
СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 9, 2021

Обзорные и теоретические статьи

Маркеры Y-хромосомы в популяционной генетике: фундаментальные и прикладные результаты этногеномных исследований

В. Н. Харьков 981

Молекулярно-генетические основы и перспективы генной терапии миомы матки

*С. В. Штыкалова, А. А. Егорова, М. А. Маретина,
С. А. Фрейнд, В. С. Баранов, А. В. Киселев* 995

Бактерии-пробиотики в коррекции признаков депрессии, их активные гены и белки

Е. У. Полуэктова, В. Н. Даниленко 1011

Компоненты внутривидовой динамики размера генома у растений и животных

А. М. Бутанов 1021

Общая генетика

Сравнительное изучение ДНК-повреждающей активности эпихлоргидрина с помощью биосенсоров *Escherichia coli* и методом ДНК-комет на мышах

К. Г. Орджоникидзе, Е. В. Игонина, Б. С. Жошибекова, С. К. Абилов 1031

Генетика растений

Филогенетические связи видов Азиатской России подродов *Phacoxytropis* и *Tragacanthoxytropis* рода *Oxytropis* на основе полиморфизма маркеров хлоропластного и ядерного геномов

*А. Б. Холина, М. М. Козыренко, Е. В. Артюкова,
М. Н. Колдаева, Д. В. Санданов, И. Ю. Селютин* 1039

Генетические маркеры в лабораторном сортовом контроле ячменя (*Hordeum vulgare* L.)

*А. А. Поморцев, Е. В. Лялина, Н. А. Терещенко, С. В. Болдырев,
Е. Ю. Яковлева, А. Н. Березкин, А. М. Малько, О. В. Андреева* 1054

Генетика человека

Генетическое разнообразие популяций Северной Евразии по маркерам, ассоциированным с заболеваниями, нарушающими когнитивные функции человека

А. В. Бочарова, В. А. Степанов 1062

Связь метилирования ДНК в гене *YJEFN3* с когнитивным дефицитом при расстройствах шизофренического спектра

*М. В. Алфимова, Н. В. Кондратьев, А. К. Голов,
В. Г. Каледа, Л. И. Абрамова, В. Е. Голиббет* 1073

Локус rs833061 гена *VEGF* у беременных с преэклампсией ассоциирован с весом новорожденного

О. В. Головченко, М. Ю. Абрамова, И. В. Пономаренко, М. И. Чурносков 1082

Профиль экспрессии группы генов и микроРНК при раке молочной железы:
связь с прогрессией и иммуногистохимическим статусом опухоли

*Е. А. Филиппова, И. В. Пронина, А. М. Бурденный,
Т. П. Казубская, В. И. Логинов, Э. А. Брага*

1089

Contents

Vol. 57, No. 9, 2021

Reviews and Theoretical Articles

Y-Chromosome Markers in Population Genetics: Fundamental and Applied Results of Ethnogenomic Research

V. N. Kharkov 981

Molecular Genetic Basis and Perspectives of Uterine Leiomyoma Gene Therapy

S. V. Shtykalova, A. A. Egorova, M. A. Maretina, S. A. Freund, V. S. Baranov, and A. V. Kiselev 995

Probiotic Bacteria in the Correction of Depression Symptoms, Their Active Genes and Proteins

E. U. Poluektova and V. N. Danilenko 1011

Components of Intrageneric Genome Size Dynamics in Plants and Animals

A. M. Boutanaev 1021

General Genetics

Comparative Study of the DNA-Damaging Activity of Epichlorohydrin Using *Escherichia coli* Biosensors and the Method of DNA Comets in Mice

K. G. Ordzhonikidze, E. V. Igonina, B. S. Zhoshibekova, and S. K. Abilev 1031

Plant Genetics

Population Studies of the Species of Asian Russia of the Subgenera *Phacoxytropis* and *Tragacanthoxytropis* Genus *Oxytropis* and Phylogenetic Relationships: Data on the Polymorphism of Markers of the Chloroplast and Nuclear Genomes

A. B. Kholina, M. M. Kozyrenko, E. V. Artyukova, M. N. Koldaeva, D. V. Sandanov, and I. Yu. Selyutina 1039

Genetic Markers in Laboratory Variety Control of Barley (*Hordeum vulgare* L.)

A. A. Pomortsev, E. V. Lyalina, N. A. Tereshchenko, S. V. Boldyrev, E. Ю. Яковлева (дать перевод) A. N. Berezkin, A. M. Malko, and O. V. Androsova 1054

Human Genetics

Genetic Diversity of Populations in North Eurasia by Genetic Markers Associated with Diseases Impairing Human Cognitive Functions

A. V. Bocharova and V. A. Stepanov 1062

Relationship between DNA Methylation within the *YJEFN3* Gene and Cognitive Deficit in Schizophrenia Spectrum Disorders

M. V. Alfimova, N. V. Kondratyev, A. K. Golov, V. G. Kaleda, L. I. Abramova, and V. E. Golimbet 1073

Locus rs833061 of the *VEGF* Gene in Pregnant Women with Preeclampsia Is Associated with Newborn Weight

O. V. Golovchenko, M. Y. Abramova, I. V. Ponomarenko, and M. I. Churnosov 1082

The Profile of MicroRNA and a Group of Genes Expression in Breast Cancer:
Relationship with the Tumor Progression and Immunohistochemical Status

*E. A. Filippova, I. V. Pronina, A. M. Burdennyi,
T. P. Kazubskaya, V. I. Loginov, and E. A. Braga*

1089

**ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ**

УДК 575.174:599.9

**МАРКЕРЫ Y-ХРОМОСОМЫ В ПОПУЛЯЦИОННОЙ ГЕНЕТИКЕ:
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ
ЭТНОГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

© 2021 г. В. Н. Харьков*

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

*e-mail: vladimir.kharkov@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.

После доработки 23.02.2021 г.

Принята к публикации 19.03.2021 г.

Y-хромосома является уникальным инструментом для изучения структуры генофондов и эволюционной истории популяций человека. Патрилинейность обеспечивает последовательное накопление мутаций, в результате чего Y-хромосома представляет собой достаточно простую маркерную систему для реконструкции эволюционных изменений, миграционных и других демографических процессов в популяциях человека. Анализ гаплогрупп Y-хромосомы может быть эффективно применен как для описания генетико-демографической истории различных популяций, так и для масштабных филогенетических и филогеографических исследований отдельных монофилетических линий разного иерархического уровня. Обнаружение все новых популяционно-специфичных ДНК-маркеров этой части генома человека позволяет очень подробно анализировать популяционную, субэтническую и родовую структуру различных этносов на протяжении всех периодов ее формирования. Определение аллельного профиля образцов мужчин в работах по палеогенетике особенно важно для реконструкции миграций, компонентного состава, преемственности генетического наследия древних популяций и уточнения филогении различных сублиний. Накопление большого массива данных по специфичному для конкретных популяций распределению различных гаплогрупп и особенностей их профилей по SNP и STR-маркерам кроме разрешения фундаментальных проблем позволяет успешно решать практические задачи по генетической генеалогии каждого мужчины, а также этнической идентификации неизвестного индивида по образцу его ДНК и разработке тест-систем для ДНК-идентификации.

Ключевые слова: Y-хромосома, генофонд, популяция, генетическое разнообразие, этногеномика, палеогенетика, ДНК-идентификация.

DOI: 10.31857/S0016675821090046

Развитие новых технологий масштабного генотипирования и биоинформационного анализа за последние несколько лет позволили перейти на новый уровень изучения генетической структуры популяций человека. Активно накапливающиеся данные по индивидуальным геномам из различных научных проектов появляются в свободном доступе и позволяют интегрировать эти результаты при статистической обработке различных по масштабу массивов данных. Несмотря на то что большую часть этих “больших данных” составляют различные аутосомные маркеры, результаты генотипирования мтДНК и Y-хромосомы занимают особое место среди маркерных генетических систем в силу их однородительского наследования. Принципиальная важность ДНК-маркеров этих специфических участков генома человека состо-

ит в том, что они позволяют исследовать раздельно материнскую и отцовскую линии, поскольку мтДНК передается потомкам только от матери, а Y-хромосома наследуется только от отца к сыну.

Благодаря отсутствию рекомбинации и линейному наследованию этих гаплоидных участков анализ их генетического полиморфизма является важным методом изучения геномного разнообразия и генетической истории популяций человека. Анализ линий мтДНК и Y-хромосомы применяется для выявления особенностей генетической структуры локальных популяций, истории и закономерностей формирования региональных генофондов, этапов заселения человеком различных континентов и, наконец, этапов эволюции человека как вида [1, 2].

ОСОБЕННОСТИ Y-ХРОМОСОМЫ КАК ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ ПОПУЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Преимущество Y-хромосомы заключается в том, что она, имея все те же удобные для эволюционных и популяционных исследований качества, что и мтДНК, несет гораздо более широкий спектр маркеров, имеющих разные темпы мутирования. Это позволяет проводить анализ мужских линий на разных уровнях разрешения — от определения крупных клад до персональной идентификации каждой конкретной хромосомы в популяции. К настоящему времени установлено, что распределение маркеров Y-хромосомы специфично для большинства популяций мира [3].

Наибольшей информативностью обладают гаплотипы Y-хромосомы, построенные на основе сочетания максимального числа высокополиморфных микросателлитных локусов и диаллельных маркеров (в основном SNP). При этом крупные кластеры гаплотипов строятся на основании композиции диаллельных локусов, частота мутирования которых гораздо ниже, а их более детальное дробление проводится с помощью набора STR-маркеров. Сходство или различие в спектре и частотах гаплотипов между двумя или более популяциями позволяет оценить степень их родства и уточнять их происхождение [4]. Сочетание в гаплотипе SNP и STR-маркеров дает возможность с помощью различных статистических методов получить количественные оценки возраста линий Y-хромосомы, а также долю генофонда, унаследованную этносом от различных предковых групп [5].

Спецификой Y-хромосомных линий является их высокая разрешающая способность при анализе генетической дифференциации популяций. Вследствие низкой эффективной численности пула Y-хромосом (как и мтДНК) в популяции (в 4 раза меньше, чем для аутосом) эта хромосома в значительной степени подвержена эффектам генетического дрейфа [6]. К уменьшению эффективного размера приводит и значительная вариабельность числа потомков у мужчин. Этот фактор влиял на Y-хромосомные линии гораздо интенсивнее, чем на мтДНК, поскольку на протяжении большей части своей истории люди придерживались полигении и лишь относительно недавно перешли к моногамным отношениям, что было подтверждено анализом различных Y-хромосомных гаплогрупп [7]. При этом оценка статистических различий в числе потомков между мужчинами и женщинами показывает значительные диспропорции в разные периоды человеческой истории, которые связаны с развитием древних цивилизаций и изменениями социальной организации обществ. Было показано, что увеличение эффективной численности мужской части популяции про-

изошло значительно позже, чем женской. Первоначально время максимального роста популяции на основе данных, полученных при исследовании мтДНК, было оценено в 80–60 тыс. л.н., а данные анализа Y-хромосомы дали гораздо меньшие значения — 18 тыс. л.н. [8]. Позднее был подтвержден рост разнообразия 50 тыс. л.н., и по мужским и по женским линиям, что свидетельствует об увеличении эффективного размера популяции в период расселения по Евразии. Но был обнаружен и сильный спад разнообразия Y-хромосомных линий 10–8 тыс. л.н. и уточнен последующий рост по разным регионам в период 8–4 тыс. л.н., с формированием множества регионально-специфических кластеров [3].

В популяциях человека особенности заключения браков, когда мужчины, как правило, чаще остаются в местах своего рождения, чем женщины, обуславливают феномен патрилокальности — явление, которое отмечено практически во всех этносах. Генетическая дифференциация большинства популяций характеризуется высоким разнообразием по мтДНК и низким по маркерам Y-хромосомы внутри групп популяций и, наоборот, большими различиями по маркерам Y-хромосомы и относительно малыми по мтДНК между группами. Это дает в результате более высокий уровень географической дифференциации вариантов Y-хромосомы по сравнению с мтДНК и аутосомами, который может быть более эффективно использован для исследования миграций [1]. Распределение отдельных гаплогрупп может служить маркером различных компонент популяционного генофонда, позволяя исследователю проводить количественный анализ генетической вариабельности непосредственно по их частоте и составу.

К настоящему времени обнаружено более ста тысяч полиморфных SNP [9, 10] и несколько сотен STR-маркеров [11, 12], которые позволяют решать популяционные и эволюционные задачи различного масштаба — от характеристики мирового генофонда до высокоразрешающего анализа генетически близких популяций.

КЛАССИФИКАЦИЯ ГАПЛОГРУПП

За три последних десятилетия накоплено огромное количество данных, полученных при анализе нерекombинирующей части Y-хромосомы. Первые работы в этой области относятся к середине 1980-х гг. [13, 14]. В последующие годы маркеры Y-хромосомы стали использоваться для эволюционных исследований [15], в судебно-медицинской экспертизе, медицинской генетике [6, 16] и реконструкции родословных [17]. Обнаружение диаллельных ДНК-маркеров на различных участках Y-хромосомы позволило открыть и классифицировать монофилетические гаплогруппы и

начать подробное изучение генофонда различных популяций.

За первые десять лет работы прогресс был не слишком велик, и количество Y-хромосомных ДНК-маркеров оставалось относительно небольшим. К концу 1996 г. было известно лишь около 60 полиморфных маркеров [18, 19]. Затем были опубликованы сведения о 19 новых SNP, которые были обнаружены при помощи денатурирующей жидкостной хроматографии при высоком давлении (DHPLC) [20]. С тех пор с помощью этого метода было обнаружено несколько сотен SNP на Y-хромосоме. Далее на первый план при поиске новых маркеров Y-хромосомы выходит методика секвенирования ДНК [3, 21–23].

С увеличением числа известных SNP возрастало как число исследований, выполненных с их использованием, так и число номенклатурных систем. Со временем появилось семь различных вариантов названий гаплогрупп Y-хромосомы. Главная проблема носила технический характер, поскольку разные исследовательские коллективы использовали разные наборы маркеров и различную номенклатуру гаплогрупп, что затрудняло сравнение результатов разных работ. Это побудило исследователей, работающих в данной области, к созданию единой номенклатуры, систематизирующей весь ранее накопленный материал и при этом достаточно гибкой для включения каких-либо новых линий [24]. Было выделено 18 основных мутационных кластеров в хромосоме, так называемых клад, обозначаемых латинскими буквами от A до R. Порядок букв отражал последовательность возникновения определяющих их мутаций. Эти клады в свою очередь разветвлялись на гаплогруппы, пронумерованные цифрами и буквами. Дальнейшее увеличение количества открытых SNP способствовало уточнению топологии древа и все большей его детализации [2, 25–28 и др.].

Современная номенклатура Y-хромосомных линий представляет собой многоуровневую буквенно-цифровую систему обозначений, кластеризующихся в соответствии с пошаговой мутационной моделью. Иерархическое местоположение конкретной линии определяется сцеплением мутантного и исходного вариантов ДНК-маркера с лежащими выше и ниже SNP. Для обозначения субклад используются две системы: либо на основе буквенно-цифровой номенклатуры (например, E1b1, N1a1a1a2, R1a1a1b2a2, R1a1a1b2a2a3c, T1a2b и др.), либо по номеру терминальной мутации, определяющей данную гаплогруппу (например, Q-BZ99 или N-B172) [9, 10]. Первая система может быть упрощена до 3–5 буквенно-цифровых уровней, при этом промежуточные узлы древа обозначаются сцеплением именованных узлов, например наличие Y1'3 и Y4 указывает, что Y1, Y2, Y3

имеют общего предка, а уже этот предок — общего предка с Y4 [3].

В настоящее время эта классификация является основной для всех коллективов, занимающихся исследованиями с привлечением маркеров Y-хромосомы. При этом постоянно выходят в свет работы, уточняющие топологию отдельных монофилетических кластеров [21, 23, 25], вплоть до полной ревизии филогении базовых клад A и B [22].

Не менее значимым для классификации гаплогрупп является ресурс YFull.com, который был основан в 2013 г. и является сервисом по биоинформатическому анализу исходных данных секвенирования. Древо гаплогрупп на этом сайте является сейчас наиболее подробным и включает максимальное количество SNP, с привязкой к конкретным образцам. Обозначение линий при этом отличается от буквенно-цифровой кодировки и содержит только привязку к конкретным маркерам, начиная от самых базовых до терминальных для конкретного образца [10].

ФИЛОГЕНИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ГАПЛОГРУПП

Кроме характеристики генетического разнообразия, дифференциации и компонентного состава популяционного генофонда, исследование маркеров Y-хромосомы очень важно для филогенетических реконструкций. Использование множества различных полиморфных сайтов позволяет проследивать комбинации аллелей, представляющие собой последовательную запись мутаций в ряду поколений. При этом под линией понимают группу гаплотипов, связанных общим происхождением, где каждый вариант отличается от соседнего на один мутационный шаг [2]. Анализ филогении и филогеографии всего Y-хромосомного древа человечества, его отдельных клад и гаплогрупп является сутью этой области исследований.

Частота возникновения SNP на Y-хромосоме примерно в 2 раза выше, чем в среднем по геному, и уступает по скорости мутирования только мтДНК [5, 29]. Поскольку нерекombинирующая часть Y-хромосомы значительно превосходит мтДНК по размеру, а число повторных и обратных мутаций для отдельных позиций намного ниже, то филогения мужских линий может быть гораздо более детально структурирована по сравнению с женскими. Накопление все большего количества просеквенированных образцов Y-хромосом из различных популяционных выборок для всех гаплогрупп позволяет увеличивать информативность и популяционную специфичность их филогенетической реконструкции от самых древних линий до недавно возникших в локальных популяционных группах.

В момент возникновения гаплогруппы она представлена только у одного индивида, поскольку определяющая ее мутация происходит на конкретной хромосоме, а затем частота гаплогруппы начинает стохастически меняться. Новая возникшая сублиния с большой вероятностью может исчезнуть из популяции, если мужской род, ведущий свое начало от родоначальника этой мутации, прервется в каком-либо поколении. Большинство таких новых линий элиминируются стохастическим процессом генетического дрейфа. Но некоторые из гаплогрупп остаются в популяции и увеличивают свою частоту. На фоне стохастического роста численности гаплогруппы в ней с течением времени начинает накапливаться изменчивость по другим SNP и микросателлитным локусам [30]. Изначально гаплогруппа представлена одним определенным гаплотипом-основателем, характеризующимся определенным значением аллелей в различных STR-локусах. Затем, с течением времени, у потомков появляются и другие аллели за счет мутаций и возникают кластеры эволюционно родственных гаплотипов.

Наибольшей информативностью обладают гаплотипы, построенные на основе сочетания большого числа высокополиморфных микросателлитных локусов (STR) и SNP. В дальнейшем более детальное дробление и анализ уровня разнообразия хромосом, несущих определенные варианты диаллельного локуса, проводятся с помощью набора микросателлитов и дополнительных SNP, позволяющих детализировать структуру субклад исследуемой гаплогруппы.

Аналогично, вполне реальным является проведение оценки времени коалесценции к общему предку микросателлитных гаплотипов внутри гаплогрупп Y-хромосомы. Таким образом, представляется возможным оценить время происхождения гаплотипического разнообразия внутри линий, т.е. их возраст. Такие исследования проводились для отдельных клад, в частности для гаплогрупп E, J, G [25, 26], I [27], R1a [21], R1b [28], N [23].

Филогеографический подход к картированию всего разнообразия сублиний конкретной клады и уровня гаплотипического разнообразия в пределах гаплогрупп позволяет решать специфические задачи: выявлять места происхождения и пути распространения линий, проводить реконструкцию древних миграций [31]. Анализ распределения частот и оценка разнообразия гаплогрупп позволяют подробно описывать генофонды популяций и определять причины, которые привели к тем или иным структурным изменениям.

Чем эволюционно ближе друг другу популяции, тем шире должен быть спектр перекрывающихся сублиний гаплогрупп и STR-гаплотипов. И наоборот, при сходных частотах основных гап-

логрупп спектр STR-гаплотипов в пределах отдельных линий может значительно различаться, что является следствием длительной изоляции популяций и формирования на основе различных генетических составляющих, маркируемых специфичными кластерами гаплотипов, относящихся к одним и тем же диаллельным гаплогруппам.

Не только SNP, но и STR-маркеры позволяют детально реконструировать филогенетические взаимоотношения между отдельными Y-хромосомами, принадлежащими к одной гаплогруппе, и дать оценку возраста наименее древнего общего предка. Анализ STR-гаплотипов Y-хромосомы успешно применяют для сравнительного анализа популяций, относящихся к близким этносам, что позволяет выявить у них определенную степень гетерогенности, которую не всегда удастся обнаружить с помощью аутосомных маркеров. Степень детализации анализа зависит практически лишь от количества YSTR, используемых для построения гаплотипа: если для высокоразрешающего анализа индивидов и генеалогических реконструкций требуется от 30 и более маркеров (в качестве основного примера выступает компания Family Tree DNA), то для общего описания популяционного генофонда в большинстве работ используются 15–20 YSTR [3, 23].

Наблюдаемое в гаплогруппах разнообразие микросателлитных гаплотипов формировалось на протяжении определенного промежутка времени, под воздействием мутационного процесса и фиксации или элиминации из генофонда популяций тех или иных вариантов хромосом под воздействием других факторов популяционной динамики. Исследуя их современное разнообразие в популяциях и зная особенности и скорость мутирования изучаемых ДНК-маркеров, можно с определенной степенью точности оценить время его генерации.

При расчетах возраста генерации гаплотипического разнообразия по STR-маркерам в пределах конкретных гаплогрупп очень важным является определение гаплотипа-основателя. На протяжении первых поколений нарастания изменчивости аллель-основатель еще остается наиболее представительным в выборке: частоты других аллелей не успевают увеличиться до значительных величин. Поэтому в качестве гаплотипа-основателя предлагается принимать модальный гаплотип, частота которого максимальна в исследуемой выборке [32, 33]. Но распределение частот аллелей YSTR-локусов, даже в отдельной сублинии в пределах гаплогруппы, не всегда является унимодальным. Мутации, миграции и генетический дрейф могут привести к тому, что гаплотип-основатель перестает быть модальным и может вообще исчезнуть из состава генного пула конкретных популяций. Поэтому часто более подходящей является медианная оценка числа повторов в гаплоти-

пе-основателе: для каждого локуса она вычисляется как медиана числа повторов по всем аллелям, которые обнаружены в данной выборке [30]. Но это может приводить к заниженной оценке возраста на эволюционно более старых гаплогруппах, поскольку за большие промежутки времени распределение числа повторов в дочерних гаплотипах может значительно отклоняться от аллельной композиции гаплотипа-основателя.

Гаплотипы-основатели, определенные медицинским методом, и основанные на них оценки возраста гаплогрупп, сделанные по данным одной выборки или небольшого числа выборок из географически ограниченной области, могут относиться не к истинному моменту возникновения этой гаплогруппы, а к моменту появления ее на данной территории. В случае же если группа мигрантов на момент появления в генофонде локальной популяции имела по данной гаплогруппе сформировавшееся разнообразие гаплотипов, оценка возраста гаплогруппы будет относиться не к изучаемой, а к предковой популяции [30]. Таким образом, достижение наиболее адекватных оценок возраста гаплогрупп возможно при формировании как можно более многочисленных выборок, обязательно включающих популяции из региона предполагаемого происхождения этих гаплогрупп, и должно опираться на информацию по максимально возможному числу генетических маркеров [34–36].

При определении прародины гаплогрупп необходимо использовать несколько критериев. Во-первых, частота гаплогруппы должна достигать высоких значений в месте ее происхождения. Но максимальная частота не может служить однозначным показателем центра зарождения гаплогруппы, поскольку и на периферии ареала гаплогруппы популяции могут испытывать сильное влияние дрейфа, что может привести к эффекту основателя по данной линии у конкретного этноса или группы популяций.

Примеры очень высокой частоты гаплогруппы в популяциях на сильном удалении от места ее происхождения широко известны. Такая ситуация характерна дляклады N у финнов [37] и якутов [38],клады D у японцев [39], гаплогруппы R1b1b1 у башкир [40]. Но в большинстве случаев миграции ее носителей разносят гаплогруппу по соседним популяциям, не подвергающимся резким колебаниям эффективной численности, и частоты там будут ниже, чем в популяциях, близких к месту происхождения SNP, определяющего эту линию.

Во-вторых, наличие предковой по отношению к исследуемой линии и близкородственных сестринских гаплогрупп также указывает на прародину. В большинстве случаев местом возникнове-

ния гаплогруппы может быть регион с высокой частотой базальных ветвей этой клады.

Третьим критерием является разнообразие YSTR-гаплотипов в пределах изучаемой гаплогруппы. Территорию с наибольшим разнообразием какой-то родственной группы гаплотипов принято рассматривать как вероятную зону их общего происхождения. Там, где гаплогруппа впервые достигла значимой частоты и откуда она затем расширяла свой ареал, должны были накопиться многочисленные мутации и сформироваться множество дочерних гаплотипов. В месте происхождения показатели разнообразия должны быть максимальными. В отдаленных популяциях гаплогруппы гаплогруппы разнообразие должно быть мало, поскольку с миграционными потоками они получают не репрезентативную выборку гаплотипов предковой популяции, а лишь случайную часть спектра [41].

Анализ микросателлитной изменчивости в пределах гаплогруппы Y-хромосомы можно проводить и для определения времени, прошедшего с момента отделения ныне существующих популяций от общей предковой популяции. Поскольку в начале процесса накопления STR-изменчивости ее дисперсия равна нулю, можно получить верхнюю границу для времени дивергенции популяций (в пределах изучаемой гаплогруппы). Эта оценка наиболее корректна для популяций, у которых момент разделения отстоит от момента возникновения STR-изменчивости в данной гаплогруппе на наименьший отрезок времени. Для недавно разошедшихся популяций эта верхняя граница может значительно отстоять от реального времени дивергенции. В этом случае для оценки времени дивергенции популяции применима TD-статистика [42, 43]. Очень важное ее отличие перед другими мерами генетического расстояния в том, что ее оценка не зависит от изменения численности популяций во времени и устойчива к слабым миграциям.

Обнаружение все большего числа информативных маркеров позволяет максимально подробно исследовать филогенетические взаимосвязи отдельных линий внутри разных клад Y-хромосомы. В то же время это открывает и широкие возможности для подробной характеристики популяционных генофондов. При этом уже накоплен значительный массив данных по варибельности десятков микросателлитных маркеров в тысячах образцов ДНК, тестируемых коммерческими ДНК-генеалогическими компаниями. Это позволяет научно-исследовательским группам гораздо эффективнее планировать работу по анализу Y-хромосомных гаплогрупп. Если 10–15 лет тому назад генотипирование новых SNP и YSTR далеко не всегда приводило к значительному увеличению информативности выбранного набора маркеров, то сейчас можно отбирать ДНК-маркеры, широкий полиморфизм

которых уже подтвержден. Более того, можно выбирать как быстро мутирующие STR, для подробного анализа относительно молодых сублиний, так и маркеры с гораздо более медленным темпом мутирования, выделяющие в пределах отдельных гаплогрупп региональные и этноспецифичные кластеры гаплотипов.

Установлено, что для большинства гаплогрупп Y-хромосомы наблюдается разделение не только на этноспецифические линии, но и на более узкие сублинии и кластеры гаплотипов. Анализ микросателлитных гаплотипов Y-хромосомы успешно применяют для сравнительного описания популяций, относящихся к близким этносам, что позволяет выявить у них определенную степень гетерогенности, которую не удастся обнаружить с помощью классических маркеров, а также аутомомных маркеров. Большинство этнических генофондов характеризуются преобладанием или даже полным доминированием специфичных SNP по всем крупным кладам, исследованным в настоящее время [3, 23 и др.]. Степень детализации зависит практически лишь от количества SNP и STR-маркеров, используемых для построения гаплотипа.

Аллели разной длины в одном и том же локусе могут различаться по темпам мутирования. Более длинные аллели могут чаще мутировать, предпочтительно к аллелям с меньшим числом повторов [30, 44–46]. Возможность того, что аллели большей длины могут предпочтительно мутировать в короткие аллели и, наоборот, короткие аллели — в длинные, может являться эволюционным механизмом, удерживающим изменчивость по микросателлитным локусам в определенных пределах [44, 47, 48]. Очевидно, что в разных гаплогруппах темп мутирования разных локусов неодинаков и может также отличаться на разную глубину поколений. Для более точных оценок темпа по отдельным линиям необходимы калибровки по точно датированным событиям в жизни различных популяционных групп.

Новые SNP Y-хромосомы в различных гаплогруппах все активнее выявляются в ходе работы проектов по полногеномному секвенированию и специальному поиску таких маркеров научными группами и различными компаниями. Однако точных данных по их филогенетическим взаимоотношениям в пределах различных гаплогрупп на большом объеме популяционных выборок зачастую нет, многие SNP подтверждены лишь на ограниченном наборе образцов и данные о частотах определяемых ими сублиний в реальных этнических группах отсутствуют или являются весьма приблизительными в силу нерепрезентативности исследованных выборок. Пока отсутствуют результаты генотипирования многих обнаруженных маркеров на материале различных территориальных и этнических групп, значительно затруднен их филогеографический ана-

лиз, достоверные реконструкции возникновения и распространения вновь открытых линий.

ЭТНОГЕНОМИКА НАСЕЛЕНИЯ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ

В настоящее время научные коллективы по всему миру проводят анализ структуры генофондов различных популяций. Одним из наиболее актуальных направлений этногеномных исследований является изучение региональной и внутри-этнической структурированности генетического разнообразия коренного населения разных регионов. Генофонд населения Северной Евразии представляет собой уникальную систему с точки зрения исследования популяционно- и эволюционно-генетических процессов, анализа генетического разнообразия и реконструкции генетической истории популяций. Огромные пространства этого региона и малочисленность аборигенного населения способствовали формированию его значительной территориальной и генетической подразделенности. Относительная изоляция населения отдельных регионов, таких как Сибирь и Дальний Восток, от основных миграционных потоков на территории Евразии обеспечила сохранение в их генофонде древних генетических пластов, хранящих информацию о важнейших этапах заселения человеком современного типа не только Сибири, но и Европы, Кавказа, Центральной Азии и Америки. Генофонд коренного населения хранит в себе следы миграций, экспансий численности, метисационных событий, генетико-демографических процессов и изменения генетического состава популяций. Разнообразие генофонда Северной Евразии по сравнению с другими регионами мира достаточно велико и включает множество генетических компонент. Результаты его анализа очень важны для изучения генофонда всего человечества.

Одними из наименее исследованных территорий в настоящее время остаются Сибирь и Дальний Восток. Современный этнический состав их коренного населения постепенно складывался в результате длительных этногенетических процессов. Археологические, этнографические, антропологические данные указывают на то, что население Сибири формировалось на протяжении тысячелетий при объединении самых различных компонент. Ее заселение было комплексным и продолжительным процессом вследствие миграций с территории Восточной Европы, Средней, Центральной и Восточной Азии. Пересечение различных миграционных путей привело к тому, что народы, населяющие этот обширный регион, весьма разнообразны по своему антропологическому и языковому составу. Огромное влияние на процесс заселения Сибири оказывало изменение климатических условий, вызывавшее смену биоценозов, что отражалось на

возможности использования их человеком и заселении им новых территорий.

Популяции коренных этносов Сибири представляют значительный интерес для такого рода исследований как в силу относительно слабой их изученности с привлечением современных ДНК-маркеров, так и по причине специфичности их генофондов, развивавшихся, зачастую, в условиях длительной генетической изоляции. Уникальный генофонд коренного населения Сибири представляет собой ценный источник генетической информации, важный как для выяснения особенностей генофондов популяций Северной Евразии и заселения Америки, так и для анализа молекулярной эволюции многих гаплогрупп Y-хромосомы и мтДНК.

Первичные данные по сибирским популяциям были получены в ранних работах, описывающих распределение новых диаллельных молекулярно-генетических маркеров Y-хромосомы [19, 49]. После этого большинство исследований, где приводились результаты по сибирским популяциям, касались проблемы заселения Америки. Некоторые научные работы включали материал сибирских популяций, но не рассматривали их как самостоятельные объекты. Затем изучение истории популяций, этнических и региональных генофондов населения Сибири с использованием ДНК-маркеров Y-хромосомы стало самостоятельной задачей в целом ряде исследований [50–53]. Различными группами исследователей была охарактеризована общая структура генофонда коренных этносов Сибири, проведены анализ филогенетических взаимоотношений сибирских популяций и изучение филогеографии отдельных гаплогрупп. К настоящему времени уже накоплен значительный фактический материал о составе гаплогрупп и YSTR-гаплотипов.

Однако полученная картина далеко не полно отражает реальную структуру сибирского генофонда. Это связано, в первую очередь, с относительной малочисленностью исследованных выборок и проблемой репрезентативности выборок в отношении всего генофонда изучаемых этносов. По-прежнему остаются неисследованными генофонды некоторых малочисленных коренных этнических групп и субэтносов. Кроме того, многие сибирские этносы антропологически и генетически довольно гетерогенны (например, алтайцы, тувинцы, якуты, эвенки, буряты), а исследованные до настоящего времени выборки не отражают всей многокомпонентности генофонда, характеризуя лишь часть имеющегося разнообразия. Для коренных этносов Сибири актуальность проведения исследований их генофондов с помощью маркеров Y-хромосомы обусловлена также недостаточной степенью детализации гаплогрупп по сравнению с европейскими, ближневосточными и африкан-

скими популяциями и отсутствием данных по широкому набору YSTR в большинстве работ.

Для многих гаплогрупп Y-хромосомы гаплотипическое разнообразие в сибирских популяциях ниже величин, характеризующих современное население других регионов (Восточная Европа, Средняя, Центральная и Юго-Восточная Азия). Принимая во внимание все возможные погрешности при подобного рода оценках, можно, тем не менее, заключить, что накопление гаплотипического разнообразия в гаплогруппах, составляющих большую часть суммарного генофонда сибирских этносов, сопровождалось снижением эффективной численности популяций. При этом накопление гаплотипического разнообразия в гаплогруппах Y-хромосомы, составляющих большую часть суммарного генофонда сибирских этносов, сопровождалось значительным дрейфом генов и многочисленными событиями популяционного “горлышка бутылки” в генетической истории коренных популяций.

Были выявлены локальные эффекты основателя по различным гаплогруппам Y-хромосомы как для отдельных этносов, так и для различных территориальных групп в пределах конкретных сублиний. С привлечением оценки темпов мутирования YSTR было рассчитано время накопления разнообразия YSTR-гаплотипов внутри наиболее частых гаплогрупп. По всей видимости, это является следствием значительного роста численности популяций, связанного с изменением климатических условий и типа ведения хозяйства.

Изучение вариативности Y-хромосомы в современных популяциях, эволюции гаплогрупп и их географического распределения позволило прояснить проблемы происхождения и расселения человека, реконструировать пути древних миграций, описать структуру и происхождение генетического разнообразия в общемировом масштабе. На новом этапе на первый план выходят работы по анализу внутри этнической генетической дифференциации и особенностей локальных генофондов субэтнических и этнотерриториальных групп населения. Детальное исследование этнических генофондов требует увеличения численности популяционных выборок и подробности описания исследуемого материала.

Таким образом, в настоящее время одним из наиболее актуальных направлений этногенетических исследований является изучение региональной и внутриэтнической структурированности генетического разнообразия коренного населения Северной Евразии, с привлечением материала по крайней мере нескольких географически дистанцированных выборок для каждого этноса. Изучение множества локальных популяций позволит оценить степень внутриэтнической дифференциации генофонда. Новая информация о структуре Y-хромосомной составляющей генофонда коренных

популяций этого региона будет являться важным дополнением к существующим антропологическим, археологическим, лингвистическим данным, а также результатам, полученным при исследовании других маркерных генетических систем.

АНАЛИЗ РОДОВОЙ СТРУКТУРЫ НАРОДОВ

Одним из актуальных направлений популяционной генетики человека является изучение внутриэтнической структурированности генетического разнообразия различных этносов, с привлечением материала входящих в их состав субэтнических и родоплеменных групп. Комплексный междисциплинарный подход приносит значительные результаты для такого рода работ. Методы популяционной генетики в последние два десятилетия активно используются на стыке таких ранее не связанных между собой наук, как молекулярная генетика, с одной стороны, и антропология, археология, этнография и лингвистика, с другой.

Особенностью этнического состава многих народов является наличие родов, где счет родства ведется по мужской линии. Такая родовая структура характерна для кланов Шотландии и Ирландии, различных народов Центральной и Средней Азии, Волго-Уральского региона, Сибири и Дальнего Востока. Проблема родовой организации разных народов достаточно хорошо изучена с этнографической и социокультурной точек зрения. Многочисленные работы этнографов подробно освещают особенности родоплеменной организации. В то же время их генетическая структура оставалась практически неизученной.

Применение Y-хромосомных маркеров в этой связи дает богатейшие возможности для исследования проблем, связанных с родоплеменной структурой, поскольку накопление большого массива генотипических данных по множеству новых SNP и STR позволяет вывести этногенетические исследования на совершенно новый уровень. Если два человека принадлежат к разным гаплогруппам Y-хромосомы, между ними не может быть близкого родства по мужской линии. Если же два человека принадлежат к одной гаплогруппе, то возможность родства между ними существует. Степень этого родства устанавливается путем анализа STR-гаплотипов и специфичных SNP Y-хромосомы у исследуемых индивидов. Определение специфичных гаплотипов по большому числу STR и значительная детализация сублиний внутри гаплогрупп позволяют проверить, является ли род кровнородственным объединением, имеющим одного родоначальника по мужской линии, или осознание такой общности связано лишь с социокультурными особенностями этой группы, когда род является общностью людей, проживающих на одной территории, но не связанных генетическим родством по отцовским генеалогическим линиям.

Современные молекулярно-филогенетические методы позволяют безошибочно выполнить такого рода сравнительный анализ, а обширная база мировых генетических данных дает возможность провести подробное сравнение обнаруженных генетических вариантов на разных иерархических уровнях. Генотипирование широкого набора SNP и YSTR-маркеров, подобранных с учетом имеющейся информации о их информативности для изучаемых популяционных групп, позволяет выявлять генетическую структуру патрилинейных обществ, оценивать родственные связи отдельных индивидов, родов, групп родов и субэтносов, а также отслеживать общие генетические компоненты между разными народами и реконструировать источник, время и направление миграций носителей отдельных сублиний внутри исследуемых гаплогрупп.

Одними из первых заметных публикаций по анализу популяций в контексте родоплеменных отношений были работы по генетическому наследию династии монголов [54], центральноазиатских популяций [55] и маньчжурской династии Цин [56]. Результаты этих исследований послужили толчком для дальнейшего применения Y-хромосомных маркеров для более подробной характеристики родов, за счет увеличения количества маркеров и популяционных выборок.

В настоящее время достаточно подробно охарактеризованы родовые группы башкир [57], казахов [58, 59], туркмен [59], хакасов и шорцев [60], тувинцев [61]. Для большинства исследованных родов в составе разных народов показаны значительные генетические различия по составу гаплогрупп и спектру STR-гаплотипов. Для многих родов обнаружены доминирование одной гаплогруппы и недавние эффекты основателя, оценка возраста которых, как правило, хорошо согласуется с данными этнографии. Это свидетельствует об однозначной родоплеменной подразделенности большинства исследованных популяций по мужской линии. Анализ STR-гаплотипов показывает, что большинство представителей одного рода являются родственниками по мужской линии и имеют родоначальника, жившего в относительно недалеком прошлом. Именно родовой уровень организации генофонда является наиболее точно характеризующим его популяционную структуру.

Перспективы дальнейших работ по этому направлению достаточно обнадеживающи, поскольку родовую принадлежность у представителей разных этносов во многих случаях возможно установить не только по родовой самоидентификации, но и по их фамилиям, так как большинство современных фамилий коренного населения Сибири повторяют название рода в исходной форме, либо с небольшими изменениями, а также ранее привязаны этнографами к различным родам и фратриям. Такая

ситуация характерна для башкир, хантов, ненцев, шорцев, хакасов, северных и южных алтайцев, телеутов, нанайцев, удэгейцев и других народов. Практическое выполнение таких работ требует значительного пополнения популяционных библиотек и расширения этнических выборок с привязкой к конкретным патрилинейным группам.

ПАЛЕОГЕНЕТИКА

Палеогенетика основана на анализе геномной информации, содержащейся в биологических останках ископаемых организмов. Данное направление возникло на стыке антропологии, археологии и молекулярной генетики и позволяет не только описывать генетические портреты древних образцов, но и более детально реконструировать генетическую историю заселения различных регионов. Анализ древних образцов также включает в себя филогенетический и филогеографический подходы, в том числе с помощью анализа линий мтДНК и Y-хромосомы.

Изучение генетического разнообразия древнего населения предоставляет новую информацию о динамике развития генофондов того или иного региона. Вероятную прародину гаплогруппы должны указывать и данные о гаплотипах образцов из захоронений [62]. Популяционно-генетические исследования с использованием древней ДНК ориентированы в основном на решение проблем заселения территорий, изучение древних миграций и установление генетической преемственности древнего и современного населения.

В большинстве ранних работ внимание было сосредоточено на анализе гаплотипов мтДНК, а данные по маркерам Y-хромосомы отсутствовали из-за гораздо более низкой ее копийности. Но за последнее десятилетие опубликовано довольно много работ, где определена принадлежность древних образцов к различным гаплогруппам Y-хромосомы как по YSTR-гаплотипам, так и по широкому набору SNP с достаточной плотностью покрытия информативных участков.

Определение принадлежности образцов древних популяций к конкретным сублиниям Y-хромосомы позволяет более точно, по сравнению с анализом аутосомных генотипов, описать филогенетическое положение конкретного образца, внутри- и межпопуляционные взаимосвязи, подробно реконструировать древние миграции и этногенез популяций.

Прародиной гаплогруппы может быть регион с высокой частотой предковой для нее линии. Если где-то наблюдается высокая концентрация исследуемой гаплогруппы и та же самая гаплогруппа с близкими YSTR-гаплотипами выявлена в образцах ДНК из захоронений многовековой давности, расположенных в том же регионе, это указывает на

генетическую преемственность населения и длительное присутствие этого варианта Y-хромосомы на данной территории. Исследования древних образцов во многих случаях позволяют обнаружить базальные варианты различных линий, что полностью соответствует филогенетическим схемам их происхождения и позволяет уточнять расселение предков их современных носителей. Так, было установлено, что образец из сибирской стоянки Мальта принадлежит к предковой линии гаплогруппы R, которая сейчас распространена в пределах Западной Евразии, Южной Азии и в Южной Сибири [63, 64].

В Западном Иране обнаружен самый древний из известных на сегодня носитель гаплогруппы G1a (образец I1674), относящийся к эпохе энеолита (4500–3500 до н.э.) [65], что полностью согласуется со снижением гаплотипического разнообразия от Западного Ирана к востоку Юго-Западной Азии и далее на север к Евразийским степям в современных популяциях. Это подтверждает гипотезу о локализации прародины гаплогруппы G1 в западной части Ирано-Армянского нагорья [66]. Носители различных субкластеров гаплогруппы Q1a Y-хромосомы достоверно выявлены среди представителей древних кочевых групп гунно-сарматского времени на территории Горного Алтая [67].

Также важно установить и проанализировать совпадения и отличия в филогеографии различных сублиний у древних и современных носителей. Показано, что мужское население окуневской культуры принадлежит к различным вариантам клады Q1a. Гаплогруппы клады Q представлены в составе ранних и поздних археологических комплексов. Один образец принадлежит к Q1a1b1 (xQ1a1b1a), другой – к Q1a2b-L940 (xQ1a2b1, Q1a2b2), которая сейчас имеет преимущественно среднеазиатское распространение. Еще два образца относятся к Q1a2-M346. Также один образец окуневской культуры и один из стоянки Усть-Ида принадлежат Q1a2a1, родственной линиям коренных американских популяций. Несколько образцов относятся к Q1a2alc-L330 (xQ1a2alc1), которая в настоящее время выявлена у многих коренных народов Южной Сибири – кетов, алтайцев, хакасов, тувинцев, хантов [68]. Три образца афанасьевской культуры и один из окуневской принадлежат к гаплогруппе R1b1a1a2a-L23, а три других окуневских мужчины относятся к очень редкой в настоящее время линии NO, предковой для основной сибирской клады N Y-хромосомы [69].

У древних образцов из Европы была найдена очень редкая в современных популяциях гаплогруппа C1a2, которая маркирует раннее заселение этого региона группой, близкородственной мигрантам, заселявшим по аустерическому пути Австралию, Южную и Восточную Азию. Анализ Y-хромосомного разнообразия позволил уточ-

нить формирование генофонда населения Европы, после начала освоения земледелия. В европейских неолитических образцах доминировали гаплогруппы G и I, а пришлые анатолийские земледельцы принесли ближневосточные гаплогруппы, которые затем клинально распространились на запад. Это свидетельствует о смешении земледельцев с местными охотниками-собираателями, в соответствии с их географической локализацией [70].

Изучение гаплогрупп Y-хромосомы на материале древних популяций позволяет точнее проследить и особенности генетико-демографических событий в истории различных регионов. Установлено, что пришлые неолитические земледельцы в Центральной Европе и на Иберийском полуострове смешивались с местными охотниками-собираателями, и это смешение в разных регионах различалось не только по интенсивности, но и по различному соотношению полов. Дисбаланс в смешении сильно выражен в пользу мужского вклада охотников-собираателей, по сравнению с женским в среднем неолите, что подтверждается маркерами X-хромосомы и высокой частотой Y-хромосомных гаплогрупп охотников-собираателей. В среднем европейском неолите насчитывалось 35–50% предкового вклада охотников-собираателей мужчин и только до 5% приходилось на долю женщин, т.е. местные мужчины-охотники брали в жены женщин из земледельческих общин, а не наоборот [71].

В случае более поздней степной миграции в Европу на примере древних образцов из Эстонии установлено, что у пяти индивидов мужского пола все образцы принадлежали к линии R1a. Гаплогруппа N, которая является наиболее частой в современной Эстонии, обнаружена не была. Это вместе с анализом других маркеров свидетельствует об обратном сценарии: из степей мигрировали преимущественно мужчины, и по мере продвижения по Европе они брали в жены местных женщин из общин европейских земледельцев [72].

В последние годы выходят работы, которые включают гораздо больше образцов, чем более ранние, что дает более достоверные статистические результаты и однозначные выводы. При анализе более 100 геномов бронзового века из множества захоронений степной зоны Евразии установлено распределение различных сублиний гаплогрупп R1a, R1b и Q1a. Выявлено, что генофонд населения Европы и Центральной Азии именно ближе к концу бронзового века отражает современную евразийскую генетическую структуру в такой степени, которая не наблюдалась в предыдущие периоды. Большая часть основы современного евразийского генетического ландшафта была сформирована именно в бронзовом веке, в ходе миграций, смешения и вытеснения различных групп населения [67]. Изученные образцы срубной культуры несут

только гаплогруппу R1a, и большая часть из них и образцов полтавкинской культуры принадлежит к азиатской ветви R1a-Z93, которая сейчас распространена в Южной Сибири, Центральной и Южной Азии, Волго-Уральском регионе и на Кавказе, но отсутствует во всех изученных к настоящему времени древних образцах Центральной Европы.

Развитие этого направления науки очень актуально для раскрытия и уточнения многих вопросов эволюции человека и истории формирования современных популяций. Значительный прогресс в генотипировании древних образцов с помощью полногеномного секвенирования, накопление большого массива палеогенетических данных и новые биоинформатические инструменты позволяют в ближайшем будущем гораздо достовернее и точнее раскрыть многие аспекты при совместном анализе современных и палеогеномов, в том числе благодаря генотипированию Y-хромосомных маркеров.

ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Помимо фундаментальных вопросов популяционной генетики применение Y-хромосомных маркеров имеет важное значение и для практического использования в области генетической генеалогии и разработки методов ДНК-идентификации биологических образцов человека. Каждый индивидуальный организм с его уникальным геномом отличается неповторяющимся сочетанием множества полиморфных ДНК-маркеров. Каждая популяция человека отличается от других популяций не только частотами аутосомных SNP, специфичностью идентичных по происхождению блоков сцепления, но и особенностями представленности различных филогенетических линий Y-хромосомы и специфичностью кластеров их STR-гаплотипов [73].

Накопление данных индивидуальных генотипов по тысячам образцов ДНК из различных мировых популяций в общедоступных интернет-ресурсах позволяет использовать эту информацию и интегрировать экспериментальные данные научных коллективов и доступные генотипы образцов из открытых баз генеалогических компаний, расширяя возможности по определению происхождения человека и его привязке к конкретной этно-территориальной группе. Генотипирование маркеров Y-хромосомы может быть эффективно в криминалистике и судебной медицине и служить альтернативой ДНК-идентификации по аутосомным локусам. Дополнительный анализ гаплотипов Y-хромосомы наиболее значим в случаях биологических образцов со смесью мужской и женской ДНК. Значительная специфичность Y-хромосомных сублиний играет важную роль при

определении популяционной принадлежности неизвестного индивида по образцу его ДНК.

Обнаружение огромного количества SNP-маркеров, которые определяют филогенетически недавние ветви для различных гаплогрупп Y-хромосомы, и данные об их распространении в современных популяциях, позволяют провести отбор специфичных маркеров не только для большинства популяций и этносов, но зачастую и для отдельных патрилинейных родовых групп. Дополнительное использование широкого набора YSTR совместно с генотипированием таких терминальных SNP позволяет в большинстве случаев очень точно идентифицировать популяционную принадлежность образца. Такая идентификация касается только привязки Y-хромосом и не затрагивает весь геном исследуемого индивида.

В данном случае для популяционной идентификации применимы только информативные высоко-специфичные терминальные SNP, поскольку большинство базовых SNP для всех основных сублиний большинства гаплогрупп, которые возникли тысячи лет назад, присутствуют у представителей самых различных народов. Использование таких высокоинформативных этноспецифичных SNP-маркеров Y-хромосомы является одним из наиболее перспективных инструментов для анализа региональных и этнических популяционных генофондов на уровне субэтносов, родов и локальных территориальных групп, а также для разработки и применения идентификационных тест-систем для криминалистики и исследования этнического происхождения мужчин, заинтересованных в определении своей генетической генеалогии [74].

Использование маркеров Y-хромосомы позволяет повысить эффективность идентификации личности в сочетании с другими известными в криминалистике методами. Получение информации для проведения оперативно-розыскных мероприятий на основе развития генетических технологий становится возможным практически по любым биологическим следам, остающимся на местах преступлений, а при идентификации индивида генетические технологии обеспечивают максимальную точность. За счет наибольшей межпопуляционной дифференциации населения именно по Y-хромосомным маркерам разработка тест-систем на их основе очень важна и эффективна, поскольку в этом случае наборы для генотипирования будут основаны на значительно большем числе маркеров, по сравнению с аутосомными.

Очевидно, что при разработке новых наборов Y-хромосомных SNP и STR для определения популяционной принадлежности помимо дискриминирующего потенциала выбранных маркеров необходимо учитывать и степень представленности информации о генотипах по этим маркерам в доступных генетических базах данных. Поиск

совпадающих гаплотипов в базах данных, этническая и географическая привязка таких образцов могут являться важной составляющей работы по криминалистическому анализу биологических образцов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-50421 “Маркеры Y-хромосомы в популяционной генетике: фундаментальные и прикладные результаты этногеномных исследований”.

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. *Underhill P.A., Shen P., Lin A.A. et al.* Y chromosome sequence variation and the history of human populations // *Nat. Genet.* 2000. V. 26. P. 358–361. <https://doi.org/10.1038/81685>
2. *Jobling M.A., Tyler-Smith C.* The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age // *Nat. Rev. Genet.* 2003. V. 4. P. 598–612. <https://doi.org/10.1038/nrg1124>
3. *Karmin M., Saag L., Vicente M. et al.* A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture // *Genome Res.* 2015. P. 459–466. <https://doi.org/10.1101/gr.186684.114>
4. *Underhill P.A.* Inferring human history: clues from Y-chromosome haplotypes // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2003. V. 68. P. 487–493. <https://doi.org/10.1101/sqb.2003.68.487>
5. *Балановский О.П., Запороженко В.В.* Хромосома-летописец: датировки генетики, события истории, соблазн ДНК-генеалогии // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 7. С. 810–830. <https://doi.org/10.1134/S1022795416070048>
6. *Jobling M.A., Tyler-Smith C.* New uses for new haplotypes the human Y chromosome, disease and selection // *Trends in Genetics.* 2000. V. 16. P. 356–362. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)02057-6](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02057-6)
7. *Dupanloup I., Pereira L., Bertorelle G. et al.* A recent shift from polygyny to monogamy in humans is suggested by the analysis of worldwide Y-chromosome diversity // *Mol. Evol.* 2003. V. 57. P. 85–97. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2458-x>
8. *Dupanloup I., Pereira L., Bertorelle G. et al.* A recent shift from polygyny to monogamy in humans is suggested by the analysis in worldwide Y-chromosome diversity // *J. Mol. Evol.* 2003. V. 57. P. 85–97. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2458-x>
9. <http://www.isogg.org/>.
10. <http://www.yfull.com/>.
11. *Ballantyne K.N., Keel V., Wollstein A. et al.* A new future of forensic Y-chromosome analysis: Rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages // *Forensic. Sci. Int. Genet.* 2012. V. 6. P. 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.017>

12. Burgarella C., Navascues M. Mutation rate estimates for 110 Y-chromosome STRs combining population and father-son pair data // *Eur. J. Hum. Genet.* 2011. V. 19. P. 70–75.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.154>
13. Casanova M., Leroy P., Boucekkine C. et al. A human Y-linked DNA polymorphism and its potential for estimating genetic and evolutionary distance // *Science*. 1985. № 230. P. 1403–1406.
<https://doi.org/10.1126/science.2999986>
14. Ngo K.Y., Vergnaud G., Johnsson C. et al. A DNA probe detecting multiple haplotypes of the human Y chromosome // *Am. J. Hum. Genet.* 1986. V. 38. P. 407–418. PMID: PMC1684810
15. Rosser Z.H., Balaesque P., Jobling M.A. Gene conversion between the X chromosome and the male-specific region of the Y chromosome at a translocation hotspot // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. V. 85. P. 130–134.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.06.009>
16. Krausz C., Quintana-Murci L., Rajpert-De Meyts E. et al. Identification of a Y chromosome haplogroup associated with reduced sperm counts // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. P. 1873–1877.
<https://doi.org/10.1093/hmg/10.18.1873>
17. King T.E., Ballereau S.J., Schürer K.E., Jobling M.A. Genetic signatures of coancestry within surnames // *Curr. Biol.* 2006. V. 16. P. 384–388.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.12.048>
18. Hammer M.F. A recent insertion of an Alu element on the Y chromosome is a useful marker for human population genetics // *Mol. Biol. Evol.* 1994. V. 11. P. 749–761.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040155>
19. Underhill P.A., Li Jin, Zemans R. et al. A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 196–200.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.19>
20. Underhill P.A., Li Jin, Lin A.A. et al. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography // *Genome Res.* 1997. V. 7(10). P. 996–1005.
<https://doi.org/10.1101/gr.7.10.996>
21. Underhill P.A., Myres N.M., Rootsi S. et al. Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a // *Eur. J. Hum. Genet.* 2010. V. 18. P. 479–484.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.194>
22. Cruciani F., Trombetta B., Massaia A. et al. A revised root for the human Y chromosome phylogenetic tree: The origin of patrilineal diversity in Africa // *Am. J. Hum. Genet.* 2011. V. 88. № 6. P. 814–818.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.05.002>
23. Illumäe A.-M., Reidla M., Chukhryaeva M. et al. Human Y-chromosome haplogroup N: A non-trivial time-resolved phylogeography that cuts across language families // *Am. J. Hum. Genet.* 2016. V. 99. P. 163–173.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.025>
24. The Y-chromosome Consortium. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups // *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 339–348.
<https://doi.org/10.1101/gr.217602>
25. Cinnioglu C., King R., Kivisild T. et al. Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia // *Hum. Genet.* 2004. V. 114. P. 127–148.
<https://doi.org/10.1007/s00439-003-1031-4>
26. Semino O., Magri M., Benuzzi G. et al. Origin, diffusion, and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J: Inferences on the neolithization of Europe and Later Migratory Events in the Mediterranean Area // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. P. 1023–1034.
<https://doi.org/10.1086/386295>
27. Rootsi S., Magri C., Kivisild T. et al. Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 75. P. 128–137.
<https://doi.org/10.1086/422196>
28. Myres N.M., Rootsi S., Lin A. et al. A major Y-chromosome haplogroup R1b Holocene era founder effect in Central and Western Europe // *Eur. J. Hum. Genet.* 2011. V. 19. P. 95–101.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.146>
29. Kivisild T. Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes // *Investig Genet.* 2015. V. 6(3).
<https://doi.org/10.1186/s13323-015-0022-2>
30. Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // *Вестник ВОГиС*. 2006. Т. 10. № 1. С. 74–96.
31. Underhill P.A., Passarino G., Lin A.A. et al. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations // *Ann. Hum. Genet.* 2001. V. 65. P. 43–62.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.2001.6510043.x>
32. Thomas M.G., Skorecki K., Ben-Ami H. et al. Origins of old testament priests // *Nature*. 1998. V. 394. P. 138–140.
<https://doi.org/10.1038/28083>
33. Stumpf M.P.H., Goldstein D.B. Genealogical and evolutionary inference with human Y chromosome // *Science*. 2001. V. 291. P. 1738–1742.
<https://doi.org/10.1126/science.291.5509.1738>
34. Zhivotovsky L.A., Feldman M.W. Microsatellite variability and genetic distances // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 11549–11552.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11549>
35. Goldstein D.B., Zhivotovsky L.A., Nayar K. et al. Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci: Implications for the history of human Y chromosomes // *Mol. Biol. Evol.* 1996. V. 13. P. 1213–1218.
36. Jorde L.B., Rogers A.R., Bamshad M. et al. Microsatellite diversity and the demographic history of modern humans // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 3100–3103.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3100>
37. Lahermo P., Savontaus M.L., Sistonen P. et al. Y-chromosomal polymorphisms reveal founding lineages in the Finns and the Saami // *Eur. J. Hum. Genet.* 1999. V. 7. P. 447–458.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200316>
38. Пузырев В.П., Степанов В.А., Голубенко М.В. и др. Линии мтДНК и Y-хромосомы в популяции якутов // *Генетика*. 2003. Т. 39. № 7. С. 975–981.

39. *Hammer M.F., Karafet T.M., Park H. et al.* Dual origins of the Japanese: Common ground for hunter-gatherer and farmer Y chromosomes // *J. Hum. Genet.* 2006. V. 51. P. 47–58.
<https://doi.org/10.1007/s10038-005-0322-0>
40. *Юсупов Ю.М., Балановская Е.В., Жабагин М.К. и др.* Генофонд юго-западных башкир по маркерам Y-хромосомы: опыт междисциплинарного анализа // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 13. Приложение. С. S94–S97.
<https://doi.org/10.1134/S0016675818130222>
41. *Балановская Е.В., Балановский О.П.* Русский генофонд на русской равнине. М.: ООО “Луч”, 2007. 416 с.
42. *Zhivotovsky L.A.* Estimating divergence time with the use of microsatellite genetic distances: Impacts of population growth and gene flow // *Mol. Biol. Evol.* 2001. № 18. P. 700–709.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003852>
43. *Zhivotovsky L.A., Underhill P.A., Cinnioglu C. et al.* The effective mutation rate at Y chromosome short tandem repeats, with application to human population-divergence time // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. P. 50–61.
<https://doi.org/10.1086/380911>
44. *Xu X., Peng M., Fang Z., Xu X.* The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length // *Nat. Genet.* 2000. V. 24. P. 396–399.
<https://doi.org/10.1038/74238>
45. *Huang, Q.Y., Xu F.H., Shen H. et al.* Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 70. P. 625–634.
<https://doi.org/10.1086/338997>
46. *Dupuy B.M., Stenersen M., Egeland T., Olaisen B.* Y-chromosomal microsatellite mutation rates: Differences in mutation rate between and within loci // *Hum. Mutat.* 2004. V. 23. P. 117–124.
<https://doi.org/10.1002/humu.10294>
47. *Garza J.C., Freimer N.B.* Homoplasmy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees // *Genome Res.* 1996. V. 6. P. 211–217.
<https://doi.org/10.1101/gr.6.3.211>
48. *Feldman M.W., Kumm J., Pritchard J.K.* Mutation and migration in models of microsatellite evolution // *Microsatellites: Evolution and Applications* / Eds Goldstein D.G., Schlotterer C. Oxford Univ. Press, 1999. P. 98–115.
49. *Zerjal T., Dashnyam B., Pandya A. et al.* Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 60(5). P. 1174–1183. PMID: 9150165. PMCID: PMC1712423.
50. *Степанов В.А.* Этногеномика населения Северной Евразии. Томск: Печатная мануфактура, 2002. 244 с.
51. *Karafet T.M., Osipova L.P., Gubina M.A. et al.* High levels of Y-chromosome differentiation among native Siberian populations and the genetic signature of a boreal hunter-gatherer way of life // *Hum. Biol.* 2002. V. 74. № 6. P. 761–789.
<https://doi.org/10.1353/hub.2003.0006>
52. *Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G. et al.* Contrasting patterns of Y-chromosome variation in South Siberian population from Baikal and Altai-Sayan regions // *Hum. Genet.* 2006. V. 118. P. 591–604.
<https://doi.org/10.1007/s00439-005-0076-y>
53. *Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G. et al.* Y chromosome haplogroup N dispersals from south Siberia to Europe // *J. Hum. Genet.* 2007. V. 52(9). P. 763–770.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.025>
54. *Zerjal T., Xue Y., Bertorelle G. et al.* The genetic legacy of the Mongols // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 72. P. 717–721.
<https://doi.org/10.1086/367774>
55. *Chaix R., Austerlitz F., Khégay T. et al.* The genetic or mythical ancestry of descent groups: Lessons from the Y chromosome // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 75. P. 1113–1116.
<https://doi.org/10.1086/425938>
56. *Xue Y., Zerjal T., Bao W. et al.* Male demography in East Asia: A North-South contrast in human population expansion times // *Genetics*. 2006. V. 172. P. 2431–2439.
<https://doi.org/10.1534/genetics.105.054270>
57. *Балановская Е.В., Юсупов Ю.М., Схаляхо Р.А. и др.* Генетические портреты семи кланов северо-западных башкир: вклад финно-угорского компонента в генофонд башкир // *Вестник Моск. ун-та. Серия XXIII. Антропология*. 2017. № 3. С. 94–103.
58. *Abilev S., Malyarchuk B., Derenko M. et al.* The Y-chromosome C3*Star-Cluster attributed to Genghis Khan’s Descendants Is Present at High frequency in the Kerey Clan from Kazakhstan // *Hum. Biol.* 2012. V. 84(1). P. 79–89.
<https://doi.org/10.3378/027.084.0106>
59. *Zhabagin M.K., Dibirova H.D., Frolova S.A. et al.* The relation between the Y-chromosomal variation and the clan structure: The gene pool of the steppe aristocracy and the steppe clergy of the Kazakhs // *Moscow Univ. Anthropol. Bul.* 2014. V. 1. P. 96–101.
60. *Схаляхо Р.А., Жабагин М.К., Юсупов Ю.М. и др.* Генофонд туркмен Каракалпакстана в контексте популяций Центральной Азии (полиморфизм Y-хромосомы) // *Вестник Моск. ун-та. Серия XXIII. Антропология*. 2016. № 3. С. 83–93.
61. *Харьков В.Н., Новикова Л.М., Лузина Ф.А. и др.* Генофонд хакасов и шорцев по маркерам Y-хромосомы: общие компоненты и генетическая структура родов // *Генетика* 2020. Т. 56. № 7. С. 826–833.
<https://doi.org/10.31857/S0016675820070073>
62. *Дамба Л.Д., Балановская Е.В., Жабагин М.К. и др.* Оценка вклада монгольской экспансии в генофонд тувинцев // *Вавиловский журн. генетики и селекции*. 2018. Т. 22(5). С. 611–619.
<https://doi.org/10.18699/VJ18.402>
63. *Keyser C., Bouakaze C., Crubezy E. et al.* Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people // *Hum. Genet.* 2009. V. 126. P. 395–410.
<https://doi.org/10.1007/s00439-009-0683-0>
64. *Raghavan M., Skoglund P., Graf K.E. et al.* Upper palaeolithic siberian genome reveals dual ancestry of Native Americans // *Nature*. 2014. V. 505(7481). P. 87–91.
<https://doi.org/10.1038/nature12736>
65. *Lazaridis I., Patterson N., Mittnik A. et al.* Ancient human genomes suggest three ancestral populations for

- present-day Europeans // *Nature*. 2014. V. 513(7518). P. 409–413.
<https://doi.org/10.1038/nature13673>
66. Balanovsky O., Zhabagin M., Agdzhoyan A. et al. Deep phylogenetic analysis of haplogroup G1 provides estimates of SNP and STR mutation rates on the human Y-chromosome and reveals migrations of Iranic speakers // *PLoS One*. 2015. V. 10(4): e0122968.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122968>
 67. Allentoft M.E., Sikora M., Sjögren K.G. et al. Population genomics of Bronze Age Eurasia // *Nature*. 2015. V. 522(7555). P. 167–172.
<https://doi.org/10.1038/nature14507>
 68. Damgaard P., Martiniano R., Kamm J. et al. The first horse herders and the impact of early Bronze age steppe expansions into Asia // *Science*. 2018. V. 360(6396). P. 1422.
<https://doi.org/10.1126/science.aar7711>
 69. Hollard C., Zvenigorosky V., Kovalev A. et al. New genetic evidence of affinities and discontinuities between bronze age Siberian populations // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2018. № 167. P. 97–107.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.23607>
 70. Lipson M., Szécsényi-Nagy A., Mallick S. et al. Parallel palaeogenomic transects reveal complex genetic history of early European farmers // *Nature*. 2017. V. 551(7680). P. 368–372.
<https://doi.org/10.1038/nature24476>
 71. Mathieson I., Alpaslan-Roodenberg S., Posth C. et al. The genomic history of southeastern Europe // *Nature* 2018. V. 555(7695). P. 197–203.
<https://doi.org/10.1038/nature25778>
 72. Saag L., Varul L., Scheib C.L. et al. Extensive farming in Estonia started through a sex-biased migration from the steppe // *Curr. Biol.* 2017. V. 27(14). P. 2185–2193.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.022>
 73. Amorim A., Pinto N. Big data in forensic genetics // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2018. № 37. P. 102–105.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.08.001>
 74. Харьков В.Н., Зарубин А.А., Вагайцева К.В. и др. Y-хромосома как инструмент для ДНК-идентификации и определения популяционной принадлежности // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 9. С. 1056–1074.
<https://doi.org/10.31857/S0016675820090118>

Y-Chromosome Markers in Population Genetics: Fundamental and Applied Results of Ethnogenomic Research

V. N. Kharkov*

*Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,
Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, 634050 Russia*

*e-mail: vladimir.kharkov@medgenetics.ru

The Y-chromosome is a unique tool for studying the structure of gene pools and the evolutionary history of human populations. Patrilinearity ensures the sequential accumulation of mutations, as a result of which the Y-chromosome is a fairly simple marker system for reconstructing evolutionary changes, migration, and other demographic processes in human populations. The analysis of Y-chromosome haplogroups can be effectively applied both for the analysis of the genetic and demographic history of various populations and for large-scale phylogenetic and phylogeographic studies of individual monophyletic lineages of different hierarchical levels. The discovery of more and more population-specific DNA markers of this part of the human genome makes it possible to analyze in great detail the population, subethnic and generic structure of various ethnic groups throughout all periods of its formation. Determination of the allelic profile of male samples in works on paleogenetics is especially important for the reconstruction of migrations, component composition, continuity of the genetic heritage of ancient populations, and clarification of the phylogeny of various sublines. The accumulation of a large array of data on the distribution of various haplogroups specific for different populations and the features of their profiles by SNP and STR markers, in addition to solving fundamental problems, allows us to successfully solve practical problems on the genetic genealogy of each man, as well as the ethnic identification of an unknown individual based on his DNA sample and the development systems for DNA identification.

