

СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 5, 2021

Обзорные и теоретические статьи

- Эволюция представлений о биологическом значении феномена хромосом типа ламповых щёток
А. Ф. Сайфитдинова, С. А. Галкина, Е. Р. Гагинская 491
- Роль генов фосфоламбана (*PLN*), триадины (*TRDN*) и джунктина (*ASPH*) в развитии сократительной дисфункции миокарда
Э. Ф. Муслимова, Т. Ю. Реброва, Д. С. Кондратьева, С. А. Афанасьев 508
- Гены-модификаторы как причина клинического полиморфизма болезни Вильсона–Коновалова
А. Е. Постригань, И. Ж. Жалсанова, Е. А. Фонова, Н. А. Скрябин 516

Генетика микроорганизмов

- Генетический полиморфизм ядер штаммов *Purophora tritici-repentis* по генам-эффекторам *ToxA* и *ToxB*
Н. В. Мироненко, А. С. Орина, Н. М. Коваленко 528

Генетика растений

- Применение SRAP-маркеров для ДНК-идентификации российских сортов люцерны
А. О. Шамустакимова, Ю. М. Мавлютов, И. А. Клименко 536
- Структура и пути формирования полиморфизма гордеинов, контролируемых аллелями гордеин-кодирующих локусов в культурном ячмене (*Hordeum vulgare* L.)
А. А. Поморцев, А. В. Рубанович, Е. В. Лялина 544

Генетика животных

- Генетические показатели и эволюция уссурийской восковой пчелы *Apis cerana ussuriensis* из Приморского края России
Р. А. Ильясов, Г. Ю. Хан, М. Л. Ли, К. В. Ким, М. Ю. Процалькин, А. С. Лелей, Д. Х. Парк, Д. И. Такахаши, Х. В. Квон, А. Г. Николенко 557

Генетика человека

- Ассоциация полиморфного локуса rs1799998, с.–344Т>С гена альдостеронсинтазы (*CYP11B2*) с развитием саркоидоза легких
И. Е. Малышева, Л. В. Топчиева, Э. Л. Тихонович 572
- Гены нейротрансмиттерной системы и ген трансмембранного белка 18 в развитии пищевого поведения у пациентов с ожирением
О. В. Кочетова, Д. Ш. Авзалетдинова, З. А. Шангареева, Л. З. Ахмадишина, Г. Ф. Корытина, В. В. Викторов, Т. В. Викторова 579
- Роль полиморфных вариантов ряда генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в развитии рака желудка
Л. Ф. Галлямова, А. Х. Нургадиева, И. И. Хидиятов, Т. Р. Насибуллин, Ф. Р. Мунасыпов, Ш. М. Хуснутдинов, Р. Р. Рахимов, Р. Р. Абдеев, Д. Д. Сакаева, Э. К. Хуснутдинова 590

Краткие сообщения

- Репликативный анализ ассоциаций генетических маркеров с ожирением в российской популяции
Е. А. Трифонова, А. А. Попович, О. А. Макеева, Л. И. Минайчева, А. В. Бочарова, К. В. Вагайцева, В. А. Степанов 604

Contents

Vol. 57, No. 5, 2021

Reviews and Theoretical Articles

- Biological Significance of Lampbrush Chromosomes: the Evolution of Approaches
A. F. Saifitdinova, S. A. Galkina, and E. R. Gaginskaya 491
- Role of Phospholamban (*PLN*), Triadin (*TRDN*), and Junctin (*ASPH*) Genes
in the Development of Contractive Myocardial Dysfunction
E. F. Muslimova, T. Yu. Rebrova, D. S. Kondratieva, and S. A. Afanasiev 508
- Modifier Genes as a Cause of Wilson–Konovalov Disease Clinical Polymorphism
A. E. Postrigan, I. Zh. Zhalsanova, E. A. Fonova, and N. A. Skryabin 516
-

Genetics of Microorganisms

- Nuclear Genetic Polymorphism in *Pyrenophora tritici-repentis* Strains
for *ToxA* and *ToxB* Effector Genes
N. V. Mironenko, A. S. Orina, and N. M. Kovalenko 528
-

Plant Genetics

- Application of SRAP Markers for DNA Identification of Russian Alfalfa Cultivars
A. O. Shamustakimova, Y. M. Mavlyutov and I. A. Klimenko 536
- Structure and Formation Mechanisms of Polymorphism of Hordein-Coding Loci
in Domesticated Barley (*Hordeum vulgare* L.)
A. A. Pomortsev, A. V. Rubanovich, and E. V. Lialina 544
-

Animal Genetics

- Genetic Properties and Evolution of Ussurian Wax Bee *Apis cerana ussuriensis*
from the Primorsky Territory of Russia
*R. A. Ilyasov, G. Y. Han, M. L. Lee, K. W. Kim, M. Y. Proshchalykin, A. S. Lelej,
J. H. Park, J. I. Takahashi, H. W. Kwon, and A. G. Nikolenko* 557
-

Human Genetics

- Association of Polymorphic Locus rs1799998, c.–344T>C of Aldosterone Synthase
(*CYP11B2*) Gene with Pulmonary Sarcoidosis Development
I. E. Malysheva, L. V. Topchieva, and E. L. Tikhonovic 572
- The Association of Neurotransmitter Gene Polymorphism and *TMEM18* Gene
with Obesity its Related Traits and Eating Behavior
*O. V. Kochetova, D. S. Avzaletdinova, Z.A. Shangareeva, L. Z. Akhmadishina,
G. F. Korytina, V. V. Victorov, and T. V. Victorova* 579
- The Role of Polymorphic Variants of Several Genes of Matrix Metalloproteinases
and Their Tissue Inhibitors in the Development of Gastric Cancer
*L. F. Gallyamova, A. Kh. Nurgalieva, I. I. Khidiyatov, T. R. Nasibullin,
F. R. Munasyrov, Sh. M. Khusnutdinov, R. R. Rakhimov,
R. R. Abdeev, D. D. Sakaeva, and E. K. Khusnutdinova* 590
-

Short Communications

- Replicative Association Analysis of Genetic Markers of Obesity in the Russian Population
*E. A. Trifonova, A. A. Popovich, O. A. Makeeva, L. I. Minaycheva,
A. V. Bocharova, K. V. Vagaitseva, and V. A. Stepanov* 604
-
-

ЭВОЛЮЦИЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О БИОЛОГИЧЕСКОМ ЗНАЧЕНИИ ФЕНОМЕНА ХРОМОСОМ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЁТОК

© 2021 г. А. Ф. Сайфитдинова^{1,2, *}, С. А. Галкина³, Е. Р. Гагинская³

¹Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, 191186 Россия

²Международный центр репродуктивной медицины, Санкт-Петербург, 197350 Россия

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

*e-mail: saifitdinova@mail.ru

Поступила в редакцию 02.06.2020 г.

После доработки 11.08.2020 г.

Принята к публикации 10.09.2020 г.

Обзор посвящен развитию представлений о значении одного из наиболее загадочных феноменов биологии развития — преобразования хромосом в так называемые ламповые щётки (ЛЩ). Эукариотические хромосомы в фазе ЛЩ характеризуются низкой степенью конденсации и дискретной структурой, образованной множеством линейно расположенных компактных хромомеров, из которых вытянуты боковые петли, покрытые транскриптами. Линейная длина ЛЩ превосходит длину соответствующей митотической хромосомы более чем в 30 раз, благодаря чему ЛЩ представляют собой ценный модельный объект для анализа строения и функционирования хромосом и структурно-функциональной организации генома в целом методами молекулярной цитогенетики и геномики с очень высоким разрешением. Широкое распространение этого феномена в природе подчеркивает его функциональную значимость, однако, несмотря на многократные попытки объяснить смысл преобразования хромосом в ЛЩ, у исследователей все еще остается много вопросов. В обзоре критически рассмотрены все основные гипотезы, предложенные для объяснения функционального значения ЛЩ.

Ключевые слова: мейоз, диплотена, хроматин, транскрипция, организация генома.

DOI: 10.31857/S0016675821050106

Few other chromosomes so insistently demand a functional interpretation as the lampbrush chromosomes of oocytes
Joseph G. Gall

Этот загадочный научный термин — “ламповые щётки” (ЛЩ), принадлежащий немецкому ученому Иоганнесу Рюккерт [1], поначалу вызывает удивление и недоумение у неспециалиста или начинающего исследователя. Но дело в том, что в ооцитах многих животных на стадии диплотены первого деления мейоза хромосомы сильно деконденсируются и действительно приобретают вид, напоминающий ершики для мытья посуды, использовавшиеся в прошлом для мытья стекол керосиновых ламп. Сходство обусловлено тем, что хромосомы в этот период покрыты множеством боковых петель. Это мейотические биваленты, в которых материал каждой гомологичной хромосомы состоит из располагающихся вдоль оси компактных хромомеров и отходящих от них боковых петель (рис. 1). В фазе цитоплазматического роста ооцита размер хромосом, преобразующихся в ЛЩ, максимально увеличивается: например, линейная длина макрохромосом-ЛЩ в

ооцитах птиц на фиксированных препаратах превосходит длину соответствующих митотических хромосом более чем в 30 раз [2–5], а микрохромосом-ЛЩ — в 13–14 раз [6]. В период вителлогенеза их размер постепенно сокращается по мере того, как ооцит приближается к созреванию [7].

Длительная стадия ЛЩ описана в оогенезе ряда беспозвоночных (щетинкочелюстные, равноногие и десятиногие раки, моллюски, насекомые, некоторые иглокожие) и позвоночных (рыбы, амфибии, рептилии, птицы) животных [7, 8]. Но большая часть сведений об организации ЛЩ получена при исследовании ооцитов амфибий и птиц. Эти данные обобщены в ряде монографий [7–10] и серии обзорных статей [11–24]. История изучения ЛЩ насчитывает около 140 лет. Впервые они были описаны Вальтером Флеммингом, который наблюдал их в ооцитах аксолотля [25]. Позднее М. Холл описал “бородатые обрезки” в ядрах ооцитов курицы [26], но в научной литера-

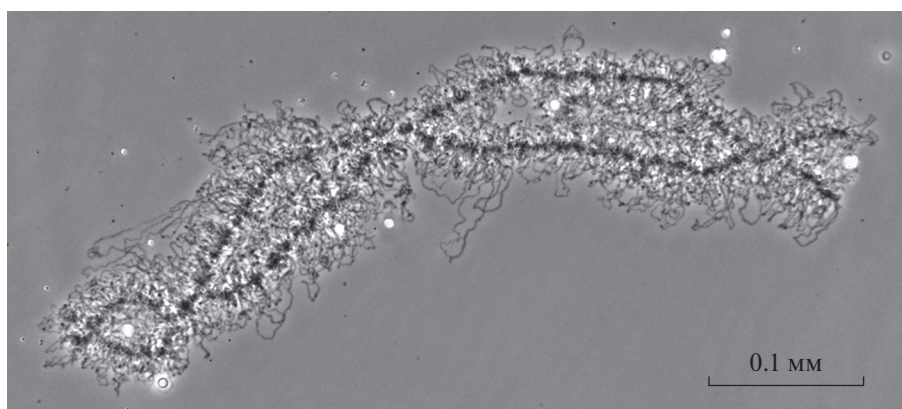


Рис. 1. Микрофотография ЛЩ *Ambystoma mexicanum*, изолированной из ядра ооцита в солевой раствор и не подвергавшейся никаким дополнительным воздействиям, включая фиксацию и центрифугирование.

туре закрепилось название, предложенное Рюккертом [1]. Эпоха активного изучения ЛЩ началась в середине прошлого столетия и была инициирована работами Вильяма Дьюри [27, 28]. Он показал, что выделенные вручную из ядра ооцита хромосомы сохраняют свой вид, если их поместить в 0.1 М раствор NaCl в отсутствие ионов кальция. Предложенная им методика была вскоре усовершенствована для выделения и исследования ЛЩ амфибий [7, 29] и в дальнейшем адаптирована для выделения ЛЩ из растущих ооцитов птиц [30–34] и рептилий [34, 35]. История открытия и изучения ЛЩ подробно описана [7, 15, 36]. Благодаря деятельности профессора Герберта Макгрегора (1933–2018) информация об исследованиях ЛЩ и публикациях, им посвященных, аккумулирована на специальном сайте и доступна широкой публике [37].

С самого начала описания характерных “лохматых структур” в растущих ядрах ооцитов исследователи ассоциировали их с хромосомами. Сначала – по отдаленному внешнему сходству с политенными хромосомами из слюнных желез комаров-звонцов [25], позднее – по специфическому окрашиванию, сходному с окрашиванием основными красителями более компактных митотических хромосом. Иоганнес Рюккерт предполагал связь ЛЩ с передачей наследственной информации [1], он же впервые описал структуру бивалентов, соединенных в местах хиазм. Важным фактом в понимании природы и функций ЛЩ было выявление сходства организации бивалентов в сперматоцитах и ооцитах [38]. Еще в 1905 г. Н.К. Кольцов [39], основываясь на описании обратимых изменений морфологии ЛЩ в ооцитах амфибий и акул (“набухание” – исчезновение – появление заново), сделанных предшественниками, ставит вопросы об укладке хроматина, отчасти актуальные и по сей день: всегда ли хроматин сворачивается одинаковым образом и

сохраняется ли “невидимый скелет” при его деконденсации? Исследование ЛЩ в ооцитах тритона, курицы и голубя способствовало созданию Н.К. Кольцовым модели передачи наследственности по матричному принципу [40]. Несмотря на ошибочность многих его предположений и в первую очередь непонимание роли ДНК, факт участия ЛЩ в накоплении и передаче потомству наследственной информации полностью подтвердился, хотя Н.К. Кольцов не мог правильно объяснить природу боковых петель ЛЩ и сам феномен преобразования хромосом в ЛЩ.

Уже после открытия роли ДНК в хранении и передаче генетической информации [41], именно при исследовании ЛЩ были получены лучшие доказательства того, что вдоль хроматиды проходит одна непрерывная молекула ДНК [42]. Анализ структуры “двойных мостов” – растянутых участков ЛЩ [43], исследование кинетики ферментативного расщепления ЛЩ ДНКазой [42], измерение толщины осевых нитей ДНП [44–46] – результаты всех этих работ доказывали, что ось каждого гомолога в биваленте (полубивалента) содержит две нити ДНК – по одной в каждой хроматиде.

За последние 30 лет, параллельно с развитием методов геномных исследований и микроскопии высокого разрешения, достигнут существенный прогресс в понимании структуры ЛЩ и природы самого этого феномена. Признан вклад ЛЩ в исследование проблем геномики, биологии развития, молекулярной и эволюционной цитогенетики. Но, несмотря на многократные попытки объяснить биологический смысл преобразования хромосом в растущих ооцитах в гигантские ЛЩ, значение этого феномена до сего времени не имеет исчерпывающего объяснения. Ниже мы даем краткую характеристику строения и особенностей организации ЛЩ, показываем, как варьировали представления исследователей хромосом этого типа об их функциональном значении.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХРОМОСОМ В ФАЗЕ ЛАМПОВЫХ ЩЁТОК

Как уже было отмечено выше, ЛЩ представляют специфическую форму организации эукариотической хромосомы. Это мейотические биваленты, в которых гомологичные хромосомы, не окончательно разошедшиеся после конъюгации и генетической рекомбинации в пахитене, остаются связанными в местах хиазм (рис. 2). Каждый гомолог (полубивалент) состоит из двух хроматид, скрепленных с помощью белков когезинового комплекса [47, 48]. ЛЩ имеют характерную хромомерно-петлевою организацию: вдоль оси хромосомы чередуются компактные хромомеры с попарно отходящими от них, видимыми в световой микроскоп боковыми петлями [7]. Интенсивное окрашивание хромомеров ДНК-связывающими красителями, выявление белка HP1 β , модифицированных гистонов H3K9me3, H3K27me3 [21, 49] и метилированного цитозина 5mC в их составе [50] предполагают присутствие компактного хроматина. В то же время электронно-микроскопические данные [30, 51], а также выявление в хромомерах гистоновых модификаций H4K5/8/12/16(Ac) [21, 50, 52] и 5-гидроксиметилцитозина 5hmC [50] подтверждают присутствие в них транскрипционной активности. Приведенные данные и обнаружение в хромомерах ЛЩ *Xenopus laevis* конденсинового комплекса ХСАР–D2 [53] представляют веские свидетельства в пользу гипотезы о том, что хромомер ЛЩ организован как розетка, образующая петлями хроматина, как инертными, так и транскрипционно активными [17, 30, 51], скрепленными в основании белками конденсинового комплекса [10, 21]. Микродиссекция индивидуальных хромомеров хромосомы 4 в стадии ЛЩ и последующее секвенирование содержащейся в них ДНК показали, что у домашней курицы хромомеры ЛЩ отличаются по упаковке от соматических клеток [54].

