

DOPA-хром-таутомераза Dct, или TYRP2, катализирует превращение DOPA-хром в 5,6-дигидроксиндол-2-карбоновую кислоту (DHICA), полимеризация которой приводит к образованию коричневого DHICA-меланина (рис. 1). Показано, что *TYRP2* интенсивно экспрессируется в пигментированной коже домашних кур [97]. У уток обнаружена ассоциация между окраской оперения и SNPs в экзонах гена [37].

Мембранные транспортные белки

Продукт гена *SLC45A2*, еще известный как мембран-ассоциированный транспортный белок MATP, участвует в посттрансляционной модификации и транспортировке тирозиназы в меланосомы [98]. Также он функционирует как Na^+/H^+ обменник и участвует в поддержании pH и ионного гомеостаза меланосом, влияя тем самым на активность тирозиназы [99]. Однако окончательно функция *SLC45A2* до сих пор неизвестна. Мутации в гене *SLC45A2* вызывают снижение вплоть до полной остановки синтеза одного или обоих типов меланинов у домашней курицы, японского перепела и сизого голубя [48, 100]. Нулевые рецессивные мутации в гене вызывают неполный альбинизм у кур и перепелов, который проявляется в виде белого оперения с тусклым желто-бежевым оттенком и отсутствия пигментации радужной оболочки глаз. У птиц-носителей замен Leu347Met и Tug 277Cys в меланосомах не синтезируется феомеланин, хотя синтез эумеланина осуществляется нормально [100]. Такой же эффект имеет мутация Ala477Val в гене *SLC45A2* бе-

лого тигра, однако почему это происходит до сих пор остается загадкой [101].

Ген *SLC7A11* кодирует цистин-глутаматный транспортер, мембранный белок, который переносит цистеин в форме цистина из межклеточного пространства в цитозоль меланоцитов. Цистеин используется меланоцитом как источник сульфгидрильной группы, необходимой для синтеза феомеланина. У серой неясыти *Strix aluco* экспрессия *SLC7A11* коррелирует с экспрессией *ASIP* и *MITF*, что закономерно, ведь связывание *ASIP* с MC1R блокирует синтез эумеланина, а *MITF* запускает транскрипцию *SLC7A11* [7]. У зебровой амадины *Taeniopygia guttata* в условиях окислительного стресса экспрессия *SLC7A11* падает и феомеланин синтезируется в значительно меньшем количестве, поскольку цистеин используется организмом в качестве строительного блока главного внутриклеточного антиоксиданта – глутатиона [102]. Снижение уровня экспрессии *SLC7A11* у обыкновенного поползня *Sitta europaea* отмечается и в противоположной ситуации, в случае избытка цистеина, видимо для того, чтобы сократить поступление цистеина в меланоциты и избежать окислительного стресса, который может вызвать его аккумуляция [103]. Тем не менее концентрация феомеланина в перьях *Sitta europaea*, получающего избыток цистеина с пищей, растет. По-видимому, связь между интенсивностью феомеланиновой окраски оперения и уровнем экспрессии гена *SLC7A11* у обыкновенного поползня отсутствует.

Известны и другие белки-переносчики растворимых соединений, например калий-зависимый натрий-кальциевый ионообменник *SLC24A5*, дисфункция которого вызывает глазкожный альбинизм *OCA6* у человека. Снижение экспрессии гена *SLC24A5* уменьшает пигментацию кур [104]. Продукт гена *OCA2*, полипептид P, является мембранным транспортным белком меланосом и участвует в транспорте тирозина в меланосомы. Полагают, что полипептид P также задействован в переносе ионов хлора, способствуя тем самым регуляции pH меланосом [105]. Снижение экспрессии гена *OCA2* сопряжено с уменьшением пигментации оперения серого юнко *Junco hyemalis* и домашней курицы [8, 106, 107].

Образование и транспорт меланосом

Своей эллипсоидной формой эумеланосомы обязаны присутствию внутри просветного фибриллярного гликопротеина PMEL17 или SILV, SILVER, gp100, ME20. Он формирует каркас эумеланосом в виде фибриллярных слоев, который облегчает полимеризацию эумеланина и служит местом для его упаковки и хранения, обеспечивает компартментализацию токсичных промежуточных продуктов меланогенеза, способствует транспортировке эумеланина путем агрегации

эумеланиновых полимеров [108]. У птиц ген *PMEL17* состоит из 11 экзонов и имеет размер 4.1 тпн [109]. Три аллеля *PMEL17* (*Dominant White*, *Dun* и *Smoky*), которые в разной степени подавляют эумеланогенез, обнаружены у домашней курицы [109]. Фенотипически аллели дают белую, серо-коричневую и темно-серую окраску оперения, соответственно. Аллель *Dominant White* представляет собой инсерцию 10 пн в десятом экзоне гена, которая приводит к появлению трех новых аминокислот в трансмембранном участке белка. Делеция 15 пн (аллель *Dun*) вызывает потерю пяти аминокислот также в трансмембранном домене гликопротеина. Делеция 12 пн в шестом экзоне может компенсировать инсерцию 10 пн в десятом экзоне аллеля *Dominant White* (аллель *Smoky*). Поэтому носители *Smoky* восстанавливают пигментацию и имеют темно-серую или серую окраску оперения. У японского перепела нонсенс-мутация в четвертом экзоне *PMEL* приводит к преждевременному появлению стоп-кодона и считыванию дефектного протеина, состоящего из 148 вместо 733 аминокислот [110]. В меланоцитах особей, гомозиготных по данной мутации, экспрессия *PMEL* падает и содержание эумеланина в перьях снижается, что фенотипически проявляется как бледно-желтая окраска оперения. Также показано, что ген *PMEL* обладает плейотропным действием. Мутации *PMEL*, влияющие на пигментацию кур, связаны и с отклонениями в социальном поведении [111].

Транспорт меланосом в дендриты для передачи кератиноцитам осуществляется с помощью миозина 5MyoVa, RAS ГТФ-азы RAB27a и меланофилина MLPH. Три белка соединяют меланосомы с актиновым цитоскелетом меланоцитов: MyoVa соединяется с филаментами актина, RAB27a – с меланосомой, а MLPH связывается с одной стороны с MyoVa, а с другой с RAB27a. Рецессивная аутосомная мутация *lavender* в гене *MLPH*, представляющая собой несинонимичную замену Arg35Trp в первом экзоне гена *MLPH*, вызывает значительное уменьшение интенсивности пигментации или “разбавление” окраски оперения у домашней курицы, японского перепела, мускусной утки, причем это касается как эумеланиновой, так и феомеланиновой окраски [112–114]. По-видимому, мутация изменяет трехмерную структуру меланофилина, что негативно влияет на его способность связываться с 5MyoVa и RAB27a, нарушая таким образом внутриклеточный транспорт меланосом [114]. “Разбавленную” окраску оперения японского перепела также определяет хромосомная перестройка, которая затрагивает четыре рядом расположенных гена *MLPH*, *PRLH*, *RAB17* и *LRRFIPI*. В результате двух инверсий и одной делеции происходит удаление последовательностей генов *PRLH*, *RAB17* и частично *MLPH*. Гомозиготы по данной мутации

помимо значительно разбавленной окраски оперения имеют меньший вес, более высокую температуру тела и повышенный аппетит по сравнению с “дикими” особями [115].

РИСУНОК ОКРАСКИ ОПЕРЕНИЯ

Большинство из вышеописанных генетических механизмов определяет либо тип пигмента, либо выраженность пигментации, т.е. расцветку оперения. Однако в окраске оперения огромную роль играет рисунок, как пера, так и тела птицы. Рисунок оперения служит основой для формирования покровительственной окраски и является определяющим фактором для узнавания особей своего вида, выбора полового партнера, передачи разного рода сигналов.

Рисунок пера

Окраска растущего пера реализуется посредством передачи меланоцитами зрелых пигмент-содержащих меланосом кератиноцитам, из которых формируются роговые структуры пера. Клетки-предшественницы меланоцитов формируют кольцо в основании перьевого фолликула и управляют незрелые, недифференцированные меланоциты вверх вдоль периметра перьевого цилиндра [116]. По мере продвижения происходит дифференцировка меланоцитов, которая подразумевает синтез пигментов, их упаковку и хранение в меланосомах. Если по каким-либо причинам дифференцировка или миграция меланоцитов нарушаются, то в перо появляется белая полоса, или пятно, или все перо оказывается белым, лишенным пигмента [117]. Так, сцепленный с полом полосатый рисунок пера у домашней курицы обусловлен мутациями в гене *CDKN2A*, которые вызывают преждевременную дифференцировку меланоцитов [118]. Это две несинонимичные замены Val9Asp и Arg10Cys и две некодирующие замены в интроне 1 и промоторе. Различные комбинации мутаций дают три функциональных аллеля. У носителей мутантных аллелей наблюдаются в разной степени снижение пигментации оперения и полосатый рисунок пера. В фолликулах перьев мутантных птиц меланоциты уже на раннем этапе миграции находятся на значительно более поздней, чем обычно, стадии зрелости. Пул клеток-предшественниц меланоцитов в результате их преждевременного созревания быстро исчерпывается и транспортируемых ими от основания фолликула к растущим бородкам пера пигментов не хватает для непрерывной окраски пера. Поэтому до тех пор, пока стволовые клетки не сгенерируют новую волну клеток-предшественниц меланоцитов, в растущем пере формируется лишенный пигментации участок, затем цикл повторяется.

Крапчатая окраска, при которой кончик опала пера окрашен в белый цвет, так же как и окраска оперения по типу “панды” у кур некоторых пород и японского перепела обусловлены мутациями в гене эндотелинового рецептора EDNRB2. Мутации Arg332His и Cys244Phe негативно влияют на способность рецептора связываться со своим лигандом EDN3, в результате чего нарушается миграция, пролиферация и дифференциация меланоцитов. В этом случае пигментные клетки в фолликуле пера вообще отсутствуют или присутствуют в количестве, недостаточном для его нормальной пигментации [11].

Важную роль в регуляции рисунка пера играет паракринный сигнальный пептид ASIP, или Agouti, ингибитор синтеза эумеланина, который секретируется в пульпе растущего пера. В месте контакта пульпы с высоким содержанием ASIP и формирующихся структур пера меланоциты могут прекратить продукцию эумеланина или переключиться на синтез феомеланина. Соответственно формируется белая или желто-коричневая окраска данного участка пера, причем любой заданной формы [80, 116].

Рисунок оперения

Закладка ювенильного рисунка оперения спинной стороны эмбрионов у японского перепела и ряда других видов отряда Курообразных осуществляется с помощью двух взаимодополняющих механизмов [119, 120]. В первом решающую роль играет градиент концентрации ASIP, предопределяющий местоположение желтых и черных полос [119]. Экспрессия ASIP начинается еще до формирования фолликулов пера, в дерме, по обеим сторонам нервной трубки, причем расположение ASIP-содержащих доменов совпадает с будущей локализацией желтых продольных полос. Второй механизм осуществляется с помощью щелевых контактов между меланоцитами [120]. Щелевые контакты состоят из молекул мембранного белка коннексина 40 (CX 40). В случае дефектного гена коннексина 40 у эмбрионов развивается однотонная черная окраска оперения, а если меланоциты активно экспрессируют нормальный коннексин, то формируется полосатая окраска спины. Показано также, что щелевые контакты могут регулировать ширину черных и желтых доменов.

ASIP также участвует в формировании покровительственной окраски оперения, когда вентральная сторона тела более светлая, а дорсальная сторона более темная. Высокий уровень транскрипции ASIP отмечен в фолликулах вентральной, бледной, почти лишенной пигментации стороне тела эмбрионов японского перепела [121]. На роль регуляторов экспрессии ASIP претендуют продукты генов β -дефенсина, Corin, аттрактин и т.д., однако для птиц такие исследования не

проводились. Недавно, тем не менее, показано, что присутствие однонуклеотидного полиморфизма в интроне гена *RALY*, расположенного рядом с ASIP, у двух близкородственных гибридирующихся видов певчих птиц рода *Setophaga* четко ассоциировано с окраской оперения головы, щек и груди, различающейся у этих видов. Авторы предположили, что продукт гена *RALY* регулирует экспрессию ASIP, а блок *RALY*–ASIP обладает плейотропным действием и влияет на формирование механизмов репродуктивной изоляции [122].

ПОЛНОГЕНОМНЫЕ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Развитие и широкое применение методов полногеномного секвенирования значительно расширили возможности генетических исследований. С их помощью стало возможно идентифицировать новые, неизвестные ранее участки генома, вовлеченные тем или иным образом в формирование расцветки и рисунка оперения у птиц. Чаще всего такие исследования проводятся на близкородственных видах птиц, вступающих в гибридизацию и различающихся по окраске оперения [123–126]. Геномы видов сравнивают и ищут дивергентные участки ДНК. В большинстве таких работ, а их число неуклонно растет, показано, что дивергентные участки генома, связанные с пигментацией оперения, содержат регуляторные гены, продукты которых влияют или на сигнальные пути, или на экспрессию отдельных генов меланогенеза. Так, наиболее дифференцированными участками геномов золотокрылого *Vermivora chrysoptera* и синекрылого *V. cyanoptera* пеночковых певунов, видов с резко выраженными многочисленными отличиями по расцветке и рисунку оперения, оказались участки ДНК, расположенные выше таких связанных с пигментацией генов как *ASIP*, *WNT*, *EDA*, *BCO2*, *FST*. Эти некодирующие участки, скорее всего, выполняют функцию цис-регуляторов экспрессии соответствующих белок-кодирующих генов [126]. Полногеномный анализ ассоциаций (ПГАА) показал, что большинство статистически значимых SNPs, дифференцирующих серую и коричневую морфы максаренской белоглазки *Zosterops borbonicus*, локализованы в некотором полиморфном локусе размером 3 млн пн хромосомы 1. Причем в генах-кандидатах, расположенных в данном локусе (*RS1*, *APIS2*, *GPM6B*, *TRAPPC2*, *RAB9A*, *APXL*, *OAI*), несинонимичные замены, связанные с окраской оперения, не обнаружены. По-видимому, они сосредоточены в области цис-регуляторных участков генов, запускающих или блокирующих синтез феомеланина у коричневой и серой морф, соответственно [127]. Самцы девяти южноамериканских симпатричных видов овсянок (род *Sporophyla*), прошедших через недавнюю радиацию, различаются по окраске оперения и по

песням для защиты территории и привлечения самок. Большинство дивергентных участков их геномов содержат гены, так или иначе связанные с меланогенезом, в том числе *ASIP*, *SLC45A2*, *TYR*, *TYRP1*, *KitL* и т.д. Причем SNPs обнаружены не в кодирующих последовательностях, а в некодирующих участках предположительно цис-регуляторной природы, которые контролируют экспрессию генов, в том числе и меланогенных [128]. В Z-хромосоме Гульдовой амадины *Erythrura gouldiae* выше гена фоллистатина *FST* обнаружен участок размером 72 тпн, дифференцирующий две морфы амадины, различающиеся по окраске оперения головы, ряду поведенческих и физиологических признаков [129, 130]. Данный фрагмент не содержит кодирующей ДНК и, по мнению авторов, представляет собой цис-регулятор плейотропного гена фоллистатина *FST*. Фоллистатин антагонистически действует на гены семейства TGF- β (активин, BMP и др.), которые участвуют в регуляции дифференциации меланоцитов и меланогенеза, развития зрительной и репродуктивной систем. Регуляторную функцию выполняет и число копий последовательности в регионе CNV, которое коррелирует с уровнем экспрессии гена *NDP* в фолликуле растущего пера сизого голубя *Columbia livia* [131]. Чем выше уровень экспрессии гена, тем темнее окраска оперения крыла, характерная для темно-чеканной и чеканной морф. У дикой морфы со светлым крылом и двумя темными полосами на нем число копий CNV не превышает двух.

В целом, внутри- и межвидовая изменчивость окраски оперения у диких видов птиц чаще всего сопряжена с пигментацией отдельных участков тела, например горла, макушки, полос вокруг глаз, небольших участков в районе крыла, груди и т.д. Причем окраску таких участков по данным ПГАА контролируют определенные некодирующие последовательности генома [126, 128, 130–132]. Такой модульный тип окраски оперения в результате генетической рекомбинации способствует появлению новых, уникальных цветовых комбинаций и может служить основой для быстрого с точки зрения эволюции видообразования в случае радиации нескольких видов, как это произошло, например, у муний [132] и овсянок [128].

Значительную роль в возникновении внутривидовых морф, различающихся окраской оперения, могут играть структурные перестройки генома. Так, у турухтана *Philomachus pugnax* инверсия участка 11-й хромосомы размером 4.5 млн пн привела к появлению трех морф у самцов: “независимых” (independents), “спутников” (satellites) и “фэдеров” (faeders), которые составляют 80–95, 5–20 и менее 1% всех самцов соответственно [133]. В брачный сезон самцы разных морф различаются окраской и формой оперения, а также поведением. Данная инверсия характерна для

“спутников” и “фэдеров” только в гетерозиготном состоянии. В гомозиготном состоянии она летальна из-за нарушения последовательности гена *CENPN*, кодирующего центромерный белок N, необходимый для нормального деления клеток. Всего в районе инверсии находится около 125 генов, включая и ген меланокортинового рецептора *MC1R*. Она содержит целый ряд миссенс-мутаций, включая три делеции размером от 3.3 до 17.7 тпн. Авторы исследования полагают, что инверсия произошла у предков “независимых” морф 3.8 ± 0.15 млн лет назад и привела к появлению хромосомы “фэдеров”, а примерно 520 тыс. лет назад произошло очень редкое событие — рекомбинация между неинвертированной и инвертированной последовательностями, в результате чего появилась хромосома “спутников”.

У белогорлого воробья *Zonotrichia albicollis* причиной появления двух морф, также различающихся окраской оперения и поведением, стала инверсия участка 2-й хромосомы размером 100 млн пн (10% генома) [134]. Примерно половина самцов и самок вида, обладателей белой макушки, для которых характерна повышенная агрессивность и склонность к промискуитету, являются гетерозиготами по инверсии. У представителей второй морфы с коричневой макушкой, моногамных, самцы которой заботятся о потомстве наравне с самками, инверсия отсутствует. Соотношение белой и коричневой морф 1 : 1 в популяциях вида поддерживается благодаря дисассортативному скрещиванию, т.е. когда пары образуются главным образом между представителями разных морф. Оказалось, что в районе инверсии находится от 1000 до 1100 генов, многие из которых связаны с нейрофизиологией поведения, включая гены, кодирующие половые гормоны и их рецепторы. Также идентифицированы два гена *Fig4* и *LYST*, продукты которых влияют на пигментацию. Высокая степень дивергенции инвертированной и неинвертированной последовательностей и филогенетические реконструкции указывают на появление инверсии в генном пуле вида задолго до его становления в результате гибридизации с ныне вымершим видом.

Большой вклад в изучение формирования окраски оперения внес и ставший недавно относительно доступным высокопроизводительный транскриптомный анализ. В большинстве исследований такого рода сравниваются транскриптомы перьев разной окраски/рисунка из разных участков тела птицы или проводится сравнительный анализ экспрессии генов в перьях одних и тех же участков тела близкородственных видов. Сравнение профилей экспрессии генов-кандидатов и секвенирование транскриптомов показывают, что в фолликулах перьев с более светлой окраской снижена экспрессия генов меланогенеза, также среди дифференциально экспрессирующихся генов

значительную долю составляют регуляторные гены [8, 90, 106, 107, 135]. Чаще всего в фолликулах светлых перьев отмечают снижение уровня экспрессии генов *TYR*, *TYRP1*, *PMEL*, *SLC45A2*, *SLC24A5*, *MLANA*, *OCA2* и т.д. и повышение уровня экспрессии *ASIP* [8, 106, 135]. Спектр дифференциально экспрессирующихся генов транскрипционных факторов и участников сигнальных путей довольно широкий. Так, у мучуаньской породы кур это гены семейства гомеобокс *HOXB9*, *HOXC8*, *HOXA9*, *HOXC9* и сигнального пути TGF- β : *BMP5* и *PITX2* [109]. У кур линии “Yufen I” в фолликулах полосатых и белых перьев отмечен разный уровень экспрессии *MC1R*, генов-участников сигнальных путей *WNT* и *SCF-KIT*, а также *MED23*, энхансера *MITF* [136].

Весьма интересные результаты получены при изучении экспрессии генов в фолликулах растущих перьев у двух подвигов серого юнко *Junco hyemalis*, которые различаются окраской оперения головы, спины и боков [106]. Сравнение профилей экспрессии генов в фолликулах перьев из головы и спины птиц показало, что в регуляцию окраски оперения вовлечены *WNT* и *HOX* гены, которые с той же вероятностью могут регулировать и морфогенез пера, учитывая, что не только цвет, но строение и форма пера из этих участков различаются. Сравнение профилей экспрессии генов между подвидами выявило дифференциальную экспрессию генов *ASIP*, *HAND2*, *MFSD12*, *KCNJ13*. Ген *HAND2* кодирует транскрипционный фактор, активатор экспрессии гена *SHH* (sonic hedgehog), ключевого регулятора органогенеза и сегментации у эукариот. Продукт гена *KCNJ13* — калиевый канал, который модулирует взаимодействие между пигментными клетками, ген *MFSD12* кодирует ингибитор эумеланогенеза. Также показано, что окраска пера серого юнко зависит еще и от распределения меланосом в разных частях пера: стержне, бородках и бородочках, которое может менять окраску пера от светло-коричневой до черной при одинаковом содержании меланина. Поэтому различия в окраске оперения достигаются не только путем регуляции сигнальных путей или отдельных генов меланогенеза, но и с помощью модуляции распределения пигментов в пере. На роль регулятора дифференциального депонирования меланосом в разных частях растущего пера по мнению авторов может претендовать ген *HAND2* [106].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На начальном этапе молекулярно-генетические исследования меланиновой окраски оперения птиц проводились путем анализа изменчивости генов-кандидатов, идентифицированных на модельных видах млекопитающих. Сопоставление обнаруженных генетических полиморфизмов в генах-

кандидатах с мутантными фенотипами позволило уточнить роль конкретных генов в формировании окраски оперения и выявить функциональные мутации. Таким образом была выяснена роль таких генов как *ASIP*, *MC1R*, *EDNRB*, *MITF* и т.д. [10, 34, 53, 60, 81, 83]. Однако функциональные исследования генетических основ окраски оперения проводились главным образом на домашних модельных видах птиц, таких как курица [11, 58, 82], утка [12, 40] и перепел [10, 59]. К тому же все большее число работ демонстрировало, что генетический полиморфизм генов-кандидатов не может объяснить фенотипическую изменчивость многих признаков окраски оперения [75–78, 137, 138]. Было показано, что несинонимичные замены, делеции, инсерции в кодирующих и некодирующих участках генов-кандидатов приводят к изменению окраски всего тела птицы, например к меланизму [53, 56, 58–62, 68, 84], альбинизму [35, 40, 87, 91], общему осветлению за счет снижения или нарушения синтеза феомеланина и/или эумеланина [47, 48, 81, 85, 94–96, 100, 109, 110, 112–114], крапчатой окраске оперения [10, 11, 118] и за редкими исключениями [131] никак не связаны с пигментацией отдельных участков тела птицы, т.е. с рисунком оперения.

Развитие методов полногеномного и транскриптомного секвенирования дало возможность заглянуть в неисследованные ранее области генома, идентифицировать новые локусы, ассоциированные с меланиновой окраской оперения, установить роль известных ранее генов и различных комбинаций их аллелей, а также изучить пространственно-временную организацию экспрессии генов под контролем транскрипционных факторов и эпигенетических изменений не только у модельных видов, но и в природных популяциях немодельных видов птиц. В частности, полногеномные и транскриптомные исследования показали, что в формировании окраски оперения важнейшую роль играют регуляторные гены. Так, рисунок оперения определяют не структурные гены, мутации в которых лишь нарушают общую схему реализации программы окраски, а регуляторные, осуществляющие пространственно-временную модуляцию сигнальных путей меланогенеза или экспрессии определенных генов [8, 106, 107, 121, 126–130, 132]. Однако результаты полногеномных и транскриптомных исследований сами по себе не полны и должны подкрепляться изучением функциональной роли выявленных участков геномов, ассоциированных с окраской оперения. С этой целью проводят сравнение с референсными или эталонными геномами близкородственных модельных видов. К сожалению, на настоящий момент референсные геномы доступны лишь для небольшого числа видов птиц. Также в выяснении функциональной роли участков генома может помочь применение таких подхо-

дов как CRISP/Cas9 и трансфекция культур клеток [139].

Учитывая полигенную природу наследования большинства признаков меланиновой окраски оперения, ясно, что на них могут влиять сразу несколько десятков локусов или даже несколько полигенных систем, включая системы генов-модификаторов и генов-регуляторов. Количественная изменчивость признаков окраски оперения ставит перед исследователями сложнейшую задачу выявления всех полигенов. Однако многие из них оказывают настолько минорный эффект, что ими, казалось бы, можно пренебречь. Но вкуче множество локусов со слабым фенотипическим эффектом контролирует порой значительную часть наследуемой изменчивости признаков окраски оперения [140]. Иногда идентифицированные с помощью картирования генома локусы большого эффекта объясняют лишь меньшую часть наследуемой изменчивости [141] или вообще отсутствуют [142]. Картирование локусов малого эффекта представляет собой пока крайне сложную задачу для исследователей из-за слабой фенотипической выраженности и низкой частоты каузативных вариантов (менее 5%) [139]. Поэтому невозможность обнаружить локусы, слабо влияющие на признак, не говоря уже об их аллельном разнообразии, степени эффекта и взаимодействия, является на данный момент одним из ограничений для полного понимания генетической архитектуры количественных признаков окраски оперения у птиц.

Важную роль в формировании окраски оперения играют и средовые факторы, которые также определяют скорее непрерывные, чем дискретные, различия между особями, а также гормональная регуляция, состояние здоровья птиц [143]. Нельзя также забывать о действии отбора на другие генетически коррелированные признаки. Сложность представляет и тот факт, что сходные фенотипы могут контролироваться различными генами, тогда как аллельные варианты одного и того же гена могут приводить к полиморфизму окраски оперения. Однако, несмотря на множество трудностей, стоящих перед исследователями, изучение молекулярно-генетических основ меланиновой окраски оперения привело к идентификации множества генов и пониманию процессов их взаимодействий друг с другом. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят лучше понять процессы формирования многочисленных признаков расцветки и рисунка оперения птиц, лежащих в основе индивидуальных, межпопуляционных и межвидовых различий.

Автор искренне благодарен Ю.Н. Журавлеву, С.В. Шедько и М.В. Павленко, прочитавшим статью в рукописи, за их ценные критические замечания и советы.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hill G.E., McGraw K.J. (Eds.) Bird Coloration. Mechanisms and Measurements. Boston, MA: Harvard Univ. Press, 2006. V. I. 640 p.
2. Galván I., García-Campa J., Negro J.J. Complex plumage patterns can be produced only with the contribution of melanins // *Physiol. Biochem. Zool.* 2017. V. 90. № 5. P. 600–604. <https://doi.org/10.1086/693962>
3. Krishnaswamy A., Baranoski G.V.G. A biophysically-based spectral model of light interaction with human skin // *Eurographics.* 2004. V. 23. № 3. P. 331–340. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8659.2004.00764.x>
4. Videira I.F., Moura D.F., Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis // *An. Bras. Dermatol.* 2013. V. 88. № 1. P. 76–83. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962013000100009>
5. Pillaiyar T., Manickam M., Jung S.H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis // *Cell. Signal.* 2017. V. 40. P. 99–115. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.09.004>
6. Serre C., Busuttill V., Botto J.M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation // *Int. J. Cosmet. Sci.* 2018. V. 40. № 4. P. 328–347. <https://doi.org/10.1111/ics.12466>
7. Emaresi G., Ducrest A.-L., Bize P. et al. Pleiotropy in the melanocortin system: Expression levels of this system are associated with melanogenesis and pigmentation in the tawny owl (*Strix aluco*) // *Mol. Ecol.* 2013. V. 22. № 19. P. 4915–4930. <https://doi.org/10.1111/mec.12438>
8. Liu X., Zhou R., Peng Y. et al. Feather follicles transcriptome profiles in Bashang long-tailed chickens with different plumage colors // *Genes & Genomics.* 2019. V. 41. № 11. P. 1357–1367. <https://doi.org/10.1007/s13258-018-0740-y>
9. Natafa V., Amemiyab A., Yanagisawab M., Le Douarin N.M. The expression pattern of endothelin 3 in the avian embryo // *Mech. Dev.* 1998. V. 73. № 2. P. 217–220.
10. Miwa M., Inoue-Murayama M., Aoki H. et al. Endothelin receptor B2 (EDNRB2) is associated with the panda plumage colour mutation in Japanese quail // *Anim. Genet.* 2007. V. 38. № 2. P. 103–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01568.x>
11. Kinoshita K., Akiyama T., Mizutani M. et al. Endothelin receptor B2 (EDNRB2) is responsible for the tyrosinase-independent recessive white (mo(w)) and mottled (mo) plumage phenotypes in the chicken // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 1: e86361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086361>
12. Li L., Li D., Liu L. et al. Endothelin receptor B2 (EDNRB2) gene is associated with spot plumage pattern in domestic ducks (*Anas platyrhynchos*) // *PLoS*

- One. 2015. V. 10. № 5: e0125883.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125883>
13. Jin E.J., Erickson C.A., Takada S., Burrus L.W. Wnt and BMP signaling govern lineage segregation of melanocytes in the avian embryo // *Dev. Biol.* 2001. V. 233. № 1. P. 22–37.
<https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0222>
 14. Dunn K.J., Brady M., Jambor C.O. et al. WNT1 and WNT3a promote expansion of melanocytes through distinct modes of action // *Pigment Cell Res.* 2005. V. 18. № 3. P. 167–180.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00226.x>
 15. Chang C.H., Tsai R.K., Tsai M.H. et al. The roles of Frizzled-3 and Wnt3a on melanocyte development: In vitro studies on neural crest cells and melanocyte precursor cell lines // *J. Dermatol. Sci.* 2014. V. 75. № 2. P. 100–108.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.04.012>
 16. Takeda K., Yasumoto K., Takada R. et al. Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 19. P. 14013–14016.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C000113200>
 17. Ashman L.K. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999. V. 31. № 10. P. 1037–1051.
[https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00076-x](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00076-x)
 18. Hou L., Panthier J.J., Arnheiter H. Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF // *Development.* 2000. V. 127. № 4. P. 5379–5389.
 19. Imokawa G., Kobayashi T., Miyagishi M. Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes: Cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 43. P. 33321–33328.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M004346200>
 20. Nordlund J.J., Boissy R.E., Hearing V.J. (Eds.). *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Publ. Ltd., 2006. 1228 p.
 21. Roulin A., Ducrest A.L. Genetics of colouration in birds // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2013. V. 24. № 6–7. P. 594–608.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.05.005>
 22. McCallion A.S., Chakravarti A. EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease type II // *Pigment Cell Res.* 2001. V. 14. № 3. P. 161–169.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2001.140305.x>
 23. Matsushima Y., Shinkai Y., Kobayashi Y. et al. A mouse model of Waardenburg syndrome type 4 with a new spontaneous mutation of the endothelin-B receptor gene // *Mamm. Genome.* 2002. V. 13. № 1. P. 30–35.
<https://doi.org/10.1007/s00335-001-3038-2>
 24. Xi Y., Wang L., Liu H. et al. A 14-bp insertion in endothelin receptor B-like (EDNRB2) is associated with white plumage in Chinese geese // *BMC Genomics.* 2020. V. 21. № 1. 162.
<https://doi.org/10.1186/s12864-020-6562-8>
 25. Hertwig P. Neue Mutationen und Kopplungsgruppen bei der Hausmaus // *Z. Indukt. Abstamm. Vererbungsl.* 1942. V. 80. P. 220–246.
 26. Hodgkinson C.A., Moore K.J., Nakayama A. et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein // *Cell.* 1993. V. 74. № 2. P. 395–404.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90429-t](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90429-t)
 27. Goding C.R., Arnheiter H. MITF—the first 25 years // *Genes Dev.* 2019. V. 33. № 15–16. P. 983–1007.
<https://doi.org/10.1101/gad.324657.119>
 28. Shibahara S., Takeda K., Yasumoto K. et al. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation // *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2001. V. 6. № 1. P. 99–104.
<https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00010.x>
 29. Cheli Y., Ohanna M., Ballotti R., Bertolotto C. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes // *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010. V. 23. № 1. P. 27–40.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00653.x>
 30. Thomas A.J., Erickson C.A. The making of a melanocyte: The specification of melanoblasts from the neural crest // *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008. V. 21. № 6. P. 598–610.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00506.x>
 31. Li Y., Zhu X., Yang L. et al. Expression and network analysis of genes related to melanocyte development in the Silky Fowl and White Leghorn embryos // *Mol. Biol. Rep.* 2011. V. 38. № 2. P. 1433–1441.
<https://doi.org/10.1007/s11033-010-0248-2>
 32. Wu C.C., Klaesson A., Buskas J. et al. In situ quantification of individual mRNA transcripts in melanocytes discloses gene regulation of relevance to speciation // *J. Exp. Biol.* 2019. V. 222. № 5: jeb194431.
<https://doi.org/10.1242/jeb.194431>
 33. Mochii M., Mazaki Y., Mizuno N. et al. Role of Mitf in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell // *Dev. Biol.* 1998. V. 193. № 1. P. 47–62.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8800>
 34. Kawaguchi N., Ono T., Mochii M., Noda M. Spontaneous mutation in Mitf gene causes osteopetrosis in silver homozygote quail // *Dev. Dyn.* 2001. V. 220. № 2. P. 133–140.
[https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999<::AID-DVDY1095>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1095>3.0.CO;2-7)
 35. Minvielle F., Bed'hom B., Coville J.L. et al. The “silver” Japanese quail and the MITF gene: Causal mutation, associated traits and homology with the “blue” chicken plumage // *BMC Genet.* 2010. V. 11:15.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-15>
 36. Wang Y., Li S.-M., Huang J. et al. Mutations of TYR and MITF genes are associated with plumage colour phenotypes in geese // *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2014. V. 27. № 6. P. 778–783.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13350>
 37. Sultana H., Seo D., Choi N.R. et al. Identification of polymorphisms in MITF and DCT genes and their associations with plumage colors in Asian duck breeds // *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2018. V. 31. № 2. P. 180–188.
<https://doi.org/10.5713/ajas.17.0298>

38. Yang L., Mo C., Shen W. et al. The recessive C locus in the MITF gene plays a key regulatory role in the plumage colour pattern of duck (*Anas platyrhynchos*) // Br. Poult. Sci. 2019. V. 60. № 2. P. 105–108. <https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1564237>
39. Lin R., Lin W., Zhou S. et al. Integrated analysis of mRNA expression, CpG island methylation, and polymorphisms in the MITF gene in ducks (*Anas platyrhynchos*) // Biomed. Res. Int. 2019:8512467. <https://doi.org/10.1155/2019/8512467>
40. Zhou Z., Li M., Cheng H. et al. An intercross population study reveals genes associated with body size and plumage color in ducks // Nat. Commun. 2018. V. 9. № 1: 2648. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04868-4>
41. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond // Nat. Rev. Genet. 2012. V. 13. № 7. P. 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
42. Kubic J.D., Young K.P., Plummer R.S. et al. Pigmentation PAX-ways: The role of Pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease // Pigment Cell Melanoma Res. 2008. V. 21. № 6. P. 627–645. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00514.x>
43. Otreba M., Miliński M., Buszman E. et al. Hereditary hypomelanocytoses: the role of PAX3, SOX10, MITF, SNAI2, KIT, EDN3 and EDNRB genes // Postepy Hig. Med. Dosw. 2013. V. 67. P. 1109–1118. <https://doi.org/10.5604/17322693.1077722>
44. Chalepakis G., Goulding M., Read A. et al. Molecular basis of splotch and Waardenburg Pax-3 mutations // PNAS. 1994. V. 91. № 9. P. 3685–3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3685>
45. Ohno T., Maegawa T., Katoh H. et al. A new missense mutation in the paired domain of the mouse Pax3 gene // Exp. Anim. 2017. V. 66. № 3. P. 245–250. <https://doi.org/10.1538/expanim.17-0013>
46. Wegner M. Secrets to a healthy Sox life: lessons for melanocytes // Pigment Cell Res. 2005. V. 18. № 2. P. 74–85. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00218.x>
47. Gunnarsson U., Kerje S., Bed'hom B. et al. The Dark brown plumage color in chickens is caused by an 8.3-kb deletion upstream of SOX10 // Pigment Cell Melanoma Res. 2011. V. 24. № 2. P. 268–274. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00825.x>
48. Domyan E.T., Guernsey M.W., Kronenberg Z. et al. Epistatic and combinatorial effects of pigmentary gene mutations in the domestic pigeon // Curr. Biol. 2014. V. 24. № 4. P. 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.020>
49. Domyan E.T., Hardy J., Wright T. et al. SOX10 regulates multiple genes to direct eumelanin versus pheomelanin production in domestic rock pigeon // Pigment Cell Melanoma Res. 2019. V. 32. № 5. P. 634–642. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12778>
50. Cone R.D., Lu D., Koppula S. et al. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation // Recent Prog. Horm. Res. 1996. V. 51. P. 287–317.
51. Smith A.G., Box N.F., Marks L.H. et al. The human melanocortin-1 receptor locus: Analysis of transcription unit, locus polymorphism and haplotype evolution // Gene. 2001. V. 281. № 1–2. P. 81–94. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00791-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00791-0)
52. Katritch V., Cherezov V., Stevens R.C. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2013. V. 53. P. 531–556. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>
53. Mundy N.I., Badcock N.S., Hart T. et al. Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice // Science. 2004. V. 303. № 5665. P. 1870–1873. <https://doi.org/10.1126/science.1093834>
54. Mundy N.I. A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds // Proc. Biol. Sci. 2005. V. 272. № 1573. P. 1633–1640. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3107>
55. Dessinioti C., Antoniou C., Katsambas A., Stratigos A.J. Melanocortin 1 receptor variants: functional role and pigmentary associations // Photochem. Photobiol. 2011. V. 87. № 5. P. 978–987. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00970.x>
56. Baião P.C., Schreiber E., Parker P.G. The genetic basis of the plumage polymorphism in red-footed boobies (*Sula sula*): A melanocortin-1 receptor (MC1R) analysis // J. Hered. 2007. V. 98. № 4. P. 287–292. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm030>
57. Guernsey M.W., Ritscher L., Miller M.A. et al. A Val85Met mutation in melanocortin-1 receptor is associated with reductions in eumelanin pigmentation and cell surface expression in domestic rock pigeons (*Columba livia*) // PLoS One. 2013. V. 8. № 8: e74475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074475>
58. Kerje S., Lind J., Schütz K. Melanocortin 1-receptor (MC1R) mutations are associated with plumage colour in chicken // Anim. Genet. 2003. V. 34. № 4. P. 241–248. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.00991.x>
59. Nadeau N.J., Minvielle F., Mundy N.I. Association of a Glu92Lys substitution in MC1R with extended brown in Japanese quail (*Coturnix japonica*) // Anim. Genet. 2006. V. 37. № 3. P. 287–289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2006.01442.x>
60. Theron E., Hawkins K., Bermingham E. et al. The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: A melanocortin-1-receptor point mutation is perfectly associated with the melanic plumage morph of the bananaquit, *Coereba flaveola* // Curr. Biol. 2001. V. 11. № 8. P. 550–557. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00158-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00158-0)
61. Cibois A., Thibault J.-C., Pasquet E. The molecular basis of the plumage colour polymorphism in the Tahiti reed-warbler *Acrocephalus caffer* // J. Avian Biol. 2012. V. 43. № 1. P. 3–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2011.05546.x>
62. Kageyama M., Takenouchi A., Kinoshita K. et al. The “Extended Brown” plumage color mutant of blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*) is associated with a mutation in the melanocortin 1-receptor gene

- (MC1R) // J. Poult. Sci. 2018. V. 55. № 4. P. 233–238. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0180006>
63. Pointer M.A., Mundy N.I. Testing whether macroevolution follows microevolution: Are colour differences among swans (*Cygnus*) attributable to variation at the MC1R locus? // BMC Evol. Biol. 2008. V. 8:249. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-249>
64. Gangoso L., Grande J.M., Ducrest A.L. et al. MC1R-dependent, melanin-based colour polymorphism is associated with cell-mediated response in the Eleonora's falcon // J. Evol. Biol. 2011. V. 24. № 9. P. 2055–2063. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02336.x>
65. Uy J.A., Moyle R.G., Filardi C.E., Cheviron Z.A. Difference in plumage color used in species recognition between incipient species is linked to a single amino acid substitution in the melanocortin-1 receptor // Am. Nat. 2009. V. 174. № 2. P. 244–254. <https://doi.org/10.1086/600084>
66. San-Jose L.M., Ducrest A.L., Ducret V. et al. Effect of the MC1R gene on sexual dimorphism in melanin-based colorations // Mol. Ecol. 2015. V. 24. № 11. P. 2794–2808. <https://doi.org/10.1111/mec.13193>
67. San-Jose L.M., Ducrest A.L., Ducret V. et al. MC1R variants affect the expression of melanocortin and melanogenic genes and the association between melanocortin genes and coloration // Mol. Ecol. 2017. V. 26. № 1. P. 259–276. <https://doi.org/10.1111/mec.13861>
68. Yu W., Wang C., Xin Q. et al. Non-synonymous SNPs in MC1R gene are associated with the extended black variant in domestic ducks (*Anas platyrhynchos*) // Anim. Genet. 2013. V. 44. № 2. P. 214–216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2012.02377.x>
69. Sultana H., Seo D.W., Park H.B. et al. Identification of MC1R SNPs and their association with plumage colors in Asian duck // J. Poult. Sci. 2017. V. 54. № 2. P. 111–120. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12581>
70. Johnson J.A., Ambers A.D., Burnham K.K. Genetics of plumage color in the Gyr falcon (*Falco rusticolus*): Analysis of the melanocortin-1 receptor gene // J. Hered. 2012. V. 103. № 3. P. 315–321. <https://doi.org/10.1093/jhered/ess023>
71. Bam S., Hart L., Willows-Munro S. Mc1r genotype and plumage colouration in highly polymorphic jackal buzzards, *Buteo rufofuscus* // Afr. Zool. 2019. V. 54. № 4. P. 239–242. <https://doi.org/10.1080/15627020.2019.1658539>
72. Bourgeois Y.X., Bertrand J.A., Thébaud C., Milá B. Investigating the role of the melanocortin-1 receptor gene in an extreme case of microgeographical variation in the pattern of melanin-based plumage pigmentation // PLoS One. 2012. V. 7. № 12: e50906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050906>
73. Vieira S.N., Araripe J., Aleixo A., do Rêgo P.S. Plumage polymorphism and variation in the melanocortin-1 receptor gene in the Fuscous Flycatcher, *Cnemotriccus fuscatus* (Wied, 1831) // Rev. Bras. Ornit. 2018. V. 26. P. 251–257. <https://doi.org/10.1007/BF03544439>
74. Ling M.K., Lagerström M.C., Fredriksson R. et al. Association of feather colour with constitutively active melanocortin 1 receptors in chicken // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. № 7. P. 1441–1449. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03506.x>
75. Dobson A.E., Schmidt D.J., Hughes J.M. Sequence variation in the melanocortin-1 receptor (MC1R) does not explain continent-wide plumage color differences in the Australian Magpie (*Cracticus tibicen*) // J. Hered. 2012. V. 103. № 6. P. 769–780. <https://doi.org/10.1093/jhered/ess053>
76. Luna L.W., Silva W., Araripe J. et al. Mutations in the melanocortin-1 receptor (MC1R) gene have no influence on the distinct patterns of melanic plumage found in the manakins of the genus *Antilophia* (Aves: Pipridae) // An. Acad. Bras. Cienc. 2018. V. 90. № 3. P. 2873–2879. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820171003>
77. Derelle R., Kondrashov F.A., Arkhipov V.Y. et al. Color differences among feral pigeons (*Columba livia*) are not attributable to sequence variation in the coding region of the melanocortin-1 receptor gene (MC1R) // BMC Res. Notes. 2013. V. 6. № 1: 310. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-310>
78. Cheviron Z.A., Hackett S.J., Brumfield R.T. Sequence variation in the coding region of the melanocortin-1 receptor gene (MC1R) is not associated with plumage variation in the blue-crowned manakin (*Lepidothrix coronata*) // Proc. Biol. Sci. 2006. V. 273. № 1594. P. 1613–1618. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3499>
79. Neumann Andersen G., Nagaeva O., Mandrika I. et al. MC₁ receptors are constitutively expressed on leucocyte subpopulations with antigen presenting and cytotoxic functions // Clin. Exp. Immunol. 2001. V. 126. № 3. P. 441–446. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01604.x>
80. Yoshihara C., Fukao A., Ando K. et al. Elaborate color patterns of individual chicken feathers may be formed by the agouti signaling protein // Gen. Comp. Endocrinol. 2012. V. 175. № 3. P. 495–499. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.12.009>
81. Nadeau N.J., Minvielle F., Ito S. et al. Characterization of Japanese quail yellow as a genomic deletion upstream of the avian homolog of the mammalian ASIP (agouti) gene // Genetics. 2008. V. 178. № 2. P. 777–786. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.077073>
82. Oribe E., Fukao A., Yoshihara C. et al. Conserved distal promoter of the agouti signaling protein (ASIP) gene controls sexual dichromatism in chickens // Gen. Comp. Endocrinol. 2012. V. 177. № 2. P. 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.04.016>
83. Hiragaki T., Inoue-Murayama M., Miwa M. et al. Recessive black is allelic to the yellow plumage locus in Japanese quail and associated with a frameshift deletion in the ASIP gene // Genetics. 2008. V. 178. № 2. P. 771–775. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.077040>
84. Uy J.A., Cooper E.A., Cutie S. et al. Mutations in different pigmentation genes are associated with parallel melanism in island flycatchers // Proc. Biol. Sci. 2016.