Keywords: Y-chromosome, gene pool, population, genetic diversity, ethnogenomics, paleogenetics, DNA identification.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.11:577.21

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ МИОМЫ МАТКИ

© 2021 г. С. В. Штыкалова^{1,2}, А. А. Егорова¹, М. А. Маретина¹, С. А. Фрейнд²,
В. С. Баранов^{1,2}, А. В. Киселев^{1, *}

¹Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии
им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: ankiselev@yahoo.co.uk

Поступила в редакцию 19.10.2020 г.

После доработки 11.02.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

Миома матки (ММ) — одно из наиболее частых гинекологических заболеваний, которое представляет собой доброкачественную опухоль, развивающуюся в миометрии. Основной причиной развития ММ является гормональный дисбаланс, однако значительная роль в ее патогенезе принадлежит генетическим факторам, влияющим на проявление и тяжесть заболевания. В настоящее время хирургический подход является наиболее распространенным методом лечения ММ, что часто приводит к снижению фертильности. Новым подходом к лечению ММ может быть генная терапия, основанная на доставке генетических конструкций в миоматозные узлы. В обзоре суммированы данные о молекулярно-генетических механизмах патогенеза ММ и разрабатываемых генотерапевтических подходах к ее лечению.

Ключевые слова: миома матки, генная терапия, MED12, HMGA2, тимидин-киназа, DNER, доставка ДНК.

DOI: 10.31857/S0016675821090113

Миома матки — распространенная доброкачественная опухоль миометрия (мышечного слоя матки). Несмотря на доброкачественное течение заболевания, миома матки может быть причиной различных гинекологических нарушений у женщин репродуктивного возраста, может вызывать маточные кровотечения, тазовые боли, осложнения беременности и бесплодие, а также является наиболее распространенной причиной удаления матки (гистерэктомии) [1–4]. В дополнение к гистерэктомии были разработаны различные операции с минимальной инвазией, такие как лапароскопия и минимально инвазивная миомэктомия, однако существенной проблемой такого лечения остается повторное формирование новых опухолей [5, 6]. Следует отметить, что только у 15% больных есть показания для обязательного хирургического лечения, вследствие обильных и длительных менструальных кровотечений, хронических тазовых болей; нарушений функций соседних органов; большого размера и/или быстрого роста опухоли, ее неблагоприятного расположения [7]. Таким образом, актуальна разработка новых методов лечения данного заболевания. Отсутствие метастазов, четкая локализованность миоматозных узлов, выяв-

ляемая с помощью ультразвука, и доступность для различных эндоскопических методик делают ММ идеальной мишенью для генной терапии *in situ*.

Генная терапия основана на доставке в организм экспрессионных векторов либо искусственных конструкций на основе нуклеиновых кислот, способных направленно вмешиваться в работу генов. Преодоление клеточных барьеров на пути нуклеиновых кислот является важной проблемой генной терапии. В настоящее время разрабатываются различные подходы для доставки терапевтических генетических конструкций в клетки. Широко распространенными являются векторы на основе вирусов, однако их применение *in vivo* ограничено повышенной иммуногенностью и опасностью инсерционного мутагенеза. Для решения проблем доставки используются различные модификации, которые позволяют снизить терапевтические концентрации вирусных векторов и уменьшить их иммуногенность, а также повысить специфичность проникновения в определенные ткани и клетки без потери эффективности [8]. Другим подходом к решению проблемы доставки является разработка невирусных систем на основе липосом и поликатионов, которые по своей

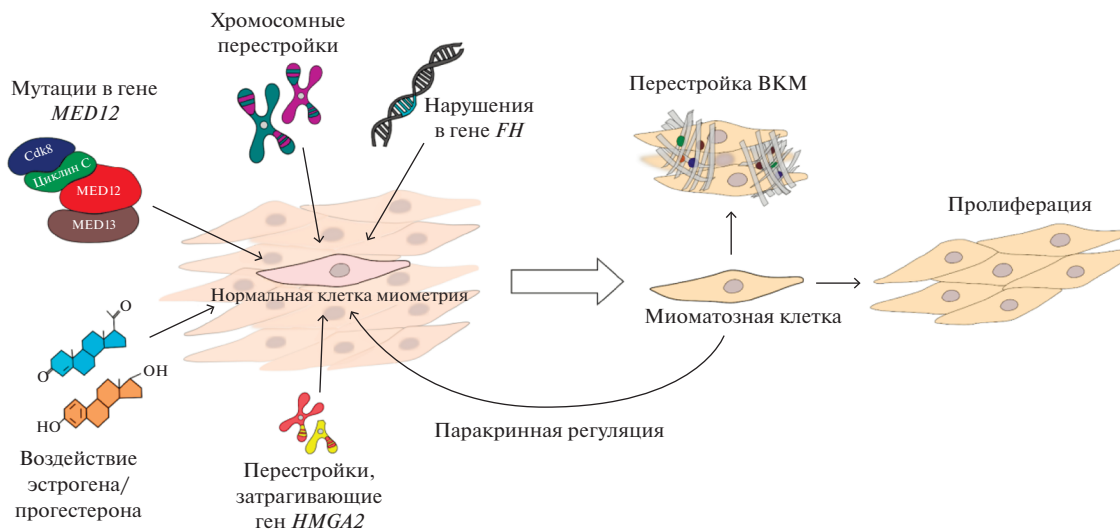


Рис. 1. Основные нарушения, приводящие к образованию миоматозной клетки.

трансфекционной эффективности *in vivo* могут приближаться к вирусным векторам.

1. МИОМА МАТКИ – МНОГОФАКТОРНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ

Миома матки (ММ) встречается в среднем у 50% женщин репродуктивного возраста [9]. Несмотря на широкую распространенность заболевания, патогенетические механизмы ММ до конца не изучены.

Ранее было показано, что развитие ММ начинается с одной клетки. Доказательства моноклонального происхождения ММ были получены при исследовании женщин, гетерозиготных по изоферментным формам X-связанного гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (*G6PD*) [10]. Дальнейший цитогенетический анализ, а также исследования инактивации X-хромосомы и потери гетерозиготности подтверждают теорию моноклонального происхождения ММ [11]. Однако в некоторых более поздних работах признается возможность биклонального и олигоклонального происхождения заболевания [12].

Традиционно образование ММ принято ассоциировать с повышенным уровнем эстрогена и наличием соответствующих рецепторов в клетках [13]. В 1995 г. было доказано, что прогестерон наравне с эстрогеном играет важную роль в развитии ММ [14]. В настоящее время развитие заболевания связывают как с влиянием эстрогена и прогестерона, так и с мутациями и хромосомными перестройками, ведущими к нарушению работы ряда генов, молекулярно-клеточных каскадов, а также определенных регуляторных РНК (рис. 1). Так, установлена взаимосвязь между мутацией в гене фумаразы (*FH*) и наследственным лейомиоматозом

[15]. Также была отмечена роль глюкокортикоидов в регуляции экспрессии генов и пролиферации клеток ММ [16]. Поиск генов, мутации в которых определяют развитие ММ, ведется уже более 40 лет, и к настоящему моменту описано множество соматических мутаций в клетках ММ, из которых ключевыми являются мутации в генах *MED12* и *HMGA2*. Также описан ряд наследственных синдромов, клиническая картина которых включает развитие миоматозных узлов (табл. 1) [17]. Основным наследственным синдромом, для которого характерно развитие ММ, является синдром Рида (называемый также синдромом наследственного лейомиоматоза и карциномы почки) [15]. В клинической картине синдромов Коудена и Протеуса образование ММ имеет второстепенное значение [17].

Несмотря на сообщения о наличии наследственных синдромов, для которых специфично развитие ММ, их вклад в общую заболеваемость составляет не более 10% [18]. Большинство доброкачественных новообразований характеризуются наличием соматических мутаций, предположительно возникших в стволовых клетках миометрия [19].

По данным экзомного секвенирования, мутации в гене *MED12* являются наиболее частым наследственным дефектом. Мутация во втором экзоне гена *MED12* (с.131G>A) может способствовать развитию ММ без дополнительных генетических нарушений [20, 21]. Вторым по частоте мутирования в ММ является ген *HMGA2*, кодирующий негистоновый хромосомный белок [22]. Наблюдается повышение экспрессии данного гена в клетках ММ по сравнению с нормальным миометрием.

В формировании миоматозного фенотипа и в патогенезе заболевания особую роль отводят кле-

Таблица 1. Наследственные синдромы, ассоциированные с развитием ММ

Наследственный синдром	Ключевые мутантные гены	Продукты генов	Функция продуктов мутантных генов
Синдром Рида	<i>FH</i>	Фумаратгидратаза	Осуществление реакции гидратации фумарата в цикле трикарбоновых кислот
Синдром Альпорта	<i>COL4A5, COL4A6</i>	Цепи коллагена IV типа: $\alpha 5$, $\alpha 6$	Входит в состав базальных мембран
Синдром Коудена/синдром Протеуса	<i>PTEN/AKT1</i>	Фосфатаза PTEN; серин-треониновая протеинкиназа Akt1	PTEN — опухолевый супрессор, регулятор клеточного деления; Akt1 — компонент путей сигнальной трансдукции, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток

точному окружению. Важным паракринным фактором роста ММ является внеклеточный матрикс, который может быть резервуаром для факторов роста, цитокинов, хемокинов и факторов ангиогенеза [23–25]. Нарушение паракринной сигнализации в результате генетических дефектов в клетках опухоли или накопление их в межклеточном матриксе может служить основной причиной прогрессирования ММ [26]. Исследования показали, что в миомах содержится на 50% больше коллагена, преимущественно аномально упакованного коллагена I типа [27]. Подобная структура внеклеточного матрикса объясняется гиперэкспрессией генов *COL4A1* и *NAV2* [2].

Проводили изучение экспрессии генов *PTEN* и *LKB1*, а также изменений, затрагивающих ключевые сигнальные пути PI3K/Akt/mTOR в клетках ММ и нормального миометрия. Существенных различий в экспрессии генов *Akt1* и *Akt2*, а также уровне mTOR между клетками ММ и нормальным миометрием обнаружено не было, при этом экспрессия генов *PTEN* и *LKB1* значительно выше в клетках ММ по сравнению с клетками нормального миометрия. Повышенные уровни экспрессии генов *PTEN* и *LKB1* на фоне отсутствия гиперпродукции Akt и mTOR предполагают нарушение регуляции путей PI3K/Akt/mTOR в ММ, что приводит к развитию доброкачественного новообразования [28].

В настоящее время ведется поиск генов, вовлеченных в патогенез ММ, с использованием биоинформатических подходов. Растет число работ, посвященных полногеномному поиску ассоциаций (genome-wide association studies, GWAS), — исследованию взаимосвязи между геномными вариантами и развитием ММ [29]. Полногеномный поиск позволил выявить локусы *GREB1*, *OBFC1*, *TERT*, *WNT4*, *CDC42* и *TP53*, которые могут быть вовлечены в патогенез ММ [30–32]. В работе 2019 г. было показано, что статистически значимые геномные варианты различаются у представителей разных этнических групп. Так, вариант G>A в однонуклеотидном полиморфном сайте, локализован-

ном между генами *CDC42* и *Wnt4*, положительно ассоциирован с ММ у представителей европейской популяции, однако не имеет статистически значимой ассоциации с ММ у представителей африканской этнической группы [30]. Взаимосвязь между однонуклеотидной заменой в 3'-нетранслируемой области гена *TP53* и развитием ММ представляет интерес, поскольку данный генетический вариант ведет к нарушению полиаденилирования и уменьшению количества мРНК, что в свою очередь приводит к нарушениям в работе систем репарации и контроля пролиферативной активности клеток [31]. Повышенная экспрессия *HEATR3* также ассоциирована с развитием ММ [30].

1.1 ММ — гормонозависимая опухоль

Действие половых стероидов опосредовано многочисленными пострецепторными механизмами, включающими активацию транскрипционных факторов, киназных белков и ингибиторов апоптоза в клетках миометрия. Результаты воздействия стероидных гормонов — повышенный рост ММ, выживание клеток и продукция внеклеточного матрикса [33]. Главными физиологическими регуляторами патогенеза ММ являются эстроген и прогестерон. В ряде исследований была продемонстрирована повышенная экспрессия генов рецепторов эстрогена и прогестерона в клетках ММ по сравнению с клетками нормального миометрия [34]. Было показано, что белок Bcl-2, который является фактором подавления апоптоза, гиперпродуцирован в ММ по сравнению с нормальными клетками миометрия, при этом его гиперпродукция стимулирована прогестероном и эстрогеном [34, 35].

К настоящему моменту доказана ведущая роль прогестерона в патогенезе ММ, который в норме регулирует развитие эндометрия и участвует в поддержании беременности [36, 37]. Действие прогестерона на ткани матки осуществляется за счет сигналов от двух изоформ рецепторов проге-

стерона (progesterone receptors, PR) — PR-A и PR-B, которые после активации лигандом функционируют как транскрипционные факторы. Прогестерон путем активации рецепторов и неклассической сигнализации усиливает рост миом, а также патологические процессы и пролиферацию клеток ММ. В то же время эстроген оказывает сопутствующее влияние, повышая чувствительность тканей к прогестерону за счет увеличения доступности его рецепторов [33, 35, 36]. В экспериментах по обработке клеток эстрогеном наблюдали увеличение количества рецепторов эпидермального фактора роста по сравнению с необработанными клетками. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что действие эстрогена опосредованно эпидермальным фактором роста и играет решающую роль в регуляции роста ММ [34]. Также была установлена достоверная ассоциация варианта T>C в позиции –13950 гена рецептора эстрогена с предрасположенностью к ММ. Кроме того, высокие уровни эстрогена у пациентов на фоне увеличенного индекса массы тела, по сравнению с контрольной группой, на разных стадиях менструального цикла усиливают рост миом, что позволяет говорить о повышенном уровне эстрогена и ожирении как о факторах, потенцирующих развитие заболевания [38]. Отмечается также вклад в патогенез ММ метилирования генов рецепторов эстрогена и прогестерона, однако эпигенетический статус клеток ММ подлежит дальнейшему изучению и уточнению [39].

1.2 Хромосомные перестройки

Значительную роль в патогенезе ММ играют цитогенетические нарушения. Наиболее частыми нарушениями при ММ являются делеции хромосом 1, 7, 16, 19 и 22. Гомозиготные делеции были обнаружены в локусе 1q43, высокий уровень делеций обнаружен в X-хромосоме (q22.3, p11.3–p11.23) [40]. Также стоит отметить часто встречающиеся абберрации, такие как транслокация t(12;14)(q14–q15; q23–q24) и перестройки короткого плеча 6-й хромосомы (6p21 (инделы, инверсии)), затрагивающие гены *HMGA2* и *HGMA1* соответственно [41]. Трисомия 12 была обнаружена в некоторых опухолях, иногда в сочетании с другими абберациями, за исключением делеции длинного плеча 7-й хромосомы и транслокации 12–14 [42]. Перестройки в длинных плечах хромосом 12 и 8 затрагивали гены *HMGA2* и *PLAG1* соответственно. При наличии перестройки в локусе 12q наблюдается повышенная экспрессия как *HMGA2*, так и протоонкогена *PLAG1*, в то время как в опухолях с перестройкой в локусе 8q наблюдали повышение экспрессии только гена *PLAG1*. В ММ без аббераций одновременно в 12q и 8q экспрессия *HMGA2* была очень низкой, а экспрессия гена

PLAG1 наблюдалась только в случае делеции участка длинного плеча 7-й хромосомы del(7)(q22) [43].

Были проведены исследования хромосомных перестроек в миомах, различающихся по наличию мутаций в гене *MED12*. В *MED12*-негативных опухолях наиболее распространенными являются делеции 1q31–q44, 1p34–p36, 2p23–p25 и 22q. Примечательно, что были обнаружены гетерозиготные делеции 1q43, затрагивающие ген *FH*. Было показано, что драйверные мутации, в частности в *MED12* и *FH*, являются взаимоисключающими [22]. Геномные изменения в *MED12*-положительных миомах очень отличаются от наблюдаемых в *MED12*-негативных опухолях. Подавляющее большинство изменений находилось в 7q21–q31. Также было отмечено, что геномные изменения в *MED12*-положительных миомах не влияют на регионы, кодирующие другие субъединицы медиа-торного комплекса [44].

Несмотря на разнообразие хромосомных перестроек, необходимо отметить, что данный тип нарушений встречается не более чем в 30–40% миоматозных узлов [45, 46].

1.3 Генетическая и эпигенетическая регуляция в патогенезе ММ

Несмотря на сообщения о дерегуляции различных генов, ключевые генетические изменения, ведущие к развитию ММ, остаются неизвестными. Ведутся исследования, направленные на выявление нарушений в конкретных генах, приводящих к развитию ММ. Иммуногистохимический анализ показал наличие изменений в гене *TP53* в 26% лейомиосарком, но не выявил мутаций в данном гене при ММ [47]. При этом наблюдали как гиперэкспрессию гена *TP53*, так и повышение уровня продукции соответствующего белка в клетках ММ по сравнению с нормальным миометрием. Белок p53 вовлечен в процессы репарации повреждений в ДНК, а также в регуляцию клеточного цикла и опосредованно индуцирует апоптоз. Повышенное содержание данного белка ограничивает злокачественную трансформацию и дедифференцировку клеток [48].

Многочисленные исследования, направленные на поиск генов, гиперэкспрессия которых характерна для ММ, позволили выделить ряд генов с нарушенной регуляцией по сравнению с клетками нормального миометрия. Проведено исследование дифференциальной экспрессии генов, в котором сравнивали профили экспрессии генов в трех группах: ткани после биопсии, культивируемые клетки ММ и нормальный миометрий в качестве контроля. В результате работы было обнаружено повышение активности генов *NAV2*, *KIF5C*, *DCX*, *CAPN6* и *COL4A2* и снижение экспрессии генов *ALDH1A1* и *DPT* в клетках и тканях

по сравнению с контролем. Можно предположить, что нарушение регуляции этих генов связано с патогенезом заболевания [2]. Также были обнаружены гены-драйверы, мутации в которых приводят к возникновению ММ: мутации во втором экзоне гена *MED12*, гиперэкспрессия гена *HMG2*, кодирующего негистоновый хромосомный белок, и в редких случаях диаллельная инактивация гена *FH*, кодирующего фермент фумаразу, принимающую участие в цикле трикарбоновых кислот [22, 49]. Данные гены могут стать генами-кандидатами в качестве мишеней для генной терапии ММ.

MED12. По данным экзомного секвенирования установлено, что мутации в гене *MED12* являются наиболее часто встречаемым дефектом и играют решающую роль в патогенезе ММ [20]. Так как все обнаруженные мутации находились во втором экзоне, было выдвинуто предположение, что нарушения именно в этой области приводят к развитию новообразований [20]. Большая часть идентифицированных мутаций второго экзона гена *MED12* затрагивали 44-й кодон. Мутации содержали как однонуклеотидные замены, так и небольшие делеции или инсерции (рис. 2) [50]. Анализ кДНК из опухоли с мутациями в гене *MED12* подтвердил преимущественную экспрессию мутантного аллеля. Секвенирование гена *MED12* в различных опухолях, включая рак яичников, рак молочной железы, рак толстой кишки, лейомиосаркому и опухоли гладких мышц с неопределенным злокачественным потенциалом, указывает на то, что мутации гена *MED12* являются высокоспецифичными для лейомиом и встречаются только в небольшой части лейомиосарком и гладкомышечных опухолей с неопределенным злокачественным потенциалом [17].

Ген *MED12* состоит из 45 экзонов, расположен в локусе Xq13 и кодирует 12-ю субъединицу 26-субъединичного медиаторного комплекса, необходимую для активации киназы CDK8, которая играет важную роль в регуляции транскрипции [51, 52]. Медиаторный комплекс является эволюционно консервативным мультипротеиновым комплексом, осуществляющим взаимодействие между транскрипционными факторами и РНК-полимеразой II. Он состоит из четырех частей: трех основных доменов (голова, середина, хвост) и киназного домена (субдомен CDK8). *MED12* является одной из четырех субъединиц субдомена CDK8, наряду с *MED13*, *CDK8* и циклином С [53]. *MED12* связывается с циклином С и активирует комплекс циклин С—CDK8. Было установлено, что мутации в первом и во втором экзонах гена *MED12* ведут к нарушению взаимодействия белка с циклином С, что приводит к ингибированию киназной активности CDK8 [54, 55]. Примечательно, что в ММ с интактным геном *MED12* не было обнаружено мутаций в генах других субъ-

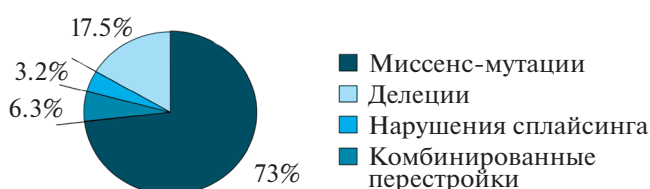


Рис. 2. Распределение мутаций во втором экзоне гена *MED12* [4].

единиц киназного комплекса (CDK8, *MED13*, *CCNC*) [56].

Ген *MED12* включается на ранних стадиях эмбриогенеза и является важным звеном ряда сигнальных путей, его нокаутирование несовместимо с нормальным эмбриогенезом [57]. Тем не менее у моделей животных с условным нокаутом гена *MED12* с помощью *Amhr2-Cre* рекомбиназы не происходит развития ММ. В то время как повышенная экспрессия гена *MED12* с мутацией с.131G>A у условно нокаутированных мышей по гену *MED12-KO*, наоборот, приводила к более раннему началу развития ММ, которые также были больше по размеру [21]. Поскольку большинство мутаций гена *MED12*, ассоциированных с развитием ММ у человека, обнаруживались в экзоне 2, можно предположить, что нарушение активности этой области *MED12* способствует онкогенезу.

В 2018 г. было изучено взаимодействие между *MED12* и рецептором прогестерона (PR). Мутации в гене *MED12* ведут к усилению взаимодействия между белком и PR, что приводит к повышению экспрессии гена лиганда рецептора активатора экспрессии NF-κB (*RANKL*, *TNFSF11*) в клетках ММ [58]. Показано, что *RANKL* активируется системой прогестерон/PR и играет важную роль в росте миома.

В клетках ММ, содержащих мутацию в гене *MED12*, наблюдали повышенный уровень продукции β-катенина, что было связано со снижением уровня продукции ингибитора β-катенина GSK-3β (гликогенсинтаза-киназа-3β). Повышение уровня β-катенина и активация Wnt4/β-катенин сигнального пути снижает уровень аутофагии и способствует делению клеток, приводя к быстрому опухолеобразованию [59]. Ранее было установлено, что нокдаун *MED12* приводил к снижению уровня продукции белков Wnt4 и β-катенина [60]. Считается, что одной из причин высокой мутабельности экзона 2 является наличие специфического сайта высокого риска (rs5937008), расположенного в относительной близости от гена *MED12* [61]. Было предположено, что происходит отбор клеток миомы без мутации *MED12*, несущих аллель “высокого риска” по данному полиморфному сайту, вследствие того что клетки с мутацией в гене *MED12* из-за сверхэкспрессии гена

SFRP1, ингибитора пути Wnt, получают дополнительные преимущества для выживания. Однако точный молекулярный механизм отбора клеток с мутацией гена *MED12* остается неизвестным [29].

HMGA2. Продукт гена *HMGA2* является членом семейства белков группы высокой мобильности А, связывающихся с малой бороздкой АТ-богатых сайтов в ДНК и функционирующих как регуляторы транскрипции. Белки *HMGA* изменяют транскрипционную активность нескольких генов [62]. Увеличение экспрессии гена *HMGA2* по сравнению с нормальным миометрием наблюдается более чем в 50% ММ, что делает данный ген кандидатом на роль основного генетического фактора, приводящего к развитию ММ [63, 64]. Чаще всего нарушения в экспрессии данного гена ассоциированы с хромосомными перестройками, затрагивающими участок 12q14–15, в частности происходит транслокация t(12;14)(q14–15;q23–24) [65]. Частым партнером при транслокациях гена *HMGA2* является ген *RAD51B*, кодирующий белок репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Сверхэкспрессия мутантного гена может приводить к аномальному росту соматических стволовых клеток миометрия с образованием фиброидоподобных тканей [66]. В редких случаях происходит слияние *HMGA2* с несколькими другими генами, включая *ALDH2*, *COX6C* и *CALB1* [17]. Гиперэкспрессию гена *HMGA2* наблюдали также в клетках ММ, не содержащих транслокацию t(12;14) [64]. Экспрессия *HMGA2* может регулироваться с помощью микроРНК *let-7* и связана с ингибированием старения фиброидных клеток [67]. Основным цис-элементом, регулирующим экспрессию *HMGA2*, является ди-нуклеотидный повтор ТСТСТ(ТC)_n, расположенный на 500 пн выше стартового кодона АТG [68]. Обнаружена корреляция между повышенным уровнем экспрессии данного гена и длиной повтора ТC [29].

FH. Ген *FH* кодирует фермент фумаратгидратазу (фумаразу), участвующий в цикле трикарбоновых кислот. Данный фермент участвует в присоединении молекулы воды к фумарату с образованием малата. В отсутствие активности фумаразы в тканях матки и других органах накапливается фумарат, который ингибирует пролилгидроксилазу, что приводит к повышению уровня индуцируемого гипоксией фактора (HIF) в цитоплазме и изменению клеточного метаболизма [36]. Несмотря на то что нарушения в гене *FH* ассоциированы с развитием онкологических заболеваний, механизм развития патологий до конца не изучен. Гетерозиготная мутация в гене фумаратгидратазы (*FH*) является причиной развития синдрома Рида — редкого аутосомно-доминантного заболевания, характеризующегося множественными кожными лейомиомами, развитием карциномы почки и миомы матки у женщин [69]. Потеря активности фумара-

зы в опухолевой ткани, ассоциированная с мутациями в гене *FH*, обнаружена у 60% больных наследственным лейомиоматозом и карциномой почки [15]. Данный генетический дефект обнаруживается приблизительно в 1% всех случаев ММ [70, 71]. При наличии мутации в гене *FH* заболевание развивалось в более раннем возрасте [70].

Эпигенетическая регуляция. Особая роль в патогенезе заболевания отводится эпигенетической регуляции: метилированию ДНК, микроРНК и модификации гистоновых белков [29, 72, 73].

Выявлен ряд генов, метилирование которых значимо различалось в клетках ММ и нормальном миометрии, а также коррелировало с изменением количества соответствующих транскриптов. Гипометилированными и транскрипционно более активными оказались гены семейства коллагенов (*COL4A1*, *COL4A2*, *COL6A3*) и гены, вовлеченные в развитие различных онкологических заболеваний (*CYP1B1*, *RAD51B*, *IRS1*, *GSTM5*). Среди генов, экспрессия которых была подавлена повышенным уровнем метилирования, были выявлены поддерживающие стабильность клетки и активацию апоптоза (*DAPK1*, *NUAK1*) [74]. Нарушение статуса метилирования 12 генов, представленных в большинстве исследованных образцов миом, а также гиперметилирование генов *SATB2* и *NGR1* приводили к активации сигнального пути Wnt/ β -катенин [75, 76].

Наряду с метилированием ДНК важным механизмом эпигенетической регуляции являются модификации гистоновых белков. Показано, что внешний эстроген стимулирует эпигенетический модификатор EZH2, приводя к снижению количества гистоновых меток H3K27me3 и последующей активации генов онкогенеза в клетках миометрия [77]. Отмечена корреляция низкого уровня экспрессии гена *KLF11*, кодирующего транскрипционный фактор, осуществляющий регуляцию опосредованно через деацетилазу гистонов, с развитием ММ [78, 79]. Низкая экспрессия *KLF11* может быть связана с повышенным метилированием промотора данного гена в клетках ММ [80].

Другим эпигенетическим механизмом, нарушение которого приводит к образованию ММ, является изменение регуляции экспрессии генов некодирующими РНК. Так, подавление активности микроРНК 106b, 93, let-7a, 26a и 26b, участвующих в регуляции экспрессии гена *HMGA2*, отрицательно коррелирует с уровнем экспрессии данного гена, что предполагает дополнительный молекулярный механизм активации *HMGA2* и развития ММ [81]. Снижение количества микроРНК miR-150 в клетках ММ влияет на регуляцию клеточного цикла через сигнальный путь Akt/p27Kip1 [82]. Отмечают также вклад микроРНК miR-21 в регуляцию генов, ответственных за образование внекле-

Таблица 2. Животные модели, использующиеся в изучении патогенеза миом матки и подходов к генной терапии

Модель	Описание модели	Источник
Морские свинки	У около 8% морских свинок спонтанно развивается ММ. После овариэктомии и воздействия эстрогена ~100% животных развивают ММ	[89, 90]
Домашняя курица	Спонтанное развитие ММ, связанное с повышенной экспрессией генов рецепторов эстрогена и прогестерона, а также гена <i>Bcl2</i>	[91]
Миниатюрные свиньи	Спонтанное развитие ММ, связанное с повышенной экспрессией гена рецептора прогестерона	[92]
Крысы Экера	Содержат мутацию зародышевой линии в гене <i>Tsc2</i> . Заболевание развивается в 65% случаев	[88, 93]
Мыши	Иммунодефицитные (SCID) мыши после инъекций гормонов (эстрогена и прогестерона) и подкожной трансплантации клеток ММ	[94–96]
	Генетически модифицированные мыши с условным нокаутом гена <i>Tsc2</i>	[97]
	Генетически модифицированные мыши с гиперэкспрессией гена <i>GPR10</i>	[98]
	Генетически модифицированные мыши с повышенной экспрессией гена β -катенина	[99]
	Генетически модифицированные мыши с мутацией в гене <i>MED12</i> (с.131G>A)	[21]

точного матрикса, в частности генов коллагена I типа и матриксных металлопротеиназ [83].

щью липосом и полимеров, а также физические методы доставки.

2. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Генная терапия — введение с терапевтическими целями в клетки и ткани организма нуклеиновых кислот, их синтетических аналогов или геном-редактирующих систем, для направленного изменения уровня экспрессии или исправления дефекта определенного гена [84]. Результатом данного подхода может являться восполнение либо подавление работы поврежденных генов, изменение последовательности ДНК или внесение новых функций в клетку [85].

Главной проблемой генной терапии остается отсутствие эффективных и одновременно безопасных способов доставки терапевтических генетических конструкций в клетки-мишени. Для эффективной генной терапии вектор должен обладать такими свойствами, как биodeградируемость, неиммуногенность, способность включать последовательность ДНК больших размеров, а также направленно доставлять терапевтические генетические конструкции к определенным органам и тканям. С целью повышения специфичности векторов и эффективности в преодолении вне- и внутриклеточных барьеров транспорта активно разрабатывают различные носители нуклеиновых кислот вирусной и невирусной природы [86]. В качестве вирусных векторов используют аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и другие [87]. Невирусные способы включают доставку нуклеиновых кислот с помо-

2.1 Клеточные и животные модели ММ

Важным условием успешного проведения генной терапии является выбор модельного объекта. В качестве модельных объектов в генной терапии ММ выступают иммортализованные клеточные линии, такие как HuLM, первичные клеточные линии ММ, полученные от пациентов после миомэктомии, а также лабораторные животные (крысы, мыши и др.) (табл. 2) [88]. Основные требования, предъявляемые к модельным объектам генной терапии, обычно включают фенотипическое и генетическое сходство с заболеванием, удобство в использовании и поддержании клеточных культур, а также в содержании лабораторных животных.

2.2 Системы доставки генетических конструкций в ММ

Наиболее часто используемой системой доставки терапевтических генетических конструкций в клетки ММ является аденовирусный вектор (Ad). Результаты ряда исследований с применением данного вектора показали высокую эффективность доставки терапевтических генов в клетки ММ [100].

Для увеличения эффективности и специфичности проникновения конструкций в клетки ММ проводят изучение различных модификаций Ад-вектора. В ряде работ наблюдали повышение уровня трансдукции клеток ММ в экспериментах

in vitro и *in vivo* при модификации Ad-вектора лигандом RGD (аргинилглициласпарагиновая кислота) [8, 101, 102]. Псевдотипирование вектора Ad собачьим аденовирусом серотипа 2 (CAV2) также приводило к повышению специфичности проникновения конструкций в клетки ММ [8]. Кроме того, магнитные наночастицы в составе комплексов с Ad-векторами способны повышать эффективность трансдукции клеток после воздействия магнитным полем. Этот подход позволяет уменьшать дозу векторов, тем самым снижая иммуногенность лекарства, не изменяя при этом эффективности специфической доставки [103]. Таким образом, дальнейшие исследования, направленные на снижение концентраций используемых носителей на основе вирусов при сохранении высокого уровня эффективности, смогут позволить сделать возможным применение данных векторов в клинической генной терапии ММ. Альтернативой вирусам являются невирусные носители. Они не обладают иммуногенностью и не имеют ограничения на размер доставляемой терапевтической конструкции, однако сегодня они уступают вирусным носителям по эффективности доставки *in vivo*. Необходимы дальнейшие усилия по совершенствованию невирусных систем доставки с целью создания эффективных и безопасных молекулярных комплексов, которых могли бы имитировать вирусные векторы [104, 105].

2.3 Подавление активности эстрогеновых рецепторов

Роль стероидных гормонов яичников в патогенезе ММ подтверждается эпидемиологическими, клиническими и экспериментальными данными [33, 38]. Одной из мишеней для генной терапии ММ могут служить рецепторы эстрогена. Нарушение связывания эстрогена с рецепторами и подавление их активности ведет к снижению уровня пролиферации клеток ММ. С целью подавления пролиферативной активности клеток ММ используют ген доминантного негативного рецептора эстрогена (*DNER*), представляющий собой форму рецепторов эстрогена (*ER*), которая не способна запускать транскрипцию. Также молекулы *DNER* образуют димеры с нативными *ER* и подавляют их активность [106]. Доставка гена *DNER* в клетки ММ с помощью Ad-вектора приводила к снижению уровня пролиферации трансдуцированных клеток. Кроме того, *DNER* влияет на экспрессию нескольких регулируемых эстрогеном генов, которые контролируют апоптоз, пролиферацию и образование внеклеточного матрикса. В частности, в инфицированных Ad-*DNER* клетках ММ регистрировали низкое содержание белка Bcl-2, повышенное содержание белка BAX, а также высокий уровень каспазы 3 [107]. Сообщается также о снижении продукции белка VEGF клет-

ками ММ после введения Ad-*DNER*, однако существенного вклада VEGF в патогенез миомы выявлено не было [108–110].

Внутриопухолевое введение Ad-*DNER* бестимусным мышам с ММ приводило к снижению пролиферации и запуску апоптоза в клетках ММ [100]. Внутриопухолевые инъекции Ad-*DNER* крысам Экера также приводили к клеточной гибели путем запуска как внутреннего пути апоптоза за счет увеличения продукции белков Bax и p53, так и внешнего пути за счет повышения экспрессии генов *FasL* и *Daxx* [107].

2.4 Суицидная генная терапия

Одним из популярных подходов в генной терапии опухолей является доставка в клетки-мишени суицидных генов. В большинстве исследований по суицидной генной терапии проводят трансфекцию клеток геном тимидинкиназы вируса простого герпеса (*HSV-TK*) с последующим лечением ганцикловиром (GCV). Ганцикловир, являющийся ациклическим нуклеозидом, фосфорилируется тимидинкиназой вируса герпеса, что делает данное соединение доступным для фосфорилирования клеточными киназами; образующийся в результате тринуклеозид встраивается в реплицирующуюся ДНК, нарушая репликацию и запуская каскады, приводящие к апоптозу [111]. Установлено, что введение в клетки гена *HSV-TK* с последующим воздействием ганцикловиром снижает продукцию белков PCNA и циклина D, ответственных за пролиферацию, и увеличивает продукцию проапоптозного белка Bax [102]. Важное преимущество данного подхода заключается в том, что погибают не только клетки, в которые встроилась терапевтическая генная конструкция, но и часть окружающих их клеток. Данный феномен, который получил название “эффект свидетеля” (bystander effect), можно объяснить возможным переносом фосфорилированного ганцикловира в соседние клетки при их межклеточных взаимодействиях (рис. 3) [112].

Исследование, проводимое на клетках ELT-3 и первичных клетках ММ, по введению гена *HSV-TK* в составе аденовирусного вектора с последующим лечением ганцикловиром показало снижение уровня пролиферации обеих клеточных культур. Снижение пролиферативной активности первичных клеток ММ имело дозозависимый характер и зависело от количества введенных аденовирусных векторов с геном *HSV-TK* [113]. Клетки линии ELT-3, инфицированные аденовирусным вектором, содержащим *HSV-TK*, были затем трансплантированы бестимусным мышам с ММ. Авторы демонстрировали остановку роста опухоли после данной процедуры, а также подтверждали отсутствие токсического эффекта, связанного с попаданием вирусного вектора в незараженные

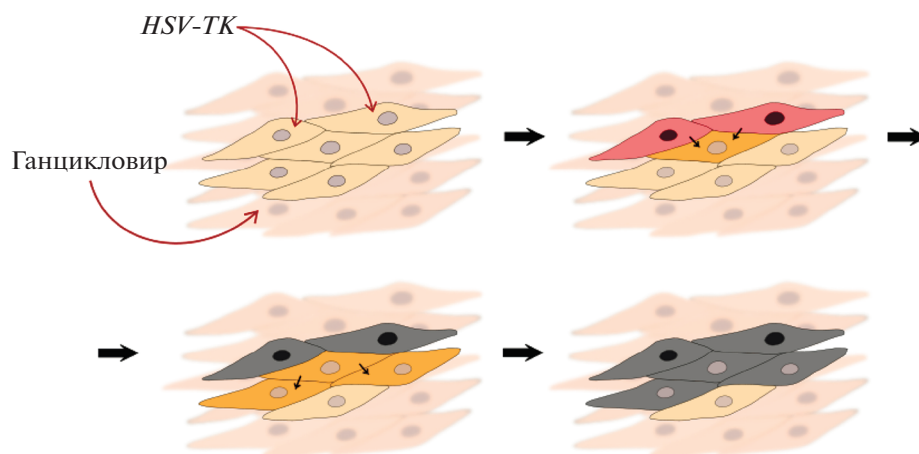


Рис. 3. “Эффект свидетеля” после трансфекции клеток геном тимидинкиназы *HSV-TK* и последующего лечения ганцикловиром. Трижды фосфорилированный ганцикловир попадает в соседние клетки, в которых встраивается в цепь ДНК, терминируя ее репликацию и приводя к апоптозу. Стрелками показаны пути распространения фосфорилированного ганцикловира в соседние клетки. Черным цветом показаны ядра клеток, в которых происходит транскрипция гена *HSV-TK*.

органы и ткани [113]. Эксперименты по внутри-опухолевым инъекциям аденовирусного вектора с *HSV-TK* крысам Экера показали значительное уменьшение размеров опухолей [114].

Дальнейшее развитие суицидная генотерапия ММ получила благодаря улучшению вирусных систем доставки с помощью модификации Ад-вектора мотивом RGD и магнитными наночастицами [101–103].

В ряде работ по суицидной генной терапии ММ использовали невирусные способы доставки. В исследовании Ниу и коллег сообщается об эффективной трансфекции клеток ММ и клеток линии ELT-3 плазмидой, содержащей ген *HSV-TK* [115]. Отмечено преимущество использования невирусных векторов, в частности отсутствие иммунного ответа на введение плазмиды. Показано достоверное снижение выживаемости первичных клеток ММ после трансфекции комплексами с *HSV-TK* и цистеин-фланкированными катионными пептидами [116]. При этом модификация пептидных носителей циклическим лигандом iRGD приводила к значительному увеличению эффективности трансфекции. Доставка *HSV-TK* пептидными носителями, модифицированными лигандом iRGD, и последующее лечение GCV снижали пролиферативную активность клеток ММ и приводили к апоптозу [117]. Дальнейшая разработка невирусных систем доставки является перспективным направлением генной терапии ММ.

3. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ

Наряду с разработкой систем доставки поиск новых мишеней является актуальным направлением в создании эффективных методов лечения

ММ. Как отмечалось ранее, основные исследования по генной терапии ММ направлены на подавление рецептора эстрогена в клетках ММ и доставку суицидных генов [118]. С появлением новых данных о молекулярно-генетических особенностях ММ количество потенциальных мишеней для генной терапии увеличилось. Наибольший интерес в качестве потенциальных мишеней представляют гены *MED12* и *HMG2*, нарушения в которых присутствуют в 80–90% ММ [119]. Так, специфичное подавление экспрессии мутантного гена *MED12* может оказаться эффективной стратегией терапии ММ. Ранее в работе Аль-Хенди и соавт. было продемонстрировано, что подавление экспрессии *MED12* с помощью РНК-интерференции приводит к уменьшению уровня белков Wnt и β -катенина и к снижению уровня пролиферации immortalized клеток ММ [60]. Аналогично подавление экспрессии гена *HMG2*, активно экспрессирующегося еще в эмбриогенезе, может сыграть существенную роль в лечении заболевания [120].

Другой потенциальной стратегией терапии ММ может являться специфическое воздействие на гены, контролирующие образование внеклеточного матрикса (ВКМ). Известно, что ВКМ миомы отличается от ВКМ здоровой ткани миометрия повышенным содержанием коллагена I типа, фибронектина и протеогликанов, а также дисрегуляцией работы металлопротеиназ [118, 121]. Воздействие на компоненты ВКМ может привести к подавлению роста ММ, к нарушению межклеточной структуры и повышению доступности клеток опухоли для терапевтических препаратов [118]. Комбинированное лечение на основе суицидной генной терапии и разрушения ВКМ может значи-

тельно повысить эффективность лечения миом. Следует отметить, что миоматозные узлы окружены плотной оболочкой — псевдокапсулой, образованной клетками нормального миометрия [122]. Понимание механизмов образования псевдокапсулы может помочь в поиске новых мишеней для терапии ММ.

Перспективным подходом к генной терапии ММ является активация апоптоза внутри опухоли. Показано, что в клетках ММ снижена экспрессия генов, вовлеченных в активацию и регуляцию программируемой клеточной гибели. Введение в клетки ММ апоптоз-индуцирующих факторов, таких как TNF, TRAIL, FasL, Bax, или активированных каспаз усиливает механизмы апоптоза как по внешнему, так и по внутреннему пути клеточной сигнализации [123].

Сообщается также о роли васкуляризации и повышения проницаемости сосудов матки в формировании и развитии ММ [17]. Процессы образования новых кровеносных сосудов тесно ассоциированы с развитием опухолей, они определяют характер роста и клинико-морфологические варианты (простая и пролиферирующая ММ). В связи с этим перспективными для лечения ММ представляются методы, связанные с действием на процессы ангиогенеза [124, 125]. Ранее установлено, что в клетках ММ по сравнению с нормальным миометрием наблюдается повышенная экспрессия гена *VEGF* — основного фактора неоваскуляризации [126, 127]. Известно, что опухоли при ММ слабо васкуляризованы, но аномально развитая сеть сосудов представлена на периферии и в псевдокапсуле [128]. Подавление экспрессии генов, запускающих ангиогенез, таких как *VEGF*, *bFGF* и др., может приводить к снижению интенсивности роста и уменьшению объема ММ. Мишенью при данном подходе являются клетки эндотелия сосудов. Показано, что введение в миоматозные узлы рекомбинантного фактора PEDF снижало количество белка VEGF [129]. Таким образом, ММ оказалась чувствительна к действию анти-ангиогенных белков, несмотря на малое количество сосудов внутри самой опухоли [123]. В качестве ингибиторов процессов ангиогенеза для генной терапии ММ могут выступать антисмысловые олигонуклеотиды либо малые интерферирующие РНК (миРНК), способные специфически связываться с транскриптами гена *VEGFA*, его рецептора, а также других генов проангиогенных факторов [130, 131].

Следует отметить, что в большинстве случаев генной терапии ММ экспрессия трансгена должна быть ограничена исключительно клетками опухоли. Локализованный характер ММ помогает легко идентифицировать цель для клинического применения векторов генной терапии и, следовательно, позволяет избежать непреднамеренной трансфекции клеток окружающего миометрия.

Селективная экспрессия трансгенов в ММ может быть достигнута с помощью промоторов факторов транскрипции, специфичных для ММ, а также эффективных векторов для направленной доставки генетических конструкций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящий момент генная терапия находится на стадии разработки эффективных систем доставки терапевтических конструкций в клетки. Некоторые из них уже находят практическое применение в медицине. Векторы на основе вирусов показывают большую эффективность в доставке терапевтических генетических конструкций, однако их токсичность, связанная с возможностью запуска иммунного ответа, накладывает ограничения на использование их *in vivo*. В качестве альтернативы разрабатываются невирусные векторы на основе липосом и полимеров.

С развитием молекулярных технологий и появлением новых данных о молекулярных аспектах патогенеза ММ увеличивается число методов и препаратов, направленных на подавление роста и развития опухоли. Изучение особенностей патогенеза ММ и выявление новых генов-кандидатов делает возможным разработку перспективных терапевтических генетических конструкций. Четкая визуализация миом и их доступность различными эндоскопическим методам делают данное заболевание удобной мишенью для генной терапии.

В экспериментах на модельных животных продемонстрировано успешное применение подходов генной терапии к лечению ММ. Показано, что подавление активности рецепторов эстрогена с помощью доставки в клетки ММ мутантной формы рецептора эстрогена (DNER) снижает пролиферативную активность клеток, а также индуцирует апоптоз. Суицидная генная терапия с использованием гена тимидинкиназы вируса простого герпеса и последующим лечением ганцикловиром также демонстрирует значительное уменьшение размеров опухоли через индукцию апоптоза как в трансфицированных клетках, так и в соседних опухолевых клетках за счет “эффекта свидетеля”.

Генная терапия ММ на данный момент находится на стадии становления. Для развития данного подхода необходимы дальнейшие фундаментальные исследования патофизиологии ММ и клинические испытания. Важным шагом на пути к генной терапии ММ будет создание эффективных и безопасных систем доставки терапевтических конструкций в клетки, а также дальнейший поиск генов-кандидатов и уточнение молекулярных механизмов патогенеза заболевания.

Написание раздела 1 проведено в соответствии с планами научно-исследовательской работы НИИАГиР им. Д.О. Отта (тема № АААА-А19-

119021290033-1). Написание разделов 2 и 3 проведено при поддержке гранта РФ № 19-15-00108. Марианна Маретина — стипендиат Совета по грантам Президента РФ (СП-822.2018.4).

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. Walker C.L., Stewart E.A. Uterine fibroids: The elephant in the room // *Science*. 2005. V. 308. P. 1589–1592.
<https://doi.org/10.1126/science.1112063>
2. Xia L., Liu Y., Fu Y. et al. Integrated analysis reveals candidate mRNA and their potential roles in uterine leiomyomas. // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2017. V. 43. P. 149–156.
<https://doi.org/10.1111/jog.13172>
3. Stewart E.A. Uterine fibroids // *Lancet*. 2001. V. 357. P. 293–298.
<https://doi.org/10.1016/S0140-67360003622-9>
4. Osinovskaya N.S., Malysheva O.V., Shved N.Y. et al. Frequency and Spectrum of MED12 exon 2 mutations in multiple versus solitary uterine leiomyomas from Russian patients // *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2016. V. 35. P. 509–515.
<https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000255>
5. Gingold J.A., Gueye N.-A., Falcone T. Minimally invasive approaches to myoma management // *J. Minim. Invasive. Gynecol.* 2018. V. 25. P. 237–250.
<https://doi.org/10.1016/j.jmig.2017.07.007>
6. Dubuisson J. The current place of mini-invasive surgery in uterine leiomyoma management // *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* 2019. V. 48. P. 77–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2018.10.004>
7. Доброхотова Ю.Э., Ильина И.Ю., Ибрагимова Д.М., Нариманова М.Р. Миома матки: альтернативные методы лечения // *Проблемы репродукции*. 2018. Т. 24. № 2. С. 83–87.
8. Hassan M.H., Khatoon N., Curiel D.T. et al. Toward gene therapy of uterine fibroids: Targeting modified adenovirus to human leiomyoma cells // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. P. 514–524.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dem410>
9. Cramer S.F., Patel A. The frequency of uterine leiomyomas // *Am. J. Clin. Pathol.* 1990. V. 94. P. 435–438.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/94.4.435>
10. Linder D., Gartler S.M. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase electrophoretic variants in different tissues of heterozygotes // *Am. J. Hum. Genet.* 1965. V. 17. P. 212–220.
11. Canevari R.A., Pontes A., Rosa F.E. et al. Independent clonal origin of multiple uterine leiomyomas that was determined by X chromosome inactivation and microsatellite analysis // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005. V. 193. P. 1395–1403.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.02.097>
12. Holdsworth-Carson S.J., Zaitseva M., Vollenhoven B.J., Rogers P.A.W. Clonality of smooth muscle and fibroblast cell populations isolated from human fibroid and myometrial tissues // *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 2014. V. 20. P. 250–259.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gat083>
13. Andersen J., DyReyes V.M., Barbieri R.L. et al. Leiomyoma primary cultures have elevated transcriptional response to estrogen compared with autologous myometrial cultures // *J. Soc. Gynecol. Investig.* 1995. V. 2. P. 542–551.
<https://doi.org/10.1177/107155769500200307>
14. Rein M.S., Barbieri R.L., Friedman A.J. Progesterone: A critical role in the pathogenesis of uterine myomas // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995. V. 172. P. 14–18.
<https://doi.org/10.1016/0002-93789590077-2>
15. Tomlinson I.P.M., Alam N.A., Rowan A.J. et al. Germ-line mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer // *Nat. Genet.* 2002. V. 30. P. 406–410.
<https://doi.org/10.1038/ng849>
16. Whirledge S., Dixon D., Cidrowski J.A. Glucocorticoids regulate gene expression and repress cellular proliferation in human uterine leiomyoma cells // *Horm. Cancer*. 2012. V. 3. P. 79–92.
<https://doi.org/10.1007/s12672-012-0103-0>
17. Commandeur A.E., Styer A.K., Teixeira J.M. Epidemiological and genetic clues for molecular mechanisms involved in uterine leiomyoma development and growth // *Hum. Reprod. Update*. 2015. V. 21. P. 593–615.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmv030>
18. Mehine M., Kaasinen E., Heinonen H.-R. et al. Integrated data analysis reveals uterine leiomyoma subtypes with distinct driver pathways and biomarkers // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. P. 1315–1320.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1518752113>
19. Baranov V.S., Ivaschenko T.E., Yarmolinskaya M.I. Comparative systems genetics view of endometriosis and uterine leiomyoma: Two sides of the same coin? // *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2016. V. 62. P. 93–105.
<https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1123325>
20. Makinen N., Mehine M., Tolvanen J. et al. MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas // *Science*. 2011. V. 334. P. 252–255.
<https://doi.org/10.1126/science.1208930>
21. Mittal P., Shin Y., Yatsenko S.A. et al. Med12 gain-of-function mutation causes leiomyomas and genomic instability // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. P. 3280–3284.
<https://doi.org/10.1172/JCI81534>
22. Mäkinen N., Kämpjärvi K., Frizzell N. et al. Characterization of MED12, HMGA2, and FH alterations reveals molecular variability in uterine smooth muscle tumors // *Mol. Cancer*. 2017. V. 16. P. 101.
<https://doi.org/10.1186/s12943-017-0672-1>

23. *Nair S., Al-Hendy A.* Adipocytes enhance the proliferation of human leiomyoma cells via TNF- α proinflammatory cytokine // *Reprod. Sci.* 2011. V. 18. P. 1186–1192.
<https://doi.org/10.1177/1933719111408111>
24. *Ono M., Yin P., Navarro A. et al.* Paracrine activation of WNT/ β -catenin pathway in uterine leiomyoma stem cells promotes tumor growth // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 17053–17058.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1313650110>
25. *Moravek M.B., Yin P., Coon J.S. et al.* Paracrine pathways in uterine leiomyoma stem cells involve insulin-like growth factor 2 and insulin receptor A // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017. V. 102. P. 1588–1595.
<https://doi.org/10.1210/jc.2016-3497>
26. *Islam M.S., Greco S., Janjusevic M. et al.* Growth factors and pathogenesis // *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2016. V. 34. P. 25–36.
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.08.018>
27. *Leppert P.C., Baginski T., Prupas C. et al.* Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium // *Fertil. Steril.* 2004. V. 82. P. 1182–1187.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.04.030>
28. *Makker A., Goel M., Mahdi A. et al.* PI3K/Akt/mTOR signaling; its regulator tumour suppressor genes PTEN & LKB1 in human uterine leiomyomas // *Indian. J. Med. Res.* 2016. V. 143. P. 112.
<https://doi.org/10.4103/0971-5916.191808>
29. *Baranov V.S., Osinovskaya N.S., Yarmolinskaya M.I.* Pathogenomics of uterine fibroids development // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 6151.
<https://doi.org/10.3390/ijms20246151>
30. *Edwards T.L., Giri A., Hellwege J.N. et al.* A trans-ethnic genome-wide association study of uterine fibroids // *Front. Genet.* 2019. V. 10. P. 511.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00511>
31. *Rafnar T., Gunnarsson B., Stefansson O.A. et al.* Variants associating with uterine leiomyoma highlight genetic background shared by various cancers and hormone-related traits // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 3636.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05428-6>
32. *Gallagher C.S., Mäkinen N., Harris H.R. et al.* Genome-wide association and epidemiological analyses reveal common genetic origins between uterine leiomyomata and endometriosis // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 4857.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12536-4>
33. *Reis F.M., Bloise E., Ortiga-Carvalho T.M.* Hormones and pathogenesis of uterine fibroids // *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2016. V. 34. P. 13–24.
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.11.015>
34. *Shimomura Y., Matsuo H., Samoto T., Maruo T.* Up-regulation by progesterone of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression in human uterine leiomyoma // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998. V. 83. P. 2192–2198.
<https://doi.org/10.1210/jcem.83.6.4879>
35. *Catherino W.H., Parrott E., Segars J.* Proc. from the Natl institute of child health and human development conference on the uterine fibroid research update workshop // *Fertil. Steril.* 2011. V. 95. P. 9–12.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.049>
36. *Patel B., Elguero S., Thakore S. et al.* Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology // *Hum. Reprod. Update.* 2015. V. 21. P. 155–173.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmu056>
37. *Kim J.J., Sefton E.C.* The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012. V. 358. P. 223–231.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.044>
38. *Veronica M., Ali A., Venkateshwari A. et al.* Association of estrogen and progesterone receptor gene polymorphisms and their respective hormones in uterine leiomyomas // *Tumor Biol.* 2016. V. 37. P. 8067–8074.
<https://doi.org/10.1007/s13277-015-4711-5>
39. *Есенева Ф.М., Шалаев О.Н., Оразмурадов А.А. и др.* Влияние эпигенетических процессов на экспрессию генов стероидных рецепторов при миоме матки // *Трудный пациент.* 2017. Т. 15. С. 23–26.
40. *Liegl-Atzwanger B., Heitzer E., Flicker K. et al.* Exploring chromosomal abnormalities and genetic changes in uterine smooth muscle tumors // *Mod. Pathol.* 2016. V. 29. P. 1262–1277.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.107>
41. *Ligon A.H., Morton C.C.* Genetics of uterine leiomyomata // *Genes., Chromosom. Cancer.* 2000. V. 28. P. 235–245.
<https://doi.org/10.1002/1098-226420000728:3<235::AID-GCC1>3.0.CO;2-7>
42. *Nilbert M., Heim S., Mandahl N. et al.* Trisomy 12 in uterine leiomyomas // *Cancer Genet. Cytogenet.* 1990. V. 45. P. 63–66.
<https://doi.org/10.1016/0165-46089090067-K>
43. *Panagopoulos I., Gorunova L., Brunetti M. et al.* Genetic heterogeneity in leiomyomas of deep soft tissue // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 48769–48781.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.17953>
44. *Yatsenko S.A., Mittal P., Wood-Trageser M.A. et al.* Highly heterogeneous genomic landscape of uterine leiomyomas by whole exome sequencing and genome-wide arrays // *Fertil. Steril.* 2017. V. 107. P. 457–466.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.10.035>
45. *Hodge J.C., Kim T.-M., Dreyfuss J.M. et al.* Expression profiling of uterine leiomyomata cytogenetic subgroups reveals distinct signatures in matched myometrium: transcriptional profiling of the t12;14 and evidence in support of predisposing genetic heterogeneity // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. P. 2312–2329.
<https://doi.org/10.1093/hmg/dds051>
46. *Mehine M., Kaasinen E., Mäkinen N. et al.* Characterization of uterine leiomyomas by whole-genome sequencing // *N. Engl. J. Med.* 2013. V. 369. P. 43–53.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1302736>
47. *Hall K.L., Teneriello M.G., Taylor R.R. et al.* Analysis of Ki-ras, p53, and MDM2 genes in uterine leiomyomas and leiomyosarcomas // *Gynecol. Oncol.* 1997. V. 65. P. 330–335.
<https://doi.org/10.1006/gyno.1997.4653>
48. *Lora V., Grings A.O., Capp E. et al.* Gene and protein expression of progesterone receptor isoforms A and B, p53 and p21 in myometrium and uterine leiomyoma //

- Arch. Gynecol. Obstet. 2012. V. 286. P. 119–124.
<https://doi.org/10.1007/s00404-012-2245-2>
49. Xie J., Xu X., Yin P. *et al.* Application of ex-vivo spheroid model system for the analysis of senescence and senolytic phenotypes in uterine leiomyoma // Lab. Investig. 2018. V. 98. P. 1575–1587.
<https://doi.org/10.1038/s41374-018-0117-5>
50. Осиновская Н.С., Иващенко Т.Э., Долинский А.К. и др. Мутации гена MED12 у женщин с миомой матки // Генетика. 2013. Т. 49. № 12. С. 1426–1431.
51. Knuesel M.T., Meyer K.D., Donner A.J. *et al.* The human CDK8 subcomplex is a histone kinase that requires Med12 for activity and can function independently of mediator // Mol. Cell. Biol. 2009. V. 29. P. 650–661.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00993-08>
52. Taatjes D.J. The human mediator complex: A versatile, genome-wide regulator of transcription // Trends Biochem. Sci. 2010. V. 35. P. 315–322.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.02.004>
53. Borggreffe T., Yue X. Interactions between subunits of the Mediator complex with gene-specific transcription factors // Semin. Cell. Dev. Biol. 2011. V. 22. P. 759–768.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.07.022>
54. Turunen M., Spaeth J.M., Keskitalo S. *et al.* Uterine leiomyoma-linked MED12 mutations disrupt mediator-associated CDK activity // Cell. Rep. 2014. V. 7. P. 654–660.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.047>
55. Kämpjärvi K., Park M.J., Mehine M. *et al.* Mutations in exon 1 highlight the role of MED12 in uterine leiomyomas // Hum. Mutat. 2014. V. 35. P. 1136–1141.
<https://doi.org/10.1002/humu.22612>
56. Mäkinen N., Heinonen H.-R., Sjöberg J. *et al.* Mutation analysis of components of the Mediator kinase module in MED12 mutation-negative uterine leiomyomas // Br. J. Cancer. 2014. V. 110. P. 2246–2249.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2014.138>
57. Rocha P.P., Scholze M., Bleiß W., Schrewe H. Med12 is essential for early mouse development and for canonical Wnt and Wnt/PCP signaling // Development. 2010. V. 137. P. 2723–2731.
<https://doi.org/10.1242/dev.053660>
58. Liu Y., Liu X., Liu Y., Zhao J. Screening of potential biomarkers in uterine leiomyomas disease via gene expression profiling analysis // Mol. Med. Rep. 2018. V. 17(5). P. 6985–6996.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8756>
59. El Andaloussi A., Al-Hendy A., Ismail N. *et al.* Introduction of somatic mutation in MED12 induces Wnt4/ β -catenin and disrupts autophagy in human uterine myometrial cell // Reprod. Sci. 2020. V. 27. P. 823–832.
<https://doi.org/10.1007/s43032-019-00084-7>
60. Al-Hendy A., Laknaur A., Diamond M.P. *et al.* Silencing Med12 gene reduces proliferation of human leiomyoma cells mediated via Wnt/ β -catenin signaling pathway // Endocrinology. 2017. V. 158. P. 592–603.
<https://doi.org/10.1210/en.2016-1097>
61. Välimäki N., Kuisma H., Pasanen A. *et al.* Genetic predisposition to uterine leiomyoma is determined by loci for genitourinary development and genome stability // Elife. 2018. V. 7. e37110.
<https://doi.org/10.7554/eLife.37110>
62. Fusco A., Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer // Nat. Rev. Cancer. 2007. V. 7. P. 899–910.
<https://doi.org/10.1038/nrc2271>
63. Galindo L.J., Hernández-Beeftink T., Salas A. *et al.* HMGA2 and MED12 alterations frequently co-occur in uterine leiomyomas // Gynecol. Oncol. 2018. V. 150. P. 562–568.
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.07.007>
64. Klemke M., Meyer A., Nezhad M.H. *et al.* Overexpression of HMGA2 in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease // Genes, Chromosom. Cancer. 2009. V. 48. P. 171–178.
<https://doi.org/10.1002/gcc.20627>
65. Hennig Y., Rogalla P., Wanschura S. *et al.* HMGIC expressed in a uterine leiomyoma with a deletion of the long arm of chromosome 7 along with a 12q14–15 rearrangement but not in tumors showing del7 as the sole cytogenetic abnormality // Cancer Genet. Cytogenet. 1997. V. 96. P. 129–133.
<https://doi.org/10.1016/S0165-46089600283-X>
66. Mas A., Cervelló I., Gil-Sanchis C. *et al.* Identification and characterization of the human leiomyoma side population as putative tumor-initiating cells // Fertil. Steril. 2012. V. 98. P. 741–751.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.044>
67. Markowski D.N., Helmke B.M., Belge G. *et al.* HMGA2 and p14Arf: Major roles in cellular senescence of fibroids and therapeutic implications // Anticancer Res. 2011. V. 31. P. 753–761.
68. Borrmann L., Seebeck B., Rogalla P., Bullerdiek J. Human HMGA2 promoter is coregulated by a polymorphic dinucleotide TC-repeat // Oncogene. 2003. V. 22. P. 756–760.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206073>
69. Matsuda T., Kambe N., Ly N.T.M. *et al.* Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome in which skin biopsy enabled diagnosis // J. Dermatol. 2019. V. 46. P. e285–e287.
<https://doi.org/10.1111/1346-8138.14855>
70. Harrison W.J., Andrici J., Maclean F. *et al.* Fumarate hydratase-deficient uterine leiomyomas occur in both the syndromic and sporadic settings // Am. J. Surg. Pathol. 2016. V. 40. P. 599–607.
<https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000573>
71. Lehtonen R., Kiuru M., Vanharanta S. *et al.* Biallelic inactivation of fumarate hydratase FH occurs in non-syndromic uterine leiomyomas but is rare in other tumors // Am. J. Pathol. 2004. V. 164. P. 17–22.
<https://doi.org/10.1016/S0002-94401063091-X>
72. Yang Q., Mas A., Diamond M.P., Al-Hendy A. The mechanism and function of epigenetics in uterine leiomyoma development // Reprod. Sci. 2016. V. 23. P. 163–175.
<https://doi.org/10.1177/1933719115584449>
73. Laganà A.S., Vergara D., Favilli A. *et al.* Epigenetic and genetic landscape of uterine leiomyomas: a current view over a common gynecological disease // Arch. Gynecol. Obstet. 2017. V. 296. P. 855–867.
<https://doi.org/10.1007/s00404-017-4515-5>