Размеры ЛЩ коррелируют с содержанием ДНК в гаплоидном геноме вида [7, 11]. Например, кариотипы всех американских саламандр рода *Plethodon* содержат по 14 хромосом, но виды различаются по содержанию ДНК в гаплоидном геноме (величина C) и, соответственно, по длине ЛЩ в ооцитах. У *P. cinereus* $C = 20$ пг, длина всех 14 ЛЩ – 8 мм, тогда как у *P. dunni* $C = 36.8$ пг и общая длина ЛЩ – 20 мм [55]. У рептилии *Bipes biporus* $C = 2$ пг, а общая длина ЛЩ в ядре ооцита – 3 мм [56]. Подобная корреляция описана и для размеров простых боковых петель, которые представляют транскрипционно активные участки хроматид, вытянутые из хромомеров и покрытые рибонуклеопротеиновым (РНП) матриксом. Н. Анжелье с соавт. [18] приводят следующие данные по амфибиям: у протей *Necturus maculosus* при $C = 78$ пг боковые петли ЛЩ имеют длины порядка 100 мкм, у

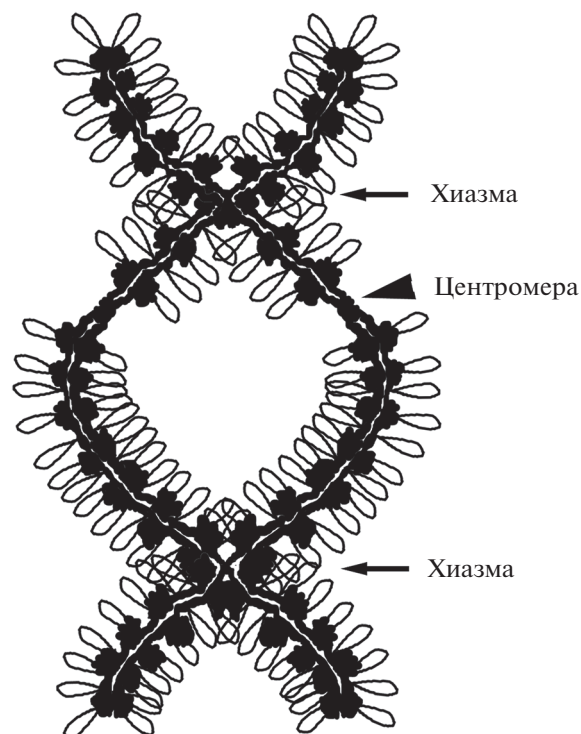


Рис. 2. Схема организации бивалента на стадии ЛЩ. Каждая хромосома (полубивалент) представлена двумя хроматидами, идущими параллельно. Гомологи связаны в местах хиазм за счет произошедшей в пахитене рекомбинации. Толщина линии соответствует разной степени упаковки хроматина. На рисунке намеренно не показаны рибонуклеопротеиновый матрикс и когезиновые комплексы для демонстрации организации ДНК хроматид.

шпорцевой лягушки *X. laevis* $C = 3$ пг и средняя длина петель 5 мкм. У птиц размер генома варьирует в пределах 1.0–1.5 пг [57], и большинство видимых в световом микроскопе боковых петель в ЛЩ имеют длину в пределах 7–15 мкм [4, 30, 31, 58], что соответствует, как минимум, 20–44 тпн ДНК (1 пн = 0.34 нм [59]). Чем именно определяется эта корреляция, до сих пор не установлено. Однако изящные эксперименты Дж. Голла по пересадке содержимого сперматозоидов ксенопуса в ядро ооцита (зародышевый пузырек – ЗП) тритона и наоборот показали, что факторы, влияющие на размер петель ЛЩ, по всей видимости, находятся в ооците вида-реципиента [60]. Наряду с преобладающими по количеству простыми боковыми петлями в ЛЩ практически у всех изученных организмов присутствуют немногочисленные значительно более длинные петли и так называемые “сложные” петли, которые, несмотря на то, что их функциональная роль неизвестна, служат важными цитологическими маркерами специфических районов хромосом [2, 7, 18, 19, 32, 33, 61–66]. Помимо видимых в световой микроскоп петель, как упоминалось выше, многие хромомеры

имеют микропетли (менее 1.0 мкм), которые можно обнаружить только с помощью электронного микроскопа [18, 21]. Таким образом, хромомеры ЛЩ, по-видимому, следует рассматривать как сложные домены, представляющие собой комплексы конденсированных и транскрипционно активных петель ДНК, соотношение тех и других варьирует в зависимости от генетического содержания домена и стадии развития ооцита.

Простые петли содержат одну или несколько поляризованных (асимметричных) единиц матрикса РНП, которые соответствуют единицам транскрипции, ДНК и которые могут быть ориентированы вдоль петли в одном или противоположных направлениях [7, 16, 67, 68]. Каждая единица транскрипции плотно загружена комплексами РНК-полимеразы II (РНКполII) — 13–20 комплексов на 1 мкм ДНК петли [69–71]. Такая плотность отличает транскрипцию на ЛЩ от транскрипции в интерфазе митоза и приводит к тому, что петля становится видимой даже при небольшом увеличении микроскопа. Заметим также, что при, как правило, одинаковом хромомерно-петлевом рисунке гомологичных хромосом, боковые петли, выходящие из одного хромомера, всегда парные и представляют собой комплементарные участки сестринских хроматид в составе ЛЩ.

Важным в исследовании ЛЩ было выявление изменений в их химическом составе. Так, еще И. Рюккерт [1] наблюдал, что по мере декомпактизации хромосом в ранней диплоте в них появляется базофильная составляющая (как мы теперь знаем — это РНП), которая исчезает по мере конденсации хромосом. В 1950 г. В. Дьюри [28] предположил, что образующаяся на ЛЩ РНК необходима для поддержания и регуляции ранних стадий эмбрионального развития. Хотя функциональная значимость многих транскрибирующихся в оогенезе РНК до сих пор не ясна, в целом это предположение не опровергнуто.

Следует подчеркнуть, что ЛЩ являются уникальным модельным объектом для цито-молекулярного анализа транскрипции и ко-транскрипционного созревания синтезированной РНК [7, 9, 19, 21]. Многочисленные эксперименты по включению меченого уридина, разработка техники распластывания транскрипционно активных участков хромосом, гибридизация *in situ* со специфичными зондами, иммуоцитохимическое выявление компонентов транскрипции и процессинга позволили исследовать эти процессы на цито-молекулярном уровне с удивительно высоким разрешением [7, 13, 18, 19]. Применение микроразрешенного масла в качестве среды для выделения зародышевого пузырька (ЗП) из ооцита амфибий позволило использовать все преимущества этих гигантских хромосом для изучения транскрипции и преобразований РНК в условиях, прибли-

женных к прижизненным [23, 72, 73]. В этом направлении особенно значимой представляется работа Гарри Моргана [23], способствующая развитию нашего понимания принципов формирования и пространственной организации высокоактивной в транскрипции и стабильной боковой петли на ЛЩ. Исследуя динамику взаимодействия многофункционального РНК-связывающего фактора CELF1 с вновь синтезированными транскриптами в интактных ЗП из ооцитов *X. laevis*, автор впервые проследил в реальном времени изменения структуры транскрипционных единиц в петле и представил экспериментальные свидетельства ключевой роли динамического обмена белка между РНП петли и нуклеоплазмой. В итоге Г. Морган пришел к заключению, что взаимодействие синтезированных транскриптов с белками формирует самоорганизующуюся динамическую структуру РНП-матрикса на длинной транскрипционной единице, так что петля ЛЩ представляет собой пример внутриядерных компартов, физическое существование которых определяется физикой фазовых переходов (phase separation) в нуклеоплазме [23]. Представления Г. Моргана находят подтверждение в исследовании И.В. Соловей с коллегами [74], которые убедительно показали, что относительно длинные и интенсивно транскрибирующиеся гены формируют в интерфазном ядре петли, жесткость которых определяется динамически модулирующимися РНП. Привлекая к обсуждению данные об особой организации ЛЩ, авторы приходят к заключению, что формирование петель — универсальный принцип экспрессии генов эукариот [74].

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ХРОМОСОМ В ФАЗЕ ЛАМПОВЫХ ЩЁТОК

Вопрос о том, какие именно нуклеотидные последовательности транскрибируются на петлях ЛЩ, представляется ключевым для понимания самого феномена преобразования хромосом в ЛЩ и его значения для биологии развития. Этот вопрос давно и интенсивно исследуется, но до сих пор не имеет окончательного ответа. Основная часть транскриптов синтезируется на ЛЩ с матриц некодирующей белки повторяющейся ДНК (табл. 1). На примере гистоновых генов и генов 5S рРНК показана транскрипция повторов структурных генов на ЛЩ в ооцитах амфибий [16, 75, 76]. И лишь малая доля РНК, транскрибируемой на ЛЩ, по данным, полученным ранее молекулярными и биохимическими методами, становится мРНК [9, 99, 100]. Однако гибридизация *in situ* с зондами для выявления РНК, комплементарной уникальным белок-кодирующим генам, либо вообще не давала сигнала на ЛЩ, либо результаты ее были неоднозначны. Так, например, Т. Вебер с соавт. [84] использовали кДНК-зонды

для выявления транскриптов уникальных генов нуклеофозмина и цитокератина на боковых петлях ЛЩ *X. laevis*. Они обнаружили мечеными несколько транскрипционных единиц на разных хромосомах, что трудно было интерпретировать как адекватный результат. Серьезную попытку определить транскрипцию уникальных генов на ЛЩ с использованием гибридизации *in situ* предприняли Н. Анжелье с коллегами [18], но достоверно на ЛЩ тритона *Pleurodeles waltl* они смогли показать только транскрипцию гена шаперонов Hsp70, присутствующих в геноме во множестве копий. Таким образом, вопрос о транскрипции на ЛЩ уникальных последовательностей непосредственного подтверждения пока не имеет.

В то же время полученные разными авторами данные на основе анализа РНК, выделенной из ядра и цитоплазмы ооцита, свидетельствуют о содержании и накоплении в ооците коротко- и долгоживущих материнских РНК, необходимых для созревания ооцита, оплодотворения яйцеклетки и осуществления первых этапов эмбрионального развития [9, 101–104]. По данным Б. Ольшанской [102, 105], у японского перепела и домашней курицы в зрелом ооците содержится примерно 5 мкг материнских поли(А⁺) РНК, из которых 1–2 мкг относительно стабильной РНК наследуются зародышем и используются для синтеза белка во время раннего развития, до начала экспрессии зиготического генома. Содержание запасенной поли(А⁺) РНК в зрелом ооците *X. laevis* примерно такое же [9]. Однако активация синтеза зиготической мРНК в самом зародыше происходит в разное время: у *X. laevis* – перед гастрულიей [106], в зародышах *G. g. domesticus* – на стадии средней бластулы [101]. Показано, что пул материнских РНК в цитоплазме ооцитов амфибий и птиц содержит транскрипты многих уникальных, в том числе специфичных для высококодифференцированных тканей, генов [102–104]. В то же время источник этих мРНК достоверно определить трудно. По заключению польских исследователей, в яйце перепела материнская РНК накапливается в ооците после завершения стадии ламповых щёток и поступает в него из фолликулярных клеток [102]; по данным Э. Дэвидсона и коллег, у ксенопуса запаасающаяся в яйцеклетке РНК синтезируется на ранних стадиях роста ооцита и пул ее постоянно обновляется [9]. Дж. Гёрден и коллеги [104] получили экспериментальные данные о том, что разнообразные тканеспецифичные мРНК на стадии ЛЩ синтезируются самим ооцитом, однако идет ли этот синтез на боковых петлях или же он происходит на мелких петлях внутри хромомеров, а также значение этих специализированных транскриптов для созревания ооцита и ранних стадий эмбриогенеза остается непонятным. Интересные и пока не нашедшие объяснения данные были получены также в лаборатории

Дж. Голла [103, 107]: при анализе транскриптома из тщательно отмытых ядер ооцитов *X. tropicalis* на стадии ЛЩ были обнаружены только РНК, комплементарные интронам транскрибируемых генов, тогда как сплайсированные мРНК выявлялись лишь в ооплазме. Эти внутриядерные интронные РНК были стабильны и сохранялись в зародыше по крайней мере до стадии бластулы, когда у *X. tropicalis* начинается синтез собственных РНК [22, 103]. Авторы отнесли их к особому классу стабильных интронных РНК – sisРНК (stable intronic sequence RNA) [22, 103]. Происхождение этих sisРНК остается неясным, как и механизм их попадания в ЗП.

На протяжении многолетней истории изучения особенностей строения и функционирования этих удивительных хромосом попытки объяснить их особые организацию и функционирование предпринимались неоднократно, но в большинстве своем объяснения отвергались и пересматривались на основании вновь получаемых фактов. Тем не менее помимо исторического значения каждая из предложенных гипотез была основана на фактах, и в настоящее время не теряющих своей актуальности. Мы рассматриваем основные гипотезы, относящиеся к хромосомам типа ламповых щёток, в исторической последовательности, независимо от того, объясняли они конкретные свойства этих хромосом или биологическую значимость самого феномена ЛЩ.