- V. 283. № 1834: 20160731.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0731>
85. Robic A., Morisson M., Leroux S. et al. Two new structural mutations in the 5' region of the ASIP gene cause diluted feather color phenotypes in Japanese quail // Genet. Sel. Evol. 2019. V. 51. № 1: 12.
<https://doi.org/10.1186/s12711-019-0458-6>
 86. Yang J., Liu X., Zhang J. et al. Molecular cloning and biochemical analysis of tyrosinase from the Crested Ibis in China // Biochem. Genet. 2012. V. 50. № 11–12. P. 936–945.
<https://doi.org/10.1007/s10528-012-9533-1>
 87. Chang C.M., Coville J.L., Coquerelle G. et al. Complete association between a retroviral insertion in the tyrosinase gene and the recessive white mutation in chickens // BMC Genomics. 2006. V. 7:19.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-19>
 88. Yu S., Liao J., Tang M.A. functional single nucleotide polymorphism in the tyrosinase gene promoter affects skin color and transcription activity in the black-boned chicken // Poult. Sci. 2017. V. 96. № 11. P. 4061–4067.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex217>
 89. Xu Y., Zhang X.H., Pang Y.Z. Association of tyrosinase (TYR) and tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) with melanic plumage color in Korean Quails (*Coturnix coturnix*) // Asian-Australas. J. Anim. Sci. 2013. V. 26. № 11. P. 1518–1522.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13162>
 90. Li S., Wang C., Yu W. et al. Identification of genes related to white and black plumage formation by RNA-Seq from white and black feather bulbs in ducks // PLoS One. 2012. V. 7. № 5: e36592.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036592>
 91. Tobita-Teramoto T., Jang G.Y., Kino K. et al. Autosomal albino chicken mutation (ca/ca) deletes hexanucleotide (-deltaGACTGG817) at a copper-binding site of the tyrosinase gene // Poult. Sci. 2000. V. 79. № 1. P. 46–50.
<https://doi.org/10.1093/ps/79.1.46>
 92. Yu S., Wang G., Liao J., Tang M. Five alternative splicing variants of the TYR gene and their different roles in melanogenesis in the Muchuan black-boned chicken // Br. Poult. Sci. 2019. V. 60. № 1. P. 8–14.
<https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1533633>
 93. Liang Z., Wang C., Yu H. et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of duck tyrosinase-related protein-1 // J. Anim. Vet. Adv. 2010. V. 9. № 16. P. 2102–2108.
<https://doi.org/10.3923/javaa.2010.2102.2108>
 94. Nadeau N.J., Mundy N.I., Gourichon D. et al. Association of a single-nucleotide substitution in TYRP1 with roux in Japanese quail (*Coturnix japonica*) // Anim. Genet. 2007. V. 38. № 6. P. 609–613.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01667.x>
 95. Li J., Bed'hom B., Marthey S. et al. A missense mutation in TYRP1 causes the chocolate plumage color in chicken and alters melanosome structure // Pigment Cell Melanoma Res. 2019. V. 32. № 3. P. 381–390.
<https://doi.org/10.1111/pcmr.12753>
 96. Cortimiglia C., Castiglioni B., Pizzi F. et al. Involvement of tyrosinase-related protein 1 gene in the light brown plumage phenotype of *Falco cherrug* // Anim. Genet. 2017. V. 48. № 1. P. 125–126.
<https://doi.org/10.1111/age.12506>
 97. Zhang X.D., Wang H.H., Zhang C.X. et al. Analysis of skin color change and related gene expression after crossing of Dongxiang black chicken and ISA layer // Genet. Mol. Res. 2015. V. 14. № 3. P. 11551–11561.
<https://doi.org/10.4238/2015>
 98. Costin G.E., Valencia J.C., Vieira W.D. et al. Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4 // J. Cell Sci. 2003. V. 116. № 15. P. 3203–3212.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00598>
 99. Dooley C., Schwarz H., Mueller K. et al. Slc45a2 and V-ATPase are regulators of melanosomal pH homeostasis in zebrafish, providing a mechanism for human pigment evolution and disease // Pigment Cell Melanoma Res. 2013. V. 26. № 2. P. 205–217.
<https://doi.org/10.1111/pcmr.12053>
 100. Gunnarsson U., Hellström A.R., Tixier-Boichard M. et al. Mutations in SLC45A2 cause plumage color variation in chicken and Japanese quail // Genetics. 2007. V. 175. № 2. P. 867–877.
<https://doi.org/10.1534/genetics.106.063107>
 101. Xu X., Dong G.X., Schmidt-Küntzel A. et al. The genetics of tiger pelage color variations // Cell Res. 2017. V. 27. № 7. P. 954–957.
<https://doi.org/10.1038/cr.2017.32>
 102. Galván I., Inácio Â., Romero-Haro A.A., Alonso-Alvarez C. Adaptive downregulation of pheomelanin-related SLC7A11 gene expression by environmentally induced oxidative stress // Mol. Ecol. 2017. V. 26. № 3. P. 849–858.
<https://doi.org/10.1111/mec.13952>
 103. Rodríguez-Martínez S., Márquez R., Inácio Â., Galván I. Changes in melanocyte RNA and DNA methylation favour pheomelanin synthesis and may avoid systemic oxidative stress after dietary cysteine supplementation in birds // Mol. Ecol. 2019. V. 28. № 5. P. 1030–1042.
<https://doi.org/10.1111/mec.15024>
 104. Liu X.F., Luo J., Hu X.X. et al. Repression of Slc24a5 can reduce pigmentation in chicken // Front. Biosci. 2011. V. 3. № 1. P. 158–165.
<https://doi.org/10.2741/e229>
 105. Bellono N.W., Escobar I.E., Lefkovith A.J. et al. An intracellular anion channel critical for pigmentation // Elife. 2014. V. 3: e04543.
<https://doi.org/10.7554/eLife.04543>
 106. Abolins-Abols M., Kornobis E., Ribeca P. et al. Differential gene regulation underlies variation in melanic plumage coloration in the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*) // Mol. Ecol. 2018. V. 27. № 22. P. 4501–4515.
<https://doi.org/10.1111/mec.14878>
 107. Yu S., Wang G., Liao J. et al. Transcriptome profile analysis of mechanisms of black and white plumage determination in black-bone chicken // Cell. Physiol. Biochem. 2018. V. 46. № 6. P. 2373–2384.
<https://doi.org/10.1159/000489644>
 108. Theos A.C., Truschel S.T., Raposo G., Marks M.S. The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: con-

- reoversial in name and function // *Pigment Cell Res.* 2005. V. 18. № 5. P. 322–336.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00269.x>
109. Kerje S., Sharma P., Gunnarsson U. et al. The Dominant white, Dun and Smoky color variants in chicken are associated with insertion/deletion polymorphisms in the PMEL17 gene // *Genetics.* 2004. V. 168. № 3. P. 1507–1518.
<https://doi.org/10.1534/genetics.104.027995>
110. Ishishita S., Takahashi M., Yamaguchi K. et al. Non-sense mutation in PMEL is associated with yellowish plumage colour phenotype in Japanese quail // *Sci. Rep.* 2018. V. 8:16732.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34827-4>
111. Karlsson A.C., Kerje S., Andersson L., Jensen P. Genotype at the PMEL17 locus affects social and explorative behaviour in chickens // *Br. Poult. Sci.* 2010. V. 51. № 2. P. 170–177.
<https://doi.org/10.1080/00071661003745802>
112. Mayerson P.L., Brumbaugh J.A. Lavender, a chick melanocyte mutant with defective melanosome translocation: A possible role for 10 nm filaments and microfilaments but not microtubules // *J. Cell Sci.* 1981. V. 51. P. 25–51.
113. Minvielle F., Gourichon D., Monvoisin J.L. Testing homology of loci for two plumage colors, “lavender” and “recessive white,” with chicken and Japanese quail hybrids // *J. Hered.* 2002. V. 93. № 1. P. 73–76.
<https://doi.org/10.1093/jhered/93.1.73>
114. Vaez M., Follett S.A., Bed'hom B. et al. A single point-mutation within the melanophilin gene causes the lavender plumage colour dilution phenotype in the chicken // *BMC Genet.* 2008. V. 9: 7.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-7>
115. Bed'hom B., Vaez M., Coville J.L. et al. The lavender plumage colour in Japanese quail is associated with a complex mutation in the region of MLPD that is related to differences in growth, feed consumption and body temperature // *BMC Genomics.* 2012. V. 13: 442.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-442>
116. Lin S.J., Foley J., Jiang T.X. et al. Topology of feather melanocyte progenitor niche allows complex pigment patterns to emerge // *Science.* 2013. V. 340. № 6139. P. 1442–1446.
<https://doi.org/10.1126/science.1230374>
117. Oh J.W., Lin S.J., Plikus M.V. Regenerative metamorphosis in hairs and feathers: Follicle as a programmable biological printer // *Exp. Dermatol.* 2015. V. 24. № 4. P. 262–264.
<https://doi.org/10.1111/exd.12627>
118. Schwochow Thalmann D., Ring H., Sundström E. et al. The evolution of Sex-linked barring alleles in chickens involves both regulatory and coding changes in CDKN2A // *PLoS Genet.* 2017. V. 13. № 4:e1006665.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006665>
119. Haupaix N., Curantz C., Bailleul R. et al. The periodic coloration in birds forms through a prepattern of somite origin // *Science.* 2018. V. 361. № 6408: eaar4777.
<https://doi.org/10.1126/science.aar4777>
120. Inaba M., Jiang T.X., Liang Y.C. et al. Instructive role of melanocytes during pigment pattern formation of the avian skin // *PNAS.* 2019. V. 116. № 14. P. 6884–6890.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1816107116>
121. Gluckman T.L., Mundy N.I. The differential expression of MC1R regulators in dorsal and ventral quail plumages during embryogenesis: Implications for plumage pattern formation // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 3: e0174714.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174714>
122. Wang S., Rohwer S., de Zwaan D.R. et al. Selection on a pleiotropic color gene block underpins early differentiation between two warbler species // *bioRxiv.* 2019. 853390.
<https://doi.org/10.1101/853390>
123. Poelstra J.W., Vijay N., Bossu C.M. et al. The genomic landscape underlying phenotypic integrity in the face of gene flow in crows // *Science.* 2014. V. 344. № 6190. P. 1410–1414.
<https://doi.org/10.1126/science.1253226>
124. Mao H., Wang X., Fan Y. et al. Whole-genome SNP data unravel population structure and signatures of selection for black plumage of indigenous chicken breeds from Jiangxi province, China // *Anim. Genet.* 2019. V. 50. № 5. P. 475–483.
<https://doi.org/10.1111/age.12827>
125. Knief U., Bossu C.M., Saino N. et al. Epistatic mutations under divergent selection govern phenotypic variation in the crow hybrid zone // *Nat. Ecol. Evol.* 2019. V. 3. № 4. P. 570–576.
<https://doi.org/10.1038/s41559-019-0847-9>
126. Toews D.P., Taylor S.A., Vallender R. et al. Plumage genes and little else distinguish the genomes of hybridizing warblers // *Curr. Biol.* 2016. V. 26. № 17. P. 2313–2318.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.034>
127. Bourgeois Y.X., Delahaie B., Gautier M. et al. A novel locus on chromosome 1 underlies the evolution of a melanic plumage polymorphism in a wild songbird // *R. Soc. Open Sci.* 2017. V. 4. № 2: 160805.
<https://doi.org/10.1098/rsos.160805>
128. Campagna L., Repenning M., Silveira L.F. et al. Repeated divergent selection on pigmentation genes in a rapid finch radiation // *Sci. Adv.* 2017. V. 3. № 5:e1602404.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1602404>
129. Toomey M.B., Marques C.I., Andrade P. et al. A non-coding region near Follistatin controls head colour polymorphism in the Gouldian finch // *Proc. Biol. Sci.* 2018. V. 285. № 1888: 20181788.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1788>
130. Kim K.W., Jackson B.C., Zhang H. et al. Genetics and evidence for balancing selection of a sex-linked colour polymorphism in a songbird // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1: 1852.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09806-6>
131. Vickrey A.I., Bruders R., Kronenberg Z. et al. Introgression of regulatory alleles and a missense coding mutation drive plumage pattern diversity in the rock pigeon // *Elife.* 2018. V. 7: e34803.
<https://doi.org/10.7554/eLife.34803>
132. Stryjewski K.F., Sorenson M.D. Mosaic genome evolution in a recent and rapid avian radiation // *Nat. Ecol.*

- Evol. 2017. V. 1. № 12. P. 1912–1922.
<https://doi.org/10.1038/s41559-017-0364-7>
133. Lamichhaney S., Fan G., Widemo F. et al. Structural genomic changes underlie alternative reproductive strategies in the ruff (*Philomachus pugnax*) // Nat. Genet. 2016. V. 48. № 1. P. 84–88.
<https://doi.org/10.1038/ng.3430>
134. Tuttle E.M., Bergland A.O., Korody M.L. et al. Divergence and functional degradation of a sex chromosome-like supergene // Curr. Biol. 2016. V. 26. № 3. P. 344–350.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.069>
135. Poelstra J.W., Vijay N., Hoepfner M.P., Wolf J.B. Transcriptomics of colour patterning and coloration shifts in crows // Mol. Ecol. 2015. V. 24. № 18. P. 4617–4628.
<https://doi.org/10.1111/mec.13353>
136. Wang X., Li D., Song S. et al. Combined transcriptomics and proteomics forecast analysis for potential genes regulating the Columbian plumage color in chickens // PLoS One. 2019. V. 14. № 11: e0210850.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210850>
137. Skoglund P., Höglund J. Sequence polymorphism in candidate genes for differences in winter plumage between Scottish and Scandinavian Willow Grouse (*Lagopus lagopus*) // PLoS One. 2010. V. 5. № 4:e10334.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010334>
138. Bourgeois Y.X., Bertrand J.A., Delahaie B. et al. Candidate gene analysis suggests untapped genetic complexity in melanin-based pigmentation in birds // J. Hered. 2016. V. 107. № 4. P. 327–335.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esw017>
139. San-Jose L.M., Roulin A. Genomics of coloration in natural animal populations // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2017. V. 372. № 1724:20160337.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0337>
140. Mackay T.F. The genetic architecture of quantitative traits // Annu. Rev. Genet. 2001. V. 35. P. 303–339.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090633>
141. Dembeck L.M., Huang W., Magwire M.M. et al. Genetic architecture of abdominal pigmentation in *Drosophila melanogaster* // PLoS Genet. 2015. V. 11. № 5: e1005163.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005163>
142. Kardos M., Husby A., McFarlane S.E. et al. Whole-genome resequencing of extreme phenotypes in collared flycatchers highlights the difficulty of detecting quantitative trait loci in natural populations // Mol. Ecol. Resour. 2016. V. 16. № 3. P. 727–741.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12498>
143. Galván I., Solano F. Bird integumentary melanins: biosynthesis, forms, function and evolution // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 4:520.
<https://doi.org/10.3390/ijms17040520>

Molecular Mechanisms and Gene Regulation of Melanin Plumage Coloration in Birds

I. V. Kulikova*

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch,
 Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

*e-mail: Kulikova@biosoil.ru

Melanin plumage coloration is created by the distribution in the feather and ratio of two melanin pigments, eumelanin and pheomelanin. This review covers diverse aspects of melanogenesis, transport and deposition of melanins, and gene regulation of these and other numerous associated processes. Modern views on the functional role of candidate genes are presented and results of analysis of their variability in different bird species are described. Whole genome and transcriptome data used to study genetics of plumage color and pattern are reported.

Keywords: plumage coloration, melanin, melanogenesis, candidate genes, whole genome sequencing.

БЕЛКИ СИНАПТОНЕМНОГО КОМПЛЕКСА: УНИКАЛЬНОСТЬ ИЛИ УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ?

© 2021 г. Т. М. Гришаева¹, *, Ю. Ф. Богданов¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: grishaeva@vigg.ru

Поступила в редакцию 01.10.2020 г.

После доработки 27.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

Обязательным этапом мейоза является предварительное спаривание гомологичных хромосом. Оно происходит путем формирования синаптонемных комплексов (СК): белковые оси двух хромосом соединяются с помощью вспомогательных “белков центрального пространства”. Эти белки иногда видоспецифичны и служат предметом сравнительного исследования. С помощью методов биоинформатики мы изучили белки, структурирующие центральное пространство СК у животных и грибов. Мы установили, что белки Ecm11 и Gmc2 даже в пределах одного таксона грибов-аскомицетов мало консервативны. Белок SIX6OS1 мыши, подобно SYCE1–SYCE3 и TEX12 животных, умеренно консервативен только в пределах подтипа позвоночных, хотя эти белки (кроме SYCE3) встречаются и у беспозвоночных животных. Таким образом, подтверждается тезис о том, что наряду с общим набором мейотических белков каждая линия развития эукариот выработала свои белки для построения СК, имеющего общий план строения у всех эукариот.

Ключевые слова: мейоз, синаптонемный комплекс, белки, биоинформатика.

DOI: 10.31857/S0016675821080063

Мейоз – это специальный тип клеточного деления, в результате которого диплоидные половые клетки превращаются в гаплоидные гаметы. Сегрегация гаплоидных наборов хромосом происходит путем предварительного спаривания гомологичных хромосом и последующего точного расхождения гомологов с помощью веретена клеточного деления. У большинства эукариот для обеспечения этого процесса происходит формирование специальных белковых структур – синаптонемных комплексов (СК) [1, 2]. Каждый СК состоит из двух латеральных элементов – сформированных заранее хромосомных осей – и центрального пространства (ЦП) между ними. Как правило (у разных организмов по-разному), посередине центрального пространства выявляется продольный центральный элемент (ЦЭ). ЦП заполнено поперечными филаментами, простирающимися от каждого из двух латеральных элементов и соединяющимися наподобие зубцов застёжки–“молнии” [3]. ЦЭ образуется как линия контактов встречных зубцов застёжки. СК был открыт Мозесом в 1956 г. [4], однако первые белки в его составе были обнаружены значительно позже. Белки латеральных элементов и поперечных филаментов были выявлены, в основном, в прошлом веке (см. обзоры [1, 5]). Но существовал еще один класс белков, предсказанных Шмекель

и Данехолтом еще в 1995 г. [6]. Это так называемые пиллары – белки, скрепляющие поперечные филаменты и стабилизирующие структуру СК. Подобные белки начали выявлять уже в нынешнем столетии. К ним относятся Corona и Corolla у дрозофилы, SYP-1–SYP-4 у нематоды [7, 8], SYCE1–SYCE3 и TEX12 у мыши [9–11]. Совсем недавно были выявлены белок мыши SIX6OS1 [12] и белки дрожжей Ecm11 и Gmc2 [13, 14]. Белки SYP нематоды (кроме, возможно, SYP-2) к пилларам не относятся, а строят своеобразные поперечные филаменты СК у нематоды. А вот Corona и Corolla взаимодействуют между собой и являются истинными пилларами [2, 7, 8]. Белки SYCE1–SYCE3 и TEX12 являются компонентами ЦЭ СК [15]. SIX6OS также является компонентом ЦЭ СК и взаимодействует с SYCE1, укрепляя структуру комплекса [12]. Белки Ecm11 и Gmc2 взаимодействуют друг с другом и помогают соединиться поперечным филаментам СК, образованным у дрожжей белком Zip1 [13, 14].

Вопрос о консервативности или уникальности белков СК возник сразу после их открытия. И также сразу стало ясно, что белки латеральных элементов и поперечных филаментов СК специфичны для отдельных линий развития (ветвей) эукариот, хотя структура СК в целом весьма кон-

сервативна [5, 16, 17]. После обнаружения новых белков ЦП СК выяснилось, что белки *Corona*, *Corolla* и *SYR* родоспецифичны, и об их консервативности говорить не приходится. Напротив, *SYCE2* и *TEX12* прослежены в филогенезе вплоть до предков нынешних Eumetazoa и экспериментально выявлены у гидры. *SYCE1* обнаруживается у предков нынешних Bilateria, а *SYCE3* — у предков позвоночных [18, 19]. Эти работы проводили в основном с помощью биоинформатических методов, выравнивая аминокислотные последовательности белков методом BLAST. Белок *SIX6OS1* был исследован экспериментально на мышах, *Ecm11* и *Gmc2* — на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.

Мы поставили задачу с помощью комплекса методов биоинформатики выяснить степень консервативности недавно открытых белков центрального пространства СК — *Ecm11*, *Gmc2*, *SIX6OS1*. Мы хотели ответить на вопрос, сравнима ли их консервативность с таковой у белков, исследованных ранее (*SYCE*, *TEX*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск ортологов белков синаптонемного комплекса проводили в базах данных UniProtKB/TrEMBL (<http://www.uniprot.org/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) и GeneCards (<http://www.genecards.org/cgi-bin/>). Выбирали экспериментально проверенные белки, либо полноразмерные формы, либо формы, близкие по длине другим ортологам. Консервативность белков оценивали по четырем критериям: 1) наличие или отсутствие одинаковых функциональных доменов, наличие дополнительных доменов у исследованных ортологов; 2) разброс значений изоэлектрических точек (pI) у изученных ортологов; 3) наличие сходной или различной вторичной структуры (альфа-спиральной конфигурации); 4) наличие общих аминокислотных мотивов. Наличие функциональных доменов выявляли с помощью программы CDART (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>), набор и последовательность консервативных аминокислотных мотивов — с помощью программы MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/tools/meme>). Для определения вторичной структуры белка (вероятности формирования альфа-спиральной конфигурации) использовали программу COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html), изоэлектрические точки белков (pI) выявляли с помощью Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/).

В анализ были взяты следующие белки. Для белка *SYCE1* — ортологи у человека *Homo sapiens* (*SYCE1_HUMAN*), мыши *Mus musculus* (*NP_001137237.1*), крысы *Rattus norvegicus* (*NP_001020229.2*), китайского и золотистого хомячков *Cricetulus griseus* (*A0A3L7HWV6_CRIGR*) и *Mesocricetus auratus* (*A0A1U7Q6L0_MESAU*),

полевки *Microtus ochrogaster* (*XP_026637282.1*), землеройки *Sorex araneus* (*XP_012791351.1*), кролика *Oryctolagus cuniculus* (*A0A5F9D5A2_RABIT*), панды *Ailuropoda melanoleuca* (*G1L8P2_AILME*), слона *Loxodonta africana* (*G3TJY0_LOXAF*), опоссума *Monodelphis domestica* (*D3JUJ3_MONDO*), утконоса *Ornithorhynchus anatinus* (*F7BBC0_ORNAN*), кита *Delphinapterus leucas* (*A0A2Y9MS50_DELLE*), дельфина *Tursiops truncatus* (*A0A2U3V0Z1_TURTR*), латимерии *Latimeria chalumnae* (*H3ALY1_LATCH*), рыб *Salmo salar* (*A0A1S3M6G7_SALSA*) и *Danio rerio* (*B3DFT5_DANRE*), аллигатора *Alligator sinensis* (*A0A1U8DW85_ALLSI*), ящериц *Anolis carolinensis* (*G1KEZ2_ANOCA*) и *Gekko japonicus* (*XP_015261632.1*), лягушки *Xenopus laevis* (*A0A1L8F471_XENLA*), ланцетника *Branchiostoma floridae* (*XP_002592847.1*), моллюска *Lottia gigantea* (*XP_009044517.1*), кольчатого червя *Capitella teleta* (*ELU12842.1*).

Для белка *SYCE3* — ортологи у *Homo sapiens* (*SYCE3_HUMAN*), *Mus musculus* (*NP_001156352.1*), *Rattus norvegicus* (*NP_001128725.1*), *Cricetulus griseus* (*G3IM77_CRIGR*), *Mesocricetus auratus* (*A0A1U7Q7Y3_MESAU*), *Microtus ochrogaster* (*XP_026638266.1*), *Sorex araneus* (*XP_004610643.1*), слепыша *Nannospalax galili* (*XP_008833003.1*), *Oryctolagus cuniculus* (*G1U293_RABIT*), *Ailuropoda melanoleuca* (*D2H6D0_AILME*), *Loxodonta africana* (*G5E7G0_LOXAF*), *Monodelphis domestica* (*A0A5F8G5S8_MONDO*), курицы *Gallus gallus* (*NP_001265057.1*), голубя *Columba livia* (*XP_021136937.1*) *Ornithorhynchus anatinus* (*XP_028935400.1*), *Delphinapterus leucas* (*A0A2Y9MKQ2_DELLE*), *Tursiops truncatus* (*A0A2U3V110_TURTR*), *Latimeria chalumnae* (*H3A163_LATCH*), *Danio rerio* (*NP_001129458.1*), *Alligator sinensis* (*A0A1U7SGC3_ALLSI*), ящериц *Anolis carolinensis* (*R4GBT4_ANOCA*) и *Pogona vitticeps* (*XP_020645218.1*), черепахи *Terrapene carolina triunguis* (*XP_024064554.2*), лягушки *Xenopus tropicalis* (*XP_002939574.2*).

Для белка *TEX12* — ортологи у *Homo sapiens* (*TEX12_HUMAN*), *Mus musculus* (*NP_079963.1*), *Rattus norvegicus* (*NP_001178035.1*), *Cricetulus griseus* (*A0A0611546_CRIGR*), *Mesocricetus auratus* (*A0A1U7Q596_MESAU*), *Microtus ochrogaster* (*XP_005347360.1*), *Sorex araneus* (*XP_004604751.1*), *Nannospalax galili* (*XP_017653573.1*), *Oryctolagus cuniculus* (*XP_008259599.1*), *Ailuropoda melanoleuca* (*G1LBH9_AILME*), *Loxodonta africana* (*G3SS29_LOXAF*), *Monodelphis domestica* (*F6UHS6_MONDO*), *Ornithorhynchus anatinus* (*XP_028931825.1*), *Delphinapterus leucas* (*A0A2Y9M6Z8_DELLE*), *Tursiops truncatus* (*A0A2U3V1E3_TURTR*), *Latimeria chalumnae* (*M3XKC5_LATCH*), *Danio rerio* (*A0A140LH85_DANRE*), *Alligator sinensis* (*A0A3Q0GUI2_ALLSI*), *Anolis carolinensis* (*XP_008121887.1*), *Xenopus laevis* (*A0A1L8FLU4_XENLA*), *Gallus gallus* (*A0A3Q2UGL4_CHICK*, *A0A3Q2U5T2_CHICK*, *XP_001233099.3*), *Branchiostoma floridae*

(EEN46167.1), моллюска *Hydra vulgaris* (R4NDD8_HYDVU). Остальные исследованные белки указаны в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Консервативность белков SYCE1–SYCE3 и TEX12 изучалась Фрауне с соавт. [18, 19] определенными методами биоинформатики и экспериментально, тогда как мы в своей работе используем подобранный нами комплекс биоинформатических методов. Поэтому, чтобы сравнить консервативность этих белков с таковой SIX6OS1, Ecm11 и Gmc2, мы вначале исследовали белки SYCE и TEX. Было изучено 24 ортолога белка SYCE1, 31 ортолог SYCE2, 25 ортологов TEX12 (у позвоночных и беспозвоночных животных) и 24 ортолога SYCE3 (у позвоночных животных). Белок SYCE3 (длина от 73 до 179 аминокислотных остатков, а.к.) имеет один функциональный домен (Synaptonemal_3 superfamily), один общий мотив для всех (у большинства видов еще общие мотивы на концах молекул). Белок кислый, почти у всех ортологов имеется альфа-спиральный участок. Таким образом, по всем параметрам этот белок довольно консервативен, но имеется только у позвоночных животных. Почти у всех ортологов SYCE1 (длиной от 190 до 359 а.к.) также имеется один домен SYCE1. У некоторых видов выявлены дополнительные домены. У кольчатого червя *Capitella teleta* и ланцетника *Branchiostoma floridae* имеются другие домены. Белок кислый. Почти вся молекула занята несколькими фрагментами ярко выраженной альфа-спирали. Что касается общих консервативных мотивов, то для всех видов он только один, тогда как позвоночные (кроме рыбы *Danio rerio*) имеют четыре общих мотива. У белка кольчатого червя *Capitella teleta* нет общих мотивов с остальными белками (возможно, это не ортолог). Таким образом, SYCE1 умеренно консервативен, но только в пределах подтипа позвоночных. Все ортологи белка TEX12 (длина от 122 до 270 а.к.), кроме белка гидры *Hydra vulgaris*, имеют один большой домен TEX12. Разброс изоэлектрических точек (pI) большой (от 3.7 до 8.8). Вторичная структура сильно различается (у одних белков есть альфа-спиральные участки, у других нет). Таким образом, физико-химические свойства этого белка не консервативны. Один общий консервативный аминокислотный мотив есть у всех ортологов, кроме белка утконоса *Ornithorhynchus anatinus*. У большинства позвоночных имеются три общих мотива. Таким образом, несмотря на то, что ортологи этого белка есть у позвоночных и беспозвоночных животных, белок не очень консервативен.

Последним в этом ряду является белок SYCE2 (длина от 113 до 327 а.к., объекты исследования указаны в табл. 1). У большинства ортологов

функциональных доменов не выявлено. У человека и ряда позвоночных домены есть, но не относящиеся к SYCE2. Белок кислый. Один общий аминокислотный мотив есть у всех ортологов (светлый прямоугольник на рис. 1), у асцидии *Ciona intestinalis* и кольчатого червя *Capitella teleta* он изменен; большинство белков имеет два общих мотива во второй половине молекулы. У большинства ортологов имеются два фрагмента альфа-спиральной конфигурации разной степени выраженности, причем их расположение полностью соответствует двум основным мотивам, расположенным рядом — светло- и темно-серому. В целом вторичная структура строго соответствует выявленным мотивам и даже более консервативна, чем первичная, так как альфа-спиральная конфигурация выявляется даже в том случае, если мотив изменен.

Таким образом, исследованные ранее Фрауне с соавт. белки центрального пространства СК [18, 19] не настолько консервативны, как можно было бы ожидать. Мы сравнили с ними недавно выявленные белки ЦП СК (SIX6OS1, Ecm11, Gmc2) и установили следующее.

Белок SIX6OS1 (компонент центрального элемента) выявлен, в основном, у позвоночных и лишь у немногих беспозвоночных животных (рис. 2, табл. 1). Нами исследовано 26 ортологов длиной от 478 до 756 а.к. (есть также неполные си-квенсы белков). У большинства ортологов почти всю молекулу, кроме N-концевого фрагмента, занимает домен S6OS1. У морского ежа (*Strongylocentrotus purpuratus*) нет домена S6OS1, но присутствуют два других. Белок кислый. Вторичная структура представлена одним или несколькими альфа-спиральными участками в первой половине молекулы.

Почти у всех позвоночных имеются консервативные наборы мотивов (по четыре мотива) на N- и C-концах молекулы (рис. 2). У беспозвоночных есть только два общих с другими мотива на N-конце белка. Белок морского ежа имеет один общий мотив с другими, да и тот изменен. У аллигатора другие мотивы. Возможно, эти два белка не являются ортологами (хотя и аннотированы как предполагаемые белки SIX6OS1). Таким образом, белок SIX6OS1 достаточно консервативен только в пределах подтипа позвоночных, что сближает его с белками SYCE1, SYCE2 и TEX12.

Белки Ecm11 и Gmc2 ранее исследовались на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Мы нашли ортологи этих белков только у грибов-аскомицетов (табл. 1). Нами исследовано семь ортологов Ecm11 у представителей разных таксонов аскомицетов. Длина белка составляла от 302 до 997 а.к. У всех изученных белков, кроме белка *Pneumocystis murina*, на C-конце молекулы имеется домен Ecm11. У некоторых грибов выявлены дополни-

Таблица 1. Список изученных белков и их идентификаторов (ID) из протеомов указанных видов эукариот

Сокращенное название объекта	Полное название объекта	Изученные белки и их ID
Ac	<i>Anolis carolinensis</i>	SYCE2 (G1KHL2_ANOCA)
Am	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	SYCE2 (G1M180G1M180_AILME), SIX6OS1 (G1L885_AILME)
As	<i>Alligator sinensis</i>	SYCE2 (A0A3Q0GIZ7_ALLSI), SIX6OS1 (A0A1U7SK42_ALLSI)
Bf	<i>Branchiostoma floridae</i>	SYCE2 (C3ZJ92_BRAFL)
Cg	<i>Cricetulus griseus</i>	SYCE2 (A0A061IFL5_CRIGR), SIX6OS1 (A0A3L7HIR4_CRIGR)
Cgi	<i>Crassostrea gigas</i>	SIX6OS1 (K1QFR8_CRAGI)
Cgl	<i>Candida glabrata</i>	Ecm11 (Q6FMQ5_CANGA), Gmc2 (KTB23594.1)
Ci	<i>Ciona intestinalis</i>	SYCE2 (H2XZ07_CIOIN)
Cs	<i>Cochliobolus sativus</i>	Ecm11 (M2T680_COCSN)
Ct	<i>Capitella teleta</i>	SYCE2 (R7VL09_CAPTE)
Dl	<i>Delphinapterus leucas</i>	SYCE2 (A0A2Y9LZ27_DELLE), SIX6OS1 (A0A2Y9NB65_DELLE)
Dr	<i>Danio rerio</i>	SYCE2 (Q56P19_DANRE), SIX6OS1 (A0A0R4IRN1_DANRE)
En	<i>Emericella nidulans</i>	Ecm11 (Q5B0K9_EMENI)
Gg	<i>Gallus gallus</i>	SYCE2 (XP_003643433.1), SIX6OS1 (A0A1D5NWU8_CHICK)
Gj	<i>Gekko japonicus</i>	SYCE2 (XP_015268656.1)
Hs	<i>Homo sapiens</i>	SYCE2 (SYCE2_HUMAN), SIX6OS1 (S6OS1_HUMAN)
Hu	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Gmc2 (KKA01161)
Km	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gmc2 (QGN16543.1)
Ks	<i>Kazachstania saulgeensis</i>	Gmc2 (SMN21974.1)
La	<i>Loxodonta africana</i>	SYCE2 (G3TV56_LOXAF), SIX6OS1 (G3T820_LOXAF)
Lch	<i>Latimeria chalumnae</i>	SYCE2 (H3ASX3_LATCH), SIX6OS1 (M3XIB0_LATCH)
Lg	<i>Lottia gigantea</i>	SYCE2 (V4AZX6_LOTGI), SIX6OS1 (V3ZXH6_LOTGI)
Lq	<i>Lachancea quebecensis</i>	Gmc2 (CUS20177.1)
Ma	<i>Mesocricetus auratus</i>	SYCE2 (A0A1U8D0I1_MESAU), SIX6OS1 (A0A1U8BXH0_MESAU)
Md	<i>Monodelphis domestica</i>	SYCE2 (A0A5F8GW15_MONDO), SIX6OS1 (F6T1Z5_MONDO)
Mm	<i>Mus musculus</i>	SYCE2 (NP_001161718.1), SIX6OS1 (S6OS1_MOUSE)
Mo	<i>Microtus ochrogaster</i>	SYCE2 (XP_026644993.1), SIX6OS1 (XP_013209700.1)
Nc	<i>Neurospora crassa</i>	Ecm11 (Q7S8Y9_NEUCR)
Ng	<i>Nannospalax galili</i>	SYCE2 (XP_008853689.1), SIX6OS1 (XP_008837805.1)
Nv	<i>Nematostella vectensis</i>	SYCE2 (A7STC2_NEMVE)
Oa	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	SYCE2 (F7GD40_ORNAN), SIX6OS1 (F6ZYZ2_ORNAN)
Oc	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	SYCE2 (G1U3A1_RABIT), SIX6OS1 (G1SMF6_RABIT)
Pa	<i>Phialophora attenuata</i>	Ecm11 (A0A0N0NK46_9EURO)
Pk	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Gmc2 (XP_029320145.1)
Pmu	<i>Pneumocystis murina</i>	Ecm11 (M7NLS0_PNEMU)
Pv	<i>Pogona vitticeps</i>	SYCE2 (XP_020647360.1), SIX6OS1 (XP_020669341.1)
Rn	<i>Rattus norvegicus</i>	SYCE2 (NP_001178486.1), SIX6OS1 (D4A1D9_RAT)
Sa	<i>Sorex araneus</i>	SYCE2 (XP_004616855.1), SIX6OS1 (XP_004612484.1)
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ecm11 (ECM11_YEAST), Gmc2 (GMC2_YEAST)
Sj	<i>Stichopus japonicus</i>	SYCE2 (A0A2G8K9H2_STIJA)
Spu	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	SYCE2 (W4Y102_STRPU), SIX6OS1 (W4Z7U2_STRPU)
Tct	<i>Terrapene carolina triunguis</i>	SYCE2 (XP_026516465.2), SIX6OS1 (XP_029767947.1)
Tt	<i>Tursiops truncatus</i>	SYCE2 (A0A2U4AZD5_TURTR), SIX6OS1 (A0A2U3V6D7_TURTR)
Xl	<i>Xenopus laevis</i>	SYCE2 (A0A1L8H2Z8_XENLA)
Xt	<i>Xenopus tropicalis</i>	SIX6OS1 (XP_031748214.1)
Zp	<i>Zygosaccharomyces parvulus</i>	Gmc2 (AQZ18349.1)

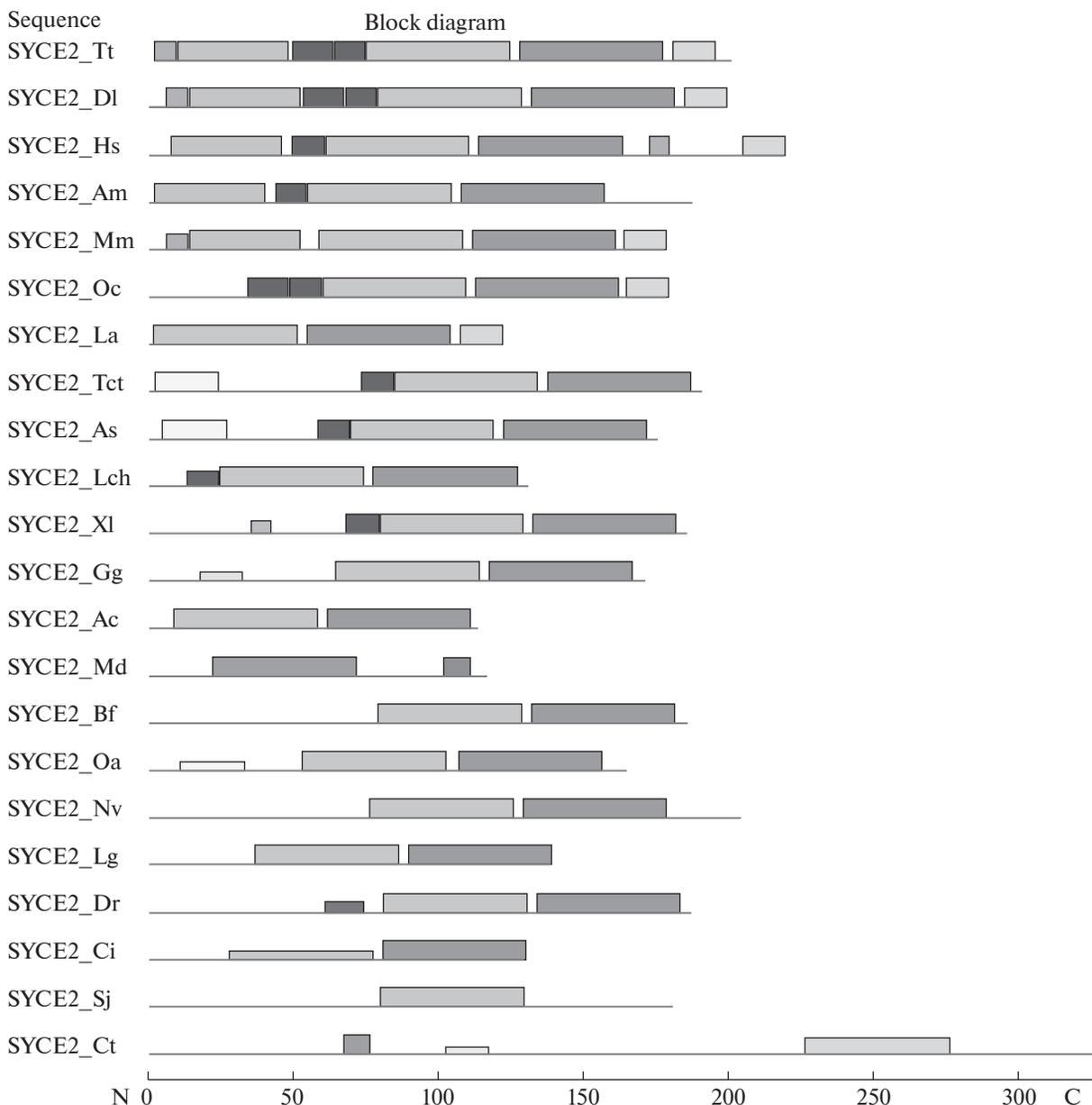


Рис. 1. Консервативные аминокислотные мотивы в молекулах SYCE2 позвоночных и беспозвоночных животных: дельфина (Tt), кита (Dl), человека (Hs), панды (Am), мышцы (Mm), кролика (Oc), слона (La), черепахи (Tct), аллигатора (As), латимерии (Lch), лягушки (Xl), курицы (Gg), ящерицы (Ac), опоссума (Md), ланцетника (Bf), утконоса (Oa), анемоны (Nv), моллюска (Lg), рыбы (Dr), асцидии (Ci), голотурии (Sj), кольчатого червя (Ct). Одинаковые мотивы показаны прямоугольниками одного оттенка и размера. Указаны N- и C-концы белковых молекул.