74. *Maekawa R., Sato S., Yamagata Y. et al.* Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e66632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066632>
75. *Sato S., Maekawa R., Yamagata Y. et al.* Identification of uterine leiomyoma-specific marker genes based on DNA methylation and their clinical application // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 30652. <https://doi.org/10.1038/srep30652>
76. *Sato S., Maekawa R., Tamura I. et al.* SATB2 and NGR1: Potential upstream regulatory factors in uterine leiomyomas // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019. V. 36. P. 2385–2397. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01582-y>
77. *Greathouse K.L., Bredfeldt T., Everitt J.I. et al.* Environmental estrogens differentially engage the histone methyltransferase EZH2 to increase risk of uterine tumorigenesis // *Mol. Cancer Res.* 2012. V. 10. P. 546–557. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0605>
78. *Yin P., Lin Z., Reierstad S. et al.* Transcription factor KLF11 integrates progesterone receptor signaling and proliferation in uterine leiomyoma cells // *Cancer Res.* 2010. V. 70. P. 1722–1730. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2612>
79. *Zheng Y., Tabbaa Z.M., Khan Z. et al.* Epigenetic regulation of uterine biology by transcription factor KLF11 via posttranslational histone deacetylation of cytochrome p450 metabolic enzymes // *Endocrinology*. 2014. V. 155. P. 4507–4520. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1139>
80. *Navarro A., Yin P., Monsivais D. et al.* Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma // *PLoS One*. 2012. V. 7. P. e33284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033284>
81. *Mello J.B.H., Barros-Filho M.C., Abreu F.B. et al.* MicroRNAs involved in the HMGA2 deregulation and its co-occurrence with MED12 mutation in uterine leiomyoma // *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 2018. V. 24. P. 556–563. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay037>
82. *Lee J.H., Choi Y.S., Park J.H. et al.* MiR-150-5p may contribute to pathogenesis of human leiomyoma via regulation of the Akt/p27Kip1 pathway in vitro // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 2684. <https://doi.org/10.3390/ijms20112684>
83. *Cardozo E.R., Foster R., Karmon A.E. et al.* MicroRNA 21a-5p overexpression impacts mediators of extracellular matrix formation in uterine leiomyoma // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018. V. 16. P. 46. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0364-8>
84. *Wahane A., Waghmode A., Kapphahn A. et al.* Role of lipid-based and polymer-based non-viral vectors in nucleic acid delivery for next-generation gene therapy // *Molecules*. 2020. V. 25. № 12. P. 2866. <https://doi.org/10.3390/molecules25122866>
85. *High K.A., Roncarolo M.G.* Gene therapy // *N. Engl. J. Med.* 2019. V. 381. P. 455–464. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1706910>
86. *Egorova A., Kiselev A.* Peptide modules for overcoming barriers of nucleic acids transport to cells // *Curr. Top. Med. Chem.* 2016. V. 16. P. 330–342. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150812120755>
87. *Chen Y.H., Keiser M.S., Davidson B.L.* Viral vectors for gene transfer // *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2018. V. 8. P. 58. <https://doi.org/10.1002/cpmo.58>
88. *Howe S.R., Gottardis M.M., Everitt J.I. et al.* Rodent model of reproductive tract leiomyomata. Establishment and characterization of tumor-derived cell lines // *Am. J. Pathol.* 1995. V. 146. P. 1568–1579.
89. *Field K., Griffith J., Lang C.* Spontaneous reproductive tract leiomyomas in aged guinea-pigs // *J. Comp. Pathol.* 1989. V. 101. P. 287–294. <https://doi.org/10.1016/0021-99758990038-8>
90. *Porter K.B., Tsibris J.C.M., Nicosia S.V. et al.* Estrogen-induced guinea pig model for uterine leiomyomas: Do the ovaries protect? // *Biol. Reprod.* 1995. V. 52. P. 824–832. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.4.824>
91. *Machado S.A., Bahr J.M., Hales D.B. et al.* Validation of the aging hen gallus gallus domesticus as an animal model for uterine leiomyomas // *Biol. Reprod.* 2012. V. 87. P. 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.101188>
92. *Mozzachio K., Moore A.B., Kissling G.E., Dixon D.* Immunoeexpression of steroid hormone receptors and proliferation markers in uterine leiomyoma and normal myometrial tissues from the miniature pig, *Sus scrofa* // *Toxicol. Pathol.* 2016. V. 44. P. 450–457. <https://doi.org/10.1177/0192623315621414>
93. *Cook J., Walker C.* The eker rat: Establishing a genetic paradigm linking renal cell carcinoma and uterine leiomyoma // *Curr. Mol. Med.* 2004. V. 4. P. 813–824. <https://doi.org/10.2174/1566524043359656>
94. *Hassan M.H., Eyzaguirre E., Arafa H.M.M. et al.* Memy I: A novel murine model for uterine leiomyoma using adenovirus-enhanced human fibroid explants in severe combined immune deficiency mice // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008. V. 199. P. 156.e1–156.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.02.010>
95. *Tsuiji K., Takeda T., Li B. et al.* Establishment of a novel xenograft model for human uterine leiomyoma in immunodeficient mice // *Tohoku J. Exp. Med.* 2010. V. 222. P. 55–61. <https://doi.org/10.1620/tjem.222.55>
96. *Drosch M., Bullerdiek J., Zollner T.M. et al.* A novel mouse model that closely mimics human uterine leiomyomas // *Fertil. Steril.* 2013. V. 99. P. 927–935. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.032>
97. *Kaneko-Tarui T., Commandeur A.E., Patterson A.L. et al.* Hyperplasia and fibrosis in mice with conditional loss of the TSC2 tumor suppressor in Müllerian duct mesenchyme-derived myometria // *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 2014. V. 20. P. 1126–1134. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau077>
98. *Varghese B.V., Koohestani F., McWilliams M. et al.* Loss of the repressor REST in uterine fibroids promotes aberrant G protein-coupled receptor 10 expression and activates mammalian target of rapamycin pathway //

- Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 2187–2192.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1215759110>
99. *Tanwar P.S., Lee H.-J., Zhang L. et al.* Constitutive activation of beta-catenin in uterine stroma and smooth muscle leads to the development of mesenchymal tumors in mice // *Biol. Reprod.* 2009. V. 81. P. 545–552.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075648>
100. *Al-Hendy A., Lee E.J., Wang H.Q., Copland J.A.* Gene therapy of uterine leiomyomas: Adenovirus-mediated expression of dominant negative estrogen receptor inhibits tumor growth in nude mice // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004. V. 191. P. 1621–1631.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.04.022>
101. *Abdelaziz M., Sherif L., ElKhaiy M. et al.* Targeted adenoviral vector demonstrates enhanced efficacy for in vivo gene therapy of uterine leiomyoma // *Reprod. Sci.* 2016. V. 23. P. 464–474.
<https://doi.org/10.1177/1933719116630413>
102. *Nair S., Curiel D.T., Rajaratnam V. et al.* Targeting adenoviral vectors for enhanced gene therapy of uterine leiomyomas // *Hum. Reprod.* 2016. V. 28. P. 2398–2406.
<https://doi.org/10.1093/humrep/det275>
103. *Shalaby S.M., Khater M.K., Perucho A.M. et al.* Magnetic nanoparticles as a new approach to improve the efficacy of gene therapy against differentiated human uterine fibroid cells and tumor-initiating stem cells // *Fertil. Steril.* 2016. V. 105. P. 1638–1648.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.03.001>
104. *Li S.D., Huang L.* Gene therapy progress and prospects: Non-viral gene therapy by systemic delivery // *Gene Ther.* 2006. V. 13. P. 1313–1319.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302838>
105. *Young L.S., Searle P.F., Onion D., Mautner V.* Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application // *J. Pathol.* 2006. V. 208. P. 299–318.
<https://doi.org/10.1002/path.1896>
106. *Lazennec G., Alcorn J.L., Katzenellenbogen B.S.* Adenovirus-mediated delivery of a dominant negative estrogen receptor gene abrogates estrogen-stimulated gene expression and breast cancer cell proliferation // *Mol. Endocrinol.* 1999. V. 13. P. 969–980.
<https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0318>
107. *Hassan M.H., Salama S.A., Zhang D. et al.* Gene therapy targeting leiomyoma: adenovirus-mediated delivery of dominant-negative estrogen receptor gene shrinks uterine tumors in Eker rat model // *Fertil. Steril.* 2010. V. 93. P. 239–250.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.086>
108. *Dixon D., He H., Haseman J.K.* Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium // *Environ. Health Perspect.* 2000. V. 108. P. 795–802.
<https://doi.org/10.2307/3454309>
109. *Hassan M.H., Salama S.A., Arafa H.M.M. et al.* Adenovirus-mediated delivery of a dominant-negative estrogen receptor gene in uterine leiomyoma cells abrogates estrogen- and progesterone-regulated gene expression // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007. V. 92. P. 3949–3957.
<https://doi.org/10.1210/jc.2007-0823>
110. *Korompelis P., Piperi C., Adamopoulos C. et al.* Expression of vascular endothelial factor-A, gelatinases MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 in uterine leiomyomas // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015. V. 53. P. 1415–1424.
<https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0798>
111. *Matthews T., Boehme R.* Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir // *Clin. Infect. Dis.* 1988. V. 10. P. 490–494.
https://doi.org/10.1093/clinids/10.Supplement_3.S490
112. *Pope I.M., Poston G.J., Kinsella A.R.* The role of the bystander effect in suicide gene therapy // *Eur. J. Cancer.* 1997. V. 33. P. 1005–1016.
<https://doi.org/10.1016/S0959-80499600483-2>
113. *Salama S.A., Kamel M., Christman G. et al.* Gene therapy of uterine leiomyoma: Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir treatment inhibits growth of human and rat leiomyoma cells in vitro and in a nude mouse model // *Gynecol. Obstet. Invest.* 2007. V. 63. P. 61–70.
<https://doi.org/10.1159/000095627>
114. *Hassan M., Zhang D., Salama S. et al.* Towards fibroid gene therapy: Adenovirus-mediated delivery of herpes simplex virus 1 thymidine kinase gene/ganciclovir shrinks uterine leiomyoma in the Eker rat model // *Gynecol. Obstet. Invest.* 2009. V. 68. P. 19–32.
<https://doi.org/10.1159/000209675>
115. *Niu H., Simari R.D., Zimmermann E.M. et al.* Nonviral vector-mediated thymidine kinase gene transfer and ganciclovir treatment in leiomyoma cells // *Obstet. Gynecol.* 1998. V. 91. P. 735–740.
<https://doi.org/10.1016/S0029-78449800014-3>
116. *Егорова А.А., Штыкалова С.В., Маретина М.А. и др.* Сус-фланкированные катионные пептиды для доставки гена тимидинкиназы вируса простого герпеса в клетки с целью суицидной генной терапии миомы матки // *Мол. биология.* 2020. Т. 54. № 3. С. 497–511.
117. *Egorova A., Shtykalova S., Selutin A. et al.* Development of iRGD-modified peptide carriers for suicide gene therapy of uterine leiomyoma // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. № 2. P. 202.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020202>
118. *Islam M.S., Protic O., Stortoni P. et al.* Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma // *Fertil. Steril.* 2013. V. 100. P. 178–193.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.007>
119. *Mehine M., Mäkinen N., Heinonen H.-R. et al.* Genomics of uterine leiomyomas: Insights from high-throughput sequencing // *Fertil. Steril.* 2014. V. 102. P. 621–629.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.050>
120. *Mas A., Cervelló I., Fernández-Álvarez A. et al.* Overexpression of the truncated form of high mobility group A proteins HMGA2 in human myometrial cells induces leiomyoma-like tissue formation // *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 2015. V. 21. P. 330–338.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gau114>
121. *Malik M., Norian J., McCarthy-Keith D. et al.* Why leiomyomas are called fibroids: The central role of extracellular matrix in symptomatic women // *Semin. Reprod. Med.* 2010. V. 28. P. 169–179.
<https://doi.org/10.1055/s-0030-1251475>

122. *Di Tommaso S., Massari S., Malvasi A. et al.* Selective genetic analysis of myoma pseudocapsule and potential biological impact on uterine fibroid medical therapy // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2015. V. 19. P. 7–12.
<https://doi.org/10.1517/14728222.2014.975793>
123. *Hassan M.H., Othman E.E., Hornung D., Al-Hendy A.* Gene therapy of benign gynecological diseases // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009. V. 61. P. 822–835.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.023>
124. *Степанова Е.В.* Антиангиогенная терапия: новые возможности лечения злокачественных заболеваний // *Практическая онкология.* 2002. № 3. С. 246–252.
125. *Manyonda I., Sinthamoney E., Belli A.-M.* Controversies and challenges in the modern management of uterine fibroids // *BJOG An. Int. J. Obstet. Gynaecol.* 2004. V. 111. P. 95–102.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-0528.2003.00002.x>
126. *Hague S., Zhang L., Oehler M.K. et al.* Expression of the hypoxically regulated angiogenic factor adrenomedullin correlates with uterine leiomyoma vascular density // *Clin. Cancer. Res.* 2000. V. 6. P. 2808–2814.
127. *Gentry C.C., Okolo S.O., Fong L.F.W. Te. et al.* Quantification of vascular endothelial growth factor-A in leiomyomas and adjacent myometrium // *Clin. Sci.* 2001. V. 101. P. 691.
<https://doi.org/10.1042/CS20010096>
128. *Tal R., Segars J.H.* The role of angiogenic factors in fibroid pathogenesis: potential implications for future therapy // *Hum. Reprod. Update.* 2014. V. 20. P. 194–216.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmt042>
129. *Bar-Joseph H., Hikri E., Chuderland D. et al.* Pigment epithelium derived factor as a novel multi-target treatment for uterine fibroids // *Reprod. Biomed. Online.* 2020. V. 41. P. 335–342.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.03.024>
130. *Hwa S., Hoon J., Hyeon S. et al.* Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer // *J. Controlled Release.* 2008. V. 129. P. 107–116.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.03.008>
131. *Egorova A.A., Shtykalova S.V., Maretina M.A. et al.* Synergistic anti-angiogenic effects using peptide-based combinatorial delivery of siRNAs targeting VEGFA, VEGFR1, and endoglin genes // *Pharmaceutics.* 2019. V. 11. P. 261.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060261>

Molecular Genetic Basis and Perspectives of Uterine Leiomyoma Gene Therapy

S. V. Shtykalova^{a, b}, A. A. Egorova^a, M. A. Maretina^a,
S. A. Freund^b, V. S. Baranov^{a, b}, and A. V. Kiselev^{a, *}

^a*Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint-Petersburg, 199034 Russia*

^b*Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia*

^{*}*e-mail: ankiselev@yahoo.co.uk*

Uterine leiomyoma (UL) is one of the most common gynecological diseases, which is a benign tumor that develops in the myometrium. The main reason for the UL development is hormonal imbalance; however, a significant role belongs to genetic factors that affect the manifestation and severity of the disease. Currently, the surgical approach is the most common in the treatment of UL, which often leads to reduced fertility. Gene therapy based on the delivery of genetic constructs to myomatous nodes may be a new approach to the treatment of UL. This review summarizes the data on the molecular mechanisms of UL pathogenesis and current gene therapy approaches to UL treatment.

Keywords: uterine leiomyoma, gene therapy, MED12, HMGA2, thymidine kinase, DNER, DNA delivery.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.162;579.61

БАКТЕРИИ-ПРОБИОТИКИ В КОРРЕКЦИИ ПРИЗНАКОВ ДЕПРЕССИИ, ИХ АКТИВНЫЕ ГЕНЫ И БЕЛКИ

© 2021 г. Е. У. Полуэктова¹, *, В. Н. Даниленко¹

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

*e-mail: epolu@vigg.ru

Поступила в редакцию 02.11.2020 г.

После доработки 07.12.2020 г.

Принята к публикации 21.12.2020 г.

Бактерии-пробиотики широко используются для профилактики и лечения воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта и стимулирования иммунитета. В последнее десятилетие появилось много данных о положительном влиянии пробиотиков на течение нейродегенеративных и психических заболеваний. В кратком обзоре суммированы сведения о клинических исследованиях потенциальных пробиотиков-антидепрессантов, генах и белках их активных компонентов. Данные предварительных исследований на малых выборках свидетельствуют о том, что отдельные штаммы бактерий достоверно снижают проявление признаков депрессии по сравнению с плацебо, причем действие пробиотиков особенно выражено на группах людей с подтвержденным диагнозом депрессии. Сведения о генах/белках бактерий, определяющих их активность, разрозненны, однако они свидетельствуют о большом потенциале бактерий как источнике подобных метаболитов. Наиболее активными компонентами клеток являются секретируемые белки/пептиды и компоненты клеточных стенок. Сведения о таких генах могут быть использованы для поиска пробиотиков с определенными заданными свойствами.

Ключевые слова: пробиотики, психобиотики, метаболиты, гены, белки, депрессия.

DOI: 10.31857/S0016675821090095

Последние два десятилетия ознаменовались интенсивным изучением микробиоты человека — сообщества комменсальных, симбиотических и патогенных микроорганизмов, находящихся в/на его теле и адаптированных в результате эволюции к совместному сосуществованию друг с другом и с макроорганизмом. Микробиота состоит из вирусов, архей, простейших, грибов и бактерий, представляющих наиболее многочисленную и изученную группу [1]. Наиболее разнообразной и многочисленной по составу и выполняемым функциям является микробиота желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [2]. Бактерии кишечной микробиоты участвуют в метаболических процессах, прежде всего в метаболизме углеводов, а также белков, желчных солей, полифенолов; защищают организм человека от патогенов, поддерживают целостность кишечного барьера, синтезируют сотни биологически активных веществ (молочную и уксусную кислоты, перекись водорода, бактериоцины, короткоцепочечные жирные кислоты, витамины, белки, пептиды, компоненты клеточных стенок, нейроактивные соединения — гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), гистамин и другие), участвуют в формировании и функционировании иммунной системы и в функционировании

нервной и эндокринной систем [2–4]. Состав кишечной микробиоты является индикатором здоровья человека. Во многих исследованиях отмечена корреляция между составом микробиоты и различными заболеваниями человека [5, 6].

Накопление знаний о составе и функциях кишечной микробиоты человека привели к пониманию того, что определенные бактерии, обладающие полезными для здоровья человека свойствами, могут быть использованы в качестве лекарственных средств. Был введен термин пробиотик — живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах оказывают благоприятное воздействие на организм хозяина, человека или животных. Пионером в использовании пробиотиков является И.И. Мечников. В качестве пробиотиков используются бактерии родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, а также *Escherichia coli* M-17, *Saccharomyces boulardii* [7]. Показано профилактическое и лечебное действие пробиотиков при хронических воспалительных заболеваниях ЖКТ, заболеваниях метаболического синдрома и ряда других. Пробиотики, в отличие от лекарств, практически не имеют побочных эффектов [8]. Еще в начале широкого использования пробиотиков

было высказано предположение, что отдельные пробиотики могут быть использованы для дополнительного или альтернативного лечения при депрессии [9]. Позже был введен термин психобиотик [10, 11] и действительно показано во многих работах, что прием бактериальных препаратов оказывал положительный эффект при нейродегенеративных и психических заболеваниях, таких как депрессия, шизофрения, эпилепсия, ишемия мозга, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, бессонница, расстройства аутистического спектра. Подавляющее большинство работ было сделано на моделях этих заболеваний у животных [12–14].

Депрессия – наиболее распространенное психическое расстройство, от которого страдает более 300 миллионов человек в мире [15]. Болезнь существенно снижает качество жизни пациентов, служит одной из наиболее частых причин суицида и относится к социально-значимым заболеваниям. Симптомы депрессии многочисленны, среди них можно выделить подавленное настроение, ангедонию, утомляемость, заторможенность, тревожное состояние. Считается, что заболевание депрессией сопровождается хроническим слабо выраженным воспалением, связанным с нарушением состава микробиоты, повышением проницаемости эпителия кишечника, нарушением иммунного статуса [16]. Лечение антидепрессантами дает эффект только у части больных и имеет побочные эффекты [17], поэтому важен поиск новых способов лечения депрессии, одним из которых является использование пробиотиков.

ОТБОР БАКТЕРИЙ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИДЕПРЕССАНТОВ

Первым этапом отбора штаммов потенциальных пробиотиков является оценка общих пробиотических свойств бактерий, которая обычно проводится *in vitro*. Штаммы отбираются по способности сохраняться в организме хозяина, выдерживать специфическую среду желудка (низкий pH, желудочный сок, пепсин) и кишечника (панкреатин и желчные кислоты). Определяется способность колонизировать эпителиальные клетки ЖКТ и подавлять рост патогенных бактерий. Устанавливается безопасность штаммов по отсутствию генов патогенности и устойчивости к антибиотикам, определяемой мобильными элементами; оценивается способность продуцировать активные внеклеточные метаболиты в результате синтеза (бактериоцины, органические кислоты, экзополисахариды и др.) и путем преобразования углеводов, белков и др. компонентов пищи (короткоцепочечные жирные кислоты, КЦЖК) и технические свойства (сохранение жизнеспособности в процессе производства и хранения лекарственных препаратов). Далее оцениваются специфические полезные свойства штаммов

(антидепрессивные, противовоспалительные, антиканцерогенные, иммуномодулирующие) *in vitro* на культурах клеток (если это возможно) и *in vivo* на моделях лабораторных животных. Завершающий и необходимый этап исследований – на людях-добровольцах [18].

Активность различных бактериальных штаммов как потенциальных антидепрессантов была показана в нескольких сотнях работ на лабораторных животных, крысах и мышах. В качестве потенциальных антидепрессантов были преимущественно использованы штаммы различных видов лактобацилл и бифидобактерий [19]. Активность на моделях животных демонстрировали лишь отдельные штаммы бактерий каждого вида, причем различные штаммы проявляли различные свойства [20]. Применение потенциальных антидепрессантов у животных в нормальных условиях и условиях стресса, а также у гнотобиотических животных, достоверно снижало проявление поведенческих признаков депрессии, тревоги и стресса (в тестах предпочтения сахарозы, вынужденного плавания, приподнятого крестообразного лабиринта, открытого поля и других), а также изменяло их физиологические характеристики. Изменения физиологических характеристик включали снижение уровня гормона стресса кортикостерона, а также адренкортикотропного гормона АСТН в плазме крови; увеличение уровня нейротрансмиттеров дофамина, серотонина и триптофана (предшественника серотонина) в разных отделах мозга, серотонина и триптофана – в сыворотке крови; изменение активности рецепторов ГАМК в различных отделах мозга; увеличение уровня нейротрофического фактора мозга BDNF в гиппокампе и сыворотке крови. Отмечали также снижение проявления маркеров воспаления – С-реактивного белка и липополисахаридов – в крови, снижение уровня провоспалительных цитокинов (IL-6, IFN- γ , TNF- α) и увеличение уровня противовоспалительного IL-10 в плазме и селезенке, индукцию антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы в мозге и сыворотке крови, укрепление целостности кишечного и гематоэнцефалического барьеров и нормализация состава кишечной микробиоты [19].

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОБИОТИКОВ-АНТИДЕПРЕССАНТОВ

К сожалению, данные, полученные на животных, не всегда могут быть воспроизведены на людях [21]. Поэтому принципиально важны результаты использования пробиотиков-антидепрессантов на людях. Существует несколько десятков работ, в которых показано положительное действие пробиотиков на симптомы депрессии, тревожности, стресса у людей в рандомизированных двойных

слепых плацебо-контролируемых исследованиях. Численность людей в исследуемых группах максимально составляла 423 человека, чаще 30–100. Исследования проводились на различных когортах людей — на здоровых людях, на людях в условиях стресса, на больных депрессией/тревожным расстройством, получавших или не получавших антидепрессанты одновременно с пробиотиками. В качестве потенциальных пробиотиков-антидепрессантов были использованы различные штаммы лактобацилл (*L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), бифидобактерий (*B. longum*, *B. longuminfantis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. animalis* subsp. *lactis*) и бактерий других родов (*Bacillus coagulans*, *Clostridium butyricum*, *Streptococcus thermophilus*). Пробиотики представляли собой различные монокультуры бактерий [22–30] или поликомпонентные смеси [31–38]. Кроме того, многие пробиотики содержали вспомогательные вещества (мальтодекстрин, крахмал,) и пребиотики (олигосахара, инулин), т.е. относились к синбиотикам. В ряде случаев именно синбиотик, но не пробиотик, проявлял антидепрессивные свойства [37]. Ежедневная доза пробиотика составляла обычно 10^9 – 10^{10} КОЕ, длительность приема от 3 до 24 нед. Использовались как капсулы, так и пробиотики в виде йогуртов [30].

Действие пробиотиков было различным, они вызывали либо только снижение проявления признаков депрессии, не тревожности [25, 26, 37], либо тревожности, но не депрессии [22, 30], либо обоих признаков [24, 28, 33, 38]. Как и в случае любых лекарственных препаратов, положительный эффект проявлялся не у всех членов исследуемой группы. Фактором, затрудняющим сравнение результатов работ, является различие используемых для оценки степени и динамики признаков тревожности и депрессии вербальных тестов. Даже в рамках одной работы получали различные результаты при использовании разных тестов [24]. Используемые пробиотики оказывали влияние не только на поведенческие симптомы депрессии и тревожности, но и на различные физиологические свойства людей. Во многих работах было отмечено изменение состава микробиоты [22, 24], снижение уровня гормона кортизола в слюне и плазме [23, 24, 29, 31, 38], снижение уровня маркеров воспаления и окислительного стресса [27, 29, 30, 34]. В отдельных работах отмечали увеличение в сыворотке крови фактора BDNF [37], увеличение нейронной активности префронтальной коры мозга [23], изменения активности районов мозга, связанных с депрессией [26], усиление серотонинового пути [29]. Многие из использованных пробиотиков были исследованы ранее и демонстрировали иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства при инфекциях верхних дыхательных путей и ЖКТ.

Действие одного и того же пробиотика было различно для различных когорт [22, 39]. Важно отметить, что достоверным являлся положительный эффект пробиотиков для группы пациентов с клинически доказанными симптомами депрессии [29, 30, 34–37], в том числе для больных, не восприимчивых к действию лекарств-антидепрессантов [28]. В ряде работ отмечен различный эффект действия пробиотика в зависимости от пола [25, 30] и возраста [29] испытуемых. После окончания приема пробиотика его действие на симптомы депрессии и тревожности могло либо сохраняться в течение нескольких недель [26], либо исчезать после окончания приема [23]. Нужно отметить, что ни в одной работе не было отмечено серьезных побочных эффектов использования пробиотиков.

В перечисленных работах использовались различные штаммы различных видов бактерий и исследовались они различными группами ученых. Поэтому трудно сравнивать эффективность данных пробиотиков. Только один из них, ProBio'Stick канадской компании Lallemand Health Solutions, был исследован в ряде работ. Он состоит из штаммов *L. helveticus* R0052 и *B. longum* R0175. В нескольких работах было показано, что пробиотик снижает показатели депрессии [31, 32, 35]; однако в работе Romijn et al. пробиотик не проявлял подобных свойств [40]. Возможно, это связано с тем, что были использованы различные группы испытуемых. Планируется большая по числу испытуемых людей и длительная (16 нед.) работа с этим препаратом на больных с диагнозом большое депрессивное расстройство [41].

В ряде обзоров был проведен метаанализ рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых исследований, учитывались работы как с положительным, так и с отрицательным результатом. Перечислим только подобные обзоры последних двух лет: [42–47]. Данные всех метаанализов свидетельствуют, что пробиотики статистически значимо влияют на симптомы депрессии у людей по сравнению с плацебо. Суммируя результаты работ, можно сделать вывод, что действие пробиотиков крайне специфично и определяется как штаммом пробиотика, так и его мишенью. Активность проявляют только отдельные штаммы бактерий. В работе [46] авторы пришли к заключению, что использование пробиотиков статистически значимо улучшает состояние пациентов по шкале Гамильтона (Hamilton Rating Scale for Depression, HDRS), но не по опроснику Бека (Beck Depression Inventory, BDI). Эффект действия пробиотиков зависит от многих характеристик исследуемых групп пациентов: наличия симптомов депрессии и других заболеваний, одновременного приема пребиотиков и антидепрессантов, пола и возраста испытуемых. Пробиотики действуют более эффективно на па-

циентов с заболеванием депрессией и тревожными расстройствами, чем на людей в стрессовых условиях [44] или с другими заболеваниями [42]. Эти данные могут быть косвенным свидетельством разной нозологии большого депрессивного расстройства и других депрессивных состояний. Отмечается, что терапия пробиотиками требует длительного лечения [43]. Общий вывод всех подобных работ: хотя метаанализ данных свидетельствует о том, что пробиотики способны оказывать антидепрессивное действие на людей, проделанные исследования являются предварительными; для широкого и систематического использования пробиотиков в комплексной профилактике и терапии депрессии требуется исследование эффективности пробиотиков на больших когортах людей, установление оптимальных доз и длительности применения, определение длительности полученного эффекта.

АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ БАКТЕРИЙ-ПРОБИОТИКОВ И ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ИХ СИНТЕЗ ГЕНЫ

Наиболее важным направлением в исследовании пробиотиков является определение и выделение метаболитов, определяющих их активность. Идентификация таких метаболитов позволит определить механизм действия пробиотика, целенаправленно отбирать новые пробиотики и перейти к созданию более эффективных и безопасных т.н. метабиотиков — структурных компонентов, метаболитов и/или сигнальных молекул бактерий-пробиотиков с известной химической структурой, способных оптимизировать физиологические функции макроорганизма [48, 49].

Бактерии, используемые в качестве пробиотиков, способны синтезировать ряд нейроактивных соединений, которые потенциально могут участвовать в коммуникации с макроорганизмом — ГАМК, серотонин, дофамин, адреналин, норадреналин, гистамин [50–54]. Однако только для ГАМК было показано, что использование бактериальных штаммов, синтезирующих ГАМК, и продуктов их сбраживания оказывает положительный эффект на проявление признаков депрессии и тревожности у лабораторных животных [55–57]. Бактерии кишечной микробиоты могут синтезировать ГАМК тремя различными путями. Наиболее распространенным является путь декарбоксилирования глутамата (гены *gadABC*), реже встречаются пути метаболизма путресцина (гены *puuABCD* и *ygjG*, *ydcW*) [58].

В работе [59] антидепрессивный эффект штамма *L. reuteri* предположительно был связан с продукцией штаммом перекиси водорода и с ее ингибирующим действием на индолеамин-пиррол-2,3-диоксигеназу (IDO1) мышей. Перекись водорода образуется в клетках лактобацилл в ре-

зультате окисления NADH или пирувата и разложения активных форм кислорода, участвует в редокс-сигналикации [60] и окисляется пероксидазами; эти ферменты широко распространены среди лактобацилл и эффект продукции штаммом значительных количеств H_2O_2 определяется, вероятно, действием регуляторных механизмов.

Еще одним активным ферментом является карбоксиэстераза *B. breve* ATCC 15700 (WP_003829800.1, WP_003829196.1, WP_003828396.1, WP_003828023.1). Фермент превращает антидепрессант альбифлорин в бензойную кислоту, она проникает через гемато-энцефалический барьер, ингибирует в мозге оксидазу D-аминокислот (DAAO) и проявляет *in vivo* антидепрессивный эффект [61].

Бактерии кишечной микробиоты ферментируют углеводы, не перевариваемые организмом человека, в результате чего образуются КЦЖК (short chain fatty acids, SCFA), уксусная, пропионовая, масляная. В организме человека они проявляют противовоспалительную активность, в том числе уменьшают нейровоспалительные процессы, влияя на продукцию цитокинов, целостность кишечного барьера, дифференциацию Т-лимфоцитов [62]. Есть ряд косвенных свидетельств того, что КЦЖК могут быть активными метаболитами потенциальных пробиотиков-антидепрессантов. Мыши, находившиеся в условиях хронического стресса и получавшие пробиотик *L. plantarum* MTCC 9510, демонстрировали снижение признаков депрессивного поведения и увеличение количества КЦЖК в фекалиях [63]. Прием *Faecalibacterium prausnitzii* ATCC 27766 оказывал профилактический и терапевтический эффект на поведение крыс, находившихся в условиях стресса, и увеличивал содержание КЦЖК в слепой кишке [64]. *Clostridium butyricum* CGMCC 9831 на мышинной модели сосудистой деменции снижал проявление когнитивных и гистологических патологий и восстанавливал нормальный уровень масляной кислоты в фекалиях и мозге [65]. Однако не ясно, связано ли увеличение количества КЦЖК с активностью именно этих бактерий или они влияют на состав микробиоты и способствуют активизации других КЦЖК-продуцирующих бактерий. Ключевые ферменты, определяющие различные пути образования бутирата, — бутираткиназа или, альтернативно, бутирил-КоА-дегидрогеназа [66]. Для пропионата это ферменты лактоил-КоА-дегидратаза, пропиональдегиддегидрогеназа, метилмалонил-КоА-декарбоксилаза [67].

Как было сказано выше, депрессия сопровождается воспалительным процессом, и ряд потенциальных пробиотиков, снижающих симптомы депрессии, имеет иммуномодулирующие свойства. Эти факты позволяют предполагать, что бактериальные штаммы с иммуномодулирующими свой-

ствами могут иметь антидепрессивные свойства. Активные метаболиты бактерий, определяющие их иммуномодулирующие свойства, достаточно изучены [3]. К ним относятся секретируемые белки и пептиды:

белок 15 кДа *Faecalibacterium prausnitzii*, дающий начало семи различным активным пептидам [68];

Стр (серин-треониновый) пептид, представляющий из себя фрагмент секретируемого белка *L. plantarum* BMC12 и образующийся при действии кишечных протеаз [69];

секретируемые белки ряда штаммов *L. rhamnosus* и *L. casei* p75 и p40 – пептидазы клеточной стенки, содержащие CNAP и NlpC/p60 домены (гены *L. casei* BL23 LCABL_00230 и LCABL_02770) [70, 71];

секретируемый антиген A, SagA – NlpC/p60 пептидогликангидролаза *Enterococcus faecium* Com15, гидролизующая пептидогликановые фрагменты Lys-типа [72, 73];

секретируемый белок, не имеющий известных структурных доменов, кодируемый геном HMPREF0539_2242 *L. rhamnosus* LMS2-1 [74];

белок 32 кДа, кодируемый геном Amuc_1100 *Akkermansia muciniphila*, локализованный во внешней мембране и стабильный при температуре пастеризации [75];

лактоцепин, секретируемый белок *L. paracasei* LMGS-29188 из пробиотического препарата VSL#3, протеаза клеточной стенки [76];

серпин, ингибитор сериновой протеазы, продуцируемый штаммами *B. longum*, *B. breve*, *B. dentium* [77]. В штамме *B. longum* NCC2705 белок кодируется геном *BL0108* [78].

Бактерии, используемые в качестве пробиотиков, продуцируют ряд веществ, которые в организме человека являются нейромедиаторами. Из них иммуномодулирующее действие показано для ГАМК *L. brevis* BGZLS10-17 [79] и гистамина *L. reuteri* [80]. Бактерии образуют гистамин из гистидина с помощью гистидиндекарбоксилазы. У *L. reuteri* – это ген *hdcA*: HMPREF0535_RS02485 в штамме MM2-3 и HMPREF0536_11827 в штамме MM4-1A. Гистамин блокирует рецептор гистамина-2, но одновременно активирует рецептор гистамина-1 человека; однако последнее не вызывает воспалительной реакции, так как *L. reuteri* одновременно продуцируют диацилглицеринкиназу, метаболизирующую субстрат этого рецептора [81].

Важными иммуномодулирующими агентами бактериальных клеток являются компоненты клеточной стенки. У грамположительных бактерий, к которым принадлежит большинство бактерий, используемых в качестве пробиотиков, к ним относятся экзополисахариды (ЭПС), теихоевые кислоты, липопroteины. ЭПС представляют собой высо-

комолекулярные водорастворимые линейные или разветвленные полимеры, состоящие из повторяющихся единиц моно- или олигосахаридов. Иммуномодулирующая активность ЭПС показана во многих работах [82]. Активность ЭПС определяется их составом, физическими и химическими характеристиками [83], значительная иммуномодулирующая активность присуща только определенным ЭПС [84, 85]. Синтез ЭПС определяется многими генами, преимущественно локализованными в оперонах [86]. Из теихоевых кислот наиболее изучена иммуномодулирующая активность липотейхоевой кислоты (LTA), например у *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. gasseri* [87, 88]. Иммуномодулирующей активностью обладают и липопroteины/липopeптиды потенциальных пробиотиков (Lpp); они у грамположительных бактерий являются главными агонистами TLR2. Число генов, определяющих синтез липопroteинов, варьирует от вида к виду и составляет значительную часть генома, 1–3% всех генов конкретного штамма [89]. Важным является белок пролипопротеин-диацилглицерилтрансфераза (ген *lgt*), осуществляющая присоединение к белку липидной части (ген *lp_0755 L. plantarum* WCFS1) [90]. Компоненты клеточной стенки бактерий могут сохранять иммуномодулирующую активность и после термической инактивации бактерий [88].

Иммуномодулирующая активность бактерий может быть обусловлена их нуклеиновыми кислотами. Такую активность демонстрировали неметилованные CpG-мотивы бифидобактерий *B. longum* NCC2705, *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, связывающиеся с TLR9 [91]; олигонуклеотиды штамма *L. casei* ATCC 27092, в частности TTTTGCCG, также взаимодействующие с TLR9 [92]; тотальная РНК и геномная ДНК фагоцитированных клеток *L. gasseri* OLL2809 [93].

Иммуномодулирующая активность показана не только для отдельных метаболитов и компонентов клеток потенциальных бактерий-пробиотиков, но и для внеклеточных везикул – секретируемых наноразмерных мембранных структур, содержащих различные молекулы и фрагменты структурных компонентов бактериальной клетки [94]. Так, внеклеточные везикулы штамма *L. plantarum* WCFS1 усиливали иммунный ответ при инфекции энтерококками на моделях нематоды и культуры клеток человека [95].

Данные об активных компонентах бактерий – потенциальных пробиотиков разрозненны и часто неполны. Однако они свидетельствуют о том, что активные компоненты бактериальных клеток многочисленны и разнообразны, при этом основными являются секретируемые белки/пептиды и компоненты клеточных стенок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клинические исследования на небольших выборках свидетельствуют о том, что пробиотики способны достоверно снижать проявление признаков депрессии по сравнению с плацебо. Такая активность свойственна только определенным штаммам пробиотиков, обычно это виды лактобацилл и бифидобактерий. Действие пробиотиков различно в зависимости от используемого штамма и специфики исследуемой группы людей и наиболее выражено в группах с диагностированным заболеванием депрессией. Однако это предварительные данные, требующие проверки на больших выборках. Зарегистрированных препаратов такого типа на рынке нет.

Активные компоненты пробиотиков, определяющие их антидепрессивное действие, изучены крайне мало. Компоненты, определяющие их иммуномодулирующие свойства, исследованы в большей степени, однако эти сведения разрозненны и крайне фрагментарны. Основными активными компонентами являются секретируемые белки/пептиды и компоненты клеточных стенок. Разнообразие активных метаболитов, их мишеней и механизмов действия свидетельствует о большом потенциале метабиотиков как лекарственных средств, в том числе и для профилактики и лечения депрессии. Эти же данные позволяют предполагать, что свойства конкретного пробиотического штамма определяются не одним типом молекул, а их совокупностью. Идентификация белков/генов, определяющих продукцию активных метаболитов, может быть использована для поиска штаммов бактерий с нужными свойствами; есть примеры такого отбора штаммов. Так, штаммы *L. plantarum* и *B. adolescentis* – продуценты значительных количеств ГАМК были успешно использованы для снижения симптомов депрессии у мышей [56].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 20-14-00132.

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. Gilbert J.A., Blaser M.J., Caporaso J.G. et al. Current understanding of the human microbiome // Nat. Med. 2018. V. 24. P. 392–400. <https://doi.org/10.1038/nm.4517>
2. Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota // Biochem. J. 2017. V. 474. P. 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
3. Delgado S., Sánchez B., Margolles A. et al. Molecules produced by probiotics and intestinal microorganisms with immunomodulatory activity // Nutrients. 2020. V. 12. № 2. e391. <https://doi.org/10.3390/nu12020391>
4. Олескин А.В., Шендеров Б.А., Роговский В.С. Социальность микроорганизмов и взаимоотношения в системе микробиота–хозяин: роль нейромедиаторов. М.: Изд-во МГУ, 2020. 284 с.
5. Ding R.X., Goh W.R., Wu R.N. et al. Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease // J. Food Drug. Anal. 2019. V. 27. № 3. P. 623–631. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.012>
6. Шендеров Б.А., Голубев В.Л., Данилов А.Б., Прищепа А.В. Кишечная микробиота человека и нейродегенеративные заболевания // Поликлиника. 2016. № 1-1. С. 7–13.
7. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Probiotics and prebiotics. 2017. <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english#Ref001>.
8. Novik G., Savich V. Beneficial microbiota. Probiotics and pharmaceutical products in functional nutrition and medicine // Microbes Infect. 2020. V. 22. № 1. P. 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.06.004>
9. Logan A.C., Katzman M. Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy // Med. Hypotheses. 2005. V. 64. № 3. P. 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.08.019>
10. Dinan T.G., Stanton C., Cryan J.F. Psychobiotics: A novel class of psychotropic // Biol. Psychiatry. 2013. V. 74. № 10. P. 720–726. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001>
11. Oleskin A.V., Shenderov B.A. Probiotics and psychobiotics: The role of microbial neurochemicals // Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2019. V. 11. № 4. P. 1071–1085. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09583-0>
12. Lou De Santis G., Kavvadia M., Abd Almajeed Abbaas Alwardat N. et al. Psychobiotics as integrative therapy for neuropsychiatric disorders with special emphasis on the microbiota-gut-brain axis // Biomedicine & Prevention Issues. 2017. V. 2. e111. <https://doi.org/10.19252/000000006F>
13. Cheng L.H., Liu Y.W., Wu C.C. et al. Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders // J. Food. Drug. Anal. 2019. V. 27. № 3. P. 632–648. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.002>
14. Marsova M., Poluektova E., Odorskaya M. et al. Protective effects of *Lactobacillus fermentum* U-21 against paraquat-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* and mouse models // World. J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 36. e104. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02879-2>

15. *Smith K.* Mental health: a world of depression // *Nature*. 2014. V. 515(7526) P. 180–181.
<https://doi.org/10.1038/515180a>
16. *Carlessi A.S., Borba L.A., Zugno A.I. et al.* Gut microbiota-brain axis in depression: the role of neuroinflammation // *Eur. J. Neurosci.* 2019. V. 53. P. 231–235.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14631>
17. *Cipriani A., Furukawa T.A., Salanti G. et al.* Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: A systematic review and network meta-analysis // *Lancet*. 2018. V. 391(10128). P. 1357–1366.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32802-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32802-7)
18. *De Melo Pereira G.V., de Oliveira Coelho B., Magalhães Júnior A.I.* How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. P. 2060–2076.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
19. *Yong S.J., Tong T., Chew J., Lim W.L.* Antidepressive mechanisms of probiotics and their therapeutic potential // *Front. Neurosci.* 2020. V. 13. e1361.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01361>
20. *Stenman L.K., Patterson E., Meunier J. et al.* Strain specific stress-modulating effects of candidate probiotics: A systematic screening in a mouse model of chronic restraint stress // *Behav. Brain. Res.* 2020. V. 379. e112376.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112376>
21. *Kelly J.R., Allen A.P., Temko A. et al.* Lost in translation? The potential psychobiotic *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) fails to modulate stress or cognitive performance in healthy male subjects // *Brain. Behav. Immun.* 2017. V. 61. P. 50–59.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.018>
22. *Rao A.V., Basted A.C., Beaulne T.M. et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome // *Gut Pathog.* 2009. V. 1. № 1. e6.
<https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-6>
23. *Allen A.P., Hutch W., Borre Y.E. et al.* *Bifidobacterium longum* 1714 as a translational psychobiotic: modulation of stress, electrophysiology and neurocognition in healthy volunteers // *Transl. Psychiatry*. 2016. V. 6. e939.
<https://doi.org/10.1038/tp.2016.191>
24. *Sawada D., Kawai T., Nishida K. et al.* Daily intake of *Lactobacillus gasseri* CP2305 improves mental, physical, and sleep quality among Japanese medical students enrolled in a cadaver dissection course // *J. Funct. Foods*. 2017. V. 31. P. 188–197.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.042>
25. *Sanchez M., Darimont C., Panahi S. et al.* Effects of a diet-based weight-reducing program with probiotic supplementation on satiety efficiency, eating behaviour traits, and psychosocial behaviours in obese individuals // *Nutrients*. 2017. V. 9. № 3. e284.
<https://doi.org/10.3390/nu9030284>
26. *Pinto-Sanchez M.I., Hall G.B., Ghajar K. et al.* Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: A pilot study in patients with irritable bowel syndrome // *Gastroenterology*. 2017. V. 153. № 2. P. 448–459. e8.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.003>
27. *Majeed M., Nagabhushanam K., Arumugam S. et al.* *Bacillus coagulans* MTCC 5856 for the management of major depression with irritable bowel syndrome: A randomised, double-blind, placebo controlled, multi-centre, pilot clinical study // *Food. Nutr. Res.* 2018. V. 62.
<https://doi.org/10.29219/fnr.v62.1218>
28. *Miyaoka T., Kanayama M., Wake R. et al.* *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 as adjunctive therapy for treatment-resistant major depressive disorder: A prospective open-label trial // *Clin. Neuropharmacol.* 2018. V. 41. № 5. P. 151–155.
<https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000299>
29. *Chong H.X., Yusoff N.A.A., Hor Y.Y. et al.* *Lactobacillus plantarum* DR7 alleviates stress and anxiety in adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled study // *Benef. Microbes*. 2019. V. 10. № 4. P. 355–373.
<https://doi.org/10.3920/BM2018.0135>
30. *Lew L.C., Hor Y.Y., Yusoff N.A.A. et al.* Probiotic *Lactobacillus plantarum* P8 alleviated stress and anxiety while enhancing memory and cognition in stressed adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled study // *Clin. Nutr.* 2019. V. 38. № 5. P. 2053–2064.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.09.010>
31. *Messaoudi M., Lalonde R., Violle N. et al.* Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects // *Br. J. Nutr.* 2011. V. 105. № 5. P. 755–764.
<https://doi.org/10.1017/S0007114510004319>
32. *Messaoudi M., Violle N., Bisson J.F. et al.* Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers // *Gut Microbes*. 2011. V. 2. № 4. P. 256–261.
<https://doi.org/10.4161/gmic.2.4.16108>
33. *Mohammadi A.A., Jazayeri S., Khosravi-Darani K. et al.* The effects of probiotics on mental health and hypothalamic–pituitary–adrenal axis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in petrochemical workers // *Nutr. Neurosci.* 2016. V. 19. № 9. P. 387–395.
<https://doi.org/10.1179/1476830515Y.0000000023>
34. *Akkasheh G., Kashani-Poor Z., Tajabadi-Ebrahimi M. et al.* Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Nutrition*. 2016. V. 32. № 3. P. 315–320.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.09.003>
35. *Kazemi A., Noorbala A.A., Azam K. et al.* Effect of probiotic and prebiotic vs placebo on psychological outcomes in patients with major depressive disorder: A randomized clinical trial et al. Effect of probiotic and prebiotic vs placebo on psychological outcomes in patients with major depressive disorder: a randomized clinical trial // *Clin. Nutr.* 2018. V. 38. № 2. P. 522–528.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.04.010>
36. *Ghorbani Z., Nazari S., Etesam F. et al.* The effect of synbiotic as an adjuvant therapy to fluoxetine in moderate depression: A randomized multicenter trial //

- Arch. Neurosci. 2018. V. 5. e60507.
https://doi.org/10.5812/archneurosci.60507
37. Haghighat N., Rajabi S., Mohammadshahi M. Effect of synbiotic and probiotic supplementation on serum brain-derived neurotrophic factor level, depression and anxiety symptoms in hemodialysis patients: A randomized, double-blinded, clinical trial // Nutr. Neurosci. 2019. V. 4. P. 1–10.
https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1646975
 38. Venkataraman R., Madempudi R.S., Neelamraju J. et al. Effect of multi-strain probiotic formulation on students facing examination stress: A double-blind, placebo-controlled study // Probiotics Antimicrob. Prot. 2020.
https://doi.org/10.1007/s12602-020-09681-4
 39. Takada M., Nishida K., Kataoka-Kato A. et al. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models // Neurogastroenterol. Motil. 2016. V. 28. № 7. P. 1027–1036.
https://doi.org/10.1111/nmo.12804
 40. Romijn A.R., Rucklidge J.J., Kuijter R.G., Frampton C. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* for the symptoms of depression // Aust. N. Z. J. Psychiatry. 2017. V. 51. № 8. P. 810–821.
https://doi.org/10.1177/0004867416686694
 41. Wallace C.J.K., Foster J.A., Soares C.N., Milev R.V. The effects of probiotics on symptoms of depression: Protocol for a double-blind randomized placebo-controlled trial // Neuropsychobiology. 2020. V. 79. № 1. P. 108–116.
https://doi.org/10.1159/000496406
 42. Goh K.K., Liu Y.-W., Kuo P.-H. et al. Effect of probiotics on depressive symptoms: a meta-analysis of human studies // Psychiatry Res. 2019. V. 282. e112568.
https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.112568
 43. Liu R.T., Walsh R.F.L., Sheehan A.E. Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials // Neurosci. Biobehav. Rev. 2019. V. 102. P. 13–23.
https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.03.023
 44. Chao L., Liu C., Suthawongwadee S. et al. Effects of probiotics on depressive or anxiety variables in healthy participants under stress conditions or with a depressive or anxiety // Front. Neurol. 2020. V. 11. e421.
https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00421
 45. Noonan S., Zaveri M., Macaninch E., Martyn K. Food & mood: A review of supplementary prebiotic and probiotic interventions in the treatment of anxiety and depression in adults // BMJ Nutrition, Prevention & Health. 2020. bmjnph-2019-000053.
https://doi.org/10.1136/bmjnp-2019-000053
 46. Amirani E., Milajerdi A., Mirzaei H. et al. The effects of probiotic supplementation on mental health, biomarkers of inflammation and oxidative stress in patients with psychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // Complement. Ther. Med. 2020. V. 49. e102361.
https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102361
 47. Sanada K., Nakajima S., Kurokawa S. et al. Gut microbiota and major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis // J. Affect. Disord. 2020. V. 266. P. 1–13.
https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.01.102
 48. Shenderov B.A. Metabiotics: Novel idea or natural development of probiotic conception // Microb. Ecol. Health Dis. 2013. V. 24.
https://doi.org/10.3402/mehd.v24i0.20399
 49. Олескин А.В., Шендеров Б.А. Пробиотики, психобиотики и метаббиотики: проблемы и перспективы // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2020. Т. 2. № 3. С. 233–243.
https://doi.org/10.36425/rehab25811
 50. Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: microbial endocrinology in the design and use of probiotics // Bioessays. 2011. V. 33. № 8. P. 574–581.
https://doi.org/10.1002/bies.201100024
 51. Oleskin A., Zhilenkova O., Shenderov B. et al. Lactic-acid bacteria supplement fermented dairy products with human behavior-modifying neuroactive compounds // J. Pharm. Nutr. Sci. 2014. V. 4. P. 199–206.
https://doi.org/10.6000/1927-5951.2014.04.03.5
 52. Yunes R.A., Poluektova E.U., Dyachkova M.S. et al. GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota // Anaerobe. 2016. V. 42. P. 197–204.
https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.011
 53. Аверина О.В., Даниленко В.Н. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы // Микробиология. 2017. Т. 86. № 1. С. 5–24.
https://doi.org/10.7868/S0026365617010050
 54. Oleskin A.V., Shenderov B.A., Rogovsky V.S. Role of neurochemicals in the interaction between the microbiota and the immune and the nervous system of the host organism // Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2017. V. 9. № 3. P. 215–234.
https://doi.org/10.1007/s12602-017-9262-1
 55. Ko C.Y., Lin H.-T.V., Tsai G.J. Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model // Progress Biochem. 2013. V. 48. № 4. P. 559–568.
https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.021
 56. Yunes R.A., Poluektova E.U., Vasileva E.V. et al. A multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2020. V. 12. № 3. P. 973–979.
https://doi.org/10.1007/s12602-019-09601-1
 57. Yu L., Han X., Cen S. et al. Beneficial effect of GABA-rich fermented milk on insomnia involving regulation of gut microbiota // Microbiol. Res. 2020. V. 233. e126409.
https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126409
 58. Díez-Gutiérrez L., San Vicente L., Barrón L.J.R. et al. Gamma-aminobutyric acid and probiotics: multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market // J. Funct. Foods. 2020. V. 64. e103669.
https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103669

59. Marin I.A., Goertz J.E., Ren T. et al. Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 43859. <https://doi.org/10.1038/srep43859>
60. Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative stress // Ann. Rev. Biochem. 2017. V. 86. № 1. P. 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
61. Zhao Z.X., Fu J., Ma S.R. et al. Gut-brain axis metabolic pathway regulates antidepressant efficacy of aliflorin // Theranostics. 2018. V. 8. № 21. P. 5945–5959. <https://doi.org/10.7150/thno.28068>
62. Peirce J.M., Alviña K. The role of inflammation and the gut microbiome in depression and anxiety // J. Neurosci. Res. 2019. V. 10. P. 1223–1241. <https://doi.org/10.1002/jnr.24476>
63. Dhaliwal J., Singh D.P., Singh S. et al. *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 supplementation protects from chronic unpredictable and sleep deprivation-induced behaviour, biochemical and selected gut microbial aberrations in mice // J. Appl. Microbiol. 2018. V. 125. P. 257–269. <https://doi.org/10.1111/jam.13765>
64. Hao Z., Wang W., Guo R., Liu H. *Faecalibacterium prausnitzii* (ATCC 27766) has preventive and therapeutic effects on chronic unpredictable mild stress-induced depression-like and anxiety-like behavior in rats // Psychoneuroendocrinology. 2019. V. 104. P. 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.02.025>
65. Liu R.T., Walsh R.F.L., Sheehan A.E. Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials // Neurosci. Biobehav. Rev. 2019. V. 102. P. 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.03.023>
66. Vital M., Howe A.C., Tiedje J.M. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data // mBio. 2014. V. 5. № 2. e00889–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00889-14>
67. Reichardt N., Duncan S., Young P. et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota // ISME J. 2014. V. 8. P. 1323–1335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.14>
68. Quevrain E., Maubert M.A., Michon C. et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease // Gut. 2016. V. 65. P. 415–425. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307649>
69. Al-Hassi H.O., Mann E.R., Sanchez B. et al. Altered human gut dendritic cell properties in ulcerative colitis are reversed by *Lactobacillus plantarum* extracellular encrypted peptide STp // Mol. Nutr. Food. Res. 2014. V. 58. № 5. P. 1132–1143. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300596>
70. Yan F., Cao H., Cover T.L. et al. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth // Gastroenterology. 2007. V. 132. № 2. P. 562–575. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.022>
71. Yan F., Polk D.B. Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases // Gut Microbes. 2012. V. 3. № 1. P. 25–28. <https://doi.org/10.4161/gmic.19245>
72. Rangan K.J., Pedicord V.A., Wang Y.C. et al. A secreted bacterial peptidoglycan hydrolase enhances tolerance to enteric pathogens // Science. 2016. V. 353. P. 1434–1437. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3552>
73. Kim B., Wang Y.-C., Hespen C.W. et al. *Enterococcus faecium* secreted antigen A generates muropeptides to enhance host immunity and limit bacterial pathogenesis // eLife. 2019. V. 8. e45343. <https://doi.org/10.7554/eLife.45343>
74. Gao J., Li Y., Wan Y. et al. A novel postbiotic from *Lactobacillus rhamnosus* GG with a beneficial effect on intestinal barrier function // Front. Microbiol. 2019. V. 10. e477. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00477>
75. Plovier H., Everard A., Druart C. et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice // Nat. Med. 2017. V. 23. № 1. P. 107–113. <https://doi.org/10.1038/nm.4236>
76. von Schillde M.A., Hörmannspurger G., Weiher M. et al. Lactocypin secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines // Cell Host Microbe. 2012. V. 11. № 4. P. 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.02.006>
77. Alessandri G., Ossiprandi M.C., MacSharry J. et al. Bifidobacterial dialogue with Its human host and consequent modulation of the immune system // Front. Immunol. 2019. V. 10. e2348. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02348>
78. McCarville J.L., Dong J., Caminero A. et al. A commensal *Bifidobacterium longum* strain prevents gluten-related immunopathology in mice through expression of a serine protease inhibitor // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. № 19. e01323–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01323-17>
79. Bajić S.S., Đokić J., Dinić M. et al. GABA potentiate the immunoregulatory effects of *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 via ATG5-dependent autophagy in vitro // Sci. Rep. 2020. V. 10. e1347. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58177-2>
80. Gao C., Major A., Rendon D. et al. Histamine H2 receptor-mediated suppression of intestinal inflammation by probiotic *Lactobacillus reuteri* // mBio. 2015. V. 6. № 6. e01358–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01358-15>
81. Ganesh B.P., Hall A., Ayyaswamy S. et al. Diacylglycerol kinase synthesized by commensal *Lactobacillus reuteri* diminishes protein kinase C phosphorylation and histamine-mediated signaling in the mammalian intestinal epithelium // Mucosal Immunol. 2018. V. 11. № 2. P. 380–393. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.58>
82. Saadat Y.R., Khosroushahi A.Y., Gargari B.P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides // Carbohydr. Polym. 2019. V. 217. P. 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>

83. Chen Y.-C., Wu Y.-J., Hu C.-Y. Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 133. P. 575–582.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.109>
84. Gorska S., Hermanova P., Ciekot J. et al. Chemical characterization and immunomodulatory properties of polysaccharides isolated from probiotic *Lactobacillus casei* LOCK 0919 // *Glycobiology*. 2017. V. 27. P. 275–277.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cww047>
85. Jeong D., Kim D.-H., Kang I.-B. et al. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir // *Food Control*. 2017. V. 78. P. 436–442.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.033>
86. Deo D., Davray D., Kulkarni R. A diverse repertoire of exopolysaccharide biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus* revealed by comparative analysis in 106 sequenced genomes // *Microorganisms*. 2019. V. 7. № 10. e444.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7100444>
87. Wang S., Ahmadi S., Nagpal R. et al. Lipoteichoic acid from the cell wall of a heat killed *Lactobacillus paracasei* D3-5 ameliorates aging-related leaky gut, inflammation and improves physical and cognitive functions: From *C. elegans* to mice // *Geroscience*. 2019. V. 42. № 1. P. 333–352.
<https://doi.org/10.1007/s11357-019-00137-4>
88. Kim Y., Park J.Y., Kim H., Chung D.K. Differential role of lipoteichoic acids isolated from *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus plantarum* on the aggravation and alleviation of atopic dermatitis // *Microb. Pathogen.* 2020. V. 147. e104360.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104360>
89. Nguyen M.T., Matsuo M., Niemann S. et al. Lipoproteins in gram-positive bacteria: abundance, function, fitness // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. e582582.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582582>
90. Lee I.C., van Swam I.I., Boeren S. et al. Lipoproteins contribute to the anti-inflammatory capacity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. e1822.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01822>
91. Menard O., Gafa V., Kapel N. et al. Characterization of immunostimulatory CpG-rich sequences from different *Bifidobacterium* species // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 2846–2855.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01714-09>
92. Hiramatsu Y., Satho T., Hyakutake M. et al. The anti-inflammatory effects of a high-frequency oligodeoxynucleotide from the genomic DNA of *Lactobacillus casei* // *Int. Immunopharmacol.* 2014. V. 23. № 1. P. 139–147.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.013>
93. Onishi K., Mochizuki J., Sato A. et al. Total RNA and genomic DNA of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 induce interleukin-12 production in the mouse macrophage cell line J774.1 via toll-like receptors 7 and 9 // *BMC Microbiol.* 2020. V. 20. e217.
<https://doi.org/10.1186/s12866-020-01900-w>
94. Шендеров Б.А., Синица А.В., Захарченко М.М., Ткаченко Е.И. Внеклеточные везикулы (экзосомы) и их роль в биологии бактерий и реализации их патогенного потенциала // *Эксперим. и клинич. гастроэнтерология*. 2020. Т. 179. № 7. С. 118–130.
<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130>
95. Li M., Lee K., Hsu M. et al. *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci // *BMC Microbiol.* 2017. V. 17. e66.
<https://doi.org/10.1186/s12866-017-0977-7>

Probiotic Bacteria in the Correction of Depression Symptoms, Their Active Genes and Proteins

E. U. Poluektova^{a,*} and V. N. Danilenko^a

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

*e-mail: epolu@vigg.ru

Probiotic bacteria are widely used to prevent and treat inflammatory diseases of the gastrointestinal tract due to their immunostimulating effects. In the last decade, many studies corroborated the hidden potential of probiotics in alleviating the symptoms of neurodegenerative and mental diseases. This review summarizes briefly the data on clinical studies of probiotics touted as potential antidepressants and focuses on genes and proteins accounting for the antidepressive effects. Preliminary results of small sample placebo-controlled studies indicate that certain strains of bacteria can significantly reduce symptoms of depression. Furthermore, the effects of probiotics is especially pronounced in groups of patients with a confirmed diagnosis of depression. Information concerning the genes and proteins of bacteria that account for the activity of probiotics is far from conclusive. Nevertheless, the identification of such bacterial products emphasizes the great potential of metabiotics. Secreted proteins, peptides and cell wall components are more likely to be involved in the communication with the host organism than other parts of the cell. Therefore, narrowing down the search for probiotics with specific and unique properties to these proteins and cell wall components can prove effective.

Keywords: probiotic, psychobiotics, metabiotics, genes, proteins, depression.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.2.0

КОМПОНЕНТЫ ВНУТРИРОДОВОЙ ДИНАМИКИ РАЗМЕРА ГЕНОМА У РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

© 2021 г. А. М. Бутанаев*

*Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований”,
Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук,
Московская область, Пушкино, 142290 Россия*

**e-mail: boutanaev@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.09.2020 г.

После доработки 19.01.2021 г.

Принята к публикации 04.02.2021 г.

Настоящее исследование посвящено динамике размера генома в процессе эволюции видов растений и животных, принадлежащих к одному роду. В масштабе таксономических категорий царств растений и животных размер генома видов имеет тенденцию к снижению, т.е. виды с небольшим геномом существенно преобладают. Однако внутри родов, как растений, так и животных, размер генома может увеличиваться, уменьшаться или оставаться относительно стабильным на протяжении всего времени эволюции рода. Эти три варианта составляют базовые компоненты внутриродовой динамики размера генома. Помимо простой динамики, состоящей из одной компоненты, существует сложная составная динамика размера генома, включающая две или даже три базовые компоненты. Динамика диплоидов и полиплоидов внутри родов растений может существенно различаться, что отражает действие разных эволюционных факторов. Причины смены базовой компоненты в случае сложной динамики не вполне понятны, однако одной из них может быть глобальное похолодание, начавшееся три миллиона лет назад.

Ключевые слова: внутриродовая динамика размера генома, компоненты динамики размера генома, эволюция генома.

DOI: 10.31857/S0016675821080038

Размер генома (РГ) — фундаментальный признак, являющийся точкой приложения эволюционных факторов и играющий важную роль в эволюции и адаптации видов растений и животных. Основной вклад в увеличение количества ДНК вносят полиплоидия и мобильные генетические элементы [1–4], а ее потеря связана с механизмами рекомбинации и репарации (см., например, [5]). Возможный вклад в изменение РГ небольших вставок и делеций обсуждается в [6, 7]. В настоящее время известно достаточно много корреляций между размером генома и факторами внешней среды, а также биохимическими и структурными внутриклеточными параметрами у растений и животных (см., например, [8–15]). На РГ могут влиять такие многофакторные признаки как уровень сложности индивидуального развития [16], возрастающая сложность организации в процессе эволюции [17] и интенсивность метаболизма [18] у животных, а также листовая стратегия (leaf strategy) [19]. Листовая стратегия подразумевает время жизни листа и отношение масса/поверхность. В смешанной группе покрытосеменных и голосеменных растений присутствует слабая корреляция между РГ и параметрами листовой стратегии,

однако в отдельных группах тех и других корреляция отсутствует. Известна также ассоциация РГ и жизненного цикла у растений [14]. Снижение функциональной эффективности (интенсивность функций на 1 пг ДНК) у покрытосеменных с одновременным увеличением содержания ДНК может быть связано с изменением климата в сторону более жестких условий [20]. В отдельных случаях изменение РГ совпадает с классификацией таксонов растений и может использоваться в их систематике [21, 22]. Тот факт, что селективное давление влияет на РГ вида, подтвержден в многочисленных работах и не вызывает сомнения. Однако в нашем недавнем исследовании внутриродовой динамики РГ у диплоидных семенных растений приведены доказательства того, что естественный отбор, по видимому, играет значительно меньшую роль в эволюции этого признака, в отличие от того, как это принято считать [23]. Была показана линейность динамики РГ на протяжении миллионов лет эволюции многих родов растений. Такая линейность не предполагает существенного влияния отбора, так как маловероятно, что факторы внешней среды, действуя одно направленно в сторону уменьшения или увеличения РГ, остава-

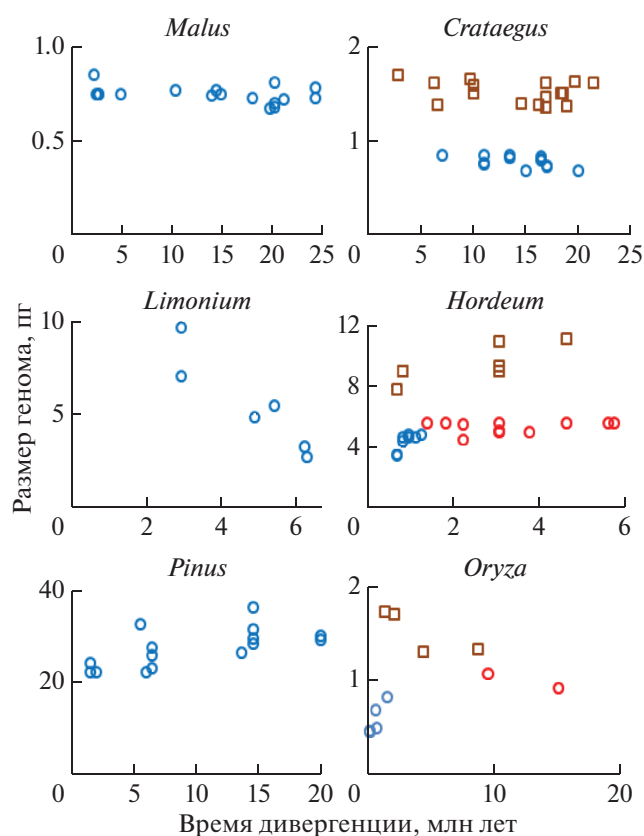


Рис. 1. Примеры внутриродовой динамики размера генома у растений. Представлены рода *Malus*, *Limonium*, *Pinus* и *Crataegus* с простыми базовыми компонентами у диплоидов (круги синего цвета) и рода *Hordeum* и *Oryza* со сложной двухкомпонентной динамикой. Разные компоненты у диплоидов показаны синими и красными кругами. Представлены также примеры динамики РГ у тетраплоидов *Hordeum* и *Oryza* (коричневые квадраты).