ГИПОТЕЗА ДВИЖУЩЕЙСЯ ОСИ (ХРОМАТИДЫ)

Одна из первых попыток объяснить, как функционируют ЛЩ, возникла на основе тщательного изучения морфологии ЛЩ [108] и наблюдений за включением ³Н-уридина в состав РНП-матрикса гигантских гранулярных петель на ЛЩХП у *Triturus cristatus* [109]. Авторы интерпретировали последовательное распространение радиоактивной метки вдоль петли от тонкого ее конца до полного мечения всей петли в течение 14 дней как свидетельство движения оси ДНК. В результате была сформулирована гипотеза “движущейся оси” (“the moving axis hypothesis”), согласно которой хроматида непрерывно вытягивается из хромомера в области основания петли и, проходя через РНП-матрикс, втягивается в хромомер в области ее толстого конца [108–110]. Эта гипотеза впоследствии была резонно отвергнута самими авторами и стала представлять чисто исторический интерес [7, 36]. Действительно, помимо несоответствия современным представлениям о молекулярных механизмах транскрипции и доменопетлевой организации хроматина в хромосомах, эта гипотеза предполагала непостоянство морфологии хромосомы на протяжении периода функционирования ЛЩ. Но именно стабильность

Таблица 1. Известные последовательности, транскрипция которых выявлена на петлях ЛЩ методом гибридизации *in situ*

	Мишень	Объект	Комментарии
АМФИБИИ	Гены 18S и 28S рРНК	<i>Triturus carnifex</i> [12, 77, 78]	Показана транскрипция РНКполII минорных сайтов в гетероморфных районах ЛЩ1. ЯОР на ЛЩ9 не транскрибируется
	Гены 5S рРНК	<i>Notophthalmus viridescens</i> [79, 80]; <i>Xenopus laevis</i> [81]	Меченые боковые петли обнаруживались лишь в некоторых случаях, предполагается “случайная” транскрипция РНКполII
	Гены гистонов	<i>T. carnifex</i> [82]; <i>N. viridescens</i> [16, 75, 76, 83]	У <i>T. carnifex</i> показана транскрипция минорного сайта только в одной петле на ЛЩ1. У <i>N. viridescens</i> мощная транскрипция выявлена на ЛЩ 2 и 6 в районах, маркированных сферами
	Гены нуклеофозмина NO38/B23 и цитокератина 8	<i>X. laevis</i> [84]	Выявлено несколько транскрипционных единиц на разных хромосомах, что может соответствовать дуплицированным копиям или псевдогенам
	Гены <i>hsp70</i> , <i>c-мус</i> , <i>Eg1</i>	<i>Pleurodeles waltl</i> [18, 85]	Для гибридизации были использованы РНК-зонды, комплементарные мРНК <i>c-мус</i> , <i>Eg1</i> <i>X. laevis</i> , и кДНК-зонд <i>hsp70</i> <i>P. waltl</i>
	Сателлит 1	<i>N. viridescens</i> [75, 76, 83, 86]	Тандемный повтор с повторяющейся единицей 222 пн; располагается между кластерами генов гистонов
	Сателлит 2	<i>N. viridescens</i> [87, 88]	Тандемный повтор с повторяющейся единицей 330 пн; показана транскрипция с обеих нитей на стадии ЛЩ; гомологичен стабильным нитеспецифичным транскриптам в цитоплазме клеток из разных тканей; <i>in vitro</i> транскрипты катализируют саморазрезание
	Сателлит G	<i>Lissotriton vulgaris</i> [89]	Тандемный повтор с повторяющейся единицей 310 пн; перичентромерные кластеры не транскрибируются, минорные кластеры в других локусах транскрибируются
	Сателлит Tks1	<i>Triturus karelinii</i> и <i>T. cristatus</i> [90]	Тандемный повтор с повторяющейся единицей 33 пн; показана редкая транскрипция копий повтора, фланкирующего центромерные районы
	Сателлит TcS1	<i>T. carnifex</i> [78]	Тандемный повтор с повторяющейся единицей 330 пн; 20–40 петель на ЛЩ1 (длинные плечи гомологов)
Повторы из клонов X-132A, X1-741, X-132C	<i>X. laevis</i> [91]	Тандемные повторы из клонов X-132A с повторяющейся единицей 77–79 пн (~105 копий на геном) и X1-741 с повторяющейся единицей 741 пн (1% в геноме). Транскрипты рассеянного повтора из клона X-132C (~1000 копий в геноме) выявлены на большом числе петель	
Сателлит I	<i>Lithobates catesbeianus</i> [92]	Тандемный повтор с повторяющейся единицей 360 пн	

Таблица 1. Окончание

	Мишень	Объект	Комментарии
ПТИЦЫ	Z-макросателлит	<i>Gallus gallus domesticus</i> [93]	Показана транскрипция на ЛЩZ и ЛЩ1,2,3,4 (концевые петли)
	Район МНМ (male hypermethylation)	<i>G. g. domesticus</i> [94]	Тандемный повтор с повторяющейся единицей 2.2 тпн, включает ~210 повторов; располагается в коротком плече Z-хромосомы у курицы, где и транскрибируется на ЛЩ
	Тандемный повтор CNM	<i>G. g. domesticus</i> [95, 96]	Видоспецифичный повтор с повторяющейся единицей 41 пн; показана транскрипция с обеих нитей на стадии ЛЩ
	Тандемный повтор LL2R (lumpy loop 2 repeat)	<i>G. g. domesticus</i> [97]	Видоспецифичный повтор с повторяющейся единицей ~440 пн, транскрипты локализуются в составе маркерных петель LL2 на ЛЩ2 курицы
	Перицентромерный тандемный повтор PO41	<i>G. g. domesticus</i> , <i>Coturnix japonica</i> [96]	Повторяющаяся единица 41 пн, повтор специфичен для Galliformes; показана транскрипция с обеих нитей на стадии ЛЩ
	Перицентромерный тандемный повтор BgII	<i>C. japonica</i> [96]	Видоспецифичный повтор с повторяющейся единицей 41 пн; показана транскрипция G-богатой нити на стадии ЛЩ
	Серия тандемных повторов Sjar	<i>C. japonica</i> [98]	Видоспецифичные повторы длиной 16–858 пн; транскрибируются перицентромерные кластеры
	Теломерная последовательность (TTAGGG) _n	<i>G. g. domesticus</i> , <i>Meleagris gallopavo</i> [62]	Показана транскрипция C-богатой нити
	Центромерный повтор PR1	<i>Columba livia</i> и <i>C. palumbus</i> [63]	Тандемный повтор с повторяющейся единицей ~900 пн; показана транскрипция на коротких петлях в центромерных районах всех ЛЩ <i>C. palumbus</i> . У <i>C. livia</i> показана транскрипция только на ЛЩ 2

хромомерно-петлевого рисунка и его видоспецифичный характер лежат в основе всех работ, посвященных созданию цитологических карт ЛЩ [2, 4–6, 111–121]. При этом следует отметить, что объективно картина вытягивания и обратного сокращения боковых петель ЛЩ существует благодаря регулированию их активации. Подобные изменения морфологии хромосом наблюдаются при формировании ЛЩ и затем при их регрессии, обусловленной прекращением функции, как в естественных условиях, так и при воздействии стресса, преждевременной активации яйцеклетки или искусственном подавлении синтеза РНК в ооците с помощью, например, актиномицина Д или альфа-аманитина [7]. Важно, что при этом не происходит перемещения петли относительно ее положения на хромосоме. Границы петель, по видимому, определяются структурно-функциональной организацией хроматина с участием последовательности ДНК. В связи с этим обсуждается вопрос о роли в поддержании петлевой структуры хроматина ЛЩ инсуляторного белка

СТCF (CCCTC-Binding factor) [54], которому в настоящее время отводится основная роль в маркировании границ топологически-ассоциированных доменов хроматина в интерфазном ядре [122].

ГИПОТЕЗА “ГЕНА-ХОЗЯИНА” И “ГЕНОВ-РАБОВ”

Представления о движущейся оси ДНК при формировании боковой петли ЛЩ дали основания Г. Кэллану [108, 123] для создания интересной, хотя и чисто умозрительной, гипотезы “хозяев и рабов” (“master – slave hypothesis”). Эта гипотеза представляла попытку объяснить не только различия в количестве ДНК у разных видов, в том числе и у родственных, но главное – значение самого феномена хромосом типа ЛЩ для сохранения наследственной информации в геноме [108, 123, 124]. Суть гипотезы состояла в предположении того, что в эукариотической клетке каждый ген (“хозяин” по терминологии

автора) имеет несколько копий (“рабов”), расположенных линейно. Ген-“хозяин” является носителем генетической информации и участвует в рекомбинации во время мейоза. В ходе преобразования хромосом в ЛЩ гены-“рабы” продвигаются вдоль гена-“хозяина”, который находится в хромосоме, происходит выравнивание, проверка и корректировка нуклеотидного состава копий (“рабов”) относительно эталонной последовательности “хозяина”, они вытягиваются из хромосомы и образуют боковую петлю ДНК на ЛЩ [108, 123]. Такое заключение было сделано на основе данных о включении предшественников в состав ДНК в основании петель, это наблюдение осталось недооцененным и заслуживает в будущем отдельного внимания. Кроме того, гипотеза “хозяев и рабов” впервые обратила внимание на связь формирования латеральных петель с повторяющимися элементами в геноме. В то же время сама по себе она была полностью спекулятивной и ее несостоятельность вскоре стала очевидной самим авторам [7, 36].

“КЛАССИЧЕСКАЯ” ГИПОТЕЗА

Наибольшее распространение получила “классическая” гипотеза, как ее определили Г. Макгрегор [11–13] и Г. Кэллан [7, 125], посвященная проблеме биологического значения преобразования хромосом в ЛЩ. Эта гипотеза предполагает, что повышенная транскрипционная активность ЛЩ имеет целью формирование разнообразных материнских РНК, необходимых для реализации ранних этапов эмбриогенеза [7, 9, 13, 18, 102, 126]. Идею об информационном значении для раннего эмбриогенеза РНК, синтезированных на ЛЩ, первоначально выдвинул В. Дьюри [28], ее поддержал Дж. Голл [127], а экспериментально обосновал и окончательно сформулировал Э. Дэвидсон [9, 128, 129]. Однако исследования Дэвидсона и коллег главным образом базировались на анализе и осмыслении судьбы гетерогенных РНК, а также поли(А⁺) РНК, содержащих интерсперсные повторяющиеся последовательности и синтезирующихся в растущих ооцитах морского ежа [99, 130–132]. При этом в отличие от амфибий в ооцитах морских ежей хромосомы не принимают форму ЛЩ. Обширные и глубокие исследования Дэвидсона с коллегами, обобщенные им в неоднократно переиздававшейся монографии, посвященной дифференциальной активности генов в про- и раннем эмбриогенезе [9, 129, 133], дали основание автору еще в 1960–70-е гг. экстраполировать синтез на ЛЩ, объединить его с запасанием в ооците также регуляторных РНК, необходимых для ранних этапов развития [133]. К настоящему времени накоплена серия экспериментальных данных, обосновывающих синтез на ЛЩ некодирующих (оче-

видно, регуляторных) РНК, считывающихся с обеих нитей tandemных повторов ДНК [21, 134]. Стабильные интронные РНК (sisRNA), выявленные в ЗП из ооцитов [103], а также в форме своеобразных лассо обнаруженные в ооплазме у *X. tropicalis* [107], по данным авторов наследуются зародышем и предположительно играют регуляторную роль в эмбриональной трансляции. Положения классической гипотезы о роли гиперактивной транскрипции хромосом на стадии ЛЩ в индивидуальном развитии животных нашли отражение в монографиях отечественных исследователей [135–137] и закрепились в учебниках по эмбриологии и биологии развития [138]. В целом классическая гипотеза заложила основы современного представления о функциях ЛЩ, однако ее нельзя признать справедливой, так как она далеко не исчерпывает всех аспектов биологической значимости этих хромосом. Так, например, классическая гипотеза не дает объяснения тому факту, что у многих видов, в частности у предшественников амниот, хромосомы поддерживаются в форме ЛЩ на протяжении длительного периода, который может начинаться задолго до полового созревания особи [139]. Она не объясняет, почему все типы запасающихся РНК синтезируются в необходимых количествах на ранних этапах роста ооцита, задолго до полного развития и максимального функционирования ЛЩ, а затем медленно обновляются, сохраняясь в равновесном состоянии до созревания яйцеклетки [9], а также почему в период большого роста и максимальной потребности ооцита в РНК ЛЩ уже перестают существовать. Иными словами, она не объясняет, почему активный синтез РНК на ЛЩ происходит на протяжении значительно более длительного периода, чем это требуется для полного обеспечения ооцита, и прекращается задолго до возникновения реальной потребности в этой РНК.

ГИПОТЕЗА СКВОЗНОГО СЧИТЫВАНИЯ МНОГИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ (“READ-THROUGH” HYPOTHESIS)

С развитием техники молекулярного клонирования и гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*, к началу 1980-х гг. стало очевидным, что многие повторяющиеся последовательности в петлях ЛЩ считываются в составе одной длинной транскрипционной единицы вместе с другими последовательностями ДНК [78, 140, 141]. Дж. Голл с коллегами провели детальное исследование такой сквозной транскрипции в ЛЩ на модели гистоновых генов у *N. viridescens* [8, 16, 75, 76]. У этого вида гистоновые гены повторены в геноме 600–800 раз и сгруппированы в двух сайтах на хромосомах 2 и 6 [86]. Каждый повтор содержит один кластер из пяти гистоновых генов (Н1–Н3–Н2В–Н2А–Н4) длиной 9 тпн, причем ген Н2В

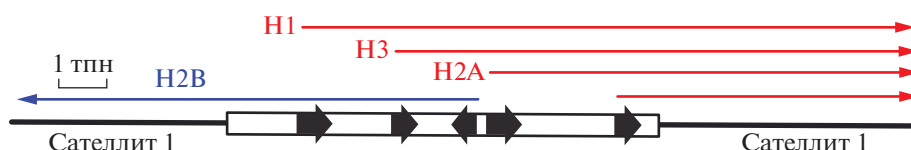


Рис. 3. Транскрипция кластера гистоновых генов на ЛЩ *N. viridescens* [16].

находится в комплементарной остальным четырем генам нити ДНК (рис. 3).

Кластеры гистоновых генов разделены длинными последовательностями (50 тпн) сателлитной ДНК (сателлит 1), состоящей из повторов с длиной мономера 222 пн (табл. 1). Анализ результатов РНК-гибридизации ЛЩ с радиоактивными зондами, комплементарными всем структурным генам и фрагментам обеих нитей сателлита 1, показал, что транскрипция сателлита 1 происходит в единой транскрипционной единице с гистоновыми генами и в обоих направлениях запускается, по всей видимости, с промоторов структурных генов [75, 76].

На основании этих результатов Дж. Голлом [16] была сформулирована так называемая “гипотеза сквозного считывания” (“read-through” hypothesis), которая определяла следующие закономерности транскрипции хромосом на стадии ЛЩ: а) транскрипция начинается с промотора, расположенного на 5'-конце любого структурного гена; б) РНК-полимеразы проскакивают сигнал терминации на 3'-конце структурного гена и в транскрипционные единицы вовлекаются некодирующие последовательности, следующие за смысловыми; в) транскрипция останавливается в одном из трех мест: там, где встречаются две транскрипционные единицы противоположного направления считывания; там, где уже началась транскрипция следующей транскрипционной единицы в том же направлении считывания; там, где петля входит в хромосом. Сегодня мы знаем, что из перечисленных ограничений реально транскрипция должна останавливаться только в месте наличия терминатора или конца петли, остальные факторы не являются в норме физическим ограничением для транскрипции, только если сама транскрипция не имеет каких-то особенностей и задач. Исследование транскрипции повторов на ЛЩ бесхвостых амфибий подтверждало, что сплошное считывание разнообразных последовательностей в одной транскрипционной единице – характерная специфическая особенность функционирования хромосом типа ЛЩ [91, 92].

Появление гипотезы “сквозного считывания” явилось ярким этапом в истории изучения ЛЩ. Практически сразу же эта гипотеза была принята и поддержана сообществом исследователей ЛЩ, поскольку она объясняла известные многочис-

ленные факты транскрипции на ЛЩ рассеянных и tandemных повторов [7, 12, 13, 29].

Позднее автором этой гипотезы было сделано допущение, что инициация транскрипции в ЛЩ может осуществляться необязательно в промоторной части структурного гена, поскольку оказалось, что на ЛЩ *N. viridescens* в РНК-транскриптах гистоновых генов могут присутствовать последовательности, расположенные выше промотора первого гистонического гена в кластере [142]. Это наблюдение не противоречит гипотезе Дж. Голла, но расширяет ее положение о возможных сайтах инициации сквозного считывания. Подтверждение тому мы находим на примере транскрипции в ЛЩ домашней курицы и японского перепела tandemных повторов CNM и PO41. Анализ последовательностей, примыкающих к сайтам локализации этих повторов в геноме курицы, выявил последовательности длинных концевых повторов (LTR) эндогенных ретровирусов ERV [96]. Поскольку в геномах курицы и японского перепела последовательности LTR содержат полнофункциональные промоторы, авторы предположили, что транскрипция tandemных повторов может начинаться с них [96, 134]. В заключение следует отметить, что гипотеза “сквозного считывания” не концентрируется напрямую на проблеме значения преобразования хромосом в ЛЩ, но вскрывает некоторые закономерности их функционирования.

“ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ” ГИПОТЕЗЫ

В своей публикации, посвященной парадоксу избыточности генома (“C-value paradox”), Томас Кавалье-Смит выдвинул неожиданную гипотезу “о скелетной функции ДНК” [143]. Он предположил, что синтез большого количества молекул разнообразных РНК на специализированных (“скелетных”) фрагментах ДНК в сочетании со специфическими белками, происходящий на стадии ЛЩ, необходим для механического растягивания оболочки при увеличении объема ядра в растущем ооците, а сами ЛЩ служат своего рода каркасом. Несостоятельность этой гипотезы давно стала очевидна. Хромосомы в фазе ЛЩ вообще не контактируют с ядерной оболочкой, в то же время физическое поддержание морфологии латеральных петель РНП-комплексами трудно отрицать.

В 1975 г. Педро Леон [144] предложил гипотезу “репрограммирования хроматина для развития”. Автор предположил, что для подготовки хромосом к работе в процессе развития в боковых петлях ЛЩ происходит изменение структуры ДНП, включающее ферментативную модификацию регуляторных молекул или их обмен. По мнению автора транскрипция на ЛЩ нужна для поддержания хроматина в расправленном состоянии, чтобы обеспечить доступ нуклеоплазмы к ДНК, а массивные комплексы РНП служат для того, чтобы предотвратить коллапс петель. При этом тезис о том, что ЛЩ участвуют в производстве и запасании мРНК для ранних этапов эмбриогенеза, оставался и в этой гипотезе справедливым [144]. К этой гипотезе, по нашему мнению, стоит обратиться с пристальным вниманием с учетом данных о том, какие именно последовательности транскрибируются на ЛЩ.

Действительно, во время гаметогенеза (равно как и в первых делениях дробления) происходит репрограммирование генома, суть которого состоит в удалении из хроматина старых эпигенетических меток, таких как метилирование ДНК, специфические модификации гистонов, и установление новых меток, соответствующих данному этапу онтогенеза [145]. Эпигенетическое репрограммирование характерно для гаметогенеза всех многоклеточных и сопровождается как пассивной потерей меток в ходе быстрых последовательных делений клеток линии зародышевого пути, так и активной модификацией метилцитозина в ядрах гониев путем промежуточного окисления до гидроксиметилцитозина или с участием модифицирующих ферментов и системы репарации [146]. У представителей разных групп позвоночных в ходе дифференцировки первично половых клеток и раннего развития эти изменения происходят с некоторыми отличиями. Если у рыб в зрелых ооцитах происходит практически полное удаление эпигенетических меток и метилирование в клетках нарастает уже после оплодотворения [147], то у человека деметилирование хроматина минимально в завершивших дробление бластомерах. Оно повышается в ходе гастрюляции и ранних этапов морфогенеза, но после определения судьбы первично половых клеток и миграции их в гонады с 5–6-й недели эмбрионального развития в ядрах оогониев начинается новый раунд удаления меток и продолжается в ооцитах, вступивших в мейоз до 7–10-й недели развития, а затем начинается длительный период постепенного восстановления метилирования, который происходит на протяжении всего времени роста ооцитов вплоть до созревания и уровень метилирования в них на момент оплодотворения достаточно высок [148]. Можно предположить, что формирование ЛЩ непосредственно связано с репрограммированием генома в гаметогенезе. Как уже упомина-

лось выше, способность содержимого ооцитов амфибий вызывать репрограммирование хроматина не является видоспецифичной, поэтому экстракты, полученные из ооцитов и яиц *X. laevis*, могут перепрограммировать геномы других, даже весьма далеких, видов. Здесь уместно вспомнить удивительные опыты Дж. Голла по реципрокным инъекциям головок спермиев в ЗП ооцитов между *X. laevis* и *N. viridescens*, когда гаплоидные хромосомы донора принимали форму ламповых щеток реципиента [59]. Более того, хромосомы зрелых сперматозоидов млекопитающих принимали форму типичных ЛЩ после инъекции в ооцит *X. laevis* [148]. Инъекцированные в ооцит ядра клеток других типов становятся транскрипционно активными в течение нескольких часов, что позволяет использовать этот подход для изучения кинетики и молекулярных механизмов репрограммирования геномов, хотя они и не формируют характерных для ЛЩ петель [103, 149–151].

С гипотезой П. Леона перекликается и более современная гипотеза “заблокированной транскрипции”, предложенная одним из авторов настоящего обзора [152]. Автор гипотезы обращает внимание на то, что в составе боковых петель ЛЩ обнаруживаются тандемно повторяющиеся последовательности и рассеянные повторы [62, 63, 78, 87–98, 153], зачастую транспозонного происхождения. В дифференцированных клетках транскрипция этих последовательностей ограничена метилированием ДНК и обусловливающими репрессию хроматина модификациями гистонов. Деметилирование и удаление репрессивных гистоновых меток при репрограммировании в ходе гаметогенеза приводят к активации транскрипции в том числе мобильных элементов, увеличивая тем самым вероятность их перемещения по геному. Гипотеза “заблокированной транскрипции” предполагает, что в течение длительного периода профазы первого деления мейоза в ядре ооцита активируется защитный механизм, останавливающий нежелательную транскрипцию деметилированных последовательностей, что приводит к накоплению транскриптов и формированию характерных для ЛЩ латеральных петель. Формирование характерных транскрипционных единиц с плотно расположенными вдоль оси матричной нити ДНК полимеразными комплексами обеспечивает легкий доступ модифицирующих ферментов к свободной цепи ДНК. С другой стороны, запускаемые гормональной регуляцией оогенеза процессы дают сигнал к переходу к фазе вителлогенеза, сопровождающейся втягиванием петель, которое происходит в результате разблокировки транскрипции. Образовавшиеся РНП могут сохраняться в ооците до оплодотворения и участвовать в эпигенетической маркировке хроматина зиготы, отмечая районы конститутивного гетерохроматина и мест скопления транспозонов. Несмотря на по-

тенциальный вред экспрессии и возможной реинтеграции мобильных элементов, транскрипция некоторых из них, по-видимому, необходима во время эмбриогенеза и гаметогенеза [154].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Завершая настоящий обзор, мы должны признать, что, несмотря на почти полутравековую историю изучения ЛЩ и огромное число посвященных им экспериментальных исследований с применением передовых для своего времени методов, а также большой вклад, внесенный изучением этих хромосом в понимание общих закономерностей функциональной организации и регуляции эукариотического генома, многократные попытки объяснить значение феномена преобразования хромосом в эти удивительные образования по-прежнему остаются тщетными.

Принято считать, что хромосомы преобразуются в ЛЩ у организмов с крупными ооцитами, но на самом деле неизвестно, насколько широко распространено это явление. ЛЩ изучаются преимущественно на примере ооцитов амфибий и птиц, но это объясняется скорее удобством работы с ними, а не ограничениями распространения. Хорошо изучена роль материнских РНК для раннего эмбриогенеза, однако нет убедительных данных о синтезе их именно на ЛЩ, практически неизвестно, какие РНК транскрибируются на ЛЩ и есть ли среди них мРНК. Не без оснований предполагается регуляторная роль транскриптов тандемных и рассеянных повторов, но механизмы их участия в регуляции работы эмбрионального генома только начинают открываться.

Мы уверены, что применение современных методов геномики и клеточной биологии, например таких как высокопроизводительное секвенирование нового поколения, методы изучения наследственной информации единичных клеток и геномного редактирования, прижизненные наблюдения динамических процессов, а также усовершенствование методов биоинформатики, в ближайшем будущем приведет к прояснению многих аспектов феномена ЛЩ и его фундаментальной значимости для реализации программы развития и эволюции.

Нам кажется уместным в заключение привести слова одного из основоположников науки о хромосомах типа ЛЩ, профессора Герберта Макгрегора, написанные им ровно 40 лет тому назад и справедливые по настоящее время: “I would have wished to end the article by offering some new and conclusive explanation of the lampbrush phenomenon, but it is perhaps just as well that I cannot do so, for lampbrushes are truly amazing objects and it would be a pity if they lost their challenge, so depriving young

cytologists of the pleasure of handling and working with them in years to come” [11].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50096. При написании обзора была использована инфраструктура РЦ “ЦКП Хромас” СПбГУ.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rückert J.* Zur Entwicklungsgeschichte des Ovarialeies bei Selachiern // *Anat. Anz.* 1892. V. 7. P. 107–158.
2. *Чельшьева Л.А., Соловей И.В., Родионов А.В. и др.* Хромосомы-ламповые щетки курицы. Цитологические карты макробивалентов // *Цитология.* 1990. Т. 32. № 4. С. 303–316.
3. *Derjusheva S., Kurganova A., Krasikova A. et al.* Precise identification of chicken chromosomes in the lampbrush form using chromosome painting probes // *Chromosome Res.* 2003. V. 11. P. 749–757. <https://doi.org/10.1023/B:CHRO.0000005778.72909.4d>
4. *Saifitdinova A., Derjusheva S., Krasikova A., Gaginskaya E.* Lampbrush chromosomes of the chaffinch (*Fringilla coelebs* L.) // *Chromosome Res.* 2003. V. 11. P. 99–113. <https://doi.org/10.1023/A:1022859713777>
5. *Galkina S., Deryusheva S., Fillon V. et al.* FISH on avian lampbrush chromosomes produces higher resolution gene mapping // *Genetica.* 2006. V. 128. № 1–3. P. 241–251. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-5776-7>
6. *Galkina S., Fillon V., Saifitdinova A. et al.* Chicken microchromosomes in the lampbrush phase: A cytogenetic description // *Cytogenet. Genome Res.* 2017. V. 152. № 1. P. 46–54. <https://doi.org/10.1159/000475563>
7. *Callan H.G.* Lampbrush Chromosomes. Heidelberg: Springer, 1986. 254 p.
8. *Босток К., Самнер Э.* Хромосома эукариотической клетки. М.: Мир, 1981. 595 с.
9. *Davidson E.* Gene Activity in Early Development. 3rd ed. Orlando: Acad. Press, 1986. 670 p.
10. *Красикова А.В., Куликова Т.В.* Хромосомы типа ламповых щеток: современные представления и перспективы исследований. СПб: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2020. 104 с.
11. *Macgregor H.C.* Recent developments in the study of lampbrush chromosomes // *Heredity.* 1980. V. 44. P. 3–35. <https://doi.org/10.1038/hdy.1980.2>
12. *Macgregor H.C.* Lampbrush chromosomes and gene utilization in meiotic prophase // *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1984. V. 38. P. 333–347.
13. *Macgregor H.C.* The lampbrush chromosomes of animal oocytes // *Chromosome Structure and Function.* N.Y.: Van Nostrand Reinhold, 1986. P. 152–186.

14. *Macgregor H.C.* So what's so special about these things called lampbrush chromosomes? // *Chromosome Res.* 2012. V. 20. P. 903–904. <https://doi.org/10.1007/s10577-012-9330-z>
15. *Macgregor H.C.* Chromomeres revisited // *Chromosome Res.* 2012. V. 20. P. 911–924. <https://doi.org/10.1007/s10577-012-9310-3>
16. *Gall J.G., Diaz M.O., Stephenson E.C., Mahon K.A.* The transcription unit of lampbrush chromosomes // *Soc. Dev. Biol. Symp.* 1983. V. 41. P. 137–146.
17. *Гагинская Е.Р.* Хромосомы ламповые щетки из ооцитов амфибий // *Цитология.* 1989. Т. 31. № 11. С. 1267–1291.
18. *Angelier N., Penrad-Mobayed M., Billoud B. et al.* What role might lampbrush chromosomes play in maternal gene expression? // *Int. J. Dev. Biol.* 1996. V. 40. № 4. P. 645–652. <https://doi.org/10.1007/BF00292471>
19. *Morgan G.T.* Lampbrush chromosomes and associated bodies: new insights into principles of nuclear structure and function // *Chromosome Res.* 2002. V. 10. P. 177–200. <https://doi.org/10.1023/a:1015227020652>
20. *Gall J.C., Wu Z., Murphy C., Gao H.* Structure in the amphibian germinal vesicle // *Exper. Cell Res.* 2004. V. 296. P. 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.017>
21. *Gaginskaya E., Kulikova T., Krasikova A.* Avian lampbrush chromosomes: A powerful tool for exploration of genome expression // *Cytogenet. Genome Res.* 2009. V. 124. № 3–4. P. 251–267. <https://doi.org/10.1159/000218130>
22. *Gall J.G.* Are lampbrush chromosomes unique to meiotic cells? // *Chromosome Res.* 2012. V. 20. P. 905–910. <https://doi.org/10.1007/s10577-012-9329-5>
23. *Morgan G.T.* Imaging the dynamics of transcription loops in living chromosomes // *Chromosoma.* 2018. V. 127. P. 361–374. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0667-8>
24. *Krasikova A.V., Kulikova T.V.* Identification of genomic loci responsible for the formation of nuclear domains using lampbrush chromosomes // *Non-Coding RNA.* 2020. 6, 1. <https://doi.org/10.3390/ncrna6010001>
25. *Flemming W.* *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung.* Leipzig: F.C.W. Vogel, 1882. 424 p.
26. *Holl M.* Über die Reifung der Eizellen des Huhnes // *SitzungsberFkad Wiss. Wien.* 1890. V. 99. P. 311–370.
27. *Duryee W.R.* Isolation of nuclei and non-mitotic chromosome pairs from frog eggs // *Arch. Exp. Zellforsch.* 1937. V. 19. P. 171–176.
28. *Duryee W.R.* Chromosomal physiology in relation to nuclear structure // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1950. V. 50. P. 920953.
29. *Макгрегор Г., Варли Дж.* Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир, 1986. 272 с.
30. *Кроптова Е.В., Гагинская Е.Р.* Хромосомы типа ламповых щеток из ооцитов японского перепела. Данные световой и электронной микроскопии // *Цитология.* 1984. Т. 26. С. 1006–1015.
31. *Hutchison N.* Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus* // *The J. Cell Biol.* 1987. V. 105. P. 1493–1500. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.4.1493>
32. *Solovei I., Gaginskaya E., Allen T., Macgregor H.* A novel structure associated with a lampbrush chromosome in the chicken, *Gallus domesticus* // *J. Cell Sci.* 1992. V. 101. P. 759–772.
33. *Solovei I., Gaginskaya E., Macgregor H.* The arrangement and transcription of telomere DNA sequences at the ends of lampbrush chromosomes of birds // *Chromosome Res.* 1994. V. 2. P. 460–470. <https://doi.org/10.1007/BF01552869>
34. *Saifitdinova A., Galkina S., Volodkina V., Gaginskaya E.* Preparation of lampbrush chromosomes dissected from avian and reptilian growing oocytes // *Biol. Comm.* 2017. V. 62. P. 165–168. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu03.2017.302>
35. *Lisachov A.P., Galkina S.A., Saifitdinova A.F. et al.* Identification of sex chromosomes in *Eremias velox* (Lacertidae, Reptilia) using lampbrush chromosome analysis // *Comp. Cytogen.* 2019. V. 13. P. 121–132. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v13i2.34116>
36. *Callan H.G.* Lampbrush chromosomes as seen in historical perspective // *Results and Problems in Cell Differentiation.* 1987. V. 14. P. 5–26. https://doi.org/10.1007/978-3-540-47783-9_2
37. *Macgregor H.C.* Lampbrush chromosomes [Электронный ресурс] // URL: <http://spass-sci.ru/lbc/>. Дата обновления: 01.03.2020. Дата обращения: 30.05.2020.
38. *Janssens F.A.* Das chromatische Element während der Entwicklung des Ovocyts von Triton // *Anatomischer Anzeiger.* 1904. V. 24. P. 648–651.
39. *Кольцов Н.К.* Исследования о форме клетки. Часть I. Исследование о спермиях десятиногих раков в связи с общими соображениями относительно организации клетки. М.: Унив. тип., 1905. 200 с.
40. *Кольцов Н.К.* Структура хромосом и обмен веществ в них // *Биол. журн.* 1938. Т. 7. № 1. С. 3–46.
41. *Watson J.D., Crick F.H.* Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid // *Nature.* 1953. V. 171. P. 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
42. *Gall J.G.* Kinetics of deoxyribonuclease action on chromosomes // *Nature.* 1963. V. 198. P. 36–38. <https://doi.org/10.1038/198036a0>
43. *Callan H.G.* The nature of lampbrush chromosomes // *Int. Rev. Cytol.* 1963. V. 15. P. 1–34.
44. *Miller O.L.* Fine structure of lampbrush chromosomes // *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1965. V. 18. P. 79–99.
45. *Miller O.L.* The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity // *J. Cell Biol.* 1981. V. 91. P. 15–27. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.15>