тельные домены в средней части молекулы. Изоэлектрические точки белков (pI) варьируют в широких пределах, как и вторичная структура белков. Мы исследовали также набор и расположение консервативных мотивов (рис. 3). Очень небольшие общие мотивы (не более 50 а.к.) объединяют представителей разных таксонов аскомицетов (мотивы, обозначенные звездочкой и решеткой, на С-конце молекулы). Таким образом, ортологи Ecm11 даже в пределах одного отдела грибов (ас-

комицеты) не консервативны. У других эукариот ортологов этих белков нет.

Еще один новый белок – Gmc2 – аннотирован у представителей только одного класса аскомицетов – у сахаромицетов. Нами изучено восемь ортологов длиной от 168 до 228 а.к. Практически ни у одного из ортологов функциональных доменов не выявлено. Общий консервативный мотив обнаружен на С-конце молекулы (рис. 4). У шести

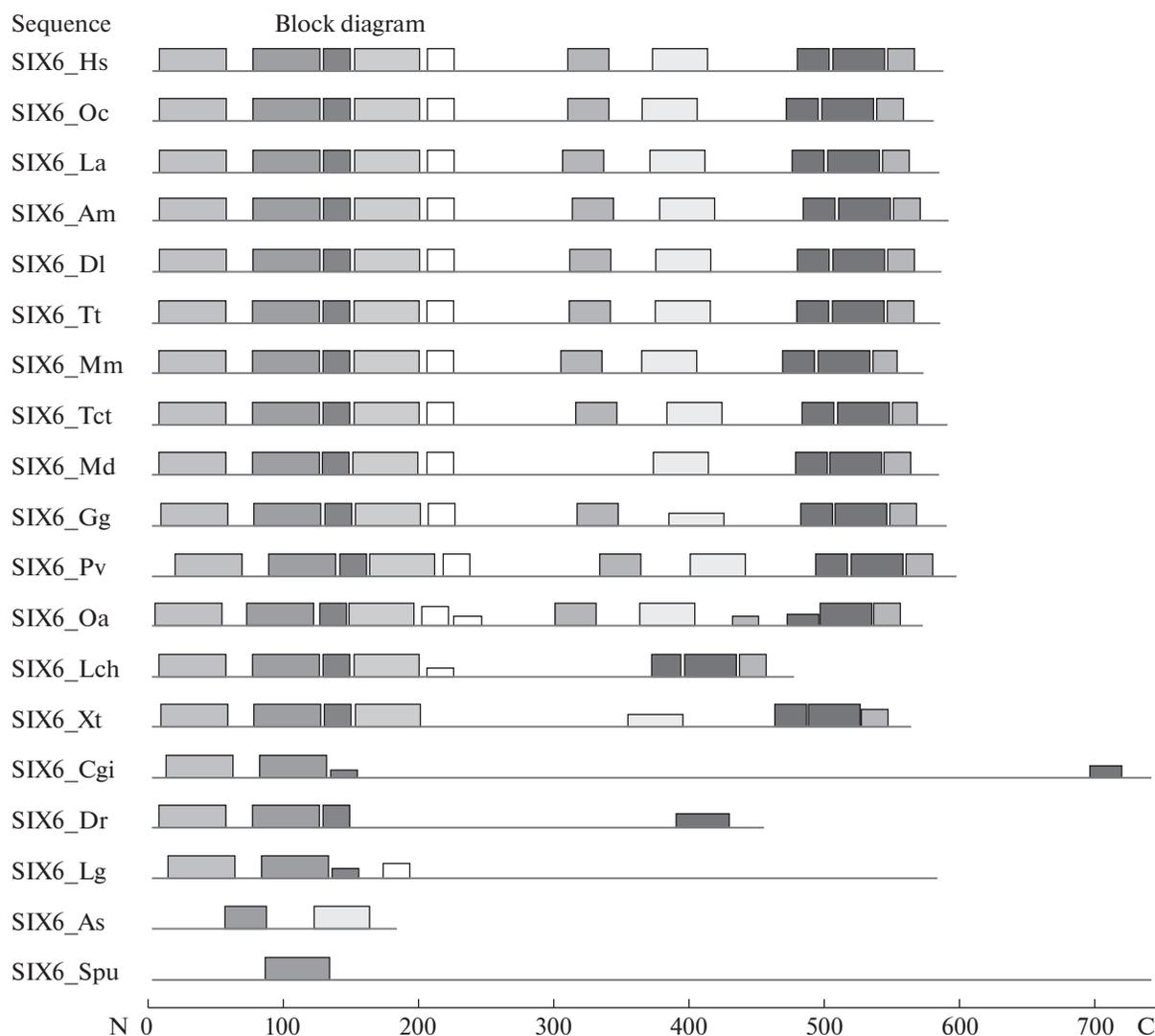


Рис. 2. Консервативные мотивы в молекулах SIX6OS1 позвоночных и беспозвоночных животных: человека (Hs), кролика (Oc), слона (La), панды (Am), кита (Dl), дельфина (Tt), мыши (Mm), черепахи (Tct), опоссума (Md), курицы (Gg), ящерицы (Pv), утконоса (Oa), латимерии (Lch), лягушки (Xt), устрицы (Cgi), рыбы (Dr), брюхоногого моллюска (Lg), аллигатора (As), морского ежа (Spu). Одинаковые мотивы показаны прямоугольниками одного оттенка и размера. Указаны N- и C-концы белковых молекул.

из восьми ортологов имеются общие мотивы в средней части молекулы.

Изоэлектрические точки Gmc2, как и Ecm11, варьируют. Вторичная структура (альфа-спираль) представлена у всех ортологов, но выражена в разной степени. Таким образом, белок Gmc2 так же мало консервативен, как Ecm11.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как упоминалось выше, белки синаптонемного комплекса (СК) специфичны для отдельных линий развития (ветвей) эукариот, хотя структура СК весьма консервативна [5, 16, 17]. Наши результаты подтверждают этот вывод. Однако в ре-

зультате проведенного исследования нами был получен парадоксальный результат: белки Ecm11 и Gmc2, присутствующие только у грибов-аскомицетов, даже в пределах этого таксона менее консервативны, чем белки SYCE и TEX, выявленные у позвоночных и беспозвоночных животных. Белок SIX6OS1 по степени консервативности близок к последним. Таким образом, еще раз подтверждается тезис о том, что наряду с общим набором мейотических белков каждая линия развития эукариот выработала свои белки для построения СК, имеющего общий план строения у всех эукариот [5, 17, 20, 21]. Ответ на вопрос, поставленный в заглавии, об уникальности или универсальности белков мейоза на данный момент состоит в

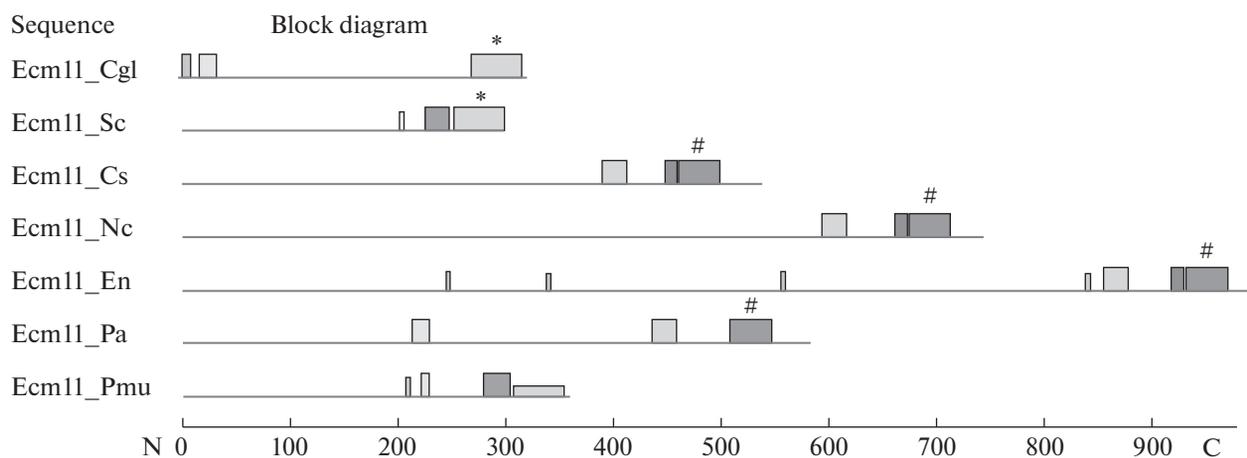


Рис. 3. Консервативные аминокислотные мотивы в белках Ecm11 семи видов грибов-аскомицетов: *Candida glabrata* (Cgl), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Cochliobolus sativus* (Cs), *Neurospora crassa* (Nc), *Emericella nidulans* (En), *Phialophora atatae* (Pa), и *Pneumocystis murina* (Pmu). Одинаковые мотивы обозначены одинаковыми символами. Указаны N- и C-концы белковых молекул. Пояснения в тексте.

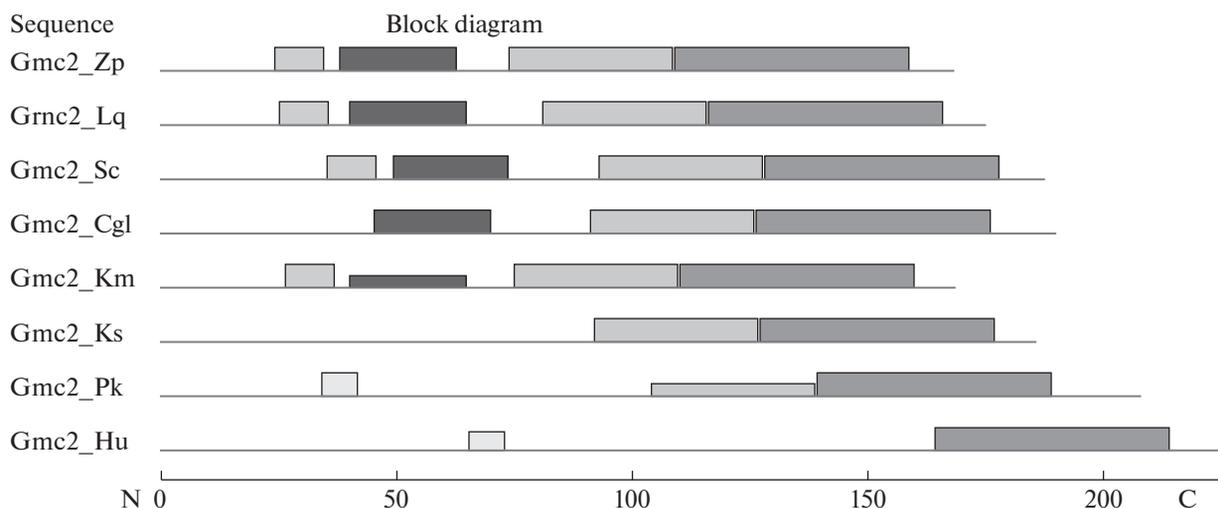


Рис. 4. Консервативные аминокислотные мотивы в молекулах белка Gmc2 грибов: *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Kluyveromyces marxianus* (Km), *Zygosaccharomyces parabailii* (Zp), *Kazachstania saulgeensis* (Ks), *Candida glabrata* (Cgl), *Hanseniaspora uvarum* (Hu), *Pichia kudriavzevii* (Pk), *Lachancea quebecensis* (Lq). Одинаковые мотивы обозначены прямоугольниками одного оттенка и размера. Указаны N- и C-концы белковых молекул.

том, что имеется сходство белков в пределах отдельных линий эукариот.

В ранний период изучения структуры синаптонемных комплексов исследователи вынужденно ограничивались изучением их ультраструктуры с помощью электронных микроскопов. Накоплено много изображений ультраструктуры центрального пространства и центральных элементов СК у растений, грибов, беспозвоночных и позвоночных животных [22]. Таблица в этом обзоре содержит сведения о толщине и рисунке расположения нитей, структурирующих центральное пространство СК у 52 видов организмов. Эти авторы условно вы-

делили два типа ультраструктуры центрального пространства: аморфный и решетчатый. Аскомицеты и млекопитающие имеют аморфный тип – расположение тонких структур центрального пространства менее регулярное, чем при решетчатом типе, характерном для насекомых. Обзор [3] содержит еще больше информации, нуждающейся в систематизации. Ширина центрального пространства СК у разных организмов меняется в пределах от 50 до 150 нм, а толщина элементов, структурирующих его, имеет порядок 3–10 нм. С появлением данных о структуре белков центрального пространства, в том числе результатов, полученных в настоящей статье, предстоит проделать

значительную работу для согласования данных молекулярных (биохимических) и ультраструктурных (электронно-микроскопических) исследований.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-00-00430 (17-00-00429 КОМФИ) и при бюджетном финансировании Государственного задания ФГБУ Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по теме № 0112-2019-0002.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Page S.L., Hawley R.S. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004. V. 20. P. 525–558. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.155141>
2. Gao J., Colaiácovo M.P. Zipping and unzipping: protein modifications regulating synaptonemal complex dynamics // *Trends in Genetics.* 2018. V. 34. P. 232–245. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.001>
3. Zickler D., Kleckner N. Meiotic chromosomes: integrating structure and function // *Ann. Rev. Genet.* 1999. V. 33. P. 603–754. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.603>
4. Moses M.J. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes // *The J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1956. V. 2. P. 215–219. <https://doi.org/10.1083/jcb.2.2.215>
5. Cahoon C.K., Hawley R.S. Regulating the construction and demolition of the synaptonemal complex // *Nature Struct. Molec. Biol.* 2016. V. 23. P. 369–377. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3208>
6. Schmekel K., Daneholt B. The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions // *Trends Cell Biol.* 1995. V. 5. P. 239–242. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)89017-0](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)89017-0)
7. Hawley R.S. Solving a meiotic LEGO puzzle: Transverse filaments and the assembly of the synaptonemal complex in *Caenorhabditis elegans* // *Genetics.* 2011. V. 189. P. 405–409. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.134197>
8. Collins K.A., Unruh J.R., Slaughter B.D. et al. Corolla is a novel protein that contributes to the architecture of the synaptonemal complex of *Drosophila* // *Genetics.* 2014. V. 198. P. 219–228. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.165290>
9. Costa Y., Speed R., Ollinger R. et al. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118. P. 2755–2762. <https://doi.org/10.1242/jcs.02402>
10. Hamer G., Gell K., Kouznetsova A. et al. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. P. 4025–4032. <https://doi.org/10.1242/jcs.03182>
11. Schramm S., Fraune J., Naumann R. et al. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. e1002088. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002088>
12. Gómez-H. L., Felipe-Medina N., Sánchez-Martí M. et al. C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility // *Nature Communications.* 2016. V. 7. 13298. <https://doi.org/10.1038/ncomms13298>
13. Humphryes N., Leung W.-K., Argunhan B. et al. The Ecm11–Gmc2 complex promotes synaptonemal complex formation through assembly of transverse filaments in budding yeast // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. e1003194. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003194>
14. Voelkel-Meiman K., Cheng S.-Y., Morehouse S.J., MacQueen A.J. Synaptonemal complex proteins of budding yeast define reciprocal roles in MutSy-mediated cross-over formation // *Genetics.* 2016. V. 203. P. 1091–1103. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.182923>
15. Fraune J., Schramm S., Alsheimer M., Benavente R. The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination // *Exp. Cell Res.* 2012. V. 318. P. 1340–1346. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.018>
16. Bogdanov Y.F., Grishaeva T.M., Dadashev S.Y. Similarity of the domain structure of proteins as a basis for the conservation of meiosis // *Intern. Rev. Cytol.* 2007. V. 257. P. 83–142. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)57003-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)57003-8)
17. Grishaeva T.M., Bogdanov Y.F. Conservation and variability of synaptonemal complex proteins in phylogenesis of eukaryotes // *Int. J. Evol. Biol.* 2014. V. 2014. 856230. <https://doi.org/10.1155/2014/856230>
18. Fraune J., Brochier-Armanet C., Alsheimer M., Benavente R. Phylogenies of central element proteins reveal the dynamic evolutionary history of the mammalian synaptonemal complex: ancient and recent components // *Genetics.* 2013. V. 195. P. 781–793. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.156679>
19. Fraune J., Brochier-Armanet C., Alsheimer M. et al. Evolutionary history of the mammalian synaptonemal complex // *Chromosoma.* 2016. V. 125. P. 355–360. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0583-8>
20. Ramesh M.A., Malik S.-B., Logsdon J.M., Jr. A phylogenomic inventory of meiotic genes: Evidence for sex in giardia and an early eukaryotic origin of meiosis // *Current Biology.* 2005. V. 15. P. 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.003>
21. Богданов Ю.Ф., Гришаева Т.М. Консерватизм, изменчивость и эволюция мейоза. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2020. С. 231–245, 260–277.
22. Westergaard M., Wettstein D. von. The synaptonemal complex // *Ann. Rev. Genet.* 1972. V. 6. P. 71–110. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.06.120172.000443>

Synaptonemal Complex Proteins: Unicity or Universality?

T. M. Grishaeva^{a,*} and Yu. F. Bogdanov^a

^a*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: grishaeva@vigg.ru*

The prior pairing of homologous chromosomes is the obligatory step of meiosis. It occurs through formation of synaptonemal complexes (SC): the protein axes of two chromosomes are linked with the help of additional “central space proteins”. These proteins are sometimes species-specific and serve as the object of comparative studies. With the help of bioinformatical methods, we studied proteins structuring the SC central space in animals and fungi. We established that Ecm11 and Gmc2 were low conserved even within the taxon of Ascomycetes. The mouse protein SIX6OS1, as well as SYCE1–SYCE3 and TEX12 of animals, were moderately conserved only in the limits of Vertebrates, while these proteins (except SYCE3) were found in Invertebrates too. Thus the statement was confirmed, stating that every developmental line of Eukaryotes have generated its own proteins for forming the SC having the common plan in all Eukaryotes.

Keywords: meiosis, synaptonemal complex, proteins, bioinformatics.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ РЕЛИКТОВЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИПЫ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗМЕНЧИВОСТИ ЯДЕРНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

© 2021 г. А. К. Экарт^{1, *}, А. Я. Ларионова¹, А. Н. Кравченко¹, С. А. Семерикова², М. И. Седаева¹¹Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения
Российской академии наук, Красноярск, 660036 Россия²Институт экологии растений и животных Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

*e-mail: aekart@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

После доработки 24.09.2020 г.

Принята к публикации 10.10.2020 г.

Впервые на основании анализа изменчивости 12 микросателлитных маркеров ядерного генома изучено генетическое разнообразие, структура и дифференциация реликтовых насаждений липы в Красноярском крае, рассматриваемых в качестве отдельного вида *Tilia naseczokinii* Stepanov. Кроме того, в исследование были включены шесть популяций *T. cordata* Mill. из европейской и западно-сибирской частей ее ареала и популяция *T. sibirica* Bayer из Кемеровской области. Обнаружено, что насаждения липы в окрестностях г. Красноярска (Манское займище и Каштак) имеют сходную генетическую структуру и находятся в состоянии, близком к равновесному. Уровень генетической изменчивости *T. naseczokinii* сопоставим с таковым в популяции *T. sibirica*, но оказался значительно ниже, чем в популяциях *T. cordata*. Оценка степени генетической дифференциации популяций липы по межпопуляционным парным значениям F_{st} и генетическим дистанциям Нея (D_{N72}) выявила значительные различия популяций *T. naseczokinii* от популяций *T. cordata* и *T. sibirica*. Анализ генетической дифференциации методом РСрА парных значений F_{st} и индивидуальных генетических дистанций (D), а также кластеризация в STRUCTURE показали разделение изученных популяций на три группы согласно их видовой принадлежности. При этом популяции *T. naseczokinii* генетически удалены от популяций *T. sibirica* в большей степени, чем от *T. cordata*.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, структура, дифференциация, *Tilia naseczokinii*, ядерные микросателлитные локусы.

DOI: 10.31857/S0016675821070079

На территории России наибольшее распространение имеют два вида липы: липа мелколистная (*Tilia cordata* Mill.) и липа амурская (*Tilia amurensis* Rupr.). В Сибири, помимо *T. cordata*, крайне восточная часть ареала которой достигает р. Иртыш, липа встречается в Кемеровской области. Самое крупное из известных насаждений липы находится в предгорьях Кузнецкого Алатау вблизи села Кузедеево (Государственный памятник природы “Липовый остров”). Оно достаточно хорошо исследовано несколькими поколениями ботаников [1–6]. Кроме того, в Кемеровской области выявлено и описано несколько десятков более мелких изолированных насаждений липы [6], предположительно сохранившихся на территории области с третичного доледникового периода. Впервые гипотеза о реликтовом происхождении липы в Южной Сибири была выдвинута П.Н. Крыловым [1] и в дальнейшем поддержана другими ис-

следователями [7–9]. Ряд авторов [10–12], указывая на значительные морфологические различия между произрастающей в Кемеровской области липы и *T. cordata*, рассматривают ее в качестве отдельного вида *Tilia sibirica* Bayer. Некоторые исследователи [13] считают, что южно-сибирские популяции липы являются подвидом *T. cordata* subsp. *sibirica* (Fischer ex Bayer) Pigott или формой *T. cordata* var. *sibirica* (Fischer ex Bayer) Maximowicz. Согласно современной международной классификации *T. sibirica* до сих пор остается неопределенным видом [14].

Следует однако отметить, что в последние годы в связи с разработкой ДНК-маркеров ядерного генома, пригодных для популяционно-генетических исследований различных видов липы [15], появились новые данные, подтверждающие видовой статус *T. sibirica*. Сравнительное исследование *T. sibirica* из окрестностей села Кузедеево, где на-

блюдается самая высокая в Южной Сибири концентрация липы этого вида, и *T. cordata* из Австрии, Польши и России (Тюменская область) по 12 ядерным микросателлитным локусам [16] показало значительную генетическую дифференциацию между ними (F_{st} варьировал от 0.151 до 0.303). Обнаружено, что популяции *T. sibirica* имеют более низкое генетическое разнообразие и более высокую частоту вегетативного (клонального) размножения по сравнению с изученными популяциями *T. cordata*. На основании полученных данных [16] о генетических различиях между популяциями *T. sibirica* и *T. cordata* и выявленных ранее другими исследователями различий по морфологическим признакам [12, 13], экологической и географической изоляции *T. sibirica* авторы делают заключение о том, что *T. sibirica* и *T. cordata* являются разными видами.

Небольшие изолированные насаждения липы существуют также в окрестностях г. Красноярск. Впервые сведения о реликтовых насаждениях липы на территории Красноярского края появились еще в XIX в. [17–19]. Большинство исследователей описывали ее как *T. sibirica* [20–22]. Т.Н. Буторина и В.Д. Нащокин [23] отмечая своеобразие липы, произрастающей вблизи Красноярск, предложили для нее ранг подвида *T. sibirica* ssp. *jenisseensis* Butor. На особенности морфологии цветков и плодов красноярской липы указывал в своей работе и Л.М. Черепнин [24]. Он активно поддерживал выделение нового таксона. Однако данный таксон так и остался “nomen nudum” — необнародованным. В качестве нового вида *Tilia nasczokinii* Stepanov sp. nov. = *T. sibirica* ssp. *jenisseensis* красноярскую липу описал Н.В. Степанов [25], основываясь на существенных морфологических отличиях ее от *T. cordata*, *T. amurensis* и *T. sibirica* по признакам завязи, зубцов по краю листа и почечных чешуй. Наиболее значительные различия по морфологическим признакам наблюдаются между красноярской липой и липами мелколистной и сибирской. По отдельным признакам (зубчатость листовой пластинки) красноярская липа имеет сходство с *T. amurensis*, однако для установления степени их родства требуются дополнительные исследования [25]. Достоверные различия между липой из окрестностей Красноярск и липой мелколистной из восточных районов ее ареала (Омская область) были получены также по ряду морфометрических характеристик листовых пластин [26]. По мнению авторов этого исследования *T. nasczokinii* и *T. cordata* являются близкими, но экологически довольно обособленными видами.

Несмотря на географическую удаленность и существенные отличия липы из Красноярского края от *T. cordata* и *T. sibirica* по экологическим условиям обитания, фенологии, морфологическим признакам, видовой статус *T. nasczokinii* до

настоящего времени не получил международного признания и остается неопределенным [14].

На сегодняшний день достоверно известно о двух изолированных местообитаниях липы, расположенных в окрестностях г. Красноярск. Одно из них, впервые описанное Я. Прейном [19], расположено на левом берегу Енисея, в 18 км выше г. Красноярск, на склонах хребта у так называемого Манского займища. Второе, обнаруженное сотрудниками государственного заповедника “Столбы” в 1951 г., находится на правом берегу Енисея у северной границы заповедника, на склоне невысокой гривы, в долине ручья Каштак [23, 25, 27].

Произрастающая вблизи Красноярск липа является единственным представителем широколиственных древесных растений, сохранившихся на территории Красноярского края с третичного доледникового периода, и является ценным объектом для генетических исследований. Однако ни одно из обнаруженных местообитаний липы до настоящего времени в этом отношении не изучалось. Нет данных о состоянии генофонда и репродуктивных возможностях насаждений красноярской липы, о филогенетических связях с популяциями липы из других регионов Сибири. Использование для ее изучения методов молекулярной генетики, основанных на анализе изменчивости ДНК-маркеров, даст возможность получить информацию о генетическом разнообразии, структуре и степени дифференциации реликтовых насаждений красноярской липы от популяций других близких видов, необходимую как для обоснования правомерности выделения липы из окрестностей Красноярск в качестве отдельного вида, так и для выполнения работ по сохранению и воспроизводству этих уникальных реликтовых насаждений.

Цель настоящего исследования — изучение генетического разнообразия, структуры и степени генетической дифференциации *T. nasczokinii* от популяций *T. sibirica* и *T. cordata* на основе анализа изменчивости ядерных микросателлитных локусов (nSSR).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены две известные в окрестностях г. Красноярск популяции *T. nasczokinii* (Манское займище и Каштак), популяция *T. sibirica* из Кемеровской области (Кузедеево) и шесть популяций *T. cordata* из европейской и западно-сибирской частей ареала этого вида (Калининград, Луга, Плющань, Малиновка, Екатеринбург, Тобольск). Объем выборки варьировал от 19 до 29, составляя в среднем 23.8. Всего было проанализировано 214 особей. Географические координаты включенных в исследование популяций липы приведены в табл. 1.

Таблица 1. Местоположение и основные параметры изменчивости исследованных популяций *T. naseczokinii*, *T. sibirica* и *T. cordata*

Популяция	Координаты с.ш./в.д.	<i>n</i>	<i>P</i> , %	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F</i>
<i>T. naseczokinii</i>								
Манское займище	55°57'51"/92°29'57"	24	75.0	2.92	1.59	0.285	0.312	0.080
Каштак	55°57'26"/92°46'41"	19	91.7	2.50	1.45	0.263	0.253	-0.003
<i>T. sibirica</i>								
Кузедеево	53°19'54"/87°13'59"	23	58.3	2.25	1.41	0.228	0.197	-0.117
<i>T. cordata</i>								
Екатеринбург	56°53'31"/60°19'34"	29	91.7	5.83	2.78	0.500	0.548	0.104
Тобольск	58°18'42"/68°26'54"	25	91.7	4.67	2.50	0.403	0.493	0.204
Малиновка	51°46'45"/56°50'17"	24	91.7	3.92	2.35	0.449	0.485	0.062
Плющань	52°49'00"/38°59'00"	24	91.7	4.92	2.58	0.462	0.532	0.131
Луга	58°52'16"/29°50'56"	26	83.3	4.58	2.63	0.452	0.502	0.095
Калининград	54°56'43"/20°05'15"	20	91.7	4.83	2.92	0.400	0.567	0.316

Примечание. *n* – объем выборки.

Выделение геномной ДНК проводили по стандартному протоколу для растительных тканей с применением СТАВ-метода из высушенных листьев [28]. Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР с 12 парами праймеров для микросателлитных последовательностей, разработанных и апробированных для 23 видов липы [15]. Для ПЦР-амплификации использовали универсальный беспраймерный набор УБП 1–4 ООО “НПФ “Генлаб” (Россия) согласно рекомендациям производителя. Амплификацию отобранных ядерных микросателлитных локусов (Tc4, Tc5, Tc6, Tc7, Tc8, Tc11, Tc915, Tc920, Tc927, Tc937, Tc943, Tc951) проводили при следующем режиме: предварительная денатурация ДНК при 95°C – 5 мин; далее 30 циклов, включающих денатурацию – 30 с при 94°C; отжиг праймеров – 40 с при 60°C и элонгация – 40 с при 72°C. Завершающий цикл элонгации проходил при 72°C в течение 5 мин.

Электрофоретическое разделение амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 6%-ном полиакриламидном геле с использованием Трис-ЭДТА-боратной буферной системы, pH 8.3 при напряжении 15 В/1 см геля в течение 2–3 ч с последующей окраской нитратом серебра. Длину фрагментов определяли путем сопоставления со стандартным маркером O’Range Ruler 20 bp DAN Ladder (Thermo Scientific, Литва). Варианты размера фрагмента рассматривали в качестве аллелей данного локуса.

Популяционно-генетический анализ проводили на основании общепринятых в популяционной генетике статистических параметров, описывающих уровень изменчивости и дифференциации популяций. Расчет параметров проводился в

GenAlEx 6.502 [29]. Уровень генетической изменчивости в популяциях липы по 12 микросателлитным локусам определяли по следующим показателям: *P* – процент полиморфных локусов, *N_a* – число выявленных аллелей, *N_e* – эффективное число аллелей, *H_o* – наблюдаемая гетерозиготность, *H_e* – ожидаемая гетерозиготность, *F* – индекс фиксации. Для определения популяционной структуры и дифференциации популяций использовались коэффициенты *F*-статистики [30]. Количественная оценка степени генетических различий (*D_{N72}*) между популяциями проводилась по методу, предложенному М. Неи [31]. Соответствие наблюдаемых в популяциях соотношений генотипов ожидаемым по закону Харди–Вайнберга определялось с помощью критерия χ^2 . Кроме того, с помощью программы GenAlEx 6.502 проведен анализ иерархического распределения генетической изменчивости внутри популяций, между популяциями внутри видов, между видами (AMOVA), а также проведена ординация популяций на плоскости главных координат (Principal Coordinates Analysis, PCoA) на основе матриц межпопуляционных парных значений *F_{st}* и индивидуальных генетических дистанций *D* [32].

Принадлежность особей общей выборки к той или иной группе популяций определяли методом Байесовской кластеризации, реализованным в программе STRUCRURE v2.3.4 [33]. Количество кластеров (*K*) оценивалось в диапазоне от двух до четырех с числом повторов 1000 раз (burnin 10⁴, MCMC 10⁴). Оптимальное число кластеров устанавливалось методом Evanno ΔK [34] в STRUCRURE HARVESTER [35]. Усреднение значений *Q*-матрицы проводилось по алгоритму LargeKGreedy

Таблица 2. Общее число аллелей и число аллелей, выявленных в популяциях *T. nasczokinii*, *T. sibirica* и *T. cordata*, размеры амплифицируемых фрагментов

Локус	Общее число выявленных аллелей	Размер фрагмента, пн	Число выявленных аллелей		
			<i>T. nasczokinii</i>	<i>T. sibirica</i>	<i>T. cordata</i>
Tc4	8	228–244	6	2	8
Tc5	17	150–190	4	3	16
Tc6	14	131–163	5	4	12
Tc7	4	222–240	2	1	4
Tc8	1	144	1	1	1
Tc11	5	136–156	2	1	5
Tc915	16	159–189	4	5	16
Tc920	10	226–244	4	1	10
Tc927	4	147–157	3	1	2
Tc937	9	152–172	4	4	9
Tc943	4	147–159	2	2	4
Tc951	4	159–165	4	2	4
Всего	96		41	27	91

(10⁴ повторов) в CLUMPP v1.1.2 [36]. Визуализация данных осуществлялась в DISTRUCT v1.1 [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 12 включенных в исследование ядерных микросателлитных локусов лишь один локус (Tc8) оказался мономорфным в изученных популяциях липы. Остальные локусы обнаруживают изменчивость. Наиболее высокий уровень полиморфизма наблюдается в локусах Tc5 (17 аллелей), Tc915 (16 аллелей) и Tc6 (14 аллелей). В других полиморфных локусах число выявленных аллелей варьирует от четырех (Tc7, Tc927, Tc943, Tc951) до 10 (Tc920). Всего при анализе 214 индивидов липы из девяти популяций идентифицировано 96 аллелей, 15 из которых являются общими в популяциях трех видов липы (табл. 2). Самое большое аллельное разнообразие обнаружено у *T. cordata*. В разных популяциях этого вида общее число выявленных аллелей колеблется в пределах от 47 (Малиновка) до 70 (Екатеринбург), составляя в среднем 57.5. В популяциях *T. nasczokinii* число выявленных аллелей ниже, чем у *T. cordata*: 35 (Манское займище) и 29 (Каштак). В популяции *T. sibirica* (Кузедеево) обнаружено минимальное среди изученных популяций число аллельных вариантов (27). Большая часть выявленных в локусах аллелей встречается в популяциях с частотой менее 5%. В отдельных популяциях число редких аллелей варьирует от восьми (Каштак, Кузедеево) до 25 (Екатеринбург). Больше всего редких аллелей обнаружено в популяциях *T. cordata*.

Рассчитанные значения основных показателей генетического разнообразия в изученных по-

пуляциях трех видов липы приведены в табл. 1. Из представленных данных видно, что произрастающая в окрестностях г. Красноярска липа (*T. nasczokinii*) имеет более низкие по сравнению с *T. cordata* показатели генетической изменчивости. Доля полиморфных локусов в исследованных популяциях *T. nasczokinii* составляет 75.0 и 91.7%, среднее число аллелей на локус 2.50 и 2.92, эффективное число аллелей 1.45 и 1.59, наблюдаемая гетерозиготность 0.263 и 0.285, ожидаемая гетерозиготность 0.253 и 0.312. В популяциях *T. cordata* значения этих показателей значительно выше и варьируют в диапазоне: 83.3–91.7%, 3.92–5.83, 2.35–2.92, 0.400–0.500 и 0.493–0.567 соответственно. Самый низкий уровень генетического разнообразия среди изученных популяций наблюдается у *T. sibirica* (табл. 1). В проведенном ранее сравнительном исследовании популяций *T. sibirica* и *T. cordata* по аналогичному набору микросателлитных локусов [16] также отмечается низкое генетическое разнообразие *T. sibirica*. В двух популяциях обнаружен избыток (F равен -0.003 и -0.117), а в остальных – недостаток гетерозиготных генотипов (F варьирует от 0.080 до 0.316). Самый большой дефицит гетерозигот по изученным микросателлитным локусам установлен в одной из популяций *T. cordata* (Калининград). В этой популяции достоверные различия между наблюдаемой и ожидаемой в соответствии с законом Харди–Вайнберга гетерозиготностью, установленные по χ^2 -тестам, выявлены у шести из 12 микросателлитных локусов. В популяциях *T. nasczokinii* (Манское займище, Каштак) существенные отклонения наблюдаемых частот генотипов от ожидаемых обнаружены лишь у одного–двух локусов. В целом, по совокупности

Таблица 3. Значения индексов фиксации для проанализированных локусов

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}
Tc4	0.285	0.400	0.161
Tc5	-0.052	0.058	0.105
Tc6	0.158	0.303	0.172
Tc7	0.293	0.381	0.124
Tc11	0.184	0.306	0.149
Tc915	0.235	0.314	0.103
Tc920	0.002	0.253	0.251
Tc927	0.430	0.480	0.088
Tc937	-0.037	0.218	0.246
Tc943	-0.038	0.315	0.339
Tc951	-0.037	0.333	0.357
В среднем	0.129 ± 0.049	0.306 ± 0.031	0.191 ± 0.027

проанализированных локусов, популяции красной липы находятся в состоянии близком к равновесному.

Исследование популяционной структуры с помощью F -статистик показало, что 19.1% ($F_{st} = 0.191$) выявленной генетической изменчивости приходится на межпопуляционную составляющую. Остальная изменчивость распределяется внутри популяций. Самый большой вклад в дифференциацию популяций вносят четыре локуса: Tc920, Tc937, Tc943 и Tc951 (F_{st} варьирует от 0.246 до 0.357). Значения F_{is} и F_{it} , отражающие соответственно инбридинг особи относительно популяции и инбридинг особи относительно совокупности изученных популяций, равны в среднем 0.129 и 0.306 (табл. 3). Полученные оценки этих показателей указывают на недостаток гетерозиготных генотипов. Как видно из приведенных в таблице данных, наиболее значительный дефицит гетерозигот наблюдается в локусе Tc927 ($F_{is} = 0.430$).

Достаточно высокий уровень генетической дифференциации изученных популяций липы подтверждается результатами анализа иерархической структуры молекулярной изменчивости AMOVA (табл. 4). Доля изменчивости, обеспечивающая

дифференциацию между тремя видами липы, составила 21% от общего генетического разнообразия. Это более чем в 3 раза больше доли изменчивости, распределяемой среди популяций внутри видов (6%). Внутрипопуляционная генетическая изменчивость составляет 73%.

Для оценки степени генетической дифференциации популяций липы использовали межпопуляционные парные значения F_{st} и генетические расстояния D_{N72} (табл. 5). Наиболее высокие значения F_{st} обнаружены между популяциями *T. nasczokinii* и популяцией *T. sibirica*. Значения F_{st} между популяциями этих видов равны 0.514 и 0.586. В меньшей степени популяции *T. nasczokinii* дифференцированы от популяций *T. cordata*. Парные значения F_{st} варьируют от 0.194 до 0.320, составляя в среднем 0.248. Немного выше степень дифференциации популяций *T. cordata* и *T. sibirica*. F_{st} варьирует от 0.280 до 0.386 (среднее значение F_{st} равно 0.313). Сопоставимые значения F_{st} между популяциями *T. sibirica* и *T. cordata* получены ранее [16]. Авторами отмечена высокая генетическая дифференциация между этими таксонами, произошедшая в результате экологической и географической изоляции *T. sibirica* в Южной Сибири в среднем плейстоцене (примерно 447 тыс. лет назад). Самый низкий уровень различий наблюдается между популяциями внутри видов. F_{st} колеблется в пределах от 0.018 до 0.092 со средним значением 0.061 (табл. 5).

Сходные результаты получены при использовании в качестве меры дифференциации генетических расстояний D_{N72} . Среднее генетическое расстояние между популяциями разных видов ($D_{N72} = 0.357$) в несколько раз больше расстояния между популяциями внутри видов ($D_{N72} = 0.073$). Как и в случае с F_{st} , максимальный уровень генетических различий наблюдается между популяциями *T. nasczokinii* и *T. sibirica* ($D_{N72} = 0.511$).

Для визуализации генетических различий между изученными видами липы на основе индивидуальных парных генетических расстояний D [33] был выполнен PCoA. На рис. 1 видно, что исследованные популяции *T. nasczokinii*, *T. sibirica* и *T. cordata* образуют три пространственно разоб-

Таблица 4. Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) изученных популяций *T. nasczokinii*, *T. sibirica* и *T. cordata*

Источник изменчивости	$d.f.$	Сумма квадратов отклонений	Компоненты изменчивости	Доля (%) изменчивости	Значение p
Между видами	2	179.86	89.93	0.776 (21)	0.001
Между популяциями внутри видов	6	74.21	12.37	0.201 (6)	0.001
Внутри популяций	419	1134.4	2.71	2.707 (73)	0.001
Всего	427	1388.5		3.685 (100)	

Таблица 5. Межпопуляционные парные значения F_{st} (ниже диагонали) и генетические дистанции D_{N72} (выше диагонали) между популяциями *T. naszokinii*, *T. sibirica* и *T. cordata*

Вид	<i>T. naszokinii</i>		<i>T. sibirica</i>	<i>T. cordata</i>					
	МЗ	КШ	КЗ	ЕК	ТБ	МЛ	ПЛ	ЛГ	КЛ
МЗ	—	0.048	0.473	0.208	0.261	0.297	0.218	0.202	0.212
КШ	0.085	—	0.549	0.285	0.330	0.361	0.309	0.287	0.222
КЗ	0.514	0.586	—	0.272	0.257	0.407	0.292	0.290	0.244
ЕК	0.194	0.257	0.286	—	0.057	0.126	0.052	0.105	0.120
ТБ	0.245	0.305	0.301	0.031	—	0.113	0.079	0.090	0.119
МЛ	0.265	0.320	0.386	0.082	0.082	—	0.090	0.106	0.152
ПЛ	0.206	0.279	0.309	0.023	0.048	0.057	—	0.042	0.109
ЛГ	0.202	0.276	0.317	0.066	0.061	0.074	0.018	—	0.108
КЛ	0.200	0.224	0.280	0.064	0.073	0.092	0.058	0.066	—

Примечание. МЗ – Манское займище, КШ – Каштак, КЗ – Кузедеево, ЕК – Екатеринбург, ТБ – Тобольск, МЛ – Малиновка, ПЛ – Плющань, ЛГ – Луга, КЛ – Калининград.

шенные группы, что свидетельствует о значительной дифференциации этих видов. Аналогичные результаты получены при РСoA парных значений F_{st} (рис. 2). Наиболее удалены друг от друга популяции *T. naszokinii* и *T. sibirica*, обнаруживающие самый высокий уровень генетической дифференциации среди всех изученных популяций.

Кластеризация проанализированных особей в STRUCTURE подтверждает результаты, полученные при анализе парных значений F_{st} и индивидуальных генетических дистанций. При использовании метода Evanno ΔK изученные деревья липы распределились в трех кластерах в соответствии с их видовой принадлежностью (рис. 3).