лись бы неизменными на протяжении всей эволюции рода. Существуют, по меньшей мере, две интерпретации такой внутриродовой динамики РГ [23]. Одна из них утверждает, что отбор действует только на его значительные изменения, в то время как небольшие вставки и делеции ДНК не влияют на его эволюцию, что приводит к преобладанию действия внутриклеточных факторов, таких как система ферментов метаболизма ДНК [24]. Другая интерпретация основана на концепции динамического хаоса в эволюции РГ. В этом случае постулируется эволюционная положительная обратная связь между изменением РГ в ту или иную сторону и действием отбора опять же на ферменты метаболизма ДНК, которые, в том числе, отвечают за рекомбинацию и дупликацию [25].

Механизмы эволюции РГ внутри родов растений и животных, определяющие линейную динамику, в значительной степени не известны, и требуется еще немало исследований как самой динамики РГ, так и определяющих ее факторов.

БАЗЫ ДАННЫХ И КОМПЬЮТЕРНОЕ ПРОГРАММИРОВАНИЕ

Величины размера генома растений (количество ДНК в пикограммах) получены из базы данных “C-value database” (Royal Botanic Gardens, Kew, UK.; <http://data.kew.org/cvalues>) [26]. Данные по размеру генома видов млекопитающих, птиц и земноводных получены из базы данных “Animal genome size database” (<http://www.genomesize.com>) [27]. Компьютерная программа для обработки текстовой информации баз данных была создана ранее [23]. Программа извлекает необходимую информацию и приписывает РГ каждого вида соответствующему роду и семейству.

ВРЕМЕНА ДИВЕРГЕНЦИИ ВИДОВ И СТАТИСТИКА

Для вычисления времен дивергенции видов использовали опубликованные калиброванные филогенетические деревья для растений [28–34] и животных: млекопитающих [35–40], птиц [41–43] и земноводных [44–47]. В основном филогенетические деревья публикуются в виде графических образов без времен дивергенции, поэтому прямое измерение длины ветвей дерева — единственный способ их нахождения. Подробно вычисление времен дивергенции видов на основе графических образов дендрограмм описано в [23].

Корреляционный анализ, регрессионный анализ и статистические критерии были выполнены с использованием программы SPSS Statistics 17.0.

ДИНАМИКА РАЗМЕРА ГЕНОМА У ДИПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ

В нашей предыдущей работе была обнаружена сильная корреляция Пирсона между временем дивергенции видов (эволюционным возрастом) и размером генома внутри родов диплоидных семенных растений. Линейность зависимости была подтверждена регрессионным анализом [23]. Обнаруженная прямая и обратная корреляция отражает, соответственно, линейное уменьшение или увеличение РГ в зависимости от времени дивергенции. Эта линейная зависимость сохранялась в течение миллионов лет, что подразумевает постепенное увеличение или уменьшение РГ в процессе эволюции видов, принадлежащих к одному и тому же роду. В некоторых родах корреляция отсутствовала, что предполагает относительно стабильный РГ. Эти три характеристики, т.е. относительно стабильное количество ДНК, ее накопление или потеря, представляют собой основные базовые компоненты внутриродовой динамики РГ (рис. 1; диплоиды родов *Malus*, *Limonium* и *Pinus*).

В настоящем исследовании применен такой же методологический подход с вовлечением других

Таблица 1. Зависимость размера генома от времени дивергенции видов внутри родов растений и животных

Семейство	Род	Плоидность	Компонента динамики РГ	r	p	R^2	p	Виды	
								в анализе	исключенные
Растения									
Rosaceae	<i>Malus</i>	2 <i>n</i>	рис. 1, син.	−0.40	0.05	0.16	0.06	17	0
Rosaceae	<i>Crataegus</i>	2 <i>n</i>	рис. 1, син.	−0.56	0.02	0.31	0.04	13	0
Rosaceae	<i>Crataegus</i>	4 <i>n</i>	рис. 1, кор.	−0.23	0.39	0.05	0.11	16	0
Plumbaginaceae	<i>Limonium</i>	2 <i>n</i>	рис. 1, син.	−0.92	0.005	0.85	0.01	6	0
Pinaceae	<i>Pinus</i>	2 <i>n</i>	рис. 1, син.	0.65	0.004	0.42	0.01	15	0
Poaceae	<i>Hordeum</i>	2 <i>n</i>	рис. 2, кр.	0.40	0.22	0.16	0.30	11	0
Poaceae	<i>Hordeum</i>	2 <i>n</i>	рис. 2, син.	0.42	0.004	0.18	0.30	8	0
Poaceae	<i>Hordeum</i>	4 <i>n</i>	рис. 1, кор.	0.79	0.03	0.62	0.03	7	0
Poaceae	<i>Oryza</i>	2 <i>n</i>	рис. 1, син.	0.87	0.04	0.76	0.06	5	0
Amaryllidaceae	<i>Allium</i>	2 <i>n</i>	рис. 2, кр.	0.89	0.03	0.79	0.04	5	0
Amaryllidaceae	<i>Allium</i>	2 <i>n</i>	рис. 2, син.	0.15	0.64	0.02	0.62	12	0
Amaryllidaceae	<i>Allium</i>	2 <i>n</i>	рис. 2, зел.	−0.25	0.46	0.06	0.44	11	0
Caryophyllaceae	<i>Schiedea</i>	2 <i>n</i>	рис. 2, син.	0.84	0.04	0.71	0.04	5	0
Caryophyllaceae	<i>Schiedea</i>	2 <i>n</i>	рис. 2, зел.	0.43	0.04	0.18	0.07	18	0
Животные									
Млекопитающие									
Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	2 <i>n</i>	рис. 3, кр.	−0.93	3×10^{-5}	0.86	9×10^{-4}	11	0
Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	2 <i>n</i>	рис. 3, син.	0.77	2×10^{-4}	0.59	0.001	17	0
Macropodidae	<i>Macropus</i>	2 <i>n</i>	рис. 3, син.	−0.67	0.04	0.45	0.04	5	1
Птицы									
Turdidae	<i>Turdus</i>	2 <i>n</i>	рис. 3, син.	−0.81	0.03	0.65	0.02	7	0
Gruidae	<i>Grus</i>	2 <i>n</i>	рис. 3, син.	−0.03	0.93	10^{-5}	0.06	10	0
Cisticolidae	<i>Cisticola</i>	2 <i>n</i>	рис. 3, син.	−0.34	0.58	0.12	0.57	5	0
Psittacidae	<i>Amazona</i>	2 <i>n</i>	рис. 3, син.	−0.31	0.38	0.10	0.60	10	0
Земноводные									
Plethodontidae	<i>Bolitoglossa</i>	2 <i>n</i>	рис. 3, син.	−0.49	0.03	0.24	0.04	16	0
Plethodontidae	<i>Pseudoeurycea</i>	2 <i>n</i>	рис. 3, син.	0.95	0.01	0.91	0.01	5	1
Plethodontidae	<i>Plethodon</i>	2 <i>n</i>	рис. 3, син.	0.75	0.02	0.56	0.02	9	3

Примечание. Представлены результаты корреляционного и регрессионного анализа. Значения коэффициентов корреляции (r) и коэффициентов детерминации (R^2) с их уровнями значимости (p) показаны для родов, у которых число видов с доступными данными РГ и времени дивергенции 5 и более, что позволяет достаточно надежную статистическую обработку. Столбец “Компонента динамики РГ” указывает на соответствующий график или часть графика на рис. 1–3. Сокращения кор., кр., зел. и син. соответствуют коричневому (тетраплоиды), красному, зеленому и синему (все диплоиды) цвету точек на графиках.

видов растений, а также видов животных с целью обобщения полученной информации. Результаты (коэффициенты корреляции и коэффициенты детерминации линейной регрессии), подтверждающие сильную корреляцию между РГ и временем дивергенции видов внутри родов, а также линейный характер этой зависимости, представлены в табл. 1. Из 17 базовых компонент динамики РГ со статистически значимой корреляцией (17 родов растений и животных) линейная зависимость не подтверждена лишь для трех. Это отно-

сится к родам *Hordeum*, *Oryza* (рис. 1, синий цвет) и *Schiedea* (рис. 2, зеленый).

Необходимо отметить, что не все рода имеют достаточное количество видов для статистической обработки данных (см., например, род *Oryza* на рис. 1, красная компонента РГ). Тем не менее статистически достоверные результаты нашего предыдущего исследования, касающегося динамики РГ многих родов диплоидных семенных растений [23], а также результаты настоящей работы (табл. 1) позволяют их экстраполировать и

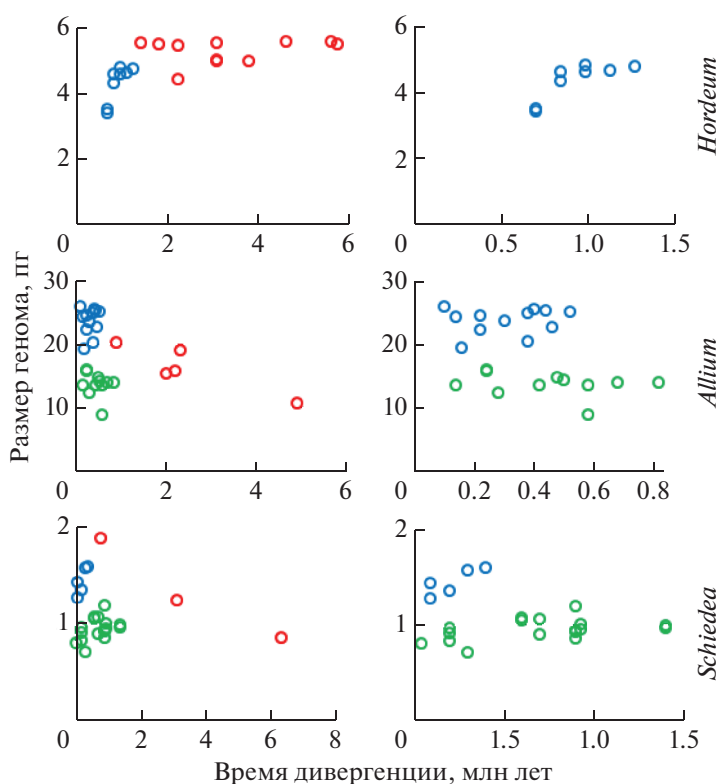


Рис. 2. Сложная многокомпонентная динамика РГ у диплоидов родов *Hordeum*, *Allium* и *Schiedea*. Разные компоненты показаны красным, синим и зеленым цветом. В родах *Allium* и *Schiedea* РГ дивергирует.

на большинство малочисленных родов как растений, так и животных.

Помимо основных базовых компонент РГ-динамики в родах растений существуют более сложные составные типы, как это показано на рис. 1. Например, у диплоидных видов *Oryza* (рис. 1) и *Hordeum* (рис. 1, 2) внутриродовая динамика РГ сложная, состоящая из двух базовых компонент: относительно стабильного и уменьшающегося РГ (соответственно красные и синие круги). Внутри рода *Allium* (Amaryllidaceae) динамика даже более сложная. Вслед за увеличением РГ у видов *Allium* в течение около 4.0 млн лет (рис. 2, средний ряд, красный цвет) последовала их дивергенция на две группы со средними значениями РГ 13.6 ± 1.9 и 23.6 ± 2.1 (средний ряд на рис. 2, зеленый и синий цвет). Согласно критерию Стьюдента, разница между средними статистически достоверна ($p = 1.9 \times 10^{-8}$). Впоследствии, хотя диапазон колебаний групповых значений РГ существенный, что составляет 5.0 и 10.4 пг (синие и зеленые круги), внутри обеих групп РГ не проявлял тенденции к увеличению или снижению на протяжении около 800 тыс. лет эволюции (корреляция отсутствует со значениями, соответственно, $r = -0.25$ и $r = 0.15$; табл. 1).

Другой интересный пример сложной динамики РГ представляет род *Schiedea* (Caryophyllaceae). У ви-

дов этого рода РГ возрастал на протяжении 6.0 млн (рис. 2, нижний ряд, красный цвет) и затем дивергировал, как и в случае *Allium*. Поскольку распределение РГ в обеих группах дивергировавших видов *Schiedea* отличается от нормального, вместо средних величин использовались медианы (1.43 ± 0.1 и 0.95 ± 0.02 ; синий и зеленый цвет соответственно). Согласно непараметрическому критерию Краскала–Уоллиса, различие между группами достоверно ($p = 8 \times 10^{-4}$). Впоследствии РГ уменьшался в обеих группах видов, дивергировавших по этому признаку, с коэффициентами корреляции 0.84 (синий цвет) и 0.43 (зеленый) (табл. 1).

Род *Schiedea* еще интересен тем, что его филогения, биология и экология интенсивно изучались, что предоставляет возможность связать переход динамики РГ от одного типа (компоненты) к другому с изменяющимися условиями окружающей среды. Виды этого рода являются эндемиками, обитающими на вулканических Гавайских островах, сформировавшихся последовательно в виде островной цепи. Монофилетическое происхождение 32 современных видов рода *Schiedea*, 26 из которых были включены в настоящее исследование, дает возможность полагать, что все они произошли в результате единственного события колонизации цепи вулканических островов. Местообитание

большинства видов ограничено одним островом, однако пять из них встречаются более чем на одном острове [48]. Новые линии *Schiedea*, населяющие Гавайский архипелаг, могли появиться в результате переселения на более молодые острова до того, как более старые разрушались вследствие эрозии. Эволюция рода *Schiedea* включала межостровную и обратную колонизацию, а также внутриостровное видообразование [48, 49].

Дивергенция РГ в роде *Schiedea*, представленная на рис. 2, может быть связана с дивергенцией разных линий внутри рода, в частности с предпочитаемым местобитанием и системой размножения. Две группы с дивергировавшим РГ включают 5 (группа 1) и 18 (группа 2) видов, которые на рис. 2 показаны синим и зеленым цветом. Эти виды принадлежат к пяти секциям: *Schiedea* (S), *Mononeura* I (MI), *Mononeura* II (MII), *Nothoschiedea* (N), *Alphaschiedea* (Alp) и *Alsinidendron* (Als) [48]. Распределение видов по секциям представлено в табл. 2. В группе 1 четыре вида из пяти входят в секцию MI, в которой отсутствуют виды из группы 2, и один вид принадлежит к секции S. Напротив, половина членов группы 2 (9 из 18) принадлежит к этой секции (S). Виды из группы 1 также отсутствуют в секциях MII, N, Alp и Als, в то время как другая половина видов из группы 2 распределена по этим секциям.

Разные виды *Schiedea* предпочитают три разных местообитания: сухие склоны и скалы, леса с умеренной влажностью и влажные леса [49]. Распределение видов двух групп по этим местообитаниям представлено в табл. 2. Лишь один вид из пяти в группе 1 населяет сухие местообитания. Остальные 4 вида предпочитают умеренно влажные и влажные леса. Напротив, половина видов из группы 2 занимают сухие склоны и скалы.

У видов рода *Schiedea* обнаружены две системы размножения: мономорфная и диморфная [50]. Две группы видов, дивергировавших по признаку РГ, также различаются в отношении системы размножения. Большинство видов из группы 1 (4 из пяти) имеют мономорфную систему размножения, тогда как в группе 2 мономорфизм характерен для 10 видов, а остальные 8 видов имеют диморфную систему размножения.

Таким образом, наблюдается явное смещение в распределении видов в группе 1 по трем факторам: филогенетическому родству, местообитанию и системе размножения. Единственный вид, отличающийся от остальных в этой группе по всем трем признакам, — *S. mannii*. Напротив, в группе 2 виды распределены примерно поровну между сухими и влажными местообитаниями, а также между двумя системами размножения (табл. 2). Возможная ассоциация между дивергенцией РГ и различиями в местообитании и системе размножения позволяет предположить, что внешние факто-

Таблица 2. Дивергенция размера генома и возможная ассоциация с филогенией, местообитанием и системой размножения рода *Schiedea*

	Виды группы 1	Виды группы 2
Секция рода <i>Schiedea</i>		
MI	4	0
S	1	9
MIИ	0	4
Als	0	2
Alp	0	2
N	0	1
Местообитание		
Сухие склоны и скалы	1	9
Умеренно влажные леса	2	7
Влажные леса	2	2
Система размножения		
Мономорфная	4	10
Диморфная	1	8

Примечание. Виды группы 1 и группы 2 представлены на рис. 2 соответственно синим и зеленым цветом.

Таблица 3. Время изменения тенденции в динамике размера генома

Род	Время, млн лет
Растения	
<i>Allium</i>	0.5
<i>Allium</i>	0.8
<i>Hordeum</i>	1.3
<i>Schiedea</i>	0.4
<i>Schiedea</i>	1.4
<i>Oryza</i>	1.5
Животные	
<i>Myotis</i>	3.2

Примечание. Представлены временные точки смены компоненты для родов со сложной динамикой размера генома.

ры играли существенную роль в его дивергенции. Можно полагать также, что вследствие изоляции островных популяций РГ основателей разных линий был разным и что дивергенция по признаку РГ происходила в разное эволюционное время: примерно 0.4 млн (группа 1) и 1.4 млн (группа 2) (рис. 2 и табл. 3).

ДИНАМИКА РАЗМЕРА ГЕНОМА У ПОЛИПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ

Выше рассматривалась внутриродовая динамика РГ у диплоидных семенных растений, однако полиплоидные виды в этом отношении не исключение и следуют той же тенденции изменения РГ,

т.е. его увеличения, уменьшения или относительной стабильности в процессе эволюции рода. На рис. 1 (коричневые квадраты) представлена динамика РГ тетраплоидов родов *Crataegus*, *Hordeum* и *Oryza*. Можно видеть, что в случае *Crataegus* РГ тетраплоидов существенно не изменяется на протяжении 18 млн, в то время как в роде *Hordeum* РГ снижается в течение 4 млн, а в роде *Oryza* — растет в течение 7 млн. Необходимо отметить, что динамика РГ у диплоидов и полиплоидов, относящихся к одному роду, может существенно различаться. Так, у диплоидов *Crataegus* РГ увеличивается с эволюционным временем, а у тетраплоидов он стабилен (рис. 1 и табл. 1). Диплоиды *Hordeum* и *Oryza* имеют двухкомпонентную динамику, тогда как тетраплоиды этих родов соответственно редуцируют и аккумулируют ДНК (рис. 1 и табл. 1).

ДИНАМИКА РАЗМЕРА ГЕНОМА У ЖИВОТНЫХ

Внутриродовая динамика РГ у животных включает те же базовые компоненты стабильности, увеличения и уменьшения, а также сложную динамику, состоящую из более чем одной компоненты. Особенность родов животных состоит в том, что большинство из них содержит небольшое число видов, что исключает статистический анализ ассоциации между переменными времени дивергенции и РГ. Тем не менее даже в малочисленных родах явно прослеживаются те же тенденции динамики РГ, что и в родах с большим числом видов. Например, в классе млекопитающих виды рода летучих мышей *Artibeus* накапливали ДНК в течение 1.8 млн лет. В широко известном роде *Canis* РГ оставался стабильным на протяжении 30 млн, начиная от серого волка (*C. lupus*; 30 млн, 2.8 пг), койота (*C. latrans*; 16 млн, 2.8 пг), красного волка (*C. rufus*; 0.39 млн, 3.0 пг) и заканчивая домашней собакой (*C. familiaris*; 0.03 млн, 3.1 пг).

Многочисленный род летучих мышей *Myotis* имеет сложную динамику РГ. Сначала РГ достаточно интенсивно растет в процессе эволюции от 1.9 до 3.3 пг в течение 4.3 млн, а затем, после резкого падения до 2.4 пг, постепенно незначительно снижается до 2.2 пг на протяжении 2.7 млн (рис. 3, красный и синий цвет; табл. 1). Времена дивергенции для рода *Myotis* вычислены на основе калиброванных дендрограмм из трех независимых исследований [35–37]. Максимальная разница между временами дивергенции повторяющихся видов этого рода была 0.06 млн в нисходящей компоненте динамики РГ (рис. 3, синий цвет) и 0.96 млн в восходящей компоненте (рис. 3, красный цвет), что свидетельствует о надежности подхода определения значений временной переменной (см. Материалы и методы и [23]).

В классе земноводных у саламандр в роде *Bolitoglossa* РГ увеличивается на 20 пг за 20 млн, т.е. на

1 пг в миллион лет, в то время как в родах *Pseudoeurycea* и *Plethodon* РГ снижается на 20 пг за 8.1 млн и на 8 пг за 20 млн соответственно. В роде лягушек *Leptodactylus* РГ существенно возрастает на 48.3 пг в течение 3 млн (16 пг за 1 млн). В трех родах птиц, *Grus*, *Cisticola* и *Amazona*, РГ остается стабильным на протяжении соответственно 10.8, 2.4 и 24.5 млн, а в роде *Turdus* незначительно увеличивается на 0.28 пг за 8.8 млн (табл. 1 и рис. 3).

В родах *Macropus*, *Pseudoeurycea* и *Plethodon* некоторые виды не следуют общей тенденции, т.е. являются выбросами, и были исключены из анализа (рис. 3). В предыдущей работе мы подробно рассматривали причину таких выбросов в родах растений и пришли к выводу, что их появление не правомерно считать случайными ошибками определения как количества ДНК, так и времени дивергенции [23]. В настоящем исследовании, так же как и в предыдущем, студентизированные остатки линейной регрессии видов-выбросов по переменной РГ находились в интервале $2 < \sigma < 3$, тогда как за случайные отклонения принимаются значения, у которых остатки лежат в интервале $\sigma > 3$. Помимо результатов статистической обработки данных в поддержку неслучайного присутствия видов-выбросов, обращает внимание достаточная надежность современных методов изучения размера генома и филогении видов (подробнее см. в [23]), что также свидетельствует в пользу их закономерного появления в процессе эволюции РГ рода.

РГ видов-выбросов, в отличие от остальных, мог подвергаться сильному давлению отбора и быстрому эволюционному изменению в сторону увеличения или уменьшения. Подтверждением служит пример рода кенгуру *Macropus* с восходящей динамикой РГ в течение 4.1 млн лет. Для этого рода времена дивергенции взяты из двух независимых работ [38, 39]. Как видно из рис. 3, один вид из пяти (*M. rufogriseus*) является выбросом из линейной зависимости в обоих исследованиях филогении *Macropus* (знак “×” на рис. 3), что подтверждает закономерность присутствия таких видов во внутриродовой динамике РГ. Разница в значении времени дивергенции для этого вида составляет 0.7 млн. Возможно, что при большем числе доступных для анализа видов, принадлежащих к одному роду, некоторые из этих выбросов обратятся в дополнительную базовую компоненту сложной динамики РГ.

ПЕРЕХОД МЕЖДУ БАЗОВЫМИ КОМПОНЕНТАМИ СЛОЖНОЙ ДИНАМИКИ РГ И ГЛОБАЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ КЛИМАТА

Интересно, что переход от одной базовой компоненты к другой у родов со сложной динамикой РГ происходил, примерно, в интервале 0.5–3.0 млн лет (табл. 3). У четырех родов растений

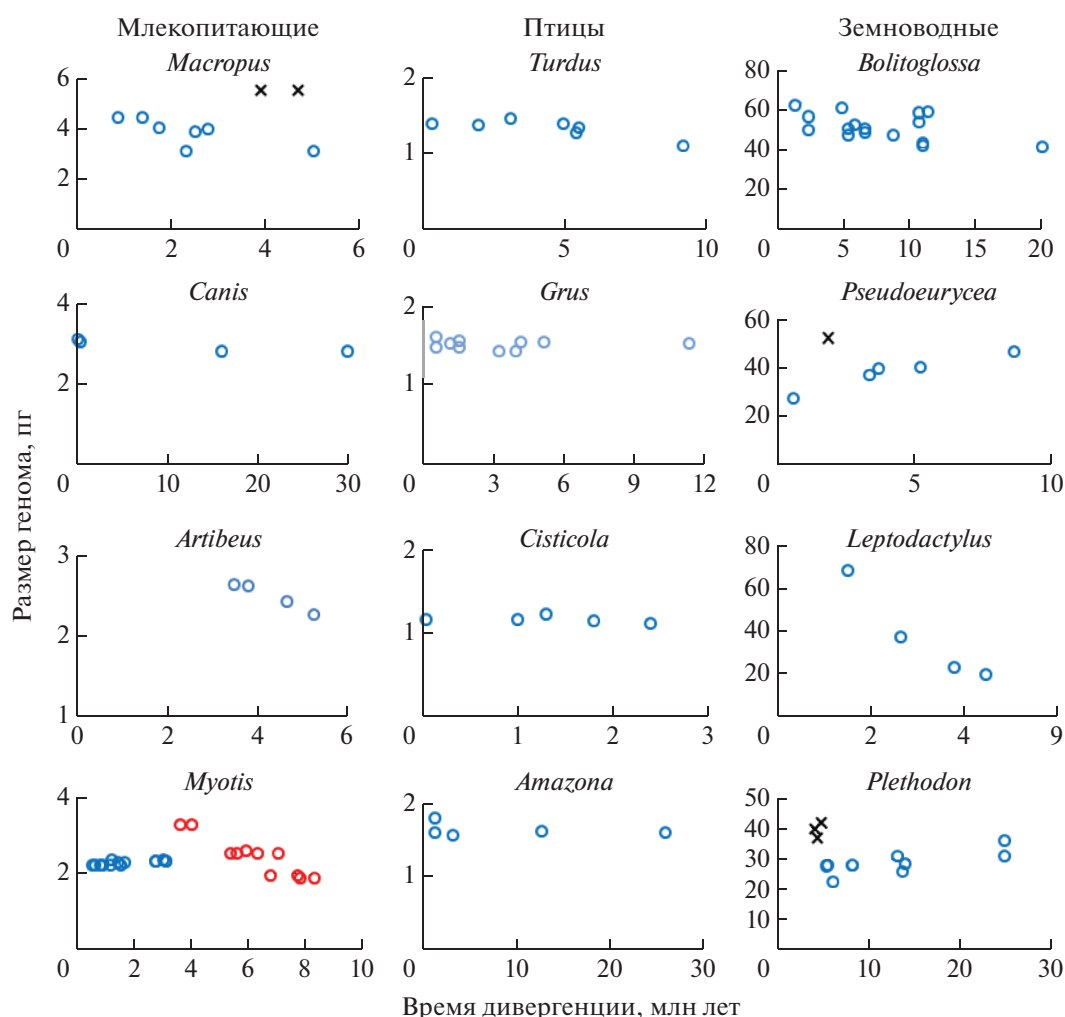


Рис. 3. Примеры внутриродовой динамики размера генома у животных. В роде *Myotis* динамика РГ двухкомпонентная. Выбросы из линейной зависимости между РГ и временем дивергенции обозначены знаком “x”.

этот переход имел место позднее (менее 2 млн), а у единственного представленного в настоящем исследовании рода животных с двухкомпонентной динамикой (*Myotis*) – ранее (3.2 млн). Точка 3 млн на шкале геологического времени хорошо известна в области исследования истории глобального климата. Известно, что последние три миллиона лет характеризуются циклами оледенений и межледниковых периодов с общим понижением глобальной температуры (см., например, [51–53]). Возможно, что смена тенденции в эволюции РГ видов внутри родов связана с понижением глобальной температуры 3 млн лет тому назад, однако только для немногих изученных родов характерна его сложная динамика. Например, у растений такая динамика наблюдается лишь у четырех родов из 26 (15%) (предыдущее исследование и настоящее), а у животных – это один род *Myotis* из 12 (8.3%). Отсюда следует, что глобальное похолодание было не единственным фактором,

влияющим на внутриродовую динамику РГ как у растений, так и у животных, а также то, что в динамику простых компонент существенный вклад вносят скорее внутриклеточные факторы по сравнению с селективным влиянием внешней среды.

Таким образом, линейность динамики РГ внутри родов растений и животных является ее характерным признаком наряду с относительно стабильным РГ на протяжении всей эволюции рода. Такая линейность в течение многих миллионов лет предполагает менее существенную роль отбора по сравнению с видоспецифичными факторами, например, ферментной системой метаболизма ДНК, контролирующую такие функции, как репликация и рекомбинация. Это следует из того, что одностороннее действие внешних факторов на протяжении длительного эволюционного времени маловероятно. Можно полагать, что действие отбора проявляется в полной мере

при смене тенденции изменения РГ, в том числе его дивергенции, в процессе эволюции родов с многокомпонентной динамикой. По-видимому, существенное действие отбора также характерно для видов, представляющих собой выбросы из общей внутриродовой линейной тенденции.

В динамике РГ на более низком уровне таксономических категорий остается еще много неясного и накопление фактов в отношении как растений, так и животных представляет значительный интерес. В частности, это касается факторов, определяющих эволюцию РГ внутри родов.

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. Ågren J.A., Wright S.I. Co-evolution between transposable elements and their hosts: A major factor in genome size evolution? // *Chromosome Res.* 2011. V. 19. P. 777–786.
<https://doi.org/10.1007/s10577-011-9229-0>
2. Zhao M., Ma J. Co-evolution of plant LTR-retrotransposons and their host genomes // *Protein Cell.* 2013. V. 4. P. 493–501.
<https://doi.org/10.1007/s13238-013-3037-6>
3. Elliott T.A., Gregory T.R. Do larger genomes contain more diverse transposable elements? // *BMC Evol. Biol.* 2015. V. 5. P. 69.
4. Ahuja M.R., Neale D. Evolution of genome size in conifers // *Silvae Genet.* 2005. V. 54. № 3. P. 126–137.
5. Puchta H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 1–14.
6. Petrov D.A. Mutational equilibrium model of genome size evolution // *Theor. Popul. Biol.* 2002. V. 61. P. 531–544.
7. Vitte C., Panaud O. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: Emergence of the increase/decrease model // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. V. 110. P. 91–107.
8. Chénais B., Caruso A., Hiard S., Casse N. The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: from genome size increase to genetic adaptation to stressful environments // *Gene.* 2012. V. 509. P. 7–15.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.042>
9. Cavalier-Smith T. Skeletal DNA and the evolution of genome size // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1982. V. 11. P. 273–302.
10. Cavalier-Smith T. Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion // *Ann. Bot.* 2005. V. 95. P. 147–175.
11. Gregory T.R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma // *Biol. Reviews.* 2001. V. 7. P. 65–101.
12. Vinogradov A.E. Genome size and chromatin condensation in vertebrates // *Chromosoma.* 2005. V. 113. P. 362–369.
13. Alonso C., Pérez R., Bazaga P., Herrera C.M. Global DNA cytosine methylation as an evolving trait: Phylogenetic signal and correlated evolution with genome size in angiosperms // *Front. Genet.* 2015. V. 6. P. 4.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00004>
14. Garnatje T., Vallès J., Garcia S. et al. Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): karyological, ecological and phylogenetic implications // *Biol. Cell.* 2004. V. 96. P. 117–124.
15. Grotkopp E., Rejmanek M., Sanderson M. et al. Evolution of genome size in pines (*Pinus* ssp.) and its life-history correlates: supertree analysis // *Evolution.* 2004. V. 58. № 8. P. 1705–1729.
16. Gregory T.R. Genome size and developmental complexity // *Genetica.* 2002. V. 115. № 1. P. 131–146.
17. Марков А.В., Анисимов В.А., Коротаев А.В. Взаимосвязь размера генома и сложности организма в эволюционном ряду от прокариот к млекопитающим // *Палеонт. журн.* 2010. Т. 4. С. 3–14.
18. Vinogradov A.E., Anatskaya O.V. Genome size and metabolic intensity in tetrapods: a tale of two lines // *Proc. Biol. Sci.* 2006. V. 273. P. 27–32.
19. Morgan H.D., Westoby M. The relationship between nuclear DNA content and leaf strategy in seed plants // *Ann. Bot.* 2005. V. 96. P. 1321–1330.
20. Шереметьев С.Н., Гамалей Ю.В., Слемнев Н.Н. Направления эволюции генома покрытосеменных // *Цитология.* 2011. Т. 53. № 4. С. 295–312.
21. Гриф В.Г. Количество ДНК на геном в биосистематике растений // *Цитология.* 1998. Т. 40. № 7. С. 690–705.
22. Ohri D. Genome size variation and plant systematics // *Ann. Bot.* 1998. V. 82. P. 75–83.
23. Бутанев А.М., Немчинов Л.Г. Внутриродовая динамика размера генома у диплоидных семенных растений // *Генетика.* 2020. Т. 56. № 6. С. 667–676.
<https://doi.org/10.31857/S0016675820060041>
24. Bennetzen J.L., Ma J., Devos K.M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants // *Ann. Bot.* 2005. V. 95. P. 127–132.
25. Vinogradov A.E. Evolution of genome size: Multilevel selection, mutation bias or dynamical chaos? // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004. V. 14. P. 620–626.
26. Pellicer J., Leitch I.J. The Plant DNA C-values database (release 7.1): An updated online repository of plant genome size data for comparative studies // *New Phytol.* 2020. V. 226. № 2. P. 301–305.
<https://doi.org/10.1111/nph.16261>
27. Gregory T.R. Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com>. 2020.
28. Willyard A., Wallace L.E., Wagner W.L. et al. Estimating the species tree for Hawaiian *Schiedea* (Caryophyllaceae) from multiple loci in the presence of reticulate evolution // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2011. V. 60. № 1. P. 29–48.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.04.001>

29. Gurushidze M. Phylogenetic relationships and diversification processes in *Allium* subgenus *Melanocrommyum*: Dis. zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerumnaturalium (Dr. rer. Nat.) Vorgelegt der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften – der Martin-Luther Univ. Halle-Wittenberg. <https://d-nb.info/1024874451/34>.
30. Ammiraju J.S.S., Fan C., Yu Y. et al. Spatio-temporal patterns of genome evolution in allotetraploid species of the genus *Oryza* // Plant J. 2010. V. 6. № 3. P. 430–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04251.x>
31. Brassac J., Blattner F.R. Species level phylogeny and polyploid relationships in *Hordeum* (Poaceae) inferred by next-generation sequencing and in silico cloning of multiple nuclear loci // Syst. Biol. 2015. V. 64. № 5. P. 792–808. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syv035>
32. Lo E.Y.Y., Donoghue M.J. Expanded phylogenetic and dating analyses of the apples and their relatives (Pyreae, Rosaceae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2012. V. 63. P. 230–243.
33. Wang B. Hybridization and evolution in the genus *Pinus* // Department of Ecology and Environmental Science, Umeå Univ., Umeå, Sweden. 2013. <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:652236/FULLTEXT01.pdf>.
34. Lledó M.D. Molecular phylogenetics of *Limonium* and related genera (Plumbaginaceae): biogeographical and systematic implications // Am. J. Bot. 2005. V. 92. № 7. P. 1189–1198. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.7.1189>
35. Stadelmann B., Jacobs D.S., Schoeman C., Ruedi M. Phylogeny of African *Myotis* bats (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from cytochrome b sequences // Acta Chiropterologica. 2004. V. 6. № 2. P. 177–192. <https://doi.org/10.3161/001.006.0201>
36. Stadelmann B., Lin L.K., Kunz T.H., Ruedi M. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes // Mol. Phylogenet. Evol. 2007. V. 43. № 1. P. 32–48.
37. Ruedi M., Stadelmann B., Gager Y. et al. Molecular phylogenetic reconstructions identify East Asia as the cradle for the evolution of the cosmopolitan genus *Myotis* (Mammalia, Chiroptera) // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. V. 69. № 3. P. 437–449.
38. Phillips M.J., Haouchar D., Pratt R.C. et al. Inferring kangaroo phylogeny from incongruent nuclear and mitochondrial genes // PLoS One. 2013. V. 8. № 2. P. e57745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057745>
39. Meredith R.W., Westerman M., Springer M. A phylogeny and timescale for the living genera of kangaroos and kin (Macropodiformes: Marsupialia) based on nuclear DNA sequences // Australian J. Zool. 2008. V. 56. P. 395–410.
40. Larsen P.A., Marchán-Rivadeneira M.R., Baker R.J. Speciation dynamics of the fruit-eating bats (genus *Artibeus*): With evidence of ecological divergence in Central American populations // Bat Evolution, Ecology, and Conservation / Eds Adams R., Pedersen S. N.Y.: Springer, 2013. P. 315–339. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7397-8_16
41. Nagy J., Végvári Z., Varga Z. Phylogeny, migration and life history: filling the gaps in the origin and biogeography of the *Turdus thrushes* // J. Ornithology. 2019. V. 160. № 2. P. 529–543.
42. Krajewski C., Sipiorski J.T., Anderson F.E. Complete mitochondrial genome sequences and the phylogeny of cranes (Gruiformes: Gruidae) // The Auk. 2010. V. 127. № 2. P. 440–452.
43. Lima N.C.B., Soares A.E.R., de Paula Almeida L.G. et al. Comparative mitogenomic analyses of *Amazona parrots* and *Psittaciformes* // Genet. Mol. Biol. 2018. V. 41. № 3. P. 593–604. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0023>
44. Wiens J.J., Parra-Olea J., García-París M., Wake D.B. Phylogenetic history underlies elevational biodiversity patterns in tropical salamanders // Proc. Biol. Sci. 2007. V. 274. № 1612. P. 919–928.
45. Hedges S.B., Heinicke M.P. Molecular phylogeny and biogeography of West Indian frogs of the genus *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2007. V. 44. № 1. P. 308–314.
46. Kozak K.H., Weisrock D.W., Larson A. Rapid lineage accumulation in a non-adaptive radiation: phylogenetic analysis of diversification rates in eastern North American woodland salamanders (Plethodontidae: Plethodon) // Proc. R. Soc. B. 2006. № 273. P. 539–546. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3326>
47. Vieites D.R., Min M.-S., Wake D.B. Rapid diversification and dispersal during periods of global warming by plethodontid salamanders // PNAS. 2007. V. 104. № 50. P. 19903–19907.
48. Wagner W.L., Funk V.A., Weller S.G. et al. Phylogeny and biogeography in *Schiedea* and *Alsinidendron* (Caryophyllaceae) // Hawaiian Biogeography: Evolution on a hot spot archipelago / Eds Wagner W.L., Funk V.A. 1995. P. 221–258. <https://repository.si.edu/handle/10088/7620>.
49. Willyard A., Wallace L.E., Wagner W.L. et al. Estimating the species tree for Hawaiian *Schiedea* (Caryophyllaceae) from multiple loci in the presence of reticulate evolution // Mol. Phylogenet. Evol. 2011. V. 60. P. 29–48.
50. Wagner W.L., Weller S.G., Sakai A. Monograph of *Schiedea* (Caryophyllaceae–Alsinoideae) // Syst. Bot. Monographs. 2005. V. 72. <https://repository.si.edu/handle/10088/18515>
51. Ravelo A.C., Andreasen D.H., Lyle M. et al. Regional climate shifts caused by gradual global cooling in the Pliocene epoch // Nature. 2004. V. 429(6989). P. 263–267. <https://doi.org/10.1038/nature02567>
52. Bartoli G., Sarnthein M., Weinelt M. et al. Final closure of Panama and the onset of northern hemisphere glaciation // Earth and Planetary Sci. Letters. 2005. V. 237. № 1–2. P. 33–44.
53. Zachos J., Pagani M., Sloan L. et al. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present // Science. 2001. V. 292 (5517). P. 686–693.

Components of Intrageneric Genome Size Dynamics in Plants and Animals

A. M. Boutanaev*

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

**e-mail: boutanaev@mail.ru*

This study is dedicated to genome size dynamics during evolution of plant and animal species belonging to the same genera. At the scale of the taxonomic categories of plant and animal kingdoms, genome size of species tends to decline, which means that species with small genomes significantly prevail. However, within genera of both plants and animals genome size can increase, decrease, or remain relatively stable during the entire time of genus evolution. These three patterns represent the basic components of intrageneric genome size dynamics. Aside of this simple dynamics with one component, there exists complex dynamics consisting of two or even three basic components. Genome size dynamics of diploids and polyploids within plant genera can significantly differ which reflects influence of different evolutionary factors. The reasons of the component change in the case of the complex dynamics is not completely clear, however one of those can be the global cooling which began three million years ago.

Keywords: intrageneric genome size dynamics, components of genome size dynamics, genome evolution.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЭПИХЛОРИДИНА С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРОВ *Escherichia coli* И МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ НА МЫШАХ

© 2021 г. К. Г. Орджоникидзе¹, Е. В. Игонина¹, Б. С. Жошибекова², С. К. Абилев^{1, *}

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

²Казахский национальный женский педагогический университет, Алматы, 090000 Казахстан

*e-mail: abilev@vigg.ru

Поступила в редакцию 12.12.2020 г.

После доработки 25.01.2021 г.

Принята к публикации 26.01.2021 г.

Проведено сравнительное изучение генотоксических эффектов метилметансульфоната (ММС) и эпихлоргидрина (ЭХГ) с помощью бактериальных биосенсоров *E. coli* и метода ДНК-комет на мышах. Показано, что ЭХГ более слабо индуцирует SOS-ответ и экспрессию гена *alkA* в клетках бактерий, чем ММС. Эксперименты *in vivo* на мышах с использованием метода ДНК-комет показали ДНК-повреждающую активность ЭХГ и ММС в клетках печени, почек и легких при экспозиции 3 ч. Уровни повреждений ДНК, вызываемых ЭХГ в этих органах при экспозиции 3 ч, оказались ниже, чем для ММС. Генотоксический эффект ЭХГ при экспозиции 18 ч оказался статистически значимым только в клетках почек в дозе 20 мг/кг.

Ключевые слова: метилметансульфонат, эпихлоргидрин, генотоксичность, биосенсоры, *E. coli*, SOS-ответ, экспрессия гена *alkA*, ДНК-кометы, мыши.

DOI: 10.31857/S0016675821090083

Эпихлоргидрин (ЭХГ) является основным полупродуктом промышленного синтеза глицерина, красителей и поверхностно-активных веществ и для получения синтетических материалов (главным образом, эпоксидных и ионообменных смол) и полимеров, применяемых в различных областях промышленности, а также в медицине.

ЭХГ является высокореакционноспособным и высокотоксичным веществом, отравление которым приводит к тяжелым и часто смертельным последствиям, связанным с алкилированием сульфгидрильных, аминных, карбоксильных групп белков крови и поражением таких жизненно важных органов, как печень, почки, легкие и мозг [1]. По итогам обширных исследований токсичности, генотоксичности и канцерогенности ЭХГ на грызунах Международное агентство по изучению рака (IARC) в 90-е годы прошлого века включило его в число вероятных канцерогенов для человека — класс 2В [2]. ЭХГ, по данным IARC, вызывает злокачественные лимфомы, гиперплазии, папилломы и карциномы, подкожные фибромы, гипоплазии и легочные опухоли у грызунов, индуцирует повреждения и разрывы ДНК, проявляет мутагенную активность в различных тест-системах, включая бактериальные. Результаты этих исследований легли в основу ряда документов, регу-

лирующих условия его производства и применения, что привело к снижению уровня взаимодействия работников с ЭХГ. В настоящее время ежегодно в мире используется около двух млн тонн ЭХГ в производстве эпоксидных смол и полимеров [3].

Мутагенное действие ЭХГ на людей было показано еще в 70-е и 80-е годы XX в. при изучении хромосомных aberrаций в лимфоцитах работников, занятых на производстве [4–6]. Итоги изучения генотоксического действия ЭХГ на людей в период 1990–2001 гг. обобщены в обзоре [7]. Результаты изучения генотоксичности ЭХГ на лабораторных животных и на клеточных культурах приведены в работах [3, 8, 9].

ЭХГ содержит активную эпоксидную группу, которая реагирует с нуклеофильными сайтами ДНК и белков, а также хлоридную группу, которая может вступать в реакции с ДНК или белками. Эта особенность структуры ЭХГ придает ему свойства бифункционального алкилирующего агента, способного вызывать кросс-сшивки между нуклеофильными участками ДНК и белков, что и обуславливает его токсические и генотоксические эффекты [3, 10, 11]. В результате реакции эпоксидной группы ЭХГ в клетках образуются 3-хлор-2-гидроксипропиловые аддукты с белками и ДНК, что придает ему свойство монофункцио-

нального агента. Формирование стабильных аддуктов 2,3-дигидропропил-гемоглобин показано у крыс и человека после воздействия ЭХГ [12, 13].

В ДНК ЭХГ реагирует преимущественно с гуанином в позиции N-7 так же, как этилметансульфонат (ЭМС) и метилметансульфонат (ММС), которые получили широкое применение в качестве позитивного контроля в генотоксикологических исследованиях как *in vitro*, так *in vivo*. Гуанин, замещенный в позиции N-7, является преобладающим аддуктом ДНК, формирующимся при воздействии большинства алкилирующих агентов, и поэтому он является первым маркером воздействия подобных химических веществ. Другие аддукты, например, аддукты ЭХГ с N-3 аденином, могут быть более значимы биологически, однако из-за низких концентраций труднее их анализировать. Поэтому для определения профессионального воздействия ЭХГ на работников используется метод количественного определения 7-(3-хлор-2-гидроксипропил)-гуанина в лейкоцитах человека [13].

Соотношение кросс-сшивок и стабильных аддуктов, образуемых ЭХГ с белками и ДНК, зависит от экспериментальной системы. Так, цитотоксичность ЭХГ преимущественно считается следствием его способности вызывать кросс-сшивки с белками и ДНК, тогда как генотоксические эффекты ЭХГ могут быть следствием образования как аддуктов с ДНК, так и сшивок. В последнее время растет интерес к изучению генотоксичности ЭХГ. С одной стороны, это связано с тем, что несмотря на многочисленные исследования генотоксичности ЭХГ в 90-х годах прошлого века, есть не выясненные вопросы о механизме его генотоксичности. С другой — ежегодный рост производства ЭХГ на 4% с целью промышленного синтеза различных синтетических материалов обращает внимание исследователей на необходимость изучения эколого-генетических последствий загрязнения окружающей среды ЭХГ.

Целью настоящей работы является сравнительное изучение индукции ЭХГ и ММС в клетках *E. coli*, SOS-ответа на повреждение ДНК и алкилтрансферазы в ответ на алкилирование ДНК, а также разрывов ДНК во внутренних органах мышей методом ДНК-комет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения

Метилметансульфонат и эпихлоргидрин производства Sigma- Aldrich (США).

Бактериальные штаммы

В работе использовали два биосенсора на основе штамма *E. coli* K12: MG1655 (pColD-lux) и MG1655 (pAlkA-lux), несущего рекомбинантную

плазмиду с lux-опероном люминесцирующей бактерии *Photorhabdus luminescens* транскрипционно слитыми с промоторами гена колицина *col* (*cda*) и *alkA* соответственно. Биосенсор MG1655 (pColD-lux) люминесцирует в ответ на повреждение или остановку синтеза ДНК, то есть характеризует уровень SOS-ответа бактерий. MG1655 (pAlkA-lux) люминесцирует в результате активации промотора P_{alkA} в ответ на алкилирование ДНК.

Штаммы предоставлены Г.Б. Завильгельским и И.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, Москва). Генотип штамма и карта рекомбинантной плазмиды приведены в работе [14].

Процедура определения люминесценции биосенсоров

Культуры клеток *E. coli* выращивали на полноценной среде Лурия-Бертани (LB) с добавлением ампициллина в конечной концентрации 100.0 мкг/мл в течение ночи при температуре 37°C. Ночную культуру разбавляли свежей средой в 10 раз (1×10^6 клеток/мл). Измерения проводили на денситометре DEN-1B ("Biosan"). Затем суспензию подрачивали в течение 2 ч при 37°C на шейкере до ранней логарифмической фазы.

Для определения активных концентраций генотоксикантов аликвоты культуры (по 180 мкл) переносили в стерильные ячейки планшета, в них же добавляли индукторы в разных концентрациях в объеме 20 мкл, в качестве контроля использовали дистиллированную воду или соответствующий растворитель. Через 60 и 90 мин инкубации планшетов при 37°C проводили измерения люминесценции на микропланшетном ридере StatFax 4400, Awareness Technology Inc. (США).

Оценка генотоксичности на мышах *in vivo*

Для изучения ДНК-повреждающей активности ЭХГ и ММС в клетках различных органов мышей использовали метод ДНК-комет (Comet Assay). Эксперименты проводили *in vivo* согласно протоколу OECD 489 [15] и рекомендациям по *in vivo* Comet assay [16]. Метод основан на электрофоретической подвижности ДНК заранее лизированных и помещенных в агарозный гель клеток. Под влиянием электрического поля ДНК мигрирует к аноду в виде отдельных фрагментов или петель и формирует электрофоретический след, напоминающий хвост кометы, параметры которого зависят от количества разрывов в ДНК. Нами был использован щелочной вариант метода, позволяющий выявлять, помимо двухнитевых разрывов ДНК, однонитевые разрывы и щелочно-лабильные сайты [17].

ЭХГ и ММС вводили мышам внутрибрюшинно в дозах 20 и 60 мг/кг. В качестве отрицательного контроля использовали воду. В каждой группе было

пять половозрелых самцов мышей линии BALB/c массой тела 25 г с экспозицией 3 и 18 ч.

Для получения гель-слайдов использовали предметные стекла, предварительно покрытые 1%-ным агарозным гелем (Sigma, тип II, США). Исследуемые клетки заключали в гель легкоплавкой агарозы (Sigma, тип VIIa, США), приготовленной на фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) при 37°C и наносили на подготовленные гель-слайды. После этого иммобилизованные клетки подвергали лизису (10 мМ Трис-HCl (pH 10), 2.5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА-Na, 1%-ный Тритон-X100 и 10%-ный диметилсульфоксид) при температуре 4°C в темноте в течение 1 ч.

Денатурацию ДНК в течение 20 мин и электрофорез проводили в щелочных условиях (0.3 М NaOH, 1 мМ ЭДТА-Na, pH 13; 25 В, 300 мА, 20 мин). После электрофореза препараты подвергали нейтрализации в течение 15 мин (0.4 М Tris-HCl pH 7.5), фиксировали и окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I. Анализ микропрепаратов проводили на флуоресцентном микроскопе "Axioplan 2 Imaging" (Carl Zeiss, Germany) с использованием высокочувствительной камеры CV-M4+CL (JAI, Japan) и программного обеспечения Comet Imager 2.0. В качестве показателя поврежденности ДНК, в соответствии с рекомендациями OECD [15–17], использовали процентное содержание ДНК в хвосте кометы, отражающее относительное количество фрагментов ДНК, мигрирующих к аноду при электрофорезе. От каждого животного анализировали не менее 100 клеток печени, почек и легких на процент ДНК в хвосте кометы и подсчитывали среднее значение медианы по группе. Согласно рекомендациям OECD 489 Guideline (2016), медиана процентного содержания ДНК в хвосте комет определялась для каждого животного (не менее 100 клеток на животное, полученных с двух слайдов), после чего подсчитывалось среднее значение медианы по группе.

Статистическая обработка

Все данные, полученные с использованием биосенсоров, подвергали статистической обработке с вычислением среднего значения и его ошибки. Значимость различий средних значений оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Для статистической обработки данных, полученных методом ДНК-комет, использовали непараметрический тест Манна-Уитни и программу SPSS Statistics v.25.

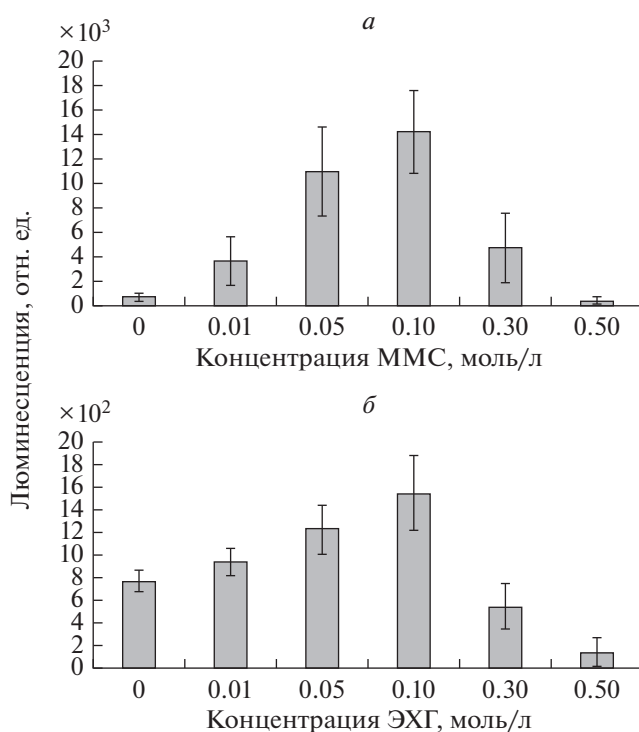


Рис. 1. Индукция MMC (а) и ЭХГ (б) SOS-ответа у биосенсора MG1655 (pColD-lux).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение генотоксичности на *E. coli*

Известно, что алкилирующие химические соединения обладают генотоксическими свойствами и индуцирует SOS-ответ в клетках *E. coli* [18, 19]. В индукции SOS-ответа важную роль играют продукты генов *lexA* и *recA*, а также наличие однонитевых разрывов в ДНК, которые возникают как при прямой индукции разрывов, так и при блокировании синтеза повреждающими ДНК агентами [20]. Из наших результатов, представленных на рис. 1, следует, что MMC и ЭХГ индуцируют SOS-ответ у биосенсора MG1655 (pColD-lux), и это свидетельствует об их способности повреждать ДНК. Однако уровень отклика у биосенсора MG1655 (pColD-lux) на воздействие MMC был на порядок выше, чем у ЭХГ. Например при концентрации в 0.1 моль/л люминесценция при действии ЭХГ составила 1500 отн. ед., тогда как при действии MMC — 14000 отн. ед.

Для изучения способности MMC и ЭХГ алкилировать ДНК был использован биосенсор MG1655 (pAlkA-lux), который люминесцирует при индукции гена *adaA* в ответ на алкилирование ДНК [21]. Из рис. 2 видно, что MMC активно индуцирует экспрессию гена *adaA*, тогда как ЭХГ является слабым индуктором этого гена. Сравнение количественных показателей индукции люминесценции, характеризующих уровень экспрессии гена *adaA*,

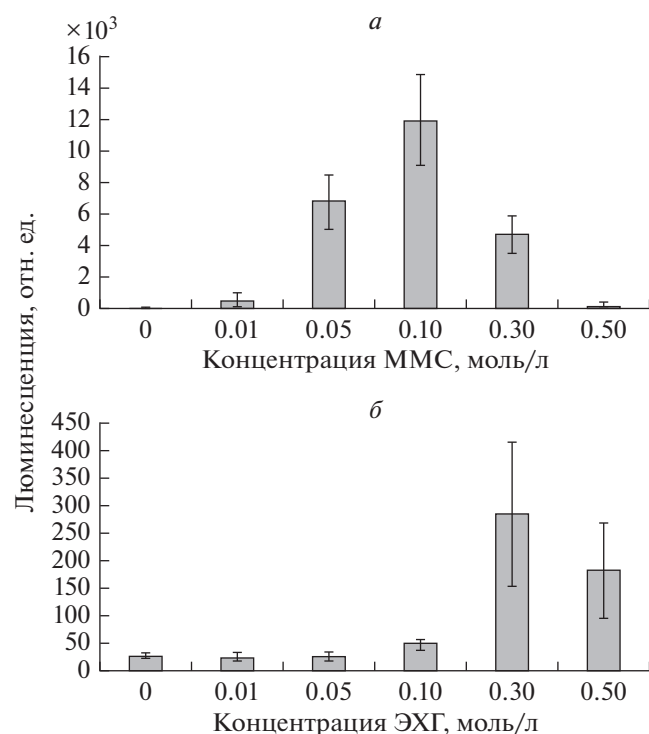


Рис. 2. Индукция ММС (а) и ЭХГ (б) алкилтрансферазы у биосенсора MG1655 (pAlkA-lux).

показало, что при действии ММС в концентрации 0.1 моль/л интенсивность люминесценции составляет 12000 отн. ед., тогда как при действии ЭХГ статистически значимая индукция люминесценции происходит в концентрациях 0.3 и 0.5 моль/л. При этом максимальная интенсивность люминесценции при действии ЭХГ и концентрации 0.3 моль/л составляет 285 отн. ед., что в 42 раза меньше люминесценции MG1655 (pAlkA-lux) при действии ММС в концентрации 0.1 моль/л.

lux) при действии ММС в концентрации 0.1 моль/л.

Важным показателем индукции люминесценции является амплитуда ответа биосенсора, то есть отношение показателя люминесценции при действии изучаемого фактора к показателю спонтанного уровня люминесценции биосенсора в контроле. Амплитуда ответа биосенсора MG1655 (pAlkA-lux) при действии ММС составила 480 отн. ед., при действии ЭХГ — 10.

Определение генотоксичности в клетках внутренних органов мышей

В работе анализировали уровень поврежденности ДНК в клетках печени, почек и легких мышей, получавших ММС и ЭХГ в дозах 20 и 60 мг/кг и 3 и 18 ч экспозиции. В качестве показателя уровня поврежденности ДНК определяли процентное содержание (%) ДНК в хвосте «кометы». Этот показатель характеризует количество ДНК, высвободившееся из ядра при электрофорезе и мигрирующего в сторону анода (хвост кометы). Такое поведение ДНК является результатом как спонтанных и индуцированных разрывов в цепи ДНК, так и щелочеллабильных апуриновых и апиримидиновых сайтов, которые при щелочном электрофорезе реализуются в разрывы. Полученные результаты приведены в табл. 1. ММС и ЭХГ в дозах 20 и 60 мг/кг при 3 ч экспозиции достоверно повышали показатель содержания (%) ДНК в хвосте кометы в клетках печени, почек и легких мышей по сравнению с контролем. ММС проявил генотоксичность и при 18 ч экспозиции в обеих дозах. ЭХГ, в отличие от ММС, при 18 ч экспозиции проявил активность только в клетках почек мышей в дозе 20 мг/кг.

Более детальный анализ полученных данных приведен на диаграммах «ящик с усами» (Box

Таблица 1. ДНК-повреждающее действие ММС и ЭХГ в клетках печени, почек и легких мышей

Экспозиция	Вариант	Печень, % ДНК в хвосте	Почки, % ДНК в хвосте	Легкие, % ДНК в хвосте
3 часа	Контроль, вода	7.98 ± 0.66	5.39 ± 1.13	4.19 ± 0.36
	ММС, 20 мг/кг	28.83 ± 6.61**	38.77 ± 6.48**	39.61 ± 6.12**
	ММС, 60 мг/кг	36.68 ± 8.26**	51.58 ± 11.45**	62.88 ± 3.37**
	ЭХГ, 20 мг/кг	17.17 ± 0.93**	12.28 ± 1.46**	7.70 ± 0.53**
	ЭХГ, 60 мг/кг	19.08 ± 1.01**	14.43 ± 1.21**	10.60 ± 1.40*
18 часов	Контроль, вода	14.83 ± 1.54	8.75 ± 0.33	7.06 ± 0.75
	ММС, 20 мг/кг	27.23 ± 1.40**	28.37 ± 0.91**	25.17 ± 2.51**
	ММС, 60 мг/кг	37.72 ± 1.58**	36.32 ± 2.00**	36.99 ± 2.36**
	ЭХГ, 20 мг/кг	13.71 ± 0.89	17.74 ± 5.15*	10.16 ± 2.26
	ЭХГ, 60 мг/кг	11.94 ± 1.03	10.48 ± 1.18	7.89 ± 0.29

Примечание. Значимость отличия между вариантами эксперимента: контроль (вода) и ММС или ЭХГ: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Plot) (рис. 3), которые позволяют проводить сравнение результатов, полученных при различных сроках экспозиции ММС и ЭХГ для различных органов мышей по таким показателям, как медиана, минимальное и максимальное значение выборки и выбросы, и распределение по квартилям. На рис. 3 представлено распределение числовых значений показателя “% ДНК в хвосте кометы” клеток печени мыши. Для ММС, в отличие от ЭХГ, наблюдается разброс числовых значений показателя “% ДНК в хвосте кометы” от 17 до 40 в случае дозы 20 мг/кг и от 27 до 50 в случае дозы 60 мг/кг. ЭХГ в обеих дозах при экспозиции 18 ч не проявил активности. ММС при экспозиции 18 ч был менее активен, чем при трехчасовой экспозиции, однако в дозе 60 мг/кг был более активен, чем в дозе 20 мг/кг.

В почках наблюдается такая же картина. Однако при трехчасовой экспозиции ММС в дозе 60 мг/кг показал высокую активность с большим разбросом числовых значений показателя “% ДНК в хвосте кометы”. ЭХГ при экспозиции 3 ч был менее активен, чем ММС, но значимо отличался от контроля. ЭХГ не проявил активности в дозе 60 мг/кг при 18 ч экспозиции, однако ММС проявил высокую активность. Отмечены выбросы как ММС, так и у ЭХГ, при обеих сроках экспозиции. В легких ММС в дозе при экспозиции 3 ч проявил высокую активность с небольшим разбросом числовых значений показателя “% ДНК в хвосте кометы”. ЭХГ повторил картину, полученную на почках. При 18-часовой экспозиции оба соединения показали такую же картину, как на почках. Зафиксированы выбросы как в большую, так и меньшую сторону.

ОБСУЖДЕНИЕ

Алкилирующие вещества по кинетике реакций с биологическими молекулами делятся на два типа: SN1 и SN2. ММС относится к типу SN2 и преимущественно реагирует с одонитевой ДНК, приводя к образованию N1-метиладенина и N3-метилцитозина, а при воздействии на двунитевую ДНК, как правило, в 70–80% случаев метилирует N7-позицию гуанина [22, 23]. N³-метиладендин, который является вторым по распространенности продуктом алкилирования двунитевой ДНК, удаляется из нее 3-метиладенин-ДНК-гликозилазой, продуктом гена *adaA*, экспрессия которого контролируется сенсорным белком Ada. Поэтому уровень экспрессии гена *adaA*, регистрируемый по люминесценции биосенсора *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux), отражает уровень индукции белка Ada в ответ на алкилирование. У *E. coli* белку Ada присущи две функции – репарационная (репарация O6-алкилгуанина и O4-метилтимина) и регуляторная (усиление транскрипции) четырех генов *ada*-регулона – *ada*, *alkA*, *alkB*

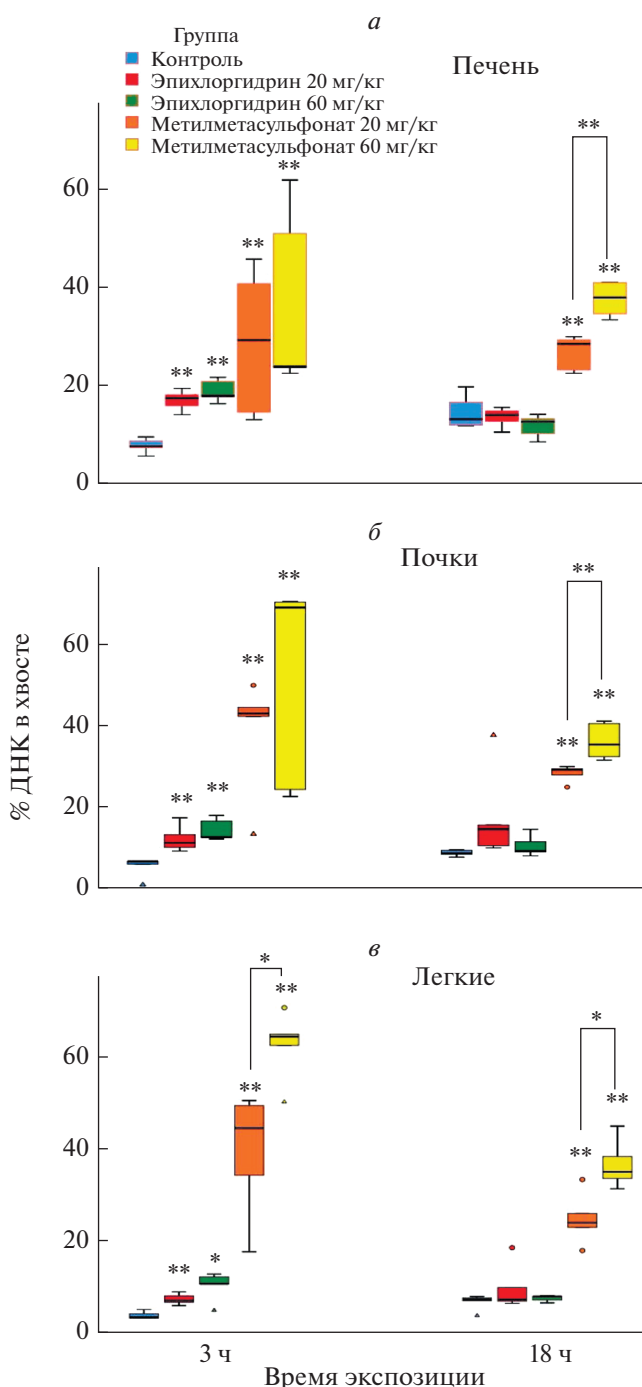


Рис. 3. Результаты анализа индукции ММС и ЭХГ ДНК-комет в клетках печени (а), почек (б) и легких (в) мышей.