46. Ullerich F.H. DNS-Gehalt und Chromosomenstruktur bei Amphibien // *Chromosoma*. 1970. V. 30. P. 1–37. <https://doi.org/10.1007/BF00293907>
47. Krasikova A., Barbero J.L., Gaginskaya E. Cohesion proteins are present in centromere protein bodies associated with avian lampbrush chromosomes // *Chromosome Res.* 2005. V. 13. P. 675–685. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-1005-6>
48. Austin C., Novikova N., Guacci V., Bellini M. Lampbrush chromosomes enable study of cohesin dynamics // *Chromosome Res.* 2009. V. 17. P. 165–184. <https://doi.org/10.1007/s10577-008-9015-9>
49. Krasikova A., Daks A., Zlotina A., Gaginskaya E. Polymorphic heterochromatic segments in Japanese Quail microchromosomes // *Cytogenet. Genome Res.* 2009. V. 126. № 1–2. P. 148–155. <https://doi.org/10.1159/000245914>
50. Morgan G.T., Jones P., Bellini M. Association of modified cytosines and the methylated DNA-binding protein MeCP2 with distinctive structural domains of lampbrush chromatin // *Chromosome Res.* 2012. V. 20. P. 925–942. <https://doi.org/10.1007/s10577-012-9324-x>
51. Angelier N., Paintrand M., Lavaud A., Lechaire J.P. Scanning electron microscopy of amphibian lampbrush chromosomes // *Chromosoma*. 1984. V. 9. № 4. P. 243–253. <https://doi.org/10.1007/bf00292471>
52. Sommerville J., Baird J., Turner B.M. Histone H4 acetylation and transcription in amphibian chromatin // *J. Cell Biol.* 1993. V. 120. P. 277–290. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.2.277>
53. Beenders B., Watrin E., Legagneux V. et al. Distribution of XCAP-E and XCAP-D2 in the *Xenopus* oocyte nucleus // *Chromosome Res.* 2003. V. 11. P. 549–564. <https://doi.org/10.1023/a:1024999316867>
54. Zlotina A., Maslova A., Pavlova O. et al. New insights into chromomere organization provided by lampbrush chromosome microdissection and high-throughput sequencing // *Front. Genet.* 2020. V. 11. P. 57. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00057>
55. Vlad M., Macgregor H.C. Chromomere number and its genetic significance in lampbrush chromosomes // *Chromosoma*. 1975. V. 50. P. 327–347. <https://doi.org/10.1007/BF00327073>
56. Macgregor H., Klosterman L. Observations on the cytology of *Bipes* (Amphisbaenia) with special reference to its lampbrush chromosomes // *Chromosoma*. 1979. V. 72. P. 67–87. <https://doi.org/10.1007/BF00286430>
57. Gregory T.R., Nicol J.A., Tamm H. et al. Eukaryotic genome size databases // *Nucl. Acids Res.* 2007. P. 35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl828>
58. Хутинаева М.А., Кропотова Е.В., Гагинская Е.Р. Особенности морфофункциональной организации хромосом типа ламповых щеток из ооцитов сизого голубя // *Цитология*. 1989. Т. 31. № 10. С. 1185–1191.
59. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. N.Y.: Garland Sci., 2002. 1616 p.
60. Gall J.G., Murphy C. Assembly of lampbrush chromosomes from sperm chromatin // *Mol. Biol. Cell*. 1998. V. 9. P. 733–747. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.4.733>
61. Solovei I., Macgregor H., Gaginskaya E. Single stranded nucleic acid binding structures on chicken lampbrush chromosomes // *J. Cell Sci.* 1995. V. 108. P. 1391–1396.
62. Solovei I., Macgregor H., Gaginskaya E. Specifically terminal clusters of telomere DNA sequences are transcribed from C-rich strand on chicken lampbrush chromosomes // *Chromosome Today*. 1995. V. 11. P. 147–156.
63. Solovei I.V., Joffe B.I., Gaginskaya E.R., Macgregor H.C. Transcription on lampbrush chromosomes of a centromerically localized highly repeated DNA in pigeon (*Columba*) relates to sequence arrangement // *Chromosome Res.* 1996. V. 4. P. 588–603. <https://doi.org/10.1007/BF02261722>
64. Мякошина Ю.А., Родионов А.В. Мейотические хромосомы индейки *Meleagris gallopavo* (Galliformes: Meleagrididae) на стадии хромосом-ламповых щеток // *Генетика*. 1994. Т. 30. № 5. С. 649–656.
65. Angelier N., Bonnanfant-Jais M.-L., Herberts C. et al. Chromosomes of amphibian oocytes as a model for gene expression: significance of lampbrush loops // *Int. J. Dev. Biol.* 1990. V. 34. P. 69–80.
66. Kulikova T., Chervyakova D., Zlotina A. et al. Giant poly(A)-rich RNP aggregates form at terminal regions of avian lampbrush chromosomes // *Chromosoma*. 2016. V. 125. № 4. P. 709–724. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0563-4>
67. Scheer U., Franke W.W., Trendelenburg M.F., Spring H. Classification of loops of lampbrush chromosomes according to the arrangement of transcriptional complexes // *J. Cell Sci.* 1976. V. 22. P. 503–519.
68. Scheer U., Spring H., Trendelenburg M.F. Organization of transcriptionally active chromatin in lampbrush chromosome loop // *The Cell Nucleus*. V. VII. N.Y.; London: Acad. Press, 1979. P. 3–47.
69. Miller O.L., Beatty B.R. Portrait of a gene // *J. Cell Physiol.* 1969. V. 74. Suppl. 1. P. 225–232.
70. Hill R.S. A quantitative electron-microscope analysis of chromatin from *Xenopus laevis* lampbrush chromosomes // *J. Cell Sci.* 1979. V. 40. P. 145–169.
71. Гагинская Е.Р., Цветков А.Г. Электронно-микроскопическое исследование структуры хроматина в диспергированных хромосомах-ламповых щетках курицы // *Цитология*. 1988. Т. 30. № 2. С. 142–150.
72. Patel S., Novikova N., Beenders B. et al. Live images of RNA polymerase II transcription units // *Chromosome Res.* 2008. V. 16. P. 223–232. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1189-z>
73. Gall J.G., Wu Z.A. Examining the contents of isolated *Xenopus* germinal vesicles // *Methods*. 2010. V. 51. P. 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.010>
74. Leidescher S., Nübler J., Feodorova Y. et al. Spatial organization of transcribed eukaryotic genes // *bioRxiv*. 2020.05.20.106591. <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.106591>

75. Diaz M.O., Barsacchi-Pilone G., Mahon K.A., Gall J.G. Transcripts from both strands of a satellite DNA occur on lampbrush chromosome loops of the newt *Notophthalmus* // Cell. 1981. V. 24. P. 649–659. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90091-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90091-x)
76. Diaz M.O., Gall J.G. Giant readthrough transcription units at the histone loci on lampbrush chromosomes of the newt *Notophthalmus* // Chromosoma. 1985. V. 92. P. 243–253. <https://doi.org/10.1007/BF00329807>
77. Morgan G.T., Macgregor H.C., Colman A. Multiple ribosomal gene sites revealed by *in situ* hybridization of *Xenopus* rDNA to *Triturus* lampbrush chromosomes // Chromosoma. 1980. V. 80. P. 309–330. <https://doi.org/10.1007/BF00292687>
78. Macgregor H.C., Varley J.M., Morgan G.T. The transcription of satellite and ribosomal DNA sequences on lampbrush chromosomes of crested newts // International Cell Biology. Berlin; Heidelberg: Springer, 1981. P. 1980–1981.
79. Pukkila P.J. Identification of the lampbrush loops which transcribe 5S ribosomal RNA in *Notophthalmus* (*Triturus*) *viridescens* // Chromosoma. 1975. V. 53. P. 71–89. <https://doi.org/10.1007/BF00329391>
80. Barsacchi-Pilone G., Nardi I., Andronico F. et al. Chromosome location of the ribosomal RNA genes in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). I. Localization of the DNA sequences complementary to 5S ribosomal RNA on mitotic and lampbrush chromosomes // Chromosoma. 1977. V. 63. P. 127–134.
81. Callan H.G., Gall J.G., Berg C.A. The lampbrush chromosomes of *Xenopus laevis*: Preparation, identification, and distribution of 5S DNA sequences // Chromosoma. 1987. V. 95. P. 236–250. <https://doi.org/10.1007/BF00294780>
82. Callan H.C., Old R.W., Gross K.W. Problems exposed by the results of *in situ* hybridization to lampbrush chromosomes // Eur. J. Cell Biol. 1980. V. 22. P. 21.
83. Gall J.G., Stephenson E.C., Erba H.P. et al. Histone genes are located at the sphere loci of newt lampbrush chromosomes // Chromosoma. 1981. V. 84. P. 159–171. <https://doi.org/10.1007/BF00399128>
84. Weber T., Schmidt E., Scheer U. Mapping of transcription units on *Xenopus laevis* lampbrush chromosomes by *in situ* hybridization with biotin-labeled cDNA probes // Eur. J. Cell Biol. 1989. V. 50. P. 144–153.
85. Billoud B., Rodroguez-Martin M.L., Berard L. et al. Constitutive expression of a somatic heat-inducible hsp70 gene during amphibian oogenesis // Development. 1993. V. 119. P. 921–923.
86. Stephenson E.C., Erba H.P., Gall J.G. Histone gene clusters of the newt *Notophthalmus* are separated by long tracts of satellite DNA // Cell. 1981. V. 24. P. 639–647. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90090-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90090-8)
87. Epstein L.M., Mahon K.A., Gall J.G. Transcription of a satellite DNA in the newt // J. Cell Biol. 1986. V. 103. P. 1137–1144. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.4.1137>
88. Epstein L.M., Gall J.G. Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt // Cell. 1987. V. 48. P. 535–543. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90204-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90204-2)
89. Barsacchi-Pilone G., Batistoni R., Andronico F. et al. Heterochromatic DNA in *Triturus* (Amphibia, Urodela). I. A satellite DNA component of the pericentric C-bands // Chromosoma. 1986. V. 93. № 5. P. 435–446. <https://doi.org/10.1007/BF00285826>
90. Baldwin L., Macgregor H.C. Centromeric satellite DNA in the newt *Triturus cristatus karelinii* and related species: its distribution and transcription on lampbrush chromosomes // Chromosoma. 1985. V. 92. P. 100–107. <https://doi.org/10.1007/BF00328461>
91. Jamrich M., Warrior R., Steele R., Gall J.G. Transcription of repetitive sequences on *Xenopus* lampbrush chromosomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 3364–3367. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.11.3364>
92. Wu Z., Murphy C., Gall J.G. A transcribed satellite DNA from the bullfrog *Rana catesbeiana* // Chromosoma. 1986. V. 93. P. 291–297. <https://doi.org/10.1007/BF00327586>
93. Hori T., Susuki Y., Solovei I. et al. Characterization of DNA sequences constituting the terminal heterochromatin of the chicken Z chromosome // Chromosome Res. 1996. V. 4. P. 411–426. <https://doi.org/10.1007/BF02265048>
94. Teranishi M., Shimada Y., Hori T. et al. Transcripts of the MHM region of the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT locus // Chromosome Res. 2001. V. 9. P. 147–165. <https://doi.org/10.1023/A:1009235120741>
95. Krasikova A., Derjusheva S., Galkina S. et al. On the positions of centromeres in chicken lampbrush chromosomes // Chromosome Res. 2006. V. 14. P. 777–789. <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1085-y>
96. Deryusheva S., Krasikova A., Kulikova T., Gaginskaya E. Tandem 41-bp repeats in chicken and Japanese quail genomes: FISH mapping and transcription on lampbrush chromosomes // Chromosoma. 2007. V. 116. P. 519–530. <https://doi.org/10.1007/s00412-007-0117-5>
97. Красикова А.В., Василевская Е.В., Гагинская Е.Р. Хромосомы типа ламповых щеток домашней курицы: транскрипция тандемно повторяющихся последовательностей ДНК // Генетика. 2010. Т. 46. № 10. С. 1329–1334.
98. Kulak M., Komissarov A., Dyomin A. et al. Description of new tandem repeats in the genome of Japanese quail // Mol. Cytogenet. 2019. V. 12. № 30. P. 63. <https://doi.org/10.1186/s13039-019-0439-z>
99. Anderson D.M., Smith L.D. Patterns of synthesis and accumulation of heterogeneous RNA in lampbrush stage oocytes of *Xenopus laevis* (Daudin) // Dev. Biol.