Таким образом, в результате исследования, проведенного с помощью 12 ядерных микросателлитных локусов, получены данные о генетическом разнообразии, структуре и дифференциации реликтовых популяций липы из окрестностей г. Красноярска, рассматриваемых Н.В. Степановым [25] в качестве нового вида *T. naszokinii*. Установлено, что изученные популяции *T. naszokinii*: Манское займище и Каштак имеют более низкие параметры генетической изменчивости по сравнению с популяциями *T. cordata* из европейской и западно-сибирской частей ареала этого вида. Самый низкий уровень генетического разнообразия среди изученных популяций наблюдается у *T. sibirica* из Кемеровской области. Включенные в исследование

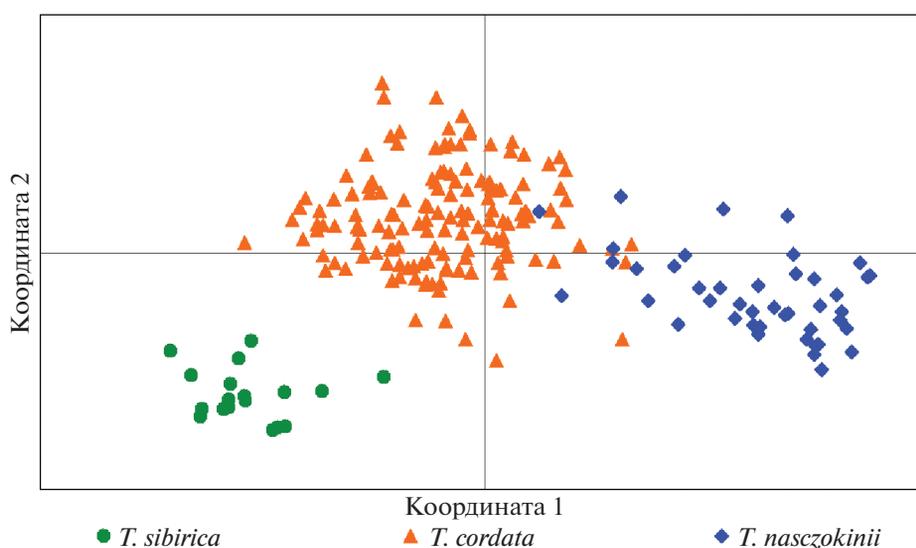


Рис. 1. Дифференциация 214 особей липы на основе РСoA матрицы индивидуальных генетических дистанций (D). Координаты 1 и 2 суммарно представляют 27% генетической изменчивости.



Рис. 2. Дифференциация изученных популяций липы на основе PCoA матрицы парных значений F_{st} . Координаты 1 и 2 суммарно представляют 77% генетической изменчивости.

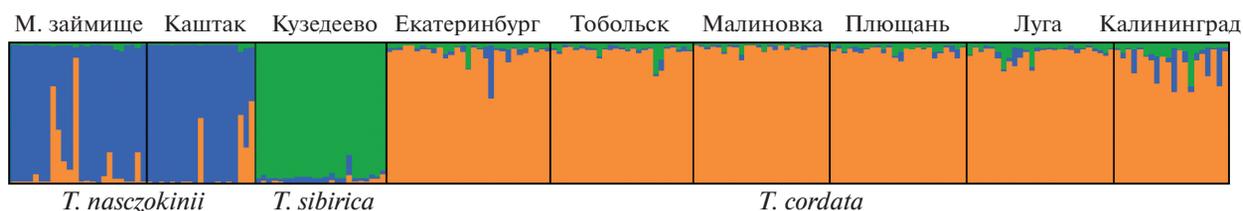


Рис. 3. Распределение 214 изученных особей липы на основе Байесовского кластерного анализа, выполненного в STRUCTURE.

популяции *T. nasczokinii* имеют сходную генетическую структуру и по совокупности проанализированных локусов ни одна из них не обнаруживает существенных отклонений от равновесного состояния по Харди–Вайнбергу.

Анализ генетической дифференциации различными методами показал разделение популяций на три группы. При этом популяции *T. nasczokinii* генетически удалены от популяций *T. sibirica* в большей степени, чем от *T. cordata*. Таким образом, принадлежность красноярских популяций липы к виду *T. sibirica* или к подвиду *T. sibirica* ssp. *jenisseensis* является генетически необоснованной.

Для подтверждения видового статуса красноярской липы необходимы дальнейшие более обширные исследования с привлечением большего числа популяций липы из сибирских регионов, а также популяций дальневосточного вида *T. amurensis*, которая по ряду морфологических признаков обнаруживает сходство с *T. nasczokinii* [25]. Кроме того, представляется целесообразным использование других генетических маркеров, в частности маркеров цитоплазматических геномов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда науки в рамках

научного проекта № 19-44-240006 p_a, а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-04-01061a.

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Сибирского федерального университета Н.В. Степанову, сотрудникам Национального парка “Красноярские Столбы” А.А. Кнорре и Д.Ю. Полянской за предоставленную информацию о местонахождении популяций липы в окрестностях Красноярска, а также сотрудникам Института экологии растений и животных УрО РАН В.Л. Семерикову, Е.В. Хантемировой и сотруднику Ботанического сада УрО РАН Е.Г. Филиппову за участие в сборе образцов *T. cordata* и *T. sibirica*.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крылов П.Н. Леса в прегорьях Кузнецкого Алатау // Изв. Импер. Томского ун-та. Отдел 2. 1891. С. 1–40.

2. *Ревердатто Л.Ф.* К вопросу о судьбе липового острова в Кузнецком Алатау // Изв. Томского ун-та. 1925. Т. 75. С. 277–282.
3. *Крылов П.Н.* Семейство Tiliaceae – Липовые // Флора Западной Сибири: руководство к определению западносибирских растений. Вып. 8: Geraniaceae – Cognaceae. Томск: Наука, 1934. С. 1891–1894.
4. *Грубов В.И.* О современном состоянии липового острова в предгорьях Кузнецкого Алатау // Сов. ботаника. 1940. № 1. С. 84–85.
5. *Хлонов Ю.П.* Леса и липники Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 1965. 154 с.
6. *Амелин И.И., Бляхарчук Т.А.* Распространение липы сибирской (*Tilia sibirica* Bayer) в Кемеровской области // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. 2016. № 2(34). С. 30–52. <https://doi.org/10.17223/19988591/34/3>
7. *Положий А.В., Крапивкина Э.Д.* Реликты третичных широколиственных лесов во флоре Сибири. Томск: Изд-во ТГУ, 1985. 156 с.
8. *Крапивкина Э.Д.* Неморальные реликты во флоре черновой тайги Горной Шории. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. 229 с.
9. *Novák J., Trotsiuk V., Šykora O. et al.* Ecology of *Tilia sibirica* in a continental hemiboreal forest, southern Siberia: An analogue of a glacial refugium of broad-leaved temperate trees? // The Holocene. 2014. V. 24(8). P. 908–918. <https://doi.org/10.1177/0959683614534744>
10. *Васильев И.В.* Сем. 58. Липовые – Tiliaceae Juss. // Деревья и кустарники СССР. М.; Л: Изд-во АН СССР, 1958. Т. 4. С. 659–726.
11. *Хлонов Ю.П.* Липа сибирская – *Tilia sibirica* Bayer // Биологические основы охраны редких и исчезающих растений Сибири. Новосибирск: Наука, 1990. С. 58–80.
12. *Власова Н.В.* Семейство Tiliaceae // Флора Сибири. Новосибирск: Наука, 1996. Т. 10. С. 65–66.
13. *Pigott C.D.* Lime-trees and Basswoods: A Biological Monograph of the Genus *Tilia*. N.Y.: Cambr. Univ. Press, 2012. 395 p.
14. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Malvaceae/Tilia/>
15. *Phuekvilai P., Wolff K.* Characterization of microsatellite locus in *Tilia platyphyllos* (Malvaceae) and cross-amplification in related species // Appl. Plant Sci. 2013. V. 1(4). <https://doi.org/10.3732/apps.1200386>
16. *Logan S., Chytry M., Wolff K.* Genetic diversity and demographic history of the Siberian lime (*Tilia sibirica*) // Perspectives in Plant Ecol., Evol. and Systematics. 2018. V. 33. P. 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2018.04.005>
17. *Пестов И.С.* Записки об Енисейской губернии Восточной Сибири. М.: Унив. типография, 1833. С. 245.
18. *Степанов А.П.* Енисейская губерния. Т. 1. СПб., 1835. 276 с.
19. *Преин Я.* Предварительный отчет об исследованиях липы в окрестностях г. Красноярска // Изв. Восточно-Сиб. отделения РГО. Иркутск, 1895. Т. 25. № 4–5. С. 95–127.
20. *Ильин М.М.* О липе в окрестностях Красноярска // Бот. журн. 1934. Т. 19. № 4. С. 34.
21. *Васильев И.В.* Новые данные о липе в окрестностях Красноярска // Бот. журн. 1953. Т. 38. № 5. С. 737–742.
22. *Положий А.В.* Сем. Tiliaceae–Липовые // Флора Красноярского края. Томск: Изд-во Томск. гос. ун-та, 1977. Вып. 7. С. 18.
23. *Буторина Т.Н., Нацокин В.Д.* Липа сибирская в заповеднике “Столбы” // Тр. гос. заповедника “Столбы”. Вып. II. Красноярское кн. изд-во, 1958. С. 152.
24. *Черепнин Л.М.* Флора южной части Красноярского края. Вып. 4 // Уч. зап. Красноярского пед. ин-та. 1963. Т. 24. № 4. С. 3–270.
25. *Степанов Н.В.* *Tilia nasczokinii* (Tiliaceae) – новый вид из окрестностей Красноярска // Бот. журн. 1993. Т. 78. № 3. С. 137–144.
26. *Сорокин А.Д., Григорьев А.И.* Особенности строения листовой пластины *Tilia cordata* Mill. и *Tilia nasczokinii* // Омский науч. вестник. Биологические, сельскохозяйственные и ветеринарные науки. 2006. № 7(43). С. 144–147.
27. *Полянская Д.Ю., Андреева Е.Б., Гончарова Н.В.* Мониторинг *Tilia nasczokinii* Stepanov в заповеднике Столбы // Научные исследования в заповедниках и национальных парках Южной Сибири. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2016. С. 46–49.
28. *Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. № 6. P. 673–679. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
29. *Peakall R., Smouse P.E.* GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update // Bioinformatics (Oxf., Engl.). 2012. V. 28. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
30. *Weir B.S., Cockerham C.C.* Estimating F-statistic for the analysis of population structure // Evolution. 1984. V. 38. P. 1358–1370.
31. *Nei M.* Genetic distance between populations // Am. Naturalist. 1972. V. 106. P. 283–292.
32. *Smouse P.E., Peakall R.* Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure // Heredity. 1999. V. 82. P. 561–573. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6885180>
33. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. № 2. P. 945–959.
34. *Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // Mol. Ecol. 2005. V. 14. № 8. P. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
35. *Earl D., vonHoldt B.* STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conserv. Genet. Resour. 2012. V. 4. P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
36. *Jakobsson M., Rosenberg N.A.* CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure // Bioinformatics. 2007. V. 23. № 14. P. 1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
37. *Rosenberg N.A.* Distruct: A program for the graphical display of population structure // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. P. 137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.005>

Genetic Structure and Differentiation of Relicts Lime Populations Based on the Analysis of Variability of Nuclear Microsatellite Loci

A. K. Ekart^{a,*}, A. Ya. Larionova^a, A. N. Kravchenko^a, S. A. Semerikova^b, and M. I. Sedaeva^a

^a*Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

^b*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia*

*e-mail: aekart@yandex.ru

The genetic diversity, structure and differentiation of relict lime populations in the Krasnoyarsk Territory, considered as a separate species of *Tilia nasczokinii* Stepanov, were studied for the first time on the basis of the variability of 12 microsatellite markers of the nuclear genome. In addition, the study included six populations of *Tilia cordata* Mill. from the European and West Siberian parts of its range and the population of *Tilia sibirica* Bayer from the Kemerovo region. It was found that *T. nasczokinii* populations in the vicinity of Krasnoyarsk (Manskoye Zaymishche and Kashtak) have a similar genetic structure and are in a state close to equilibrium. The level of genetic variability of *T. nasczokinii* populations is comparable to the level of variability of *T. sibirica* population, but turned out to be significantly lower than in populations of *T. cordata*. Estimation of genetic differentiation degree of lime populations by interpopulation paired F_{st} values and genetic distances Nei (D_{N72}) revealed significant differences in genetic structure between the populations of *T. nasczokinii* and populations of *T. cordata* and *T. sibirica*. Analysis of genetic differentiation by the PCoA method of paired F_{st} values and individual genetic distances (D) and clustering in STRUCTURE, showed the division of the studied populations into three groups according to their species affiliation. Moreover, *T. nasczokinii* populations are genetically more differentiated from *T. sibirica* than from *T. cordata*.

Keywords: genetic diversity, structure, differentiation, *Tilia nasczokinii*, nuclear microsatellite loci.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОВРЕМЕННЫХ СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.) РОССИИ НА ОСНОВЕ ОТЯГОЩЕННОСТИ ИХ ГЕНАМИ ГИБРИДНОГО НЕКРОЗА

© 2021 г. В. А. Пухальский¹, *, Е. Н. Билинская¹, А. М. Кудрявцев¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: pukhalsk@vigg.ru

Поступила в редакцию 23.10.2020 г.

После доработки 23.11.2020 г.

Принята к публикации 25.11.2020 г.

Исследовано генетическое разнообразие 113 современных сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по отягощенности их генами гибридного некроза. Установлено, что геномы 83 сортов (73.4%) свободны от генов гибридного некроза (геном *ne Ine Ine2ne2*). Геномы 14 сортов (12.4%) несут ген *Ne1* (геном *Ne1Ne Ine2ne2*), а 16-ти (14.2%) – ген *Ne2* (геном *ne Ine1Ne2Ne2*). При этом среди сортов с геном *Ne1* выявлены аллели *w* и *m*, а среди сортов с геном *Ne2* – аллели *w*, *m*, *ms* и *s*. Высказано предположение, что большее разнообразие по силе аллелей определяет преимущество генотипа *ne Ine1Ne2Ne2* над генотипом *Ne1Ne Ine2ne2*, выражающееся в том, что сорта с первым генотипом разрешены для коммерческого использования в десяти экологических регионах, а со вторым – в семи. При этом частота сортов с геном *Ne1* по регионам колеблется от 4.8 до 20.7%, а с геном *Ne2* – от 6.0 до 66.7%. Показана также определенная стабильность по временным периодам в соотношении генотипов без генов некроза и с генами *Ne1* и *Ne2*. Однако число сортов с генотипом *ne Ine1Ne2Ne2* в процессе селекции постепенно, хотя и незначительно, показывает тенденцию к преимущественному увеличению.

Ключевые слова: гены гибридного некроза, комплементарное взаимодействие генов, сила аллелей, яровая мягкая пшеница, *Triticum aestivum* L.

DOI: 10.31857/S0016675821080129

Исследование генотипов пшеницы на предмет отягощенности их генами гибридного некроза позволило выявить видовую специфичность этих генов [1] и их географическое распространение по регионам мира и территориям различных стран [2–5]. Эти данные позволяют показать влияние селекции в разные временные периоды на микроэволюционные процессы в сортовых популяциях культурной пшеницы [6]. Фенотипически гибридный некроз проявляется в летальности или сублетальности гибридов первого поколения от гибели листовой поверхности [7, 8], что генетически определяется комплементарным взаимодействием двух доминантных генов – *Ne1* и *Ne2* [10, 11]. Оба гена находятся в геноме В: *Ne1* – на хромосоме 5BL, а ген *Ne2* – на хромосоме 2BS [12–14]. Генотип *Ne1Ne Ine2ne2* считается носителем гена *Ne1*, генотип *ne Ine1Ne2Ne2* – носителем гена *Ne2*, а генотип *ne Ine Ine2ne2* определяют как неноситель [10]. Описано пять аллелей генов гибридного некроза, из которых три одинаковых аллеля для генов *Ne1* и *Ne2*: *w* (*weak*), *m* (*moderate*),

s (*strong*), а для гена *Ne2* еще два аллеля промежуточной силы – *wm* (*moderately weak*) и *ms* (*moderately strong*). Во втором гибридном поколении сублетальных комбинаций расщепление на некрозные и нормальные растения составляет 9 : 7. Силу аллелей определяют только в первом гибридном поколении, т.к. во втором поколении существуют различия между некрозными растениями, обусловленные эффектом дозы некрозных генов. При этом некроз сильнее выражен у растений, в генотипе которых находится максимальное число доминантных генов гибридного некроза [15]. Значимость работ по установлению генотипов с генами гибридного некроза обусловлена возможностью на этой основе дальнейшей оптимизации генетической теории селекции. В данном сообщении приводятся результаты сравнительного изучения отягощенности генотипов сортов яровой мягкой пшеницы, допущенных к возделыванию на территории России, генами гибридного некроза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы сортов яровой мягкой пшеницы были получены нами из ФГБУ “Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений” и оригинаторов сортов. В качестве тестеров использовали сорта яровой мягкой пшеницы Marquillo (генотип $Ne1^sNe1^sNe2ne2$), Балаганка, Грани, Мисс (генотип $ne1ne1Ne2^sNe2^s$). Скрещивания сортов с тестерами проводили в полевых условиях твел-методом с изоляцией колосьев. Генотипы сортов с генами гибридного некроза и силу аллелей этих генов выявляли на разных стадиях онтогенеза гибридов F_1 в полевых условиях, используя критерии [10, 11]. При описании происхождения сортов пшеницы пользовались информацией, приведенной в [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные обобщенные данные приведены в табл. 1. Из 113 сортов, изучавшихся нами, 83 (что составляет 73.4%) – это формы с генотипом $ne1ne1ne2ne2$ (неносители). Это сорта: Ария, Зауралочка, Радуга, Альбидум 32, Воевода, Лебедушка, Саратовская 73, Саратовская 74, Фаворит, Светланка, Тулайковская 10, Тулайковская 11, Тулайковская 108, Тулайковская 110, Тулайковская золотистая, Эскада 66, Эскада 109, Алтайская 70, Алтайская 75, Алтайская 100, Алтайская 110, Алтайская 325, Алтайская 530, Алтайская жница, Алтайская степная, Апасовка, Сибирский альянс, Тобольская, Новосибирская 15, Новосибирская 29, Новосибирская 31, Новосибирская 44, Обская 2, Памяти Вавенкова, Сибирская 12, Удача, Боевчанка, Омская 28, Омская 29, Омская 32, Омская 33, Омская 35, Омская 3661, Омская 38, Мелодия, Памяти Азиева, Росинка, Светланка, Катюша, Ом ГАУ, Павлоградка, Сibaковская юбилейная, Маргарита, Симбирцит, Ульяновская 100, Эскада 70, Курская 2058, Рикс, Кинельская 61, Кинельская 2010, Кинельская Нива, Кинельская Отрада, Ленинградская 6, Свеча, Курганская 2, Свирель, Уялочка, Учитель, Черноземоуральская 2, Челябинская степная, Приморская 50, Авида, СКЭНТ 3, Тюменская 25, Арюна, Сударыня, Уралосибирская, Любава 5, Алешина, Дарница, Тулеевская.

Ген $Ne1$ (генотип $Ne1Ne1ne2ne2$) выявлен у 14 сортов, что составило 12.4%, а ген $Ne2$ (генотип $ne1ne1Ne2Ne2$) – у 16 сортов – 14.2% (табл. 2). Установлено, что отличие популяций районированных сортов яровой мягкой пшеницы от сортов озимой мягкой пшеницы заключается в присутствии генотипов и с геном $Ne1$, и с геном $Ne2$, в то время как в популяциях озимой пшеницы присутствует только ген $Ne2$ [19]. При этом, однако, существует тенденция в селекции яровой мягкой пшеницы, хотя и минимальная, к некоторому

увеличению в разные временные периоды сортов с генами некроза, и особенно с геном $Ne2$ (табл. 2). Сорта с геном $Ne1$ различались следующим образом. Аллель w несут сорта Иделле, Иолдыз, Полюшко, аллель m – сорта Дальгау 1, Челябин 2, Омская краса, Омская 29, Омская 37, Геракл, Бэль, Мальцевская 110, Башкирская 28, Салават Юлаев, Новосибирская 44. Аллель s среди сортов с геном $Ne1$ не обнаружен. По формам с геном $Ne2$ показано, что сорт Бурятская остистая несет аллель w , сорта Алтайская 75 и Любава – аллель wm , сорта Дуэт, Баженка, Курьер, Альбидум 31 и Амир – аллель m . Аллель ms выявлен у сорта Дарья, а аллель s (*strong*) – у сортов Мис, Тулайковская 5, Красноярская 12, Агата, КВС Аквилон, Triso и Granny. Большое разнообразие по силе аллелей, по-видимому, в определенной степени определяет селективное преимущество генотипа $ne1ne1Ne2Ne2$ над генотипом $Ne1Ne1ne2ne2$. Это подтверждают и данные районирования сортов по экологическим регионам России (табл. 3). Так, формы с генотипом $Ne1Ne1ne2ne2$ разрешены для коммерческого использования в семи экологических регионах, а с генотипом $ne1ne1Ne2Ne2$ – в десяти. При этом частота сортов с геном $Ne1$ по регионам колеблется от 4.8 до 20.7%, а с геном $Ne2$ – от 6.0 до 66.7%. Подобная тенденция в росте генотипов $ne1ne1Ne2Ne2$ среди создаваемых сортов яровой пшеницы существует также в ряде других стран. Так, в Индии в настоящее время среди сортов яровой мягкой пшеницы сорта с геном $Ne2$ составляют 69.8%, а 20.3% – это сорта без генов гибридного некроза (генотип $ne1ne1ne2ne2$) [20]. Стародавние же сорта Индии несли в генотипах только ген $Ne1$ или были свободны от генов гибридного некроза [4, 21]. Такое изменение в геномах индийских сортов яровой мягкой пшеницы произошло в результате использования в селекции в качестве исходного материала короткостебельных высокопродуктивных сортов СИММУТ (Мексика) с генотипом $ne1ne1Ne2Ne2$ [22, 23]. В Австралии преобладают также сорта с геном $Ne2$ [24]. Это объясняется тесным сцеплением гена $Ne2$ с геном устойчивости к бурой ржавчине $Lr13$, имеющим высокую эффективность в условиях Австралии (R.A. McIntosh, персональное сообщение). При этом австралийские селекционеры часто, не зная, несет ли генотип сорта ген некроза, по-видимому, ориентируются при выборе исходного материала для скрещивания на устойчивость сортов к бурой ржавчине, определяемой геном $Lr13$. В связи с тем, что при выборе исходного материала селекционеры России также в большинстве случаев не имеют представления о генах некроза в генотипе сорта, то и отбор исходного материала осуществляется по признакам определенным образом опосредствованным генотипом $ne1ne1Ne2Ne2$. Например, показано, что на хромосоме 2BS помимо гена $Lr13$ локализованы гены устойчивости к бурой и стеб-

Таблица 1. Генотипы по генам гибридного некроза сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

№ п.п.	Сорт	Оригинатор	Родословная	Регион	Генотип
1	Ария	Курганский НИИСХ	Новосибирская 67/Доноры	9	<i>ne1ne2</i>
2	Зауралочка	То же	Терция/Омская 24	9	<i>ne1ne2</i>
3	Мальцевская 110	»	Интенсивная/Иртышанка	9	<i>Ne1^mne2</i>
4	Радуга	»	Краснодарская 39/Алмаз	7, 9	<i>ne1ne2</i>
5	Горноуральская	Уральский НИИСХ	Арканзас/Стрела	4	<i>ne1ne2</i>
6	Екатерина	То же	Ирен/Краснофимская 100	4, 7, 9, 10	<i>ne1Ne2^s</i>
7	Краснофимская 100	»	Люба/Краснофимская 90	4	<i>ne1ne2</i>
8	Башкирская 28	Башкирский НИИСХ	Омская 20/Приокская	9	<i>Ne1^mne2</i>
9	Салават Юлаев	То же	Омская 30/Омская 20	9	<i>Ne1^mne2</i>
10	Агата	НИИСХ ЦРНЗ	Артемовка/Милтыурум 63	3	<i>ne1Ne2^s</i>
11	Амир	То же	Родина/Приокская//Приокская	2, 4	<i>ne1Ne2^m</i>
12	Злата	»	Иволга/Прохоровка	1, 2, 3, 4, 7	<i>ne1ne2</i>
13	Любава	»	Люба/Памяти Федина	3	<i>ne1Ne2^{nm}</i>
14	Эстер	»	Эта/Л-52-4	2, 4, 7	<i>ne1ne2</i>
15	Альбидум 31	НИИСХ Юго-Востока	Л-23/Саратовская 55//Альбидум 28	8	<i>ne1Ne2^m</i>
16	Альбидум 32	То же	Альбидум 28//Саратовская 46/Лютесценс 2861//3/Альбидум 29	8, 9	<i>ne1ne2</i>
17	Воевода	»	Л-2033/Белянка	8	<i>ne1ne2</i>
18	Курьер	»	Агис 63//Альбидум 188/Юго-Восточная 2	5, 6	<i>ne1Ne2^m</i>
19	Лебедушка	»	Белянка/Добрыня	8	<i>ne1ne2</i>
20	Саратовская 73	»	S-2012/T. <i>timorheevii</i>	8, 9	<i>ne1ne2</i>
21	Саратовская 74	»	Саратовская 68/С-093//С-2093/Саратовская 70	8, 9	<i>ne1ne2</i>
22	Фаворит	»	Л-2033/Белянка	5, 7, 8, 9	<i>ne1ne2</i>
23	Светланка	Самарский НИИСХ	Омская 23/Целинная 26	10	<i>ne1ne2</i>
24	Тулайковская 5	То же	Эритроспермум 865/Агис 1	7	<i>ne1Ne2^s</i>
25	Тулайковская 10	»	Тулайковская 5/Альбидум 653	3, 4, 5, 7	<i>ne1ne2</i>
26	Тулайковская 11	»	АНК-14-А/Тулун 15	11	<i>ne1ne2</i>
27	Тулайковская 108	»	Тулайковская белозерная/Лютесценс 1222	7, 9	<i>ne1ne2</i>
28	Тулайковская 110	»	Вилозум 1381/Альбидум 653//Тулайковская 5	7	<i>ne1ne2</i>
29	Тулайковская золотистая	»	Тулайковская 5/Альбидум 653	7, 8, 9	<i>ne1ne2</i>
30	Эскада 66	»	Волжанка/Нја-21677//Тулайковская юбилейная	7	<i>ne1ne2</i>
31	Эскада 109	»	Линия 95/Харьковская 112	4, 5, 7, 9	<i>ne1ne2</i>

Таблица 1. Продолжение

№ п.п.	Сорт	Оригинатор	Родословная	Регион	Генотип
32	Алтайская 70	Алтайский НИИСХ	Алтайская 98/Алтайская 325	10, 11, 12	ne/Ine2
33	Алтайская 75	То же	Алтайская 325/Лютесценс 376//Омская 24	10, 11, 12	ne/Ine2 ^{mm}
34	Алтайская 100	»	Ботаническая 2/Жница	10	ne/Ine2
35	Алтайская 110	»	Лютесценс 281/к-54975//Лютесценс 281	10	ne/Ine2
36	Алтайская 325	»	Лютесценс 38/Жигулевская	10, 12	ne/Ine2
37	Алтайская 530	»	Лютесценс 281/к-54975//Лютесценс 281	10	ne/Ine2
38	Алтайская жница	»	Комсомол 90/Лютесценс 281	10	ne/Ine2
39	Алтайская степная	»	Лютесценс 148/Целинная 60	10	ne/Ine2
40	Апасовка	»	Лютесценс 310/к-54975	10	ne/Ine2
41	Сибирский альянс	»	Лютесценс 281/к-54975//Лютесценс 281	10, 11	ne/Ine2
42	Тобольская	»	Лютесценс 123-5/Омская 20	9, 10, 11	ne/Ine2
43	Бэль	ИЦИГ СО РАН	Чернява 13/Тулунская 12	10	Ne I ^{mm} ne2
44	Новосибирская 15	То же	Безенчукская 98/Иртышанка 10//Тулунская 10//Новосибирская 92	10, 11, 12	ne/Ine2
45	Новосибирская 29	»	PPG-38 (Мех)/Новосибирская 22	10, 11	ne/Ine2
46	Новосибирская 31	»	Тюменская 80/3/Л-41 Целинная 20/АНК-102//АНК-102/4/Спорт	10, 11	ne/Ine2
47	Новосибирская 44	»	Скала/Иртышанка/Новосибирская 22/Лютесценс 101/Краснояр-ская	10	Ne I ^{mm} ne2
48	Обская 2	»	Новосибирская 20/Тулайковская 10	10	ne/Ine2
49	Памяти Вавенкова	»	Новосибирская 29/4/Fupello/Бирюсинка	10, 11	ne/Ine2
50	Полушко	»	Обская 14/Новосибирская 22	10	Ne I ^{mm} ne2
51	Сибирская 12	»	Сибирская 24/Сибирская 47	10	ne/Ine2
52	Удача	»	Лютесценс-25//Лютесценс 25/Лютесценс 101/3/Лютесценс 25	10	ne/Ine2
53	Бевчанка	Омский НИИСХ	Саратовская 60/Лютесценс 150-86-10//Саратовская 62/Bastian	9, 10	ne/Ine2
54	Геракл	То же	Лютесценс 211-91-22-10/Лютесценс 13-93-1331	9, 10	Ne I ^{mm} ne2
55	Омская 28	»	Лютесценс 19/Спонтанный гибрид	10	ne/Ine2
56	Омская 29	»	Лютесценс 204-80-1/Лютесценс 99-80-1	10	Ne I ^{mm} ne2
57	Омская 32	»	Лютесценс 162-84-1/CHRIS	10, 11	ne/Ine2
58	Омская 33	»	Лютесценс 137-87-39/Омская 28	10, 11	ne/Ine2
59	Омская 35	»	Омская 29/Омская 30	9, 10	ne/Ine2
60	Омская 3661=	»	Лютесценс 150-86-10/Runar	4, 6, 9, 10	ne/Ine2
61	Омская 37	»	Лютесценс 61-89-100/Лютесценс 350-89-10	9, 10	Ne I ^{mm} ne2

Таблица 1. Продолжение

№ п.п.	Сорт	Оригинатор	Родословная	Регион	Генотип
62	Омская 38	»	Лютесценс 61-89-100/Лютесценс 350-89-10	10	ne1ne2
63	Мелодия	»	Омская 19/Лютесценс 6747	10	ne1ne2
64	Омская краса	»	Омская 33/Л-5-1-97	10, 11	Ne1 ^m ne2
65	Памяти Азиена	»	Саратовская 29/Лютесценс 99-80-1	10	ne1ne2
66	Росинка	»	(М)Сibaковская 3	10, 11	ne1ne2
67	Свекланка	»	Омская 23/Целинная 26	10	ne1ne2
68	Капюша	Омский аграрный ун-тет	Мутант-717/В-2612	10	ne1ne2
69	ОМ ГАУ	То же	Эритроспермум 59/Терция/4*Терция	10	ne1ne2
70	Павлоградка	»	Актюбинская 91/Алтайская 50	10	ne1ne2
71	Сibaковская юбилейная	»	Лютесценс 121*2/АНК-102	10	ne1ne2
72	Маргарита	Ульяновский НИИСХ	Крестьянка/Ишевская//Симбирка/Л-355-83	4, 7	ne1ne2
73	Симбирцит	То же	Крестьянка/Ишевская//Л-503	4, 5, 7, 9	ne1ne2
74	Ульяновская 100	»	Лада/Землячка	7, 9	ne1ne2
75	Эскада 70	»	?	4, 7, 9	ne1ne2
76	Курская 2058	Курский НИИСХ	Л-1401/Харьковская 10	4, 5	ne1ne2
77	Рикс	Томский НИИСХ	Карабалыкская 84/Лютесценс 473	10	ne1ne2
78	Кинельская 61	Поволжский НИИСХ	ISWRN-25/Кулуковская//Заволжская	7	ne1ne2
79	Кинельская 2010	То же	Кинельская 40/Надодорез/3/Кулуковская//Саратовская 29/ Горлеiforme 1440/4/Suppan/5/Л-503/Тулайковская 1	7	ne1ne2
80	Кинельская Нива	»	Тулайковская 1/Л-503	7, 4	ne1ne2
81	Кинельская Отрада	»	Тулайковская 1/к-56395	7	ne1ne2
82	Ленинградская 6	Ленинградский НИИСХ	Ralle/Ленинградская 88	2	ne1ne2
83	Баженка	НИИСХ Северо-Востока	Тулайковская юбилейная/Приокская//Иргина	4	ne1Ne2 ^m
84	Свеча	То же	Бастиан/Энига	1, 4	ne1ne2
85	Красноярская 12	Красноярский НИИСХ	RG 5-1/Лютесценс-375	11	ne1ne2
86	Курганская 2	То же	К-10-18/К-11-11	11	ne1ne2
87	Свирель	»	Омская 313/Красноярская-83/(Е-3864)/2* Зарница// Целинная 21/Красноярская 83	11	ne1ne2
88	Уярочка	»	KS -117/к-46394//Казахстанская 100	11	ne1ne2
89	Учитель	Оренбургский НИИСХ	Оренбургская 1/Целиноградка (F ₆)/(F ₄) Московская 35/ Леукоспермум 51/3/Оренбургская 7	9	ne1ne2
90	Черноземоуральская 2	НИИСХ ЦЧП	?	4, 5, 7	ne1ne2

Таблица 1. Окончание

№ п.п.	Сорт	Оригинатор	Родословная	Регион	Генотип
91	Иделле	Казанский НИИСХ	Амир/Омская 33//Омская 32	7	<i>Ne I^{iv}ne2</i>
92	Иолдыз	То же	Люба/Славянка Сибири	4, 5, 7	<i>Ne I^{iv}ne2</i>
93	Дуэт	Челябинский НИИСХ	Эритроспермум 59//Целинная 20/АНК 20	9, 10	<i>ne I Ne2^{ms}</i>
94	Челяба 2	То же	?	9	<i>Ne I^{im}ne2</i>
95	Челяба степная	»	Эритроспермум 59/Герция	7, 9	<i>ne I ne2</i>
96	Приморская 50	Приморский НИИСХ	Приморская 39/Приобская	12	<i>ne I ne2</i>
97	Дальгау 1	Дальневосточный аграрный госуниверситет	Приморская 93/Мионовская яровая	12	<i>Ne I^{im}ne2</i>
98	Авида	Тюменский НИИСХ	Лютеценс 719-99-А	10	<i>ne I ne2</i>
99	СКЭНТ 3	То же	Шторм/Саратовская 29//Саратовская 29	10	<i>ne I ne2</i>
100	Тюменская 25	»	Саратовская 42/Мионовская яровая	10, 11	<i>ne I ne2</i>
101	Арюна	Бурятский НИИСХ	Селенга/Мионовская юбилейная	11, 12	<i>ne I ne2</i>
102	Бурятская остистая	То же	Бурятская-94/Одесская 66//Лютеценс 105	11	<i>ne I Ne2^{iv}</i>
103	Мис	Владимирский НИИСХ	Тирре/Приокская	2, 3	<i>ne I Ne2^s</i>
104	Дарья	То же	81.5.1.2. (FRA)/Белорусская 80	2, 3, 5	<i>ne I Ne2^{ms}</i>
105	Сударыня	»	Kontessa/Vant//Quatro	1, 2, 3, 4	<i>ne I ne2</i>
106	Уралосибирская	Кургансемена	Лютеценс 13-93-133/Казанская юбилейная	4, 7, 9, 10, 11	<i>ne I ne2</i>
107	КВС Аквилон	Германия	CRBG=03-818/Amaretto	3, 5	<i>ne I Ne2^s</i>
108	Tpiso	Германия	W-448-78/Kadet	2, 3, 5	<i>ne I Ne2^s</i>
109	Granny	Чехия	SG-U-23/SG-U513	5	<i>ne I Ne2^s</i>
110	Любава 5	Хозяйство "Дуэт", Челябинская обл.	Мильтурум-4/Лютеценс-54	9	<i>ne I ne2</i>
111	Алешина	Ананьева З.П. (Кемеровская обл.)	Лютеценс 3229-L-059/Лютеценс 105//Лютеценс 101	10	<i>ne I ne2</i>
112	Дарница	То же	Лютеценс 105/Оренбургская	10	<i>ne I ne2</i>
113	Тулеевская	»	Оливалева/Vendel//Лютеценс 105	9, 10	<i>ne I ne2</i>

Примечание. Название региона см. в табл. 3.

Таблица 2. Частоты распределения генов некроза среди генотипов сортов яровой мягкой пшеницы в различные временные периоды

Генотип	Год мониторинга		
	1997 [17]	2000 [18]	2020
<i>Ne1Ne1ne2ne2</i>	6 (9.1)	28 (14.2)	14 (12.4)
<i>ne1ne1Ne2Ne2</i>	7 (10.6)	29 (14.7)	16 (14.2)
<i>ne1ne1ne2ne2</i>	53 (80.3)	140 (71.1)	85 (73.4)
Итого сортов	66	197	113

Примечание. Для каждого года: *N* (%).

Таблица 3. Частоты генотипов гибридного некроза сортов яровой мягкой пшеницы по регионам

№ п.п.	Регион	Число сортов	Частоты генотипов, %		
			<i>Ne1Ne1ne2ne2</i>	<i>ne1ne1Ne2Ne2</i>	<i>ne1ne1ne2ne2</i>
1	Северный	3	—	—	100.0
2	Северо-Западный	8	—	50.0	50.0
3	Центральный	9	—	66.7	33.4
4	Волго-Вятский	19	5.3	10.5	84.2
5	Центрально-Черноземный	12	8.3	41.7	50.0
6	Северо-Кавказский	2	—	50.0	50.0
7	Средневолжский	25	8.0	8.0	84.0
8	Нижневолжский	7	—	—	100.0
9	Уральский	29	20.7	6.9	72.4
10	Западно-Сибирский	50	14.6	6.0	80.0
11	Восточно-Сибирский	21	4.8	9.5	85.7
12	Дальневосточный	7	14.3	14.3	71.4

левой ржавчине: *Lr23*, *Lr16*, *Lr35*, *Sr19*, *Sr23*, *Sr39*, *Sr36* [25]; а также, что генотип *ne1ne1Ne2Ne2* имеет селективное преимущество над генотипом *Ne1Ne1ne2ne2* наличием генов, определяющих склонность растения к влажным условиям произрастания [18], и по некоторым хозяйственно ценным признакам [26, 27]. И еще одно. Наши эксперименты по изучению селективного наследования генотипов, несущих гены гибридного некроза, показали преимущество в процессе оплодотворения пыльцевых зерен без генов некроза над пыльцой с геном *Ne1* [28].

В целом, сравнительное изучение генетического разнообразия современных сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) России на основе отягощенности их генотипов генами гибридного некроза показало определенную стабильность по временным периодам в соотношении генотипов

без генов некроза и с генами *Ne1* и *Ne2*. Однако число сортов с генотипом *ne1ne1Ne2Ne2* в процессе селекции постепенно, хотя и незначительно, показывает тенденцию к преимущественному увеличению.

Авторы выражают искреннюю благодарность докторам биологических наук С.П. Мартынову и Т.И. Одинцовой за помощь при оформлении данной рукописи в печать.

Работа выполнена при бюджетном финансировании.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объектов животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объектов людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пухальский В.А. Материалы к изучению генов гибридного некроза в роде *Triticum* L. // Генетика. 1996. Т. 32. № 4. С. 541–546.
2. Tsunewaki K. Geographical distribution of necrosis genes in common wheat. I. Genetic basis of necrosis // Annu. Rept. Nat. Inst. Genet. Jap. 1964. № 15. P. 71–79.
3. Tsunewaki K., Nishikawa K.N. Frequencies of *Ne1* and *Ne2* genes in emmer and common wheats // Annu. Rept. Nat. Inst. Genet. Jap. 1963. № 14. P. 64–69.
4. Zeven A.C. Geographical distribution of genes of hybrid necrosis in wheat // Euphytica. 1966. V. 15(3). P. 281–284.
5. Zeven A.C. Eighth supplementary list of wheat varieties classified according to their genotype for hybrid necrosis // Euphytica. 1981. V. 30(1). P. 521–539.
6. Мартынов С.П., Добротворская Т.В., Пухальский В.А. Динамика генетического разнообразия сортов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), районированных на территории России в 1929–2005 гг. // Генетика. 2006. Т. 41. № 10. С. 1359–1370.
7. Декапрелевич Л.Л. О нежизнеспособном потомстве при скрещивании пшениц // Список докл. и тез. Всес. Съезда по генетике, селекции, семеноводству и племенному животноводству. Л.: 1929.
8. Костюченко И.А. Явление преждевременной гибели гибридов при скрещивании пшениц // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. Сер. А. 1936. № 19. С. 127–137.
9. Hermesen J.G.T. Quantitative investigations on progressive necrosis in wheat hybrids // Euphytica. 1960. V. 9(1). P. 141–172.
10. Hermesen J.G.T. Sources and distribution of the complementary genes for hybrid necrosis in wheat // Euphytica. 1963. V. 12. P. 147–160.
11. Hermesen J.G.T. The genetic basis of hybrid necrosis in wheat // Genetica (Netherlands). 1963. V. 4. P. 245–287.
12. Tsunewaki K. Monosomic and conventional gene analyses in common wheat. III Lethality // Jap. J. Genet. 1960. V. 35. № 4. P. 71–75.
13. Nishikawa K. Mapping of necrosis genes *Ne1* and *Ne2* // EWAC Newslett. 1974. № 4. P. 73–74.
14. Chu C.-G., Faris J.D., Friesen T.L., Xu S.S. Molecular mapping of hybrid necrosis genes *Ne1* and *Ne2* in hexaploid wheat using microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 112. P. 1374–1381.
15. Hermesen J.G.T. Classification of wheat varieties on the basis of their genotype of necrosis // Euphytica. 1959. V. 8(1). P. 37–46.
16. Мартынов С.П., Добротворская Т.В., Крупнов В.А. Генеалогический анализ использования двух видов пырея (*Agropyron*) в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на устойчивость к болезням // Генетика. 2016. Т. 52. № 2. С. 179–188.
17. Пухальский В.А., Билинская Е.Н. Некротические генотипы современных сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) России, Украины и Казахстана // Генетика. 1997. Т. 33. № 1. С. 1523–1528.
18. Pukhalskyi V.A., Martynov S.P., Dobrotvorskaya T.V. Analysis of geographical and breeding related distribution of hybrid necrosis // Euphytica. 2000. V. 114. P. 233–240.
19. Пухальский В.А., Билинская Е.Н., Кудрявцев А.М. Мониторинг отягощенности геномов сортов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) генами гибридного некроза // Генетика. 2018. Т. 54. № 12. С. 1466–1472. <https://doi.org/10/1134/S0016675818120123>
20. Singh S., Chaudhary H.K., Sethi G.S. Distribution and allelic expressivity of genes for hybrid necrosis in some elite winter and spring wheat ecotypes // Euphytica. 2000. V. 112. P. 95–100.
21. Zeven A.C. The spread of bread wheat over the Old World since the neolithicum as indicated by its genotype for hybrid necrosis // J. Agriculture Traditionne Lleet. de Botanique Appliquee. 1980. V. 27(1). P. 19–53.
22. Srivastva P.S.L., Singh S.R. Identification of genes for hybrid necrosis in wheat // Indian J. Genet. 1988. V. 35. P. 71–72.
23. Bijral J.S., Gupta B.B., Singh B. et al. Hybrid necrosis in wheat // Indian J. Genet. 1990. V. 50. P. 189–191.
24. Pukhalskyi V.A., Martynov S.P., Bilinskaya E.N. Distribution of hybrid necrosis genes in common wheat cultivars of Australia // Annual Wheat Newsletter. 2009. V. 49. P. 125–127.
25. McIntosh R.A., Hart G.E., Gale M.D. Catalogue of gene symbols for wheat. 1990. Supplement // Cer. Res. Comm. 1990. V. 18(1–2). P. 141–157.
26. Рункина Л.А. О возможной связи генов гибридного некроза с генами, контролирующими другие селекционно-ценные признаки // Бюлл. ВИР. 1991. Вып. 210. С. 24–26.
27. Мережко А.Ф., Рункина Л.А. Изогенные линии яровой мягкой пшеницы по генам гибридного некроза // Сб. тр. ИЦИГ СО РАН “Генетические основы признаков продуктивности растений”. Новосибирск: 1992. С. 119–121.
28. Пухальский В.А., Рыбакова М.И., Иорданская И.В. Селективное наследование некротических генотипов у озимой мягкой пшеницы // Докл. Россельхозакадемии. 1998. № 1. С. 3–4.