и *aid*. Активация белка Ada, как регулятора транскрипции, происходит в результате его алкилирования. Метилирование N-Ada домена приводит к повышению аффинности этого белка к промоторным участкам Ada-регулона и превращает его в сильный транскрипционный активатор [23–25]. Данное свойство белка Ada может быть при-

чиной большой разницы между ММС и ЭХГ в индукции люминесценции у *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux). В наших экспериментах ММС в концентрации 0.1 моль/л вызвала интенсивность люминесценции *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux), что составило 14 000 отн. ед., тогда как при действии ЭХГ в концентрации 0.3 моль/л — 285 отн. ед., что в 42 раза меньше люминесценции MG1655 (pAlkA-lux) при действии ММС в концентрации 0.1 моль/л.

Если сравнивать отношение показателя люминесценции при действии изучаемых соединений к показателю спонтанного уровня люминесценции биосенсора в контроле, то ответ биосенсора MG1655 (pAlkA-lux) при действии ММС составил 480, а при действии ЭХГ — 10. ММС может алкилировать как ДНК, так и белки путем прямого переноса метильной группы на сайты алкилирования, тогда как ЭХГ образует как аддукты, так и сшивки. Последнее обстоятельство может резко снизить аффинность белка Ada к промоторным участкам Ada-регулона, что приводит к резкому снижению экспрессии гена *alkA*.

В наших экспериментах *in vivo* методом ДНК-комет на мышах ММС и ЭХГ статистически значительно повышали уровень содержания ДНК в хвосте кометы по сравнению с контролем в клетках печени, почек и легких при экспозиции 3 ч в дозах 20 и 60 мг/кг. Однако генотоксический эффект ЭХГ при экспозиции 18 ч оказался статистически значимым только в клетках почек в дозе 20 мг/кг. ММС при экспозиции 18 ч, в отличие от ЭХГ, проявил генотоксичность во всех органах и в обеих дозах (табл. 1). Уровень повреждений ДНК, вызываемый ЭХГ в клетках печени при экспозиции 3 ч, оказался ниже, чем для ММС, что может быть следствием биотрансформации ЭХГ в печени.

Результаты изучения органной специфичности ММС согласуются с результатами ранее опубликованного исследования методом ДНК-комет [26]. В этой работе было показано, что ММС вызывает повреждения ДНК в клетках печени, почек и костного мозга при экспозиции 4 и 24 ч. При этом при экспозиции 4 ч генотоксичность ММС была выше, чем при экспозиции 24 ч, что может быть следствием процессов детоксикации и репарации, которые приводят к снижению общего количества поврежденных клеток.

Исследование генотоксичности методом ДНК-комет на восьми органах мышей 22 монофункциональных алкилирующих агентов и десяти кросс-сшивателей показали, что все тестированные химические агенты показали генотоксичность по крайней мере в одном органе. Кросс-сшиватели, включая ЭХГ, показали более высокую активность в клетках органов желудочно-кишечного тракта по сравнению с печенью и легкими [27]. Сравнительное исследование цитотоксичности противоопу-

холевого препарата метхлорамина (МХА) диэпоксибутана (ДЭБ) и ЭХГ на культуре человеческих лейкемических клеток HL-60 методом ДНК-комет показало, что цитотоксичность их зависит от концентрации и продолжительности воздействия. По цитотоксичности они располагались в следующем порядке: МХА > ДЭБ > ЭХГ, который коррелировал с уровнем кросс-сшивок ДНК–ДНК и ДНК–белок в клетках. ЭХГ вызывал меньше сшивок, чем ДЭБ, однако они отличались стабильностью, что может привести к блокировке клеточного цикла и последующего запуска апоптоза. Проведенные количественные эксперименты с использованием ПЦР в реальном времени показали, что обработка клеток HL-60 ДЭБ и ЭХГ приводит к усилению экспрессии ряда генов, участвующих во внутреннем (митохондриальном) пути апоптоза [10].

Исследование скорости репарации разрывов ДНК, индуцированных ЭХГ, в культуре фибробластов человека выявило, что в течение 2 ч после воздействия низкой концентрации (0.1 мМ) восстанавливается до 50%, а при высокой концентрации (0.2 мМ) — 26% двунитевых разрывов. Однако через 18 ч после воздействия ЭХГ в низкой концентрации восстановление разрывов ДНК было незначительным, при более высокой концентрации наблюдалось быстрое накопление двунитевых разрывов, что, вероятно, является результатом апоптоза клеток и деградации ДНК [28].

В конечном генотоксическом эффекте ЭХГ, особенно в экспериментах *in vivo* с грызунами, большую роль играет его биотрансформация, спектр и уровень которой разнятся по органам, а также скорость репарации разрывов ДНК. Например эпоксидгидролаза способна инактивировать ЭХГ [29, 30]. Низкий уровень показателя “% ДНК в хвосте кометы” при экспозиции 18 ч ЭХГ в высокой дозе может быть следствием большого количества сшивок, приведших как к апоптозу клеток, так и инактивацией его эпоксидгидролазой.

Таким образом, сравнительное изучение генотоксических эффектов ММС и ЭХГ с помощью бактериальных биосенсоров *E. coli* показало, что ЭХГ более слабо индуцирует SOS-ответ и экспрессию гена *alkA* в клетках бактерий, чем ММС. В экспериментах *in vivo* на мышах с использованием метода ДНК-комет ЭХГ показал ДНК-повреждающую активность в клетках печени, почек и легких при экспозиции 3 ч, так же, как и ММС. При этом ДНК-повреждающая активность ЭХГ оказалась ниже, чем активность ММС. ЭХГ при экспозиции 18 ч проявил ДНК-повреждающую активность только в дозе 20 мг/кг и в клетках почек. Отсутствие генотоксического эффекта ЭХГ в дозе 60 мг/кг в печени и легких мышей может быть следствием процессов биотрансформации его в этих органах или следствием апоптоза и де-

градации ДНК, вызванных большим количеством сшивок.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lawrence W.H., Malikj M., Autian J. Toxicity profile of epichlorohydrin // J. Farm. Sci. 1972. V. 61. № 11. P. 1712–1717.
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epichlorohydrin. Lyon, France: IARC, 1999. V. 71. P. 603–628.
3. Passang T., Millard J.T. Epichlorohydrin-induced DNA-protein cross-links in human leukemia cells // FASEB J. 2019. V. 33.1. Suppl. 457–517. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1supplement.457.17>
4. Kučerová, M., Zhurkov, V.S., Polívková, Z. et al. Mutagenic effect of epichlorohydrin. II. Analysis of chromosomal aberrations in lymphocytes of persons occupationally exposed to epichlorohydrin // Mutat. Res. 1977. V. 48. P. 355–360. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(77\)90178-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(77)90178-6)
5. Šrám R.J., Zudová Z., Kuleshov N.P. Cytogenetic analysis of peripheral lymphocytes in workers occupationally exposed to epichlorohydrin // Mutat. Res. 1980. V. 70. P. 115–120. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(80\)90064-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(80)90064-0)
6. Šrám R.J., Tomatis L., Clemmesen J., Bridges B.A. An evaluation of the genetic toxicity of epichlorohydrin. A report of an expert group of the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens // Mutat. Res. 1981. Nov. V. 87(3). P. 299–319.
7. Kolman A., Chovanec M., Goltar O.S. Genotoxic effects of ethylene oxide, propylene oxide and epichlorohydrin in humans: Update review (1990–2001) // Mutat. Res./Rev. in Mutat. Res. 2002. V. 512. P. 173–194.
8. Giri A.K. Genetic toxicology of epichlorohydrin: A review // Mutat. Res. 1997. V. 386. № 1. P. 25–38. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(96\)00042-7](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(96)00042-7)
9. Rossi A.M., Migliore L., Lascialfari D. et al. Genotoxicity, metabolism and blood kinetics of epichlorohydrin in mice // Mutat. Res. 1983. V. 118. № 3. P. 213–226. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(83\)90144-1](https://doi.org/10.1016/0165-1218(83)90144-1)
10. Phuong M. Le, Silvestri V.L., Redstone S.C. et al. Cross-linking by epichlorohydrin and diepoxybutane correlates with cytotoxicity and leads to apoptosis in human leukemia (HL-60) cells // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2018. V. 352. P. 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.020>
11. Romano K.P., Newman A.G., Zahran R.W. et al. DNA interstrand cross-linking by epichlorohydrin // Chem. Res. Toxicol. 2007. V. 20. № 5. P. 832–838. <https://doi.org/10.1021/tx700066h>
12. Hindso Landin H., Segerbäck D., Damberg C. et al. Adducts with haemoglobin and with DNA in epichlorohydrin-exposed rats // Chem. Biol. Interact. 1999. V. 117. P. 49–64. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(98\)00099-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(98)00099-4)
13. Plna K., Osterman-Goltar S., Nogradi E. et al. 32P-post-labeling of 7-(3-chloro-2-hydroxypropyl)-guanine in white blood cells of workers occupationally exposed to epichlorohydrin // Carcinogenesis. 2000. V. 21. № 2. P. 275–280. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.2.275>
14. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. 2009. № 6. С. 16–25. <https://doi.org/10.1134/S0003683810080089>
15. OECD. Test № 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2016. 26 p.
16. Tice R.R., Agurell E., Anderson D. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing // Environ. Mol. Mutagen. 2000. V. 35. № 3. P. 206–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3.0.CO;2-J)
17. Hartmann A., Agurell E., Beevers C. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay // Mutagenesis. 2003. V. 18. № 1. P. 45–51. <https://doi.org/10.1093/mutage/18.1.45>
18. Иголина Е.В., Марсова М.В., Абилов С.К. Lux-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность // Экол. генетика. 2016. Т. 14. С. 52–62. <https://doi.org/10.17816/ecogen14452-62>
19. Manukhov I.V., Kotova V.Yu., Zavilgelsky G.B. Action of 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide // Mutat. Res. 2007. V. 634. P. 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.07.012>
20. Завильгельский Г.Б. SOS-репарации 60 лет // Мол. биология. 2013. Т. 17. № 5. С. 699–706. <https://doi.org/10.7868/S0026898413050224>
21. Sedgwick B., Bates P.A., Paik J. et al. Repair of alkylated DNA: Recent advances // DNA Repair. 2007. V. 6. № 4. P. 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.005>
22. Mielecki D., Grzesiuk E. Ada response – a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 355. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.1111/1574-6968>
23. Sakumi K., Igarashi K., Sekiguchi M. et al. The Ada protein is a class I transcription factor of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 2455–2457. <https://doi.org/10.1128/jb.175.8.2455-2457.1993>
24. Landini P., Volkert M.R. Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: A simple regulon with complex regulatory features // J. Bacteriology. 2000. V. 182. № 23. P. 6543–6549. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6543-6549.2000>
25. Mielecki D., Wrzesiński M., Grzesiuk E. Inducible repair of alkylated DNA in microorganisms // Mutat. Res.

2015. V. 763. P. 294–305. Epub 2014 Dec 19.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.12.001>
26. Oshida K., Iwanaga E., Miyamoto-Kuramitsu K., Miyamoto Y. An *in vivo* comet assay of multiple organs (liver, kidney and bone marrow) in mice treated with methyl methanesulfonate and acetaminophen accompanied by hematology and/or blood chemistry // J. Toxicol. Sci. 2008. V. 33. № 5. P. 515–524.
<https://doi.org/10.2131/jts.33.515>
27. Tsuda S., Matsusaka N., Madarame H. et al. The alkaline single cell electrophoresis assay with eight mouse organs: Results with 22 mono-functional alkylating agents (including 9 dialkyl N-nitrosoamines) and 10 DNA crosslinkers // Mutat. Res. 2000. Apr 13. V. 467(1). P. 83–98.
[https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(00\)00014-0](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(00)00014-0)
28. Chovanec M., Näslund M., Spivak I. et al. Rejoining of DNA strand breaks induced by propylene oxide and epichlorohydrin in human diploid fibroblasts // Environ. and Mol. Mutagenesis. 1998. V. 32. № 3. P. 223–228.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(1998\)32:3<223::aid-em4>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(1998)32:3<223::aid-em4>3.0.co;2-9)
29. Rossi A.M., Migliore L., Lascialfari D. et al. Genotoxicity, metabolism and blood kinetics of epichlorohydrin in mice // Mutat. Res. 1983. V. 118. № 3. P. 213–226.
[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(83\)90144-1](https://doi.org/10.1016/0165-1218(83)90144-1)
30. Rossi A.M., Migliore L., Loprieno N. et al. Valuation of epichlorohydrin (ECH) genotoxicity: Microsomal epoxide hydrolase-dependent deactivation of ECH mutagenicity in *Schizosaccharomyces pombe in vitro* // Mut. Res./Fund. and Mol. Mechanisms of Mutagenesis. 1983. V. 109. Iss. 1. P. 41–52.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(83\)90093-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(83)90093-3)

Comparative Study of the DNA-Damaging Activity of Epichlorohydrin Using *Escherichia coli* Biosensors and the Method of DNA Comets in Mice

K. G. Ordzhonikidze^a, E. V. Igonina^a, B. S. Zhoshibekova^b, and S. K. Abilev^{a,*}

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

^bKazakh National Women's Teacher Training University, Almaty, 090000 Kazakhstan

*e-mail: abilev@vigg.ru

A comparative study of the genotoxic effects of methylmethanesulfonate (MMC) and epichlorohydrin (ECH) was performed using bacterial *E. coli* biosensors and the DNA comet method in mice. ECH has been shown to induce an SOS response and expression of the *alkA* gene in bacterial cells more weakly than MMC. *In vivo* experiments on mice using the DNA comet method showed DNA-damaging activity of ECH in liver, kidney, and lung cells at 3 h exposure, as well as MMC. The levels of DNA damage caused by ECH in these organs at 3 h exposure were lower than for MMC. The genotoxic effect of ECH at 18 h of exposure was statistically significant only at a dose of 20 mg/kg and in kidney cells, which may be a consequence of ECH biotransformation in the liver.

Keywords: methylmethanesulfonate, epichlorohydrin, genotoxicity biosensors, *E. coli*, SOS response, *alkA* gene expression, comet assay, mice.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ ВИДОВ АЗИАТСКОЙ РОССИИ ПОДРОДОВ *Phacoxytropis* И *Tragacanthoxytropis* РОДА *Oxytropis* НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА МАРКЕРОВ ХЛОРОПЛАСТНОГО И ЯДЕРНОГО ГЕНОМОВ

© 2021 г. А. Б. Холина¹*, М. М. Козыренко¹, Е. В. Артюкова¹, М. Н. Колдаева²,
Д. В. Санданов³, И. Ю. Селютина⁴

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

²Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

³Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук, Улан-Удэ, 670047 Россия

⁴Центральный Сибирский ботанический сад Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: kholina@biosoil.ru

Поступила в редакцию 05.11.2020 г.

После доработки 15.12.2020 г.

Принята к публикации 18.01.2021 г.

На основе анализа нуклеотидного полиморфизма межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хлоропластной ДНК видов *Oxytropis* Азиатской России (*O. tragacanthoides* секции *Hystrix* подрода *Tragacanthoxytropis*, *O. coerulea*, *O. filiformis* и *O. mandshurica* секции *Janthina* и *O. deflexa* и *O. glabra* секции *Mesogaea* подрода *Phacoxytropis*) установлено, что все популяции характеризуются высоким гаплотипическим разнообразием (*h* изменяется от 0.676 до 1.000), кроме видов секции *Mesogaea* (*h* изменяется от 0 до 0.333). Обнаружены видоспецифичные маркеры у *O. tragacanthoides*, *O. deflexa*, *O. glabra* и *O. mandshurica*, а также специфичные маркеры для секции *Mesogaea*. Реконструкция филогенетических связей хлоротипов видов подродов *Phacoxytropis*, *Tragacanthoxytropis* и *Oxytropis* показала, что виды секции *Janthina* с высокой достоверностью объединяются в одну кладу с видами подродов *Tragacanthoxytropis* и *Oxytropis*, однако взаимоотношения их остались неразрешенными. Анализ генеалогических связей риботипов ITS ядерной ДНК выявил общий риботип у видов *O. tragacanthoides*, *O. coerulea*, *O. lanata*, *O. chankaensis*, *O. oxyphylla* и *O. triphylla*, относящихся к трем подродам. Выявленная генетическая близость при четких морфологических различиях характерна для таксонов с общим происхождением, испытавших относительно недавнюю быструю адаптивную радиацию. Полученные данные полиморфизма маркеров ядерного и хлоропластного геномов подтверждают статус *O. coerulea*, *O. filiformis* и *O. mandshurica* как самостоятельных видов.

Ключевые слова: *Oxytropis*, Fabaceae, генетическое разнообразие, филогенетические связи, хлоропластная ДНК, ITS.

DOI: 10.31857/S0016675821090058

Род *Oxytropis* DC. (сем. Fabaceae) сформировался предположительно около 5.6 млн лет назад на границе миоцена–плиоцена [1, 2] в ходе эволюции древних видов рода *Astragalus* L. подрода *Phaca* (L.) Bunge [2, 3]. По морфологическим признакам и экологии к ним наиболее близки виды *Oxytropis deflexa* (Pall.) DC. и *O. glabra* (Lam.) DC. секции *Mesogaea* Bunge подрода *Phacoxytropis* Bunge [2–4]. Только эти два вида секции представлены во флоре Азиатской России [5]. *O. deflexa* — это восточносибирско-североамериканский вид, который обнаруживает значительный

полиморфизм на протяжении обширного прерывистого ареала [4–6]; считается реликтом, наиболее древним видом секции [3]; занесен в региональные Красные книги, так как существует в изолированных малочисленных популяциях. *O. glabra* — полиморфный вид, распространенный в европейской части России (Башкирия, р. Урал), Средней и Центральной Азии, Монголии и Северо-Западном Китае [5–7].

Подрод *Phacoxytropis* включает также секцию *Janthina* Bunge, виды которой морфологически сходны с видами секции *Mesogaea* [5]. В Азиат-

ской России секция *Janthina* представлена шестью видами: *O. kaspensis* Krasnob. et Pschen., *O. ladyginii* Kryl., *O. saposhnikovii* Kryl., *O. coerulea* (Pall.) DC., *O. filiformis* DC., *O. mandshurica* Bunge, отношения между тремя последними видами довольно сложные [5]. Малышев [5] отмечал, что *O. filiformis* плохо отличается от *O. coerulea* и интрогрессирует с ней в Предбайкалье и Забайкалье; *O. filiformis* и *O. mandshurica* — это самостоятельные виды; *O. caerulea* (Pall.) DC. и *O. coerulea* Turcz. являются синонимами *O. coerulea* (Pall.) DC. Авторы работы “Флора Китая” [6] для *O. filiformis* в качестве синонима приводят *O. coerulea* Turcz., а для *O. caerulea* (Pall.) DC. — *O. mandshurica*, и относят *O. filiformis* и *O. caerulea* к секции *Eumorpha* (Bge.) Abduss., которую вместе с секциями *Mesogaea* и *Janthina* помещают в подрод *Oxytropis* ex genere *Oxytropis* DC. В дальнейшем исследование нуклеотидного полиморфизма маркеров хлоропластного генома видов Азиатской России подродов *Oxytropis* и *Phacoxytropis* [8] показало, что подроду *Phacoxytropis* корреспондирует лишь секция *Mesogaea*, а секция *Janthina* этого же подрода объединяется с секциями *Orobia* Bunge, *Verticillares* DC. и *Xerobia* Bunge подрода *Oxytropis*. Кроме того, были выявлены молекулярные различия между *O. coerulea* и *O. mandshurica*, которые свидетельствуют о самостоятельности этих таксонов. Однако до сих пор существуют противоречия и другие нерешенные вопросы.

Подрод *Tragacanthoxytropis* Vass. является иной древней ветвью рода *Oxytropis*. Виды этого подрода представлены кустарничковыми формами и морфологически резко отличаются от видов других подродов [3, 9]. Одним из наиболее интересных видов подрода *Tragacanthoxytropis* является *O. tragacanthoides* Fisch. ex DC. секции *Hystrix* Bunge. Это горно-степной вид с прерывистым ареалом, встречается в Центральном и Юго-Восточном Алтае и Монголии, изредка отмечается в Тувинской котловине и Хакасии, где проходит северная граница ареала, а также в нескольких пунктах Прибайкалья [5, 9]. *O. tragacanthoides* считается реликтом миоценовой флоры [3, 9]; занесен в региональные Красные книги как вид уязвимый, находящийся под угрозой исчезновения, и как вид, возможно, исчезнувший.

Данная работа является продолжением популяционных исследований эндемичных видов *Oxytropis* [10–14] и филогенетических связей видов секций *Verticillares* [15], *Orobia* [16], *Arctobia* [17] и подродов рода *Oxytropis* [8] по данным секвенирования межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хлоропластной ДНК (хпДНК) и ITS ядерной ДНК (рДНК).

Цель исследования — изучение генетического разнообразия и популяционной структуры видов *Oxytropis* Азиатской России секций *Mesogaea* и *Janthina* подрода *Phacoxytropis*, секции *Hystrix* под-

рода *Tragacanthoxytropis* и реконструкция филогенетических связей видов подродов *Phacoxytropis*, *Tragacanthoxytropis* и *Oxytropis* по данным изменчивости нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хпДНК и ITS рДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом служили 124 растения, относящиеся к шести видам: *O. tragacanthoides* (20 образцов) секции *Hystrix* подрода *Tragacanthoxytropis*, *O. coerulea* (18), *O. filiformis* (20) и *O. mandshurica* (34) секции *Janthina*, *O. deflexa* (25) и *O. glabra* (7) секции *Mesogaea* подрода *Phacoxytropis* из 22 природных местонахождений (табл. 1, рис. 1). Названия видов, секций и подродов рода *Oxytropis* приведены согласно обработке Малышева [5].

ДНК экстрагировали из лиофильно высушенных листьев. Буфер для экстракции содержал 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 0.7 М NaCl, 40 мМ EDTA, 1% СТАВ (hexadecyltrimethylammonium bromide) и 10 мл/л β-меркаптоэтанола. Экстракт инкубировали при 65°C в течение 40 мин. ДНК депротеинизировали смесью хлороформ : октанол (24 : 1) и осаждали равным объемом изопропанола в присутствии 0.3 М ацетата натрия. ДНК промывали 75%-ным этанолом и растворяли в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl (рН 8.0) и 1 мМ EDTA. Количество ДНК в образце определяли путем сравнения с ДНК фага лямбда известной концентрации методом электрофореза в 1.4%-ном агарозном геле [10]. Методы амплификации межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* приведены в наших предыдущих работах [8, 12, 13]. ITS регион рДНК амплифицирован с праймерами ITS1 и ITS4 в реакционных условиях и температурном режиме, приведенных в работе [18]. Циклическое секвенирование обеих цепей фрагментов ДНК осуществляли с использованием набора флуоресцентно меченых нуклеотидов Big Dye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности прямых и обратных цепей определяли на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems), затем редактировали и собирали с помощью пакета программ Staden Package v. 1.5 [19]. Для каждого образца последовательности регионов выравнивали в программе SeaView v. 4.7 [20].

Матрицу объединенных последовательностей трех спейсеров хпДНК использовали для расчета гаплотипического (*h*) и нуклеотидного (*π*) разнообразия (для популяций с числом образцов пять и более), степени дивергенции (*D_{xy}*) между популяциями/видами на основе нуклеотидных замен, для анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) и для идентификации гаплотипов с помощью пакетов программ Arlequin v. 3.5 [21] и DnaSP v. 5.0 [22]. Статистическую значимость (*P*) индексов

Таблица 1. Исследуемые популяции видов *Oxytropis* подродов *Tragasanthoxytropis* и *Phasoxytropis* и параметры генетического разнообразия по данным хПДНК

Вид, местонахождение (число образцов)	Координаты с.ш., в.д.	Код	Гаплотип	Разнообразие	
				<i>h</i> (SD)	π (SD)
Подрод <i>Tragasanthoxytropis</i>					
Секция <i>Hustrix</i>					
<i>O. tragasanthoides</i>					
Республика Алтай, плато Укок, правобережье р. Жумалы, высота 2422 м (10)	49.51°, 88.06°	TRA1	P1–P7	0.867 (0.107)	0.0048 (0.0027)
Республика Алтай, окр. с. Чаган-Узун, высота 1780 м (5)	50.10°, 88.38°	TRA2	P8–P10	0.700 (0.218)	0.0008 (0.0006)
Монголия, Центральный аймак, окр. сомона Ундэрширээт, высота 1282 м (5)	47.55°, 105.11°	TRA3	P11–P13	0.800 (0.164)	0.0005 (0.0004)
Подрод <i>Phasoxytropis</i>					
Секция <i>Janthina</i>					
<i>O. coerulea</i>					
Республика Бурятия, окр. с. Заиграево, высота 675 м (5)	51.87°, 108.24°	COE1	P14–P17	0.900 (0.161)	0.0017 (0.0012)
Иркутская обл., окр. с. Сарма, высота 476 м (12)	53.12°, 106.85°	COE2	P18–P27	0.970 (0.044)	0.0046 (0.0025)
Иркутская обл., западное побережье оз. Байкал, окр. п. Сахюрта (1)	53.01°, 106.89°	COE3	P28	–	–
<i>O. filiformis</i>					
Забайкальский край, окр. оз. Ножий, высота 686 м (4)	50.82°, 114.72°	FIL1	P29–P32	–	–
Монголия, Центральный аймак, окр. сомона Аргалант, высота 1488 м (5)	47.77°, 105.90°	FIL2	P29, P33–P36	1.000 (0.126)	0.0048 (0.0031)
Монголия, Восточный аймак, окр. сомона Гурванзагал, высота 837 м (2)	48.86°, 115.11°	FIL3	P37, P38	–	–
Монголия, Восточный аймак, окр. сомона Гурванзагал, высота 797 м (9)	49.27°, 114.71°	FIL4	P30, P37, P39–P41	0.722 (0.159)	0.0012 (0.0008)

Таблица 1. Окончание

Вид, местонахождение (число образцов)	Координаты с.ш., в.д.	Код	Гаплотип	Разнообразие	
				<i>h</i> (SD)	π (SD)
<i>O. mandshurica</i>					
Приморский край, Сихотэ-Алинский заповедник, бух. Удобная (15)	44.95°, 136.55°	MAN1	P42–P47	0.838 (0.061)	0.0015 (0.0009)
Приморский край, Сихотэ-Алинский заповедник, кордон “Благодатное” (4)	45.21°, 136.53°	MAN2	P45	–	–
Приморский край, окр. г. Дальнегорск, падь Барачная (15)	44.57°, 135.62°	MAN3	P42, P45, P48, P49	0.676 (0.101)	0.0004 (0.0003)
<i>Секция Mesogaea</i>					
<i>O. deflexa</i>					
Республика Бурятия, Джергинский заповедник, урочище Биранкур (2)	55.11°, 111.46°	DEF1	P50, P51	–	–
Республика Тыва, Саянский перевал (1)	51.43°, 89.53°	DEF2	P52	–	–
Магаданская обл., окр. г. Сусуман (9)	62.83°, 148.22°	DEF3	P53, P54	0.222 (0.166)	0.0098 (0.0054)
Магаданская обл., окр. с. Оротук, надпойменная терраса р. Колыма (9)	62.10°, 148.49°	DEF4	P54	0.000 (0.000)	0.0000 (0.0000)
Магаданская обл., п-ов Пьягина, мыс Средний, у ручья (1)	59.32°, 154.57°	DEF5	P55	–	–
Магаданская обл., пос. Сеймчан (1)	62.93°, 152.39°	DEF6	P55	–	–
Восточный Таймыр, район слияния рек Большая Лесная Рассоха и Новая (2)	72.60°, 101.26°	DEF7	P55, P56	–	–
<i>O. glabra</i>					
Республика Бурятия, окр. с. Оронгой, высота 528 м (6)	51.55°, 107.03°	GLA1	P57, P58	0.333 (0.215)	0.0001 (0.0002)
Красноярский край, окр. с. Темра, берег оз. Гнилое (1)	55.43°, 89.27°	GLA2	P59	–	–

Примечание. SD – стандартное отклонение.

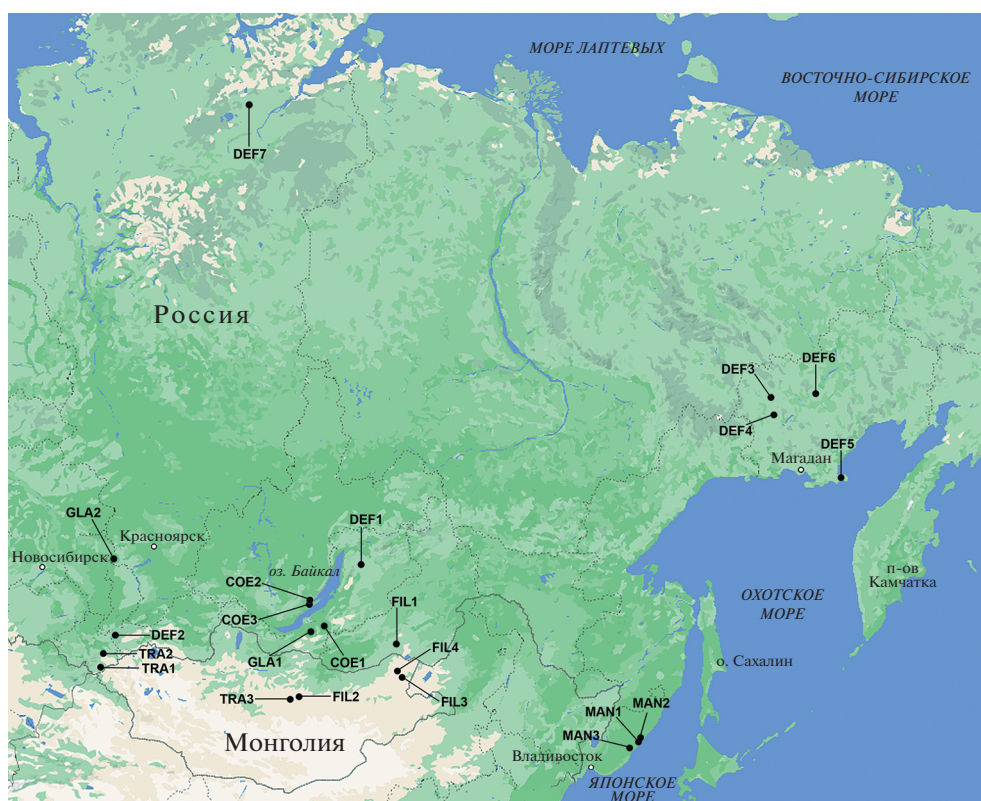


Рис. 1. Карта-схема с указанием мест сбора растений видов *Oxytropis tragacanthoides* секции *Hystrix* подрода *Tragacanthoxytropis*, *O. coerulea*, *O. filiformis* и *O. mandshurica* секции *Janthina*, *O. deflexa* и *O. glabra* секции *Mesogaea* подрода *Phacoxytropis* из 22 природных местонахождений. Код популяции см. табл. 1.

фиксации (Φ_{ST}) оценивали на основе 1023 пермутаций. Филогенетический анализ проводили методами ML, MP и NJ с помощью пакета программ RAUP v. 4.0b10 [23]. Оптимальную модель эволюции нуклеотидных замен для ML-анализа выбирали в программе Modeltest v. 3.06 [24] с использованием иерархических тестов. Для ML и MP анализов применяли эвристический поиск оптимальной топологии с алгоритмом TBR (Tree Bisection-Reconnection). Статистическую достоверность порядка ветвления оценивали с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев (BP, %). Кроме того, был использован баесовский подход (Bayesian Inference, BI) в программе MrBayes 3.1.6 [25] на портале CIPRES (<http://www.phylo.org/>) [26]. Для оценки достоверности определены апостериорные вероятности (Posterior Probabilities, PP). Значения BP < 50% и PP < 0.95 не рассматривались. В качестве внешней группы были использованы полученные нами ранее [8] нуклеотидные последовательности этих же спейсеров (LM653198, LM653161, LM653235) *A. davuricus* (Pall.) DC. Генеалогические связи риботипов ITS рДНК анализировали методом медианного связывания (MJ) в программе Network v. 5.0.1.1 [27], кодируя каждую делецию/вставку, независимо от ее размера, как единичное мутационное событие. В ка-

честве внешней группы была использована полученная нами ранее последовательность ITS (LM653272) *A. davuricus*.

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нуклеотидные последовательности каждого из регионов *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хпДНК у 124 образцов исследованных видов характеризуются относительно низкой нуклеотидной изменчивостью и разной длиной вследствие присутствия коротких (1–8 пн) и длинных (52–168 пн) инсерций/делеций (инделей), моно- и динуклеотидных повторов. Длина объединенной матрицы трех регионов после выравнивания составила 2769 сайтов. Обнаружено 42 варибельные нуклеотидные замены, из них 38 были информативны согласно методу максимальной экономии и 4 единичные. Выявлено 59 хлоротипов (P1–P59), из них 40 (67.8%) уникальные, общих хлоротипов у видов не обнаружено (табл. 1). Последовательности хлоротипов депонированы в GenBank/ENA/EMBL-EBI, номера доступа приведены в табл. 2. У всех изученных видов, кроме

O. coerulea и *O. filiformis*, обнаружены видоспецифичные маркеры. Так, последовательности *O. mandshurica* и *O. tragacanthoides* имеют нуклеотид А в позициях 862 и 1658 соответственно. У *O. deflexa* выявлены четыре нуклеотидные замены (Т в позициях 332 и 1406, С в позиции 2105, G в позиции 1410) и вставка 97–110 пн (позиции 684–793); у *O. glabra* — шесть нуклеотидных замен (G в позициях 261, 332, 1935, 2099, 2597 и Т в позиции 2346) и делеция нуклеотида А в позиции 861. Кроме того, обнаружены маркерные нуклеотидные замены, специфичные для секции *Mesogaea*: все последовательности представителей этой секции имеют шесть замен (G в позиции 136, Т в позиции 618, С в позициях 650 и 1087, А в позициях 1393 и 1394) и шесть инделей длиной от 1 до 6 пн, отсутствующих у других. Популяции *O. tragacanthoides* подрода *Tragacanthoxytropis* и видов *O. coerulea*, *O. filiformis* и *O. mandshurica* секции *Janthina* подрода *Phacoxytropis* характеризуются высоким гаплотипическим и низким/средним нуклеотидным разнообразием, а популяция *O. glabra* — низким гаплотипическим и нуклеотидным разнообразием. В популяции *O. deflexa* DEF3 при низком гаплотипическом разнообразии выявлен достаточно высокий уровень нуклеотидного разнообразия, а популяция DEF4 оказалась мономорфной (табл. 1).

Согласно результатам AMOVA (табл. 3), самые большие и значимые межпопуляционные различия у *O. deflexa* и у *O. tragacanthoides* ($\Phi_{ST} = 0.81602$ и $\Phi_{ST} = 0.75975$ соответственно, $P < 0.0001$), около 35% от общей генетической изменчивости приходится на межпопуляционную компоненту у *O. coerulea* и у *O. mandshurica* ($\Phi_{ST} = 0.34055$, $P < 0.05$ и $\Phi_{ST} = 0.33889$, $P < 0.0001$ соответственно). Статистически незначимая высокая дифференциация определена между популяциями *O. glabra* ($\Phi_{ST} = 0.71429$, $P > 0.05$), а у *O. filiformis* дифференциация между популяциями отсутствует ($\Phi_{ST} = -0.08489$, $P > 0.05$). Другим показателем степени генетической разобщенности между популяциями является дивергенция нуклеотидных последовательностей (D_{xy}). У *O. tragacanthoides* межпопуляционные значения D_{xy} (среднее число нуклеотидных замен на один сайт и среднее число нуклеотидных различий (число фиксированных различий)) изменяются от 0.00142 до 0.00226 и от 3.400 (3) до 5.400 (2) соответственно. Наименьшие значения D_{xy} определены между популяциями у *O. mandshurica* и у *O. filiformis* (табл. 4), наибольшие — между популяциями *O. deflexa*, между двумя популяциями *O. glabra* дивергенция отсутствует (табл. 5).

В табл. 6 приведены значения D_{xy} между видами. Низкая дивергенция определена между *O. coerulea* и *O. filiformis*, значение которой ниже таковых между популяциями *O. coerulea* (табл. 4). Дивергенция между *O. filiformis* и *O. mandshurica* соответствует межпопуляционным значениям, а дивергенция

O. coerulea от *O. mandshurica* в ≈ 1.4 раза превышает межпопуляционную. Нуклеотидная дивергенция *O. tragacanthoides* от видов секций *Janthina* в ≈ 1.8 раз выше межпопуляционных значений, а от видов секции *Mesogaea* в ≈ 5 раз выше (табл. 6). По данным иерархического AMOVA (табл. 3), дифференциация между *O. coerulea* и *O. filiformis* низка и незначима ($\Phi_{CT} = 0.19727$, $P > 0.075$), а дифференциация между тремя видами секций *Janthina* составляет более 57% ($\Phi_{CT} = 0.57412$, $P < 0.0001$). Наибольшие различия выявлены между секциями *Mesogaea* и *Janthina* ($\Phi_{CT} = 0.89754$, $P < 0.0001$), чуть меньшие — между *O. tragacanthoides* и секцией *Mesogaea* ($\Phi_{CT} = 0.79942$, $P < 0.004$), а генетические различия между *O. tragacanthoides* и секцией *Janthina* оказались ниже популяционных значений ($\Phi_{CT} = 0.32227$, $P < 0.009$).

Для реконструкции филогенетических связей в матрицу, включающую 46 из 59 выявленных хлоротипов видов двух подродов (некоторые уникальные хлоротипы были исключены в связи с большой представленностью), добавлены полученные нами ранее последовательности хлоротипов пяти видов подрода *Oxytropis*: *O. triphylla* (Pall.) Pers. (8 хлоротипов) секции *Xerobia* Bunge, *O. lanata* (Pall.) DC. (10) и *O. gracillima* Bunge (5) секции *Verticillares* DC., *O. sordida* (Willd.) Pers. (5) и *O. ochotensis* Bunge (10) секции *Orobia* Bunge (табл. 2). Длина объединенной матрицы 84 последовательностей хлоротипов трех регионов после выравнивания составила 2790 сайтов. Обнаружено 48 переменных нуклеотидных замен, из них 43 были информативны согласно методу максимальной экономии и 5 единичные. Общих хлоротипов у видов не обнаружено. Филогенетический анализ методами MP, NJ, ML дал деревья сходной топологии. На рис. 2 представлено MP-дерево (консенсус 10000 деревьев: длина 413 шагов, CI = 0.5617, HI = 0.4383, RI = 0.8002), в котором хлоротипы видов *Oxytropis* формируют две сестринские клады. Клада I с высокой степенью поддержки только в MP-анализе объединяет хлоротипы *O. deflexa* и *O. glabra* секции *Mesogaea* подрода *Phacoxytropis*, при этом хлоротипы каждого из видов формируют высокоподдержанные группы (рис. 2). Клада II с высокой степенью поддержки во всех анализах объединяет хлоротипы видов подродов *Tragacanthoxytropis*, *Oxytropis* и секции *Janthina* подрода *Phacoxytropis*, но взаимоотношения между ними остались неразрешенными. Хорошо поддерживаемые группы образуют хлоротипы видов *O. mandshurica*, *O. sordida*, *O. gracillima*, *O. lanata*. Следует отметить, что три хлоротипа *O. tragacanthoides* (P1, P3 и P4) подрода *Tragacanthoxytropis* объединились в одну группу со средней поддержкой в MP, ML, NJ и высокой в BI анализах с хлоротипами *O. triphylla* секции *Xerobia* подрода *Oxytropis* (рис. 2).

Таблица 2. Хлоротипы видов *Oxytropis* и номера доступа в GenBank/ENA/EMBL-EBI нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хлДНК

Хлоротип	Номер доступа		
	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnS-trnG</i>
<i>O. tragacanthoides</i>			
P1	MW172222	MW177548	MW177535
P2	MW172223	MW177549	MW177536
P3	MW172224	MW177550	MW177537
P4	MW172225	MW177551	MW177538
P5	MW172226	MW177552	MW177539
P6	MW172227	MW177553	MW177540
P7	MW172228	MW177554	MW177541
P8	MW172229	MW177555	MW177542
P9	MW172230	MW177556	MW177543
P10	MW172231	MW177557	MW177544
P11	MW172232	MW177558	MW177545
P12	MW172233	MW177559	MW177546
P13	MW172234	MW177560	MW177547
<i>O. coerulea</i>			
P14	LR898256	LR898302	LR898413
P15	LR898257	LR898303	LR898414
P16	LR898258	LR898304	LR898415
P17	LR898259	LR898305	LR898416
P18	LR898260	LR898306	LR898417
P19	LR898261	LR898307	LR898418
P20	LR898262	LR898308	LR898419
P21	LR898263	LR898309	LR898420
P22	LR898264	LR898310	LR898421
P23	LR898265	LR898311	LR898422
P24	LR898266	LR898312	LR898423
P25	LR898267	LR898313	LR898424
P26	LR898268	LR898314	LR898425
P27	LR898269	LR898315	LR898426
P28	LR898270	LR898316	LR898427
<i>O. filiformis</i>			
P29	LR898271	LR898317	LR898428
P30	LR898272	LR898318	LR898429
P31	LR898273	LR898319	LR898430
P32	LR898274	LR898320	LR898431
P33	LR898275	LR898321	LR898432
P34	LR898276	LR898322	LR898433
P35	LR898277	LR898323	LR898434
P36	LR898278	LR898324	LR898435
P37	LR898278	LR898325	LR898436
P38	LR898280	LR898326	LR898437
P39	LR898281	LR898327	LR898438
P40	LR898282	LR898328	LR898439

Таблица 2. Продолжение

Хлоротип	Номер доступа		
	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnS-trnG</i>
P41	LR898283	LR898329	LR898440
<i>O. mandshurica</i>			
P42	LR898284	LR898330	LR898441
P43	LR898285	LR898331	LR898442
P44	LR898286	LR898332	LR898443
P45	LR898287	LR898333	LR898444
P46	LR898288	LR898334	LR898445
P47	LR898289	LR898335	LR898446
P48	LR898290	LR898336	LR898447
P49	LR898291	LR898337	LR898448
<i>O. deflexa</i>			
P50	LR898292	LR898338	LR898449
P51	LR898293	LR898339	LR898450
P52	LR898294	LR898340	LR898451
P53	LR898295	LR898341	LR898452
P54	LR898296	LR898342	LR898453
P55	LR898297	LR898343	LR898454
P56	LR898298	LR898344	LR898455
<i>O. glabra</i>			
P57	LR898299	LR898345	LR898456
P58	LR898300	LR898346	LR898457
P59	LR898301	LR898347	LR898458
<i>O. triphylla</i>*			
H1	LT856461	LT856494	LT856527
H2	LT856462	LT856495	LT856528
H3	LT856463	LT856496	LT856529
H4	LT856464	LT856497	LT856530
H5	LT856465	LT856498	LT856531
H6	LT856466	LT856499	LT856532
H7	LT856467	LT856500	LT856533
H10	LT856472	LT856505	LT856538
<i>O. lanata</i>**			
V1	LT994841	LT994895	LT994949
V3	LT994843	LT994897	LT994951
V4	LT994844	LT994898	LT994952
V5	LT994845	LT994899	LT994953
V7	LT994847	LT994901	LT994955
V9	LT994849	LT994903	LT994957
V13	LT994853	LT994907	LT994961
V14	LT994854	LT994908	LT994962
V16	LT994856	LT994910	LT994964
V18	LT994858	LT994912	LT994966

Таблица 2. Окончание

Хлоротип	Номер доступа		
	<i>psbA–trnH</i>	<i>trnL–trnF</i>	<i>trnS–trnG</i>
<i>O. gracillima</i>**			
V58	<i>MH174938</i>	<i>LT996062</i>	<i>LT996067</i>
V59	<i>LT996058</i>	<i>LT996063</i>	<i>LT996068</i>
V60	<i>LT996059</i>	<i>LT996064</i>	<i>LT996069</i>
V61	<i>LT996060</i>	<i>LT996065</i>	<i>LT996070</i>
V62	<i>LT996061</i>	<i>LT996066</i>	<i>LT996071</i>
<i>O. sordida</i>***			
H1	<i>LS991870</i>	<i>LS991896</i>	<i>LS991922</i>
H2	<i>LS991871</i>	<i>LS991897</i>	<i>LS991923</i>
H3	<i>LS991872</i>	<i>LS991898</i>	<i>LS991924</i>
H4	<i>LS991873</i>	<i>LS991899</i>	<i>LS991925</i>
H5	<i>LS991874</i>	<i>LS991900</i>	<i>LS991926</i>
<i>O. ochotensis</i>****			
H1	<i>MK806162</i>	<i>MK806201</i>	<i>MK806240</i>
H2	<i>MK806163</i>	<i>MK806202</i>	<i>MK806241</i>
H3	<i>MK806164</i>	<i>MK806203</i>	<i>MK806242</i>
H4	<i>MK806165</i>	<i>MK806204</i>	<i>MK806243</i>
H5	<i>MK806166</i>	<i>MK806205</i>	<i>MK806244</i>
H7	<i>MK806168</i>	<i>MK806207</i>	<i>MK806246</i>
H9	<i>MK806170</i>	<i>MK806209</i>	<i>MK806248</i>
H11	<i>MK806172</i>	<i>MK806211</i>	<i>MK806250</i>
H12	<i>MK806173</i>	<i>MK806212</i>	<i>MK806251</i>
H14	<i>MK806175</i>	<i>MK806214</i>	<i>MK806253</i>

Примечание. Номера доступа, выделенные курсивом, приведены в предыдущих исследованиях: * – [12], ** – [15], *** – [14], **** – [16].

Регион ITS рДНК отсекуенирован у 49 образцов: *O. tragacanthoides* (13), *O. coerulea* (11), *O. filiformis* (7), *O. mandshurica* (9), *O. deflexa* (6) и *O. glabra* (3), представляющих большинство выявленных в данной работе хлоротипов хпДНК. ITS регион характеризуется одинаковой длиной (603 пн) и низкой нуклеотидной изменчивостью: 592 сайта были мономорфными и 11 вариabельными и информативными согласно методу максимальной экономии. Шесть замен (позиции 57, 68, 90, 122, 200, 201) обнаружено в спейсере ITS1 и пять (позиции 422, 427, 513, 548, 555) – в ITS2. Выявлено шесть риботипов: *O. coerulea* принадлежат два риботипа (RP1 и RP2), у всех других видов по одному: *O. filiformis* – RP3, *O. mandshurica* – RP4, *O. deflexa* – RP5, *O. glabra* – RP6, *O. tragacanthoides* – RP1, который является общим с *O. coerulea*. Последовательности риботипов видов депонированы в GenBank/ENA/EMBL-EBI под номерами доступа MW186811, LR898459–LR898464. Для выявления генеалогических связей в матрицу риботипов видов двух подродов были добавлены полученные нами ра-

нее последовательности ITS видов подрода *Oxytropis*: *O. triphylla* (MW015143) секции *Xerobia*, *O. lanata* (LM653259, LM653260), *O. chankaensis* Jurtz. (FR839001, FR839010) и *O. oxyphylla* (Pall.) DC. (FR839000) секции *Verticillares* и *O. ochotensis* (MK795939, MK795941–MK795943) секции *Orobia*, а также *A. davuricus* в качестве внешней группы. Построенная медианная сеть представлена на рис. 3. Наиболее близким видом к *Astragalus* является *O. deflexa*, риботип которого через 42 мутационных шага и гипотетический риботип (вымерший или не выявленный в данном исследовании) связан с риботипом *A. davuricus*. Пять мутационных шагов и гипотетический риботип разделяют виды *O. deflexa* и *O. glabra* секции *Mesogaea* подрода *Phacoxytropis*. К ним близки риботипы *O. mandshurica* и *O. filiformis* секции *Janthina* этого же подрода. Наиболее распространенный и общий для шести видов, относящихся к трем подкладам, риботип RP1 занимает центральное положение в сети и образует звездчатую структуру с другими рибо-

Таблица 3. Распределение генетической изменчивости (AMOVA) между группами *Oxytropis*

Источник дисперсии	Генетические различия (%) между		
	группами	популяциями внутри групп	особями в популяции
Популяции видов <i>Oxytropis</i>			
Одна группа: (популяции <i>O. tragacanthoides</i>)	—	75.97*	24.03
Одна группа: (популяции <i>O. coerulea</i>)	—	34.05**	65.95
Одна группа: (популяции <i>O. filiformis</i>)	—	—8.49 ns	108.49
Одна группа: (популяции <i>O. mandshurica</i>)	—	33.89*	66.11
Одна группа: (популяции <i>O. deflexa</i>)	—	81.60*	18.4
Одна группа: (популяции <i>O. glabra</i>)	—	71.43 ns	28.57
Две группы: (популяции <i>O. coerulea</i>) и (популяции <i>O. filiformis</i>)	19.72 ns	16.51**	32.98*
Три группы: (популяции <i>O. coerulea</i>), (популяции <i>O. filiformis</i>) и (популяции <i>O. mandshurica</i>)	57.41*	10.03**	32.56*
Две группы: (популяции <i>O. deflexa</i>) и (популяции <i>O. glabra</i>)	74.74**	21.17*	4.09*
Две группы: (популяции видов секции <i>Janthina</i>) и (популяции видов секции <i>Mesogaea</i>)	89.75*	8.91*	1.33*
Две группы: (популяции <i>O. tragacanthoides</i>) и (популяции видов секции <i>Janthina</i>)	32.23**	44.68*	23.09*
Две группы: (популяции <i>O. tragacanthoides</i>) и (популяции видов секции <i>Mesogaea</i>)	79.94**	18.32*	1.74*

Примечание. * $P < 0.0001$; ** $P < 0.05$; ns — незначимое. Уровень значимости определен на основе 1023 пермутаций.

Таблица 4. Нуклеотидная дивергенция между популяциями видов *Oxytropis coerulea*, *O. filiformis* и *O. mandshurica* секции *Janthina* подрода *Phacoxytropis*

Популяция	COE1	COE2	COE3	FIL1	FIL2	FIL3	FIL4	MAN1	MAN2	MAN3
COE1	—	3.917 (2)	4.000 (4)	0.000 (0)	0.200 (0)	0.000 (0)	0.000 (0)	4.067 (4)	4.000 (4)	4.000 (4)
COE2	0.00164	—	4.250 (2)	3.917 (2)	4.117 (2)	3.917 (2)	3.917 (2)	6.317 (4)	6.250 (4)	6.250 (4)
COE3	0.00168	0.00178	—	4.000 (4)	4.200 (4)	4.000 (4)	4.000 (4)	4.067 (4)	4.000 (4)	4.000 (4)
FIL1	0.00000	0.00164	0.00168	—	0.200 (0)	0.000 (0)	0.000 (0)	4.067 (4)	4.000 (4)	4.000 (4)
FIL2	0.00008	0.00173	0.00176	0.00008	—	0.200 (0)	0.200 (0)	4.267 (4)	4.200 (4)	4.200 (4)
FIL3	0.00000	0.00164	0.00168	0.00000	0.00008	—	0.000 (0)	4.067 (4)	4.000 (4)	4.000 (4)
FIL4	0.00000	0.00164	0.00168	0.00000	0.00008	0.00000	—	4.067 (4)	4.000 (4)	4.000 (4)
MAN1	0.00170	0.00265	0.00170	0.00170	0.00179	0.00170	0.00170	—	0.067 (0)	0.067 (0)
MAN2	0.00167	0.00262	0.00167	0.00167	0.00176	0.00167	0.00167	0.00003	—	0.000 (0)
MAN3	0.00167	0.00262	0.00167	0.00167	0.00176	0.00167	0.00167	0.00003	0.00000	—

Примечание. Выше диагонали — среднее число нуклеотидных различий (число фиксированных различий), ниже диагонали — среднее число нуклеотидных замен на один сайт. Код популяции см. табл. 1.

типами, связанными одномутационными переходами (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое разнообразие исследованных популяций видов *O. tragacanthoides* подрода *Tragacanthoxytropis* и *O. coerulea*, *O. filiformis* и *O. mandshurica* секции *Janthina* подрода *Phacoxytropis* характеризуется сочетанием высоких значений гаплотипиче-

ского и низких/средних значений нуклеотидного разнообразия (табл. 1), которое было отмечено для ряда эндемичных видов *Oxytropis* [12], некоторых популяций *O. glandulosa* [13] и *O. ruthenica* [16], а также других представителей сем. Fabaceae — *As-tragalus onobrychis* L. [28], видов рода *Sophora* L. [29]. Это указывает на быстрый рост популяции после падения численности, сопровождающийся восстановлением гаплотипической изменчивости за счет мутационного процесса [28, 30]. Низ-

Таблица 5. Нуклеотидная дивергенция между популяциями видов *Oxytropis deflexa* и *O. glabra* секции *Mesogaea* подрода *Phacoxytropis*

Популяция	DEF1	DEF2	DEF3	DEF4	DEF5	DEF6	DEF7	GLA1	GLA2
DEF1	—	4.000 (2)	4.000 (2)	4.000 (2)	6.000 (4)	6.000 (4)	6.000 (4)	15.000 (13)	15.000 (13)
DEF2	0.00175	—	0.000 (0)	0.000 (0)	3.000 (3)	3.000 (3)	3.000 (3)	14.000 (14)	14.000 (14)
DEF3	0.00167	0.00000	—	0.000 (0)	3.000 (3)	3.000 (3)	3.000 (3)	16.000 (16)	16.000 (16)
DEF4	0.00167	0.00000	0.00000	—	3.000 (3)	3.000 (3)	3.000 (3)	16.000 (16)	16.000 (16)
DEF5	0.00263	0.00131	0.00131	0.00131	—	0.000 (0)	0.000 (0)	12.000 (12)	12.000 (12)
DEF6	0.00263	0.00131	0.00131	0.00131	0.00000	—	0.000 (0)	12.000 (12)	12.000 (12)
DEF7	0.00263	0.00131	0.00131	0.00131	0.00000	0.00000	—	12.000 (12)	12.000 (12)
GLA1	0.00661	0.00639	0.00705	0.00705	0.00547	0.00547	0.00547	—	0.000 (0)
GLA2	0.00661	0.00638	0.00705	0.00705	0.00547	0.00547	0.00547	0.00000	—

Примечание. См. примечание к табл. 4.

Таблица 6. Нуклеотидная дивергенция между видами *Oxytropis* подродов *Tragacanthoxytropis* и *Phacoxytropis*

Вид	<i>O. tragacanthoides</i>	<i>O. coerulea</i>	<i>O. filiformis</i>	<i>O. mandshurica</i>	<i>O. deflexa</i>	<i>O. glabra</i>
<i>O. tragacanthoides</i>	—	7.939 (2)	7.600 (5)	7.579 (5)	22.910 (14)	22.800 (20)
<i>O. coerulea</i>	0.00334	—	2.883 (0)	5.529 (2)	24.829 (16)	24.389 (21)
<i>O. filiformis</i>	0.00320	0.00121	—	4.079 (4)	23.490 (18)	23.050 (23)
<i>O. mandshurica</i>	0.00318	0.00232	0.00171	—	21.549 (17)	22.029 (22)
<i>O. deflexa</i>	0.01097	0.01193	0.01128	0.01034	—	13.600 (10)
<i>O. glabra</i>	0.01031	0.01106	0.01044	0.00994	0.00620	—

Примечание. См. примечание к табл. 4.

кое гаплотипическое разнообразие в популяциях видов *O. deflexa* и *O. glabra* секции *Mesogaea* подрода *Phacoxytropis* (табл. 1) может быть следствием дрейфа генов в изолированных малочисленных популяциях и влияния отбора в суровых условиях существования. Высокий уровень межпопуляционной дифференциации у *O. deflexa* (табл. 3) объясняется, в первую очередь, значительной географической удаленностью местонахождений (Южная Сибирь, Магаданская обл., Таймыр, рис. 1). Отсутствие нуклеотидной дивергенции между удаленными популяциями *O. glabra* (табл. 5) может быть проявлением анцестрального полиморфизма широко распространенного вида. У *O. deflexa* и *O. glabra* выявлены видоспецифичные маркерные нуклеотидные замены хпДНК, а также маркерные замены для секции *Mesogaea*. Виды секции *Mesogaea* значительно дивергированы от видов секции *Janthina* этого же подрода и *O. tragacanthoides* подрода *Tragacanthoxytropis* (табл. 6). Базальная позиция риботипов ITS рДНК *O. deflexa* и *O. glabra* в генеалогической сети (рис. 3) свидетельствует об их более древнем происхождении. Обособленное положение было показано ранее для *O. deflexa* [31] по данным полиморфизма маркеров TRPT ядерного и *matK* хлоропластного геномов, а также для *O. deflexa* и *O. glabra* по измен-

чивости ITS рДНК [32]. Кроме этого, изучение полиморфизма межгенного спейсера *trnL—trnF* и интрона *trnL* хпДНК видов *Oxytropis*, обитающих в Турции, показало, что *O. kotschyana* секции *Mesogaea* значительно дивергирована как от видов секции *Janthina*, так и от видов других подродов [33].

В данном исследовании секция *Janthina* представлена тремя видами. У *O. filiformis* отсутствует межпопуляционная дифференциация (табл. 3) и выявлен очень низкий уровень нуклеотидной дивергенции (табл. 4), что обусловлено, вероятно, активным обменом генами между близко расположенными популяциями. У *O. coerulea* популяции значительно дивергированы друг от друга (табл. 4), при этом такой же уровень нуклеотидной дивергенции выявлен между популяциями *O. coerulea* и *O. filiformis*, а между популяцией COE1 *O. coerulea*, расположенной восточнее оз. Байкал (Бурятия), и популяциями FIL1, FIL3 и FIL4 *O. filiformis* из Забайкалья и Монголии нуклеотидная дивергенция отсутствует (табл. 4). Результаты анализа полиморфизма межгенных спейсеров хпДНК (отсутствие видоспецифичных маркеров хпДНК и значимой генетической дифференциации у *O. coerulea* и *O. filiformis* и объединение хлоротипов в одну, хотя и слабо поддерживаемую, филогруппу (рис. 2)), указывают на генетическую близость этих двух

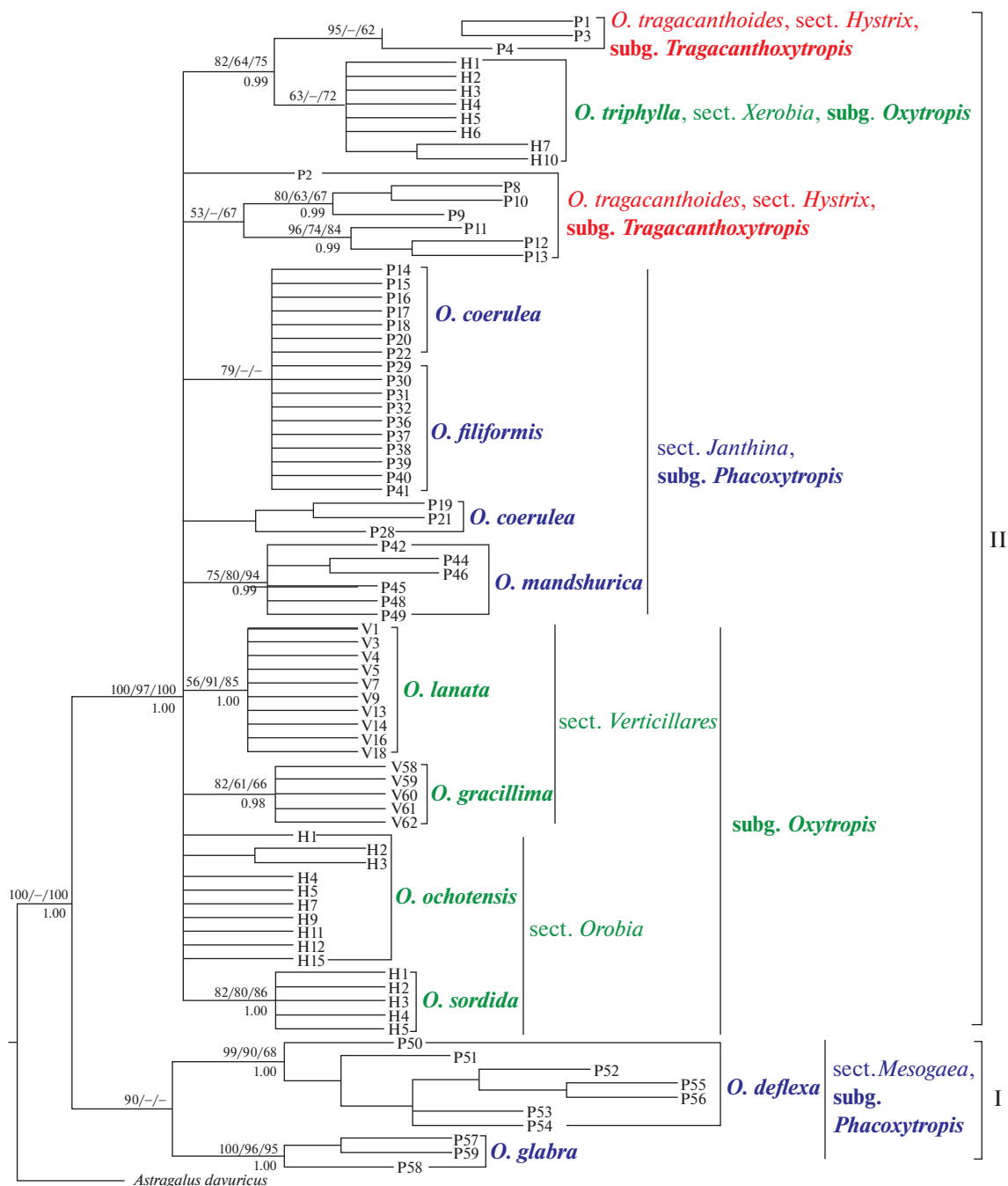


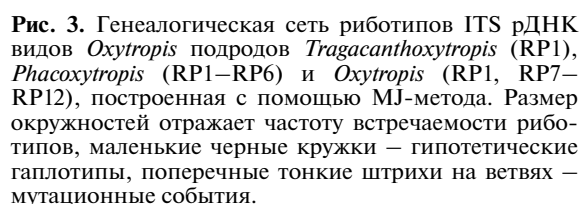
Рис. 2. МР-дерево филогенетических связей хлоротипов хпДНК видов *Oxytropis* подродов *Tragacanthoxytropis*, *Phacoxytropis* и *Oxytropis*. Числами над ветвью обозначены значения индекса бутстрэпа, рассчитанные для МР/НД/МЛ методов (>50%), под ветвью — значения апостериорной вероятности, рассчитанные для ВД анализа (>0.95). Названия видов, секций и подродов рода *Oxytropis* приведены согласно обработке Малышева [5].

видов, тем не менее отсутствие общих хлоротипов и наличие разных риботипов ITS рДНК подтверждают самостоятельность *O. coerulea* и *O. filiformis*. У *O. mandshurica* выявлен видоспецифичный маркер в спейсере *trnL*–*trnF* хпДНК, хлоротипы образуют высокоподдержанную филогруппу (рис. 2), отмечен индивидуальный риботип. Эти результа-

ты, а также высокий уровень дифференциации между видами секции *Janthina* (табл. 3), все в целом подтверждает статус *O. mandshurica* как самостоятельного вида.

Между популяциями *O. tragacanthoides* выявлены значительная нуклеотидная дивергенция и высокая межпопуляционная дифференциация,

Филогенетические связи хлоропипов видов *Oxytropis* Азиатской России подродов *Tragacanthoxytropis*, *Oxytropis* и секции *Janthina* подрода *Phacoxytropis*, образующих высокоподдержанную кладу II (рис. 2), остались неразрешенными. Кроме того, анализ генеалогических связей рибитов ITS рДНК выявил у видов *O. tragacanthoides*, *O. coerulea*, *O. lanata*, *O. chankaensis*, *O. oxyphylla* и *O. triphylla*, относящихся к этим трем подкладам, общий риботип RP1 (рис. 3). Все это может быть проявлением сетчатой эволюции, отмеченной для видов рода *Oxytropis* [5]. Выявленная генетическая близость при четких морфологических различиях характерна для таксонов с общим происхождением, испытавших относительно недавно быструю адаптивную радиацию, что отмечено для ряда родов сем. Fabaceae [1]. Учитывая обособление группы бобовых, в которую входят *Astragalus* и *Oxytropis*, около 39 млн лет назад [36], можно сказать, что дивергенция рода *Oxytropis*, появившегося на границе миоцена—плиоцена около 5.6 млн лет назад, была относительно недавней. Быстрая адаптивная радиация показана для видов *Oxytropis* [1] и других родов сем. Fabaceae: *Pultenaea* [37], *Astragalus* [38], *Sophora* [29] и др. Определенный вклад в полученную картину взаимосвязей видов *Oxytropis* трех подродов может вносить и происходившая на ранних этапах эволюции рода гибридизация между не полностью специализированными таксонами после быстрой радиации, но перед расхождением генеалогических линий, как это было отмечено для видов рода *Pultenaea* [37].



Авторы выражают благодарность И.Н. Поспелову и Е.Б. Поспеловой за предоставление образцов *O. deflexa* с п-ова Таймыр.