1978. V. 67. P. 274–285.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(78\)90199-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(78)90199-9)
100. Richter J.D., Smith L.D., Anderson D.M., Davidson E.H. Interspersed poly(A) RNAs of amphibian oocytes are not translatable // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 173. P. 227–241.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90191-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90191-8)
101. Zagris N., Kalantzis K., Guialis A. Activation of embryonic genome in chick // *Zygote*. 1998. V. 6. P. 227–231.
<https://doi.org/10.1017/s0967199498000161>
102. Olszanska B., Stepinska U. Molecular aspects of avian oogenesis and fertilization // *Int. J. Dev. Biol.* 2008. V. 52. P. 187–194.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.072329ob>
103. Gardner E.J., Nizami Z.F., Talbot C.C., Gall J.G. Stable intronic sequence RNA (sisRNA), a new class of non-coding RNA from the oocyte nucleus of *Xenopus tropicalis* // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 2550–2559.
<https://doi.org/10.1101/gad.202184.112>
104. Simeoni I., Gilchrist M.J., Garrett N. et al. Widespread transcription in an amphibian oocyte relates to its reprogramming activity on transplanted somatic nuclei // *Stem Cells Dev.* 2012. V. 21. P. 181–190.
<https://doi.org/10.1089/scd.2011.0162>
105. Malewska A., Olszańska B. Accumulation and localisation of maternal RNA in oocytes of Japanese quail // *Zygote*. 1999. V. 7. P. 51–59.
<https://doi.org/10.1017/s0967199499000398>
106. Bachvarova R., Davidson E.H., Allfrey V.G., Mirsky A.E. Activation of RNA synthesis associated with gastrulation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1966. V. 55. № 2. P. 358–365.
<https://doi.org/10.1073/pnas.55.2.358>
107. Talhouarne G.J.S., Gall J.G. Lariat intronic RNAs in the cytoplasm of *Xenopus tropicalis* oocytes // *RNA*. 2014. V. 20. P. 1476–1487.
<https://doi.org/10.1261/rna.045781.114>
108. Callan H.G., Lloyd L. Lampbrush chromosomes of crested newts *Triturus cristatus* (Laurenti) // *Philos. Transact. R. Soc. London*. 1960. V. 702. P. 135–219.
<https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rstb.1960.0007>
109. Gall J.G., Callan H.G. H3-uridine incorporation in lampbrush chromosomes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1962. V. 48. P. 562–570.
110. Snow M.H.L., Callan H.G. Evidence for a polarized movement of the lateral loops of newt lampbrush chromosomes during oogenesis // *J. Cell Sci.* 1969. V. 5. P. 1–25.
111. Mancino G., Barsacchi G. Le mappe dei cromosomi lampbrush di *Triturus* (Anfibi Urodeli). I. *Triturus alpestris apuanus* // *Caryologia*. 1965. V. 18. P. 637–665.
112. Mancino G., Barsacchi G. Le mappe dei cromosomi lampbrush di *Triturus* (Anfibi Urodeli). II. *Triturus helveticus helveticus* // *Riv. Biol. (Perugia)*. 1966. V. 59. P. 311–351.
113. Mancino G., Barsacchi G. The maps of the lampbrush chromosomes of *Triturus* (Amphibia, Urodela). III. *Triturus italicus* // *Ann. Embryol. Morphogen.* 1969. V. 2. P. 355–377.
114. Barsacchi G., Bussotti L., Mancino G. The maps of the lampbrush chromosomes of *Triturus* (Amphibia, Urodela). IV. *Triturus vulgaris meridionalis* // *Chromosoma*. 1970. V. 31. P. 255–279.
<https://doi.org/10.1007/BF00321223>
115. Callan H.G., Lloyd L. Working maps of the lampbrush chromosomes of Amphibia // *Handbook Genet.* N.Y.; London: Plenum, 1975. P. 57–77.
116. Solovej I., Gaginskaya E., Hutchison N., Macgregor H.C. Avian sex chromosomes in the lampbrush form: The ZW lampbrush bivalents from six species of bird // *Chromosome Res.* 1993. V. 1. P. 153–166.
<https://doi.org/10.1007/BF00710769>
117. Rodionov A.V., Lukina N.A., Galkina S.A. et al. Crossing over in chicken oogenesis: Cytological and chiasma-based genetic maps of chicken lampbrush chromosome 1 // *J. Hered.* 2002. V. 93. P. 125–129.
<https://doi.org/10.1093/jhered/93.2.125>
118. Вишнякова Н.М., Лакроа Ж.К., Родионов А.В. Цитогенетические карты хромосом-ламповых щеток тритонов рода *Pleurodeles*. Алгоритм идентификации ламповых щеток *Pleurodeles waltl* с использованием иммунохимического окрашивания маркерных петель поликлональной сывороткой против протеина RO52 // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 5. С. 614–623.
119. Penrad-Mobayed M., El Jamil A., Kanhoush R., Perrin C. Working map of the lampbrush chromosomes of *Xenopus tropicalis*: A new tool for cytogenetic analysis // *Dev. Dynamics*. 2009. V. 238. P. 1492–1501.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21930>
120. Дакс А.А., Дерюшева С.Е., Красикова А.В. и др. Хромосомы-ламповые щетки японского перепела *Coturnix coturnix japonica*: новая версия цитогенетических карт // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 10. С. 1335–1338.
121. Dedukh D., Mazepa G., Shabanov D. et al. Cytological maps of lampbrush chromosomes of European water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from the Eastern Ukraine // *BMC Genetics*. 2013. V. 14. P. 26.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-26>
122. Bintu B., Mateo L.J., Su J.-H. et al. Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells // *Science*. 2018. V. 362. P. eaau1783.
<https://doi.org/10.1126/science.aau1783>
123. Callan H.G. The organization of genetic units in chromosomes // *J. Cell Sci.* 1967. V. 2. P. 1–7.
124. Whitehouse H.L.K. A cycloid model for the chromosome // *J. Cell Sci.* 1967. V. 2. P. 9–22.
125. Callan H.G. Lampbrush chromosomes // *Proc. R. Soc. London Ser. B*. 1982. V. 214. P. 417–448.
126. Lee M.T., Bonneau A.R., Giraldez A.J. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition //

- Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2014. V. 30. P. 581–613.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013027>
127. *Gall J.G.* Problems of structure and function in the amphibian oocyte nucleus // Symp. Soc. Exp. Biol. 1955. V. 9. P. 358–370.
 128. *Davidson E.H., Hough B.R.* Genetic information in oocyte RNA // J. Mol. Biology. 1971. V. 56. № 3. P. 491–506.
 129. Дэвидсон Э. Действие генов в раннем развитии. М.: Мир, 1972. 344 с.
 130. *Davidson E.H., Crippa M., Kramer F.R., Mirsky A.E.* Genomic function during the lampbrush chromosome stage of amphibian oogenesis // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1966. V. 56. № 3. P. 856–863.
<https://doi.org/10.1073/pnas.56.3.856>
 131. *Thomas J.O., Glowacka S.K., Szer W.* Structure of complexes between a major protein of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and polyribonucleotides // J. Mol. Biol. 1983. V. 171. P. 439–455.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(83\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(83)90039-6)
 132. *Calzone F.J., Lee J.J., Le N. et al.* A long, nontranslatable poly(A) RNA stored in the egg of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // Genes Development. 1988. V. 2. № 3. P. 305–318.
<https://doi.org/10.1101/gad.2.3.305>
 133. *Davidson E.H.* Gene Activity in Early Development. 2nd ed. London; N.Y.: Acad. Press, 1976. 452 p.
 134. *Trofimova I., Krasikova A.* Transcription of highly repetitive tandemly organized DNA in amphibians and birds: A historical overview and modern concepts // RNA Biol. 2016. V. 13. P. 1246–1257.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1240142>
 135. Грузова М.Н. Ядро в оогенезе (структурно-функциональный аспект) // Современные проблемы оогенеза. М.: Наука, 1977. С. 51–98.
 136. *Нейфах А.А., Тимофеева М.Я.* Молекулярная биология процессов развития. М.: Наука, 1977. 311 с.
 137. *Кафиани К.А., Костомарова А.А.* Информационные макромолекулы в раннем развитии животных. М.: Наука, 1978. 334 с.
 138. *Gilbert F.* Developmental Biology. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. 695 p.
 139. *Koshel E., Galkina S., Saifitdinova A. et al.* Ribosomal RNA gene functioning in avian oogenesis // Cell Tissue Res. 2016. V. 366. P. 533–542.
<https://doi.org/10.1007/s00441-016-2444-4>
 140. *Varley J.M., Macgregor H.C., Erba H.P.* Satellite DNA is transcribed on lampbrush chromosomes // Nature. 1980. V. 283. P. 686–688.
<https://doi.org/10.1038/283686a0>
 141. *Varley J.M., Macgregor H.C., Nardi I. et al.* Transcription of highly repeated DNA sequences during the lampbrush stage in *Triturus cristatus carnifex* // Chromosoma. 1980. V. 80. P. 289–307.
<https://doi.org/10.1007/BF00292686>
 142. *Bromley S.E., Gall J.G.* Transcription of the histone loci on lampbrush chromosomes of the newt *Notophthalmus viridescens* // Chromosoma. 1987. V. 95. № 6. P. 396–402.
<https://doi.org/10.1007/BF00333990>
 143. *Cavalier-Smith T.* Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox // J. Cell Sci. 1978. V. 34. P. 247–278.
 144. *León P.E.* Function of lampbrush chromosomes: a hypothesis // J. Theor. Biol. 1975. V. 55. P. 481–490.
[https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(75\)80095-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(75)80095-6)
 145. *Morgan H.D., Santos F., Green K. et al.* Epigenetic reprogramming in mammals // Hum. Mol. Genet. 2005. V. 14. P. R47–R58.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi114>
 146. *Cantone I., Fisher A.G.* Epigenetic programming and reprogramming during development // Nat. Structural and Mol. Biology. 2013. V. 20. P. 282–289.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2489>
 147. *Jiang L., Zhang J., Wang J.-J. et al.* Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos // Cell. 2013. V. 153. P. 773–784.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.041>
 148. *Тихонов А.В., Ефимова О.А., Пендина А.А., Баранов В.С.* Эпигенетическое репрограммирование ДНК в гаметях и доимплантационных эмбрионах человека // Мед. генетика. 2017. Т. 16. № 5. С. 17–25.
 149. *Liu J.-L., Gall J.G.* Induction of human lampbrush chromosomes // Chromosome Res. 2012. V. 20. P. 971–978.
<https://doi.org/10.1007/s10577-012-9331-y>
 150. *Halley-Stott R.P., Pasque V., Astrand C. et al.* Mammalian nuclear transplantation to germinal vesicle stage *Xenopus* oocytes – a method for quantitative transcriptional reprogramming // Methods. 2010. V. 51. № 1. P. 56–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.035>
 151. *Miyamoto K., Nguyen K.T., Allen G.E. et al.* Chromatin accessibility impacts transcriptional reprogramming in oocytes // Cell Rep. 2018. V. 24. P. 304–311.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.030>
 152. *Saifitdinova A.* Breakthrough in understanding the phenomenon of lampbrush chromosomes / Eds Galkina S., Vishnevskaya M. 23rd Intern. Colloquium on Animal Cytogenetics and Genomics (23 ICACG) June 9–12, 2018, Saint-Petersburg, Russia // Comp. Cytogenet. 2018. V. 12. P. 299–360.
<https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v12i3.27748>
 153. *Сайфитдинова А.Ф., Галкина С.А., Кошель Е.И., Гагинская Е.Р.* Роль повторяющихся последовательностей в эволюции половых хромосом у птиц // Цитология. 2016. Т. 58. № 5. С. 393–398
 154. *Russell S.J., LaMarre J.* Transposons and the PIWI pathway: Genome defense in gametes and embryos // Reproduction. 2018. V. 156. P. R111–R124.
<https://doi.org/10.1530/REP-18-0218>

Biological Significance of Lampbrush Chromosomes: the Evolution of Approaches

A. F. Saifitdinova^{a, b, *}, S. A. Galkina^c, and E. R. Gaginskaya^c

^a*Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, 191186 Russia*

^b*International Centre for Reproductive Medicine, St. Petersburg, 197350 Russia*

^c*Saint Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

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

The progress in understanding of one of the most mysterious phenomena in developmental biology – transformation of chromosomes into so-called lampbrush chromosomes (LBCs) – has been reviewed. Eukaryotic chromosomes in the LBC phase feature a low degree of condensation and a discrete, recognizable structure consisting of numerous linearly arranged compact chromomeres from which lateral loops coated with transcripts are extended. LBC size exceeds that of the corresponding mitotic chromosomes at least 30 fold. All of the above makes LBCs a valuable model for analyzing chromosome and genome structure and functioning. The widespread occurrence of LBCs in the nature underlines their functional significance. However, despite numerous attempts to explain the importance and value of chromosome transformation in LBCs, researchers still have many open questions. This review critically examines all major hypotheses related to the biological significance of the LBCs.

Keywords: meiosis, diplotene, chromatin, transcription, genome organisation.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.21;616.127

РОЛЬ ГЕНОВ ФОСФОЛАМБАНА (*PLN*), ТРИАДИНА (*TRDN*)
И ДЖУНКТИНА (*ASPH*) В РАЗВИТИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ
ДИСФУНКЦИИ МИОКАРДА

© 2021 г. Э. Ф. Муслимова¹*, Т. Ю. Реброва¹, Д. С. Кондратьева¹, С. А. Афанасьев¹

¹Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634012 Россия

*e-mail: muslimovef@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.06.2020 г.

После доработки 30.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Обзор охватывает ряд исследований, посвященных оценке роли генов и белков фосфоламбана (*PLN*), триадины (*TRDN*), джунктина (*ASPH*) в развитии сократительной дисфункции миокарда. Представлены результаты, отражающие влияние изменений в структуре и экспрессии указанных генов на функционирование Ca^{2+} -транспортирующей системы саркоплазматического ретикулула кардиомиоцитов.

Ключевые слова: сердечная недостаточность, фосфоламбан, триадин, джунктин, экспрессия генов, полиморфные варианты.

DOI: 10.31857/S0016675821050064

Развитие хронической сердечной недостаточности (**ХСН**) у лиц с заболеваниями сердечно-сосудистой системы является серьезным фактором, ограничивающим качество жизни в трудоспособном возрасте и препятствующим активному долголетию. Признается, что существующих знаний недостаточно для понимания патогенеза сократительной дисфункции кардиомиоцитов и для разработки новых способов профилактики и лечения ХСН [1, 2]. С этой позиции изучение молекулярных механизмов регуляции внутриклеточного гомеостаза ионов кальция Ca^{2+} может выявить новые мишени для направленного терапевтического воздействия [3].

Хорошо известно, что состоятельность обмена Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме (**СР**) во время цикла сокращения–расслабления играет ключевую роль в реализации сократительной функции кардиомиоцитов. Одними из наиболее важных и изученных Ca^{2+} -транспортирующих белков **СР** являются Ca^{2+} -АТФаза **SERCA2a**, осуществляющая перенос ионов кальция из миоплазмы через мембрану **СР**, кальсеквестрин **CASQ2**, связывающий большую часть Ca^{2+} , поступающего в **СР** из миоплазмы во время диастолы, и рианодиновые рецепторы **RyR2**, освобождающие Ca^{2+} из **СР** во время систолы [4, 5]. Отмечено, что нарушение экспрессии и активности данных белков имеет серьезные последствия для нормальной работы

сердца, провоцирует развитие сердечной недостаточности и нарушений ритма сердца [6–8].

Однако нормальное функционирование Ca^{2+} -транспортирующей системы **СР** зависит и от других белков, которые регулируют работу **SERCA2a**, **CASQ2**, **RyR2** (рис. 1). К таким белкам, в первую очередь, относятся фосфоламбан, триадин и джунктин. Фосфоламбан – основной регулятор активности **SERCA2a**, а триадин и джунктин обеспечивают взаимодействие между **RyR2** и **CASQ2** [9, 10]. Следовательно, нарушения в функционировании и содержании фосфоламбана, триадины и джунктина также могут играть значимую роль в формировании ХСН. Кроме того, изменение любого компонента Ca^{2+} -транспортирующей системы в кардиомиоцитах может привести к нарушению процесса возбудимости, электрической дисфункции миокарда и аритмогенезу [11]. Одними из основных факторов, определяющих представленность в клетке тех или иных белков и влияющих на их функциональную состоятельность, являются уровень экспрессии соответствующих генов, а также их полиморфные варианты.