Comparative Study of the Genetic Diversity of Hybrid Necrosis Genes in Modern Russian Cultivars of Spring Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.)

V. A. Pukhalskij^{a,*}, E. N. Bilinskaya^a, and A. M. Kudryavtsev^a

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: pukhalsk@vigg.ru

The genetic diversity of hybrid necrosis genes in 113 modern Russian spring bread wheat cultivars was studied. The genomes of 83 (73.4%) cultivars were found to be non-carriers of hybrid necrosis genes (genotype *ne Ine Ine2ne2*). The genomes of 14 cultivars (12.4%) carry the *Ne1* gene (genotype *Ne1Ne1ne2ne2*), while 16 cultivars (14.2%) are *Ne2*-carriers (genotype *ne Ine1Ne2Ne2*). Among the *Ne1*-carriers, the *w* and *m* alleles were discovered, and among the *Ne2*-carriers, the *w*, *m*, *ms* and *s* alleles were found. It was suggested that greater diversity of the cultivars according to allele strength determines the advantage of the *ne Ine1Ne2Ne2* genotype over the *Ne1Ne1ne2ne2* genotype manifested by the fact that cultivars with the *ne Ine1Ne2Ne2* genotype are allowed for commercial use in 10 ecological regions, while those with the *Ne1Ne1ne2ne2* genotype, in seven. In different regions, the frequencies of *Ne1*-carriers vary from 4.8 to 20.7%, and those of *Ne2*-carriers, from 6.0 to 66.7%. Certain stability for frequencies of non-carriers, *Ne1*- and *Ne2*-carriers was observed in different years. However, the number of cultivars of the *ne Ine1Ne2Ne2* genotype tends to increase, although slightly, during breeding.

Keywords: hybrid necrosis, complementary genes, allele strength, spring wheat, *Triticum aestivum* L.

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *BLAD*-МУТАЦИИ В ПОПУЛЯЦИЯХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2021 г. К. Д. Сабетова¹, И. Ю. Подречнева¹ *,
С. Г. Белокуров¹, П. О. Щеголев¹, И. А. Кофиади², **

¹Костромская государственная сельскохозяйственная академия, Костромская область, п. Каравеево, 156530 Россия

²Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 115478 Россия

*e-mail: irina-podrechneva017@rambler.ru

**e-mail: kofiadi@mail.ru

Поступила в редакцию 02.10.2020 г.

После доработки 30.11.2020 г.

Принята к публикации 18.12.2020 г.

Разработана молекулярно-генетическая тест-система для определения мутации дефицита адгезии лейкоцитов крупного рогатого скота (*BLAD*) с использованием ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и апробации на маточном поголовье в племенных хозяйствах Костромской области. Материалом для исследования служили образцы биологического материала (кровь) крупного рогатого скота костромской, ярославской, черно-пестрой и голштинской пород в хозяйствах Костромской области. Общее количество образцов 430. Установлено, что в племенных хозяйствах по разведению костромской и ярославской пород мутации *BLAD* не выявлено. Однако в 192 пробах крови черно-пестрой породы, “улучшенной” голштинской породой, обнаружены семь коров-носителей этой моногенной рецессивной аномалии. Таким образом, усовершенствованная тест-система диагностики *BLAD*-мутации позволяет своевременно выявлять и регистрировать животных-носителей, что способствует элиминации нежелательных аллелей и оздоровлению популяций крупного рогатого скота.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, ген, мутация, дефицит адгезии лейкоцитов, тест-система, ПЦР-РВ.

DOI: 10.31857/S0016675821080130

В XX столетии интенсивное использование мирового породного генофонда и биотехнологий репродукции (искусственное осеменение, трансплантация эмбрионов, клонирование) позволило значительно повысить генетический потенциал продуктивности животных за счет получения потомства производителей – лидеров породы. Вместе с тем в поголовье все чаще проявляются признаки генетической эрозии – накопления груза вредных рецессивных мутаций [1–5].

Одной из ее форм является иммиграционный груз (*immigration load*), когда за счет притока генов из других популяций или пород происходит насыщение улучшаемой породы как положительными в селекционном отношении генами, так и мутациями, отрицательно сказывающимися на здоровье и продуктивности животных. Наследственные заболевания имеют разную степень распространенности в стадах крупного рогатого скота в разных странах мира, но только целенаправленная работа по выявлению и выбраковке носителей мутационных генов позволяет эффективно бороться с их дальнейшим распространением [6–10].

Массовое использование быков-производителей голштинской породы для “улучшения” популяций отечественного черно-пестрого скота внесли в генофонд отечественных пород рецессивные мутации, обуславливающие, в том числе, дефицит адгезии лейкоцитов (*Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency – BLAD*). По сведениям Р.Р. Шайдуллина, Т.Х. Фаизова и А.С. Ганиева, все носители данной мутации являются потомками голштинского быка К. Айвенго Белла 1667366 (линия Монтвик Чифтейн 95679), сперму которого активно использовали для осеменения коров в 50–60-х гг. прошлого века [11].

Молекулярная основа *BLAD* представляет собой точечную амутацию (A→G) в нуклеотиде 383. Мутация нарушает нормальную функцию нейтрофилов, дефектные нейтрофилы теряют способность мигрировать через эпителий капилляров и субэпителиальные мембраны. Ген *BLAD* является “шлейфом” высокой молочности. У особей, гомозиготных по рецессивному аллелю, резко снижается устойчивость к бактериальным и вирусным инфекциям, замедляется рост. Большинство те-

лят погибает в возрасте 3–7 мес. от кишечных и легочных инфекций [12–14].

Разработка и реализация национальных программ против распространения *VLAD*-синдрома привели к тому, что частота рецессивного аллеля гена *CD18* в последнее время значительно снизилась. Однако без систематического мониторинга популяций черно-пестрого скота и других пород с прилитием крови крупного рогатого скота голштинской породы частота встречаемости данной мутации может вновь возрасти. Поэтому разработка новых, более совершенных, тест-систем методом ПЦР для выявления носителей *VLAD* по-прежнему актуальна.

Цель работы – разработка быстрой и чувствительной тест-системы для выявления наследственного дефекта *VLAD* с детекцией в режиме *real-time* и выявление с ее помощью распространения скрытых носителей в популяциях молочного скота Костромской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили образцы крови крупного рогатого скота костромской, ярославской, черно-пестрой пород. Всего было отобрано 430 проб. Для выделения ДНК из биобразцов использовались реактивы из комплекта “ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА” (производитель ООО “НПО ДНК-Технология”): лизирующий рас-

твор, сорбент, промывочные растворы № 1, 2, 3 и элюирующий раствор.

Тест-система предназначена для проведения исследований по идентификации однонуклеотидной замены (A→G) в позиции 383 гена *CD18*, ассоциированной с дефицитом адгезии лимфоцитов у крупного рогатого скота (*VLAD*).

Определение генотипа основано на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, общими для “дикого” и “мутантного” вариантов нуклеотидной последовательности:

VLAD-d 5'-TGGCAGGTCAGGCAGTTGCGTT-3',
VLAD-r 5'-CGACTCGGTGATGCCATTGAGG-3'.

После завершения температурной программы ПЦР флуоресцентные зонды гибридизуются на полученную матрицу путем понижения температуры реакционной смеси. Для определения варианта последовательности используется два типа олигонуклеотидов, гибридизующихся на матрицу. Первый тип олигонуклеотидов помечен флуорофором, второй – гасителем флуоресценции.

Для генотипирования используются два си-квенс-специфичных олигонуклеотида, несущих различные флуорофоры (FAM – предковый аллель, VIC – мутантный аллель):

VLAD-pf 5'-CCCCATCGACCTGTACT-(FAM),
VLAD-pv 5'-CCCCATCGGCCTGTACT-(VIC)

и один олигонуклеотид с гасителем флуоресценции, общий для обоих аллелей:

VLAD-pq (BHQ)-ACCTGATGGACCTCTCCTACTC-(P),

а также минеральное масло, защищающее реакционную смесь от испарения в ходе ПЦР.

Определение генотипа проводилось путем измерения уровня флуоресценции в ходе температурной денатурации дуплексов олигонуклеотидов и полученных матриц. Результаты ПЦР регистрировались в режиме реального времени. Если анализируемый образец содержит только один вариант нуклеотидной последовательности гена, т.е. гомозиготен по данному полиморфизму, температура плавления для зонда, образующего совершенный (полностью комплементарный) дуплекс, существенно выше, нежели для зонда, образующего несовершенный (частично некомплементарный) дуплекс. При анализе гетерозиготного образца, содержащего оба варианта нуклеотидной последовательности, оба варианта зондов образуют совершенный дуплекс, поэтому температуры их плавления практически одинаковы. В реакции используется фермент *Taq*-полимераза в количестве 2.5 единицы активности на реакцию. Для предотвращения испарения амплификационной смеси на водную фазу реакции наслаивается 20 мкл минерального масла.

Тест-система адаптирована к использованию с амплификаторами ДТ-48 (ЗАО “НПФ ДНК-Технология”, Россия). Время проведения анализа составляет 80 мин (табл. 1).

Регистрация результатов ПЦР проводится программным обеспечением для детектирующего амплификатора ДТ-48 автоматически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известен способ одновременного определения синдрома недостаточной адгезии лейкоцитов (*VLAD*) и комплексного порока позвоночника (*CVM*) у крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в реальном времени [15–18]. Недостатком данного способа является то, что для детекции результатов ПЦР и проведения генотипирования используют анализ кинетических кривых ПЦР с определением порогового (*threshold*) цикла. Надежность анализа зависит в данном случае от нескольких параметров: качества очистки образца ДНК, эффективности фермента *Taq*-полимеразы, оптических характеристик амплификатора. Варьирование этих параметров

Таблица 1. Программа амплификации для детектирующего амплификатора ДТ-48 (ООО “НПО ДНК-Технология”)

№ этапа	Температура, °С	Продолжительность, мин	Режим оптического измерения	Число циклов	Тип блока
1	80.0 94.0	02:00 05:00		1	Цикл
2	94.0 67.0	00:30 00:15	V	5	Цикл
3	94.0 67.0	00:05 00:15	V	45	Цикл
4	94.0	00:05		1	Цикл
5	25.0	00:30		1	Цикл
6	25.0	00:15	V	50	Плавление
7	10.0		Хранение		Хранение

повышает вероятность ошибки и ограничивает возможность автоматизированного определения генотипа.

Принцип действия: определение генотипа основано на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, общими для “дикого” и “мутантного” вариантов нуклеотидной последовательности:



Первый тип олигонуклеотидов мечен флуорофором, второй – гасителем флуоресценции.

Для генотипирования используется один общий олигонуклеотид с гасителем флуоресценции (зонд BLAD-pq) и два сиквенс-специфичных олигонуклеотида, несущих различные флуорофоры: BLAD-pf и BLAD-pv (FAM маркирует предковый аллель, VIC – мутантный аллель). Определение генотипа проводится путем измерения уровня флуоресценции в ходе температурной денатурации дуплексов олигонуклеотидов и полученных матриц. Результаты регистрируются в режиме реального времени.

Если анализируемый образец содержит только один вариант нуклеотидной последовательности гена, т.е. гомозиготен по данному полиморфизму, температура плавления для зонда, образующего со-

BLAD-d 5'-TGGCAGGTCAGGCAGTTGCGTT-3',
BLAD-r 5'-CGACTCGGTGATGCCATGAGG-3'.

После завершения температурной программы ПЦР флуоресцентные зонды гибридизуются на полученную матрицу путем понижения температуры реакционной смеси. Для определения варианта последовательности используются три типа олигонуклеотидов, гибридизующихся на матрицу:

вершенный (полностью комплементарный) дуплекс, существенно выше, нежели для зонда, образующего несовершенный (частично некомплементарный) дуплекс (рис. 1).

При анализе гетерозиготного образца, содержащего оба варианта нуклеотидной последовательности, оба варианта зондов образуют совершенный дуплекс, поэтому температуры их плавления неодинаковы (рис. 2).

Разные кривые плавления дают возможность четко разделять образцы на основе их форм. Специфичность тест-системы оценивали биоинформационным методом, сравнивая последовательность разработанных праймеров против базы данных геномных последовательностей GenBank и проверяя их на температурную стабильность и температуру отжига с помощью программного

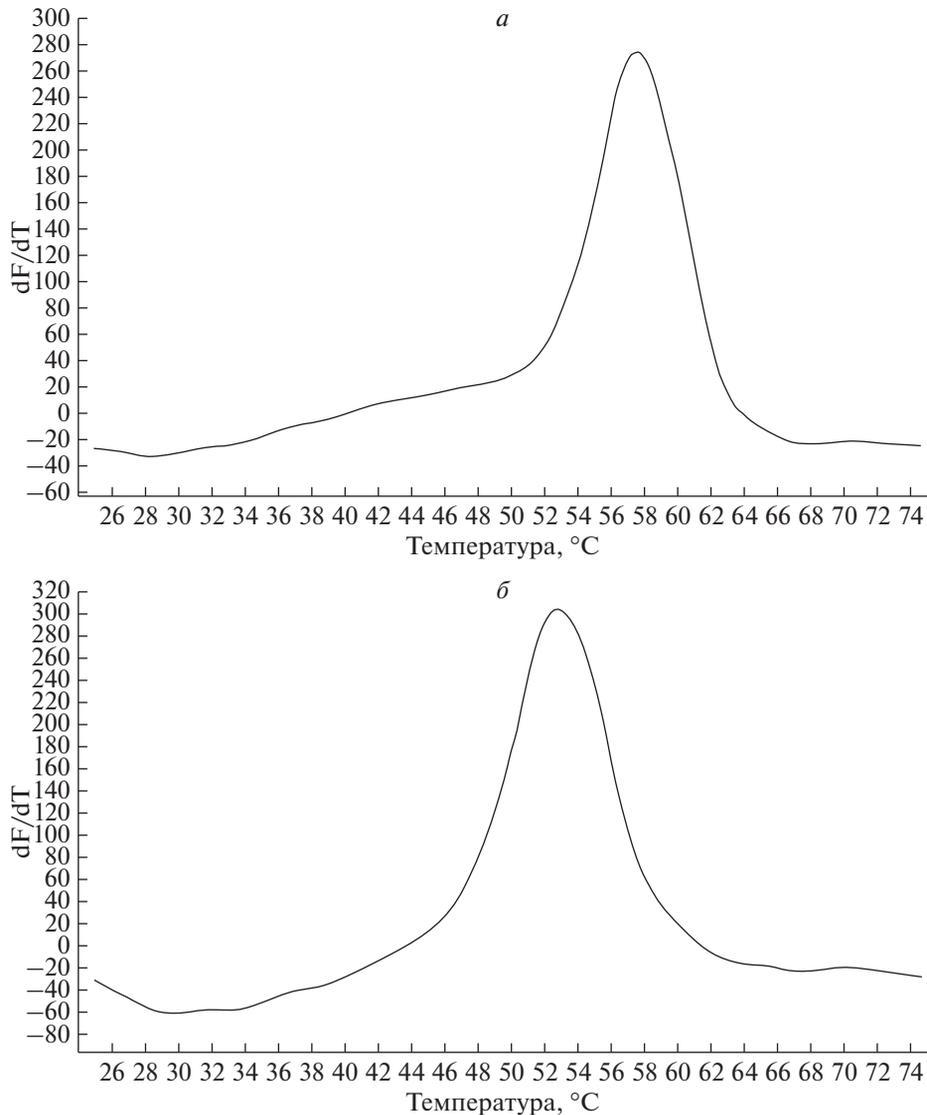


Рис. 1. Кривые плавления ДНК-дуплексов гомозиготного образца, полученные с помощью детектирующего амплификатора ДТ-48 (ООО «НПФ ДНК-Технология»). *а* – канал FAM, *б* – канал HEX.

обеспечения Oligo 6.0. По результатам проверки ни один из праймеров не обладал достаточной степенью гомологии с геномом человека для того чтобы привести к синтезу неспецифической мишени на расчетной температуре отжига. Чувствительность тест-системы оценивали методом серийных разведений – она составляет 50 копий ДНК на реакцию. Тест-система демонстрирует стабильную воспроизводимость результатов при анализе количества копий ДНК, превышающего порог чувствительности тест-системы.

Разработанную тест-систему для диагностики дефицита лейкоцитарной адгезии (BLAD) апробировали в племенных стадах Костромской области по разведению костромской, ярославской и черно-пестрой, «улучшенной» голштинской породой. В качестве отрицательного контроля взята

костромская порода крупного рогатого скота, у которой отсутствует эта рецессивная мутация. В табл. 2 приведены результаты лабораторных исследований.

Из данных таблицы следует, что в племенных хозяйствах по разведению отечественных костромской и ярославской пород *BLAD*-мутации не выявлено. Однако из 192 проб крови черно-пестрой породы, «улучшенной» голштинской породой, выявлено 3.6% животных-носителей этой аномалии, что превышает среднюю частоту встречаемости *BLAD*-мутации в отечественных популяциях, которая составляет 2.17% (по данным Л.К. Эрнста) [19, 20].

Таким образом, разработанная тест-система *BLAD*-мутации позволяет своевременно выяв-

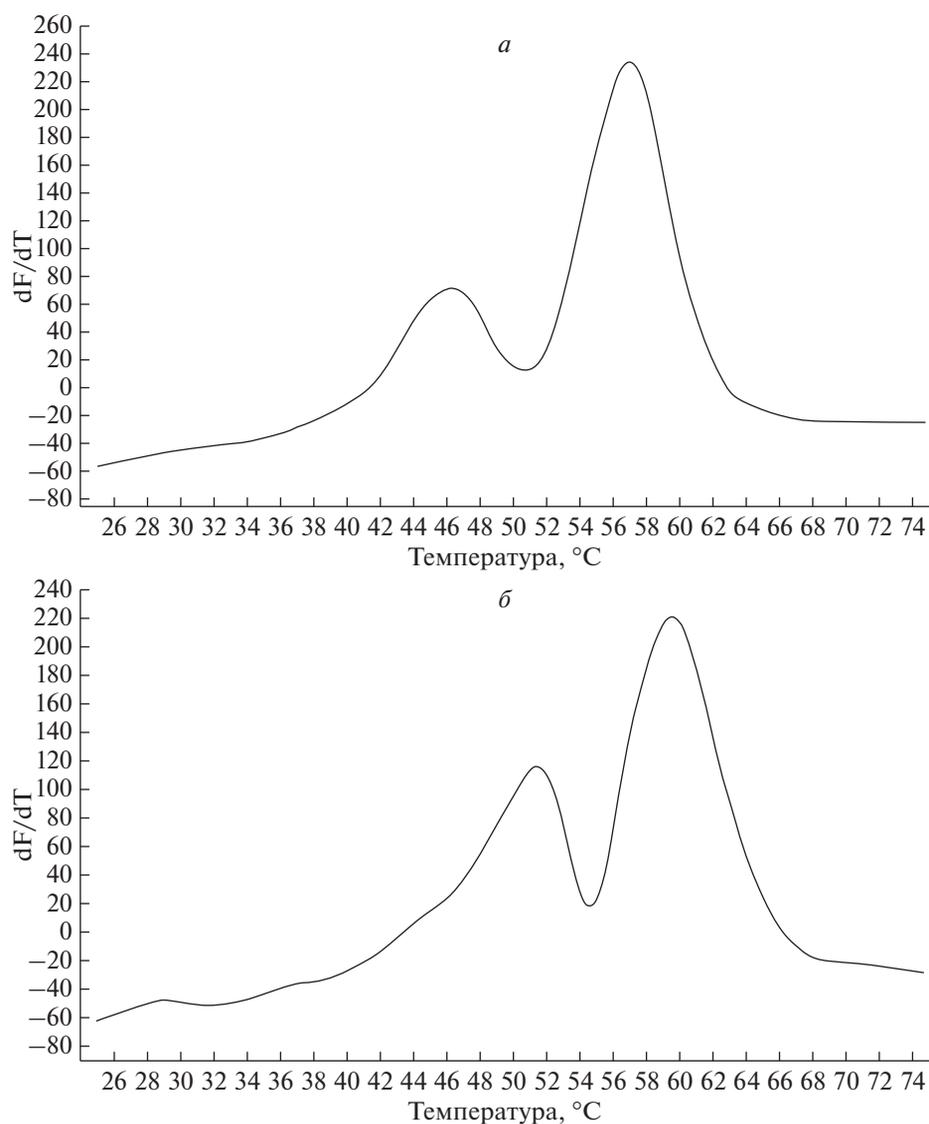


Рис. 2. Кривые плавления ДНК-дуплексов гетерозиготного образца, полученные с помощью детектирующего амплификатора ДТ-48 (ООО “НПФ ДНК-Технология”). *а* – канал FAM, *б* – канал HEX.

лять и регистрировать животных-носителей, что способствует элиминации нежелательных аллелей и оздоровлению популяций крупного рогатого скота.

Авторы выражают глубокую признательность ФГБУ “ГНЦ Институт иммунологии” ФМБА России за методическую поддержку и помощь в разработке тест-системы.

Таблица 2. Результаты исследования крупного рогатого скота различных пород на присутствие *BLAD*-мутации

Порода	Не носители TL		Носители BL		Носитель в гомозиготном состоянии
	число	%	число	%	
Костромская	98	100	–	–	–
Ярославская	96	100	–	–	–
Голштинская	50	100	–	–	–
Черно-пестрая “улучшенная” голштинами	185	96.4	7	3.6	–

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в рамках государственного задания, регистрационный номер проекта АААА-А19-119092690091-7.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эрнст Л.К., Жигачев А.И. Профилактика генетических аномалий крупного рогатого скота. Л., 1990. 238 с.
2. Жигачев А.И. Заболевания скота XXI века – откуда они? // Наше племенное дело. 2004. № 3. С. 9–11.
3. Sahana G., Nielsen U.S., Aamand G.P. et al. Novel harmful recessive haplotypes identified for fertility traits in nordicholstein cattle // PLoS One. 2013. V. 8: e82909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082909>
4. VanRaden P.M., Olson K.M., Null D.J., Hutchison J.L. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes // J. Dairy Sci. 2011. Is. 94. P. 6153–6161. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4624>
5. Усова Т.П., Усманова Н.Н., Литвина Н.И., Усов Н.В. Распространение *VLAD*-синдрома убывков-производителей голштинской породы отечественной и импортной селекции // Вестник Рос. гос. аграрного заочного ун-та [Балашиха]. 2017. № 25(30). С. 20–24.
6. Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. и др. Молекулярные методы в диагностике заболеваний и наследственных дефектов сельскохозяйственных животных // Зоотехния. 2009. № 8. С. 26–27.
7. Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А., Харзинова В.Р. и др. Роль ДНК-диагностики в контроле и элиминации рецессивных наследственных аномалий сельскохозяйственных животных // Достижения науки и техники АПК. 2012. № 11. С. 37–40.
8. Fritz S., Capitan A., Djari A. et al. Detection of haplotypes associated with prenatal death in dairy cattle and identification of deleterious mutations in GART, SHBG and SLC37A2 // PLoS One. 2013. № 8(6): e65550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065550>
9. Нургалиев Ф.М., Толькин С.В., Ахметов Т.М. Оптимизация способов выявления у животных рецессивных мутаций // Уч. зап. Казанской гос. академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2011. Т. 208. С. 39–44.
10. Меллат Э. *VLAD* – генетическое расстройство крупного рогатого скота // Сб. статей XIII межд. научно-практ. конф. М.: ООО “Актуальность РФ”, 2018. С. 16–18.
11. Шайдуллин Р.Р., Фаизов Т.Х., Ганиев А.С. Характер распространения летальных генов у молочного скота // Уч. зап. Казанской гос. академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2015. Т. 222. № 2. С. 242–245.
12. Зиновьева Н.А., Доцев А.В., Сермягин А.А. и др. Изучение генетического разнообразия и популяционной структуры российских пород крупного рогатого скота с использованием полногеномного анализа SNP // С.-х. биология. 2016. № 51(6). С. 788–800. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.6.788rus>
13. Зиновьева Н.А., Стрекозов Н.И., Ескин Г.В. и др. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве // Животноводство России. 2015. № 6. С. 30–31.
14. Тумилович Я.И., Борунова С.М. Генетические аномалии у крупного рогатого скота голштинской породы // Достижения молодых ученых в ветеринарной практике: Материалы IV межд. науч. конф., посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ “ВНИИЗЖ”. 2016. С. 104–105.
15. Филипенкова Г.В., Делян А.С., Светличкин В.В. Теоретическое и экспериментальное обоснование методов ДНК-анализа для оценки генетического материала голштинской породы КРС // Аэкономика: экономика и сельское хозяйство. 2017. № 8(20). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/teoreticheskoe-i-eksperimentalnoe-obosnovanie-metodov-dnk-analiza-dlya-otsenki-geneticheskogo-materiala-golsh-tinskoj-porody-kr>
16. Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Алексеев Я.И. и др. Способ одновременной генодиагностики двух мутантных аллелей, вызывающих *CVM* и *VLAD* у крупного рогатого скота, и тест-система для его осуществления // Патент на изобретение RU 2601151 C2, 27.10.2016. Заявка № 2015104459/10 от 11.02.2015.
17. Лазарева А.Д., Русакова А.В., Денисова В.В. и др. Исследование мутации комплексного порока позвоночника (*CVM*) и дефицита лейкоцитарной адгезии (*VLAD*) у крупного рогатого скота // XLVIII Огаревские чтения: Материалы науч. конф. В 3-х частях / Под ред. Сенина П.В. 2020. С. 129–132.
18. Трухачев В.И., Селионова М.И., Чижова Л.Н. и др. ДНК-диагностика наследственных заболеваний молочного скота // Вестник АПК Ставрополя. 2017. № 2(26). С. 120–125.
19. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А., Сибатуллин Ф.С. и др. Изучение мутантных генов наследственных заболеваний убывков-производителей в разных регионах Российской Федерации // Ветеринарный врач. 2012. № 1. С. 43–47.
20. Эрнст Л.К., Гладырь Е.А., Горелов П.В. и др. Характеристика региональных популяций убывков-производителей по генам наследственных заболеваний // Достижения науки и техники АПК. 2011. № 10. С. 28–30.

The Test System for *BLAD* Mutation Diagnosis in Cattle Populations

K. D. Sabetova^a, I. Yu. Podrechneva^{a,*}, S. G. Belokurov^a, P. O. Schiogolev^a, and I. A. Kofiadi^{b,**}

^a*Kostroma State Agricultural Academy, Kostromskaya oblast, Karavaevo, 156530 Russia*

^b*Institute of Immunology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, 115478 Russia*

^{*}*e-mail: irina-podrechneva017@rambler.ru*

^{**}*e-mail: kofiadi@mail.ru*

The goal of this work was to develop the molecular genetic test system for determining the BLAD mutation using real-time PCR and to test a pedigree cattle in breeding farms of Kostroma region. The materials for the study were samples of biological material (blood) of cattle of Kostroma breed, Yaroslavl breed, Black-and-white breed and Holstein breed in farms of the Kostroma region. The total number of samples is 430. It was discovered that no BLAD mutation was detected in breeding farms of Kostroma breed and Yaroslavl breed. However, 7 carriers of this monogenic recessive anomaly were found in 192 blood samples of the Holstenized black-and-white breed. So, the improved BLAD mutation test system allows to detect and to register carrier animals timely what promotes to elimination of undesirable alleles and invigoration of cattle populations.

Keywords: cattle, gene, mutation, blood leukocyte adhesion deficiency, test system, PCR RT.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА РИСК РАЗВИТИЯ РАССТРОЙСТВ С ДЕПРЕССИВНОЙ СИМПТОМАТИКОЙ

© 2021 г. Е. И. Рафикова¹ *, Д. В. Шибалев¹, М. И. Шадрина², П. А. Сломинский²,
А. Б. Гехт³, А. П. Рысков¹, В. А. Васильев¹

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

²Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра
“Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

³Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева, Москва, 115419 Россия

*e-mail: kat.rafikov@gmail.com

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.

После доработки 04.11.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

Депрессия характеризуется чрезвычайно высокой гетерогенностью по клиническим проявлениям. У разных пациентов с большим депрессивным расстройством может совпадать всего несколько из множества симптомов депрессии. Поиск молекулярно-генетических маркеров депрессии зачастую дает противоречивые результаты, что может быть связано с гетерогенностью выборок. В данной работе были выявлены генетические факторы риска для трех заболеваний, отличающихся выраженной депрессивной симптоматикой. Был изучен полиморфизм генов транспортера дофамина (*SLC6A3/DAT1*), рецепторов дофамина (*DRD4* и *DRD2*), а также фермента катехол-О-метилтрансферазы (*COMT*) у пациентов с тремя диагнозами: депрессивный эпизод, рекуррентная депрессия и смешанное тревожное и депрессивное расстройство. У пациентов со смешанным тревожным и депрессивным расстройством наблюдались статистически значимые различия в распределении аллелей локуса *SLC6A3 (DAT1)* 40 пн VNTR. Короткий аллель (*8R* и *9R*) встречался чаще у пациентов по сравнению с контрольной группой ($p = 0.005$), значимые отличия наблюдались и в распределении генотипов этого локуса ($p = 0.025$). Не было выявлено ассоциаций между локусами дофаминергической системы и риском развития депрессивного эпизода и рекуррентной депрессии.

Ключевые слова: депрессия, тревожность, *SLC6A3*, *DAT1*, *DRD4*, *DRD2*, *COMT*.

DOI: 10.31857/S0016675821070110

Депрессия отличается высокой гетерогенностью по симптоматике и особенностям течения. У пациентов с одним и тем же диагнозом – большое депрессивное расстройство – может совпадать только несколько из множества симптомов депрессии. Сочетание и выраженность симптомов имеют значение для прогноза и выбора терапии. Существует несколько подходов к классификации депрессивных расстройств: в соответствии с полярностью (униполярная и биполярная), преобладающей симптоматикой (меланхолическая, тревожная, атипическая, психотическая), возрастом проявления болезни, наличием или отсутствием рецидивов (депрессивный эпизод и рекуррентная депрессия) и тяжестью течения [1].

Согласно DSM-V (Диагностико-статистическое руководство по психическим расстройствам Американской психиатрической ассоциации, 2013) определяющими симптомами депрессии являются

депрессивное настроение и ангедония. В МКБ-10 (Международная классификация болезней 10-го пересмотра) добавлен еще один симптом – снижение энергии, или повышенная утомляемость [2]. Современная классификация депрессии основана на особенностях ее течения: полярности, наличии рецидивов и тяжести. Так, в МКБ-10 к расстройствам настроения с депрессивной симптоматикой относятся биполярное аффективное расстройство (F 31), депрессивный эпизод (F 32) и рекуррентное депрессивное расстройство (F 33). Рекуррентная депрессия отличается повторяющимися депрессивными эпизодами, которые чередуются с периодами ремиссии. При биполярном расстройстве депрессивная фаза чередуется с маниакальной. Кроме того, депрессивные симптомы проявляются и при других расстройствах, что тоже учитывается в МКБ-10. Смешанное тревожное и депрессивное расстройство (F 41.2) от-

носится к тревожным расстройствам и характеризуется наличием симптомов тревоги и депрессии, выраженных в равной степени.

Гетерогенность депрессивных расстройств позволяет предположить, что на развитие разных подтипов и симптомов депрессии могут влиять разные факторы, в том числе полиморфизм разных генов. Гены дофаминергической системы активно изучаются как маркеры различных психических расстройств, в том числе депрессии. Для ряда полиморфных вариантов генов дофаминовой системы были показаны различия в эффективности транскрипции или активности соответствующих белков, а также ассоциация с большим депрессивным расстройством. В нескольких исследованиях была показана зависимость между длиной локуса *SLC6A3* 40 пн VNTR (полиморфизм числа tandemных повторов) гена дофаминового транспортера и активностью экспрессии, хотя результаты этих исследований были противоречивыми [3–6]. Гомозиготный генотип с девятью повторами (*9R/9R*) в этом локусе предположительно связан с более тяжелым течением депрессии [7]. На экспрессию гена рецептора дофамина *DRD4* влияют два локуса: 48 пн VNTR в экзоне 3 и 120 пн VNTR в промоторном регионе [8, 9]. Согласно результатам метаанализа, *DRD4* 48 пн VNTR-полиморфизм связан с униполярной депрессией и аллель с двумя повторами (*2R*) повышает риск ее возникновения [10]. Также была показана ассоциация между депрессией и длинным (*L*) аллелем локуса 120 пн VNTR [11]. Рецептор *DRD2* присутствует в тканях мозга в меньшем количестве у носителей *T*-аллеля локуса rs1800497 [12] и, возможно, повышает риск депрессии [13, 14]. Было изучено влияние полиморфизма rs4680 гена *COMT*, ведущего к аминокислотной замене, на активность фермента. Для аллеля *G* (Val) характерна более высокая активность [15]. Несмотря на результаты отдельных работ, метаанализ не подтвердил влияния этого локуса на риск депрессии [16].

В большинстве исследований молекулярно-генетических маркеров депрессии проводили сравнение распределения аллелей и генотипов между контрольной группой и общей выборкой пациентов с разным течением заболевания. Целью настоящей работы было проверить полученные ранее результаты отдельно на выборках с разными нозологическими формами депрессивных расстройств и другими расстройствами с выраженными симптомами депрессии. В данной работе проведен анализ пяти полиморфных локусов четырех генов дофаминовой системы (*SLC6A3/DAT1*, *DRD4*, *DRD2*, *COMT*) на трех выборках пациентов с диагнозами “депрессивный эпизод” (ДЭ), “рекуррентное депрессивное расстройство” (РД) и “смешанное тревожное и депрессивное расстройство” (СТДР).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено с использованием трех групп пациентов психиатрической больницы, диагностированных в согласии с критериями МКБ-10. В первую группу было включено 108 пациентов с диагнозом “депрессивный эпизод” (код МКБ – F 32.1; 63 женщины (58.3%), 45 мужчин (41.7%); средний возраст 31.7). Во вторую группу вошло 149 пациентов с диагнозом “рекуррентная депрессия” (код МКБ – F 33.1; 101 женщина (67.8%), 48 мужчин (32.2%); средний возраст 34.2). Третья группа состояла из 100 пациентов с диагнозом “смешанное тревожное и депрессивное расстройство” (код МКБ – F 41.2; 52 женщины (52%), 48 мужчин (48%); средний возраст 33.9). Возраст появления симптомов заболевания составил 18–45 лет, все пациенты были восточнославянского происхождения, у всех пациентов в анамнезе отсутствовали шизофрения, алкоголизм, злоупотребление наркотиками, онкологические заболевания, неврологические расстройства (деменция, болезнь Паркинсона, инсульт, эпилепсия и др.). Обследование пациентов и получение образцов крови проводились в Научно-практическом психоневрологическом центре департамента здравоохранения г. Москвы.

В качестве контрольной группы использовалась выборка из 163 человек из восточнославянской популяции Москвы и регионов Центральной России (101 женщина (62%), 62 мужчины (38%); средний возраст 61.9). От всех пациентов было получено информированное согласие. Этический комитет Института молекулярной генетики одобрил исследование.

Геномную ДНК получали из 250 мкл антикоагулированной венозной крови, используя набор innuPREP Blood DNA Mini (Analytik Jena AG, Германия), в соответствии с рекомендациями производителя. Генотипирование проводилось с использованием методов, описанных ранее [17–19].

Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга было рассчитано с помощью онлайн-калькулятора (<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>). Для анализа распределения частот аллелей и генотипов использовалось программное обеспечение Statistica (версия 7). Различия в распределении частот аллелей и генотипов у пациентов и контрольной группы были проанализированы с помощью критерия Пирсона χ^2 . Коррекция на множественные сравнения проводилась методом Беньямини–Хохберга. В таблицах с результатами указаны скорректированные значения *p*-value для каждого локуса. Различия считались достоверными при $p < 0.05$. Сила ассоциаций между аллельными вариантами изученных локусов и депрессивными расстройствами оценивалась с использованием

Таблица 1. Частоты распределения аллелей и генотипов локуса *SLC6A3* (*DAT1*) 40 пн VNTR

Выборка, показатель	Генотипы, <i>n</i> (%)			Аллели, <i>n</i> (%)	
	<i>LL</i>	<i>LS</i>	<i>SS</i>	<i>L</i>	<i>S</i>
Контрольная группа	113 (69.3)	46 (28.2)	4 (2.5)	272 (83.4)	54 (16.6)
ДЭ	61 (56.5)	41 (38)	6 (5.6)	163 (75.5)	53 (24.5)
χ^2 (<i>p</i> -value)	5.28 (0.355)			5.21 (0.11)	
ОШ, 95% ДИ	0.57, 0.35–0.95	1.56, 0.93–2.61	2.34, 0.64–8.49	1.64, 1.07–2.51	
РД	85 (57)	59 (39.6)	5 (3.4)	229 (76.8)	69 (23.2)
χ^2 (<i>p</i> -value)	5.06 (0.199)			4.27 (0.153)	
ОШ, 95% ДИ	0.59, 0.37–0.94	1.67, 1.04–2.68	1.38, 0.36–5.24	1.52, 1.02–2.26	
СТДР	52 (52)	39 (39)	9 (9)	143 (71.5)	57 (28.5)
χ^2 (<i>p</i> -value)	10.57 (0.025)			10.61 (0.005)	
ОШ, 95% ДИ	0.48, 0.29–0.8	1.63, 0.96–2.75	3.93, 1.18–13.13	2, 1.31–3.07	

Примечание. *L*-аллель содержит ≥ 10 повторов, *S*-аллель содержит < 10 повторов; полужирным шрифтом выделены статистически значимые результаты. Для табл. 1–5: ОШ рассчитаны для каждого генотипа против двух других генотипов и для редких аллелей.

отношений шансов (ОШ) с 95%-ными доверительными интервалами (ДИ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Контрольная группа и все пациенты были генотипированы по следующим локусам: *SLC6A3* (*DAT1*) 40 пн VNTR, *DRD2* rs1800497, *DRD4* VNTR 120 пн и 48 пн VNTR, *COMT* rs4680. Распределение аллелей и генотипов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга.

По локусу *SLC6A3* 40 пн VNTR у пациентов с симптомами депрессии были выявлены аллели с тремя, 8–10, 12 и 13 повторами. В контрольной группе встречались носители аллелей с шестью, 8–10 и 11 повторами. Наиболее распространены аллели *9R* и *10R*. В наших выборках *9R* и *10R* аллели встречались с частотой 16 и 82% в контрольной группе, 24 и 75% у пациентов с ДЭ, 23 и 77% у пациентов с РД, 28 и 71% у пациентов с СТДР соответственно. Учитывая полученные ранее данные о взаимосвязи длины локуса *SLC6A3* 40 пн VNTR и активности экспрессии гена [6], мы разделили пациентов на носителей длинного (*L*, long) аллеля с десятью и более повторами и короткого (*S*, short) аллеля с девятью и менее повторами. Короткий *S*-аллель встречался чаще, чем в контрольной группе, во всех трех выборках пациентов с депрессивной симптоматикой: 24.5% у пациентов с ДЭ, 23.2% у пациентов с РД, 28.5% у пациентов с СТДР и 16.6% в контрольной группе. Была выявлена ассоциация локуса *SLC6A3* 40 пн VNTR со смешанным тревожным и депрессивным расстройством, отличия наблюдались в распределении как аллелей ($p = 0.005$), так и генотипов

($p = 0.025$). У пациентов с СТДР редкий *S*-аллель встречался чаще, чем в контрольной группе. Наличие хотя бы одного *S*-аллеля было связано с риском развития заболевания, ОШ составило 3.93 и 1.63 для *SS*- и *LS*-генотипов соответственно и 0.48 для генотипа *LL*. Хотя в выборках пациентов с ДЭ и РД *S*-аллель также встречался чаще по сравнению с контрольной группой, эти различия не были статистически значимыми после поправки на множественные сравнения (табл. 1).

По локусу *DRD4* 48 пн VNTR наиболее распространены аллели с двумя, четырьмя и семью повторами. В наших выборках присутствовали носители аллелей с числом повторов от 2 до 10. Практически все аллели были представлены во всех выборках с приблизительно одинаковой частотой, аллель с десятью повторами встречался только в контрольной группе, аллель с девятью повторами отсутствовал в выборке пациентов с СТДР. Аллели *2R*, *4R*, *7R* встречались в изученных выборках со следующими частотами: 7, 71 и 14% в контроле, 6, 71 и 14% у пациентов с ДЭ, 9, 68 и 16% у пациентов с РД, 10, 67 и 16% у пациентов с СТДР соответственно. Для проверки взаимосвязи между длиной локуса *DRD4* 48 пн VNTR и риском развития депрессии мы классифицировали пациентов как носителей длинного (*L*) аллеля с семью и более повторами и короткого (*S*) аллеля с шестью и менее повторами. Распределение аллелей *S* и *L* во всех изученных выборках было примерно одинаковым (табл. 2). Подробные данные о распределении всех аллелей, включая редкие, и генотипов локусов *SLC6A3* 40 пн VNTR и *DRD4* 48 пн VNTR в наших выборках даны в Приложении (табл. П.1).

Таблица 2. Частоты распределения аллелей и генотипов локуса *DRD4* 48 пн VNTR

Выборка, показатель	Генотипы, <i>n</i> (%)			Аллели, <i>n</i> (%)	
	<i>SS</i>	<i>LS</i>	<i>LS</i>	<i>S</i>	<i>L</i>
Контрольная группа	114 (71.7)	41 (25.8)	4 (2.5)	269 (84.6)	49 (15.4)
ДЭ	77 (71.3)	29 (26.9)	2 (1.9)	183 (84.7)	33 (15.3)
χ^2 (<i>p</i> -value)	0.155 (0.925)			<0.001 (0.967)	
ОШ, 95% ДИ	1, 0.58–1.72	1.06, 0.61–1.84	0.73, 0.13–4.06	0.99, 0.61–1.6	
РД	100 (67.1)	44 (29.5)	5 (3.4)	244 (81.9)	54 (18.1)
χ^2 (<i>p</i> -value)	0.81 (0.667)			0.81 (0.612)	
ОШ, 95% ДИ	0.81, 0.49–1.31	1.21, 0.73–1.99	1.38, 0.36–5.24	1.22, 0.79–1.86	
СТДР	67 (68.4)	29 (29.6)	2 (2)	163 (83.2)	33 (16.8)
χ^2 (<i>p</i> -value)	0.48 (0.811)			0.18 (0.668)	
ОШ, 95% ДИ	0.85, 0.49–1.48	1.21, 0.69–2.12	0.81, 0.14–4.49	1.11, 0.69–1.8	

Примечание. *L*-аллель содержит ≥ 7 повторов, *S*-аллель содержит < 7 повторов.