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. Shavvon R.S., Kazempour-Osaloo S., Maassoumi A.A. et al. Increasing phylogenetic support for explosively radiating taxa: The promise of high-throughput sequencing for *Oxytropis* (Fabaceae) // J. Syst. Evol. 2017. V. 55. № 4. P. 385–404. <https://doi.org/10.1111/jse.12269>
2. Положий А.В. К вопросу о происхождении и эволюции рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Бот. журн. 2003. Т. 88. № 10. С. 55–59.
3. Положий А.В. Флорогенетический анализ остролодочников Средней Сибири // Уч. зап. Томского гос. ун-та. Биология и почвоведение. 1965. № 51. С. 18–38.
4. Юрцев Б.А. *Oxytropis* DC. // Арктическая флора СССР. Л.: Наука, 1986. Вып. 9. Ч. 2. С. 61–146.
5. Малышев Л.И. Разнообразие рода Остролодка (*Oxytropis*) в Азиатской России // Turczaninowia. 2008. Т. 11. № 4. С. 5–141.
6. Zhu X., Welsh S.L., Ohashi H. *Oxytropis* // Flora of China. 2010. V. 10. P. 453–500. <http://www.efloras.org>.
7. Положий А.В. *Oxytropis* DC. — Остролодочник // Флора Сибири. Новосибирск: ВО “Наука”, 1994. Т. 9. С. 74–151.
8. Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В. и др. Филогенетические взаимоотношения видов *Oxytropis* DC. subg. *Oxytropis* и *Phacoxytropis* (Fabaceae) Азиатской России на основе анализа нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров хлоропластного генома // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 895–909.
9. Пешкова Г.А. Флорогенетический анализ степной флоры гор Южной Сибири. Новосибирск, 2001. 192 с.
10. Артюкова Е.В., Холина А.Б., Козыренко М.М., Журавлев Ю.Н. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) на основе RAPD маркеров // Генетика. 2004. Т. 40. № 7. С. 877–884.
11. Artyukova E.V., Kozzyrenko M.M., Kholina A.B., Zhuravlev Yu.N. High chloroplast haplotype diversity in the endemic legume *Oxytropis chankaensis* may result from independent polyploidization events // Genetica. 2011. V. 139. № 2. P. 221–232. <https://doi.org/10.1007/s10709-010-9539-8>
12. Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Санданов Д.В. Современное состояние популяций эндемичных видов *Oxytropis* Байкальской Сибири и их филогенетические связи по данным секвенирования маркеров хлоропластной ДНК // Генетика. 2018. Т. 54. № 7. С. 795–806.
13. Kholina A., Kozzyrenko M., Artyukova E. et al. Plastid DNA variation of the endemic species *Oxytropis glandulosa* Turcz. (Fabaceae) // Turk. J. Bot. 2018. V. 42. P. 38–50. <https://doi.org/10.3906/bot-1706-11>
14. Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В. и др. Генетическое разнообразие и филогенетические связи *Oxytropis evenorum* (Fabaceae) по данным секвенирования межгенных спейсеров хлоропластной ДНК // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2019. № 2. С. 117–125. <https://doi.org/10.1134/S0016675819060055>
15. Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Санданов Д.В. Дивергенция видов *Oxytropis* секции *Verticillares* (Fabaceae) степной флоры Байкальской Сибири на основе анализа хлоропластной ДНК // Генетика. 2019. Т. 55. № 6. С. 665–674.
16. Козыренко М.М., Холина А.Б., Артюкова Е.В. и др. Молекулярно-филогенетическая характеристика эндемичных дальневосточных близкородственных видов секции *Orobia* рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Генетика. 2020. Т. 56. № 4. С. 421–432.
17. Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В. и др. Филогенетические отношения видов *Oxytropis* секции *Arctobia* северо-востока Азии по данным секвенирования межгенных спейсеров хлоропластного и ITS ядерного геномов // Генетика. 2020. Т. 56. № 12. С. 1386–1397.
18. Mir B.A., Koul S., Kumar A. et al. Intraspecific variation in the internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA in *Withania somnifera* (Linn.) Dunal // Indian J. Biotechnol. 2010. V. 9. P. 325–328.
19. Bonfeld J.K., Smith K.F., Staden R. A new DNA sequence assembly program // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4992–4999.
20. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. P. 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
21. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resour. 2010. V. 10. P. 564–567.
22. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
23. Swofford D.L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods): version 4.04. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates Inc., 2003.
24. Posada D., Crandall K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution // Bioinformatics. 1998. V. 14. P. 817–818. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.817>
25. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBAYES3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. P. 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
26. Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees // Proc. Gateway Computing Environments Workshop (GCE). LA: New Orleans, 2010. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
27. Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
28. Plenk K., Willner W., Demina O.N. et al. Phylogeographic evidence for long-term persistence of the Eurasian steppe plant *Astragalus onobrychis* in the Pannonic region (eastern Central Europe) // Flora. 2020. V. 264. 151555. 10 p. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151555>
29. Shepherd L.D., Lange P.J., Perrie L.R., Heenan P.B. Chloroplast phylogeography of New Zealand *Sophora* trees (Fabaceae): Extensive hybridization and wide-

- spread Last Glacial Maximum survival // J. Biogeogr. 2017. V. 44. P. 1640–1651.
https://doi.org/10.1111/jbi.12963
30. Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.
 31. Meyers Z.J. A contribution to the taxonomy and phylogeny of *Oxytropis* section *Arctobia* (Fabaceae) in North America: Master Diss. Fairbanks. Alaska: Univ. Alaska Fairbanks, 2012. 155 p.
 32. Archambault A., Strömvik M.V. Evolutionary relationships in *Oxytropis* species, as estimated from the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences point to multiple expansions into the Arctic // Botany. 2012. V. 90. № 8. P. 770–779.
https://doi.org/10.1139/B2012-023
 33. Tekpinar A., Karaman Erkul S., Aytac Z., Kaya Z. Phylogenetic relationships among native *Oxytropis* species in Turkey using *trnL* intron, *trnL–F* IGS, and *trnV* intron cpDNA regions // Turk. J. Bot. 2016. V. 40. P. 472–479.
https://doi.org/10.3906/bot-1506-45
 34. Krivenko D.A., Kotseruba V.V., Kazanovsky S.G. et al. Fabaceae // IAPT/IOPB chromosome data 11 / Ed. Marhold K. // Taxon. 2011. V. 60. № 4. P. 1222; E12, E13.
 35. Konichenko E.S., Selyutina I.Yu., Dorogina O.V. *Oxytropis triphylla* // IAPT/IOPB chromosome data 14 / Ed. Marhold K. // Taxon. 2012. V. 61. № 6. P. 1339; E13.
 36. Lavin M., Herendeen P.S., Wojciechowski M.F. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary // Syst. Biol. 2005. V. 54. P. 530–549.
https://doi.org/10.1080/10635150590947131
 37. Orthia L.A., Crisp M.D., Cook L.G., de Kok R.P.J. Bush pea: A rapid radiation with no support for monophyly of *Pultenaea* (Fabaceae: Mirbelieae) // Aust. Syst. Bot. 2005. V. 18. P. 133–147.
https://doi.org/10.1071/SB04028
 38. Bagheri A., Maassoumi A.A., Rahiminejad M.R. et al. Molecular phylogeny and divergence times of *Astragalus* section *Hymenostegis*: An analysis of a rapidly diversifying species group in Fabaceae // Sci. Rep. 2017. №7: 14033. 9 pages.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-14614-3

Population Studies of the Species of Asian Russia of the Subgenera *Phacoxytropis* and *Tragacanthoxytropis* Genus *Oxytropis* and Phylogenetic Relationships: Data on the Polymorphism of Markers of the Chloroplast and Nuclear Genomes

A. B. Kholina^{a,*}, M. M. Kozyrenko^a, E. V. Artyukova^a,
M. N. Koldaeva^b, D. V. Sandanov^c, and I. Yu. Selyutina^d

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

^bBotanical Garden-Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

^cInstitute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia

^dCentral Siberian Botanical Garden, Siberian Branch, Russian Academy of Science, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: kholina@biosoil.ru

Based on the analysis of the nucleotide polymorphism of the intergenic spacers *psbA–trnH*, *trnL–trnF* and *trnS–trnG* of chloroplast DNA of the *Oxytropis* species from Asian Russia: *O. tragacanthoides* section *Hystrix* subgenus *Tragacanthoxytropis*, *O. coerulea*, *O. filiformis*, and *O. mandshurica* sect. *Janthina*, and *O. deflexa* and *O. glabra* sect. *Mesogaea* subg. *Phacoxytropis*, it was found that all populations are characterized by high haplotype diversity (*h* varies from 0.676 to 1.000), except for species of sect. *Mesogaea* (*h* varies from 0 to 0.333). Species-specific markers were found for *O. tragacanthoides*, *O. deflexa*, *O. glabra*, and *O. mandshurica*, as well as specific markers for sect. *Mesogaea*. Reconstruction of the phylogenetic relationships of the chlorotypes of the species of the subgenera *Phacoxytropis*, *Tragacanthoxytropis*, and *Oxytropis* showed that the species of the sect. *Janthina* are combined into one well-supported clade with the species of the subgenera *Tragacanthoxytropis* and *Oxytropis*, but their relationships remained unresolved. An analysis of the genealogical relationships of the ribotypes of the ITS of nuclear DNA revealed a common ribotype for the species *O. tragacanthoides*, *O. coerulea*, *O. lanata*, *O. chankaensis*, *O. oxyphylla* and *O. triphylla*, belonging to three subgenera. The revealed genetic affinity with clear morphological differences is characteristic for taxa with a common origin that have experienced relatively recent rapid adaptive radiation. The obtained data on the variability of markers of the nuclear and chloroplast genomes confirm the status of *O. coerulea*, *O. filiformis*, and *O. mandshurica* as a three separate species.

Keywords: *Oxytropis*, Fabaceae, genetic diversity, phylogenetic relationships, chloroplast DNA, ITS.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ЛАБОРАТОРНОМ СОРТОВОМ КОНТРОЛЕ ЯЧМЕНЯ (*Hordeum vulgare* L.)

© 2021 г. А. А. Поморцев^{1, *}, Е. В. Лялина¹, Н. А. Терещенко¹, С. В. Болдырев², Е. Ю. Яковлева¹, А. Н. Березкин³, А. М. Малько⁴, О. В. Андросова⁴

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

²Сколковский институт науки и технологий, Москва, 143026 Россия

³Российский государственный аграрный университет — Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550 Россия

⁴Российский сельскохозяйственный центр, Москва, 107139 Россия

*e-mail: pomortsev@vigg.ru

Поступила в редакцию 04.12.2020 г.

После доработки 24.12.2020 г.

Принята к публикации 25.12.2020 г.

Методом электрофореза в крахмальном геле изучен полиморфизм гордеинов, контролируемых локусами *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F*, в 259 сортах ярового ячменя, допущенных к использованию в Российской Федерации. Для локуса *Hrd A* обнаружен 21 аллель, для локуса *Hrd B* — 34 и для локуса *Hrd F* — 4 аллеля. Частоты аллелей этих локусов варьировали в пределах 0.4807–0.0039 (*Hrd A*), 0.2394–0.0039 (*Hrd B*) и 0.4633–0.0058 (*Hrd F*). Обнаруженный по локусам *Hrd* полиморфизм теоретически позволяет дифференцировать 2856 генотипов. Реально исследованные сорта по генотипам гордеин-кодирующих локусов распределились по 113 группам, включающим от 1 до 31 сорта. Самое большое число групп (77–68.15%) включало по одному сорту. Эти сорта по генотипам локусов *Hrd* были уникальными. Еще 18 групп (15.94%) включали по 2 сорта с идентичными электрофореграммами гордеина. Обнаружены группы, включающие 27 и 31 сорт с одинаковыми генетическими формулами гордеина. Обсуждается вопрос об использовании дополнительных генетических маркеров — SSR-маркеров и водорастворимых белков зерна для дифференциации и идентификации сортов ячменя, идентичных по гордеинам. Представлены результаты использования электрофоретического анализа гордеина в лабораторном сортовом контроле пивоваренного ячменя с 2005 по 2019 гг. Показана тенденция увеличения партий с высокой сортовой чистотой (более 95%) с 27% в 2005 г. до 62–65% в 2016–2019 гг. При этом за последние пять лет снижается доля партий пивоваренного ячменя, не соответствующих заявленным сортам, с 14.7% в 2015 г. до 4.2–4.6% в 2018 и в 2019 гг. соответственно.

Ключевые слова: ячмень, полиморфизм гордеинов, генетические маркеры, лабораторный сортовой контроль.

DOI: 10.31857/S0016675821090101

Федеральным законом 149-ФЗ “О семеноводстве” предусмотрено проведение лабораторного сортового контроля семян сельскохозяйственных культур, поступающих в оборот. В лабораторном сортовом контроле ячменя в России наиболее широко используются методики электрофореза спирторастворимых запасных белков зерна — гордеинов в полиакриламидном (ПААГ) и в крахмальном (КГ) гелях. Методики утверждены Научно-техническим советом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (протокол № 17 от 24.03.2004) [1]. Указанные методики различаются не только используемыми гелями, электродным буфером и приготовлением проб, но и способом регистрации электрофореграмм. При электрофорезе в ПААГ электрофореграммы исследуемых

образцов сравнивают с эталонным спектром, полученным при электрофорезе смеси белков различных сортов [2]. Эталонный спектр состоит из четырех зон (α , β , γ , ω), соответствующих биохимическим фракциям. Каждая зона включает несколько позиций, обозначаемых цифрами, которые могут быть заняты электрофоретическими компонентами гордеина. При этом в сортовых формулах интенсивные компоненты подчеркивают, минорные компоненты отмечают чертой над номером позиции, очень слабые — двумя чертами. При электрофорезе в КГ для регистрации электрофореграмм гордеина используют генетический подход. Установлено, что электрофоретические компоненты гордеина наследуются группами (блоками) и контролируются семью сцеп-

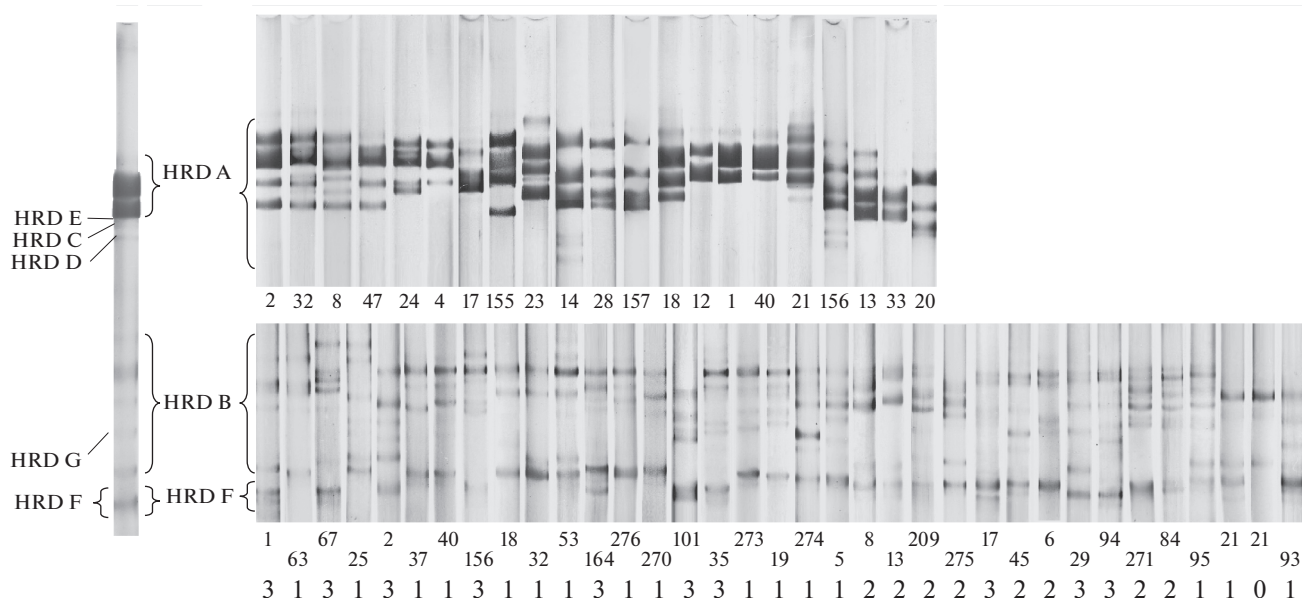


Рис. 1. Варианты блоков компонентов гордеина, контролируемые аллелями локусов *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F*, обнаруженные при анализе 259 сортов ярового ячменя, включенных в Государственный реестр селекционных достижений с 2005 по 2019 гг.

ленно наследуемыми локусами: *Hrd A*, *Hrd B*, *Hrd C*, *Hrd D*, *Hrd E*, *Hrd F* и *Hrd G* [3–5]. Локусы *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F* являются высоко полиморфными. Так, к настоящему времени у культурного ячменя для локуса *Hrd A* обнаружено 154 аллеля (вариантов блоков компонентов), для *Hrd B* – 269 и для *Hrd F* – 5 [6]. Аллели (варианты блоков компонентов) этих локусов обозначаются цифрами в порядке их обнаружения при исследовании сортов или коллекционных образцов ячменя. Локусы *Hrd C*, *Hrd D*, *Hrd E* и *Hrd G* контролируют отдельные слабоинтенсивные компоненты и на электрофореграммах гордеина у целого ряда сортов не обнаружены. Блоки компонентов HRD A, HRD B и HRD F на электрофоретических спектрах разделены пространственно (рис. 1). Это позволяет, с одной стороны, создавать каталоги вариантов блоков компонентов HRD A, HRD B и HRD F, с другой – регистрировать электрофореграммы гордеина в виде простых генетических формул, например, *Hrd A12B1F3* (рис. 1). Здесь *Hrd* – обозначение гордеинов, буквы *A*, *B* и *F* – обозначение полиморфных локусов, а цифры, следующие за буквами, обозначают аллели (варианты блоков компонентов). Таким образом, с помощью каталога можно регистрировать электрофореграммы в виде генетических формул или, имея генетическую формулу, можно представить электрофореграммы, которые они описывают. Указанный способ регистрации электрофореграмм в виде генетических формул позволяет так же легко создавать базы данных и обрабатывать их.

Испытательная лаборатория Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН уполномочена на право проведения лабораторного сортового контроля ячменя в Системе добровольной сертификации “Россельхозцентр” с 2000 г. (регистрационный номер Росс RU ДС 1.6.1.099). Как показывает опыт работы Испытательной лаборатории, наибольший интерес к лабораторному сортовому контролю ячменя проявляют не семеноводческие хозяйства, а пивоваренные и солодовенные предприятия. Это объясняется следующим: исследования, проведенные сотрудниками Московского государственного университета пищевых производств и ОАО “Русский солод” показали, что для обеспечения однородного замачивания, проращивания ячменя и сушки солода необходимо иметь его сортовую чистоту выше 90% [7]. Вопрос о надежной идентификации особенно остро стоит для так называемых Null-Lox сортов, характеризующихся отсутствием активности фермента липоксигеназы, способствующего быстрому старению пива. Очевидно, что примеси обычных сортов в партиях зерна Null-Lox сортов, не говоря уже о возможной путанице или подмене партий, могут привести к утрате качественных преимуществ последних. Пивоваренная компания “Балтика”, опираясь на западно-европейские стандарты, предъявляет к закупаемым партиям пивоваренного ячменя требования по сортовой чистоте – не ниже 95%, так как сортовая чистота влияет на формирование органолептического профиля и коллоидной стабильности пива [8]. Однако использование для идентификации сор-

Таблица 1. Микросателлитные маркеры ячменя

Микро-сателлитный маркер	Группа сцепления (хромосома)	Последовательность прямого праймера (5'–3')	Последовательность обратного праймера (5'–3')	Размер продукта ПЦР (пн)	Микро-сателлитный повтор	Ссылка
GBM1464	7H	ATAGCCGTGCTCTTGCTCAT	CAAGACCACCATTTGCATTG	170	(CAG) _{8n} (CAG) ₅	[11]
GBM1323	4H	GCTCTCCAGGGTTCGTTTC	CACCGTCTTGCAGTTGAGAC	124	(GCC) ₈	[11]
scssr09041	5H	CATGTCAGTGGGGTTCTAGC	TCTACTTGGACCTGCTGACC	164	(CATA) ₁₂	[12]

тов только электрофоретического анализа гордеина в ряде случаев недостаточно, так как ряд сортов не различается по электрофореграммам этих белков.

В настоящем сообщении представлены результаты использования дополнительных генетических маркеров для идентификации сортов, а также результаты исследований сортового соответствия и сортовой чистоты товарных партий пивоваренного ячменя урожаев 2005–2019 гг. методом электрофореза гордеинов в крахмальном геле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эталонные образцы 259 сортов ярового ячменя, включенных в Государственный реестр селекционных достижений с 2005 по 2019 гг., получали из ФГБУ “Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений”. Для определения генетической формулы гордеина от каждого эталонного образца сорта анализировали запасные белки в 40 индивидуальных зерновках. Согласно требованиям Международной ассоциации по контролю за качеством семян (International Seed Testing Association (ISTA)), для установления сортовой чистоты партий ячменя электрофоретический анализ гордеина проводили в 100 индивидуальных зерновках, случайно отобранных из средней пробы от партии зерна [9]. Электрофорез гордеинов проводили в столбиках 12–14%-ного крахмального геля с 3 М мочевиной в алюминий-лактатном буфере с pH 3.1 по методике, утвержденной НТС Министерства сельского хозяйства Российской Федерации [1]. Пропись методики изложена в Методическом пособии [6]. С целью использования SSR-маркеров для дифференциации сортов ячменя, идентичных по гордеинам, из базы данных GrainGenes 3.0 [10] было отобрано три микросателлитных маркера GBM1464, GBM1323, scssr09041, расположенных в различных хромосомах ячменя с высоким коэффициентом информативности (табл. 1) [11, 12]. Эти SSR-маркеры характеризуются единичным амплифицируемым продуктом ПЦР известного размера с небольшим количеством неспецифичной амплификации, позволяющим четко идентифицировать аллели. Тотальную ДНК выделяли из семидневных проростков по прописи [13]. Состав реакционной смеси для ПЦР и

режим амплификации подбирали в соответствии с опубликованной методикой [15]. Электрофорез продуктов мультиплексной амплификации проводили в полиакриламидном геле по стандартной методике [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате электрофоретического анализа гордеина в крахмальном геле в 259 сортах было выявлено следующее: 21 вариант блоков компонентов, контролируемых аллелями локуса *Hrd A*, 34 варианта – аллелями локуса *Hrd B* и 4 – аллелями локуса *Hrd F* (рис. 1). Аллели этих локусов в исследованных сортах существенно различались по частотам (табл. 2). Среди обнаруженных аллелей локуса *Hrd A* с наибольшей частотой встречались четыре аллеля: *A2* (0.4807), *A24* (0.1139), *A12* (0.1004) и *A28* (0.0946). Частоты остальных 17 аллелей находились в пределах от 0.0039 до 0.0309. Из 34 аллелей локуса *Hrd B* самую высокую частоту имели три аллеля: *B8* (0.2394), *B17* (0.1576) и *B19* (0.1448). Остальные аллели (31) встречались с частотами от 0.0039 до 0.0746. Среди аллелей локуса *Hrd F* по частоте доминировал аллель *F3* (0.4633), а наименьшей частотой характеризовался аллель *F0* (0.0058). Частоты аллелей *F1* и *F2* были близки (0.2452 и 0.2852 соответственно). При сортовом контроле учитываются не отдельные аллели гордеин-кодирующих локусов, а генотип в целом – сочетание аллелей трех локусов (генетическая формула гордеина). Следует отметить, что из 259 сортов 42 сорта (16.2%) были гетерогенными, то есть включали от двух до четырех биотипов, различающихся по аллелям локусов *Hrd*. Это сорта исключительно отечественной селекции. Обнаруженный по локусам *Hrd* полиморфизм теоретически позволяет дифференцировать 2856 генотипов. Однако реально в исследованной выборке сортов обнаружено всего 113 генотипов, включая гетерогенные сорта. На наш взгляд, это обусловлено рядом причин. С одной стороны, как было показано нами ранее, полиморфизм гордеинов имеет адаптивное значение. При исследовании полиморфизма запасных белков зерна в сортах ячменя, возделывавшихся на территории бывшего СССР, а также в Российской Федерации, было установлено, что распространение аллелей локусов *Hrd* сопряжено с распределени-

Таблица 2. Частоты аллелей локусов *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F*, присутствующие в 259 сортах ярового ячменя, включенных в Государственный реестр селекционных достижений в период 2005–2019 гг.

Локус <i>Hrd A</i>							
Аллель	Частота	Аллель	Частота	Аллель	Частота	Аллель	Частота
1	0.0153	14	0.0039	24	0.1139	40	0.0039
2	0.4807	17	0.0039	24	0.0135	47	0.0039
4	0.0309	18	0.0232	28	0.0946	155	0.0077
8	0.0019	20	0.0116	32	0.0116	156	0.0154
12	0.1004	21	0.0328	33	0.0116	157	0.0039
13	0.0154						
Локус <i>Hrd B</i>							
Аллель	Частота	Аллель	Частота	Аллель	Частота	Аллель	Частота
1	0.0746	21	0.0270	63	0.0097	164	0.0425
2	0.0097	25	0.0347	67	0.0116	209	0.0019
5	0.0077	29	0.0656	84	0.0212	270	0.0039
6	0.0077	32	0.0058	93	0.0019	271	0.0174
8	0.2394	35	0.0167	94	0.0039	273	0.0077
13	0.0135	37	0.0154	95	0.0077	274	0.0077
17	0.1576	40	0.0039	101	0.0039	275	0.0077
18	0.0039	45	0.0097	156	0.0039	276	0.0039
19	0.1448	53	0.0058				
Локус <i>Hrd F</i>							
Аллель	Частота	Аллель	Частота	Аллель	Частота	Аллель	Частота
0	0.0058	1	0.2452	2	0.2857	3	0.4633

ем ряда климатических факторов: сумма эффективных температур, количество осадков в год, средняя температура июля и континентальность климата [17, 18]. С другой стороны, целый ряд сортов имеет или близкие родословные (например, Скарлетт и Ксанаду), или выведены вообще из одной комбинации скрещивания (например, Эксплоер и Пионер). Кроме этого, в литературе имеются сведения о сопряженности между некоторыми показателями пивоваренных качеств ячменя (экстрактивность солода, амилолитическая активность) и аллельными вариантами гордеин-кодирующих локусов [19–21]. Таким образом, 259 сортов ячменя по генотипам гордеин-кодирующих локусов распределились по 113 группам, включающим от 1 до 31 сорта (табл. 3). При этом самое большое число групп (77–68.15%) включало по одному сорту. Эти сорта по генотипам локусов *Hrd* были уникальными. Еще 18 групп (15.94%) включали по 2 сорта с идентичными электрофореграммами гордеина. Вместе с тем об-

наружены группы, включающие 27 и 31 сорт, с одинаковыми генетическими формулами гордеина. Однако в эти группы входят сорта, допущенные к использованию в различных регионах. Например сорта с генетической формулой гордеина *Hrd A2 B17 F3*, входящие в группу из 31 сорта: Олимпик, КВС Орфелия, Кати, Никита, Приморский 44 допущены к использованию в регионах 2, 3, 4, 5, 10 и 12 соответственно. Одновременно в некоторых регионах допущены к использованию сорта, не различающиеся по электрофореграммам гордеина. Так, в пятом регионе допущены сорта Травелер, Экслоер, Марни, Грэйс и Пионер, а в третьем регионе — Грэйс, Дженнифер и Фортуна, характеризующиеся генетической формулой гордеина *Hrd A4 B164 F1*. Для идентификации таких сортов и установления возможного взаимного засорения необходимо привлекать дополнительные генетические маркеры. Например с использованием мультиплексной ПЦР с тремя SSR маркерами удастся дифференцировать сорта Травелер, Грэйс

Таблица 3. Группы генотипов в 259 сортах ярового ячменя, включенных в Государственный реестр селекционных достижений в 2005–2019 гг.

№ п/п	Число сортов в группе	Число групп сортов	Доля групп, %
1	1	77	68.15
2	2	18	15.94
3	3	6	5.32
4	4	3	2.66
5	5	1	0.88
6	6	2	1.77
7	7	1	0.88
8	10	1	0.88
9	11	1	0.88
10	13	1	0.88
11	27	1	0.88
12	31	1	0.88
Всего		113	100

Таблица 4. Доли (%) и массы партий товарного зерна сортов пивоваренного ячменя, не соответствующих заявленным сортам, выявленных методом электрофореза запасных белков зерна, в урожае 2015–2019 гг.

Год	Число исследованных партий	Партий, не соответствующих заявленным сортам	
		доля, %	масса, т
2015	319	14.7	28 390
2016	435	11.7	59 832
2017	512	6.6	42 880
2018	405	4.2	19 371
2019	394	4.6	20 871

и Пионер от сортов Эксплоер и Марни, оказавшимися идентичными по электрофореграммам продуктов амплификации (рис. 2). Кроме ДНК-маркеров для дифференциации и контроля качества сортов, идентичных по гордеинам, с успехом можно использовать электрофоретический анализ водорастворимых белков зерна ячменя [22]. Таким образом, для наиболее полной дифференциации и точной идентификации сортов необходимо использовать комплекс генетических маркеров.

В Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в России, включается все больше сортов пивоваренного ячменя. Так, если в Реестр 2006 г. было включено 58 сортов, то в 2019 г. уже 85 сортов пивоваренного ячменя. При этом в Испытательную лабораторию ИОГен РАН для проведения сортового контроля в различные годы поступали партии зерна от 23 до

30 сортов. Как было отмечено выше, к товарным партиям зерна пивоваренных сортов предъявляются требования по сортовой чистоте не ниже 95%. На диаграмме динамики доли таких партий за период с 2005 по 2019 гг. наблюдается тенденция увеличения партий с высокой сортовой чистотой (рис. 3). Если в 2005 г. доля партий с чистотой 95% и выше составляла всего 27%, то в 2016–2019 гг. доля таких партий возросла до 62–65%. Ежегодно при лабораторном сортовом контроле обнаруживались партии полностью не соответствующие заявленным в документах сортам, то есть ни одного зерна заявленного сорта при анализе гордеина в 100 зерновках обнаружено не было. Как правило такие партии представляли собой смесь сортов. Как видно из табл. 4, за последние пять лет наблюдается сокращение доли таких партий с 14.7% в 2015 г. до 4.2–4.6% в 2018 и в 2019 гг. соответственно.

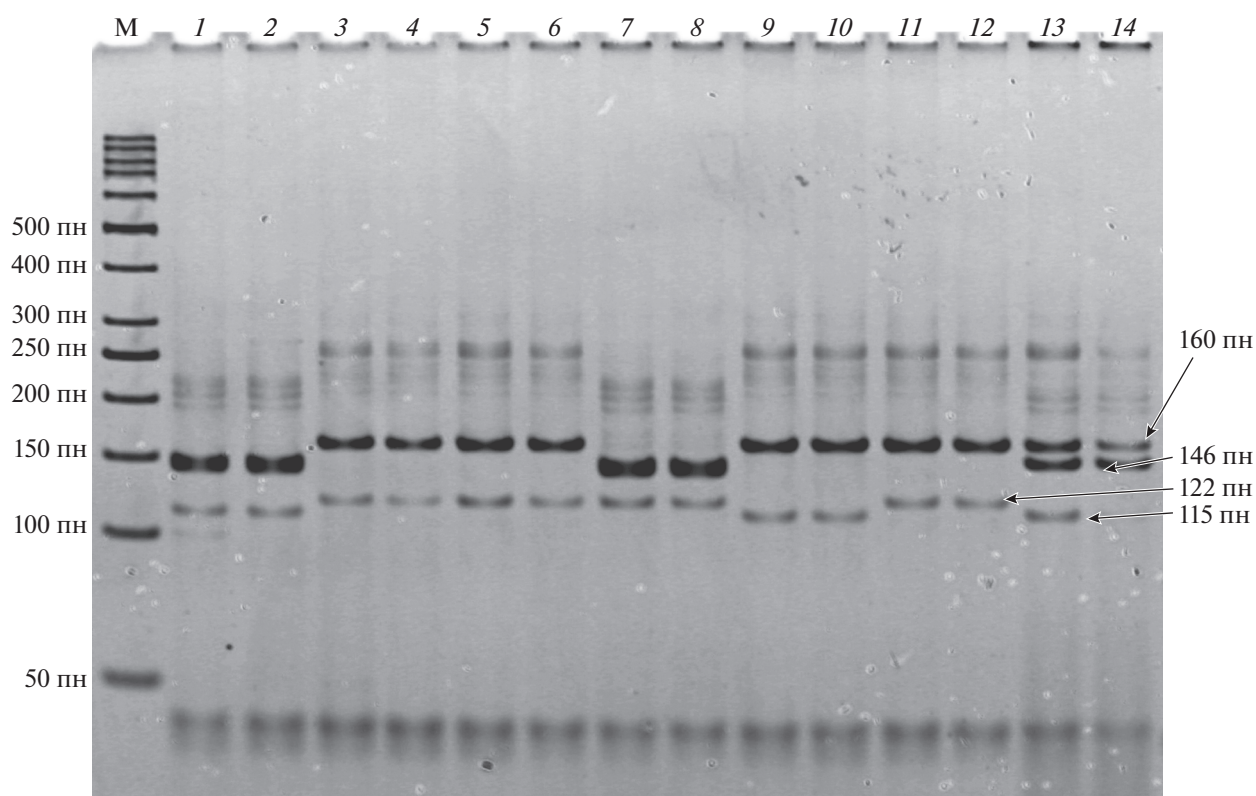


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов мультиплексной ПЦР (10%-ный ПААГ) сортов ярового ячменя, имеющих идентичные спектры гордеинов. М – молекулярный маркер массы; 1, 2 – Травелер, 3, 4 – Эксплоер, 5, 6 – Марни, 7, 8 – Грейс, 9, 10 – Дженифер, 11, 12 – Пионер, 13, 14 – Фортуна.

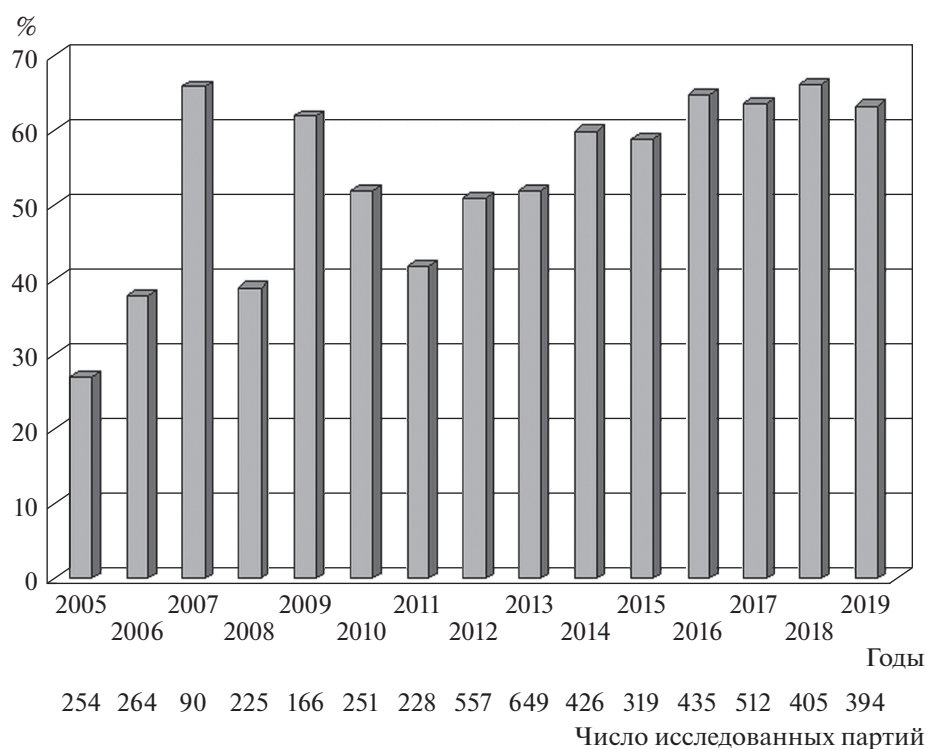


Рис. 3. Доли партий пивоваренного ячменя, с сортовой чистотой 95% и более в урожае 2005–2019 гг.

Таким образом, опыт работы Испытательной лаборатории ИОГен РАН свидетельствует, что лабораторный сортовой контроль на основе даже только электрофоретического анализа гордеина позволяет вычлнять партии пивоваренного ячменя не только с высокой сортовой чистотой, но и выявлять партии, не соответствующие заявленным сортам.

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. Поморцев А.А., Кудрявцев А.М., Уелниек В.В. и др. Методика проведения лабораторного сортового контроля по группам сельскохозяйственных растений. М.: "Росинформагротех", 2004. 107 с.
2. Конарев В.Г., Дягилева Г.Е., Гаврилюк И.П. и др. Сортовая идентификация ячменя по электрофоретическим спектрам гордеина // Бюлл. Всесоюз. Ин-та растениеводства им. Н.И. Вавилова. 1979. В. 92. С. 30–40.
3. Созинов А.А., Нецветаев В.П., Григорян Э.М. и др. Картирование локусов Hrd у ячменя (*Hordeum vulgare* L. emed. Vav. et Bach.) // Генетика. 1978. Т. 14. № 9. С. 1610–1619.
4. Поморцев А.А., Нецветаев В.П., Попереля Ф.А. и др. Идентификация шестого локуса, контролирующего синтез гордеина у озимого ячменя // Докл. ВАСХНИЛ. 1983. № 1. С. 7–11.
5. Netsvetayev V.P., Sozinov A.A. Location of a hordein G locus, Hrd G, on chromosome 5 of barley // Barley Genet. Newsletter. 1984. V. 14. P. 4–6.
6. Поморцев А.А., Лялина Е.В. Оценка сортовой принадлежности и сортовой чистоты семян ячменя методом электрофоретического анализа запасных белков зерна // Метод. пособие к практикуму "Белковые маркеры для генет. паспортизации и улучшения геномов растений хозяйственно ценных видов". М., 2011. 86 с.
7. Хлыновский А.Д., Ермолаева Г.А., Жаркова Л.П. Значение использования электрофоретического определения сортовой чистоты пивоваренного ячменя // Тр. Междунар. научно-практ. конф. Современные принципы и методы селекции ячменя. Краснодар, 2007. С. 281–285.
8. Таразанов В.А. Качественные аспекты получения пивоваренного ячменя // Мат. III междунар. конгр. "Зерно и хлеб России". С.-Петербург, 13–15 ноября, 2007. С. 93.
9. Cook R.J. Handbook of Variety Testing. Electrophoresis Handbook: Variety Identification. ISTA, 1992. 25 p.
10. <https://wneat.pw.usda.gov/GG3/>.
11. Varshney R.K., Grosse I., Hähnel U. et al. Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers shows non-uniform distribution of genes in the barley genome // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 113. P. 239. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0289-z>
12. Ramsay L., Russell J., Macaulay M. Variation shown by molecular markers in barley: genomic and genetic constraints // Aspects of Appl. Biol. 2004. V. 72. P. 146–154.
13. <https://www.diversityarrays.com/orderinstructions/plant-dna-extraction-protocol-for-dart/>.
14. Ramsay L., Macaulay M., degli Ivanisovich S. et al. A simple sequence repeat-based linkage map of barley // Genetics. 2000. V. 156. Iss. 4. P. 1997–2005.
15. Varshney R.K., Marcel T.C., Ramsay L. et al. A high-density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 114. Iss. 6. P. 1091–1103. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0503-7>
16. Sambrook J.F., Russell D.W. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. V. 1–3. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.
17. Поморцев А.А., Калабушкин Б.А., Ладогина М.П. и др. Геногеография и закономерности распространения аллельных вариантов в трех гордеинкодирующих локусах ярового ячменя на территории бывшего СССР // Генетика. 1994. Т. 30. № 6. С. 806–815.
18. Поморцев А.А., Калабушкин Б.А., Лялина Е.В. Закономерности распределения аллельных вариантов трех гордеин-кодирующих локусов ярового ячменя на территории Российской Федерации // Генетика. 2001. Т. 37. № 11. С. 1513–1520.
19. Нецветаев В.П., Шмидер В., Демина В.И. Гордеин, пивоваренные свойства и продуктивность ярового ячменя // Тез. Всес. конф. "Физиолого-генетические основы интенсификации селекционного процесса". Саратов, 1984. С. 44–45.
20. Нецветаев В.П. Теоретические основы использования белкового полиморфизма для оптимизации селекционного процесса: Автореф. дис. ... д.б.н. С.-Петербург, 2000. 49 с.
21. Echart-Almeida C., Cavalli-Molina S. Hordein polypeptide patterns in relation to malting quality in Brazilian barley varieties // Pesq. Agropec. Bras. Brasília. 2001. V. 36. № 2. P. 211–217.
22. Поморцев А.А., Болдырев С.В., Лялина Е.В. Комплекс полиморфных локусов, контролирующих белки семян для идентификации сортов ячменя // Тр. прикл. бот., генет. и селекции. 2014. Т. 175. В. 4. С. 87–91.

Genetic Markers in Laboratory Variety Control of Barley (*Hordeum vulgare* L.)

A. A. Pomortsev^{a,*}, E. V. Lyalina^a, N. A. Tereshchenko^a, S. V. Boldyrev^b,
Е. Ю. Яковлева (дать перевод)^a, A. N. Berezkin^c, A. M. Malko^d, and O. V. Androsova^d

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

^bSkolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 143026 Russia

^cRussian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Moscow, 127550 Russia

^dFederal State Budgetary Institution “Russian Agricultural Center”, Moscow, 107139 Russia

*e-mail: pomortsev@vigg.ru

The polymorphism of hordeins controlled by the *Hrd A*, *Hrd B* and *Hrd F* loci in 259 varieties of spring barley approved for use in the Russian Federation was studied by electrophoresis in the starch gel. For locus *Hrd A* – 21 alleles, for locus *Hrd B* – 34 and locus *Hrd F* – 4 alleles. The allele frequencies of these loci varied between 0.4807–0.0039 (*Hrd A*), 0.2394–0.0039 (*Hrd B*), and 0.4633–0.0058 (*Hrd F*). The polymorphism found at *Hrd* locus theoretically allows differentiating 2856 genotypes. The studied varieties by genotypes of hordein coding locus were distributed in 113 groups, including from 1 to 31 varieties. The largest number of groups (77–68.15%) included one variety. These varieties were unique in terms of *Hrd* locus genotypes. Another 18 groups (of 15.94%) included in the two grades with identical electrophoregrams hordein. Groups including 27 and 31 varieties with the same genetic formulas of hordein were found. The use of additional genetic markers – SSR markers and water-soluble grain proteins for differentiation and identification of barley varieties that are identical in hordeins is discussed. The results of using electrophoretic analysis of hordein in laboratory varietal control of malting barley from 2005 to 2019 are presented. The trend of increasing lots with high varietal purity (more than 95%) from 27% in 2005 to 62–65% in 2016–2019 is shown. At the same time, over the past 5 years, the share of batches of malting barley that do not correspond to the declared varieties has decreased from 14.7% in 2015 up to 4.2–4.6% in 2018 and 2019 respectively.

Keywords: barley, the polymorphism of hordeins, genetic markers, laboratory varietal control.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИЙ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ ПО МАРКЕРАМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ, НАРУШАЮЩИМИ КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. А. В. Бочарова¹ *, В. А. Степанов¹

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

*e-mail: anna.bocharova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 29.09.2020 г.

После доработки 03.12.2020 г.

Принята к публикации 11.02.2021 г.

Впервые исследовано генетическое разнообразие 16 популяций коренного населения Северной Евразии по панели генетических маркеров генов, ассоциированных, согласно данным полногеномных ассоциативных исследований, с заболеваниями, которые ведут к нарушению когнитивных функций человека (шизофренией, болезнью Альцгеймера и их когнитивными эндофенотипами). Наблюдается снижение генетического разнообразия в географическом пространстве с запада на восток. Наибольший уровень генетического разнообразия показали европеоидные популяции. Выделяются две группы маркеров, которые преобладают у европеоидов или у монголоидов. Расположение 16 популяций в пространстве главных компонент отражает их географическую локализацию и позволяет выделить четыре кластера. В целом анализ внутрипопуляционного и межпопуляционного генетического разнообразия по 28 маркерам в 16 популяциях отражает закономерности структуры генофонда Северной Евразии, которые описаны по другим системам маркеров.

Ключевые слова: когнитивные функции, шизофрения, болезнь Альцгеймера, популяции человека, генетическое разнообразие.

DOI: 10.31857/S0016675821080026

К когнитивным функциям (КФ) относятся интеллект, внимание, речь, память, разнообразные двигательные навыки, процессы восприятия информации [1]. КФ формируются в результате общей работы головного мозга в целом. При этом различные отделы его не являются равносильными. Повреждение какой-либо области в любом из отделов может привести к когнитивным нарушениям (КН). КН влияют на эффективность обучения, профессиональную, социальную и бытовую деятельность, являются одним из видов нервно-психических расстройств, включающих изменения в эмоциональной и поведенческой сфере. Все эти расстройства (эмоциональные, когнитивные и поведенческие) тесно взаимосвязаны. КН – состояния полиэтиологической природы, которые развиваются при различных психических, неврологических и соматических заболеваниях. Поскольку КФ связаны с общей деятельностью головного мозга в целом, КН закономерно развиваются при самых разных очаговых и диффузных поражениях головного мозга. Фактически любое повреждение головного мозга может вызвать КН разные по тяжести.

Во второй половине XX в. возрастной состав населения претерпел значительные изменения в сторону увеличения числа лиц пожилого возраста [2]. По данным статистики, от 5 до 25% и более (в зависимости от возраста) пожилых лиц имеют тяжелые когнитивные нарушения, в основном деменцию [3]. Частой причиной КН в молодом возрасте является шизофрения (ШЗ). Когнитивный дефицит является ключевой особенностью ШЗ. До 85% пациентов с ШЗ имеют ту или иную степень КН [4, 5].

Как ШЗ, так и болезнь Альцгеймера (БА) относятся к социально-значимым, широко распространенным многофакторным заболеваниям (МФЗ). Генетическая компонента подверженности к МФЗ, которые имеют полигенную природу, во многом зависит не только от возрастных и половых составляющих, но и от популяционных и этнических. Каждая популяция или этническая группа отличается генетическим паттерном частот аллелей в результате своего эволюционного происхождения. Частоты аллелей приобретают свою специфичность в разных популяциях в процессе этногенеза. Вероятно, это лежит в основе диффе-

ренциальной восприимчивости к распространенным МФЗ, таким как болезнь Альцгеймера и шизофрения. Характерные сочетания аллелей генов, формирующих предрасположенность к МФЗ, являются исключительными для каждой популяции. В связи с этим важно изучить вариабельность генов таких заболеваний у представителей разных этнических групп.

Цель настоящего исследования заключалась в характеристике генетического разнообразия полиморфных вариантов генов, ассоциированных, согласно данным полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), с шизофренией, болезнью Альцгеймера и их когнитивными эндофенотипами (ЭФ), в популяциях Северной Евразии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Популяционные выборки

В настоящей работе для выявления сходств и различий в частотах аллелей генов, ассоциированных с заболеваниями, нарушающими КФ, использованы популяционные выборки из биобанка НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН “Биобанк населения Северной Евразии”. Общая численность исследованных 16 популяционных выборок составила 1508 образцов, представляющих различные этно-территориальные регионы Северной Евразии: европейская часть России (русские, удмурты), Сибирь (хакасы, тувинцы, кеты, алтайцы, ханты, буряты, якуты), Средняя Азия (узбеки, казахи, киргизы северные, киргизы южные) и Дальний Восток (чукчи, коряки, нивхи).

В выборки включались неродственные неметисированные в трех поколениях индивиды, подписавшие информированное согласие на проведение исследования. Детальные характеристики выборок приведены в табл. 1. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Выбор генетических маркеров и генотипирование

30 генетических маркеров для работы выбраны из Каталога опубликованных полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), где эти маркеры показали статистически значимые ассоциации (уровень значимости $p \leq 5 \times 10^{-7}$) с шизофренией, болезнью Альцгеймера и когнитивными эндофенотипами этих заболеваний [6–29]. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из цельной венозной крови [30]. Генотипирование проводили с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии как описано ранее [31]. Подробная характеристика генетических маркеров представлена в табл. 2. Подбор условий мультиплексного генотипирования для MALDI-TOF

масс-спектрометрии был осуществлен с помощью разработанных подходов [32, 33].

Генотипирование было проведено на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом “Медицинская геномика” НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных данных включала проверку распределения наблюдаемых частот генотипов на соответствие ожидаемым при равновесии Харди–Вайнберга (точный тест Фишера). Для характеристики внутри- и межпопуляционного генетического разнообразия маркеров, ассоциированных с ШЗ, БА и их когнитивными ЭФ, в популяциях Северной Евразии в качестве основной характеристики использовали ожидаемую гетерозиготность [34]. Оценку генетической дифференциации популяций проводили с помощью коэффициента фиксации Райта (F_{st}) методом анализа молекулярной дисперсии AMOVA [35]. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакетов программы “Arlequin 3.1”. Генетические взаимоотношения между популяциями анализировали с помощью метода главных компонент [36]. Анализ и построение графиков проводили с помощью пакета программ STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты аллелей и генетическое разнообразие в популяциях коренного населения Северной Евразии

30 полиморфных вариантов генов, ассоциированных по данным GWAS с БА, ШЗ или когнитивными эндофенотипами этих заболеваний, были генотипированы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии во всех 16 популяциях. Два из 30 маркеров (rs1261117 гена *TCF4*, rs7004633 гена *LOC105375630*) показали долю определяемых генотипов меньше 95% и были исключены из дальнейшего анализа для всех популяций.

Частоты предковых аллелей 28 маркеров в 16 популяциях Северной Евразии представлены в табл. 3 (данные по частотам генотипов доступны по запросу у авторов). Шесть маркеров, включенных в работу, оказались мономорфными в изученных популяциях. Так, rs17594526 гена *TCF4* показал отсутствие полиморфизма в девяти популяциях: тувинцы, кеты, ханты, якуты, киргизы северные и южные, чукчи, коряки и нивхи. Другой генетический вариант этого же гена *TCF4* (rs17512836) также оказался мономорфным в девяти популяциях: удмурты, хакасы, тувинцы, кеты, якуты,

Таблица 1. Характеристика обследуемых популяционных выборок

№	Популяция (объем выборки)	Локализация	Языковая принадлежность, семья/группа	Антропологический тип
Европеоидный расовый тип				
1	Русские (216)	Кемеровская обл., г. Кемерово	Индоевропейская/славянская	Восточноевропейский
2	Удмурты (95)	Республика Удмуртия, п. Бalezино	Уральско-юкагирская/ финно-угорская	Сублапоноидный
3	Узбеки (42)	Республика Узбекистан, г. Джалал-Абад	Алтайская/тюркская	Памироиранский
Монголоидный расовый тип				
4	Алтайцы (95)	Республика Горный Алтай, с. Бешпельтир	Алтайская/тюркская	Центральноазиатский
5	Буряты (93)	Республика Бурятия, пгт. Агинское	Алтайская/монгольская	Центральноазиатский
6	Казахи (190)	Республика Казахстан, г. Алматы	Алтайская/тюркская	Южносибирский
7	Кеты (46)	Красноярский край, п. Келлог	Енисейская	Енисейский
8	Киргизы северные (48)	Республика Кыргызстан, г. Бишкек	Алтайская/тюркская	Южносибирский
9	Киргизы южные (47)	Республика Кыргызстан, г. Ош	Алтайская/тюркская	Южносибирский
10	Тувинцы (92)	Республика Тыва, г. Кызыл	Алтайская/тюркская	Центральноазиатский
11	Хакасы (93)	Республика Хакасия, Аскизский р-н	Алтайская/тюркская	Южносибирский
12	Ханты (94)	Ханты-мансийский автономный округ, с. Казым, д. Русскинская	Уральская/финно-угорская	Уральская
13	Якуты (93)	Республика Саха, с. Чериктей	Алтайская/тюркская	Центральноазиатский
14	Чукчи (95)	Чукотский автономный округ	Палеоазиатская	Арктический
15	Коряки (89)	Камчатский край	Чукотско-камчатская	Арктический
16	Нивхи (80)	Сахалинская обл., Охинский р-н	Палеоазиатская/нивхская	Монголоидный/ сахалиноамурский

киргизы южные, чукчи, коряки и нивхи. Еще несколько локусов продемонстрировали отсутствие полиморфизма: rs17693963 межгенного региона *GPR89P/TRV-AAC1-5* в популяциях хантов и нивхов, rs1212597 межгенного региона *LOC105378888/PRMT6* в популяциях чукчей и нивхов, rs11064768 гена *CCDC60* в популяции нивхов, rs11191580 гена *NT5C2* в популяции кетов (табл. 3). По опубликованным полногеномным ассоциативным исследованиям эти генетические маркеры были ассо-

циированы с развитием ШЗ и БА в европеоидных популяциях [9–11, 21, 22].

Распределение генотипов в популяциях в подавляющем большинстве случаев соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (РХВ). В проанализированном массиве данных среди 448 распределений частот генотипов было обнаружено отклонение от РХВ в 16 случаях, что не превышает ожидаемого числа случайных отклонений при 5%-ном уровне значимости. С учетом поправки

Таблица 2. Характеристика генетических маркеров

№	Полное название гена	Обозначение гена	SNP	Алели	ПА	РА	Признак	Ссылка
1	Contactin associated protein 2	<i>CNTNAP2</i>	rs10273775	A/G	G	G	БА	[6]
2	Non-SMC condensin II complex subunit D3	<i>NCAPD3</i>	rs1031381	C/T	C	N	Когнитивные тесты	[7]
3	Mitochondrial pyruvate carrier 2	<i>MPC2</i>	rs10489202	G/T	G	A	ШЗ	[8]
4	Coiled-coil domain containing 60	<i>CCDC60</i>	rs11064768	A/G	A	A	ШЗ	[9]
5	5'-Nucleotidase, cytosolic II	<i>NT5C2</i>	rs11191580	C/T	T	T	ШЗ	[10]
6	LOC105378888/protein arginine methyltransferase 6	<i>LOC105378888/PRMT6</i>	rs12125971	C/T	C	N	Интеллект	[11]
7	Long intergenic non-protein coding RNA 1741/SEC16 homolog B, endoplasmic reticulum export factor	<i>LINC01741/SEC16B</i>	rs12140439	A/C	C	C	ШЗ	[12]
8	Transcription factor 4	<i>TCF4</i>	rs1261117	C/T	C	T	ШЗ	[12]
9	Sorting nexin 29	<i>SNX29</i>	rs12922317	A/G	A	G	ШЗ	[14]
10	LOC105373605	<i>LOC105373605</i>	rs12989701	C/A	C	N	БА	[15]
11	Bromodomain containing 1	<i>BRD1</i>	rs138880	A/C	C	C	ШЗ	[12]
12	Dachshous cadherin-related 2	<i>DCHS2</i>	rs1466662	A/T	T	N	БА	[17]
13	Clusterin	<i>CLU</i>	rs1532278	T/C	C	T	БА	[18]
14	NFKB activating protein-like	<i>NKAPL</i>	rs1635	G/T	G	N	ШЗ	[19]
15	LSM1 homolog, mRNA degradation associated	<i>LSM1</i>	rs16887244	A/G	A	N	ШЗ	[8]
16	POM121 transmembrane nucleoporin-like 2	<i>POM121L2</i>	rs16897515	C/A	C	C	ШЗ	[12]
17	Rho GTPase activating protein 31	<i>ARHGAP31</i>	rs17203055	A/G	A	N	ШЗ	[12]
18	Transcription factor 4	<i>TCF4</i>	rs17512836	T/C	T	C	ШЗ	[10]
19	Transcription factor 4	<i>TCF4</i>	rs17594526	C/T	C	T	ШЗ	[21]
20	G protein-coupled receptor 89 pseudogene/tRNA-Val (anticodon AAC) 1–5	<i>GPR89P / TRV-AAC1-5</i>	rs17693963	A/C	A	N	ШЗ	[22]
21	CD33 molecule	<i>CD33</i>	rs3826656	G/A	G	N	ШЗ	[25]
22	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 1	<i>ACSM1</i>	rs433598	C/T	T	T	ШЗ	[26]
23	Apolipoprotein C1	<i>APOC1</i>	rs4420638	A/G	G	A	БА	[17]
24	Cell adhesion associated, oncogene regulated	<i>CDON</i>	rs472926	C/T	T	C	БА	[27]
25	Calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 C	<i>CACNA1C</i>	rs4765905	C/G	G	N	ШЗ	[22]
26	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein/RNA, U6 small nuclear 560, pseudogene	<i>PICALM/RNU6-560P</i>	rs561655	G/A	A	N	БА	[18]
27	Nectin cell adhesion molecule 2	<i>NECTIN2</i>	rs6859	A/G	G	A	БА	[18]
28	LOC105375630	<i>LOC105375630</i>	rs7004633	A/G	A	A	ШЗ	[22]
29	Reelin	<i>RELN</i>	rs7341475	G/A	G	G	ШЗ	[28]
30	LOC105373605	<i>LOC105373605</i>	rs7561528	G/A	A	A	БА	[18]

Примечание. ПА – предковый аллель, РА – аллель, ассоциированный с признаком, не указан в публикации; ШЗ – шизофрения, БА – болезнь Альцгеймера.

Таблица 3. Частоты предковых аллелей (%) 28 SNP в 16 изученных популяциях Северной Евразии

SNP (ген)	ПА	Европейская часть РФ		Сибирь							Средняя Азия				Дальний Восток			
		RUS	UDM	ALT	BUR	HAK	TUV	KET	HAN	YAB	UZ	KAZ	KGN	KGS	CHU	KOR	NIV	
rs10273775 (CNTNAP2) rs1031381 (NCAPD3) rs10489202 (MPC2) rs11064768 (CCDC60) rs11191580 (NT5C2) rs12125971 (LOC105378889-PRMT6) rs12140439 (LOC101928778-LOC105371627) rs12922317 (SNX29) rs12989701 (LOC105373605) rs138880 (BRD1) rs1466662 (DCHS2) rs1532278 (CLU) rs1635 (NKAPL) rs16887244 (LSMT) rs16897515 (POM12IL2) rs17203055 (ARHGAP31) rs17512836 (TCF4) rs17594526 (TCF4) rs17693963 (GPR89P-TRV-AAC1-5) rs3826656 (CD33) rs433598 (ACSM1) rs4420638 (APOC1) rs472926 (CDON) rs4765905 (CACNA1C) rs561655 (PICALM-FNTAP1) rs6859 (PIRL2) rs7341475 (RELN) rs7561528 (LOC105373605)	G	50	51	61	70	59	57	64	62	61	62	63	61	60	41	35	48	
	C	63	44	44	52	60	51	46	55	66	54	53	56	50	28	51	22	
	G	73	74	77	69	72	79	64	70	68	78	78	78	69	71	76	76	74
	A	92	90	96	99	98	98	97	93	96	94	94	95	97	95	92	98	100
	T	92	95	89	89	92	97	100	93	97	76	76	88	86	88	90	86	94
	C	93	93	95	96	96	99	96	99	94	94	94	93	94	95	100	96	100
	C	68	79	74	74	87	80	85	79	70	74	74	80	80	82	86	94	94
	A	68	55	36	33	37	26	45	42	31	52	52	42	39	40	26	19	18
	C	87	87	98	96	91	96	97	95	96	93	93	94	96	95	95	98	95
	C	19	17	21	18	19	16	18	15	15	21	21	19	11	19	21	24	16
	T	61	56	30	28	39	31	27	12	32	44	44	41	41	46	37	38	30
	C	61	59	65	68	61	55	63	55	70	72	72	64	72	67	55	55	50
	G	93	96	76	83	80	74	72	81	82	87	87	89	84	86	90	76	95
	A	74	67	82	75	69	83	74	87	77	77	77	78	77	80	76	82	49
	C	88	96	94	92	91	95	96	85	97	85	85	93	95	93	99	98	99
	A	91	90	99	98	94	94	98	97	98	99	90	93	97	96	92	94	99
T	97	100	99	99	99	100	100	100	99	100	98	99	99	100	100	100	100	
C	97	95	99	99	99	97	100	100	100	100	99	90	100	100	100	100	100	
A	93	99	98	98	96	99	98	98	100	95	98	95	98	97	0	0	100	
G	27	38	56	49	42	54	39	62	62	62	51	51	51	44	27	32	66	
T	41	36	65	65	86	79	77	79	56	76	70	70	76	70	54	74	82	
G	18	17	14	18	14	14	17	21	32	27	13	11	14	13	0	0	5	
A	84	79	73	72	72	78	63	71	66	64	83	76	79	71	67	80	75	
G	68	64	88	95	88	88	88	79	81	94	71	86	85	78	80	87	89	
A	67	66	64	57	57	35	43	42	37	48	62	57	57	56	46	50	35	
G	53	64	67	65	65	55	73	63	54	52	72	63	71	59	75	62	59	
G	84	82	91	93	93	91	93	87	86	92	83	89	91	90	59	59	79	
A	28	29	15	8	8	18	11	12	9	6	23	11	16	15	9	4	9	

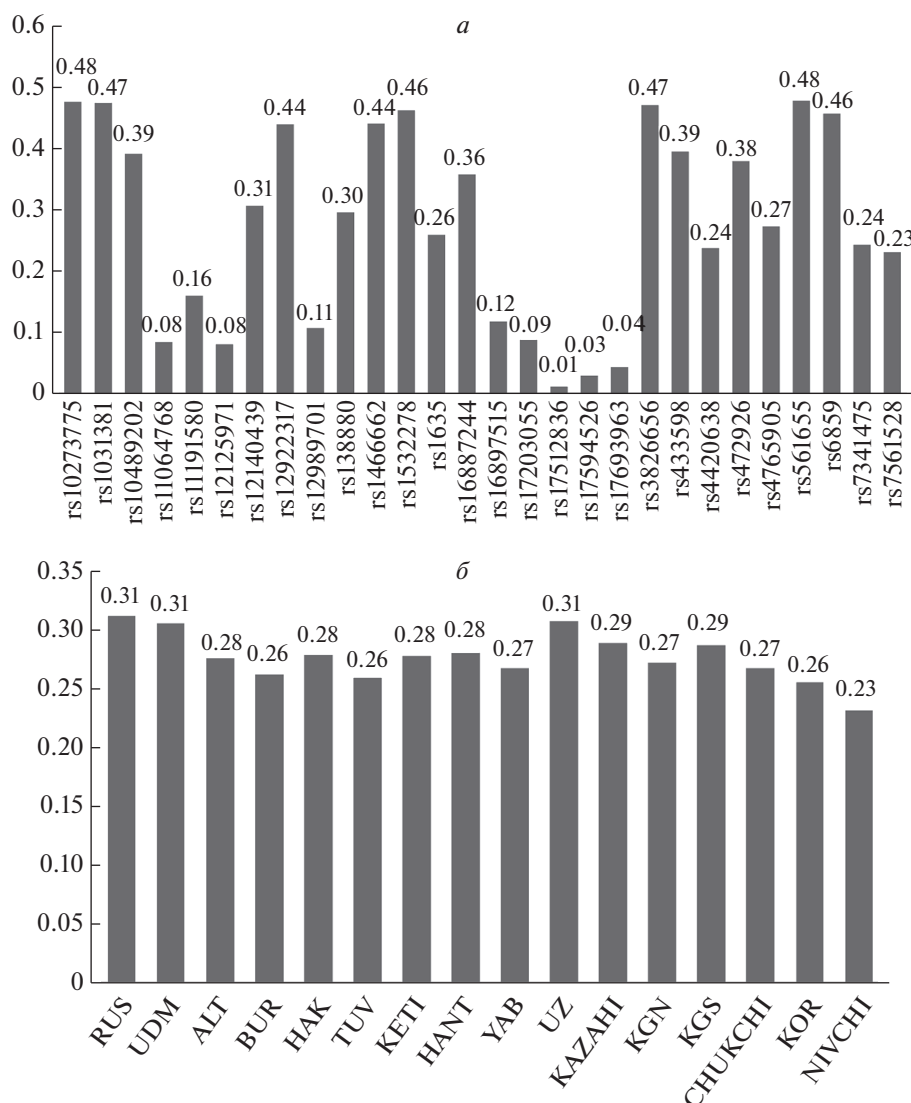


Рис. 1. Средние значения ожидаемой гетерозиготности. *а* — отдельно по каждому генетическому маркеру; *б* — отдельно для каждой популяции Северной Евразии. Для рис. 1, 2: KGN — киргизы северные, KGS — киргизы южные, ALT — алтайцы, BUR — буряты, KOR — коряки, NIVCHI — нивхи, TUV — тувинцы, HAK — хакасы, HANT — ханты, CHUKCHI — чукчи, YAB — якуты, RUS — русские, KAZANI — казахи, UDM — удмурты, KETI — кеты, UZ — узбеки.

Бонферрони выявлено четыре статистически достоверных отклонений от равновесия Харди–Вайнберга.

Уровень генетического разнообразия исследуемых популяций Северной Евразии оценивали на основании данных ожидаемой гетерозиготности (H_e). Высокое значение средней ожидаемой гетерозиготности (>0.45) показали шесть маркеров из 28: rs10273775 гена *CNTNAP2*, rs1031381 гена *NCAPD3*, rs1532278 гена *CLU*, rs3826656 гена *CD33*, rs561655 межгенного региона *PICALM/RNU6-560P*, rs6859 гена *NECTIN2*, при этом максимальный уровень генетического разнообразия (0.5) не показал ни один из маркеров (рис. 1, *а*). Максимальное значение ожидаемой гетерозиготности (0.48) показа-

ли локусы rs10273775 гена *CNTNAP2* и rs561655 межгенного региона *PICALM/RNU6-560P*. Наименьшее значение ожидаемой гетерозиготности показали два маркера гена *TCF4*: rs17512836 и rs17594526. В целом 79% маркеров показали уровень гетерозиготности ниже 0.45.