В данном обзоре мы постарались представить результаты различных исследований, посвященных полиморфным вариантам и особенностям экспрессии генов фосфоламбана, триадины и джунктина при сердечно-сосудистой патологии. Также в обзоре отражены данные работ по изуче-

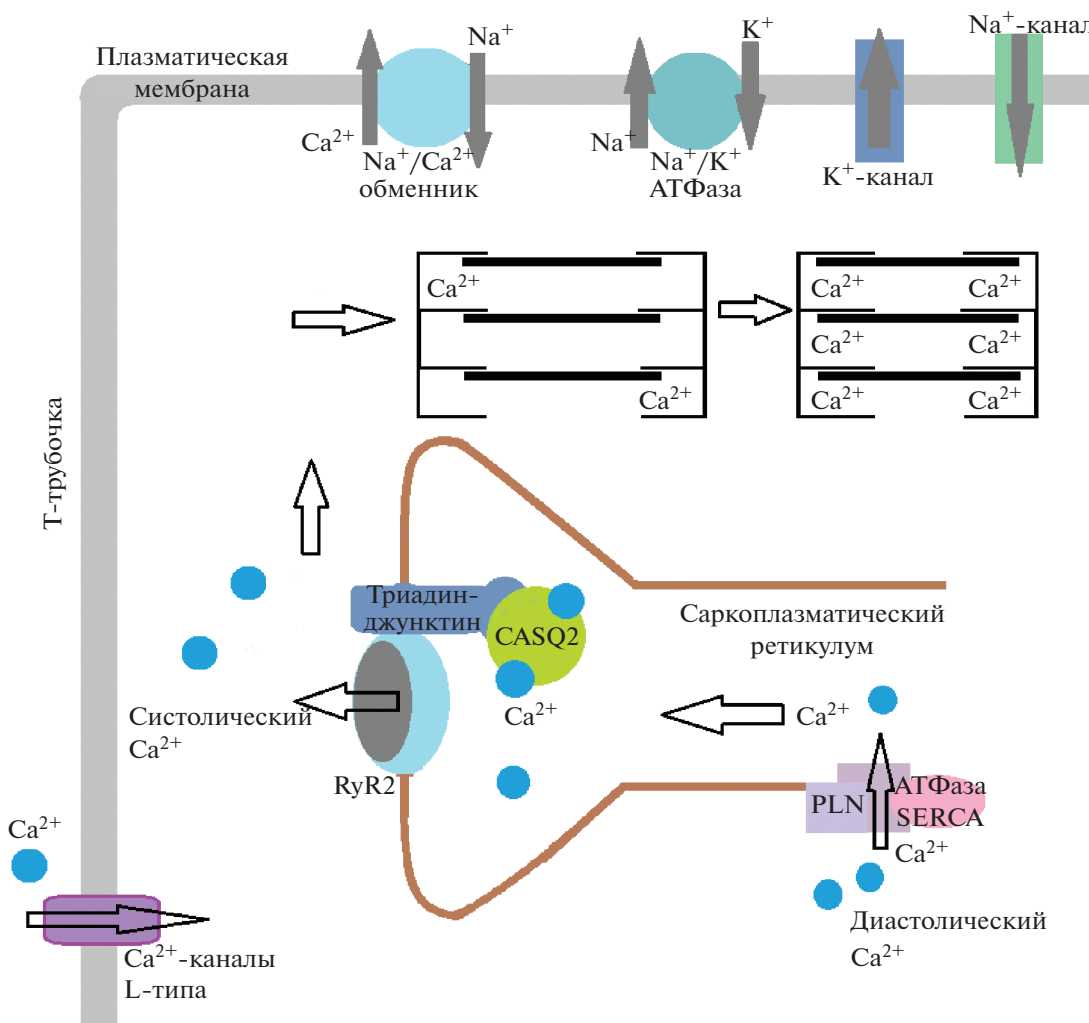


Рис. 1. Схема Ca²⁺-транспортирующей системы саркоплазматического ретикулума кардиомиоцитов с обозначением ключевых белков: Ca²⁺-АТФазы SERCA, фосфоламбана (PLN), риаинодиновых рецепторов RyR, кальсеквестрина (CASQ2), триадин (triadin), джунктина (junctin) (в соответствии с [4, 7, 9]).

нию влияния изменений в уровне экспрессии генов триадина, джунктина и фосфоламбана на работу Ca²⁺-транспортирующей системы саркоплазматического ретикулума кардиомиоцитов.

ФОСФОЛАМБАН

Фосфоламбан регулирует активность SERCA2a в кардиомиоцитах. Показано, что дефосфорилированная форма фосфоламбана, существующая в основном в виде мономера, связывает и ингибирует активность SERCA2a [12]. В этом состоянии у SERCA2a снижается сродство к ионам Ca²⁺. В результате нарушается удаление свободных ионов Ca²⁺ из цитозоля и становится невозможным полноценное расслабление, а затем и сокращение кардиомиоцитов и миокарда в целом [10, 13]. Активность белка критически регулируется фосфорилированием цАМФ-зависимой протеинкина-

зой и Ca²⁺-CaM-зависимой протеинкиназой в ответ на бета-адренергическую стимуляцию.

У человека белок фосфоламбан кодируется геном *PLN* (MIM 172405, ENSG00000198523), локализованным на хромосоме 6 (6q22.31). Структура гена включает два экзона и охватывает 13.42 тпн [14, 15]. Сравнительные исследования показали, что ген *PLN* человека структурно близок аналогичному гену кролика, крысы и мыши [16]. Однако значимость фосфоламбана в регулировании сократительной функции сердца имеет некоторые видовые различия. Так, мыши с дефицитом фосфоламбана за счет полного удаления кодирующей области гена фенотипически выглядели нормально, а их пульс и кровяное давление значимо не отличались от животных дикого типа. Более того, в условиях изолированной перфузии сердце мыши с дефицитом фосфоламбана характеризовалось даже повышенными значениями

сократительных показателей [17]. Однако в отличие от мышей для человека необходимо поддержание нормальной экспрессии гена *PLN*. Нарушение работы гена может приводить к летальной сердечной недостаточности [18].

Наглядным примером незаменимой роли фосфоламбана для функционирования Ca^{2+} -транспортирующей системы миокарда человека можно считать мутацию T116G в гене *PLN*, при которой отмечено снижение его экспрессии и отсутствие детектируемого белка в сердечной мышце. Следовательно, при такой мутации не было регулирующего воздействия фосфоламбана на *SERCA2a*. И если у гетерозиготных носителей наблюдалась гипертрофия без снижения сократительной способности, то у гомозиготных носителей уже в возрасте 16 и 27 лет развились дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) и сердечная недостаточность, требующая трансплантации сердца [18]. Кроме того, показано, что пациенты с тяжелой ХСН (III–IV функциональный класс) и фракцией выброса левого желудочка (ЛЖ) менее 35% характеризовались сниженной экспрессией гена *PLN* в ткани ЛЖ по сравнению с более легкими больными с нормальной функцией ЛЖ. При этом экспрессия гена, кодирующего *SERCA2a*, также была снижена, а экспрессия гена мозгового натрийуретического пептида *BNP*, маркера сердечной недостаточности, повышена [19].

Согласно базе данных OMIM (MIM 172405), для клинической практики большое значение имеют изменения в структуре гена *PLN*, так как они могут приводить к наследственным формам кардиомиопатии. Для таких пациентов характерны увеличенные размеры камеры и нарушения сократительной функции сердца уже в 20–30 лет. Ярким примером является упомянутая ранее замена T116G, при которой происходят изменение стоп-кодона и снижение экспрессии гена *PLN* [18]. Еще один пример – миссенс-мутация, обуславливающая замену аргинина на цистеин (R9C) в цитозольном домене фосфоламбана, которая приводила к аутосомно-доминантной ДКМП с сердечной недостаточностью. Средний возраст на момент смерти у пациентов составил 25–30 лет. Показано, что мутантный белок не ингибирует непосредственно *SERCA2a* [20]. Мутация R9C приводит к стабилизации пентамерной формы белка вследствие образования дисульфидного мостика между цитоплазматическими доменами отдельных субъединиц, следовательно нарушается диссоциация пентамера на мономеры [21].

Мутация R9C является примером нарушения структуры гена *PLN*, приводящего к патологии сердца за счет отсутствия ингибирующего влияния белка на *SERCA2a*. Другой вариант – делеция по аргинину R14Del в кодирующей области гена *PLN* – приводил к кардиомиопатии за счет необ-

ратимого хронического ингибирования *SERCA2a* измененным белком. В семье, в которой была обнаружена мутация, к среднему возрасту у гетерозиготных лиц (гомозигот по патологическому аллелю не выявлено) развились дилатация ЛЖ, сократительная дисфункция и эпизодические желудочковые аритмии. В эксперименте на трансгенных мышцах был показан сходный эффект избыточной экспрессии мутантного белка, приводящей к преждевременной смерти [22].

Еще один вариант – AF177763.1: g.203A>C в области промотора *PLN* – приводил к увеличению экспрессии гена. У гетерозиготных носителей этого варианта описана сердечная недостаточность в возрасте 18–44 лет с низкой фракцией выброса $22 \pm 9\%$ [23]. Известны и другие варианты гена *PLN* (табл. 1), связанные с развитием сердечной недостаточности и кардиомиопатий [24–26].

Проводились исследования, направленные на выявление связи вариаций числа копий ДНК (copy number variation, CNV) в регионе, затрагивающем ген *PLN*, с патологией сердца [26, 28]. Так, проводился анализ CNVs у детей с врожденными пороками сердца (ВПС) и была выявлена дупликация 6q22.31 (chr6: 118693553–119050523, 360 тпн). Однако вариант не был унаследован от родителей, и его клиническая значимость остается неизвестной [28]. В исследовании I. Mademont-Soler et al. [29] при скрининге CNVs выявили у двух пациентов с гипертрофической кардиомиопатией делеции всей кодирующей области гена *PLN*. Первый пациент имел делецию c.1-7587_159 + + 190del7936, включающую часть интрона и второго экзона гена. Вторая делеция *PLN* не была дополнительно охарактеризована. Эти варианты были классифицированы как патогенные [29].

Процесс поиска и более подробного изучения вариантов гена *PLN* не прекращается. Развитие технологий геной терапии позволяет надеяться на появление в будущем эффективных подходов к профилактике развития ХСН и лечению пациентов с нарушениями в структуре столь значимого для функционирования Ca^{2+} -транспортирующей системы гена.

ТРИАДИН И ДЖУНКТИН

Белки триадин и джунктин обеспечивают взаимодействие между RyR2 и CASQ2 в рамках единой Ca^{2+} -транспортирующей системы СР кардиомиоцитов [9, 30]. При этом установлено, что это взаимодействие является чувствительным к концентрации ионов Ca^{2+} в СР. В условиях низкой концентрации ионов кальция триадин и джунктин формируют прочный комплекс с белками CASQ2 и RyR2. В этом состоянии выброс Ca^{2+} из СР через рианодиновые рецепторы невозможен. Если же Ca^{2+} в СР слишком много, то этот

Таблица 1. Варианты гена фосфоламбана, связанные с развитием кардиомиопатии и сердечной недостаточности

Вариант	Эффект	Патология	Ссылки
rs111033560, T116G, L39X	Снижение экспрессии гена, белок не регулирует работу SERCA2a	Дилатационная кардиомиопатия	[18]
RCV000022714, -42C-G	Снижение экспрессии гена	Гипертрофическая кардиомиопатия	[25]
p.Glu2Ter, c.4G>T	Снижение экспрессии белка у гетерозигот, отсутствие у гомозиготы	Дилатационная кардиомиопатия	[26]
RCV000022715, -36A-C	Увеличение экспрессии гена	Сердечная недостаточность в молодом возрасте	[23]
RCV000022713, -77A-G	Увеличение экспрессии гена	Гипертрофическая кардиомиопатия	[24]
rs111033559, C25T, R9C	Белок не ингибирует SERCA2a	Дилатационная кардиомиопатия	[20, 21]
rs397516784, c.40_42del, R14Del	Белок необратимо ингибирует работу SERCA2a	Дилатационная кардиомиопатия	[22, 27]

комплекс менее прочен, благодаря чему RyR2 могут открыться и происходит выброс ионов в миоплазму.

Установлено, что у человека белок триадин кодируется геном *TRDN* (MIM 603283, ENSG00000186439), локализованным в 6-й (6q22.31) хромосоме [31]. Экзон 1 содержит инициирующий кодон, а экзон 41 содержит стоп-кодон и 1.3 тпн нетранслируемой последовательности. Для гена *TRDN* (420.612 тпн) характерен альтернативный сплайсинг, что обеспечивает синтез нескольких изоформ белка, по-разному представленных в скелетной и сердечной мышцах [32]. Для сердца специфична изоформа триадин CT1 (Cardiac Triadin), она же Trisk 32 (TRIadin Skeletal). Транскрипт (ENST00000546248.5) длиной в 1.179 пн содержит восемь экзонов [33].

Белок джунктин кодируется геном *ASPH* (MIM 600582, ENSG00000198363), который локализован в 8-й (8q12.3) хромосоме. Особенностью этого гена (214.037 тпн, 25 экзонов) является то, что кроме джунктина он определяет синтез белков аспаргат бета-гидроксилазы и junctate. Для синтеза *ASPH* задействованы экзоны 1, 3, 5 и 8–16, тогда как для джунктина используются экзоны 2, 3, 5 и 6, а для junctate – экзоны 2–5 и 8–16. Белки имеют значительные различия в своих С-концевых доменах, что определяет их особенности в функциональных свойствах. При этом джунктин экспрессируется только в сердечной и скелетных мышцах и является частью Ca²⁺-транспортующей системы CP, будучи связанным с кальсеквстрином [34, 35].

Триадин и джунктин обеспечивают взаимодействие между RyR2 и CASQ2, контролируя таким образом процесс выброса Ca²⁺ из CP в миоплазму при возбуждении кардиомиоцитов [9].

Следовательно есть основания считать, что уровень экспрессии как триадин, так и джунктина – один из критических факторов, влияющих на эффективность CP как компартмента, обеспечивающего внутриклеточные осцилляции ионов Ca²⁺ в ходе цикла сокращение–расслабление [36]. Сравнительное исследование трех трансгенных линий мышей показало, что сверхэкспрессия либо джунктина, либо триадин вызывает снижение экспрессии комплементарного белка и RyR2. В работе [37] были использованы линия мышей с повышенной экспрессией белка триадин, линия с повышенной экспрессией джунктина и линия с повышенной экспрессией обоих белков. Повышенная экспрессия триадин сопровождалась снижением содержания джунктина, и наоборот, однако добиться сочетанного выраженного увеличения содержания белков триадин и джунктина не удалось даже у мышей с увеличенной экспрессией обоих генов. У таких животных содержание белка триадин было в 2.9 раза выше, чем у мышей дикого типа, в то время как содержание белка джунктина оставалось на уровне дикого типа. Во всех трех линиях трансгенных мышей оказалась снижена экспрессия риадиноновых рецепторов, а вот экспрессия фосфоламбана и Serca2a не изменялась. Частота сердечных сокращений также была ниже во всех трех линиях мышей во время физической нагрузки и во время восстановления после тренировки по сравнению с мышами дикого типа. Но у мышей с повышенной экспрессией обоих белков стресс или физическая нагрузка были способны провоцировать желудочковую тахикардию при нормальных размерах ЛЖ и адекватной систолической функции сердца [37]. Повышенная в 5 раз экспрессия гена *Trdn 1*, сопровождавшаяся увеличенным содержанием белка триадин, оказалась сопряжена со снижен-

Таблица 2. Варианты гена *TRDN*, связанные с развитием сердечной недостаточности и аритмий

Вариант	Эффект	Патология	Ссылки
rs397515459, с.176C>G, T59R	Нарушение стабильности, быстрая деградация белка	КПЖТ	[43]
rs397515458, с.613C>T, Q205X	Преждевременный стоп-кодон, короткий транскрипт	КПЖТ	[43]
rs768049331, с.53_56del	Сдвиг рамки считывания, преждевременный стоп-кодон, потеря основной части белка	КПЖТ, синдром удлиненного интервала Q-T	[43, 46]
с.del 572_576	Преждевременный стоп-кодон	Синдром удлиненного интервала Q-T	[46]
с.613C>T, р.Q205*	Преждевременный стоп-кодон	КПЖТ	[44]
с.22 + 29A>G	Нарушение сплайсинга, более длинный транскрипт, преждевременный стоп-кодон	КПЖТ	[44]
rs361508, с.*62G>A	Предположительно изменение экспрессии гена или связи с другими белками	Риск внезапной сердечной смерти у пациентов с ХСН	[45]

Примечание. КПЖТ – катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия; ХСН – хроническая сердечная недостаточность.