Таблица 3. Частоты распределения аллелей и генотипов локуса *DRD4* 120 пн VNTR

Выборка, показатель	Генотипы, <i>n</i> (%)			Аллели, <i>n</i> (%)	
	<i>LL</i>	<i>LS</i>	<i>SS</i>	<i>L</i>	<i>S</i>
Контрольная группа	116 (71.2)	41 (25.1)	6 (3.7)	273 (83.7)	53 (16.3)
ДЭ	81 (75)	26 (24.1)	1 (0.9)	188 (87)	28 (13)
χ^2 (<i>p</i> -value)	2.07 (0.6)			1.11 (0.487)	
ОШ, 95% ДИ	1.22, 0.7–2.11	0.94, 0.54–1.66	0.24, 0.03–2.06	0.77, 0.47–1.26	
РД	116 (77.9)	33 (22.1)	0	265 (88.9)	33 (11.1)
χ^2 (<i>p</i> -value)	6.25 (0.199)			3.52 (0.153)	
ОШ, 95% ДИ	1.42, 0.85–2.38	0.85, 0.5–1.43	0.08, 0–1.45	0.64, 0.4–1.02	
СТДР	63 (63)	34 (34)	3 (3)	160 (60)	40 (20)
χ^2 (<i>p</i> -value)	2.39 (0.755)			1.19 (0.653)	
ОШ, 95% ДИ	0.69, 0.4–1.17	1.53, 0.89–2.64	0.81, 0.2–3.31	1.29, 0.82–2.03	

По локусам *DRD4* VNTR 120 пн, *DRD2* rs1800497 и *COMT* rs4680 различий в распределении частот аллелей и генотипов выявлено не было (табл. 3–5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Целью данной работы было выявить генетические факторы риска для разных заболеваний с депрессивной симптоматикой, различающихся по особенностям течения (депрессивный эпизод и рекуррентная депрессия) и преобладающим симптомам (смешанное тревожное и депрессивное расстройство). Все исследованные выборки были гомогенны по этническому происхожде-

нию, а также сопоставимы по возрасту и соотношению полов участников. Было изучено пять локусов четырех генов дофаминергической системы.

Наше исследование подтвердило ассоциацию локуса *SLC6A3* 40 пн VNTR только со смешанным тревожным и депрессивным расстройством (табл. 1). Хотя во всех трех выборках пациентов с депрессивными симптомами аллель с девятью и менее повторами встречается чаще, чем в контрольной группе, только у пациентов со смешанным тревожным и депрессивным расстройством эти различия были статистически значимыми. Ранее было показано, что экспрессия аллеля *9R* снижена на 50% по сравнению с аллелем *10R* [6].

Таблица 4. Частоты распределения аллелей и генотипов локуса *DRD2* rs1800497

Выборка, показатель	Генотипы, <i>n</i> (%)			Аллели, <i>n</i> (%)	
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>
Контрольная группа	95 (58.3)	63 (38.6)	5 (3.1)	253 (77.6)	73 (22.4)
ДЭ	72 (66.7)	34 (31.5)	2 (1.9)	178 (82.4)	38 (17.6)
χ^2 (<i>p</i> -value)	2.04 (0.6)			1.84 (0.438)	
ОШ, 95% ДИ	1.43, 0.86–2.38	0.73, 0.44–1.22	0.6, 0.11–3.13	0.74, 0.49–1.14	
РД	96 (64.4)	45 (30.2)	8 (5.4)	237 (79.5)	61 (20.5)
χ^2 (<i>p</i> -value)	3.08 (0.358)			0.34 (0.672)	
ОШ, 95% ДИ	1.3, 0.82–2.05	0.69, 0.43–1.1	1.79, 0.57–5.61	0.89, 0.61–1.31	
СТДР	64 (64)	33 (33)	3 (3.1)	161 (80.5)	39 (19.5)
χ^2 (<i>p</i> -value)	0.88 (0.644)			0.62 (0.432)	
ОШ, 95% ДИ	1.27, 0.76–2.13	0.78, 0.46–1.32	0.97, 0.23–4.15	0.84, 0.54–1.3	

Таблица 5. Частоты распределения аллелей и генотипов локуса *COMT* rs4680

Выборка, показатель	Генотипы, <i>n</i> (%)			Аллели, <i>n</i> (%)	
	<i>AA (Met/Met)</i>	<i>GA (Val/Met)</i>	<i>GG (Val/Val)</i>	<i>A (Met)</i>	<i>G (Val)</i>
Контрольная группа	48 (29.4)	78 (47.9)	37 (22.7)	174 (53.4)	152 (46.6)
ДЭ	34 (31.5)	46 (42.6)	28 (25.9)	114 (52.8)	102 (47.2)
χ^2 (<i>p</i> -value)	0.76 (0.853)			0.02 (0.967)	
ОШ, 95% ДИ	1.1, 0.65–1.87	0.81, 0.49–1.32	1.19, 0.68–2.1	1.02, 0.73–1.45	
РД	37 (24.8)	80 (53.7)	32 (21.5)	154 (41.7)	144 (48.3)
χ^2 (<i>p</i> -value)	1.18 (0.667)			0.18 (0.672)	
ОШ, 95% ДИ	0.79, 0.48–1.31	1.26, 0.81–1.97	0.93, 0.55–1.59	1.07, 0.78–1.47	
СТДР	26 (26)	49 (49)	25 (25)	101 (50.5)	99 (49.5)
χ^2 (<i>p</i> -value)	0.42 (0.811)			0.41 (0.522)	
ОШ, 95% ДИ	0.84, 0.48–1.47	1.05, 0.64–1.72	1.13, 0.63–2.03	1.12, 0.79–1.6	

Возможно, дефицит транспортера дофамина и, следовательно, усиленная дофаминовая передача увеличивают риск смешанного тревожного и депрессивного расстройства.

Локус *DRD4* 120 пн VNTR был изучен ранее у пациентов с большим депрессивным расстройством. *L*-аллель и *LL*-генотип встречались у пациентов чаще, чем в контрольной группе [11]. На российской выборке эти результаты подтвердить не удалось. Ни на одной из выборок нам не удалось подтвердить показанную ранее ассоциацию между локусами *DRD2* rs1800497 и *DRD4* 48 пн

VNTR и депрессивным расстройством [10, 13, 14]. Наши результаты, показывающие отсутствие влияния локуса *COMT* rs4680 на риск депрессии, согласуются с данными метаанализа [16].

Требуются дополнительные исследования, чтобы определить как изученные локусы влияют на тяжесть симптомов депрессии и тревоги у пациентов с разными заболеваниями, для которых характерны выраженные симптомы депрессии.

Работа была выполнена на базе Центра коллективного пользования Институтом биологии гена Российской академии наук при поддержке

Таблица 1. Распределение аллелей и генотипов локусов *SLC6A3* 40 пн VNTR и *DRD4* 48 пн VNTR в изученных выборках

Генотипы, аллели	Контроль		Депрессивный эпизод		Рекуррентная депрессия		Смешанное тревожное и депр. расстр.	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>SLC6A3</i> 40 пн VNTR								
10/10	109	0.67	61	0.56	84	0.56	51	0.51
9/10	45	0.28	40	0.37	58	0.39	38	0.38
9/9	3	0.02	6	0.06	5	0.03	9	0.09
10/11	4	0.02	0	0.00	0	0.00	0	0.00
6/6	1	0.01	0	0.00	0	0.00	0	0.00
8/10	1	0.01	0	0.00	0	0.00	1	0.01
9/11	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
10/12	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.01
3/10	0	0.00	1	0.01	0	0.00	0	0.00
7/10	0	0.00	0	0.00	1	0.01	0	0.00
10/13	0	0.00	0	0.00	1	0.01	0	0.00
3	0	0.00	1	0.00	0	0.00	0	0.00
6	2	0.01	0	0.00	0	0.00	0	0.00
7	0	0.00	0	0.00	1	0.00	0	0.00
8	1	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.01
9	51	0.16	52	0.24	68	0.23	56	0.28
10	268	0.82	163	0.75	228	0.77	142	0.71
11	4	0.01	0	0.00	0	0.00	0	0.00
12	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.01
13	0	0.00	0	0.00	1	0.00	0	0.00
<i>DRD4</i> 48 пн VNTR								
4/4	82	0.52	53	0.49	71	0.48	41	0.42
4/7	31	0.19	23	0.21	28	0.19	26	0.27
2/4	18	0.11	13	0.12	17	0.11	15	0.15
3/4	7	0.04	7	0.06	7	0.05	3	0.03
7/7	3	0.02	2	0.02	5	0.03	2	0.02
3/7	3	0.02	1	0.01	2	0.01	0	0.00
4/5	3	0.02	2	0.02	3	0.02	2	0.02
4/8	2	0.01	2	0.02	6	0.04	2	0.02
5/7	2	0.01	1	0.01	1	0.01	1	0.01
4/6	2	0.01	0	0.00	1	0.01	1	0.01
2/7	1	0.01	1	0.01	6	0.04	0	0.00
2/6	1	0.01	0	0.00	0	0.00	1	0.01
7/10	1	0.01	0	0.00	0	0.00	0	0.00
6/7	1	0.01	0	0.00	0	0.00	0	0.00
5/9	1	0.01	0	0.00	0	0.00	0	0.00
2/3	1	0.01	0	0.00	0	0.00	0	0.00
3/5	0	0.00	2	0.02	0	0.00	2	0.02
4/9	0	0.00	1	0.01	0	0.00	0	0.00
2/2	0	0.00	0	0.00	1	0.01	1	0.01
2/5	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.01
2/9	0	0.00	0	0.00	1	0.01	0	0.00
2	21	0.07	14	0.06	26	0.09	19	0.10
3	11	0.03	10	0.05	9	0.03	5	0.03
4	227	0.71	154	0.71	204	0.68	131	0.67
5	6	0.02	5	0.02	4	0.01	6	0.03
6	4	0.01	0	0.00	1	0.00	2	0.01
7	45	0.14	30	0.14	47	0.16	31	0.16
8	2	0.01	2	0.01	6	0.02	2	0.01
9	1	0.00	1	0.00	1	0.00	0	0.00
10	1	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00

грантов Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) № 19-04-00383, 17-29-02203-ofi-m, 19-015-00380.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thase M.E.* The multifactorial presentation of depression in acute care // *J. Clin. Psychiatry.* 2013. № 74. Suppl 2. P. 3–8.
<https://doi.org/10.4088/JCP.12084su1c.01>
2. *Kessing L.V., Bukh J.D.* The clinical relevance of qualitatively distinct subtypes of depression // *World Psychiatry.* 2017. V. 16. № 3. P. 318–319.
<https://doi.org/10.1002/wps.20461>
3. *Miller G.M., Madras B.K.* Polymorphisms in the 3'-untranslated region of human and monkey dopamine transporter genes affect reporter gene expression // *Mol. Psychiatry.* 2002. V. 7. № 1. P. 44–55.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000921>
4. *Fuke S., Suo S., Takahashi N. et al.* The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression // *Pharmacogenomics J.* 2001. V. 1. № 2. P. 152–156.
<https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500026>
5. *Inoue-Murayama M., Adachia S., Mishima N. et al.* Variation of variable number of tandem repeat sequences in the 3'-untranslated region of primate dopamine transporter genes that affects reporter gene expression // *Neurosci. Lett.* 2002. V. 334. № 3. P. 206–210.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01125-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01125-4)
6. *VanNess S.H., Owens M.J., Kilts C.D.* The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates in vitro dopamine transporter density // *BMC Genet.* 2005. № 6. P. 55.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-55>
7. *Bielinski M., Jaracz M., Lesiewska N. et al.* Association between COMT Val158Met and DAT1 polymorphisms and depressive symptoms in the obese population // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2017. № 13. P. 2221–2229.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S138565>
8. *D'Souza U.M., Russa C., Tahiret E. et al.* Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5'flanking region of the DRD4 gene // *Biol. Psychiatry.* 2004. V. 56. № 9. P. 691–697.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.08.008>
9. *Schoots O., Van Tol H.H.* The human dopamine D4 receptor repeat sequences modulate expression // *Pharmacogenomics J.* 2003. V. 3. № 6. P. 343–348.
<https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500208>
10. *Lopez Leon S., Croesa E.A., Sayed-Tabatabaei F.A. et al.* The dopamine D4 receptor gene 48-base-pair-repeat polymorphism and mood disorders: a meta-analysis // *Biol. Psychiatry.* 2005. V. 57. № 9. P. 999–1003.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.01.030>
11. *Lai J.H., Zhuab Y.S., Huoet Z.H. et al.* Association study of polymorphisms in the promoter region of DRD4 with schizophrenia, depression, and heroin addiction // *Brain Res.* 2010. № 1359. P. 227–232.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.064>
12. *Noble E.P., Blum K., Ritchie T. et al.* Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with receptor-binding characteristics in alcoholism // *Arch. Gen. Psychiatry.* 1991. V. 48. № 7. P. 648–654.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1991.01810310066012>
13. *Zou Y.F., Wang F., Fenget X.L. et al.* Association of DRD2 gene polymorphisms with mood disorders: a meta-analysis // *J. Affect. Disord.* 2012. V. 136. № 3. P. 229–237.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2010.11.012>
14. *Zhang L., Hu L., Li X. et al.* The DRD2 rs1800497 polymorphism increase the risk of mood disorder: Evidence from an update meta-analysis // *J. Affect. Disord.* 2014. № 158. P. 71–77.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.01.015>
15. *Lachman H.M., Papolos D.F., Saito T. et al.* Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: Description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders // *Pharmacogenetics.* 1996. V. 6. № 3. P. 243–250.
16. *Klein M., Schmoeger M., Kasper S., Schosse A.* Meta-analysis of the COMT Val158Met polymorphism in major depressive disorder: the role of gender // *World J. Biol. Psychiatry.* 2016. V. 17. № 2. P. 147–158.
<https://doi.org/10.3109/15622975.2015.1083615>
17. *Sukhodolskaya E.M., Fehretdinova D.I., Shibalev D.V. et al.* Polymorphisms of dopamine receptor genes DRD2 and DRD4 in African populations of Hadza and Datoga differing in the level of culturally permitted aggression // *Ann. Hum. Genet.* 2018. V. 82. № 6. P. 407–414.
<https://doi.org/10.1111/ahg.12263>
18. *Fehretdinova D.I., Sukhodolskaya E.M., Shibalev D.V. et al.* Polymorphism of the two genes encoding catecholamine degradation enzymes (COMT and MAOA) in the Hadza and Datoga African ethnic populations // *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2018. V. 33. № 3. P. 195–200.
<https://doi.org/10.3103/S0891416818030035>
19. *Суходольская Е.М., Васильев В.А., Шибалев Д.В. и др.* 3'-UTR полиморфизм гена транспортера дофамина у мужчин хадзы и датога // *Мол. биология.* 2014. V. 48. № 2. P. 295–299.

Influence of Polymorphic Gene Variants of the Dopaminergic System on the Risk of Disorders with Depressive Symptoms

E. I. Rafikova^{a,*}, D. V. Shibalev^a, M. I. Shadrina^b, P. A. Slominsky^b,
A. B. Guekht^c, A. P. Ryskov^a, and V. A. Vasilyev^a

^a*Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

^b*Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia*

^c*Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of the Healthcare Department, Moscow, 115419 Russia*

*e-mail: kat.rafikov@gmail.com

Depression is characterized by extremely high clinical heterogeneity. Only a few of the many symptoms of depression may overlap in different people with major depressive disorder. The search for molecular genetic markers of depression often yields conflicting results, which may be due to the heterogeneity of the samples. The aim of this work was to identify genetic risk factors for three diseases characterized by severe depressive symptoms. All participants were of East Slavic origin from Moscow and the regions of Central Russia. The polymorphisms of the genes of the dopamine transporter (*SLC6A3/DAT1*), dopamine receptors (*DRD4* and *DRD2*), and the enzyme catechol-O-methyltransferase (*COMT*) were studied in patients with three diagnoses: depressive episode, recurrent depression, and mixed anxiety and depressive disorder. We observed statistically significant differences in the distribution of alleles for the *SLC6A3 (DAT1)* 40 bp VNTR locus in patients with mixed anxiety and depressive disorder. The short allele (8R and 9R) was more common in patients than in the control group ($p = 0.005$), significant differences were also observed in the distribution of genotypes of this locus ($p = 0.025$). No associations were found between the loci of the dopaminergic system and the risk of depressive episode and recurrent depression.

Keywords: depression, anxiety, *SLC6A3*, *DAT1*, *DRD4*, *DRD2*, *COMT*.

НОВАЯ МИССЕНС-МУТАЦИЯ Gly238Ala В ГЕНЕ *TBX5* И ЕЕ ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

© 2021 г. Н. Н. Чакова^{1, *}, Т. В. Долматович¹, С. С. Ниязова¹,
С. М. Комиссарова², Е. С. Ребеко², А. А. Савченко²

¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр “Кардиология”, Минск, 220036 Республика Беларусь

*e-mail: n.chakova@igc.by

Поступила в редакцию 18.09.2020 г.

После доработки 23.11.2020 г.

Принята к публикации 14.12.2020 г.

Ген *TBX5* кодирует Т-бокс содержащий транскрипционный фактор 5 (Тbx5), который регулирует процесс эмбриогенеза у позвоночных и беспозвоночных. Мутации в этом гене являются причиной развития редкого моногенного синдрома Холт–Орама (HOS), характеризующегося скелетными аномалиями верхних конечностей, врожденным пороком сердца и/или нарушениями проводящей системы миокарда. Методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) выявлен новый нуклеотидный вариант с.713G>C (p.Gly238Ala) в гене *TBX5* у пациентки с мягким фенотипом синдрома Холт–Орама (деформация грудного отдела позвоночника (сколиоз), дисплазия лопатки, недостаточность митрального и трикуспидального клапанов с регургитацией I–II степени и истончение межпредсердной перегородки) и угрожающими жизни тахикардиями, потребовавшими имплантации кардиовертера-дефибриллятора (ИКД). Мутация p.Gly238Ala локализована в “горячей точке” гена *TBX5*. Оценка ее патогенности методом анализа *in silico* показала, что нуклеотидная замена с.713G>C может приводить к изменению структуры и/или функции белка. Устойчивая желудочковая тахикардия/фибрилляция желудочков, которые не являются характерной чертой HOS, могли быть результатом двух дополнительных редких замен (MAF < 0.01%): p.Val3634Asp, rs66785829 в гене *ANK2* и p.Arg1193Gln, rs41261344 в гене *SCN5A*. Мутации в этих генах влияют на функционирование натриевого ионного канала и являются причиной наследственных аритмий.

Ключевые слова: ген *TBX5*, синдром Холт–Орама, транскрипционный фактор, имплантация кардиовертера-дефибриллятора, высокопроизводительное секвенирование (NGS), новая мутация, фенотипические проявления, желудочковые тахикардии.

DOI: 10.31857/S0016675821070067

Ген *TBX5*, расположенный на хромосоме 12q24.21, кодирует Т-бокс-содержащий эволюционно консервативный транскрипционный фактор 5 (Тbx5), который регулирует широкий спектр процессов эмбриогенеза у позвоночных и беспозвоночных, включая спецификацию мезодермы и развитие сердечно-сосудистой системы и конечностей [1, 2]. У людей и позвоночных Тbx5 экспрессируется в эпикарде, миокарде всех четырех камер сердца, эндокарде левого желудочка [3] и атриовентрикулярном канале и играет ключевую роль как в структурной организации миокарда, так и в формировании его проводящей системы [4]. Тbx5 является членом семейства транскрипционных факторов, характеризующихся высококонсервативным ДНК-связывающим доменом Т-бокс [5], который состоит из 180 аминокислот. Показано, что Тbx5 посредством специфического связывания с ДНК активирует транскрипцию ге-

нов *ANF*, *CX40* и *SRF*, которые могут по отдельности или совместно работать с белками NKX2-5, GATA4 и *TBX20* [1].

Мутации в гене *TBX5* являются причиной развития редкого моногенного синдрома Холт–Орама (HOS, MIM 142900), характеризующегося скелетными аномалиями верхних конечностей, наличием врожденного порока сердца (ВПС), чаще всего представленного дефектом межпредсердной перегородки, и/или нарушениями проводящей системы миокарда. Заболевание представляет собой плейотропное расстройство с полной пенетрантностью, но с различной экспрессией (выраженностью) даже в одной семье [6]. Около 85% пациентов имеют изменения сразу в обеих системах организма [7].

HOS является наиболее распространенным синдромом “сердце-рука”. Этот синдром был впервые описан М. Холт и С. Орамом в 1960 г. [8].

Распространенность НОС у новорожденных составляет приблизительно 0.7 на 100000 рождений и не имеет гендерных различий [9]. В 1997 г. выявлены первые мутации в гене *TBX5* у пациентов с НОС [10, 11]. К настоящему моменту идентифицировано более 90 мутаций [12], локализованных преимущественно в 3–7 экзонах, соответствующих области домена Т-бокс. Практически 87% представлены точковыми изменениями, большинство из которых (37% – нонсенс-мутации, 26% – мутации, вызывающие сдвиг рамки считывания, 10% – мутации в сайтах сплайсинга) действуют по принципу гаплонедостаточности за счет синтеза нефункционального укороченного белка или запуска нонсенс-опосредованного распада мРНК и обычно сопровождаются тяжелыми пороками развития верхних конечностей и сердца [13]. На долю обширных внутригенных делеций и дупликаций в гене *TBX5* приходится 8 и 4% соответственно. Описаны также сбалансированные транслокации с участием локуса *TBX5* [13]. Миссенс-мутации по разным данным составляют 14–30%, обладают доминантно-негативным эффектом и являются причиной синтеза белков со сниженной ДНК-связывающей активностью. Некоторые исследователи показали, что аминокислотная замена на аминоконце Т-бокса приводит к очень значительным порокам развития сердца и небольшим аномалиям скелета, а изменение аминокислот на карбоксильном конце наоборот вызывает тяжелые аномалии конечностей и менее значимые сердечные аномалии [7]. Однако существует и противоположное мнение, что ни тип мутации в *TBX5*, ни место мутации в Т-боксе не являются предикторами выраженности пороков развития [14].

По результатам ряда исследований, мутации в гене *TBX5* выявлялись у 36–70% пациентов с клиническими признаками синдрома НОС [13, 15, 16]. У 78% пациентов с мутациями фенотип заболевания строго соответствовал диагностическим критериям НОС, в 20% случаев имелась менее выраженная клиническая симптоматика [13]. Большинство мутаций возникает *de novo* [6]. На данный момент базы данных по мутациям в этом гене продолжают активно пополняться новыми вариантами [5, 7].

В настоящей статье мы также сообщаем о не встречавшейся ранее в мировой популяции мутации с.713G>C, приводящей к изменению аминокислоты р.Gly238Ala в области ДНК-связывающего домена Т-бокса транскрипционного фактора *Tbx5*, выявленной у пациентки с мягким фенотипом НОС и наличием жизнеугрожающих аритмий (устойчивая желудочковая тахикардия/фибрилляция желудочков).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациентка А. с жизнеугрожающими желудочковыми аритмиями и синкопальными состояниями наблюдалась в РНПЦ “Кардиология” г. Минска, Беларусь. Клиническое обследование включало ЭКГ в 12 отведениях, ЭхоКГ, МРТ сердца с отсроченным контрастированием и суточное мониторирование ЭКГ (СМ ЭКГ). Получено информированное согласие пациентки на участие в научном исследовании.

Для определения генетической причины нарушения ритма пациентке было выполнено генетическое тестирование методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) с использованием набора реагентов “TruSight™ Cardio Sequencing Panel” (Illumina), включающего кодирующие последовательности 174 генов, ассоциированных с наследственными сердечно-сосудистыми заболеваниями, на приборе MiSeq (Illumina). Обработка и аннотирование результатов секвенирования проводились с помощью специального программного обеспечения ANNOVAR rev. 527 [17], позволяющего оценить патогенность выявленного генетического варианта на основе баз данных (dbSNP, 1000genomes, GWAS, HGMD и др.), и предсказательных модулей (PolyPhen-2 [18], SIFT [19], FATMM [20] и Mutationtester [21]).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск мутаций проводился у 54-летней женщины, которая в 42 года внезапно потеряла сознание на фоне учащавшихся сердцебиений, что потребовало проведение реанимационных мероприятий и имплантации кардиовертера-дефибриллятора (ИКД). На ЭКГ был зафиксирован эпизод желудочковой тахикардии/фибрилляции желудочков (ЖТ/ФЖ). Сердцебиения и синкопальные состояния отмечались с 6-летнего возраста. По данным ЭхоКГ камеры сердца не расширены, нарушений сократительной способности миокарда левого желудочка (ЛЖ) не выявлено. Фракция выброса ЛЖ составила 63%. Зарегистрирована митральная и трикуспидальная регургитация I–II степени и истончение межпредсердной перегородки в средней трети. ВПС не обнаружено.

По данным суточного мониторирования ЭКГ отмечалась частая желудочковая экстрасистолия (1860 за сутки) с неустойчивыми пробежками полиморфной желудочковой тахикардии (ЖТ). На фоне антиаритмической терапии (бисопролол 5 мг/сутки) эпизоды неустойчивой, устойчивой ЖТ и фибрилляции желудочка (ФЖ) сохранялись. По данным монитора ИКД выявлен эпизод фибрилляции желудочков, успешно купированный разрядом в 35 Дж.

В результате генетического тестирования у пациентки обнаружена новая, ранее не описанная

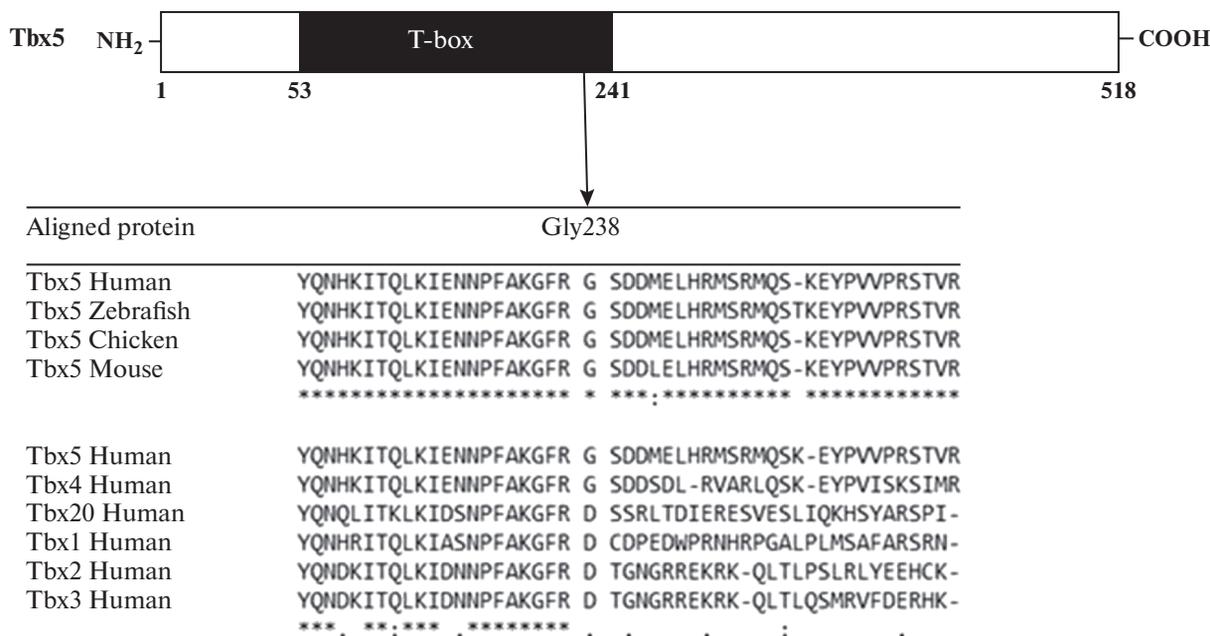


Рис. 1. Сравнительный анализ последовательностей аминокислот. *a* – на участке белка Tbx5 человека, содержащего замену р.Gly238Ala, с некоторыми животными; *б* – с другими T-box-содержащими белками у человека.

миссенс-мутация с.713G>C в экзоне 7 гена *TBX5*, которая приводит к замене глицина на аланин (р.Gly238Ala). Мутация расположена в карбоксильной области ДНК-связывающего домена T-box. Остаток глицина высококонсервативен у разных видов животных и сохраняется в гомологичном белке Tbx4 человека (рис. 1). У всех других членов семейства T-box-содержащих белков, таких как Tbx1, Tbx2, Tbx3 и Tbx20, в этом положении находится аспарагин (D), что также указывает на достаточную консервативность данного региона.

Между гистидином и аланином существует небольшая физико-химическая разница. Анализ функциональной значимости замены с использованием инструментов *in silico* (PolyPhen2, SIFT, Mutation tester) показал, что данный вариант вероятно повреждает структуру и/или функцию белка. В базе ClinVar представлен расположенный рядом вариант неопределенной значимости с.712G>A (VUS – variant of uncertain significance), в результате которого происходит замена этой же аминокислоты на серин (р.Gly238Ser, rs1593866534). Кроме того, соседний 237 кодон является “горячей точкой” нуклеотидных замен и к настоящему моменту в нем описаны три патогенные мутации: с.710G>C (р.Arg237Pro, rs104894378), с.710G>A (р.Arg237Gln, rs104894378), с.709C>T (р.Arg237Trp, rs104894382), что подтверждает функциональную важность данной области. Перечисленные варианты, за исключением р.Arg237Gln и р.Arg237Pro, не наблюдались ни в одном из известных проектов секвенирования экзома, что указывает на их диагностическую значимость. Встречаемость ми-

норного аллеля (C>G/Т в 710 положении нуклеотидной последовательности) в случае мутаций р.Arg237Gln и р.Arg237Pro также является очень низкой и варьирует в пределах 0.0005–0.000008 и, следовательно, они также не являются распространенными доброкачественными заменами в обследованных популяциях.

Функциональные исследования демонстрируют, что перечисленные мутации в гене *TBX5* вызывают снижение ДНК-связывающей способности, в результате чего уменьшается взаимодействие фактора транскрипции Tbx5 с гомеобокс-содержащими факторами транскрипции NKX2-5 и GATA4 [22, 23], контролирующими формирование и развитие сердца. Имеющиеся данные о функциональной значимости аминокислот Arg237 и Gly238, с большой долей вероятности позволяют утверждать, что другие миссенс-мутации в этих кодонах, включая выявленную в данном исследовании, также будут неблагоприятно сказываться на работе белка Tbx5.

Следует отметить, что окончательный диагноз обследуемой нами пациентки был поставлен только после проведения генетического тестирования и обнаружения мутации в гене *TBX5*, поскольку клинический фенотип заболевания не удовлетворял всем характеристикам НОС. В ходе тщательного дополнительного обследования установлены некоторые скелетные аномалии, включающие деформацию грудного отдела позвоночника (сколиоз) и дисплазию лопатки. Так, например, у некоторых пациентов с НОС описан характерный вид узких наклонных плеч из-за сочетания корот-

Таблица 1. Дополнительные мутации у пациентки А. с синдромом Холта–Орама

Ген	Хромосома (экзон)	Нуклеотидная замена/rs	Аминокислотная замена	Статус мутации	Частота минорного аллеля в популяциях (MAF)
<i>SCN5A</i>	3 (20)	c.35758G>A/rs41261344	p.Arg1193Gln	B/LB	0.0008–0.07
<i>ANK2</i>	4 (42)	c.10901T>A/rs66785829	p.Val3634Asp	B/LB/VUS	0.0009–0.01

Примечание. VUS – вариант с неустановленной значимостью (variant of uncertain significance), B – незначимый вариант (benign); LB – возможно незначимый вариант (likely benign).

ких ключиц, гипоплазии головки плечевой кости и уменьшения мускулатуры [24].

Выявленные при ЭхоКГ-исследовании признаки недостаточности митрального и трикуспидального клапанов с регургитацией I–II степени, а также истончение межпредсердной перегородки также свидетельствовали в пользу патогенности выявленной новой мутации в гене *TBX5*. Одним из наиболее значимых проявлений заболевания у данной пациентки являлось наличие пароксизмов желудочковой тахикардии/фибрилляции желудочков с рецидивирующими синкопальными состояниями в молодом возрасте. В 42 года при внезапно возникшем синкопальном состоянии был зафиксирован эпизод ЖТ/ФЖ, потребовавший проведения реанимационных мероприятий и имплантации ИКД. Злокачественные нарушения ритма описываются у пациентов с НОС [2, 3] преимущественно при наличии ВПС в результате гемодинамических эффектов. В данном случае пароксизмы ЖТ/ФЖ были зарегистрированы у пациентки при отсутствии ВПС, дилатации камер сердца и гемодинамической перегрузки. Возникновению жизнеугрожающих аритмий и синкопе могли способствовать и обнаруженные у пациентки дополнительные редкие варианты в генах *SCN5A* и *ANK2* (табл. 1), кодирующих альфа-субъединицу сердечного натриевого канала Nav1.5 и регуляторный белок анкирин-В соответственно. Мутации в обоих генах приводят к нарушению функционирования натриевого ионного канала и развитию жизнеугрожающих аритмий.

Нуклеотидный вариант c.35758G>A в гене *SCN5A* является хорошо известной редкой мутацией (в среднем, значение MAF < 0.01), которая приводит к аминокислотной замене p.Arg1193Gln в α -субъединице натриевого канала. Данная замена имеет несколько повышенную встречаемость в восточноазиатских популяциях (MAF = 0.07; Exome Aggregation Consortium). Существующие клинические и эпидемиологические исследования в отношении этого варианта демонстрируют несколько противоречивые результаты [25]. Он идентифицирован у пациентов с LQT3 и BrS, а также у лиц с внезапной сердечной смертью (ВСС) [26, 27]. Сообщалось также, что данная мутация дестабилизирует инактивацию каналов и может являться фактором риска перечисленных синдромов [28].

В то же время, не выявлено статистически значимых различий по частоте минорной аллели между группами пациентов с аритмией, у большинства из которых были структурные заболевания сердца, и здоровым контролем в Японии (0.063 для обеих групп), между случаями с синдромом ВСС и контрольной группой на юге Китая (0.0608 и 0.0476 соответственно), а также между пациентами с полным блокадой атриовентрикулярной проводимости и контрольной группой в Корее (0.071 и 0.082 соответственно), что указывает на вероятную доброкачественность этой замены [29, 30]. Можно предположить, что влияние аллельного варианта c.35758G>A в гене *SCN5A* на формирование клинического фенотипа проявляется при наличии определенных дополнительных факторов, в том числе генетических. В данном случае таким фактором может быть выявленный редкий вариант c.10901T>A (p.Val3634Asp) в гене *ANK2* с противоречивой оценкой патогенной значимости (табл. 1) и значением MAF < 0.01. Как известно, анкирин-В в качестве мембранного “адаптера” связывается с различными белками и участвует в регуляции потенциал-зависимого натриевого канала Nav1.5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного генетического тестирования пациентки с мягким фенотипическим проявлением синдрома НОС и злокачественными желудочковыми тахикардиями (желудочковая тахикардия и фибрилляция желудочков) выявлена новая мутация c.713G>C (p.Gly238Ala) в экзоне 7 гена *TBX5*, а также два редких нуклеотидных варианта p.Val3634Asp (rs66785829) в гене *ANK2* и p.Arg1193Gln (rs41261344) в гене *SCN5A*.

В представленном случае основной причиной наблюдаемого клинического фенотипа, по всей видимости, являлась новая мутация в гене *TBX5*. Вероятно патогенная значимость этого нуклеотидного варианта подтверждается данными анализа с использованием предикторов *in silico* (PolyPhen2, SIFT, Mutation tester), а также ее локализацией в “горячей точке” функционально-значимых мутаций и фенотипическими проявлениями, характерными для синдрома НОС. Можно предположить, что нуклеотидные замены в генах *SCN5A* и *ANK2* вносят определенный вклад в более тяжелое течение

заболевания в виде жизнеугрожающих аритмий, демонстрируя аддитивный эффект трех мутаций. Однако данное предположение требует дополнительного изучения.

Приведенный клинический случай показывает важность генетического тестирования для установления точного диагноза у пациентов, имеющих нарушения опорно-двигательной системы верхних конечностей, ВПС и нарушения ритма.

Работа выполнена в рамках мероприятия 25⁴ “Разработать метод диагностики наследственных нарушений сердечного ритма и/или проводимости с высоким риском внезапной сердечной смерти” подпрограммы 1 “Инновационные биотехнологии 2020” ГП “Научно-технологические и технические”, 2016–2020 гг.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Greulich F., Rudat C., Kispert A.* Mechanisms of T-box gene function in the developing heart // *Cardiovasc. Res.* 2011. V. 91. № 2. P. 212–222. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr112>
2. *Stennard F.A., Harvey R.P.* T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart // *Development.* 2005. V. 132. P. 4897–4910. <https://doi.org/10.1242/dev.02099>
3. *Hatcher C.J., Goldstein M.M., Mah C.S. et al.* Identification and localization of TBX5 transcription factor during human cardiac morphogenesis // *Dev. Dyn.* 2000. V. 219. № 1. P. 90–95. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(200009\)219:1<90::AID-DVDY1033>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-0177(200009)219:1<90::AID-DVDY1033>3.0.CO;2-L)
4. *Postma A.V., Christoffels V.M., Bezzina C.R.* Developmental aspects of cardiac arrhythmogenesis // *Cardiovasc. Res.* 2011. V. 91. № 2. P. 243–251. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr134>
5. *Packham E.A., Brook J.D.* T-box genes in human disorders // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. № 1. P. 37–44. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg077>
6. *Spiridon M.R., Petris A.O., Gorduza E.V. et al.* Holt-Oram Syndrome with multiple cardiac abnormalities // *Cardiol. Res.* 2018. V. 9. № 5. P. 324–329. <https://doi.org/10.14740/cr767w>
7. *Basson C.T., Huang T., Lin R.C. et al.* Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations // *PNAS.* 1999. V. 96. № 6. P. 2919–2924. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2919>
8. *Holt M., Oram S.* Familial heart disease with skeletal malformations // *Br. Heart. J.* 1960. V. 22. № 2. P. 236–242. <https://doi.org/10.1136/hrt.22.2.236>
9. Prevalence and incidence of rare diseases: Bibliographic data // *Orphanet Rep. Series.* 2020. № 1. P. 1–78. http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf
10. *Basson C.T., Bachinsky D.R., Lin R.C. et al.* Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome // *Nat. Genet.* 1997. V. 15. № 1. P. 30–35. <https://doi.org/10.1038/ng0197-30>
11. *Li Q.Y., Newbury-Ecob R.A., Terrett J.A. et al.* Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family // *Nat. Genet.* 1997. V. 15. P. 21–29. <https://doi.org/10.1038/ng0197-21>
12. *Zhu T., Qiao L., Wang Q. et al.* T-box family of transcription factor-TBX5, insights in development and disease // *Am. J. Transl. Res.* 2017. V. 9. № 2. P. 442–453.
13. *Vanlerberghe C., Jourdain A.S., Ghomid J. et al.* Holt-Oram syndrome: clinical and molecular description of 78 patients with TBX5 variants // *Eur. J. Hum. Genet.* 2019. V. 27. № 3. P. 360–368. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0303-3>
14. *Brassington A.M., Sung S.S., Toydemir R.M. et al.* Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 73. № 1. P. 74–85. <https://doi.org/10.1086/376436>
15. *McDermott D.A., Bressan M.C., He J. et al.* TBX5 genetic testing validates strict clinical criteria for Holt-Oram syndrome // *Pediatr. Res.* 2005. V. 58. № 5. P. 981–986. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000182593.95441.64>
16. *Debeer P., Race V., Gewillig M. et al.* Novel TBX5 mutations in patients with Holt-Oram syndrome // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2007. V. 462. P. 20–26. <https://doi.org/10.1097/BLO.0b013e3181123ffe>
17. *Wang K., Li M., Hakonarson H.* ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data // *Nucl. Ac. Res.* 2010. V. 38. № 16. P. e164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>
18. *Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L. et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. № 4. P. 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
19. *Kumar P., Henikoff S., Nag P.C.* Predicting the effects of coding nonsynonymous variants on protein function using the SIFT algorithm // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. № 7. P. 1073–1081. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
20. *Shihab H.A., Gough J., Cooper D.N. et al.* Predicting the functional, molecular and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models // *Hum. Mutat.* 2013. V. 34. № 1. P. 57–65. <https://doi.org/10.1002/humu.22225>
21. *Schwarz J.M., Rödelberger C., Schuelke M., Seelow D.* Mutation Taster evaluates disease-causing potential of

- sequence alterations // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 8. P. 575–576.
<https://doi.org/10.1038/nmeth0810-575>
22. Kimura M., Kikuchi A., Ichinoi N., Kure S. Novel TBX5 duplication in a Japanese family with Holt-Oram syndrome // *Pediatr. Cardiol.* 2015. V. 36. № 1. P. 244–247.
<https://doi.org/10.1007/s00246-014-1028-x>
 23. Dreßfen M., Lahm H., Lahm A. et al. A novel de novo TBX5 mutation in a patient with Holt-Oram syndrome leading to a dramatically reduced biological function // *Mol. Genet. Genomic Med.* 2016. V. 4. № 5. P. 557–567.
<https://doi.org/10.1002/mgg3.234>
 24. Smith A.T., Sack G.H., Jr., Taylor G.J. Holt-Oram syndrome // *J. Pediatr.* 1979. V. 95. № 4. P. 538–543.
[https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(79\)80758-1](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(79)80758-1)
 25. Abe M., Kinoshita K., Matsuoka K. et al. Lack of modulatory effect of the SCN5A R1193Q polymorphism on cardiac fast Na⁺ current at body temperature // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 11. P.: e0207437.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207437>
 26. Matsusue A., Kashiwagi M., Hara K. et al. An autopsy case of sudden unexpected nocturnal death syndrome with R1193Q polymorphism in the SCN5A gene // *Legal Med. (Tokyo)*. 2012. V. 14. № 6. P. 317–319.
<https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.04.009>
 27. Hwang H.W., Chen J.J., Lin Y.J. et al. R1193Q of SCN5A, a Brugada and long QT mutation, is a common polymorphism in Han Chinese // *J. Med. Genet.* 2005. V. 42. № 2. P.: e7.
<https://doi.org/10.1136/jmg.2004.027995>
 28. Maekawa K., Saito Y., Ozawa S. et al. Genetic polymorphisms and haplotypes of the human cardiac sodium channel alpha subunit gene (SCN5A) in Japanese and their association with arrhythmia // *Ann. Hum. Gen.* 2005. V. 69. № 4. P. 413–428.
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2005.00167.x>
 29. Cheng J., Makielski J.C., Yuan P. et al. Sudden unexplained nocturnal death syndrome in Southern China: An epidemiological survey and SCN5A gene screening // *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2011. V. 32. № 4. P. 359–363.
<https://doi.org/10.1097/PAF.0b013e3181d03d02>
 30. Park H.S., Kim Y.N., Lee Y.S. et al. Genetic analysis of SCN5A in Korean patients associated with atrioventricular conduction block // *Genomics Inform.* 2012. V. 10. № 2. P. 110–116.
<https://doi.org/10.5808/GI.2012.10.2.110>

New Missense Mutation Gly238Ala in the *TBX5* Gene and Its Phenotypical Characteristics

N. N. Chakova^{a,*}, T. V. Dolmatovich^a, S. S. Niyazova^a,
 S. M. Komissarova^b, E. S. Rebeko^b, and A. A. Savchenko^b

^a*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus*

^b*Republican Scientific and Practical Centre “Cardiology”, Minsk, 220036 Republic of Belarus*

*e-mail: n.chakova@igc.by

The *TBX5* gene encodes the T-box transcription factor 5 (Tbx5) involved in the regulation of developmental processes both in vertebrates and invertebrates. Mutations in this gene cause rare monogenic Holt–Oram syndrome (HOS) characterized by skeletal anomalies of upper limbs, a congenital heart defect and/or cardi-conduction system diseases. Next generation sequencing (NGS) allowed to detect a new nucleotide variant c.713G>C (p.Gly238Ala) in the *TBX5* gene in the patient with a mild Holt–Oram syndrome phenotype (the thoracic spine deformity (scoliosis) and scapula dysplasia and showed the signs of mitral and tricuspid valve insufficiency with the first- and second-degree regurgitation and atrial septal thinning) and life-threatening tachyarrhythmias that required the cardioverter-defibrillator implantation (ICD). The mutation is localized in the “hot spot” of the *TBX5* gene. Evaluation of its pathogenicity by *in silico* analysis showed that the c.713G>C nucleotide substitution can lead to changes in the protein structure and/or its function. Non-sustained ventricular tachycardia/ventricular fibrillation, which is not characteristic of HOS, could have resulted from two additional rare substitutions (MAF < 0.01%): p.Val3634Asp, rs66785829 in the *ANK2* gene and p.Arg1193Gln, rs41261344 in the *SCN5A* gene. Mutations in these genes affect the voltage-gated sodium channel functioning and cause hereditary arrhythmia.