Среди исследуемых 16 популяций Северной Евразии наибольший уровень генетического разнообразия (0.31) показали европеоидные популяции: русские, удмурты и узбеки (рис. 1, *б*). По-видимому, формирование этих популяций происходило на основе разнородных по происхождению групп. Среди монголоидных популяций у нивхов наблюдался наименьший уровень генетического разнообразия 0.23. Нивхи представляют собой

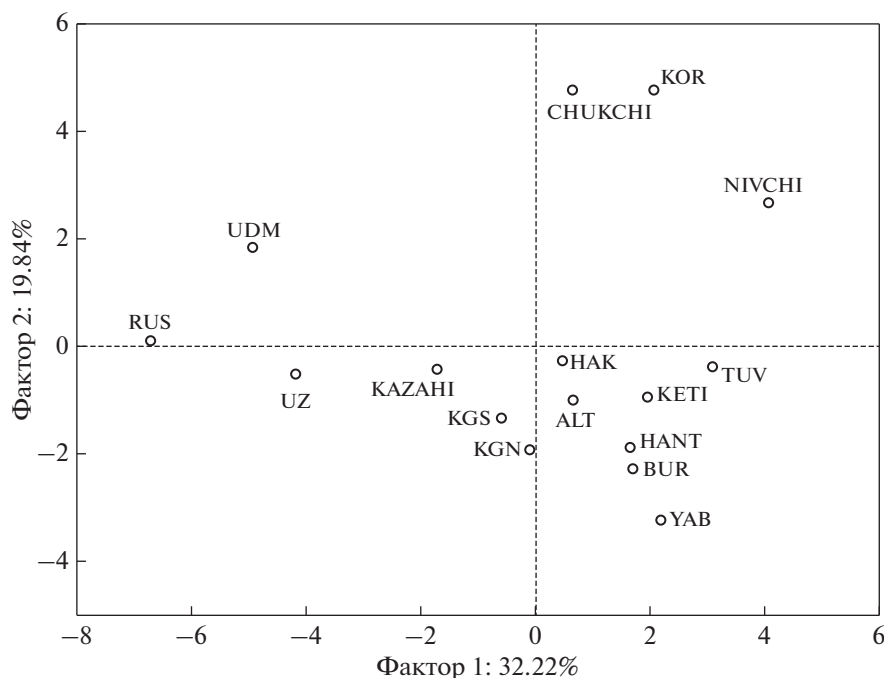


Рис. 2. Расположение исследованных этнических групп в пространстве главных компонент аллельных частот.

небольшой этнос, изолированный как в языковом, так и в территориальном плане. Вероятно, низкий уровень генетического разнообразия связан с длительной изоляцией этого этноса от контактов с другими популяциями. В настоящей работе наблюдается снижение генетического разнообразия с запада на восток, что также зафиксировано по другим системам маркеров. Хотя для других маркеров были описаны более высокие значения генетического разнообразия для популяций Северной Евразии, тем не менее общие закономерности в структуре генофонда сохраняются. Так, по X-хромосомным STR и SNP маркерам наименьший уровень генетического разнообразия наблюдался в популяциях коренных этносов Сибири у бурятов (0.746 и 0.437) и тувинцев (0.715 и 0.436), в то время как наибольшим генетическим разнообразием обладала популяция русских — 0.480 по SNP маркерам и 0.779 по STR маркерам [37]. Кроме того, ранее по Y-хромосомным диаллельным маркерам было показано высокое генетическое разнообразие для европеоидных популяций русских (0.799) и удмуртов (0.778), в то время как для нивхов (0.486) было обнаружено низкое разнообразие по этим же маркерам [38].

Из 28 SNP можно выделить две группы маркеров, которые преобладают у европеоидов или у монголоидов. Так, предковые аллели преобладают в монголоидных популяциях по локусам rs433598 гена *ACSM1* и rs4765905 гена *CACNA1C*, в то время как более высокая частота предкового аллеля в европеоидных популяциях наблюдалась

для других пяти маркеров: rs12922317 гена *SNX29*, rs1466662 гена *DCHS2*, rs1635 гена *NKAPL*, rs561655 межгенного региона *PICALM/RNU6-560P*, rs7561528 гена *LOC105373605*.

Вероятно, все эти данные в совокупности свидетельствуют о популяционной или этнической специфичности этих маркеров. Так, предковый аллель *A* rs12922317 гена *SNX29* преобладает у европеоидных популяций в нашем исследовании (русские — 68%, удмурты — 55%, узбеки — 52%), в то время как у монголоидов частым является альтернативный аллель *G*, а частота минорного аллеля *A* варьирует от 18% у нивхов до 45% у кетов.

Генетические взаимоотношения между популяциями и генетическая дифференциация популяций

При анализе генетических взаимоотношений между популяциями по 28 маркерам использовали метод главных компонент, который основан на многомерном анализе частот предковых аллелей. Положение 16 исследованных популяций в пространстве двух главных компонент частот 28 локусов, ассоциированных с заболеваниями ШЗ, БА и когнитивными эндофенотипами, приведено на рис. 2.

Две первые главные компоненты (ГК) в совокупности объясняют 52.06% вариативности аллельных частот в изученных популяциях. Расположение 16 популяций в пространстве главных компонент отражает их географическую локали-

Таблица 4. Значения F_{st} в суммарной выборке по каждому локусу

SNP	Ген	F_{st}
rs138880	<i>BRD1</i>	-0.00075
rs10489202	<i>MPC2</i>	0.00273
rs17512836	<i>TCF4</i>	0.00758
rs1532278	<i>CLU</i>	0.00992
rs12125971	<i>LOC105378888/PRMT6</i>	0.01118
rs11064768	<i>CCDC60</i>	0.01322
rs17693963	<i>GPR89P/TRV-AAC1-5</i>	0.01385
rs6859	<i>NECTIN2</i>	0.01741
rs12989701	<i>LOC105373605</i>	0.01876
rs17203055	<i>ARHGAP31</i>	0.01959
rs472926	<i>CDON</i>	0.02034
rs4420638	<i>APOC1</i>	0.02098
rs11191580	<i>NT5C2</i>	0.02105
rs16897515	<i>POM121L2</i>	0.02516
rs10273775	<i>CNTNAP2</i>	0.02799
rs16887244	<i>LSM1</i>	0.03112
rs12140439	<i>LINC01741/SEC16B</i>	0.03307
rs1635	<i>NKAPL</i>	0.04165
rs561655	<i>PICALM/RNU6-560P</i>	0.04655
rs17594526	<i>TCF4</i>	0.04689
rs1031381	<i>NCAPD3</i>	0.04878
rs7561528	<i>LOC105373605</i>	0.0502
rs4765905	<i>CACNA1C</i>	0.05852
rs3826656	<i>CD33</i>	0.06428
rs1466662	<i>DCHS2</i>	0.06952
rs7341475	<i>RELN</i>	0.07724
rs12922317	<i>SNX29</i>	0.09171
rs433598	<i>ACSM1</i>	0.10987

зацию и позволяет выделить четыре кластера: популяции Дальнего Востока (чукчи, коряки, нивхи), популяции Сибири (хакасы, тувинцы, кеты, алтайцы, ханты, буряты, якуты), популяции Средней Азии (узбеки, казахи, киргизы северные, киргизы южные) и популяции европейской части России (русские, удмурты).

Генетическую дифференциацию популяций по 28 маркерам рассчитывали с использованием анализа молекулярной дисперсии (AMOVA). Оценку генетической дифференциации проводили с помощью коэффициента F_{st} . Необходимо отметить, что не все из 28 изученных маркеров показали статистически значимую дифференциацию, по двум локусам различия не являются статистически значимыми (rs10489202 гена *MPC2* и rs138880 гена *BRD1*). Общий уровень генетической дифференциации изученных 16 популяций составил 3.6%. Локус rs138880 гена *BRD1* ($F_{st} = -0.00075$,

$p = 0.603$) показал более высокое внутривнутрипопуляционное различие, чем межпопуляционное. Значения F_{st} в суммарной выборке по каждому локусу приведены в табл. 4.

Показано, что наибольший вклад в межпопуляционное разнообразие вносят различия в частотах аллелей локусов rs433598 гена члена семейства ацил-КоА-синтетаз-1 (*ACSM1*), rs12922317 гена сортирующего нексина-29 (*SNX29*), rs7341475 гена рилина (*RELN*), rs1466662 гена протокадгерина-23 (*DCHS2*) и rs3826656 гена молекулы CD33 (*CD33*). Белковые продукты этих генов участвуют в процессах развития и функционирования нервной системы. Так, белок протокадгерин-23 вовлечен в процесс аксонального поиска пути и ветвления дендритов, белок рилин контролирует межклеточные взаимодействия, важные для миграции нейронов во время развития мозга, функция белка сортирующего нексина-29 связана с регулированием

мембранного транспорта при эндоцитозе в синапсах центральной нервной системы, молекула CD33 принадлежит к семейству иммуноглобулинов и экспрессируется микроглией и макрофагами в головном мозге, а белок ацил-КоА-синтетаза I жирных кислот является магний-зависимым ферментом, участвующим в энергетическом метаболизме митохондрий нейронов и глии.

В целом при сравнении общего уровня генетической дифференциации популяций Северной Евразии по маркерам, связанным с заболеваниями, нарушающими когнитивные функции человека, с другими системами маркеров, показано, что он чуть выше значения по X-хромосомным STR-маркерам, для которых уровень генетической дифференциации был 2.58% [37], и значительно меньше уровня генетической дифференциации по Y-хромосомным диаллельным и STR-маркерам, где уровень генетической дифференциации был 21.61 и 22.25% соответственно [38, 39].

Таким образом, в настоящем исследовании были впервые изучены генетические различия популяций Северной Евразии по полиморфизму генов, связанных с заболеваниями, которые ведут к нарушению когнитивных функций человека. В целом анализ внутрипопуляционного и межпопуляционного генетического разнообразия по 28 маркерам в 16 популяциях отражает закономерности структуры генофонда Северной Евразии, которые описаны по другим системам маркеров: Y STR-маркеры, X STR-маркеры, X SNP-маркеры, аутосомные STR-маркеры и митохондриальные маркеры [37–40]. Тем не менее актуальной задачей остается накопление данных из исследований, выполненных не только в рамках GWAS в различных популяциях мира по разным системам маркеров. Но кроме этого результаты нашей работы свидетельствуют о присутствии популяционной специфики в распределении частот некоторых изученных маркеров, связанных с заболеваниями с нарушениями КФ. Данный факт является важным с точки зрения выявления у разных народов закономерностей распространения наиболее часто встречающихся МФЗ с нарушениями КФ человека, в том числе болезни Альцгеймера и шизофрении.

Исследование выполнено за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-13045).

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. Яхно Н.Н., Захаров В.В., Локишина А.Б. и др. Деменции: руководство для врачей, 3-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2011. 272 с.
2. Захаров В.В., Яхно Н.Н. Когнитивные расстройства в пожилом и старческом возрасте. Методическое пособие для врачей. М., 2005. 71 с.
3. Alzheimer's Association. Alzheimer's Disease Facts and Figures // *Alzheimers Dement.* 2019. V. 15. № 3. P. 321–387.
4. Heinrichs R.W., Zakzanis K.K. Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence // *Neuropsychology.* 1998. V. 12. № 3. P. 426–445. <https://doi.org/10.1037//0894-4105.12.3.426>
5. Kontaxaki M.I., Kattoulas E., Smyrnis N., Stefanis N.C. Cognitive impairments and psychopathological parameters in patients of the schizophrenic spectrum // *Psychiatriki.* 2014. V. 25. № 1. P. 27–38.
6. Logue M.W., Schu M., Vardarajan B.N. et al. Multi-Institutional Research on Alzheimer genetic epidemiology (MIRAGE) study group. A comprehensive genetic association study of Alzheimer disease in African Americans // *Arch. Neurol.* 2011. V. 68. № 12. P. 1569–1579. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.646>
7. Seshadri S., Fitzpatrick A.L., Ikram M.A. et al. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease // *JAMA.* 2010. V. 303. № 18. P. 1832–1840. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.574>
8. Shi Y., Li Z., Xu Q. et al. Common variants on 8p12 and 1q24.2 confer risk of schizophrenia // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. № 12. P. 1224–1227.
9. Kirov G., Zaharieva I., Georgieva L. et al. A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling // *Mol. Psychiatry.* 2009. V. 14. № 8. P. 796–803. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.33>
10. Ripke S., Sanders A.R., Kendler K.S. et al. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. № 10. P. 969–976.
11. Loo S.K., Shtir C., Doyle A.E. et al. Genome-wide association study of intelligence: Additive effects of novel brain expressed genes // *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* 2012. V. 51. № 4. P. 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2012.01.006>
12. Aberg K.A., Liu Y., Bukszár J. et al. A comprehensive family-based replication study of schizophrenia genes // *JAMA Psychiatry.* 2013. V. 70. № 6. P. 573–581. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.288>
13. Stefansson H., Ophoff R.A., Steinberg S. et al. Common variants conferring risk of schizophrenia // *Nature.* 2009. V. 460(7256). P. 744–747. <https://doi.org/10.1038/nature08186>
14. Borglum A.D., Demontis D., Grove J. et al. Genome-wide study of association and interaction with maternal

- cytomegalovirus infection suggests new schizophrenia loci // *Mol. Psychiatry*. 2014. V. 19. № 3. P. 325–333. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.2>
15. *Hu X., Pickering E., Liu Y.C. et al.* Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late-onset Alzheimer's disease // *PLoS One*. 2011. V. 24. № 6(2):e16616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016616>
16. *O'Donovan M.C., Craddock N., Norton N. et al.* Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. № 9. P. 1053–1055. <https://doi.org/10.1038/ng.201>
17. *Kamboh M.I., Barmada M.M., Demirci F.Y. et al.* Genome-wide association analysis of age-at-onset in Alzheimer's disease // *Mol. Psychiatry*. 2012. V. 17. № 12. P. 1340–1346.
18. *Naj A.C., Jun G., Beecham G.W. et al.* Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. № 5. P. 436–441. <https://doi.org/10.1038/ng.801>
19. *Yue W.H., Wang H.F., Sun L.D. et al.* Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for schizophrenia in Han Chinese at 11p11.2 // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. № 12. P. 1228–1231. <https://doi.org/10.1038/ng.979>
20. *Sullivan P.F., Lin D., Tzeng J.Y. et al.* Genome-wide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1 // *Mol. Psychiatry*. 2008. V. 13. № 6. P. 570–584. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.25>
21. *Purcell S.M., Wray N.R., Stone J.L. et al.* Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder // *Nature*. 2009. V. 460. № 7256. P. 748–752.
22. *Bergen S.E., O'Dushlaine C.T., Ripke S. et al.* Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder // *Mol. Psychiatry*. 2012. V. 17. № 9. P. 880–886. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.73>
23. *Need A.C., Attix D.K., McEvoy J.M. et al.* A genome-wide study of common SNPs and CNVs in cognitive performance in the CANTAB // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 23. P. 4650–4661. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp413>
24. *Cirulli E.T., Kasperaviciute D., Attix D.K. et al.* Common genetic variation and performance on standardized cognitive tests // *Eur. J. Hum. Genet.* 2010. V. 18. № 7. P. 815–820. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.2>
25. *Bertram L., Lange C., Mullin K. et al.* Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. V. 83. № 5. P. 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.008>
26. *Athanasias L., Mattingdal M., Kähler A.K. et al.* Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort // *J. Psychiatr. Res.* 2010. V. 44. № 12. P. 748–753. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.02.002>
27. *Cummings A.C., Jiang L., Velez Edwards D.R. et al.* Genome-wide association and linkage study in the Amish detects a novel candidate late-onset Alzheimer disease gene // *Ann. Hum. Genet.* 2012. V. 76. № 5. P. 342–351. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2012.00721.x>
28. *Shifman S., Johannesson M., Bronstein M. et al.* Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women // *PLoS Genet.* 2008. V. 4(2):e28. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040028>
29. *Moreno-Grau S., de Rojas I., Hernández I. et al.* Genome-wide association analysis of dementia and its clinical endophenotypes reveal novel loci associated with Alzheimer's disease and three causality networks: The GR@ACE project2019 // *Alzheimers Dement.* 2019. V. 15. № 10. P. 1333–1347. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.06.4950>
30. *Mathew C.G.* The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // *Methods Mol. Biol.* 1985. V. 2. P. 31–34.
31. *Вагайцева К.В., Бочарова А.В., Марусин А.В. и др.* Разработка метода мультиплексного генотипирования полиморфных маркеров генов, ассоциированных с когнитивными способностями // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 6. С. 719–726.
32. *Степанов В.А., Трифонова Е.А.* Мультиплексное генотипирование однонуклеотидных полиморфных маркеров методом MALDI-TOF масс-спектрометрии: частоты 56 SNP в генах иммунного ответа в популяциях человека // *Мол. биология*. 2013. Т. 47. № 6. С. 976–986.
33. *Трифорова Е.А., Попович А.А., Вагайцева К.В. и др.* Метод мультиплексного генотипирования полиморфных вариантов генов, ассоциированных с ожирением и индексом массы тела // *Генетика*. 2019. Т. 55. № 10. С. 1218–1230.
34. *Nei M.* *Molecular Evolutionary Genetics*. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
35. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinform. Online*. 2007. V. 1. P. 47–50.
36. *Степанов В.А., Харьков В.Н., Трифонова Е.А., Марусин А.В.* Методы статистического анализа в популяционной и эволюционной генетике человека (Наследственность и здоровье): учебно-методическое пособие / Под ред. Пузырева В.П. Томск: Печатная мануфактура, 2014. 100 с.
37. *Вагайцева К.В.* Генетическое разнообразие популяций Северной Евразии по STR и SNP маркерам X-хромосомы и их ДНК-идентификационный потенциал: Дис. ... канд. биол. наук. Томск: ФГБНУ “Научно-исследовательский институт медицинской генетики”, 2015. 224 с.
38. *Харьков В.Н.* Структура и филогеография генофонда коренного населения Сибири по маркерам

- Y-хромосомы: Дис. ... докт. биол. наук. Томск: ФГБУ "Научно-исследовательский институт медицинской генетики" СО РАМН, 2012. 441 с.
39. Степанов В.А., Харьков В.Н., Пузырев В.П., Спиридонова М.Г. Генетическое разнообразие линий Y-хромосомы у народов Сибири. Генофонд населения Сибири. Новосибирск: Изд-во Ин-та археологии и этнографии СО РАН, 2003. С. 147–152.
40. Голубенко М.В., Еремина Е.Р., Тадинова В.Н. и др. Территориальная дифференциация генофонда народов Сибири и Средней Азии по рестрикционному полиморфизму митохондриальной ДНК // Мед. генетика. 2002. Т. 1. № 3. С. 124–128.

Genetic Diversity of Populations in North Eurasia by Genetic Markers Associated with Diseases Impairing Human Cognitive Functions

A. V. Bocharova^{a,*} and V. A. Stepanov^a

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

^{*}*e-mail: anna.bocharova@medgenetics.ru*

Genetic diversity of sixteen native populations of North Eurasia is investigated using a panel of genetic markers in genes associated, according to the data of (GWASs) genome-wide associative studies, with diseases that lead to impaired human cognitive functions (schizophrenia, Alzheimer's disease and their cognitive endophenotypes). There is a decrease of genetic diversity in the geographic space from west to east. The highest level of genetic diversity was shown by/for Caucasoid populations. There are two groups of SNPs that predominate in Caucasians or Mongoloids. The location of sixteen populations in the space of the principle components demonstrates their geographic localization. Clusterization of populations in accordance with their affiliation to four geographic regions was observed. In general, the analysis of within- and between-population genetic diversity for 28 markers in 16 populations replicates the patterns of Northern Eurasia gene pool structure, which are described using other marker systems.

Keywords: cognitive functions, Schizophrenia, Alzheimer's disease, human populations, genetic diversity.

СВЯЗЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ГЕНЕ *YJEFN3* С КОГНИТИВНЫМ ДЕФИЦИТОМ ПРИ РАССТРОЙСТВАХ ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА

© 2021 г. М. В. Алфимова¹, *, Н. В. Кондратьев¹, А. К. Голов¹,
В. Г. Каледа¹, Л. И. Абрамова¹, В. Е. Голимбет¹

¹Научный центр психического здоровья, Москва, 115522 Россия

*e-mail: m.alfimova@gmail.com

Поступила в редакцию 14.10.2020 г.

После доработки 13.11.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

В данной работе проанализировано метилирование каждого из цитозинов на фрагменте гена *YJEFN3*, расположенного в одном из локусов риска шизофрении. Цель исследования состояла в том, чтобы определить, связано ли метилирование данного фрагмента с уровнем когнитивного дефицита больных и в какой степени оно зависит от гаплотипа риска. Образцы периферической крови 70 больных с расстройствами шизофренического спектра и 72 здоровых, прошедших когнитивное тестирование, исследовали с помощью метода бисульфитного секвенирования единичных молекул ДНК в реальном времени. Обнаружена отрицательная корреляция между метилированием CpG-сайта с координатой chr19:19532203 (Illumina ID: cg08623644) и индексом когнитивного функционирования пациентов. Метилирование cg08623644 было ассоциировано с гаплотипом риска в объединенной выборке и у здоровых. У больных наблюдалось ослабление этой ассоциации. Полученные результаты позволяют предположить, что метилирование cg08623644 может быть периферическим маркером молекулярных процессов, связанных с тяжестью течения заболевания, что требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: эпигенетика, метилирование ДНК, шизофрения, когнитивный дефицит, SMRT-BS.

DOI: 10.31857/S0016675821080014

Консорциум по психиатрической геномике в полногеномных мегаисследованиях (PGC2 GWAS) выявил более 100 локусов, значимо ассоциированных с шизофренией [1, 2]. Большинство из них ранее не рассматривались в качестве функциональных кандидатов для шизофрении и не изучались в связи с ее проявлениями. Для раскрытия патогенеза заболевания необходимо понимание роли в нем этих участков ДНК как на уровне последствий для работы генома, так и на уровне симптомов и синдромов.

Предполагается, что в каждом локусе риска может действовать целый ряд генетических вариантов, которые влияют на заболевание в разной степени и разными способами, в том числе регулируя экспрессию генов посредством метилирования ДНК [3]. Анализ локусов количественных признаков (QTL) указывает на значительное обогащение наборов QTL для метилирования (mQTL) и экспрессии (eQTL) в мозге индексными полиморфизмами PGC2 GWAS шизофрении [4]. Учитывая это, оценка метилирования ДНК (меДНК) представляется перспективным направлением исследования молекулярных механизмов, ведущих от индексных локусов GWAS шизофрении к

проявлениям заболевания. В частности, такой подход может оказаться продуктивным для раскрытия биологических основ когнитивного дефицита больных [5], одного из ключевых синдромов шизофрении, определяющего тяжесть ее течения и уровень адаптации пациента [6].

В данной работе, в рамках проекта исследования связи меДНК и когнитивных нарушений при шизофрении, мы проанализировали фрагмент одного из индексных локусов PGC2 GWAS [1], совпадающих с локусами дифференциального метилирования, найденными в полнометиломных исследованиях периферической крови [7] и постмортальных образцов мозга больных [8], а именно локуса 47 (chr19: 19263213–19547213, GRCh38/hg38). Для изучения был выбран фрагмент ДНК (chr19: 19532136–19533050) внутри гена *YJEFN3* (YjeF N-terminal domain-containing protein 3, также известный как *AIBP2*). Критерии выбора фрагментов подробно описаны ранее [9]. В частности учитывали наличие однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), расположенных внутри сайтов связывания транскрипционных факторов или внутри сайтов, образующих CpG (CpG-SNP), по-

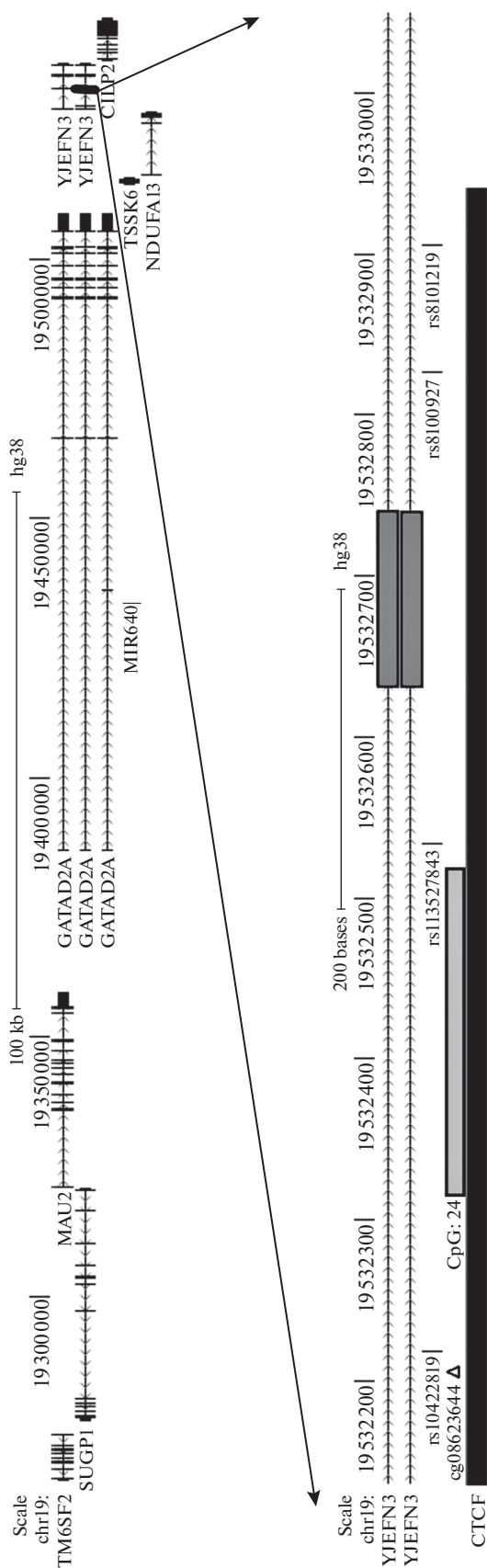


Рис. 1. Схематическое изображение изученного фрагмента ДНК в геномном браузере UCSC [10]. Вверху — локус 47 PG2 GWAS шизофрении с указанием положения изученного фрагмента в гене *YJEFN3*. Внизу — изученный фрагмент *YJEFN3* с указанием расположения общих SNP, eg08623644, CG-островка (CpG: 24) и сайта связывания CTCF. На верхнем рисунке экзоны в генах обозначены вертикальными линиями, на нижнем — прямоугольниками.

скольку они могут оказывать влияние на экспрессию генов и метилирование соседних цитозинов.

Исследованный фрагмент (рис. 1) содержит участки генома, метилирование которых по-разному ассоциировано с экспрессией и транскрипцией генов, а именно: части интронов, CG-островов, экзон, границы экзон-интрон (UCSC genomic browser [10]). В нем присутствуют кластер гиперчувствительности к ДНКазе I и чувствительные к метилированию ДНК сайты связывания транскрипционных факторов, включая многофункциональный транскрипционный фактор CTCF. Локализованные в пределах фрагмента четыре общих SNP являются eQTL в разных тканях, в том числе в мозге и крови, и локусами, влияющими на альтернативный сплайсинг (sQTL), как самого гена *YJEFN3*, так и ряда близлежащих генов (табл. 1) [11].

Цель исследования состояла в том, чтобы определить: 1) связано ли меДНК данного фрагмента в периферической крови с уровнем когнитивного дефицита больных шизофренией и 2) в какой степени уровень метилирования в данном регионе зависит от локальной структуры ДНК, а именно от наличия гаплотипа риска заболевания. Учитывая, что среднее метилирование промотора/тела гена реже коррелирует с экспрессией гена, чем метилирование единичных CpG [12], основной анализ проводили на уровне индивидуальных вариативно метилированных цитозинов. Применяли метод бисульфитного секвенирования единичных молекул ДНК в реальном времени (single-molecule real-time bisulfite sequencing, SMRT-BS [13]), позволяющий изучать метилирование длинных фрагментов ДНК с разрешением до индивидуальных цитозинов и определять гаплотипы непосредственно из данных секвенирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выборку формировали с использованием базы данных лаборатории клинической генетики (НЦПЗ, Москва) на основе критериев, более подробно описанных ранее [14]. Согласно самоотчету, испытуемые имели полное среднее или высшее образование, были русскими, не младше 18 и не старше 45 лет и не страдали заболеваниями, связанными с нарушением интеллектуальных процессов.

Выборку составили 70 психотических больных, находившихся в момент исследования на стационарном лечении в стабильном состоянии, позволявшем провести когнитивное тестирование (средний возраст 27.41 ± 6.71 лет, 49% женщин), и 72 здоровых испытуемых без наследственной отягощенности психозами (средний возраст 26.63 ± 6.72 лет, 53% женщин). Большинство пациентов ($n = 63$) страдали шизофренией (F20 согласно Международной классификации болезней 10-го

Таблица 1. Характеристика полиморфных сайтов (SNP), образующих гаплотип

SNP	Координата на хромосоме 19	Описание	MAF	LD с rs2905426	eQTL	
					кровь	мозг
rs10422819 (CpG-SNP)	19532219	Интрон, C>A	A: 32%	D': 1 R ² : 0.95	<i>GATAD2A, LPAR2, MAU2, NDUFA13, TSSK6</i>	<i>CILP2, YJEFN3</i>
rs113527843	19532534	Интрон, A>T	T: 17%	D': 1 R ² : 0.41	<i>GATAD2A, GMIP, LPAR2, NDUFA13, TSSK6, YJEFN3</i>	<i>CILP2</i>
rs8100927	19532827	Интрон, C>G	G: 17%	D': 1 R ² : 0.41	<i>GMIP, LPAR2, NDUFA13, TSSK6, YJEFN3</i>	<i>CILP2</i>

Примечание. Координаты даны согласно GRCh38/hg38. MAF — частота минорного аллеля в европейских популяциях по данным проекта 1000 геномов [18]. SNP rs2905426 — теговый SNP локуса 47 PGC2 GWAS [1]. LD — неравновесие по сцеплению в европейских популяциях [18]. eQTL — локусы количественных признаков для экспрессии перечисленных генов по данным GTEx v8 [11], для гена *CILP2* — в базальных ганглиях, для *YJEFN3* — в коре мозга.

пересмотра). Выборка также включала лиц с острым психотическим (F23, $n = 3$) и шизоаффективным расстройством (F25, $n = 4$). Все испытуемые дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования одобрено Этическим комитетом НЦПЗ.

Каждый участник выполнил шесть когнитивных тестов для оценки эпизодической памяти, регуляторно-исполнительных функций и социальных когний. Как подробно описано ранее [14], индивидуальный индекс когнитивного функционирования вычисляли путем усреднения выраженных в Т-баллах показателей этих тестов.

Геномная ДНК была выделена из 1 мл периферической крови с помощью стандартных проце-

дур. Статус метилирования определяли методом SMRT-BS на основе бисульфитной конверсии и высокопроизводительного секвенирования третьего поколения PacBio: PacBio RSII, P6/C4 chemistry, CCS reads. Метод был ранее модифицирован и включал подавление ПЦР на коротких матрицах с помощью идентичных адаптеров на концах праймеров (“panhandle” SMRT-BS [15]). Метод и его модификация, а также процедуры подготовки и контроля качества данных секвенирования и определения гаплотипов подробно описаны ранее [15, 16]. Для создания библиотеки использовали праймеры на обратную цепь ДНК: прямой —

GCAGTCGAACATGTAGCTGACTCAGGTCACGGTGTTTAAGATTTAGGAGGTGGTAG
и обратный —

GCAGTCGAACATGTAGCTGACTCAGGTCACCTCAAACACTACAACCTTAAAAACCCA.

Всего было получено 4005 прочтений. В дальнейший анализ включали образцы с количеством прочтений не менее пяти. Для каждого испытуемого вычисляли долю метилирования индивидуальных CpG/CpH как отношение прочтений с неконвертированным цитозином к общему количеству прочтений для данного CpG/CpH.

Статистический анализ проводили с помощью свободно распространяемой программы JASP 0.12.2 [17]. В дополнение к анализу цитозинов, показавших вариативное метилирование — от 0.2 до 0.8, оценили средние значения метилирования CpG для участков ДНК с различным геномным значением. Для транскрипта 1 гена *YJEFN3* (NCBI Reference Sequence: NM_198537.4; chr19: 19528911–19537581) это были часть интрона 2, расположенная вокруг CpG-SNP перед CG-островком, сам островок (chr19: 19532316–19532518), экзон 3 и прилегающая к экзону часть интрона 3. Эти же

участки представляли собой части интронов 1 и 2 и экзон 2 транскрипта 2 (NM_001190328.2).

Связь метилирования с когнитивным индексом оценивали методом пошаговой линейной регрессии, отдельно в группах больных и здоровых. Для этого у гетерозигот уровень метилирования усредняли по двум аллелям. Использовали иерархический подход: полную модель — с показателями метилирования всех вариативно метилированных CpG — сравнивали с нулевой моделью, включающей в качестве предикторов только пол и возраст. Аналогичный анализ проводили для участков ДНК. Изменение доли объясняемой дисперсии когнитивного индекса (ΔR^2) при введении в модель метилирования служило показателем размера эффекта метилирования на когнитивный дефицит. Анализ с помощью программы G*Power 3.1.9.7 показал, что при мощности 80% и $\alpha = 0.05$ выборка в 70 больных достаточна для выявления средних эффектов метилирования индивидуальных

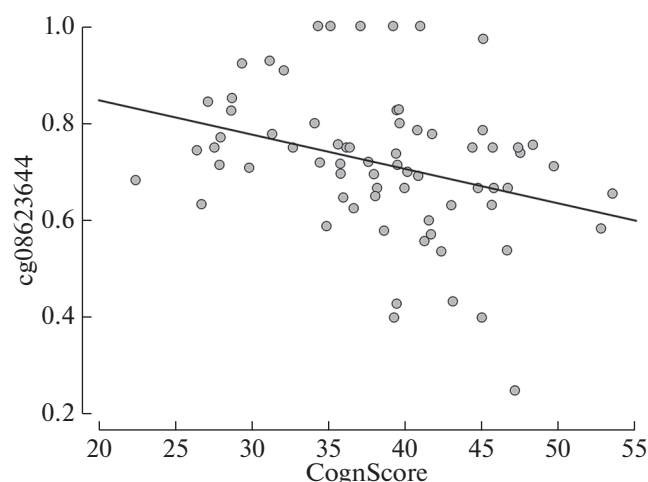


Рис. 2. Связь между когнитивным индексом и уровнем метилирования cg08623644 (CpG_19532203) в группе больных шизофренией. На оси x расположены значения когнитивного индекса, выраженные в Т-баллах, на оси y — доля метилирования CpG.

CpG на количественный признак (Cohen's $f^2 \geq 0.12$, или $\Delta R^2 \geq 0.10$) с контролем пола и возраста.

Учитывая особенности распределения показателей меДНК, аллель-специфичное метилирование (ASM) оценивали с помощью непараметрического теста Краскела—Уоллиса. Сравнивали три распространенных в европейских популяциях гаплотипа, образованных полиморфными сайтами rs10422819, rs113527843 и rs8100927 [18]. Для учета множественности сравнений значимыми считали различия, прошедшие порог $FDR < 0.05$. Post-hoc анализ проводили с помощью теста Данна.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пациенты и контроль не различались по возрасту, полу и среднему количеству прочтений. Среднее количество прочтений для больных и здоровых было равно 27.96 ± 23.44 и 28.44 ± 26.14 соответственно. Группы оказались идентичны по доле курящих (34%), потенциальному конфаундеру в исследованиях меДНК. У больных был достоверно снижен когнитивный показатель: 38.47 ± 6.76 против 50.25 ± 5.17 Т-баллов у контроля, $t = 11.69$, $d.f. = 140$, $p < 0.001$, Cohen's $d = 1.96$.

Частота гаплотипов rs10422819–rs113527843–rs8100927 в группе больных составила: AAC — 0.23, ATG — 0.14, CAC — 0.63; у здоровых: AAC — 0.215, ATG — 0.215, CAC — 0.57, при частотах в европейской популяции [18]: AAC — 0.15, ATG — 0.17, CAC — 0.68. Различия между больными и здоровыми по распределению гаплотипов не были значимы. Среди больных было 24 (0.34) гетерозиготы, среди здоровых — 26 (0.36). Гаплотип ATG был определен как гаплотип риска шизофрении на основании

данных проекта 1000 геномов [18] о сцеплении в европейских популяциях образующих гаплотип полиморфных сайтов с теговым полиморфизмом rs2905426 индексного локуса 47 PGC2 GWAS шизофрении (табл. 1).

Всего на изученном фрагменте ДНК находится 263 цитозина, из которых 43 образуют CpG-сайты. CpH-сайты были в основном неметилированы. Средний уровень метилирования геномных участков соответствовал их функциям (табл. 2). Обнаружено девять CpG с вариативным уровнем метилирования, четыре из которых находились вокруг CpG-SNP rs10422819, один располагался на границе интрона 2 и экзона 3, остальные — компактно в самом экзоне (координаты сайтов даны в табл. 2). Согласно тесту Манна—Уитни курение не влияло на метилирование в этих сайтах и участках.

Единственным значимым предиктором когнитивного дефицита больных ($p = 0.010$, $\Delta R^2 = 0.093$) оказался уровень метилирования в CpG-сайте с координатой chr19: 19532203, который обозначен как проба cg08623644 на микрочипах Illumina Infinium Human-Methylation450, использовавшихся в большинстве полнометиломных исследований шизофрении (см. обзор [19]). Корреляция между метилированием и когнитивным индексом была негативной: значение коэффициента регрессии = -14.09 , 95% bca CI = $-22.37 \dots -3.53$ (95%-ные доверительные интервалы [CI] определяли с помощью бутстреп-метода с использованием 5000 бутстреп-выборок, применяли байесовскую коррекцию). Таким образом, более низкому уровню метилирования соответствовали более высокие значения когнитивного индекса (рис. 2). Последующий анализ показал, что вклад метилирования cg08623644 в дисперсию когнитивного индекса оставался значимым ($p = 0.021$; $\Delta R^2 = 0.085$) при контроле генотипа и курения. Для данного анализа генотип кодировали как 0, 1 или 2 в зависимости от количества аллелей с гаплотипом риска. Он не влиял на когнитивный индекс. У здоровых не выявлено связей метилирования с уровнем когнитивного функционирования.

Результаты оценки ASM в объединенной выборке представлены в табл. 2. Как и ожидалось, имела место отчетливая зависимость меДНК от гаплотипа непосредственно в CpG-SNP: в случае аллеля А CpG сайт отсутствовал. Соответственно, при гаплотипах AAC и ATG, в отличие от гаплотипа CAC, метилирования практически не наблюдалось. Аналогичные различия между гаплотипами получены для среднего уровня метилирования всей части интрона 2, расположенной вокруг CpG-SNP, перед CG-островком. Помимо этого, значимое ASM отмечено для cg08623644. В этом сайте метилирование было снижено при гаплотипе риска ATG относительно двух других гаплоти-

Таблица 2. Средние значения (стандартные отклонения) уровней метилирования CpG-сайтов и участков в объединенной выборке в зависимости от гаплотипа rs10422819–rs113527843–rs8100927

Сайт (участок) <i>YJEFN3</i>	Среднее (<i>SD</i>)			KW, <i>p</i>	Тест Данна, <i>p</i>		
	AAC <i>N</i> = 43	ATG <i>N</i> = 34	CAC <i>N</i> = 115		AAC/ATG	AAC/CAC	ATG/CAC
19532203 cg08623644	0.75 (0.13)	0.63 (0.20)	0.72 (0.15)	0.011*	0.002	0.087	0.012
19532220	<0.01	<0.01	0.63 (0.14)	<0.001*	ns	<0.001	<0.001
19532250	0.21 (0.16)	0.28 (0.15)	0.28 (0.18)	0.021	0.012	0.004	ns
19532259	0.15 (0.13)	0.20 (0.14)	0.22 (0.15)	0.028	ns	0.004	ns
19532560	0.27 (0.19)	0.28 (0.17)	0.28 (0.16)	ns			
19532688	0.72 (0.16)	0.71 (0.16)	0.69 (0.16)	ns			
19532699	0.23 (0.13)	0.24 (0.16)	0.22 (0.15)	ns			
19532711	0.56 (0.20)	0.54 (0.24)	0.48 (0.19)	ns	ns	0.006	0.032
19532726	0.23 (0.15)	0.24 (0.19)	0.21 (0.13)	ns			
Инт2-CGI	0.25 (0.06)	0.25 (0.08)	0.40 (0.08)	<0.001*	ns	<0.001	<0.001
CGI	0.01 (0.01)	0.02 (0.01)	0.01 (0.01)	ns			
Экзон 3	0.71 (0.07)	0.71 (0.07)	0.69 (0.06)	ns			
Интрон 3	0.90 (0.07)	0.91 (0.07)	0.89 (0.06)	ns			

Примечание. *SD* – стандартное отклонение, ns – различия не значимы, $p > 0.05$. * – различия, значимые при $FDR < 0.05$. В колонке “Сайт” для отдельных вариативно метилированных CpG даны координаты на хромосоме 19 (hg38). Инт2-CGI – фрагмент интрона 2 транскрипта 1 *YJEFN3*, расположенный перед CG-островком – вокруг CpG-SNP; CGI – островок в интроне 2. KW – критерий Краскела–Уоллиса.

пов – AAC и CAC. Раздельный анализ групп показал, что у больных ASM в cg08623644 в отличие от здоровых не выражено: в группе больных $p = 0.296$, в группе здоровых $p = 0.028$ (рис. 3). При этом логистическая регрессия (с контролем пола и возраста) не выявила значимой связи уровня метилирования с диагнозом в этом или каком-либо другом вариативно метилированном CpG. Группы также не различались по средним уровням метилирования участков. Для того, чтобы проверить, не является ли это следствием неодинакового покрытия для разных испытуемых, дополнительно провели попарные сравнения метилирования у больных и здоровых с помощью теста Вилкоксона для связанных выборок. Пары аллелей “пациент-контроль” ($n = 76$) подобрали по количеству прочтений и гаплотипу. Как и логистическая регрессия, тест Вилкоксона не выявил значимых различий по метилированию между больными и здоровыми.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы оценили уровень метилирования индивидуальных цитозинов и участков с различными геномными функциями на фрагменте ДНК длиной около 1 kb, расположенном внутри индексного локуса 47 PGC2 GWAS шизофрении и представляющего собой часть гена *YJEFN3*, а также ассоциацию мДНК на данном участке с

когнитивным дефицитом больных. Полученные данные свидетельствуют о наличии ассоциации между метилированием CpG-сайта с координатой chr19: 19532203 (Illumina ID: cg08623644) и индекс-

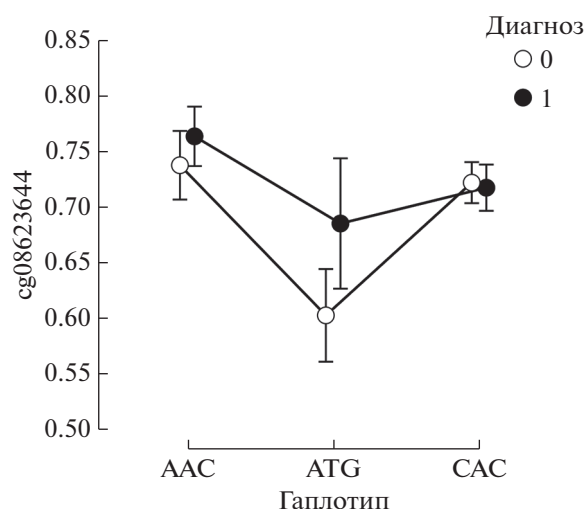


Рис. 3. Метилирование cg08623644 (CpG_19532203) в группах больных шизофренией (черные кружки) и здоровых (белые кружки) в зависимости от гаплотипа rs10422819–rs113527843–rs8100927. На рисунке показаны средние значения метилирования (кружки) и их стандартные ошибки (вертикальные черточки).

сом когнитивного функционирования пациентов. Более низкие, т.е. более близкие к нормативным, значения метилирования в этом сайте соответствовали большей сохранности когнитивных функций. В группе здоровых подобная корреляция отсутствовала, что указывает на ее специфичность для шизофрении. Этот же сайт показал аллель-специфичное метилирование, связанное с гаплотипом риска шизофрении: метилирование было снижено при гаплотипе риска относительно других гаплотипов в объединенной выборке, а также в группе здоровых. У больных выявлено ослабление связи между метилированием sg08623644 и гаплотипом, хотя значимых отличий по метилированию от здоровых не наблюдалось.

Общая гипотеза, лежащая в основе поиска ассоциации меДНК в регионах GWAS шизофрении с симптомами болезни, заключается в том, что меДНК может зависеть от генотипа и опосредовать причинно-следственную связь между структурой ДНК и проявлениями заболевания. Предполагается, что это имеет место, если метилирование находится под влиянием генотипа, т.е. mQTL; в других случаях выявляемое при различных заболеваниях дифференциальное метилирование отражает не путь от структуры ДНК к заболеванию, а нисходящие влияния болезненного процесса или предшествующих ему средовых факторов риска на метилирование [20]. Ранее [7], в отсутствие дифференциального метилирования sg08623644 при шизофрении, байесовский анализ ко-локализации подтвердил вероятность существования общего каузального фактора — полиморфизма — для связи локуса 47 с шизофренией и для аллель-специфичного метилирования sg08623644. В последующих исследованиях было показано, что на метилирование sg08623644 влияет более 200 mQTL, включая расположенный на исследованном фрагменте rs113527843, но не ближайший CpG-SNP rs10422819 ([20]; https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/eqlt/original_submissions/FHS_meQTLs/). Наши результаты относительно аллель-специфичного метилирования sg08623644 в общей выборке полностью согласуются с этими данными. Тем не менее, вопреки первоначальной гипотезе, полученные нами результаты в совокупности указывают на то, что метилирование в этом сайте при шизофрении, по-видимому, отражает средовые или стохастические факторы, запускающие или сопровождающие болезненный процесс, и не является “проводником” генетических влияний на фенотип.

Проведенное исследование не дает ответа на вопрос, маркером изменений работы какого именно гена или группы генов может быть повышение метилирования sg08623644. Регуляторный участок EN38E1945345, на границе которого нахо-

дится sg08623644, определен в рамках ENCODE как дистальный энхансер (>2 kb от старта инициации транскрипции) [21], что позволяет рассматривать целый ряд генов в качестве мишеней. На основании проведенного нами анализа баз данных UCSC genomic browser [10], GTEx [11], Human Protein Atlas [22] и ORegAnno [23] и литературы о близлежащих генах (табл. 1), наиболее интересным кандидатом для дальнейших исследований представляется *YJEFN3*, поскольку он, единственный из этих генов, характеризуется выраженной экспрессией в мозге. Недавнее исследование [24] позволяет предположить, что *YJEFN3* может быть вовлечен в патогенез шизофрении несколькими путями, в частности, как фактор ангиогенеза или как участник нарушенной при шизофрении регуляции NOTCH-сигнального пути [25].

Полученные результаты должны быть рассмотрены в свете имеющихся ограничений исследования. Во-первых, использованная выборка, возможно, не обладала достаточной мощностью для выявления восходящих от структуры ДНК — каузальных — эффектов метилирования на фенотип, поскольку предполагается, что их размер меньше, чем нисходящий эффект болезни на метилирование [20]. На основании имеющихся немногочисленных данных о связи метилирования с количественными поведенческими фенотипами (например, [26]) можно предположить, что эффекты (R^2) составляют примерно 0.05 и, следовательно, требуют выборки размером более 150 человек для обеспечения 80% мощности. Второе ограничение связано с использованием периферической крови для поиска маркеров психических функций и их патологии, так как меДНК тканеспецифично. Для sg08623644 обнаружены значимые положительные корреляции между уровнями его метилирования в крови и ряде регионов мозга [27, 28] несмотря на то, что доля метилирования данного цитозина в крови (около 70%) значительно выше такового в мозге (около 30–40%). Эти данные получены для общей популяции и согласуются с представлениями о межтканевой конкордантности меДНК в таких CpG, где метилирование находится под существенным генетическим влиянием (например, [29]). В нашем исследовании у больных эффект гаплотипа на метилирование данного сайта в периферической крови был ослаблен, что затрудняет интерпретацию выявленных закономерностей применительно к работе мозга. Наконец, мы учитывали только ограниченный ряд негенетических факторов, связанных с заболеванием или образом жизни в целом, потенциально влияющих на метилирование. В частности, мы не могли включить в анализ эффекты антипсихотического лечения,

поскольку все пациенты получали комплексную психофармакотерапию, различную на разных этапах заболевания. При этом следует отметить, что роль типичных нейролептиков, в частности галоперидола, в выявленной связи между метилированием индивидуального цитозина и тяжестью когнитивного дефицита представляется маловероятной, поскольку влияние галоперидола на метилом, по-видимому, носит генерализованный характер, способствуя гиперметилированию ДНК путем усиления экспрессии генов, кодирующих ДНК-метилтрансферазы и метилцитозин-связывающий доменный белок 2 [30]. В то же время атипичный антипсихотик клозапин вызывает разнонаправленные, в том числе нормализующие картину мДНК при шизофрении, изменения в метилировании нескольких десятков тысяч конкретных CpG [31, 32]. Назначение клозапина связано с резистентными, более тяжелыми формами шизофрении, и, возможно, улучшает когнитивное функционирование (см. обзор [33]). На этом основании можно было бы предположить роль клозапина в выявленной ассоциации уровня метилирования sg08623644 и когнитивного дефицита, например, как фактора, нормализующего оба признака. Однако среди генов, для которых к настоящему времени обнаружена выраженная связь лечения клозапином с метилированием, *YJEFN3* отсутствует [31, 34].

В целом исследование выявило сайт CpG_19532203 (sg08623644), метилирование которого у больных шизофренией коррелирует с уровнем когнитивного дефицита и в меньшей степени зависит от гаплотипа, чем у здоровых. Полученные результаты позволяют предположить, что метилирование sg08623644 может быть периферическим маркером молекулярных процессов, связанных с тяжестью течения заболевания, что требует дальнейшего изучения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00056).

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. *Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium*. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci // *Nature*. 2014. V. 511. P. 421–427.
<https://doi.org/10.1038/nature13595>
2. *Pardiñas A.F., Holmans P., Pocklington A.J. et al.* Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 3. P. 381–389.
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0059-2>
3. *Cannon M.E., Mohlke K.L.* Deciphering the emerging complexities of molecular mechanisms at GWAS loci // *Am. J. Hum. Genet.* 2018. V. 103. P. 637–653.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.10.001>
4. *Schulz H., Ruppert A., Herms S. et al.* Genome-wide mapping of genetic determinants influencing DNA methylation and gene expression in human hippocampus // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. Article 151.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01818-4>
5. *Алфимова М.В., Кондратьев Н.В., Голимбет В.Е.* Результаты и перспективы генетики когнитивных нарушений при шизофрении: эпигенетические подходы // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017. Т. 117. № 2. С. 130–135.
<https://doi.org/10.17116/jnevro201711721130-135>
6. *Halverson T.F., Orleans-Pobee M., Merritt et al.* Pathways to functional outcomes in schizophrenia spectrum disorders: Meta-analysis of social cognitive and neuro-cognitive predictors // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2019. V. 105. P. 212–219.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.07.020>
7. *Hannon E., Dempster E., Viana J. et al.* An integrated genetic-epigenetic analysis of schizophrenia: evidence for co-localization of genetic associations and differential DNA methylation // *Genome Biol.* 2016. V. 17. Article 176.
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-1041-x>
8. *Viana J., Hannon E., Dempster E. et al.* Schizophrenia-associated methylomic variation: molecular signatures of disease and polygenic risk burden across multiple brain regions // *Hum. Mol. Genet.* 2017. V. 26. P. 210–225.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw373>
9. *Кондратьев Н.В., Алфимова М.В., Голимбет В.Е.* Поиск мишеней для обнаружения связи между метилированием ДНК и нейрокогнитивным дефицитом при шизофрении // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017. Т. 117. № 8. С. 72–75.
<https://doi.org/10.17116/jnevro20171178172-75>
10. *Haeussler M., Zweig A.S., Tyner C. et al.* The UCSC Genome Browser database: 2019 update // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47 (D1). P. D853–D858.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1095>
11. *GTEX Consortium; Laboratory, Data Analysis & Coordinating Center (LDACC)—Analysis Working Group; Statistical Methods groups—Analysis Working Group et al.*

- Genetic effects on gene expression across human tissues // *Nature*. 2017. V. 550. № 7675. P. 204–213. <https://doi.org/10.1038/nature24277>
12. Lioznova A.V., Khamis A.M., Artemov A.V. et al. CpG traffic lights are markers of regulatory regions in human genome // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. Article 102. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5387-1>
 13. Yang Y., Scott S.A. DNA methylation profiling using long-read single molecule real-time bisulfite sequencing (SMRT-BS) // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1654. P. 125–134. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7231-9_8
 14. Лежейко Т.В., Алфимова М.В. Эпигенетические исследования когнитивного дефицита при шизофрении: некоторые методологические проблемы // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017. Т. 117. № 10. С. 76–80. <https://doi.org/10.17116/jnevro201711710176-80>
 15. Kondratyev N., Golov A., Alfimova M. et al. Prediction of smoking by multiplex bisulfite PCR with long amplicons considering allele-specific effects on DNA methylation // *Clin. Epigenetics*. 2018. V. 10. Article 130. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0565-1>
 16. Алфимова М.В., Кондратьев Н.В., Голов А.К., Голимбет В.Е. Метилирование промотора гена рилина в периферической крови и его связь с когнитивным функционированием больных шизофренией // *Мол. биология*. 2018. Т. 52. № 5. С. 782–792. <https://doi.org/10.1134/S0026898418050026>
 17. JASP Team. JASP (Version 0.12.2) [Computer software]. 2020. <https://jasp-stats.org/>.
 18. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation // *Nature*. 2015. V. 526. P. 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
 19. Richetto J., Meyer U. Epigenetic modifications in schizophrenia and related disorders: Molecular scars of environmental exposures and source of phenotypic variability // *Biol. Psychiatry*. 2020. S0006-3223(20)31327-5. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.03.008>
 20. Huan T., Joehanes R., Song C. et al. Genome-wide identification of DNA methylation QTLs in whole blood highlights pathways for cardiovascular disease // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. Article 4267. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12228-z>
 21. ENCODE Project Consortium, Moore J.E., Purcaro M.J. et al. Expanded encyclopedias of DNA elements in the human and mouse genomes // *Nature*. 2020. V. 583. № 7818. P. 699–710. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2493-4>
 22. Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M. et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome // *Science*. 2015. V. 347. № 6220. Article 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
 23. Lesurf R., Cotto K.C., Wang G. et al. ORegAnno 3.0: A community-driven resource for curated regulatory annotation // *Nucl. Ac. Res.* 2016. V. 44 (D1). P. D126–D132. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1203>
 24. Gu Q., Yang X., Lv J. et al. AIBP-mediated cholesterol efflux instructs hematopoietic stem and progenitor cell fate // *Science*. 2019. V. 363. P. 1085–1088. <https://doi.org/10.1126/science.aav1749>
 25. Hoseth E.Z., Krull F., Dieset I. et al. Attenuated notch signaling in schizophrenia and bipolar disorder // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. Article 5349. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23703-w>
 26. Taylor R.M., Smith R., Collins C.E. et al. Global DNA methylation and cognitive and behavioral outcomes at 4 years of age: A cross-sectional study // *Brain Behav.* 2020. V. 10. e01579. <https://doi.org/10.1002/brb3.1579>
 27. Hannon E., Lunnon K., Schalkwyk L., Mill J. Blood Brain DNA Methylation Comparison Tool. 2018. <https://epigenetics.essex.ac.uk/bloodbrain/?probenamcg=cg08623644>.
 28. Edgar R., Jones M., Meaney M. et al. BECon: A tool for interpreting DNA methylation findings from blood in the context of brain // *Transl. Psychiatry*. 2017. V. 7. e1187. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.171>
 29. van den Oord E.J., Clark S.L., Xie L.Y. et al. A Whole methylome CpG-SNP association study of psychosis in blood and brain tissue // *Schizophr. Bull.* 2016. V. 42. P. 1018–1026. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbv182>
 30. Swathy B., Banerjee M. Haloperidol induces pharmacogenetic response by modulating miRNA expression, global DNA methylation and expression profiles of methylation maintenance genes and genes involved in neurotransmission in neuronal cells // *PLoS One*. 2017. V. 12. e0184209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184209>
 31. Kinoshita M., Numata S., Tajima A. et al. Effect of Clozapine on DNA methylation in peripheral leukocytes from patients with treatment-resistant schizophrenia // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. Article 632. <https://doi.org/10.3390/ijms18030632>
 32. Higgins-Chen A.T., Boks M.P., Vinkers C.H. et al. Schizophrenia and epigenetic aging biomarkers: Increased mortality, reduced cancer risk, and unique Clozapine Effects // *Biol. Psychiatry*. 2020. V. 88. P. 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.01.025>
 33. MacKenzie N.E., Kowalchuk C., Agarwal S.M. et al. Antipsychotics, metabolic adverse effects, and cognitive function in schizophrenia // *Front. Psychiatry*. 2018. V. 9. Article 622. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00622>
 34. Hannon E., Dempster E.L., Mansell G. et al. Large-scale analysis of DNA methylation identifies cellular alterations in blood from psychosis patients and molecular biomarkers of treatment-resistant schizophrenia // *bioRxiv* 2020.04.05.026211. <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.026211>

Relationship between DNA Methylation within the *YJEFN3* Gene and Cognitive Deficit in Schizophrenia Spectrum Disorders

M. V. Alfimova^{a,*}, N. V. Kondratyev^a, A. K. Golov^a,
V. G. Kaleda^a, L. I. Abramova^a, and V. E. Golimbet^a

^a*Mental Health Research Center, Moscow, 115522 Russia*

^{*}*e-mail: m.alfimova@gmail.com*

The study investigated methylation of each cytosine within a fragment of the *YJEFN3* gene located at one of the index loci of schizophrenia risk with the aim to determine whether methylation of this fragment is associated with the level of cognitive deficit in patients and to what extent it depends on the risk haplotype. Peripheral blood samples from 70 schizophrenia spectrum patients and 72 healthy subjects who underwent cognitive testing were examined using single-molecule real-time bisulfite sequencing. A negative correlation was found between methylation of the CpG site at chr19: 19532203, hg38 (Illumina ID: cg08623644) and the cognitive index in patients. Methylation at cg08623644 was associated with the risk haplotype in the pooled sample and in healthy subjects. The patients showed a weakening of this association. The findings suggest that methylation at cg08623644 may be a peripheral marker of molecular processes associated with the severity of the disease, which deserves further investigation.

Keywords: epigenetics, DNA methylation, schizophrenia, cognitive deficit, SMRT-BS.

УДК 575.16

ЛОКУС rs833061 ГЕНА *VEGF* У БЕРЕМЕННЫХ С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ АССОЦИИРОВАН С ВЕСОМ НОВОРОЖДЕННОГО

© 2021 г. О. В. Головченко¹, М. Ю. Абрамова¹, И. В. Пономаренко¹, М. И. Чурносков¹, *

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

*e-mail: churnosov@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 14.10.2020 г.

После доработки 27.01.2021 г.

Принята к публикации 01.02.2021 г.

Изучали ассоциации веса новорожденного с полиморфными локусами генов факторов роста у беременных с преэклампсией (ПЭ) и рассмотрели их регуляторный потенциал. В группе беременных с ПЭ ($n = 190$) выполнено молекулярно-генетическое исследование пяти полиморфных локусов генов факторов роста — rs4444903 *EGF*, rs833061 *VEGFA*, rs2981582 *FGFR2*, rs6214 *IGF1*, rs1800469 *TGFβ1*. Соматометрия новорожденных проведена стандартными методами. Ассоциации исследуемых полиморфных локусов с весом новорожденного изучались с помощью лог-линейного регрессионного анализа. Установлено, что генетическим фактором риска рождения маловесных детей у беременных с ПЭ является аллель С локуса rs833061 гена *VEGFA* ($p_{\text{perm}} = 0.002$): у женщин с генотипом Т/Т вес новорожденного наибольший (в среднем 3524 г), тогда как у женщин с генотипом С/С вес новорожденного минимальный (в среднем 3415 г). Показано, что аллель С полиморфного локуса rs833061 ассоциирован с низкой транскрипцией гена *VEGFA* в щитовидной железе, более высоким уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *VEGFA* в скелетной мускулатуре, повышает аффинность ДНК к транскрипционным факторам BCL, Pax-5 и Znf143, влияет на взаимодействие ДНК с более чем 20 различными регуляторными белками (CTCF, RAD21, ZNF263, MAX и др.). Выявили, что локус rs833061 гена *VEGFA* у беременных с ПЭ ассоциирован с весом новорожденных и имеет значимый регуляторный потенциал.

Ключевые слова: вес новорожденного, преэклампсия, однонуклеотидный полиморфизм (SNP), *VEGFA*, ассоциации.

DOI: 10.31857/S0016675821090034

Антропометрические параметры (вес, рост) являются одними из ключевых показателей состояния новорожденного, которые, во-первых, характеризуют течение прошедшей беременности — эмбриональный рост, как известно, является важным показателем исхода беременности и отражает взаимодействие физиологических и патологических факторов, влияющих на плод в течение внутриутробного развития [1]. Нередко такие осложнения беременности как плацентарная недостаточность и преэклампсия приводят к рождению маловесных детей и в ряде случаев к развитию задержки роста плода [1, 2]. Во-вторых, низкий вес у новорожденных является известным фактором риска перинатальной заболеваемости (развитие дистресс-синдрома, меконияльной аспирации, некрозирующего энтероколита и др.) и смертности [2, 3]. В-третьих, у маловесных детей повышен риск развития различных заболеваний (сердечно-сосудистых, дислипидемии, метаболического синдрома и др.) во взрослой жизни [4, 5].

Согласно данным литературы важное значение в формировании антропометрических характеристик новорожденного (вес, рост) имеют материнские факторы (сосудистые и метаболические заболевания, тромбофилические состояния, нарушения питания, лекарственные препараты и др.) [3, 4, 6, 7] и в том числе генетические детерминанты материнского организма [8–10]. В исследованиях последних лет (в том числе выполненных на полногеномном уровне) показана связь полиморфизма ряда генов-кандидатов “материнского” генома с ростом и весом новорожденного [8, 9, 11]. Следует отметить, что в Российской Федерации такие исследования малочисленны. Тогда как установление генетических факторов материнского организма, ассоциированных с ростовесовыми показателями новорожденных, позволит уже на прегравидарном этапе формировать группы риска по рождению маловесных детей и уже в этих группах реализовать мероприятия по их предупреждению.

Цель исследования — изучить ассоциации веса новорожденного с полиморфными локусами генов факторов роста у беременных с преэклампсией и рассмотреть их регуляторный потенциал.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данное исследование было включено 190 беременных с преэклампсией (ПЭ), находившиеся под наблюдением в Перинатальном центре областной клинической больницы Святителя Иоасафа г. Белгорода (средний возраст 26.88 ± 5.37 лет). Диагноз ПЭ ставился на основании наличия генерализованных отеков, артериальной гипертензии и протеинурии. В выборки включались не родственные русские женщины, родившиеся в Центрально-Черноземном регионе РФ [12]. Из исследуемых выборок исключались индивидуумы с заболеваниями матки (фибромиома матки, аномалии развития внутренних половых органов), другой патологией беременности (аномалии прикрепления и расположения плаценты, задержка роста плода, резус-конфликт), патологией плода (ВПР), многоплодной беременностью. Клиническое и клинико-лабораторное обследование беременных проводилось на сроке родоразрешения. Соматометрия новорожденных проводилась стандартными методами. Данное исследование проводилось под контролем этического комитета медицинского факультета НИУ БелГУ (от каждой женщины, включенной в исследование, было получено информированное согласие).

Всем беременным с ПЭ проведено молекулярно-генетическое исследование пяти полиморфных локусов генов факторов роста: rs4444903 *EGF*, rs833061 *VEGFA*, rs2981582 *FGFR2*, rs6214 *IGF1*, rs1800469 *TGFβ1*. Включенные в исследование полиморфные варианты являются регуляторными (rSNP) [13] — согласно базы данных HaploReg (v.4.1) (<http://compbio.mit.edu/HaploReg>) они имеют значимый регуляторный потенциал. Выделение ДНК и генотипирование полиморфных локусов проводилось по методике, представленной ранее [14].

Для изучения ассоциации исследуемых полиморфных локусов с весом новорожденного использовался лог-линейный регрессионный анализ (рассматривались аллельная, аддитивная, рецессивная и доминантная генетические модели). Вычисления проводились в программе PLINK v. 2.050 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>). Рассчитывались коэффициенты регрессии (β) и их ошибки (SE), характеризующие направленность изменения изучаемого количественного показателя (веса новорожденного) на один полиморфный генетический вариант (минорный аллель). Следует отметить, что во-первых, в связи с тем, что распределение веса новорожденного в исследуемой выборке, оцененное с помощью критерия

Шапиро–Уилка, отличалось от нормального, для линейного регрессионного анализа использовались трансформированные значения веса новорожденного. Во-вторых, в генетический анализ в качестве ковариат включались возраст и индекс массы тела (до беременности) матерей (количественные переменные). В-третьих, при проведении расчетов выполнялась коррекция на множественные сравнения с помощью адаптивного пермутационного теста (p_{perm}). Статистически значимым считали уровень $p_{perm} < 0.05$.

Для полиморфных локусов генов факторов роста, показавших значимые ассоциации с весом новорожденных, рассмотрена их связь с экспрессией генов (eQTL) и альтернативным сплайсингом (sQTL) (изучались ассоциации аллельных вариантов полиморфных локусов с уровнем транскрипции генов и альтернативного сплайсинга с использованием данных проекта GTExportal (<http://www.gtexportal.org/>) по ранее представленной методике [15]), эпигенетические эффекты (с помощью онлайн программы HaploReg (v4.1) (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) по методике, изложенной ранее [16]).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный популяционно-генетический анализ наблюдаемого распределения генотипов по изучаемым полиморфным локусам генов факторов роста (rs4444903 *EGF*, rs833061 *VEGFA*, rs2981582 *FGFR2*, rs6214 *IGF1*, rs1800469 *TGFβ1*) показал его соответствие ожидаемому распределению согласно равновесия Харди–Вайнберга ($p > 0.05$).