Keywords: *TBX5* gene, Holt–Oram syndrome, transcription factor, cardioverter-defibrillator implantation, next generation sequencing (NGS), new mutation, phenotypic manifestations, ventricular tachyarrhythmias.

УДК 575.17:599.9

ТЕРРИТОРИАЛЬНАЯ ПОДРАЗДЕЛЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МЕГАПОЛИСА ПО ЭТНИЧЕСКОМУ ПРИЗНАКУ В СВЯЗИ С ПРОБЛЕМОЙ СОЗДАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ БАЗ ДАННЫХ. МИНСК

© 2021 г. И. С. Цыбовский¹, Е. А. Спивак¹, *, С. А. Котова¹,
В. С. Крумплевский², А. С. Грачева³, **, О. Л. Курбатова³

¹Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь,
Минск, 220114 Республика Беларусь

²Институт истории Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: spivak_e@inbox.ru

**e-mail: palesa@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.10.2020 г.

После доработки 15.12.2020 г.

Принята к публикации 28.12.2020 г.

Проведены анализ неравномерности расселения этнических групп, оценка этнического разнообразия и уровня генетической дифференциации населения р-нов г. Минска (Республика Беларусь). Наибольший уровень этнического разнообразия характерен для Первомайского, Советского и Центрального р-нов, а наименьший – для Заводского р-на Минска. Рассчитан уровень дифференциации р-нов мегаполиса по распределению наиболее многочисленных этнических групп ($F_{st} = 0.63 \times 10^{-2}$). Построены карты, отражающие этническую топографию Минска. Наиболее неравномерное расселение показано для цыган и евреев, наиболее равномерное – для поляков и белорусов. Результаты исследования создают основу для формирования базы данных жителей г. Минска для целей ДНК-идентификации в судебной медицине.

Ключевые слова: мегаполис, Минск, этнические группы, мигранты, этническая топография, территориальная подразделенность популяции, “квазигенетические” маркеры, F_{st} , базы данных для целей ДНК-идентификации.

DOI: 10.31857/S0016675821080142

Особенности генофондов населения городов-мегаполисов невозможно оценить без учета их сложной популяционной структуры, разнообразия этнического состава, сложившегося в результате генетико-демографических процессов, в первую очередь, миграции [1]. Этнические меньшинства обычно неравномерно расселяются по территории мегаполиса, что создает трудности для создания генетических баз данных для целей криминалистики и медицинской генетики. Кроме того, наличие в мегаполисах стратификации территории по любому демографическому признаку (этническому, образовательному, имущественному и т.п.) создает потенциальные риски возникновения социальных напряжений и потери управляемости. Таким образом, знание популяционной структуры населения мегаполиса и происходящих в нем генетико-демографических процессов может стать основой при выработке перспективных решений, определяющих социальную “экологичность” города в дальнейшем его развитии. Резкое увеличение

численности городской популяции требует необходимости прогнозирования динамики генофонда для выработки научно-обоснованной стратегии развития учреждений здравоохранения, в том числе профилактической и судебной медицины, образования, которые в итоге должны обеспечить оптимизацию факторов городской среды.

Минск, столица Беларуси – политический, экономический, культурный и научный центр, крупнейший транспортный узел республики и ее единственный мегаполис. История Минска насчитывает почти десять веков. Настоящее же его состояние сложилось, в основном, в послевоенный период. Минск был почти полностью разрушен к 1944 г. и заново отстраивался в следующие десятилетия. За время Великой Отечественной войны население Минска сократилось с 270 до 45–50 тыс. человек. С момента окончания войны население Минска характеризуется непрерывным ростом и к концу 2019 г. превысило 2 млн [2]. Население Минска характеризуется разнообраз-

ным этническим составом – 116 этнических групп по данным переписи 2019 г.

Современный Минск имеет административное деление на девять р-нов [3].

Цель настоящей работы – оценка подразделенности популяции Минска как города-мегаполиса, выявление на территории города р-нов с наибольшим этническим разнообразием и р-нов компактного проживания этнических групп. Генетико-демографическое исследование населения Минска проводится в связи с необходимостью создания генетических баз данных по признакам, значимым для ДНК-идентификации в судебной медицине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Расчет уровня подразделенности популяции Минска проводили с использованием подходов, разработанных в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН при анализе популяций Москвы, Новосибирска, Санкт-Петербурга и описанных в работах [1, 4–10]. Исследование осуществлялось на основе данных Переписи населения Республики Беларусь 2009 г. [11] о численности представителей этнических групп в каждом из р-нов г. Минска [3].

Для построения карт неравномерности расселения этнических групп для г. Минска определяли диапазон изменчивости признака “частота этнической группы” по административно-территориальным единицам мегаполиса ($p_{\max} - p_{\min}$), диапазон разделяли на 3–4 класса. Интенсивность цвета на карте отражает частоту встречаемости исследуемой этнической группы в каждой административно-территориальной единице, выраженную в численности на 10000 населения.

Для каждой административно-территориальной единицы города рассчитывали меру этнического разнообразия H согласно формуле [8]:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2,$$

где p_i – частота i -той этнической группы в р-не, n – число этнических групп.

Уровень подразделенности популяции г. Минска оценивали на основе частот встречаемости в р-нах этнических групп, рассматриваемых в качестве “квазигенетических” маркеров, методом AMOVA (программа Arlequin 3.1 [12]).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно результатам Переписи населения Республики Беларусь [11] в 2009 г. в мегаполисе проживало 1836808 человек. Население г. Минска было представлено 116 этническими группа-

ми, из которых белорусы составляли 79.26%. Другие наиболее многочисленные этнические группы: русские (10.08%), украинцы (1.49), поляки (0.73), евреи (0.28), армяне (0.11), татары (0.084), азербайджанцы (0.083). Доли других этносов в населении мегаполиса не превышали 0.07%.

Для десяти наиболее многочисленных этнических групп рассчитаны доли от общей численности населения в каждом р-не г. Минска (табл. 1). Графическое представление результатов, отражающее неравномерность расселения представителей этнических групп по районам мегаполиса, приведено на рис. 1. Анализ результатов показывает, что удельный вес численности белорусов в административно-территориальных единицах города варьирует незначительно – от 73.59 в Первомайском р-не до 84.73% в Заводском р-не.

Наибольшее количество русских – второй по численности этнической группы Минска – проживает в Первомайском (13.51), Центральном (13.23) и Советском (13.04%) р-нах, наименьшее количество – в Заводском р-не (7.81%). Характер расселения украинцев по территории города в целом повторяет таковой для русских – наибольшее их количество сосредоточено в Первомайском (2.10) и Центральном (1.86%) р-нах, наименьшее – в Заводском р-не (1.20%). Четвертая по размеру этническая группа столицы Беларуси – поляки – расселена по территории Минска достаточно равномерно. Ее доля в общей численности населения р-нов варьирует от 0.67 в Заводском р-не до 0.81% в Центральном р-не.

Наиболее неравномерно расселены по территории города цыгане, которые составляют 0.031% от общей численности населения мегаполиса: удельный вес численности этой этнической группы изменяется более чем на порядок – от 0.01 в Первомайском и Октябрьском р-нах до 0.09 в Партизанском р-не и 0.11% в Заводском. Второе место по неравномерности расселения занимают евреи, составляющие 0.28% от общей численности населения города, – от 0.15 (Заводской р-н) до 0.53% (Центральный р-н). Неравномерный характер расселения зафиксирован также для азербайджанцев, численность которых в р-нах города изменяется более чем в два раза – от 0.06% в Ленинском, Октябрьском и Московском р-нах до 0.13% в Заводском р-не.

Схожий характер расселения на территории города имеют и такие этнические группы, как татары и армяне, наибольшая численность которых регистрируется в Центральном р-не города (0.11 и 0.15% соответственно), а наименьшая – в Заводском р-не (0.06 и 0.07% соответственно).

Наиболее наглядно этническая топография Минска представлена на картах (рис. 2).

Для анализа уровня этнического разнообразия административно-территориальных единиц

Таблица 1. Этнический состав населения р-нов г. Минска по данным Переписи населения Республики Беларусь 2009 г. (в %). Рассчитано по [11]

Национальность	Минск в целом	Район								
		Центральный	Советский	Первомайский	Партизанский	Заводской	Ленинский	Октябрьский	Московский	Фрунзенский
Белорусы	79.26	74.21	74.61	73.59	78.10	84.73	82.46	79.78	80.41	79.95
Русские	10.02	13.23	13.04	13.51	12.15	7.81	8.68	9.48	8.13	8.97
Украинцы	1.49	1.86	1.75	2.10	1.81	1.20	1.32	1.45	1.21	1.34
Поляки	0.73	0.81	0.68	0.71	0.69	0.67	0.75	0.76	0.69	0.80
Евреи	0.28	0.53	0.52	0.37	0.43	0.16	0.24	0.20	0.19	0.23
Армяне	0.11	0.15	0.14	0.12	0.10	0.08	0.13	0.10	0.09	0.10
Татары	0.07	0.11	0.09	0.09	0.09	0.06	0.07	0.07	0.08	0.10
Азербайджанцы	0.08	0.09	0.99	0.08	0.13	0.12	0.06	0.06	0.06	0.08
Литовцы	0.05	0.05	0.04	0.07	0.08	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Цыгане	0.03	0.02	0.03	0.01	0.09	0.11	0.02	0.01	0.02	0.01
Другие	7.88	8.95	8.11	9.37	6.34	5.02	6.24	8.05	9.08	8.37

г. Минска, для каждого р-на города рассчитывали меру этнического разнообразия H . Полученная мера разнообразия H показывает, насколько разнообразен этнический состав отдельных р-нов столицы Беларуси. Графическое представление меры разнообразия этнического состава р-нов г. Минска приведено на рис. 3. Из результатов расчета следует, что наибольший уровень этнического разнообразия характерен для Центрального, Советского, и Первомайского р-нов г. Минска, а наименьший – для Заводского р-на мегаполиса.

Для анализа уровня территориально-этнической подразделенности популяции мегаполиса рассчитаны значения F_{st} методом AMOVA [12]. В качестве исходных данных для расчета использовали частоты этнических групп в р-нах (табл. 1). Расчет проводили по двум алгоритмам: а) на основе данных о частотах наиболее многочисленных этнических групп города (алгоритм “Много национальностей”); б) выделяли титульную национальность (белорусы) в отдельную группу, остальные этнические группы объединяли в группу “Другие” (алгоритм “Белорусы–Другие”). Результаты расчета графически представлены на рис. 4.

Уровень генетической дифференциации популяции – параметр F_{st} при расчете по алгоритму “Много национальностей” составил $F_{st} = 0.63 \times 10^{-2}$, а при расчете для двух “квази-аллелей”: “Белорусы–Другие” составил $F_{st} = 0.88 \times 10^{-2}$. Величина параметра генетической дифференциации

популяции г. Минска по сопоставимым административно-территориальным единицам выше, чем в Новосибирске [8], Санкт-Петербурге [9], Москве [10].

ОБСУЖДЕНИЕ

Этническая топография Республики Беларусь длительное время являлась предметом пристального изучения [13], особые успехи при этом были достигнуты в исследовании этногенетических процессов на основе антропологических признаков [14]. Демографические проблемы развития г. Минска активно исследовались в послевоенный период до середины 80-х годов прошлого столетия [15], при этом исследование современной популяции Минска, которая представляет более 20% населения Беларуси, не проводилось – впервые оценка генетико-демографических процессов в Минске проведена нами в 2011–2013 гг. [16, 17]. Вместе с тем, с 1959 по 2019 гг. население Минска выросло в четыре раза – с 500 тыс. до 2 млн человек, что не могло не повлиять на этническую топографию города. Этот уникальный для города рост в среднем на 5.5% в год получил собственное название – “минский феномен” [15].

Минск относится к числу древних восточнославянских городов – первое упоминание о городе датируется 1067 г. Тем не менее, какие-либо исторические закономерности этнодемографических

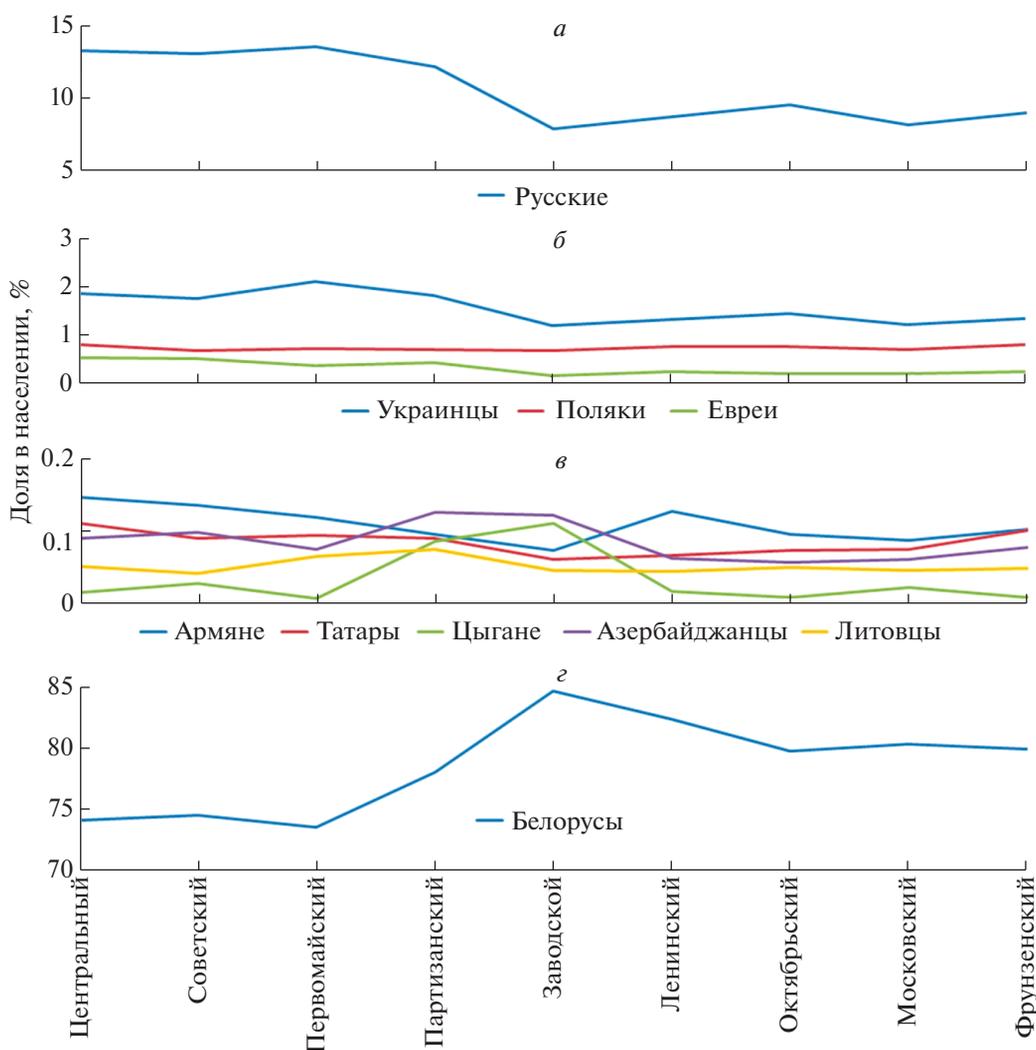


Рис. 1. Графическое представление неравномерности расселения этнических групп по городской территории. По оси ординат – удельный вес (в %) численности некоторых этнических групп по административным р-нам Минска. *а* – русские, *б* – украинцы, поляки, евреи, *в* – армяне, татары, цыгане, азербайджанцы, литовцы, *г* – белорусы.

процессов в формировании населения города могут относиться только к конкретным временным диапазонам, поскольку в истории города отмечено много исторических событий, неоднократно и кардинально изменявших судьбы города и его жителей. Результаты проведенных нами исследований выявляют причинно-следственные связи между генетико-демографическими особенностями населения Минска и развитием социально-экономических отношений периода послевоенного восстановления города и страны в целом. Так, война 1941–1945 гг. привела к коренному количественному и качественному изменению населения Минска. В табл. 2 приведен этнический состав населения Минска по итогам последней предвоенной и первой послевоенной переписей населения. Как следует из табл. 2, за 20 лет с 1939

по 1959 гг. в населении г. Минска выросла доля белорусов, практически удвоилась доля русских и почти в четыре раза уменьшилась доля евреев. Кардинально изменилась и значительно сгладилась этническая топография города – в 1939 г. доля евреев варьировала от 22% в Заводском (в 1939 г. – Сталинском) р-не города до 38.5% в Советском (в 1939 г. – Ворошиловском) р-не; доля белорусов – от 44% в Советском р-не до 59% в Октябрьском (в 1939 г. – Кагановичском) р-не [2].

Кардинальное изменение этнического состава обусловлено не только деструктивными процессами военного времени – в первые послевоенные годы город рос за счет миграции разнородной людской массы тех, кто вернулся из эвакуации, из армии и партизанских отрядов, а также с принудительных работ в Германии [15]. Решающее зна-

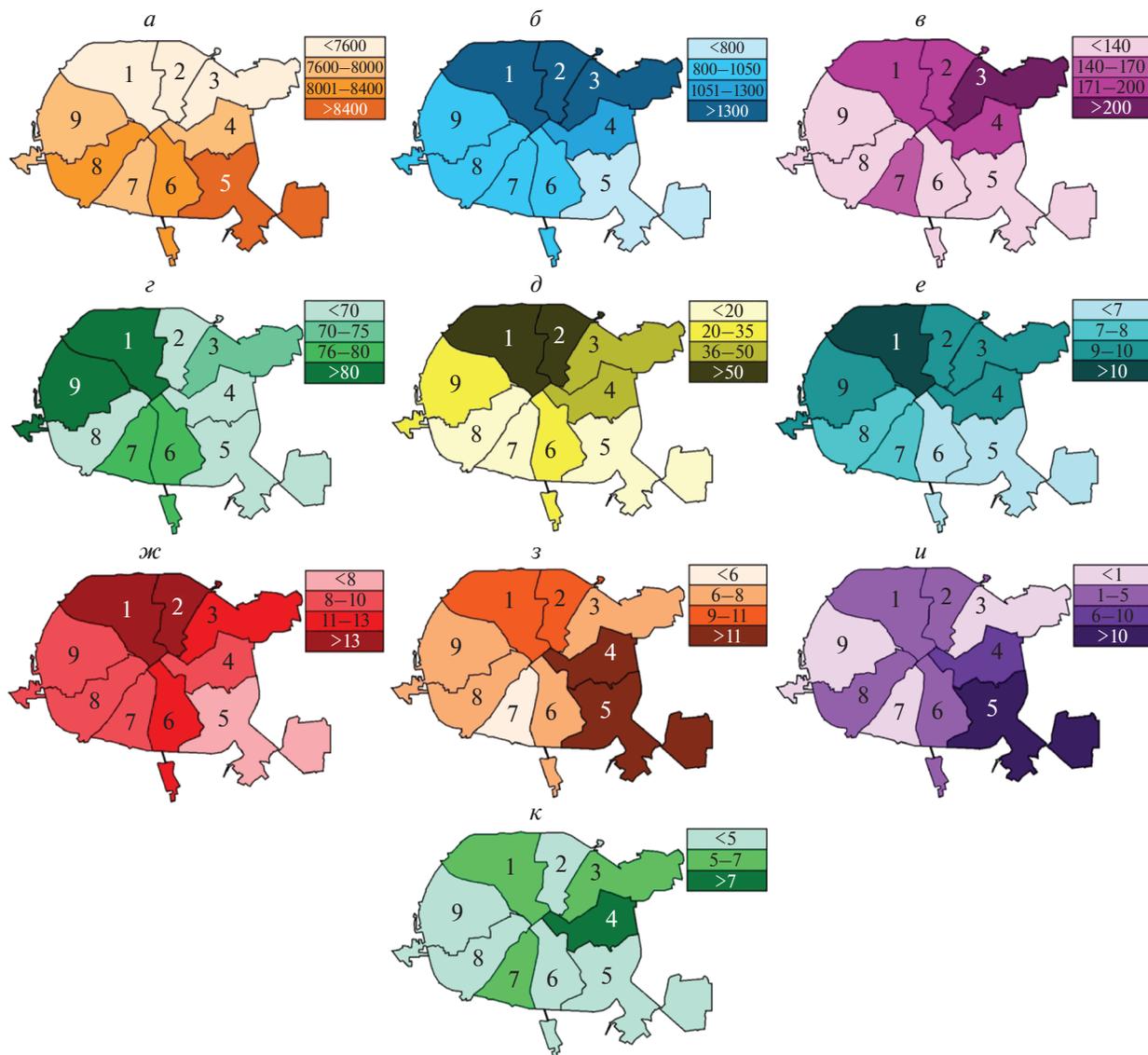


Рис. 2. Этническая топография Минска. Доля некоторых этнических групп в населении административно-территориальных единиц Минска (на 10000 населения). а – белорусы, б – русские, в – украинцы, г – поляки, д – евреи, е – татары, ж – армяне, з – цыгане, и – азербайджанцы, к – литовцы. Нумерация районов: 1 – Центральный, 2 – Советский, 3 – Первомайский, 4 – Партизанский, 5 – Заводской, 6 – Ленинский, 7 – Октябрьский, 8 – Московский, 9 – Фрунзенский.

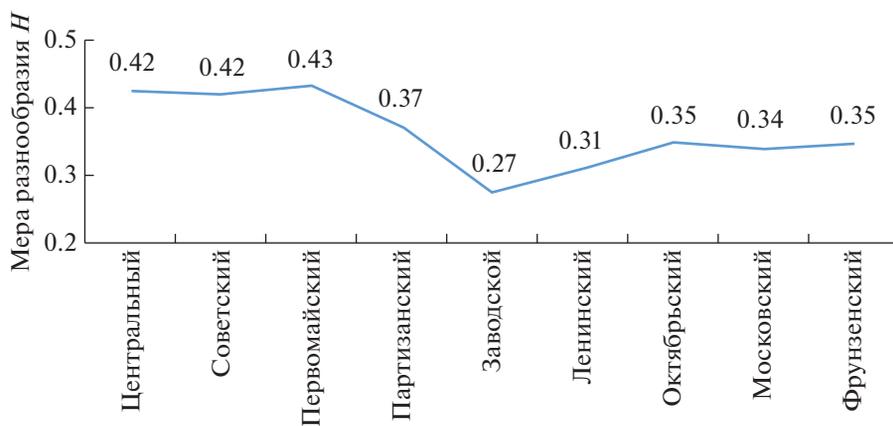


Рис. 3. Значения меры этнического разнообразия H р-нов Минска.

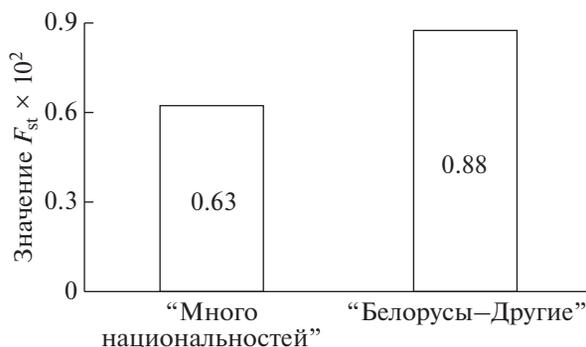


Рис. 4. Значения параметра подразделенности $F_{st} \times 10^2$ для популяции Минска.

чение имело также превращение Минска в советскую промышленную метрополию: послевоенное демографическое развитие Минска формировалось уже по закономерностям развития города как крупного промышленного центра.

Трансформация этнического состава населения Минска фиксируется и последующими переписями: доля белорусов увеличивалась и в последующие годы, достигнув 87% в 2019 г.; доля русских, напротив, уменьшилась до 7%; доля украинцев была максимальна в 1970 г. (3.84%), потом уменьшилась до 1.72%; доля евреев существенно уменьшилась до 0.28%; доля поляков и татар уменьшилась незначительно (табл. 2).

Строительство таких промышленных гигантов союзного значения, как Минский тракторный и Минский автомобильный заводы, положило начало потокам внутривнутриреспубликанской миграции населения, в первую очередь сельского, поскольку создавались более привлекательные по сравнению с селом условия работы и жизни и возможности

Таблица 2. Динамика этнического состава населения г. Минска с 1939 по 2019 гг. (в %) [2]

Национальность	Год переписи				
	1939	1959	1970	2009	2019
Белорусы	51.92	63.77	65.61	79.26	86.86
Русские	12.01	22.82	23.35	10.02	7.34
Украинцы	2.78	3.6	3.84	1.49	1.72
Поляки	1.41	1.09	1.03	0.73	0.96
Евреи	29.7	7.62	5.13	0.28	0.28
Татары	0.68	0.34	0.24	0.07	0.11
Другие	1.5	0.76	0.81	8.15	2.73

для реализации своих образовательных и статусных и жизненных притязаний. Перепись населения 2009 г. фиксирует наибольшую долю белорусов именно в Заводском р-не г. Минска, в котором сейчас сосредоточено более 45 крупных предприятий промышленности, поскольку район заселялся внутренними мигрантами, получившими в первую очередь массовые заводские профессии. В Заводском р-не Минска отмечен наименьший уровень этнического разнообразия – вероятно расселение мигрантов иных этнических групп происходило с учетом многих других социокультурных признаков (уровень образования, имущественные и профессиональные признаки) [18].

Минск как мегаполис представляет собой достаточно компактное образование, в связи с чем административно-территориальные единицы (р-ны) образованы без выделения центра – по принципу “нарезания пиццы” – все р-ны города, за исключением Заводского, включают часть центра мегаполиса и микрорайоны у кольцевой дороги [3]. Последнее обстоятельство не позволяет проследить более точную территориально-этническую подразделенность по типу центр/окраина, которая, несомненно, существует. Например, наиболее благоприятные в экологическом плане (с минимумом промышленных предприятий) северо-западные р-ны Минска – Центральный, Советский и Первомайский, предпочитают для проживания русские, украинцы, евреи, армяне. Эти же административные р-ны характеризуются наибольшим уровнем этнического разнообразия.

Поскольку внешнюю миграцию долгие годы определяли квалифицированные кадры, получившие образование и направленные в Минск из других регионов Советского Союза, мы сравнили этническое разнообразие административных р-нов Минска в проекции на образовательный ценз населения [18]. Результаты приведены в табл. 3. Примечательно, что крайние значения параметров этнического разнообразия и образова-

Таблица 3. Сравнение меры этнического разнообразия и образовательного ценза населения административных р-нов г. Минска

Район Минска	Мера этнического разнообразия, <i>H</i>	Число лиц на 1000 человек в возрасте старше 16 лет	
		с высшим образованием	с профессионально-техническим образованием
Центральный	0.423*	398*	52**
Советский	0.419*	389*	47**
Первомайский	0.431*	372*	57**
Заводской	0.273**	228**	100*
Минск в целом	0.355	321	72.6

* — высокое значение показателя; ** — низкое значение показателя.

тельного ценза свойственны одним и тем же административным р-нам Минска. В Центральном, Советском и Первомайском р-нах выявлены наибольшие значения меры этнического разнообразия, максимальное число лиц с высшим образованием и минимальное — с профессионально-техническим. Для Заводского р-на все наоборот — минимальные значения этнического разнообразия и доли лиц с высшим образованием, максимум лиц с профессионально-техническим образованием. Приведенные в табл. 3 результаты позволяют сделать вывод, что уровень образования является активным фактором при формировании населения мегаполиса по типу промышленного центра.

Ранее упоминалось, что наибольшей неравномерностью расселения по территории г. Минска характеризуются цыгане (рис. 1, рис. 2, табл. 1). Наибольшая доля цыган проживает в Заводском и Партизанском р-нах г. Минска (суммарно около 60% от всей численности этнической группы). Для Заводского р-на также характерна наибольшая частота встречаемости азербайджанцев. В целом, для цыган и азербайджанцев было выявлено сходство в характере расселения по р-нам мегаполиса. На первый взгляд, причиной этого может быть большая доступность жилья и мест трудоустройства. Однако, по нашему мнению, высокая доля цыган в Заводском и Партизанском р-нах обусловлена, в первую очередь, наличием обширных кварталов частной застройки, поскольку для этой наиболее закрытой этнической группы жизнь в доме усадебного типа обеспечивает меньший уровень публичности.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что послевоенная стра-

тификация населения Минска как мегаполиса происходила по совокупности социокультурных признаков (этническая принадлежность, уровень образования, имущественные, профессиональные и другие) в условиях, определяемых в первую очередь интересами промышленного развития города. Современная этническая топография Минска соответствует дисперсному типу расселения этнических групп, как это показано ранее для мегаполисов Новосибирска [8], Санкт-Петербурга [9] и Москвы [10]. Сопоставимы даже количественные показатели уровня генетической дифференциации популяций. Так же, как и в Санкт-Петербурге и Москве, в Минске удельный вес “титულიной национальности” выше на городских, особенно промышленных, окраинах. В Минске также не выявлены этнические анклавы. Эти обстоятельства указывают на наличие общих тенденций в развитии данных мегаполисов, обусловленных длительным существованием в одной большой стране и формированием по типу промышленных центров.

Результаты данного исследования, демонстрирующего наличие генетической дифференциации населения Минска, необходимо учитывать при формировании генетических баз данных для целей ДНК-идентификации.

Исследование проведено в рамках Научно-технической программы Союзного государства “Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства” (“ДНК-идентификация”): со стороны Республики Беларусь — задание 10: “Изучить генетические и демографические параметры сме-

шанного населения г. Минска, необходимые для прогноза динамики генофонда мегаполиса и разработки методики формирования криминалистических баз данных для целей ДНК-идентификации”; со стороны Российской Федерации – мероприятие 10: “Разработка методики формирования баз данных для целей ДНК-идентификации в смешанном населении мегаполиса и прогноза динамики генофонда мегаполиса под воздействием миграционных процессов”.

Исследование одобрено Этическим комитетом ИОГен РАН.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курбатова О.Л. Демографическая генетика городского населения. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: ИОГен РАН, 2014. 49 с.
2. Население Минска [Электронный ресурс] // Материал из Википедии – свободной энциклопедии. Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/Население_Минска#cite_note-19, свободный. Загл. с экрана.
3. Административно-территориальное деление Минска [Электронный ресурс] // Материал из Википедии – свободной энциклопедии. Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/Административно_деление_Минска, свободный. Загл. с экрана.
4. Свежинский Е.А., Курбатова О.Л. Опыт исторической реконструкции генетико-демографической структуры московской популяции на рубеже XIX и XX веков // Генетика. 1999. Т. 35. № 8. С. 1149–1159.
5. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Свежинский Е.А. Влияние этноконфессиональных факторов на динамику генофонда населения Москвы // Мусульмане изменяющейся России. М.: Российская политическая энциклопедия (РОССПЭН), 2002. С. 142–172.
6. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю. Урбанизированные популяции // Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. Гл. 5.2 / Ред. Алтухов Ю.П. М.: Наука, 2004. С. 433–516.
7. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю. Городские популяции: возможности генетической демографии (миграция, подразделенность, аутбридинг) // Вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 155–188.
8. Грачева А.С., Победоносцева Е.Ю., Удина И.Г., Курбатова О.Л. Территориальная подразделенность популяции мегаполиса по этническому признаку в связи с проблемой создания генетических баз данных. Новосибирск // Генетика. 2018. Т. 54. Приложение. С. S85–S90. <https://doi.org/10.1134/S0016675818130064>
9. Грачева А.С., Победоносцева Е.Ю., Удина И.Г., Курбатова О.Л. Территориальная подразделенность популяции мегаполиса по этническому признаку в связи с проблемой создания генетических баз данных. Санкт-Петербург // Генетика. 2019. Т. 55. № 12. С. 1442–1450. <https://doi.org/10.1134/S0016675819120051>
10. Грачева А.С., Победоносцева Е.Ю., Удина И.Г., Курбатова О.Л. Территориальная подразделенность популяции мегаполиса по этническому признаку в связи с проблемой создания генетических баз данных. Москва // Генетика. 2020. Т. 54. № 12. С. 1453–1463. <https://doi.org/10.31857/S0016675820120073>
11. Национальный состав населения Республики Беларусь. Перепись населения 2009 // Минск: Национальный статистический комитет Республики Беларусь, 2011. Т. III. 436 с.
12. Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis [Электронный ресурс]. URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3> (дата обращения 02.06.2020).
13. Титов В.С. Историко-этнографическое районирование материальной культуры белорусов: XIX–начало XX в. // Минск: Наука и техника, 1983. 152 с.
14. Антропология Беларуси в исследованиях конца XIX–середины XX в. / Научн. ред. Саливан И.И., Марфина О.В. Минск: Беларуская навука, 2017. 456 с.
15. Польский С.А. Демографические проблемы развития Минска. Минск: Издательство БГУ им. В.И. Ленина, 1976. С. 154.
16. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Веремейчик В.М. и др. Особенности генетико-демографических процессов в населении трех мегаполисов в связи с проблемой создания генетических баз данных // Генетика. 2013. Т. 49. № 4. С. 513–522.
17. Удина И.Г., Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю. и др. Влияние этно-демографических факторов на генетическую дифференциацию городских популяций // Программа фундаментальных исследований Президиума РАН “Биологическое разнообразие”, подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие”. Сборник материалов. Москва, 2011. С. 189–192.
18. Национальный состав населения Республики Беларусь. Перепись населения 2009. Образовательный уровень населения Республики Беларусь. Минск: Национальный статистический комитет Республики Беларусь, 2011. Т. IV. С. 236–237.

Territorial Subdivision of the Megalopolis Population by the Ethnic Trait in Relation to the Problem of Creating Genetic Databases. Minsk

I. S. Tsybovsky^a, E. A. Spivak^{a, *}, S. A. Kotova^a,
V. S. Krumpleyski^b, A. S. Gracheva^{c, **}, and O. L. Kurbatova^c

^aScientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee
of the Republic of Belarus, Minsk, 220114 Republic of Belarus

^bInstitute of History of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus

^cVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: spivak_e@inbox.ru

**e-mail: palesa@yandex.ru

The analysis of the unevenness of the settlement of ethnic groups, the assessment of ethnic diversity and the level of genetic differentiation of the population of the districts of Minsk have been performed. The highest level of ethnic diversity is typical for Pervomaisky, Sovetsky and Tsentralny districts, and the lowest for Zavadskoy district of Minsk. The level of differentiation of megalopolis districts according to the distribution of the most numerous ethnic groups was calculated ($F_{st} = 0.63 \times 10^{-2}$). Maps reflecting the ethnic topography of Minsk were built. The most uneven settlement is shown for Roma and Jews, the most uniform – for Poles and Belarusians. The research results create the basis for the formation of a database of Minsk residents for the purposes of DNA identification in forensic medicine.

Keywords: megalopolis, Minsk, ethnic groups, migrants, ethnic topography, territorial subdivision of population, “quasi-genetic” markers, F_{st} , databases for DNA identification purposes.

ОЦЕНКА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ И РОДИТЕЛЬСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ХРОМОСОМНЫХ МИКРОДЕЛЕЦИЙ И МИКРОДУПЛИКАЦИЙ, ЗАТРАГИВАЮЩИХ ГЕН *CNTN6*, В ВЫБОРКЕ ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ НЕРВНО-ПСИХИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ И У ЗДОРОВЫХ ИНДИВИДОВ

© 2021 г. М. Е. Лопаткина¹, *, С. А. Иванова², И. Н. Лебедев¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

²Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634014 Россия

*e-mail: maria.lopatkina@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 01.09.2020 г.

После доработки 02.11.2020 г.

Принята к публикации 17.11.2020 г.

Проведен анализ распространенности микроделечий и микродупликаций гена *CNTN6* среди пациентов с нарушением нервно-психического развития и здоровых индивидов. С помощью матричной сравнительной геномной гибридизации и ПЦР в режиме реального времени в выборке 1070 пациентов с задержкой интеллектуального развития, 86 пациентов с клиническим диагнозом шизофрения и 200 здоровых индивидов выполнен скрининг изменений числа копий хромосомного региона 3p26.3, затрагивающих ген *CNTN6*. На основании полученных результатов и данных литературы оценена суммарная частота изолированных микроделечий и микродупликаций, составившая 1 : 711 (0.14%) в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития и 1 : 917 (0.11%) в группе здоровых индивидов. Среди здоровых индивидов статистически значимо преобладали микродупликации *CNTN6* ($p = 0.0372$). Для 43 из 100 описанных в литературе случаев хромосомных мутаций было показано их наследование от одного из родителей. В 12 случаях из 18 (67%) микроделечии и микродупликации были унаследованы пробандом от условно здорового родителя без фенотипических проявлений хромосомной мутации.

Ключевые слова: хромосомные болезни, вариации числа копий участков ДНК, синдромы микроделечий и микродупликаций, нарушение нервно-психического развития, неполная пенетрантность, геномный импринтинг.

DOI: 10.31857/S0016675821070109

Хромосомные болезни, возникающие в результате числовых и структурных aberrаций хромосом, представляют собой обширную группу наследственных заболеваний, характеризующихся задержкой физического, психомоторного и речевого развития, неврологическими нарушениями, лицевыми дисморфизмами, аномалиями скелета и конечностей, врожденными пороками внутренних органов. Изучение патогенеза хромосомных болезней и возможностей реализации хромосомного дисбаланса остается одной из актуальных проблем в медицинской генетике. Несмотря на прогресс в разработке и внедрении молекулярно-генетических методов диагностики хромосомных аномалий, а также выявления большого числа микроструктурных хромосомных aberrаций, или вариаций в числе копий участков ДНК (CNV), оценка патогенетической значимости данных пе-

рестроек осложняется наличием неспецифических фенотипических проявлений хромосомных мутаций, их неполной пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью, клинической гетерогенностью хромосомного синдрома. В ряде случаев отсутствие фенотипических проявлений у носителей патогенетически значимой перестройки и проявление клинической картины заболевания у пробанда (при передаче мутации по материнской или отцовской линии) могут указывать на импринтированный характер действия локализованных в ней генов.

Уникальными в плане изучения эффектов хромосомного дисбаланса на фенотип пациента являются “моногенные и внутригенные CNV”, представляющие собой случаи хромосомных мутаций, затрагивающих единственный ген или его отдельную часть. Несмотря на сужение спектра

вовлеченных в перестройку генов, установление гено-фенотипических корреляций и оценка патогенетической значимости подобных CNV также могут осложняться неполной пенетрантностью мутации. В настоящее время накоплено достаточное количество информации о CNV данного типа, однако анализ частоты распространенности мутации и эффектов родительского происхождения перестройки на фенотип унаследовавшего ее пациента еще не проведен.

В ходе молекулярно-цитогенетической диагностики пациентов с задержкой развития и идиопатическими формами интеллектуальных нарушений ранее нами были описаны три уникальных случая реципрокных моногенных CNV (два случая микроделеции и один случай микродупликации) в регионе 3p26.3 [1]. В области перестройки локализован единственный ген *CNTN6*, экспрессирующийся в головном мозге и рассматриваемый в качестве кандидатного гена развития нервно-психических заболеваний [2, 3]. Цель настоящей работы – оценка распространенности и родительского происхождения хромосомных мутаций, затрагивающих ген *CNTN6*, в группе пациентов с нарушением интеллектуального развития и шизофренией.

В настоящем исследовании обследовано 1070 пациентов с задержкой развития и идиопатической формой интеллектуальных нарушений, 86 пациентов с клиническим диагнозом шизофрения и 200 здоровых индивидов (группа контроля). Обследование пациентов и сбор клинического материала осуществлялись на базе Генетической клиники НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, клиники НИИ психического здоровья Томского НИМЦ и Томской клинической психиатрической больницы. Информированное согласие от родителей пробандов с интеллектуальными нарушениями, пациентов с шизофренией и индивидов контрольной группы было получено во всех случаях. Перед проведением исследования было получено разрешение комитетов по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики и НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП “Медицинская геномика” Томского НИМЦ и ресурсов биобанка “Биобанк населения Северной Евразии” НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Для оценки распространенности микроделеций и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*, в группе пациентов с нервно-психическими заболеваниями был проведен скрининг с помощью методов ПЦР в режиме реального времени (200 пациентов [4]) и матричной сравнительной геномной гибридизации (870 пациентов). Проведена ПЦР-диагностика микроструктурных aberrаций в регионе 3p26.3 для выявления вероятного носительства микроделеций и микродупликаций гена *CNTN6* в выборке больных шизофренией. При исследовании выборок пациентов с нарушением

нервно-психического развития и контрольной группы не было обнаружено ни одного нового индивида с измененным числом копий гена *CNTN6* [1].

В литературе представлена информация о 103 пациентах с микроделециями и микродупликациями, затрагивающими ген *CNTN6*. Поскольку микроструктурные aberrации гена *CNTN6* у родственников в одной семье не могут быть рассмотрены как изолированные отдельные случаи хромосомной аномалии, общее число мутационных событий составило 100. Для 97 из 100 событий в литературе доступны данные об объемах выборок, в которых были проведены исследования (68 942 индивида). С учетом описанных нами ранее пациентов и данных литературы оценена суммарная частота микроделеций и микродупликаций, затрагивающих единственный ген *CNTN6*, которая составила 1 : 711 (0.14%) (табл. 1).

Стоит отметить, что хромосомные мутации, затрагивающие ген *CNTN6*, также встречаются у здоровых людей [2, 3]. С учетом результатов настоящего исследования, а также данных литературы частота микроделеций и микродупликаций гена *CNTN6* в выборке здоровых индивидов составила 1 : 917 (0.11%) (17 случаев выявленных CNV в контрольной выборке объемом 15596 человек). Соотношение случаев микроделеций и микродупликаций гена *CNTN6* среди здоровых индивидов составило 1 : 4.7. Примечательно, что аналогичный показатель в группе пациентов составил 1 : 1.3. Таким образом, в группе здоровых индивидов в сравнении с группой пациентов с нарушением нервно-психического развития отмечено статистически значимое преобладание микродупликаций гена *CNTN6* (точный критерий Фишера, $p = 0.0372$). Следовательно, отсутствие фенотипических проявлений перестройки у индивида более вероятно в случае наличия у него микродупликации *CNTN6*. Недостаток микроделеций среди всех выявленных хромосомных мутаций, затрагивающих ген *CNTN6*, в группе здоровых индивидов, вероятно, может указывать, с одной стороны, на их более тяжелое клиническое проявление, а с другой, – на неполную пенетрантность микродупликаций *CNTN6*.

Для 100 описанных в литературе случаев микроделеций и микродупликаций гена *CNTN6* данные о наследовании хромосомной перестройки были получены в 46 случаях (25 мутаций материнского, 18 – отцовского происхождения, 1 *de novo* мутация). В двух случаях авторами были представлены данные о том, что перестройка унаследована, но неизвестно от кого из родителей. Соотношение частоты перестроек материнского и отцовского происхождения у пациентов с делециями и дупликациями *CNTN6* составило 1.2 : 1 и 1.6 : 1 соответственно. Статистически значимых различий в частоте материнских и отцовских CNV у пациентов в зависимости от типа перестройки установлено не было ($p = 0.43$). В шести случаях микроделеции и

Таблица 1. Частота и родительское происхождение микроструктурных aberrаций гена *CNTN6* в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития и в группе здоровых индивидов

Исследование	Делеция <i>CNTN6</i>		Дупликация <i>CNTN6</i>		Общее число CNV	Объем выборки	Наследование	Диагноз
Настоящее исследование + Kashevarova et al., 2014 [1] + Лопаткина и др., 2016 [4]	2 (1 + 1 ¹)	1 отц., 1 унасл.	1	1 отц.	3	1070	2 отц., 1 унасл.	УО, ЗПР, РАС, СДВГ, задержка речевого развития, тревожность, гиперкинезы, дизартрия, аномалии сердечно-сосудистой и скелетно-мышечной систем
Настоящее исследование	0	—	0	—	0	86	—	Шизофрения
Szatmari et al., 2007 [5]	1	1 неизв.	0	—	1	6709	1 неизв.	РАС
Elia et al., 2010 [6]	1	1 отц.	1	1 мат.	2	335	1 мат., 1 отц.	СДВГ
Saus et al., 2010 [7]	1	1 неизв.	0	—	1	724	1 неизв.	РАС
Wang et al., 2010 [8]	0	—	1	1 неизв.	1	1033	1 неизв.	Нервная анорексия
Kaminsky et al., 2011 [9]	3	2 мат., 1 неизв.	4	1 мат., 1 отц., 2 неизв.	7	15749	3 мат., 1 отц., 3 неизв.	ЗПР, УО, РАС, ВПР, лицевые дисморфизмы
Van Daalen et al., 2011 [10]	0	—	1	1 <i>de novo</i>	1	50	1 <i>de novo</i>	РАС
Martin et al., 2014 [11]	0	—	2	1 унасл., 1 неизв.	2	1723	1 унасл., 1 неизв.	РАС, СДВГ
Pinto et al., 2014 [12]	3	3 мат.	4	3 мат., 1 отц.	7	2446	6 мат., 1 отц.	РАС
Hu et al., 2015 [13]	7 (6 + 1 ¹)	1 отц., 6 неизв.	5	1 мат., 1 отц., 3 неизв.	12	3724	1 мат., 2 отц., 9 неизв.	ЗПР, УО, РАС, СДВГ, БАР, ОВР, судороги, страбизм, нистагм, нарушение поведения, трудности в обучении, аномалии сердечно-сосудистой и скелетно-мышечной систем
Brain & Body Genetic Resource Exchange database (цит. по Mercati et al., 2016)	9	4 мат., 3 отц., 2 неизв.	6 (5 + 1 ²)	2 мат., 1 отц., 2 неизв., 1 мат. ²	15	5891	7 мат., 4 отц., 4 неизв.	ЗВУР, ЗПР, задержка речевого развития, РАС, СДВГ, ОКР, диспраксия, синдром Туретта, нарушение поведения, тревожность, кардиологические нарушения, лицевые дисморфизмы
Fry et al., 2016 [14]	0	—	1	1 неизв.	1	80	1 неизв.	ЗПР, УО, РАС, генерализованная эпилепсия, гипертонус мышц нижних конечностей
Mercati et al., 2016 [3]	4 (3 + 1 ¹)	1 мат., 3 отц.	0	—	4	633	1 мат., 3 отц.	РАС, фобии, диспраксия, гиперактузия

Таблица 1. Окончание

Исследование	Делеция <i>CNTN6</i>		Дупликация <i>CNTN6</i>		Общее число <i>CNV</i>	Объем выборки	Наследование	Диагноз
	1	2	1	2				
Huang et al., 2017 [2]	1	1 неизв.	9	9 неизв.	10	2434	10 неизв.	Синдром Туретта, СДВГ, ОКР
Juan-Perez et al., 2018 [15]	1	1 мат.	0	—	1	—	1 мат.	Шизофрения, эпилепсия, пограничная УО
Tassano et al., 2018 [16]	1	1 отц.	1	1 отц.	2	—	2 отц.	УО, РАС, РСП, ОКР
Thygesen et al., 2018 [17]	0	—	2	2 неизв.	2	599	2 неизв.	УО, нарушение поведения, шизофрения
Rerņikova et al., 2019 [18]	6	1 мат., 5 неизв.	13	4 мат., 1 отц., 8 неизв.	19	20226	5 мат., 1 отц., 13 неизв.	ЗПР, УО, РАС, СДВГ, ОКР, депрессия, тревожность, гипотония, судороги, синдром Туретта, болезнь Паркинсона, апраксия, кардиологические нарушения, скелетные аномалии, лицевые дисморфизмы
Zargel et al., 2019 [19]	1	1 неизв.	0	—	1	2691	1 неизв.	РАС
Higginbotham, 2020 [20]	2	2 неизв.	6	1 отц., 5 неизв.	8	2739	1 отц., 7 неизв.	Задержка речевого развития, РАС, СДВГ
Итого (пациенты с нервно-психическими заболеваниями)	43	12 мат., 10 отц., 1 унасл. ¹ , 20 неизв.	57 (56 + 1 ²)	1 <i>de novo</i> , 13 мат., 8 отц., 1 унасл. ¹ , 34 неизв.	100	68942	1 <i>de novo</i> , 25 мат., 18 отц., 2 унасл. ¹ , 54 неизв.	1 : 711
Настоящее исследование	0	—	0	—	0	200	—	Здоровые индивиды
Elija et al., 2010 [6]	0	—	0	—	0	2026	—	»
Saus et al., 2010 [7]	1	1 неизв.	0	—	1	341	1 неизв.	»
Mercati et al., 2016 [3]	1	1 неизв.	12	12 неизв.	13	8936	13 неизв.	»
Huang et al., 2017 [2]	1	1 неизв.	2	2 неизв.	3	4093	3 неизв.	»
Итого (здоровые индивиды)	3	3 неизв.	14	14 неизв.	17	15596	17 неизв.	1 : 917

Примечание. Во втором и третьем столбцах представлена информация о количестве выявленных микроделений и микродупликаций *CNTN6* и происхождении каждой конкретной перестройки: мат. — *CNV* унаследована от матери; отц. — *CNV* унаследована от отца; неизв. — нет данных о происхождении *CNV*; унасл. — представлены данные о наследовании перестройки от одного из родителей (без уточнения от матери или отца); ¹ — семейный случай хромосомной мутации гена *CNTN6* (случай микроделеции и микродупликации в одной семье у сибсов учитывались в расчетах как одно мутационное событие); ² — трипликация *CNTN6*; БАР — билатеральное аффективное расстройство; ВПР — врожденные пороки развития; ЗВУР — задержка внутриутробного развития; ЗПР — задержка психомоторного развития; ОВР — оппозиционно-вызывающее расстройство; ОКР — обсессивно-компульсивное расстройство; РАС — расстройство аутистического спектра; РСП — расстройство социального поведения; СДВГ — синдром дефицита внимания и гиперактивности; УО — умственная отсталость. В исследованиях [1–3, 6, 9, 12, 18–20] представлены сведения о дополнительных *CNV*, полиморфных, либо с неясным клиническим значением, обнаруженных в карิโอטיפах с микроделениями и микродупликациями гена *CNTN6*, которые при дальнейшем накоплении информации могут приобрести значение для интерпретации клинической значимости и неполной пенетрантности изучаемых хромосомных перестроек.

микродупликации *CNTN6* были унаследованы от родителей с различными нервно-психическими нарушениями (биполярным расстройством, синдромом дефицита внимания и гиперактивности, расстройством аутистического спектра, трудностями в обучении, депрессивным расстройством, врожденным нарушением слуха, дислексией, судорогами). В 12 случаях в семьях с известным семейным анамнезом отмечено наследование хромосомной мутации от условно здоровых родителей и ее фенотипическое проявление у детей [1, 3, 13, 18]. Примечательно, что у четырех пациентов семейный анамнез по линии бессимптомного носителя перестройки был обогащен случаями нервно-психических нарушений [3, 18]. Отсутствие данных о возникновении перестройки *de novo* или наследовании микроделетий и микродупликаций *CNTN6* у здоровых индивидов не позволяет в настоящее время однозначно оценить влияние родительского происхождения мутации на ее фенотипическое проявление в группе пациентов с нарушением нервно-психического развития.

Проведенный анализ родительского происхождения CNV в случае описанного нами ранее пациента с микродупликацией гена *CNTN6* показал, что хромосомная aberrация была унаследована от условно здорового отца, который, в свою очередь, унаследовал ее от своей условно здоровой матери, что может указывать на моноаллельный характер экспрессии вероятно импринтированного гена *CNTN6* [1]. Примечательно, что в наших дальнейших исследованиях был выявлен феномен неравной аллельной экспрессии *CNTN6* в нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных от пациентов с нормальным числом копий гена *CNTN6* и с его дупликацией [21]. Результаты анализа экспрессии *CNTN6* в нейронах, полученных из ИПСК здоровых доноров, указали на преобладание экспрессии материнского аллеля относительно отцовского. В нейронах с микродупликацией *CNTN6* наблюдалась преимущественная экспрессия гена с материнского гомолога — уровень экспрессии дуплицированного аллеля, унаследованного от отца, составил только 5–10% относительно активности аллеля дикого типа, наследованного от матери [21]. Более того, в нейронах, полученных из ИПСК отца пациента, уровень экспрессии *CNTN6* был сопоставим с уровнем экспрессии гена в нейронах, дифференцированных из ИПСК, полученных от здоровых доноров. При этом активность гена с дуплицированного аллеля материнского происхождения практически в 2 раза превышала экспрессию с аллеля дикого типа у здоровых доноров [22]. Таким образом, полученные данные могут объяснить отсутствие клинических проявлений у отца — бессимптомного носителя дупликации *CNTN6*, унаследовавшего ее от своей матери (компенсация эффектов хромосомного дисбаланса), и проявления заболевания при передаче хромосомной мутации от отца к детям.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-315-90105.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S. et al. Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: *CNTN6* as a new candidate gene for intellectual disability // *Mol. Cytogenet.* 2014. V. 7. № 1: 97. <https://doi.org/10.1186/s13039-014-0097-0>
2. Huang A.Y., Yu D., Davis L.K. et al. Rare copy number variants in *NRXN1* and *CNTN6* increase risk for Tourette syndrome // *Neuron.* 2017. V. 94. № 6. P. 1101–1111.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.010>
3. Mercati O., Huguet G., Danckaert A. et al. *CNTN6* mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders // *Mol. Psychiatry.* 2016. V. 22. № 4. P. 625–633. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.61>
4. Лопаткина М.Е., Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Оценка ассоциации вариаций числа копий гена *CNTN6* с идиопатическими интеллектуальными расстройствами // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 9. С. 1109–1112. <https://doi.org/10.7868/S0016675816090095>
5. Szatmari P., Paterson A.D., Zwaigenbaum L. et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. № 3. P. 319–328. <https://doi.org/10.1038/ng1985>
6. Elia J., Gai X., Xie H.M. et al. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes // *Mol. Psychiatry.* 2010. V. 15. № 6. P. 637–646. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.57>
7. Saus E., Brunet A., Armengol L. et al. Comprehensive copy number variant (CNV) analysis of neuronal pathways genes in psychiatric disorders identifies rare variants within patients // *J. Psychiatr. Res.* 2010. V. 44. № 14. P. 971–978. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.03.007>
8. Wang K., Zhang H., Bloss C.S. et al. A genome-wide association study on common SNPs and rare CNVs in anorexia nervosa // *Mol. Psychiatry.* 2010. V. 16. № 9. P. 949–959. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.107>
9. Kaminsky E.B., Kaul V., Paschall J. et al. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities // *Genet. Med.* 2011. V. 13. № 9. P. 777–784. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31822c79f9>

10. Van Daalen E., Kemner C., Verbeek N.E. et al. Social responsiveness scale-aided analysis of the clinical impact of copy number variations in autism // *Neurogenetics*. 2011. V. 12. № 4. P. 315–323. <https://doi.org/10.1007/s10048-011-0297-2>
11. Martin J., Cooper M., Hamshere M.L. et al. Biological overlap of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder: Evidence from copy number variants // *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*. 2014. V. 53. № 7. P. 761–770.e26. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2014.03.004>
12. Pinto D., Delaby E., Merico D. et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders // *Am. J. Hum. Genet.* 2014. V. 94. № 5. P. 677–694. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.018>
13. Hu J., Liao J., Sathanoori M. et al. *CNTN6* copy number variations in 14 patients: A possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders // *J. Neurodev. Disord.* 2015. V. 7. № 1: 26. <https://doi.org/10.1186/s11689-015-9122-9>
14. Fry A.E., Rees E., Thompson R. et al. Pathogenic copy number variants and *SCN1A* mutations in patients with intellectual disability and childhood-onset epilepsy // *BMC Med. Genet.* 2016. V. 17. № 1: 34. <https://doi.org/10.1186/s12881-016-0294-2>
15. Juan-Perez C., Farrand S., Velakoulis D. Schizophrenia and epilepsy as a result of maternally inherited *CNTN6* copy number variant // *Schizophr. Res.* 2018. V. 202. P. 111–112. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.06.062>
16. Tassano E., Uccella S., Giacomini T. et al. Clinical and molecular characterization of two patients with *CNTN6* copy number variations // *Cytogenet. Genome Res.* 2018. V. 156. № 3. P. 144–149. <https://doi.org/10.1159/000494152>
17. Thygesen J.H., Wolfe K., McQuillin A. et al. Neurodevelopmental risk copy number variants in adults with intellectual disabilities and comorbid psychiatric disorders // *Br. J. Psychiatry*. 2018. V. 212. № 5. P. 287–294. <https://doi.org/10.1192/bjp.2017.65>
18. Repnikova E.A., Lyalin D.A., McDonald K. et al. *CNTN6* copy number variations: Uncertain clinical significance in individuals with neurodevelopmental disorders // *Eur. J. Med. Genet.* 2019. V. 63. № 1: 103636. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.02.008>
19. Zarrei M., Fehlings D.L., Mawjee K. et al. De novo and rare inherited copy-number variations in the hemiplegic form of cerebral palsy // *Genet. Med.* 2019. V. 20. № 2. P. 172–180. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.83>
20. Higginbotham E.J. Characterizing Genomic Duplication in Autism Spectrum Disorder. Univ. Toronto, 2020. 166 p.
21. Gridina M.M., Matveeva N.M., Fishman V.S. et al. Allele-specific biased expression of the *CNTN6* gene in iPSC cell-derived neurons from a patient with intellectual disability and 3p26.3 microduplication involving the *CNTN6* gene // *Mol. Neurobiol.* 2018. V. 55. № 8. P. 6533–6546. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0851-5>
22. Gridina M.M., Matveeva N.M., Menzorov A.G. et al. *CNTN6* expression in human iPSC derived neurons from patient with neurodevelopmental disorders and 3p26.3 microduplication and the same microduplication healthy carrier // *Mol. Cytogenet.* 2019. V. 12 (Suppl. 1). 30. <https://doi.org/10.1186/s13039-019-0439-z>

Estimation of the Prevalence and Parental Origin of Chromosomal Microdeletions and Microduplications, Affecting *CNTN6* Gene, in Patients with Neurodevelopmental Disorders and Healthy Individuals

M. E. Lopatkina^{a, *}, S. A. Ivanova^b, and I. N. Lebedev^a

^aResearch Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

^bMental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634014 Russia

*e-mail: maria.lopatkina@medgenetics.ru

The analysis of the prevalence of the *CNTN6* gene microdeletions and microduplications in patients with neurodevelopmental disorders and healthy individuals was performed. Array comparative genomic hybridization and real-time PCR were used for screening of the *CNTN6* gene mutations among 1070 patients with intellectual disability, 86 schizophrenia patients and 200 healthy individuals. According to our current results and published data, the overall frequency of microdeletions and microduplications of the *CNTN6* gene was estimated as 1 : 711 (0.14%) in patients with neurodevelopmental disorders and 1 : 917 (0.1%) in healthy individuals. The increase in the number of *CNTN6* microduplication in a control group was statistically significant ($p = 0.0372$). For 43 out of 100 *CNTN6* chromosomal mutations, described in the literature, the inheritance from one of the parents was shown. In 12 cases out of 18 (67%), *CNTN6* gene microdeletions and microduplications were inherited from a conditionally healthy parent without phenotypic manifestations of the chromosomal mutation.

Keywords: chromosomal diseases, copy number variation, microdeletion and microduplication syndromes, neurodevelopmental disorders, incomplete penetrance, genomic imprinting.

ИСТОКИ ФОРМИРОВАНИЯ РУССКОГО ГОРОДСКОГО НАСЕЛЕНИЯ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА

© 2021 г. Г. И. Ельчинова^{1, *}, В. В. Кадышев¹, Р. А. Зинченко^{1, 2}

¹Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

²Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья
им. Н.А. Семашко, Москва, 105064 Россия

*e-mail: elchinova@med-gen.ru

Поступила в редакцию 08.09.2020 г.

После доработки 22.12.2020 г.

Принята к публикации 25.12.2020 г.

На основании данных архива лаборатории генетической эпидемиологии МГНЦ им. Н.П. Бочкова выделены брачные записи для трех крупных городов Северного Кавказа со значительной долей русского населения: Владикавказ (25% русских), Моздок (59%), Черкесск (54%). Отобраны брачные записи, в которых один или оба супруга – русские. Проанализированы места рождения мигрантов с точностью до федеральных округов. Показано, что три четверти русского населения северокавказских городов являются уроженцами Северо-Кавказского федерального округа. Основная доля русских-мигрантов – уроженцы Украины и Казахстана.

Ключевые слова: русское население Северного Кавказа, миграция, городское население.

DOI: 10.31857/S001667582108004X

Традиционно большое внимание исследователей привлекают небольшие этнические сельские популяции, в той или иной степени изолированные в силу различных обстоятельств до практически единичной эндогамности [1]. В то же время постоянное увеличение городского населения в значительной степени происходит за счет мигрантов, о чем свидетельствует весьма невысокий индекс эндогамии в различных, даже небольших, городах, что неоднократно фиксировалось различными исследователями. При этом было замечено, что различные этносы в одном и том же городе могут характеризоваться различной миграционной активностью, что вынуждает рассматривать популяционно-генетические характеристики отдельно для каждой этнической группы. Данная работа посвящена изучению направленности миграционного потока русского населения в три крупные города Северного Кавказа. Именно миграционный поток не только изменяет социальную структуру популяции [2], но и способствует смещению генных частот, поэтому определение направленности этого миграционного потока представляется актуальным и для генетиков. Учет исходящих мест миграций производился с точностью до федеральных округов РФ для обеспечения территориальной привязки и удобства восприятия (хотя в конце XX в. такого деления еще не было): Северо-Кавказский (СКФО), Южный (ЮФО), Цен-

тральный (ЦФО), Приволжский (ПФО), Северо-Западный (СЗФО), Уральский (УФО), Сибирский (СФО), Дальневосточный (ДФО). Ранее были исследованы миграции в мегаполисы (Москва [3, 4], Новосибирск [5], Санкт-Петербург [6], Харьков [3], Минск [3]).

Брачные записи являются одним из основных небиологических источников информации и позволяют получить ряд популяционно-генетических характеристик, дающих экспресс-оценку состояния популяции в изучаемый момент времени. Индекс эндогамии, этническая брачная ассортативность, интенсивность метисации, локальный инбридинг и параметры изоляции расстоянием могут быть получены с использованием брачных записей [7].

Из архива лаборатории генетической эпидемиологии МГНЦ извлечены брачные записи за 1990–2000 гг., выкопированные во время проведения генетико-эпидемиологического обследования населения Северной Осетии и Карачаево-Черкесии. Рассмотрены три крупных города Северного Кавказа со значительной долей русского населения: Владикавказ (25% русских), Моздок (59%), Черкесск (54%). Из тотальной выборки выделены браки русских, как внутриэтнические, так и межэтнические. Брачные записи содержат сведения о месте рождения и месте жительства брачующихся. Таким образом, мы получили сведения о ме-

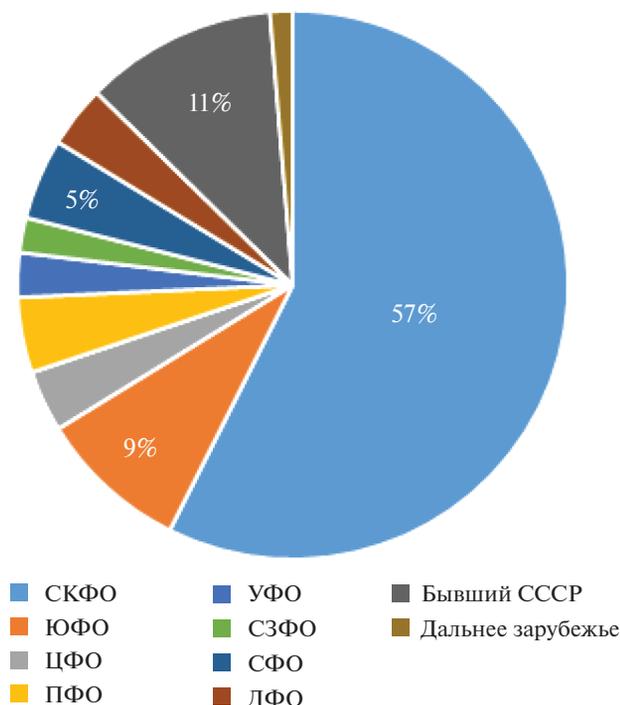


Рис. 1. Распределение русских мигрантов в северокавказские города по месту рождения с точностью до федерального округа (три города вместе).

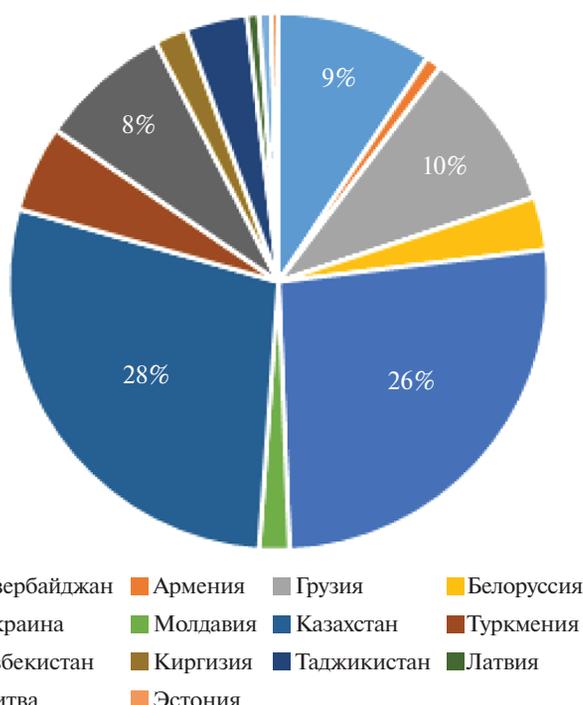


Рис. 2. Распределение мигрантов по местам рождения из республик бывшего СССР (три города вместе).

стах рождения 23881 русского жителя этих городов, мигрантами в эти города оказались 12296 чел. (51.5%).

Интенсивность метисации оценили на основании доли межэтнических браков русских. Составив 32.3% в трех городах, интенсивность метисации русских существенно варьирует: 46.4 (Владикавказ), 43.9 (Моздок), 18.3% (Черкесск). При этом не прослеживается связь ни с долей русского населения в рассматриваемых городах, ни с их абсолютным количеством.

На рис. 1 представлено распределение мигрантов по восьми федеральным округам РФ, а также республикам бывшего СССР и дальнего зарубежья. Заметно значительное количество мигрантов из СКФО. С учетом уроженцев трех городов и “местных” мигрантов уроженцами СКФО являются 78% русского городского населения. Значительна доля мигрантов из недалекого ЮФО и из отдаленных республик бывшего СССР (11%), что рассмотрено отдельно (рис. 2). В населении Санкт-Петербурга 3/4 населения из СЗФО [6], население Москвы в основном из уроженцев ЦФО [4], но все данные без учета этнической принадлежности. В то же время значительные доли русского населения этих городов делают эти оценки сопоставимыми. Аналогично: в Харькове 3/4 ми-

грантов – уроженцы Украины, а в Минске 91% мигрантов – уроженцы Белоруссии [3].

На рис. 2 представлено распределение по месту рождения русских мигрантов из республик бывшего СССР. Значительно число мигрантов – из Казахстана и Украины, а также из Азербайджана, Грузии, Узбекистана; единичны мигранты из прибалтийских республик. Среди многочисленных мигрантов из дальнего зарубежья лидируют с большим отрывом мигранты из несуществующей в настоящее время ГДР (71%), в целом из бывших социалистических стран приехало 87% мигрантов.

Если рассматривать каждый из трех городов отдельно, то несмотря на общие тенденции картины распределения несколько отличаются (рис. 3). Из трех городов Моздок оказался наиболее привлекателен для уроженцев СКФО, во Владикавказе – наибольшая доля мигрантов из бывшего СССР, в Черкеске – из ЮФО.

Таким образом, русские Северного Кавказа, переселяясь в города, не склонны к дальним миграциям, предпочитая близлежащие крупные города своего федерального округа. Около трети городских северокавказских русских вступают в межэтнические браки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-015-00061 и государственного

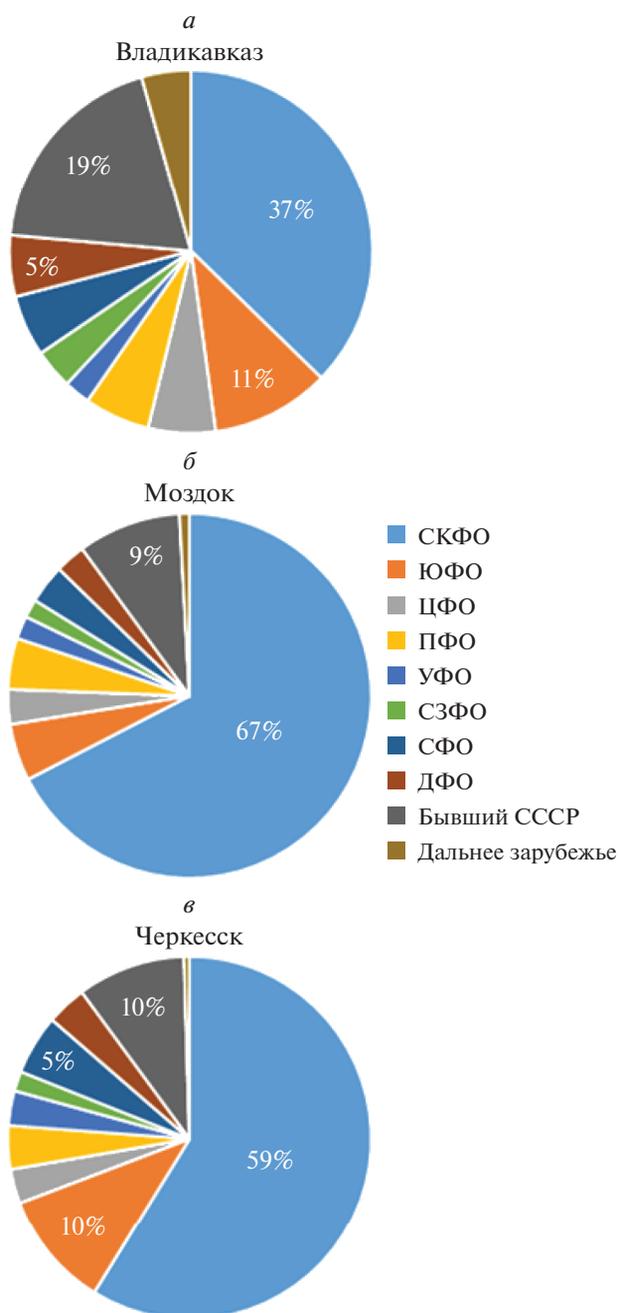


Рис. 3. Распределение русских мигрантов в северокавказские города по месту рождения с точностью до федерального округа (для каждого города отдельно). *а* – Владикавказ, *б* – Моздок, *в* – Черкесск.

задания Министерства науки и высшего образования.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булаева К.Б., Павлова Т.А., Булаев О.А. Генетический полиморфизм в трех популяциях коренных народов Дагестана // Генетика. 1997. Т. 33. № 10. С. 1395–1405.
2. Агафонова Г.Л. Миграция на Северном Кавказе: причины, направления и механизмы влияния на социальную структуру Ставропольского края (1985–2005 гг.): Автореф. дис. ... канд. истор. наук. Пятигорск, 2007. 26 с.

3. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Вермейчик В.М. и др. Особенности генетико-демографических процессов в населении трех мегаполисов в связи с проблемой создания генетических баз данных // Генетика. 2013. Т. 49. № 4. С. 513–522. <https://doi.org/10.7868/S0016675813040085>
4. Курбатова О.Л., Янковский Н.К. Миграция – основной фактор популяционной динамики городского населения России // Генетика. 2016. Т. 52. № 7. С. 831–851. <https://doi.org/10.7868/S0016675816070067>
5. Курбатова О.Л., Удина И.Г., Грачева А.С. и др. Генетико-демографические параметры населения г. Новосибирска // Генетика. 2018. Т. 54. № 13. ПРИЛОЖЕНИЕ. С. S74–S84. <https://doi.org/10.1134/S0016675818130106>
6. Курбатова О.Л., Удина И.Г., Грачева А.С. и др. Генетико-демографические параметры населения г. Санкт-Петербурга. Миграционные процессы // Генетика. 2019. Т. 55. № 9. С. 1071–1082. <https://doi.org/10.1134/S001667581909008X>
7. Ельчинова Г.И. Методы обработки популяционно-генетических данных: структура брачных миграций // Мед. генетика. 2004. Т. 3. № 4. С. 185–192.

Immigration of the Russian Urban Population of the North Caucasus

G. I. Elchinova^{a, *}, V. V. Kadyshev^a, and R. A. Zinchenko^{a, b}

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

^bSemashko National Research Institute of Public Health, Moscow, 105064 Russia

*e-mail: elchinova@med-gen.ru

Based on data from the archive of the laboratory of genetic epidemiology of the Research Centre for Medical Genetics, marriage records were identified for three big cities of the North Caucasus with a significant share of the Russians: Vladikavkaz (25% Russian), Mozdok (59%), Cherkessk (54%). Selected marriage records in which one or both spouses are Russian. The places of birth of migrants are analyzed with accuracy up to Federal districts. It is shown that three-quarters of the Russian population of North Caucasian cities are natives of the North Caucasus Federal district. The main share of Russian foreign migrants are natives of Ukraine and Kazakhstan.

Keywords: Russian population of the North Caucasus, migration, urban population.

УДК 577.21:575.17

ВАРИАНТ rs657152 НЕ АССОЦИИРУЕТСЯ С УРОВНЕМ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ ПРИ COVID-19 ИЛИ ВЕРОЯТНОСТЬЮ ЗАБОЛЕВАНИЯ В ПОПУЛЯЦИИ ЕВРОПЕОИДОВ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

© 2021 г. Е. А. Орлова¹, О. Б. Огарков¹*, П. А. Хромова¹, В. В. Синьков¹, М. А. Хаснатинов¹, С. Н. Жданова¹, Л. В. Рычкова¹, Л. И. Колесникова¹

¹“Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека”, Иркутск, 664003 Россия

*e-mail: obogarkov@sbamsr.irk.ru

Поступила в редакцию 19.09.2020 г.

После доработки 21.10.2020 г.

Принята к публикации 27.10.2020 г.

Перекрестно воспроизводящиеся ассоциации rs657152 в локусе 9q34.2с и rs11385942 в локусе 3p21.31, обнаруженные у больных с тяжелым течением COVID-19 в популяции европеоидов, требуют изучения выявленного феномена в различных популяциях, в том числе, в качестве самостоятельного биологического маркера. Разработаны праймеры и TaqMan-зонды для ПЦР-дискриминации аллелей А и С при однонуклеотидном полиморфизме (SNP) rs657152. Определяли варианты локуса rs657152 А/С у 129 больных COVID-19 и в контрольной группе из 466 здоровых индивидов. Между больными и здоровыми не обнаружено значимых отличий по частотам распределения аллелей А и С: 0.47/0.53 и 0.45/0.55 соответственно. Также не обнаружено различий в распределении аллелей у больных с высокой вирусной нагрузкой в мазке (Ст в диапазоне 16–25), по сравнению со средней и низкой вирусной нагрузкой (Ст в диапазоне 26–40).

Ключевые слова: COVID-19, rs657152, дискриминация аллелей, ПЦР, TaqMan-зонды.

DOI: 10.31857/S0016675821080099

Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) впервые был идентифицирован в городе Ухань, Китай, в конце 2019 г., а заболевание, получившее название COVID-19, быстро превратилось в глобальную пандемию [1]. Существуют значительные вариации в протекании болезни среди пациентов, пораженных вирусом SARS-CoV-2. На первых этапах пандемии страны Европы столкнулись с гораздо большим числом случаев заболевания и смертей от COVID-19, чем Восточная Азия и Россия. Механизмы, которые определяют, почему в одних популяциях возникает больше тяжелых случаев болезни, а в других нет, мало изучены. Патогенез тяжелых форм COVID-19 и связанной с ним дыхательной недостаточности исследован недостаточно, однако более высокая смертность ассоциирована с пожилым возрастом и мужским полом [2, 3], рядом сердечно-сосудистых заболеваний и артериальной гипертензией, ожирением и диабетом [4–6]. Полногеномным анализом ассоциаций (GWAS) [7] были выявлены потенциальные генетические факторы, участвующие в развитии COVID-19 [8]. При исследовании 1980 больных из Италии и Испании выявлены перекрестно воспроизводящиеся ассоциации с вариантом rs11385942 в локусе

3p21.31 и с rs657152 в локусе 9q34.2, которые являлись значимыми на полногеномном уровне [8].

Цель данной работы – разработка ПЦР-теста с TaqMan-зондами, пригодного для дискриминации аллелей А и С rs657152, и сравнительная оценка распределения генотипов в группах больных COVID-19 и здоровых лиц – представителей европеоидного населения (славяне) Иркутской обл.

Соблюдение этических норм. Настоящее исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Сбор клинического материала (мазков нос/глотка) произведен в рамках рутинных противоэпидемических процедур обследований населения Иркутской обл. на пораженность вирусом SARS-CoV-2. Выделение РНК/ДНК из образцов проводили набором “РеалБест экстракция”, ПЦР диагностику набором “РеалБест РНК SARS-CoV-2”. К группе больных были отнесены лица, имеющие диагноз COVID-19 и положительный ПЦР-тест на РНК вируса. К здоровому контролю отнесены контактные лица, проходившие обследование и не имевшие позитивного ПЦР-результата на РНК вируса, диагнозов ОРВИ или COVID-19. Расчет структуры и длины праймеров и зондов для дискриминации аллелей А и С rs657152 (табл. 1) произведен вручную по референсной нуклеотид-

Таблица 1. Список использованных праймеров и зондов

Праймеры/Зонды	Последовательность 5'→3'	Длина ампликона, пн	Отжиг, °С
657152F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	103	56
657152R	AATTTAGGACATGTAAAGTTCA		56
657152A	[FAM]TCTCGAATAGCTTCTTGAAAC[A-LNA]G[BHQ1]		66
657152C	[R6G]CTCGAATAGCTTCTTGAAAC[C-LNA]G[BHQ1]		66

Таблица 2. Характеристика обследованных выборок

Показатель	Контроль	Пациенты с COVID-19
<i>N</i>	<i>N</i> = 466	<i>N</i> = 129
Мужчины, % (<i>N</i>)	33.0 (154)	41.1 (53)
Женщины, % (<i>N</i>)	67.0 (312)	58.9 (76)
Возраст, лет	41.0 ± 16.1	38.8 ± 21.5
Генотип rs657152 AA	101	34
Генотип rs657152 AC	215	54
Генотип rs657152 CC	150	41
Аллель А	417 (0.45)	122 (0.47)
Аллель С	515 (0.55)	136 (0.53)
Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05
Пороговое значение ПЦР (Ct) при выявлении SARS-CoV-2	–	35.0 ± 5.5

ной последовательности локуса *ABO* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs657152>).

Синтез праймеров и зондов осуществлен ООО “Люмипроб РУС”. ПЦР проводили в варианте с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе CFX (БиоРад) с использованием БиоМастер HS-qPCRHi-ROX (ООО “БИОЛАБ-МИКС”) и эквимольными концентрациями праймеров (0.5 мкМ) и зондов (0.1 мкМ) соответственно. Режим амплификации: 95° – 5 мин, 40 циклов, 95° – 10 с, 55° – 10 с; 72° – 10 с. Расчет статистических данных, включая оценку отклонения от равновесия Харди–Вайнберга, проводили в таблицах Эксель (табл. 2); отклонения были статистически незначимыми.

Исходной задачей исследования было создание двух ПЦР-тестов для выявления перекрестно воспроизводимой ассоциации rs657152 в локусе 9q34.2с и rs11385942 в локусе 3p21.31 [8]. К сожалению, выявление инсерции–делеции GA/G в локусе 3p21.31 (rs11385942) TaqMan ПЦР-тестом оказалось технически сложным (данные не приводятся), и дискриминации аллелей во втором тесте добиться не удалось. В результате этого исследование было проведено только по SNP rs657152.

Группы больных и здорового контроля значительно не различались по полу и возрасту. Как видно из табл. 2, объем полученных выборок позволил достичь соотношения генотипов, значимо не от-

личающегося от ожидаемого по Харди–Вайнбергу. Анализ полученных результатов не выявил каких-либо различий в распределении генотипов или аллелей между группой больных COVID-19 и группой здоровых лиц. Нам также не удалось обнаружить существенных различий в распределении аллелей у больных COVID-19 с высокой вирусной нагрузкой в мазке (Ct в диапазоне 16–25) по сравнению с больными COVID-19 со средней и низкой вирусной нагрузкой (Ct в диапазоне 26–40).

Сравнение полученных частот аллелей с данными базы данных dbSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs657152#frequency_tab) выявило значимые различия ($\chi^2 = 13.2$, $P < 0.001$) исследуемой контрольной группы в распределении частот А- и С-аллелей (0.45/0.55) по отношению к глобальному (0.39/0.61) распределению. Аналогичное сравнение распределения А- и С-аллелей (0.45/0.55) с европеоидной популяцией (0.37/0.63) также показало существенные различия ($\chi^2 = 23.1$, $P < 0.001$). Следует отметить, что аллель А rs657152 характеризуется как “аллель риска по COVID-19” вместе с вариантом GA rs11385942 [8]. Полученные результаты по распределению rs657152 аллеля А наиболее близки (территориально и этнически) к его распределению на территории Эстонии (0.44) и Финляндии (0.47) [8]. Исследование распределения аллелей rs657152 на территории России, по всей видимости, до настоящего времени не проводилось.

Таким образом, выявление аллеля А при анализе SNP rs657152 в популяции европеоидного населения (славяне) Иркутской обл. в самостоятельном виде не может рассматриваться как фактор риска более тяжелого течения COVID-19.

Данная работа выполнена в рамках НИР ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск) с использованием оборудования ЦКП “Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья”.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu N., Zhang D., Wang W. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. P. 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
2. Zhou F., Yu T., Du R. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study // *Lancet.* 2020. V. 395. P. 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
3. Li X., Xu S., Yu M. et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2020. V. 146(1). P. 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.006>
4. Chen R., Liang W., Jiang M. et al. Risk factors of fatal outcome in hospitalized subjects with coronavirus disease 2019 from a nationwide analysis in China // *Chest.* 2020. V. 158(1). P. 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.04.010>
5. Docherty A.B., Harrison E.M., Green C.A. et al. Features of 20133 UK patients in hospital with Covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: Prospective observational cohort study // *BMJ.* 2020. V. 369. m1985. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1985>
6. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M. et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area // *JAMA.* 2020. V. 323(20). P. 2052–2059. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6775>
7. Kraft P., Zeggini E., Ioannidis J.P.A. Replication in genome-wide association studies // *Statist. Sci.* 2009. V. 24(4). P. 561–573. <https://doi.org/10.1214/09-STS290>
8. Ellinghaus D., Degenhardt F., Bujanda L. et al. Genomewide association study of severe Covid-19 with respiratory failure // *N. Engl. J. Med.* 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2020283>

SNP rs657152 Is Not Associated with the Level of Viral Load in COVID-19 or the Probability of Disease in the Population of Caucasians in Eastern Siberia

E. A. Orlova^a, O. B. Ogarkov^{a,*}, P. A. Khromova^a, V. V. Sinkov^a, M. A. Khasnatinov^a, S. N. Zhdanova^a, L. V. Rychkova^a, and L. I. Kolesnikova^a

^aScientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003 Russia

*e-mail: obogarkov@sbamsr.irk.ru

Cross-replicating associations with rs657152 at the 9q34.2c locus and rs11385942 at the 3p21.31 locus found in patients with severe COVID-19 in the Caucasian population require the study of the discovered phenomenon in various populations, including as an independent biological marker. Primers and TaqMan probes for PCR discrimination of A and C alleles in single nucleotide polymorphism (SNP) rs657152 have been developed. The polymorphism of the rs657152 A/C locus was determined in 129 patients with COVID-19 and in a control group of 466 healthy individuals. There were no significant differences in the frequency of distribution of the A and C alleles, 0.47/0.53 and 0.45/0.55, between patients and healthy subjects, respectively. Also, no differences were found in the distribution of alleles in patients with high viral load in the smear (Ct in the range of 16–25), compared with the average and low viral load (Ct in the range of 26–40).

Keywords: COVID-19, rs657152, allele discrimination, PCR, TaqMan probes.