Установлена ассоциация локуса rs833061 гена *VEGFA* с весом новорожденных в соответствии со всеми рассматриваемыми генетическими моделями (аллельной, аддитивной, доминантной и рецессивной) (табл. 1). Согласно полученным данным минорный аллель Т полиморфизма rs833061 гена *VEGFA* достоверно связан с более высоким весом новорожденных (для аллельной модели $\beta = 0.171$, $p = 0.003$, $p_{perm} = 0.005$, аддитивной модели $\beta = 0.176$, $p = 0.002$, $p_{perm} = 0.002$, доминантной модели $\beta = 0.212$, $p = 0.02$, $p_{perm} = 0.02$, рецессивной модели $\beta = 0.248$, $p = 0.008$, $p_{perm} = 0.009$). Соответственно референсный аллель С этого полиморфного варианта гена *VEGFA* ассоциирован с низким весом новорожденных. У женщин, имеющих генотип Т/Т (локуса rs833061), вес новорожденного максимальный и составляет в среднем 3524 г, тогда как у женщин, имеющих генотип С/С, вес новорожденного минимальный и составляет в среднем 3415 г ($p = 0.003$, $p_{perm} = 0.005$).

Итак, нами установлено, что генетическим фактором риска рождения маловесных детей у беременных с ПЭ является аллель С варианта rs833061 гена *VEGFA*.

Таблица 1. Ассоциации веса новорожденного с полиморфными локусами генов факторов роста у беременных с преэклампсией

Полиморфный вариант	Генотипы (генетические модели)	<i>n</i> (абс.)	%	Вес новорожденных $\bar{X} \pm SD$, граммы
rs4444903 <i>EGF</i>	A/A	64	35.96	3485 $\pm$ 357
	A/G	78	43.82	3456 $\pm$ 436
	G/G	36	20.22	3464 $\pm$ 323
	Минорный аллель G (аллельная модель)	$\beta = -0.014 \pm 0.053, p = 0.79$		
	A/A vs. A/G vs. G/G (аддитивная модель)	$\beta = -0.002 \pm 0.052, p = 0.96$		
	A/A vs. A/G + G/G (доминантная модель)	$\beta = 0.038 \pm 0.080, p = 0.63$		
	A/A + A/G vs. G/G (рецессивная модель)	$\beta = -0.063 \pm 0.097, p = 0.51$		
rs833061 <i>VEGFA</i>	C/C	44	23.91	3415 $\pm$ 280
	C/T	96	52.18	3492 $\pm$ 385
	T/T	44	23.91	3524 $\pm$ 520
	Минорный аллель T (аллельная модель)	$\beta = 0.171 \pm 0.058, p = 0.003$		
	C/C vs. C/T vs. T/T (аддитивная модель)	$\beta = 0.176 \pm 0.056, p = 0.002$		
	C/C vs. C/T + T/T (доминантная модель)	$\beta = 0.212 \pm 0.092, p = 0.02$		
	C/C + C/T vs. T/T (рецессивная модель)	$\beta = 0.249 \pm 0.091, p = 0.008$		
rs2981582 <i>FGFR2</i>	C/C	64	35.36	3499 $\pm$ 391
	C/T	93	51.38	3485 $\pm$ 393
	T/T	24	13.26	3438 $\pm$ 463
	Минорный аллель T (аллельная модель)	$\beta = 0.001 \pm 0.062, p = 0.99$		
	C/C vs. C/T vs. T/T (аддитивная модель)	$\beta = -0.022 \pm 0.061, p = 0.72$		
	C/C vs. C/T + T/T (доминантная модель)	$\beta = -0.039 \pm 0.084, p = 0.64$		
	C/C + C/T vs. T/T (рецессивная модель)	$\beta = -0.006 \pm 0.119, p = 0.95$		
rs6214 <i>IGF1</i>	G/G	68	38.20	3466 $\pm$ 399
	G/A	84	47.19	3507 $\pm$ 431
	A/A	26	14.61	3405 $\pm$ 296
	Минорный аллель A (аллельная модель)	$\beta = -0.033 \pm 0.061, p = 0.58$		
	G/G vs. G/A vs. A/A (аддитивная модель)	$\beta = -0.019 \pm 0.059, p = 0.74$		
	G/G vs. G/A + A/A (доминантная модель)	$\beta = 0.021 \pm 0.084, p = 0.79$		
	G/G + G/A vs. A/A (рецессивная модель)	$\beta = -0.113 \pm 0.114, p = 0.32$		
rs1800469 <i>TGFβ1</i>	C/C	70	38.04	3406 $\pm$ 364
	C/T	90	48.91	3539 $\pm$ 447
	T/T	24	13.04	3484 $\pm$ 269
	Минорный аллель T (аллельная модель)	$\beta = 0.030 \pm 0.061, p = 0.62$		
	C/C vs. C/T vs. T/T (аддитивная модель)	$\beta = 0.035 \pm 0.059, p = 0.56$		
	C/C vs. C/T + T/T (доминантная модель)	$\beta = 0.113 \pm 0.081, p = 0.17$		
	C/C + C/T vs. T/T (рецессивная модель)	$\beta = -0.098 \pm 0.119, p = 0.41$		

Примечание. $\beta \pm SE$ – коэффициент линейной регрессии (изменение трансформированного значения веса новорожденного на минорный аллель) и его ошибка, получены с помощью линейной регрессии с учетом коррекции на ковариаты (возраст беременной и ее индекс массы тела до беременности); p – уровень значимости, жирным выделены значимые различия.

Проведенный (с помощью современных мировых баз данных по функциональной геномике) анализ регуляторных эффектов локуса rs833061 гена *VEGFA* свидетельствует о его чрезвычайно важном функциональном значении в организме.

Во-первых, в соответствии с онлайн-программой HaploReg (v4.1), локус rs833061 (расположен на расстоянии 434 bp от 5' конца гена *VEGFA*) локализован в области “открытого” хроматина, а также в функционально активных участках генома (промоторы и энхансеры). rs833061 проявляет значимые функциональные эффекты в различных культурах клеток, органах плода и взрослого организма, имеющих “ключевое” значение в формировании антропометрических характеристик эмбриона и плода (клеточные линии трофобласта и зародышевых листков, провизорные органы — плацента и амнион, и др.).

Во-вторых, по данным HaploReg (v4.1), полиморфный вариант rs833061 локализован в области сайтов взаимодействия ДНК с более чем 20 различными регуляторными белками (CMYC, E2F6, HDAC2, HEY1, YY1, TAF1, CTCF, RAD21, ZNF263, MAX и др.) и в том числе протеинами, которые имеют “ключевую” роль в регуляции транскрипционной активности генов в организме (CTCF и др.) [17].

В-третьих, согласно материалам базы данных HaploReg (v4.1), вариант rs833061 гена *VEGFA* находится в области регуляторных мотивов ДНК, являющихся сайтами связывания с тремя факторами транскрипции (BCL, Pax-5 и Znf143). При этом аллель С, ассоциированный по нашим данным с низким весом новорожденных, повышает афинность к всем трем рассматриваемым факторам транскрипции BCL (различие между LOD scores аллелей С и Т составляет 11.1), Pax-5 (различие между LOD scores аллелей С и Т составляет 2.2), Znf143 (различие между LOD scores аллелей С и Т составляет 0.8).

В-четвертых, по данным проекта Genotype-Tissue Expression (GTEx), вариант rs833061 ассоциирован с уровнем экспрессии гена *VEGFA* в щитовидной железе (коэффициент линейной регрессии для аллеля Т равен $\beta = 0.11$, $p = 0.00014$, $p_{FDR} \leq 0.05$).

В-пятых, полиморфный локус rs833061, в соответствии с материалами базы данных GTExportal, связан с уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *VEGFA* в скелетной мускулатуре (ID интрона — 43772958:43774341:clu_32412, нормализованный коэффициент вырезания интронов для аллеля Т равен $\beta = -0.29$, $p = 7.1e-9$, $p_{FDR} \leq 0.05$).

Итак, согласно полученных нами данных, полиморфный локус rs833061 гена *VEGFA* у беременных с ПЭ ассоциирован с весом новорожденных, и медико-биологической основой данной ассоциации могут являться выраженные функциональные эффекты локуса rs833061 в организме: он связан с

экспрессией гена *VEGFA* в щитовидной железе, ассоциирован с уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *VEGFA* в скелетной мускулатуре, определяет афинность ДНК к трем факторам транскрипции (BCL, Pax-5 и Znf143), детерминирует белок–ДНК взаимодействия с большим количеством (более 20) различных регуляторных протеинов (транскрипционные факторы CTCF, ZNF263, RAD21 и др.) и локализован в зоне функционально активного “открытого” хроматина (промоторы, энхансеры и др.). При этом аллель С данного локуса, являющийся фактором риска рождения маловесных детей у беременных с ПЭ, ассоциирован с низкой транскрипцией гена *VEGFA* в щитовидной железе, с более высоким уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *VEGFA* в скелетной мускулатуре, а также повышает афинность ДНК к транскрипционным факторам BCL, Pax-5 и Znf143.

По данным информационного ресурса GeneCards: The Human Gene Database (<http://www.genecards.org/>), ген *VEGFA* является членом семейства генов факторов роста VEGF — он кодирует фактор роста эндотелия сосудов А. Данный белок существует как дисульфид-связанный гомодимер и является гепарин-связывающим. Фактор роста эндотелия сосудов А индуцирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток сосудов и имеет важное значение как для физиологического, так и для патологического ангиогенеза [18]. Следует отметить, что белок VEGFA играет важную роль в васкулогенезе — росте сосудов у эмбриона с дифференцировкой ангиобластов в эндотелиоциты. Результаты ряда исследований свидетельствуют о “ключевом” значении VEGFA в развитии организма, как в эмбриональном, так и раннем постнатальном периодах. “Выключение” гена *VEGFA* может приводить к гибели эмбриона на ранних стадиях развития [19]. Экспериментальные исследования, связанные с введением мышам ингибиторов VEGF на ранних этапах эмбрионального развития (1-й–8-ой дни), продемонстрировали остановку роста и летальный исход лабораторных животных [20].

Полиморфизм гена фактора роста эндотелия сосудов А имеет важное медико-биологическое значение в организме. В каталоге полногеномных исследований (GWAS) National Human Genome Research Institute (<http://www.genome.gov/gwastudies/>) имеется информация о более 90 различных GWAS исследованиях ассоциаций полиморфных локусов гена *VEGFA* с формированием различных признаков и заболеваний человека (антропометрические показатели, сахарный диабет 2-го типа, заболевания почек и др.), в результате которых установлено более 140 значимых ассоциаций на полногеномном уровне.

Следует отметить, что вовлеченность полиморфного локуса rs833061 гена *VEGFA* (по нашим данным ассоциирован с весом новорожденных у беременных с ПЭ) в развитие различных заболеваний человека активно изучается различными научными коллективами — в базе NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/?term=rs833061>) на февраль 2020 г. имеется более 150 работ, посвященных медико-биологическим исследованиям rs833061 гена *VEGFA*. В исследовании Ben Ali Gannoun с соавт. [21] продемонстрирована ассоциация данного полиморфизма (в составе гаплотипа) с развитием преэклампсии. В работе S.A. Yalcintepe с соавт. [22] установлены значимые различия в частотах генотипов rs833061 между матерями и их спонтанными абортусами. Авторы отмечают, что локус rs833061 является фактором риска спонтанных абортов. Значимая роль rs833061 в привычном невынашивании беременности отмечается в работе [23]. Также показаны ассоциации данного полиморфного локуса с развитием врожденных пороков сердца [24], поликистоза яичников [25], различных онкологических (рак яичников [26], рак легких [27]) и метаболических заболеваний (диабетическая ретинопатия у больных сахарным диабетом 2-го типа [28]).

Можно, предположить, что одним из важных механизмов реализации медико-биологических эффектов rs833061 гена *VEGFA* в организме, определяющих его вовлеченность в формирование различных заболеваний (и в том числе лежащих в основе, установленной в нашей работе, его ассоциации с весом новорожденных) является его влияние на процессы взаимодействия ДНК с более чем 20 различными регуляторными белками, в том числе играющими центральную роль в регуляции активности генов в организме. Так, например транскрипционный фактор CTCF, согласно данным литературы, является одним из основных участников различных сетей регуляции генов, включая активацию и репрессию транскрипции, образование независимо функционирующих доменов хроматина, регуляцию импринтинга, организацию инсуляторов, регуляцию альтернативного сплайсинга и др. [17].

Таким образом, локус rs833061 гена *VEGFA* у беременных с ПЭ ассоциирован с весом новорожденных, и медико-биологической основой данной ассоциации могут являться выраженные функциональные эффекты rs833061 в организме: он связан с экспрессией гена *VEGFA* в щитовидной железе, ассоциирован с уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *VEGFA* в скелетной мускулатуре, определяет афинность ДНК к трем факторам транскрипции (BCL, Pax-5 и Znf143), влияет на взаимодействие ДНК с более чем 20 различными регуляторными белками (CMYC, E2F6, HDAC2, HEY1, YY1, TAF1, CTCF, RAD21, ZNF263, MAX и др.). Данный локус нахо-

дится в регионе гиперчувствительности к ДНКазе-1 и модифицированных гистонов, маркирующих энхансеры и промоторы (том числе “активные” энхансеры и промоторы) в более чем 100 различных культурах клеток, тканях и органах, как взрослого организма, так и плода.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для ведущих научных школ Российской Федерации (проект НШ-2609.2020.7).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года 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. Стрижаков А.М., Липатов И.С., Тезиков Ю.В. Плацентарная недостаточность: Патогенез. Прогнозирование. Диагностика. Профилактика. Акушерская тактика. Самара: ООО “ОФОРТ”, 2014. 239 с.
2. Sharma D., Shastri S., Sharma P. Intrauterine growth restriction. Antenatal and postnatal aspects // Clin. Med. Insights: Pediatrics. 2016. V. 10. P. 67–83. <https://doi.org/10.4137/CMPed.S40070>
3. Malhotra A., Allison B.J., Castillo-Melendez M. et al. Neonatal morbidities of fetal growth restriction: Pathophysiology and impact // Front. Endocrinol. 2019. V. 10. P. 55. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00055>
4. Devaskar S.U., Chu A. Intrauterine growth restriction: Hungry for an answer // Physiology (Bethesda). 2016. V. 31(2). P. 131–146. <https://doi.org/10.1152/physiol.00033.2015>
5. Мелкозерова О.А., Башмакова Н.В., Третьякова Т.Б., Щедрина И.Д. Молекулярно-генетические и эпигенетические аспекты нарушения рецептивности эндометрия у женщин с низкой массой тела при рождении // Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии. 2019. Т. 18. № 4. С. 35–43. <https://doi.org/10.20953/1726-1678-2019-4-35-43>
6. Nardoza L.M.M., Caetano A.C.R., Zamarian A.C.P. et al. Fetal growth restriction: Current knowledge // Arch. Gynecol. Obstet. 2017. V. 295. P. 1061–1077. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4341-9>
7. Hwang L.D., Lawlor D.A., Freathy R.M. et al. Using a two-sample Mendelian randomization design to investigate a possible causal effect of maternal lipid concentrations on offspring birth weight // Int. J. Epidemiol. 2019. V. 48(5). P. 1457–1467. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz160>

8. Reshetnikov E., Zarudskaya O., Polonikov A. et al. Genetic markers for inherited thrombophilia are associated with fetal growth retardation in the population of Central Russia // J. Obstet. Gynaecol. Res. 2017. V. 43(7). P. 1139–1144.
<https://doi.org/10.1111/jog.13329>
9. Beaumont R.N., Warrington N.M., Cavadino A. et al. Genome-wide association study of offspring birth weight in 86577 women identifies five novel loci and highlights maternal genetic effects that are independent of fetal genetics // Hum. Mol. Genet. 2018. V. 27(4). P. 742–756.
10. Golovchenko O., Abramova M., Ponomarenko I. et al. Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2020. V. 253. P. 52–57.
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.07.045>
11. Horikoshi M., Beaumont R.N., Day F.R. et al. Genome-wide associations for birth weight and correlations with adult disease // Nature. 2016. V. 538(7624). P. 248–252.
<https://doi.org/10.1038/nature19806>
12. Litovkina O., Nekipelova E., Dvornyk V. et al. Genes involved in the regulation of vascular homeostasis determine renal survival rate in patients with chronic glomerulonephritis // Gene. 2014. V. 546(1). P. 112–116.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.020>
13. Reshetnikov E.A., Akulova L.Y., Dobrodomova I.S. et al. The insertion-deletion polymorphism of the ACE gene is associated with increased blood pressure in women at the end of pregnancy // J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2015. V. 16(3). P. 623–632.
<https://doi.org/10.1177/1470320313501217>
14. Решетников Е.А. Поиск ассоциаций генов-кандидатов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, с риском развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода // Науч. результаты биомед. исследований. 2020. Т. 6. № 3. С. 338–349.
<https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-6-3-0-5>
15. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometrial hyperplasia // Gene. 2020. V. 757. P. 144933.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144933>
16. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometriosis // Reprod. Biomed. Online. 2020. V. 41(5). P. 943–956.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.04.016>
17. Starikova D., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al. Novel data about association of the functionally significant polymorphisms of the MMP-9 gene with exfoliation glaucoma in the Caucasian population of Central Russia [published online ahead of print, 2020 Oct 23] // Ophthalmic Res. 2020.
<https://doi.org/10.1159/000512507>
18. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Altuchova O. et al. Association of genetic polymorphisms with age at menarche in Russian women // Gene. 2019. V. 686. P. 228–236.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.042>
19. Moskalenko M., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al. Polymorphisms of the matrix metalloproteinase genes are associated with essential hypertension in a Caucasian population of Central Russia // Sci. Rep. 2021. V. 11(1). P. 5224.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84645-4>
20. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with uterine leiomyoma // Front. Genet. 2021. V. 11. P. 512940.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.512940>
21. Zafar M.I., Zheng J., Kong W. et al. The role of vascular endothelial growth factor-B in metabolic homeostasis: current evidence // Biosci. Rep. 2017. V. 37(4). BSR20171089.
<https://doi.org/10.1042/BSR20171089>
22. Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H. et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene // Nature. 1996. V. 380(6573). P. 439–442.
23. Jung Y.W., Ahn E.H., Kim J.O. et al. Association of genetic polymorphisms in VEGF-460, -7 and -583 and hematocrit level with the development of idiopathic recurrent pregnancy loss and a meta-analysis // J. Gene Med. 2018. V. 20(9). P. e3048.
<https://doi.org/10.1002/jgm.3048>
24. Wang W., Xu A., Xu H. The roles of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in congenital heart diseases: a meta-analysis // Growth Factors. 2018. V. 36(5–6). P. 232–238.
<https://doi.org/10.1080/08977194.2018.1513505>
25. Huang L., Wang L.L. Association between VEGF gene polymorphisms (11 sites) and polycystic ovary syndrome risk // Biosci. Rep. 2020. V. 40(3). BSR20191691.
<https://doi.org/10.1042/BSR20191691>
26. Xu C.H., He Z.H., Xu H. Association of four genetic polymorphisms in the vascular endothelial growth factor-A gene and development of ovarian cancer: a meta-analysis // Oncotarget. 2017. V. 8(42). P. 73063–73078.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.20379>
27. Yang F., Qin Z., Shao C. et al. Association between VEGF gene polymorphisms and the susceptibility to lung cancer: An updated meta-analysis // Biomed. Res. Int. 2018. V. 2018. P. 9271215.
<https://doi.org/10.1155/2018/9271215>
28. Han L., Zhang L., Xing W. et al. The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis of 11 case-control studies // J. Diabetes Res. 2014. V. 2014. P. 805801.
<https://doi.org/10.1155/2014/805801>

Locus rs833061 of the *VEGF* Gene in Pregnant Women with Preeclampsia Is Associated with Newborn Weight

O. V. Golovchenko^a, M. Y. Abramova^a, I. V. Ponomarenko^a, and M. I. Churnosov^{a, *}

^aBelgorod State University, Belgorod, 308015 Russia

*e-mail: churnosov@bsu.edu.ru

We studied the associations of newborn weight with polymorphic loci of growth factor genes in pregnant women with preeclampsia (PE) and considered their regulatory potential. In the group of pregnant women with PE ($n = 190$), a molecular genetic study of five polymorphic loci of growth factor genes was performed: rs4444903 *EGF*, rs833061 *VEGFA*, rs2981582 *FGFR2*, rs6214 *IGF1*, rs1800469 *TGFβ1*. Newborn somatometry was performed using standard methods. Associations of the studied polymorphic loci with newborn weight were studied using log-linear regression analysis. It was found that the genetic risk factor for the birth of small children in pregnant women with PE is the allele C of the rs833061 polymorphism of the *VEGFA* gene ($p_{\text{perm}} = 0.002$): women with the T/T genotype have the highest newborn weight (on average 3524 g), while women with the C/C genotype have the minimum newborn weight (on average 3415 g). It is shown that the allele C of polymorphic locus rs833061 associated with low transcription of the *VEGFA* gene in the thyroid gland, a higher level of alternative splicing of the *VEGFA* gene transcript in skeletal muscle, increases affinity of DNA to transcription factors BCL, Pax-5 and Znf143, affects the interaction of DNA with more than 20 different regulatory proteins (CTCF, RAD21, ZNF263, MAX, etc.). Revealed that polymorphism rs833061 of the *VEGF* gene in pregnant women with PE associated with weighing the newborn and has considerable regulatory potential.

Keywords: newborn weight, preeclampsia, single-nucleotide polymorphism, *VEGFA*, associations.

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГРУППЫ ГЕНОВ И микроРНК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СВЯЗЬ С ПРОГРЕССИЕЙ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИМ СТАТУСОМ ОПУХОЛИ

© 2021 г. Е. А. Филиппова^{1, *, #}, И. В. Пронина^{1, #}, А. М. Бурденный¹,
Т. П. Казубская², В. И. Логинов¹, Э. А. Брага¹

¹Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия

*e-mail: p.lenyxa@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.10.2020 г.

После доработки 04.12.2020 г.

Принята к публикации 14.12.2020 г.

Актуальной задачей онкогеномики является поиск генов, экспрессия которых ассоциирована с показателями, специфично различающими тип рака молочной железы (РМЖ) и прогноз заболевания. Методом ПЦР в реальном времени на выборке из 41 образца РМЖ охарактеризована связь уровней экспрессии мРНК пяти опухоль-ассоциированных генов (*BCL6*, *CHL1*, *AXL*, *ACSL1*, *TGFB2*) и семи потенциально регуляторных микроРНК (miR-132-3p, miR-137, miR-148a-3p, miR-219-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p, miR-375) с клинико-патологическими параметрами опухолей и иммуногистохимическим статусом. Показано снижение уровня экспрессии *CHL1* и *AXL* и повышение уровня *BCL6* на поздних стадиях РМЖ. Кроме того, III–IV стадии РМЖ ассоциированы с увеличением уровня miR-339-3p, а метастазы в лимфоузлах – со снижением уровня miR-148a-3p. При высоком показателе пролиферации Ki-67 отмечено также увеличение уровня miR-375. Опухоли, не экспрессирующие рецептор прогестерона (PR), проявляют снижение уровня экспрессии *BCL6*, miR-375 и miR-24-2-5p. Снижение уровня экспрессии *BCL6* наблюдали также в РМЖ с отрицательным статусом эстрогенового рецептора (ER–). В образцах РМЖ с отрицательным HER2-статусом отмечено статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *TGFB2* и miR-219-5p, а также снижение уровня экспрессии *TGFB2* выявлено при люминальном А РМЖ. Таким образом, определены новые возможные молекулярные показатели прогрессии РМЖ и биомаркеры, которые могут быть полезны при дифференциальной диагностике молекулярного подтипа РМЖ.

Ключевые слова: экспрессия генов, микроРНК, рак молочной железы, прогрессия рака, люминальный тип РМЖ.

DOI: 10.31857/S0016675821090022

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным видом рака у женщин как в развитых, так и в развивающихся странах [1]. Несмотря на значительные успехи в диагностических и терапевтических подходах за последние десятилетия, РМЖ все еще является второй по частоте причиной смерти от рака у женщин [2]. Опухоли молочной железы характеризуются значительной вариабельностью клеточного состава, а также гистологической, экспрессионной, генотипической гетерогенностью [3]. В клетках РМЖ изменена экспрессия многих генов, при этом профиль их экспрессии зависит от патологического фенотипа опухоли [4]. Описание подтипов РМЖ дополняется новыми данными по геномным нарушениям, метилированию ДНК, профи-

лю экспрессии микроРНК и белоккодирующих генов (БКГ) [5]. Однако данные транскриптомного и протеомного анализов пока не позволяют выявить специфических маркеров для прогноза и лечения заболевания [6].

Следует отметить, что около 60% всех случаев РМЖ являются гормонозависимыми, из которых 75% случаев являются ER-положительными, а 65% – PR-положительными [7, 8]. В 20–30% всех случаев РМЖ наблюдается сверхэкспрессия HER2 (рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа, ген *ERBB2*), которая связана с неблагоприятным клиническим исходом у пациентов с РМЖ [9]. Выделяют пять основных подтипов РМЖ, а именно: люминальный А (ER+, PR±, HER-2 негативный, Ki-67 < 16%); люминальный В HER2-отрицательный (ER+ и/или PR±, HER-2

Авторы внесли равный вклад.

негативный, Ki-67 > 16%); *люминальный B HER2-положительный* (ER+ и/или PR±, Ki-67 любой, HER-2 позитивный); *HER2-обогащенный* (ER, PR отсутствуют, HER-2 позитивный); *тройной негативный рак* (ER, PR отсутствуют, HER-2 негативный). Следует отметить, что на практике онкологи сталкиваются с ситуациями, когда люминальные подтипы РМЖ, характеризующиеся благоприятным течением, ведут себя крайне агрессивно, при этом заболевание быстро прогрессирует и нередко заканчивается летальным исходом. И наоборот, наиболее агрессивный рак с тройным негативным фенотипом может протекать годами и не требовать серьезных терапевтических методов лечения. Все это требует поиска дополнительных молекулярно-генетических маркеров, позволяющих повысить точность как цитологического, так и гистологического заключений и максимально индивидуализировать лечение больных РМЖ.

На сегодняшний день идентифицированы многочисленные БКГ и гены микроРНК – супрессоры опухолевого роста и онкогены, изменение уровня экспрессии которых ассоциировано с развитием и прогрессией рака, в том числе и РМЖ [10]. МикроРНК, являясь важными регуляторами экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, представляют собой перспективные маркеры многих видов рака, включая РМЖ [11]. Идентифицированы микроРНК, ускоряющие, а в некоторых случаях и замедляющие пролиферацию в клетках при тройном негативном РМЖ, для которого нет специфического лечения, кроме хирургического, химио- и радиотерапии [12]. В настоящее время микроРНК рассматриваются как перспективные мишени не только для диагностики, но и для лечения этого типа рака [13].

Таким образом, поиск ассоциаций между изменением уровня экспрессии БКГ и генов микроРНК и молекулярными подтипами РМЖ, клинико-патологическими и иммуногистохимическими характеристиками больных РМЖ позволит найти новые маркеры для раннего выявления РМЖ, прогноза возникновения рецидива и вероятного ответа на гормональную и/или химиотерапию.

Цель данного исследования – изучение изменения уровня экспрессии мРНК группы опухоль-ассоциированных белоккодирующих генов и микроРНК с клинико-патоморфологическими параметрами РМЖ и его иммуногистохимическим статусом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал исследования. Образцы РМЖ собраны и морфологически охарактеризованы в НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Исследовали образцы РМЖ у больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию.

Все опухоли молочной железы были классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза [14] и гистологически верифицированы на основании критериев классификации ВОЗ [15]. Использовали образцы опухолей и парные гистологически неизменной ткани молочной железы, полученные от 41 больной РМЖ; клинико-морфологические данные пациенток приведены в табл. 1.

Образцы тканей хранили при -70°C . Полученные в ходе биопсии или оперативного вмешательства образцы объемом до 5 мм³ измельчали, с использованием гомогенизатора-диспергатора Ultra-Turrax T10 basic (IKA, Германия).

Выделение тотальной РНК. Тотальную РНК выделяли с использованием протокола гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [16]. Концентрацию суммарной РНК определяли спектрофотометрически при 260 нм. Качество РНК также оценивали спектрофотометрически с использованием коэффициентов поглощения при 260 против 230 нм и 260 против 280 нм. Сохранность РНК определяли по соотношению интенсивностей полос 28S рРНК и 18S рРНК при электрофорезе в 1%-ном денатурирующем агарозном геле. Перед использованием все образцы РНК обрабатывали ДНКазой, свободной от РНКазы.

Анализ уровня экспрессии генов. Обратную транскрипцию мРНК БКГ проводили с помощью обратной транскриптазы MMLV (Евроген, Россия) с добавлением “случайных” гекса- и нанонуклеотидных праймеров. При каждой постановке реакции обратной транскрипции были включены отрицательные контроли, не содержащие РНК.

Количественную ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для мРНК пяти генов *ACSL1*, *AXL*, *BCL6*, *CHL1*, *TGFB2* проводили на кДНК по технологии SYBR Green с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (5×) в соответствии с протоколом производителя (Евроген) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCRSystem (Bio-Rad, США), последовательности праймеров приведены в табл. 2. В качестве эндогенного внутреннего контроля, относительно которого проводили нормирование продуктов амплификации исследуемого гена, был выбран ген “домашнего хозяйства” *B2M* (табл. 2).

При обратной транскрипции зрелых микроРНК из тотальной РНК и при проведении ПЦР-РВ использовали готовые наборы TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя на амплификаторе BioRad CFX96.

Все реакции ПЦР повторяли трижды. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по $\Delta\Delta\text{Ct}$ -методу. Изменения уровня микроРНК менее чем

Таблица 1. Клинико-патоморфологическая характеристика больных РМЖ

Клинико-патоморфологический параметр		N = 41
Клиническая стадия	I	6
	II	24
	III	11
Степень дифференцировки	G1	3
	G2	33
	G3	3
Размер первичной опухоли	T1	7
	T2	25
	T3	4
	T4	5
Лимфогенное метастазирование	N0	18
	N1–3	23
Иммуногистохимический тип опухоли	Люминальный тип А (ER+; PR+; HER-2 негативный, Ki-67 < 16%)	5
	Люминальный тип Б (негативный) (ER и/или PR+; HER-2 негативный, Ki-67 > 16%)	7
	Люминальный тип Б (позитивный) (ER и/или PR+, Ki67 любой, HER-2 позитивный)	21
	HER-2+ (ER, PR отсутствуют, HER-2 позитивный)	6
	Тройной негативный рак (ER, PR отсутствуют, HER-2 негативный)	2
Статус рецепторов эстрогена	Положительный	29
	Отрицательный	12
Статус рецепторов прогестерона	Положительный	23
	Отрицательный	18
Статус HER2	Положительный	27
	Отрицательный	14
Статус Ki67	Низкий, <16%	11
	Промежуточный, 16–30%	14
	Высокий, >30%	16

в 2 раза ($|\Delta\Delta Ct| \leq 2$) рассматривали как отсутствие изменений [17].

Статистический анализ. Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ “IBM SPSS Statistics 22” и она включала определение медианы и интерквартильного размаха. Для оценки достоверности различий применялся непараметрический критерий Манна–Уитни, критерий Краскала–Уоллиса. Различия считали достоверными при $p < 0.05$, где p – показатель статистической значимости (достоверности) различий между изучаемы-

ми выборками. Применяли поправку на множественное сравнение Бенджамини–Хохберга и оценивали величину FDR (false discovery rate, частота ложного обнаружения).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ уровня экспрессии белоккодирующих генов и микроРНК

Данная работа была направлена на анализ изменения уровня экспрессии мРНК белоккодирующих

Таблица 2. Праймеры, использованные при анализе БКГ методом ПЦР-РВ

Ген	Структура праймеров (5'–3')	$T_{отж}$, °C	Размер продукта, пн	Ссылка
<i>ACSL1</i>	F: ACTGTCTTCCCCGTGGTTCC R: AGGCTGTTGTTTCTGATGATGC	60	152	#
<i>AXL</i>	F: TACCGCGTGCGCAAGTCCCTACA R: TGGCAATCTTCATCGTCTTCACAG	60	226	[18]
<i>BCL6</i>	F: CCAGCCACAAGACCGTCCAT R: CTCCGCAGGTTTCGCATTT	60	141	[19]
<i>CHL1</i>	F: GAACTATCCTTGCCAATGCCAATAT R: TTCTGCCAGGACACGACTGC	60	153	[17]
<i>TGFB2</i>	F: TGCAGAACCCAAAAGCCAGAGTG R: TACAAAAGTGACAGCAGGGACAGTG	60	236	#
<i>B2M</i>	F: TGACTTTGTACAGCCCAAGATAG R: CAAATGCGGCATCTTCAAACCTC	60	81	[17]

– праймеры подобраны с помощью программы Primer Select из пакета программ Lasergene (<https://www.dnastar.com/>).

генов и микроРНК, связанных с фундаментальными биологическими процессами, таким как эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) при раке молочной железы. Нами были отобраны пять белоккодирующих генов (*BCL6*, *CHL1*, *AXL*, *ACSL1*, *TGFB2*) и семь микроРНК (miR-132-3p, miR-137, miR-148a-3p, miR-219-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p и miR-375), предположительно связанных с клеточной адгезией, подвижностью и EMT по данным <http://www.genecards.org>, <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Методом количественной ПЦР в реальном времени были исследованы профили экспрессии этих генов на выборке из 41 парного (опухоль/гистологически нормальная ткань молочной железы) образца РМЖ. Показано статистически значимое снижение уровня экспрессии БКГ *CHL1*, *AXL*, *ACSL1*, *TGFB2* в опухоли по сравнению с гистологически неизменной тканью молочной железы ($p < 0.01$, FDR = 0.05). Выявлено значимо частое повышение уровня экспрессии мРНК гена *BCL6* ($p < 0.001$, FDR = 0.05) в опухоли по сравнению с гистологически неизменной тканью молочной железы (рис. 1а), что указывает на проявление про-опухолевых свойств *BCL6* при РМЖ. При анализе уровня экспрессии семи микроРНК (miR-132-3p, miR-137, miR-148a-3p, miR-219-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p, miR-375) показано статистически значимое снижение уровня экспрессии двух микроРНК miR-132-3p и miR-137 ($p = 7.4 \times 10^{-6}$ и $p = 0.049$ соответственно) в опухолевых образцах РМЖ по сравнению с парной гистологически нормальной тканью, что позволяет предположить опухоль-супрессорную функцию этих микроРНК при РМЖ (рис. 1б).

В то же время показано статистически значимое увеличение уровня экспрессии miR-375 в опухо-

левых образцах, которое указывает на ее онкогенные свойства при РМЖ. При этом изменение экспрессии miR-148a-3p, miR-219-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p было статистически не достоверно.

Связь уровня экспрессии БКГ и микроРНК с клинико-патологическими параметрами прогрессии РМЖ

Затем мы проанализировали связь между уровнем экспрессии БКГ и микроРНК и клинико-патологическими характеристиками образцов от больных РМЖ и обнаружили, что уровень экспрессии генов *CHL1*, *AXL* статистически значимо ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) снижался на более поздних стадиях (III–IV против I–II) РМЖ, в то время как уровень экспрессии гена *BCL6*, а также микроРНК miR-339-3p достоверно увеличивался на III–IV стадии по сравнению с I–II стадией РМЖ (рис. 2а). Отмечено снижение уровня экспрессии miR-148a-3p при наличии метастазов в лимфатических узлах (N_0M_0 против N_xM_x , $p = 0.02$), а для гена *BCL6* увеличение уровня экспрессии связано с увеличением размера опухоли (T1/T2 против T3/T4, $p < 0.05$) (рис. 2б). Таким образом, полученные данные указывают на возможную негативную роль генов *CHL1* и *AXL*, а также miR-148a-3p в сдерживании прогрессии или метастазирования РМЖ, но позитивную роль *BCL6* и miR-339-3p – в прогрессии РМЖ.

Связь уровня экспрессии БКГ и микроРНК с иммуногистохимическими показателями образцов РМЖ

Проведен анализ изменения уровня экспрессии БКГ и микроРНК в зависимости от иммуноги-

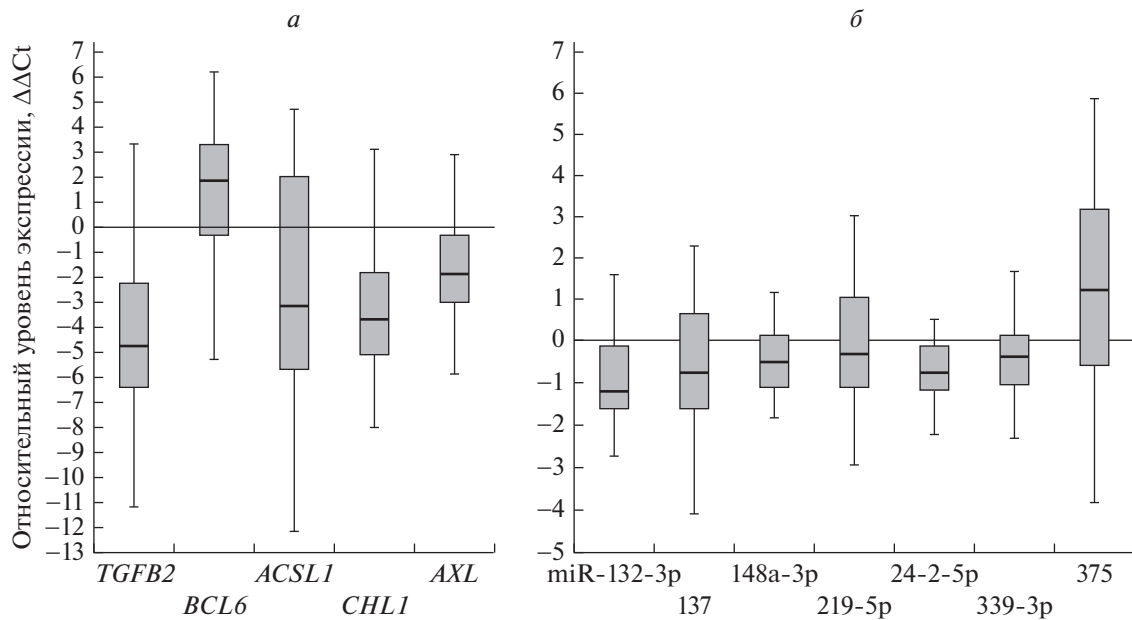


Рис. 1. Профиль экспрессии 5 БКГ (а) и 7 микроРНК (б) при РМЖ.

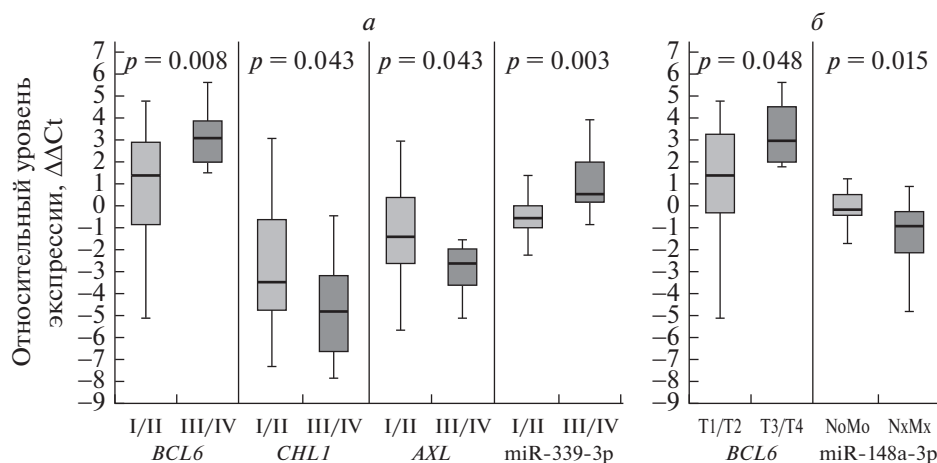


Рис. 2. Связь уровня экспрессии БКГ и микроРНК с клинико-патологическими параметрами прогрессии РМЖ: а — со стадией онкологического процесса, б — с размером опухоли и наличием метастазов в лимфатических узлах.

стохимического статуса опухоли больных РМЖ (экспрессия ER, PR, HER2, Ki-67, рис. 3а–д). Показано статистически значимое повышение уровня экспрессии *TGFB2* в люминальном типе Б по сравнению с типом А (рис. 3а), что позволяет отнести данный ген к потенциальному биомаркеру при дифференциальной диагностике типа РМЖ. Выявлено снижение уровня экспрессии *BCL6* в опухолях РМЖ с ER-отрицательным статусом по сравнению с ER-положительным (рис. 3б). Показано статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *BCL6*, miR-375 и miR-24-2-5p в опухолях молочной железы, не экспрессирующих рецептор прогестерона (PR) (рис. 3в).

При сопоставлении уровня экспрессии БКГ и микроРНК с экспрессией рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2) было показано, что уровень экспрессии гена *TGFB2* и miR-219 значимо снижался при отсутствии экспрессии HER2 (рис. 3г). В то же время отмечалось статистически значимое увеличение уровня экспрессии miR-375 в опухолях молочной железы при высоком уровне экспрессии антигена Ki-67 (рис. 3д).

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе построены профили экспрессии пяти БКГ и семи микроРНК, показано значимое

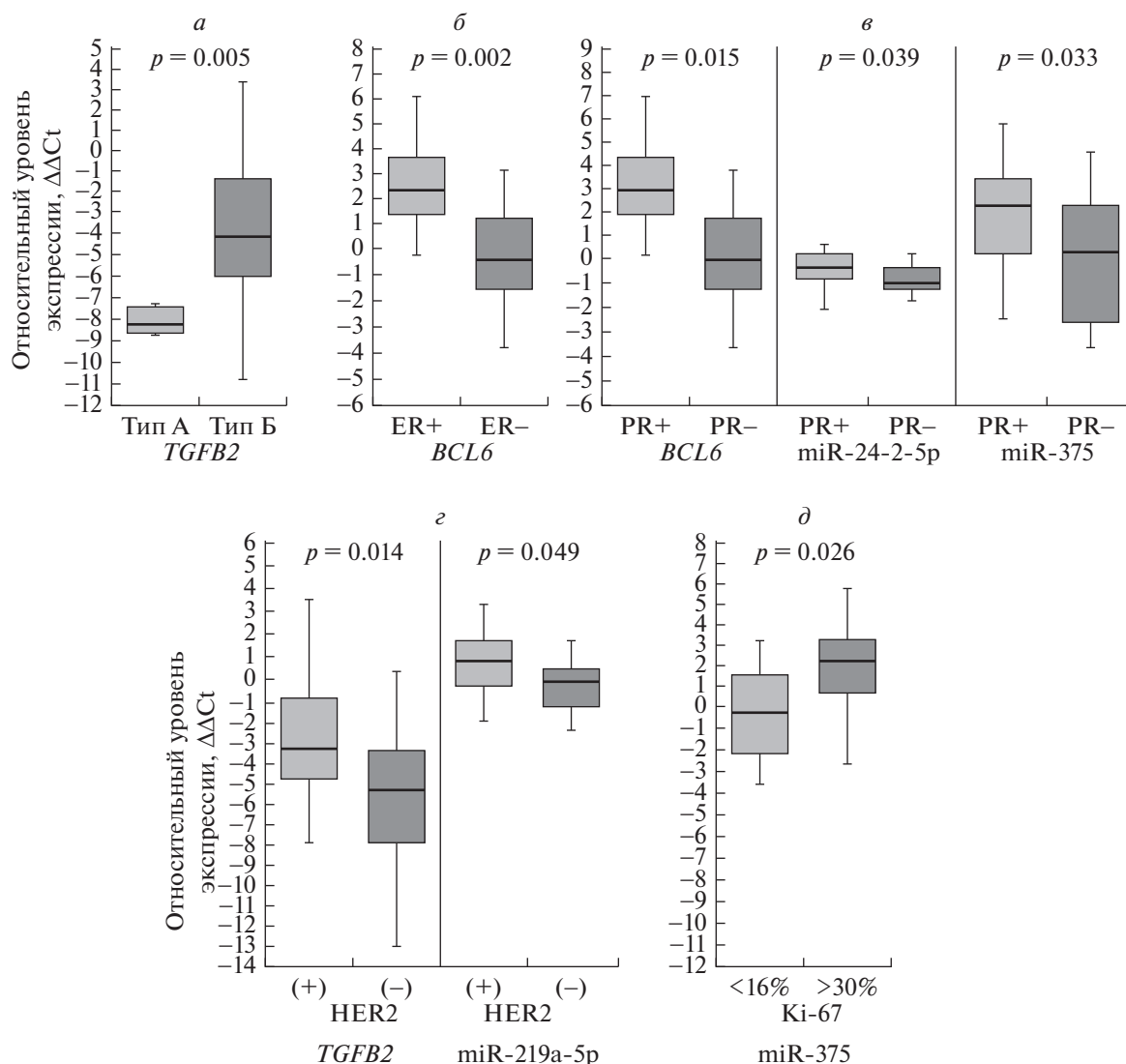


Рис. 3. Связь уровня экспрессии БКГ и микроРНК с иммуногистохимическими показателями образцов РМЖ: а – с иммуногистохимическим типом опухоли (люминальный А/люминальный Б), б – с экспрессией рецептора эстрогена, в – с экспрессией рецептора прогестерона, г – с экспрессией рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа, д – с индексом пролиферации Ki-67.

снижение уровня экспрессии генов *CHL1*, *AXL*, *ACSL1*, *TGFβ2* в опухолевых образцах РМЖ по сравнению с гистологически неизменной тканью молочной железы. В то же время отмечено статистически значимое повышение уровня экспрессии гена *BCL6* в опухоли по сравнению с гистологически неизменной тканью молочной железы. Функция *CHL1* в канцерогенезе недостаточно изучена, и механизм, посредством которого *CHL1* участвует в развитии опухоли, является важным вопросом в биологии. В работе [20] показано снижение уровня экспрессии *CHL1* в опухолях молочной железы, а также сообщается, что сниженная экспрессия *CHL1* способствует пролиферации и инвазии клеток РМЖ как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, нами впервые показано снижение

уровня экспрессии мРНК *CHL1* на более поздних стадиях (III–IV) РМЖ. Противоречивые данные встречаются в зарубежной литературе в отношении уровня экспрессии гена *AXL*. В работах [21, 22] говорится о повышенной экспрессии *AXL* при РМЖ. В настоящей работе выявлено снижение уровня экспрессии гена *AXL* в опухолевых образцах молочной железы. Однако другими авторами показано, что экспрессия мРНК *AXL* значительно повышена в клеточной линии РМЖ MDA-MB-231, но снижена в клеточных линиях РМЖ MCF7 и SK-BR-3 [23], что согласуется с полученными нами данными. Более того, из 343 образцов инвазивной протоковой карциномы низкая экспрессия *AXL* обнаружена в 173 (50.4%) случаях, высокая – в 170 (49.6%). Таким образом, требуются дополнитель-

ные исследования, уточняющие роль и функцию гена *AXL* при РМЖ. При сопоставлении уровня экспрессии с клинико-патологическими характеристиками нами отмечено снижение уровня экспрессии *AXL* при более тяжелой стадии (III) РМЖ. В мировой литературе [21, 24] встречаются указания на корреляцию экспрессии со стадией онкологического процесса, однако говорится о повышенной экспрессии *AXL* на более поздних стадиях. Сообщается также об отсутствии какой-либо связи экспрессии *AXL* с клинико-патологическими характеристиками [23]. Противоречивые данные, полученные нами и другими авторами, требуют дополнительного исследования на большей выборке для понимания роли гена *AXL* в возникновении и развитии РМЖ. В единичных работах [25, 26] говорится о снижении уровня *ACSL1* при РМЖ, в частности при люминальном А типе РМЖ, что подтверждается нашими результатами.

Нами показано статистически значимое снижение уровня экспрессии *TGFB2* в опухоли по сравнению с гистологически нормальной тканью молочной железы. В работе [27] сообщается, что уровень экспрессии мРНК *TGFB2* значительно снижен в более крупных опухолях по сравнению с опухолями молочной железы, имеющих размер T1, а также в опухолях больных с метастазами в лимфатических узлах и с метастазами в другие органы. Однако нами показан более низкий уровень экспрессии мРНК *TGFB2* при люминальном А типе РМЖ по сравнению с люминальным Б типом. Эти результаты показывают, что *TGFB2* экспрессируется на разных уровнях в зависимости от молекулярных подтипов РМЖ и, следовательно, может выступать в качестве потенциального диагностического маркера при дифференциальной диагностике различных подтипов РМЖ в дополнение к уже используемым маркерам. Более того, нами впервые показан более низкий уровень экспрессии *TGFB2* в отсутствие экспрессии HER2, в то время как более высокий уровень экспрессии *TGFB2* наблюдался в присутствии HER2.

Нами показано статистически значимое увеличение уровня экспрессии гена *BCL6* в опухолевых образцах РМЖ по сравнению с неизменной тканью молочной железы. Как известно, ген *BCL6* играет онкогенную роль в канцерогенезе различных злокачественных новообразований [28]. О повышенной экспрессии *BCL6* при РМЖ также сообщалось ранее [28, 29]. Таким образом, полученные нами данные подтверждают данные литературы. Нами показано, что уровень мРНК *BCL6* выше на более поздних стадиях РМЖ, что также согласуется с данными других авторов [28]. О связи повышенной экспрессии *BCL6* с размером опухоли и более поздними стадиями сообщалось в работах [29, 30], что также подтверждается нашими результатами. Увеличение уровня экспрессии мРНК *BCL6* при РМЖ связано с плохими прогностиче-

скими признаками, такими как поздняя стадия и больший размер опухоли. Таким образом, ингибиторы *BCL6* могут рассматриваться в качестве таргетной терапии РМЖ. Кроме того, нами установлено, что высокая экспрессия *BCL6* в значительной степени коррелировала с ER и PR-статусом опухоли; это указывает на то, что *BCL6* может способствовать усилению экспрессии ER и PR. Однако его точный механизм действия требует дальнейшего изучения. Показано, что высокая экспрессия белка *BCL6* связана с неблагоприятным клиническим исходом у ER-позитивных и пременопаузальных пациенток с РМЖ [31]. О связи повышенной экспрессии *BCL6* с положительной экспрессией PR нами сообщается впервые.

Нами показано снижение уровня экспрессии miR-132 и miR-137, а также увеличение уровня экспрессии miR-375 при РМЖ; экспрессия miR-148a-3p, miR-219a-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p оставалась без изменений. Показано, что уровень экспрессии miR-137 был значительно ниже в опухолевых тканях молочной железы по сравнению с таковым в парных смежных нормальных тканях молочной железы [32]. Сниженная экспрессия miR-132-3p и ее функциональная роль в качестве супрессора опухолевого роста показана при различных типах рака, включая РМЖ [33], рак простаты [34], колоректальный рак [35], остеосаркому [36], немелкоклеточный рак легких [37, 38] и гепатоцеллюлярную карциному [39–41]. Однако отмечается повышенная экспрессия miR-132 при глиоме и раке желудка и можно предположить, что miR-132 может служить онкогеном в этих видах рака [42, 43]. Эти сообщения продемонстрировали, что нарушение регуляции экспрессии miR-132 специфично для каждого типа рака, и предполагают, что лежащие в их основе механизмы могут отличаться. Например, микроРНК miR-132 может действовать как супрессор опухолевого роста посредством подавления FOXA1 [44].

Сведения литературы по изменению экспрессии miR-375 в опухолях отличаются неоднозначностью и, по-видимому, специфичны для разных видов рака. Так, например, в одной из работ [45] показано снижение уровня экспрессии miR-375 в клеточных линиях РМЖ MCF-7/ADM и MCF-7/PTX, которое может являться результатом метилирования промоторного CpG-островка гена MIR-375. Напротив, на ER-позитивных клеточных линиях РМЖ отмечена высокая экспрессия miR-375, которая связана с локальным гипометилированием ДНК [46]. В свою очередь, miR-375 в одних работах рассматривается как новый биологический маркер для раннего выявления метастазов [47], в других — как новый прогностический маркер течения РМЖ [48, 49]. Нами показано увеличение уровня экспрессии miR-375 в опухолевых образцах РМЖ по сравнению с нормальной тканью молочной железы. При этом нами об-

наружено снижение уровня экспрессии miR-375 в опухолях молочной железы, не экспрессирующих прогестероновый рецептор (PR). В то же время отмечалось статистически значимое увеличение уровня экспрессии miR-375 в опухолях молочной железы при высоком уровне экспрессии антигена Ki-67, что усиливает наше предположение об онкогенной роли этой микроРНК при РМЖ. Таким образом, и наши результаты показывают неоднозначность поведения miR-375. Так, в зависимости от клеточного контекста miR-375 проявляет как онкогенные, так и супрессорные черты. Корреляция снижения уровня miR-375 с потерей PR может быть полезна при разработке молекулярной классификации подвидов РМЖ.

Таким образом, полученные данные указывают на возможную роль *BCL6* и miR-339-3p в прогрессии РМЖ и роль *CHL1* и miR-148a-3p в сдерживании прогрессии РМЖ. Кроме того, гены *BCL6* и *TGFB2*, а также микроРНК miR-375, miR-24-2-5p и miR-219 можно отнести к потенциальным биомаркерам при дифференциальной диагностике типа РМЖ.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 20-75-00126); часть исследований, а именно анализ БКГ, — в рамках Государственного задания Минобрнауки РФ.

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. У всех пациентов получено письменное информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. Global Cancer Observatory (GCO). Available from: URL: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf> Accessed 5 Sep 2020.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J. Clin.* 2018. V. 68. № 6. P. 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
3. Ng C.K., Pemberton H.N., Reis-Filho J.S. Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2012. V. 12. № 8. P. 1021–1032. <https://doi.org/10.1586/era.12.85>
4. Meng L., Xu Y., Xu C., Zhang W. Biomarker discovery to improve prediction of breast cancer survival: Using gene expression profiling, meta-analysis, and tissue validation // *Onco Targets Ther.* 2016. V. 9. P. 6177–6185. <https://doi.org/10.2147/OTT.S113855>
5. Heng Y.J., Lester S.C., Tse G.M. et al. The molecular basis of breast cancer pathological phenotypes // *J. Pathol.* 2017. V. 241. № 3. P. 375–391. <https://doi.org/10.1002/path.4847>
6. Wang J., Ma Z., Carr S.A. et al. Proteome profiling outperforms transcriptome profiling for coexpression based gene function prediction // *Mol. Cell Proteomics.* 2017. V. 16. № 1. P. 121–134. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.060301>
7. Yip C.H., Rhodes A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer // *Future Oncol.* 2014. V. 10. № 14. P. 2293–2301. <https://doi.org/10.2217/fon.14.110>
8. Колядина И.В., Поддубная И.В., Франк Г.А. и др. Прогностическое значение рецепторного статуса опухоли при раннем раке молочной железы // *СТМ.* 2012. № 4. С. 48–53.
9. Figueroa-Magalhães M.C., Jelovac D., Connolly R., Wolff A.C. Treatment of HER2-positive breast cancer // *Breast.* 2014. V. 23. № 2. P. 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.11.011>
10. Hanahan D. Rethinking the war on cancer // *Lancet.* 2014. V. 383. № 9916. P. 558–563. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62226-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62226-6)
11. Браза Э.А., Филиппова Е.А., Логинов В.И. и др. Системы маркеров на основе метилирования генов микроРНК в диагностике рака молочной железы на I–II стадиях // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2019. Т. 168. № 8. С. 238–242.
12. Gyparaki M.T., Basdra E.K., Papavassiliou A.G. MicroRNAs as regulatory elements in triple negative breast cancer // *Cancer Lett.* 2014. V. 354. № 1. P. 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.07.036>
13. Tomar D., Yadav A.S., Kumar D. et al. Non-coding RNAs as potential therapeutic targets in breast cancer // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2020. V. 1863. № 4. e194378. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.04.005>
14. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch. International Union against Cancer. TNM Classification of Malignant Tumours., 7th ed. 2009. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. 332 p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101511218>.
15. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4th ed. / Eds Kurman R.J., Carcangiu M.L., Herrington C.S., Young R.H. Lyon: IARC Press, 2014. 316 p.
16. Пронина И.В., Логинов В.И., Ходырев Д.С. и др. Уровень экспрессии гена *RASSF1A* в первичных эпителиальных опухолях разной локализации // *Мол. биология.* 2012. Т. 46. № 2. С. 260–268. <https://doi.org/10.1134/S0026893312010189>
17. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyu A.M. et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer associated microRNAs and breast cancer progression // *Gene.* 2017. V. 604. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.018>
18. Пронина И.В., Филиппова Е.А., Лукина С.С. и др. Роль микроРНК в регуляции экспрессии генов *AXL*, *DAPK1*, *NFIB* при раке молочной железы // *Патогенез.* 2018. Т. 16. № 4. С. 130–133. <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2018.04.130-133>

19. Wu Z.S., Wu Q., Wang C.Q. *et al.* MiR-339-5p inhibits breast cancer cell migration and invasion in vitro and may be a potential biomarker for breast cancer prognosis // *BMC Cancer*. 2010. V. 10. e542. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-542>
20. He L.H., Ma Q., Shi Y.H. *et al.* CHL1 is involved in human breast tumorigenesis and progression // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 438. № 2. P. 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.093>
21. Li Y., Jia L., Ren D. *et al.* Axl mediates tumor invasion and chemosensitivity through PI3K/Akt signaling pathway and is transcriptionally regulated by slug in breast carcinoma // *IUBMB Life*. 2014. V. 66. № 7. P. 507–518. <https://doi.org/10.1002/iub.1285>
22. Jin G., Wang Z., Wang J. *et al.* Expression of Axl and its prognostic significance in human breast cancer // *Oncol. Lett.* 2017. V. 13. № 2. P. 621–628. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5524>
23. Tanaka K., Tokunaga E., Inoue Y. *et al.* Impact of expression of vimentin and Axl in breast cancer // *Clin. Breast Cancer*. 2016. V. 16. № 6. P. 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.06.015>
24. Li Y., Jia L., Liu C. *et al.* Axl as a Downstream effector of TGF- β 1 via PI3K/Akt-PAK1 signaling pathway promotes tumor invasion and chemoresistance in breast carcinoma // *Tumour Biol.* 2015. V. 36. № 2. P. 1115–1127. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2677-3>
25. Chen W.C., Wang C.Y., Hung Y.H. *et al.* Systematic analysis of gene expression alterations and clinical outcomes for long-chain acyl-coenzyme A synthetase family in cancer // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 5. e0155660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155660>
26. Yen M.C., Kan J.Y., Hsieh C.J. *et al.* Association of long-chain acyl-coenzyme A synthetase 5 expression in human breast cancer by estrogen receptor status and its clinical significance // *Oncol. Rep.* 2017. V. 37. № 6. P. 3253–3260. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5610>
27. Hachim M.Y., Hachim I.Y., Dai M. *et al.* Differential expression of TGF β isoforms in breast cancer highlights different roles during breast cancer progression // *Tumour Biol.* 2018. V. 40. № 1. e1010428317748254. <https://doi.org/10.1177/1010428317748254>
28. Badr E., Masoud E., Abdou A.G., Eldien M.S. BCL6 mRNA expression level in invasive duct carcinoma not otherwise specified // *Clin. Diagn. Res.* 2016. V. 10. № 12. P. XC01–XC04. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/22796.8985>
29. Wu Q., Liu X., Yan H. *et al.* B-cell lymphoma 6 protein stimulates oncogenicity of human breast cancer cells // *BMC Cancer*. 2014. V. 14. e418. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-418>
30. Ang L., Zheng L., Wang J. *et al.* Expression of and correlation between BCL6 and ZEB family members in patients with breast cancer // *Exp. Ther. Med.* 2017. V. 14. № 5. P. 3985–3992. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5101>
31. Sato T., Tran T.H., Peck A.R. *et al.* Prolactin suppresses a progesterone-induced CK5-positive cell population in luminal breast cancer through inhibition of progesterone-driven BCL6 expression // *Oncogene*. 2014. V. 33. № 17. P. 2215–2224. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.172>
32. Chen F., Luo N., Hu Y. *et al.* MiR-137 suppresses triple-negative breast cancer stemness and tumorigenesis by perturbing BCL11A-DNMT1 interaction // *Cell Physiol. Biochem.* 2018. V. 47. № 5. P. 2147–2158. <https://doi.org/10.1159/000491526>
33. Zhang Z.G., Chen W.X., Wu Y.H. *et al.* MiR-132 prohibits proliferation, invasion, migration, and metastasis in breast cancer by targeting HN1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 454. P. 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.049>
34. Qu W., Ding S.M., Cao G. *et al.* miR-132 mediates a metabolic shift in prostate cancer cells by targeting Glut1 // *FEBS Open Biol.* 2016. V. 6. P. 735–741. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12086>
35. Zheng Y.B., Luo H.P., Shi Q. *et al.* miR-132 inhibits colorectal cancer invasion and metastasis via directly targeting ZEB2 // *World J. Gastroenterol.* 2014. V. 20. № 21. P. 6515–6522. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i21.6515>
36. Wang J., Xu G., Shen F., Kang Y. miR-132 targeting cyclin E1 suppresses cell proliferation in osteosarcoma cells // *Tumour Biol.* 2014. V. 35. P. 4859–4865. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1637-2>
37. Li Y., Zu L., Wang Y. *et al.* miR-132 inhibits lung cancer cell migration and invasion by targeting SOX4 // *J. Thorac Dis.* 2015. V. 7. P. 1563–1569. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.09.06>
38. Zhang B., Lu L., Zhang X. *et al.* Hsa-miR-132 regulates apoptosis in non-small cell lung cancer independent of acetylcholinesterase // *J. Mol. Neurosci.* 2014. V. 53. № 3. P. 335–344. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0136-z>
39. Lei C.J., Yao C., Li D.K. *et al.* Effect of co-transfection of miR-520c-3p and miR-132 on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma Huh7 // *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2016. V. 9. № 9. P. 898–902. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.015>
40. Lei C.J., Li L., Gao X. *et al.* Hsa-miR-132 inhibits proliferation of hepatic carcinoma cells by targeting YAP // *Cell Biochem. Funct.* 2015. V. 33. № 5. P. 326–333. <https://doi.org/10.1002/cbf.3119>
41. Wei X., Tan C., Tang C. *et al.* Epigenetic repression of miR-132 expression by the hepatitis B virus x protein in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma // *Cell Signal.* 2013. V. 25. № 5. P. 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.01.019>
42. Li W., Zhang J., Chen T. *et al.* miR-132 upregulation promotes gastric cancer cell growth through suppression of FoxO1 translation // *Tumour Biol.* 2016. V. 37. P. 15551–15557. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3924-y>
43. Liu Q., Liao F., Wu H. *et al.* Upregulation of miR-132 expression in glioma and its clinical significance // *Tumour Biol.* 2014. V. 35. P. 12299–12304. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2541-5>
44. Wang D., Ren J., Ren H. *et al.* MicroRNA-132 suppresses cell proliferation in human breast cancer by directly targeting FOXA1 // *Acta Pharmacol. Sin.* 2018.

- V. 39. № 1. P. 124–131.
<https://doi.org/10.1038/aps.2017.89>
45. Liu S.L., Sui Y.F., Lin M.Z. MiR-375 is epigenetically downregulated due to promoter methylation and modulates multi-drug resistance in breast cancer cells via targeting YBX1 // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2016. V. 20. № 15. P. 3223–3229.
 46. de Souza Rocha Simonini P., Breiling A., Gupta N. et al. Epigenetically deregulated microRNA-375 is involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 22. P. 9175–9184.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1318>
 47. Madhavan D., Peng C., Wallwiener M. et al. Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis // *Carcinogenesis*. 2016. V. 37. № 5. P. 461–470.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgw008>
 48. Luo D., Wilson J.M., Harvel N. et al. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells // *J. Transl. Med.* 2013. V. 11. e57.
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-57>
 49. Zehentmayr F., Hauser-Kronberger C., Zellinger B. et al. Hsa-miR-375 is a predictor of local control in early stage breast cancer // *Clin. Epigenetics*. 2016. V. 8. e28.
<https://doi.org/10.1186/s13148-016-0198-1>

The Profile of MicroRNA and a Group of Genes Expression in Breast Cancer: Relationship with the Tumor Progression and Immunohistochemical Status

E. A. Filippova^{a,*}, I. V. Pronina^a, A. M. Burdennyi^a, T. P. Kazubskaya^b, V. I. Loginov^a, and E. A. Braga^a

^aResearch Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia

^bBlokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia

*e-mail: p.lenyxa@yandex.ru

A current task of oncogenomics is the finding for genes with expression that let to specify the type of breast cancer (BC) and the prognosis of the disease due to different tumor status. By Real-time PCR analysis on a set of 41 BC samples the relationship between mRNA expression levels of five tumor-associated genes (*BCL6*, *CHL1*, *AXL*, *ACSL1*, *TGFB2*) and seven potentially regulatory microRNAs (miR-132-3p, miR-137, miR-148a-3p, miR-219-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p, miR-375) with clinical and pathological parameters of tumors and immunohistochemical status was characterized. A decrease of *CHL1* and *AXL* expression level and an increase of *BCL6* expression level revealed on the late stages of breast cancer were shown. In addition, an increase of miR-339-3p expression levels are associated with III–IV stages of breast cancer, and decrease of miR-148a-3p expression levels are associated with lymph node metastases. It was noted that a high rate of Ki-67 proliferation is related to increase of miR-375 expression level. In tumors that do not the progesterone receptor (PR) to be expressed is shown the decreased expression levels of *BCL6*, miR-375, and miR-24-2-5p. A decreased expression level of *BCL6* was also observed in breast cancer with a negative estrogen receptor (ER–) status. In breast cancer samples with a negative HER2-status, a statistically significant decreased the expression level of the *TGFB2* and miR-219-5p genes was noted, as well as a decreased the expression level of *TGFB2* was found in luminal A of BC. Thus, we identified, possibly new molecular indicators of breast cancer progression and biomarkers that can be useful in the differential diagnosis of the molecular subtype of breast cancer.

Keywords: gene expression, microRNA, breast cancer, cancer progression, luminal type of breast cancer.