ными более чем наполовину уровнями экспрессии белков рианодиновых рецепторов и джунктина без изменения экспрессии кальсеквестрина, фосфоламбана и *Serca2a* у трансгенных мышей. У таких животных описаны гипертрофия сердца, нарушение расслабления и ослабление сократимости при увеличении нагрузки давлением. При этом максимальное укорочение кардиомиоцитов со сверхэкспрессией *Trdn1* было снижено, к тому же трансгенным миоцитам потребовалось больше времени для расслабления, чем контрольным миоцитам [38]. При исследовании биологического материала человека также было обнаружено, что пациенты с ишемической и дилатационной кардиомиопатией отличались значительно повышенной экспрессией гена *TRDN* по сравнению с результатами, полученными при исследовании здорового миокарда лиц, погибших в результате травмы головы или субарахноидального кровоизлияния [39].

Однако у мышей с нокаутированным геном *Trdn1*, наряду с отсутствием белка триады, снижается и содержание белков *Casq2* и джунктина. При этом даже небольшое снижение содержания кальсеквестрина увеличивает утечку диастолического Ca^{2+} , что приводит к аритмиям [40]. Показано, что скорость высвобождения Ca^{2+} из СР была значительно снижена, а диастолический Ca^{2+} и содержание Ca^{2+} в СР были увеличены в миоцитах *Trdn*-/- по сравнению с *Trdn*+/+ миоцитами. Стоит отметить, что у мышей *Trdn*-/- структурный анализ указывает на гораздо более слабую ассоциацию *Casq2* с комплексом *RyR2*. Это может способствовать снижению скорости диффузии Ca^{2+} в просвете СР и высвобождения Ca^{2+} , на-

блюдаемого в миоцитах [41]. В миокарде мышей, дефицитных по гену джунктина, не выявлено каких-либо значительных изменений уровней *RyR*, триады или кальсеквестрина, а также в активности транспорта Ca^{2+} по сравнению с диким типом. Но в миоцитах *Asph*-/- амплитуда индуцированного кофеином высвобождения Ca^{2+} была увеличена, что указывает на более высокое содержание Ca^{2+} СР, а время высвобождения Ca^{2+} было сокращено. В то же время у трансгенных мышей со сверхэкспрессией джунктина выявлены противоположные эффекты, т.е. сниженная сократительная функция. Важно отметить, что животные *Asph*-/- быстро погибали из-за аритмий, вызванных спонтанным высвобождением ионов Ca^{2+} из СР [42].

Для гена *RYR2* и гена *CASQ2* описаны варианты, сопряженные с нарушениями ритма сердца [3]. В связи с этим вполне ожидаемо, что и для гена *TRDN* были обнаружены варианты, носительство которых оказалось ассоциировано с риском развития аритмий и внезапной сердечной смерти [36]. Так, выявлены варианты гена *TRDN* (табл. 2), являющиеся основой для развития катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардии (КПЖТ) [43, 44]. Так, один из этих вариантов – миссенс-мутация T59R (с.176C<G в экзоне 2) – влияет на стабильность белка, а другой – нонсенс-мутация Q205X (с.613C>T в экзоне 8) – приводит к преждевременной терминации синтеза белка. Также описана делеция (с.53_56delACAG) в экзоне 2 гена *TRDN*, вызвавшая сдвиг рамки считывания у двухлетнего пациента, умершего от остановки сердца из-за КПЖТ. Авторы, описавшие варианты гена *TRDN*, у этих же пациентов пред-

приняли анализ структуры гена *ASPH*, кодирующего джунктин, но каких-либо вариантов, связанных с тахикардией, им обнаружить не удалось [43]. Обнаружена ассоциация варианта rs361508 в 3'-нетранслируемой области гена *TRDN* с риском внезапной сердечной смерти у пациентов с ХСН. Предположительно данный вариант может приводить к снижению экспрессии гена или к изменению связи с другими белками-партнерами. В рамках этой же работы проводился анализ вариантов rs4507756, rs7003147, rs6759 гена *ASPH*, но для них не выявлено связи с внезапной сердечной смертью [45].

Таким образом, исследование генов Ca^{2+} -транспортирующей системы СР кардиомиоцитов может способствовать выявлению лиц с повышенным риском сердечной недостаточности и внезапной сердечной смерти. Однако особенности в экспрессии генов *TRDN* и *ASPH* и соответствующих белков у людей, в том числе в условиях патологии, по-прежнему остаются малоизученными. Исследования на биоптатах сердца человека могли бы прояснить, какие изменения в уровне экспрессии наиболее значимо влияют на функцию Ca^{2+} -транспортирующей системы СР и риск неблагоприятного течения ХСН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре представлены данные исследований, посвященных изучению генов, кодирующих фосфолампан, триадин и джунктин, в контексте сократительной функции миокарда и ее нарушений. В частности, показаны результаты, указывающие на значимую роль изменений структуры и экспрессии генов *PLN*, *TRDN* и *ASPH* в обеспечении нормальной работы Ca^{2+} -транспортирующей системы СР и развитии сердечной недостаточности и аритмий.

Обзор подготовлен в рамках НИР НИИ кардиологии АААА-А15-115123110026-3-0.

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. *Тепляков А.Т., Березикова Е.Н., Шилов С.Н. и др.* Оценка роли полиморфизма гена матриксной металлопротеиназы-3 в развитии хронической сердечной недостаточности // *Терапевтический архив*. 2015. Т. 87. № 4. С. 8–12. <https://doi.org/10.17116/terarkh20158748-12>
2. *Свеклина Т.С., Шустов С.Б., Козлов В.А. и др.* Протеомный анализ в диагностике хронической сердечной недостаточности с нормальной фракцией выброса // *Вестник Северо-Западного гос. мед. ун-та им. И.И. Мечникова*. 2019. Т. 11. № 2. С. 79–90. <https://doi.org/10.17816/mechnikov201911279-90>
3. *Реброва Т.Ю., Муслимова Э.Ф., Кондратьева Д.С. и др.* Роль полиморфных вариантов генов Ca^{2+} -АТФазы 2А (АТР2А2), рианодиновых рецепторов (RYR2) и кальсеквестрина (CASQ2) в развитии сердечной недостаточности // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 6. С. 597–602. <https://doi.org/10.7868/S0016675818060024>
4. *Faggioni M., Knollmann B.C.* Calsequestrin 2 and arrhythmias // *Am. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiol.* 2012. V. 302. № 6. P. H1250–H1260. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00779.2011>
5. *Dulhunty A.F., Beard N.A., Hanna A.D.* Regulation and dysregulation of cardiac ryanodine receptor (RyR2) open probability during diastole in health and disease // *J. Gen. Physiol.* 2012. V. 140. № 2. P. 87–92. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210862>
6. *Salazar-Cantú A., Pérez-Treviño P., Montalvo-Parra D. et al.* Role of SERCA and the sarcoplasmic reticulum calcium content on calcium waves propagation in rat ventricular myocytes // *Archiv. Biochem. Biophys.* 2016. V. 604. P. 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.05.018>
7. *Zarain-Herzberg A., García-Rivas G., Estrada-Avilés R.* Regulation of SERCA pumps expression in diabetes // *Cell Calcium*. 2014. V. 56. № 5. P. 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.09.005>
8. *Муслимова Э.Ф., Реброва Т.Ю., Кондратьева Д.С. и др.* Экспрессия гена Ca^{2+} -АТФазы SERCA2a (АТР2А2) и гена рианодиновых рецепторов (RYR2) у больных хронической сердечной недостаточностью // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 7. С. 819–825. <https://doi.org/10.31857/S0016675820070103>
9. *Bers D.M.* Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004. V. 37. № 2. P. 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.026>
10. *Asahi M., Otsu K., Nakayama H. et al.* Cardiac-specific overexpression of sarcolipin inhibits sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a) activity and impairs cardiac function in mice // *PNAS*. 2004. V. 101. № 25. P. 9199–9204. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402596101>
11. *Shemarova I.V., Nesterov V.P.* Evolution of Ca^{2+} -signaling mechanisms: the role of Ca^{2+} in regulation of specialized cardiomyocyte functions in chronic heart diseases // *J. Evol. Biochem. and Physiol.* 2014. V. 50. № 6. P. 420–427. <https://doi.org/10.1134/S0022093014060027>
12. *Park W.J., Oh J.G.* SERCA2a: a prime target for modulation of cardiac contractility during heart failure // *BMB Reports*. 2013. V. 46. № 5. P. 237–243. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.5.077>
13. *Yokoe S., Asahi M.* Phospholamban is downregulated by pVHL-mediated degradation through oxidative stress in failing heart // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 11. P. 2232. <https://doi.org/10.3390/ijms18112232>
14. *Fujii J., Zarain-Herzberg A., Willard H.F. et al.* Structure of the rabbit phospholamban gene, cloning of the human cDNA, and assignment of the gene to human

- chromosome 6 // *The J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 11669–11675.
15. *Otsu K., Fujii J., Periasamy M. et al.* Chromosome mapping of five human cardiac and skeletal muscle sarco-plasmic reticulum protein genes // *Genomics.* 1993. V. 17. № 2. P. 507–509.
<https://doi.org/10.1006/geno.1993.1357>
 16. *McTiernan C.F., Frye C.S., Lemster B.H. et al.* The human phospholamban gene: structure and expression // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999. V. 31. № 3. P. 679–692.
<https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0904>
 17. *Luo W., Grupp I.L., Harrer J. et al.* Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation // *Circ. Res.* 1994. V. 75. № 3. P. 401–409.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.75.3.401>
 18. *Haghighi K., Kolokathis F., Pater L. et al.* Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 111. № 6. P. 869–876.
<https://doi.org/10.1172/JCI17892>
 19. *Vanderheyden M., Mullens W., Delrue L. et al.* Myocardial gene expression in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy responders versus nonresponders // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008. V. 51. № 2. P. 129–136.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.07.087>
 20. *Schmitt J.P., Kamisago M., Asahi M. et al.* Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban // *Science.* 2003. V. 299. № 5611. P. 1410–1413.
<https://doi.org/10.1126/science.1081578>
 21. *Ha K.N., Masterson L.R., Hou Z. et al.* Lethal Arg9Cys phospholamban mutation hinders Ca²⁺-ATPase regulation and phosphorylation by protein kinase A // *PNAS.* 2011. V. 108. № 7. P. 2735–2740.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1013987108>
 22. *Haghighi K., Kolokathis F., Gramolini A.O. et al.* A mutation in the human phospholamban gene, deleting arginine 14, results in lethal, hereditary cardiomyopathy // *PNAS.* 2006. V. 103. № 5. P. 1388–1393.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0510519103>
 23. *Haghighi K., Chen G., Sato Y. et al.* A human phospholamban promoter polymorphism in dilated cardiomyopathy alters transcriptional regulation by glucocorticoids // *Hum. Mutat.* 2008. V. 29. № 5. P. 640–647.
<https://doi.org/10.1002/humu.20692>
 24. *Minamisawa S., Sato Y., Tatsuguchi Y. et al.* Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy // *Biochem. Biophys. Res. Communicat.* 2003. V. 304. № 1. P. 1–4.
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00526-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00526-6)
 25. *Medin M., Hermida-Prieto M., Monserrat L. et al.* Mutational screening of phospholamban gene in hypertrophic and idiopathic dilated cardiomyopathy and functional study of the PLN –42C>G mutation // *Eur. J. Heart Failure.* 2007. V. 9. № 1. P. 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2006.04.007>
 26. *Li Z., Chen P., Xu J. et al.* A PLN nonsense variant causes severe dilated cardiomyopathy in a novel autosomal recessive inheritance mode // *Intern. J. Cardiol.* 2019. V. 279. P. 122–125.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.12.075>
 27. *Karakikes I., Stillitano F., Nonnenmacher M. et al.* Correction of human phospholamban R14del mutation associated with cardiomyopathy using targeted nucleases and combination therapy // *Nat. Commun.* 2015. № 6. P. 6955.
<https://doi.org/10.1038/ncomms7955>
 28. *Wu X., Li R., Fu F. et al.* Chromosome microarray analysis in the investigation of children with congenital heart disease // *BMC Pediatr.* 2017. № 17. Article 117.
<https://doi.org/10.1186/s12887-017-0863-3>
 29. *Mademont-Soler I., Mates J., Yotti R. et al.* Additional value of screening for minor genes and copy number variants in hypertrophic cardiomyopathy // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 8. e0181465.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181465>
 30. *Chopra N., Knollmann B.C.* Triadin regulates cardiac muscle couplon structure and microdomain Ca²⁺ signalling: a path towards ventricular arrhythmias // *Cardiovascular Res.* 2013. V. 98. № 2. P. 187–191.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvt023>
 31. *Taske N.L., Eyre H.J., O'Brien R.O. et al.* Molecular cloning of the cDNA encoding human skeletal muscle triadin and its localisation to chromosome 6q22–6q23 // *FEBS J.* 1995. V. 233. № 1. P. 258–265.
https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.258_1.x
 32. *Thevenon D., Smida-Rezgui S., Chevessier F. et al.* Human skeletal muscle triadin: gene organization and cloning of the major isoform, Trisk 51 // *Biochem. Biophys. Res. Communicat.* 2003. V. 303. № 2. P. 669–675.
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00406-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00406-6)
 33. *Marty I., Faur'e J., Fourest-Lieuvin A. et al.* Triadin: what possible function 20 years later? // *J. Physiol.* 2009. V. 587. № 13. P. 3117–3121.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171892>
 34. *Treves S., Feriotto G., Moccagatta L. et al.* Molecular cloning, expression, functional characterization, chromosomal localization, and gene structure of junctate, a novel integral calcium binding protein of sarco(endo)plasmic reticulum membrane // *The J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 39555–39568.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M005473200>
 35. *Dinchuk J.E., Focht R.J., Kelley J.A. et al.* Absence of post-translational aspartyl β-hydroxylation of epidermal growth factor domains in mice leads to developmental defects and an increased incidence of intestinal neoplasia // *The J. Biol. Chem.* 2001. V. 277. P. 12970–12977.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110389200>
 36. *Wleklinski M.J., Kannankeril P.J., Knollmann B.C.* Molecular and tissue mechanisms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia // *The J. Physiology.* 2020. V. 598. № 14. P. 2817–2834. Online Ver.
<https://doi.org/10.1113/JP276757>
 37. *Kirchhof P., Klimas J., Fabritz L. et al.* Stress and high heart rate provoke ventricular tachycardia in mice expressing triadin // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007. V. 42. № 5. P. 962–971.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.02.012>

38. Kirchhefer U., Neumann J., Baba H.A. et al. Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1 // *The J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 4142–4149.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M006443200>
39. Zhang L., Salgado-Somoza A., Vausort M. et al. A heart-enriched antisense long non-coding RNA regulates the balance between cardiac and skeletal muscle triadin // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Mol. Cell Res.* 2018. V. 1865. № 2. P. 247–258.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.11.002>
40. Knollmann B.C. New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle // *The J. Physiology.* 2009. V. 587. № 13. P. 3081–3087.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172098>
41. Chopra N., Yang T., Asghari P. et al. Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca²⁺ release units, impaired excitation–contraction coupling, and cardiac arrhythmias // *PNAS.* 2009. V. 106. № 18. P. 7636–7641.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902919106>
42. Yuan Q., Fan G., Dong M. et al. Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity // *Circulation.* 2007. V. 115. P. 300–309.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.654699>
43. Roux-Buisson N., Cacheux M., Fourest-Lieuvain A. et al. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. № 12. P. 2759–2767.
<https://doi.org/10.1093/hmg/dds104>
44. Rooryck C., Kyndt F., Bozon D. et al. New family with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia linked to the triadin gene // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2015. V. 26. № 10. P. 1146–1150.
<https://doi.org/10.1111/jce.12763>
45. Liu Z., Liu X., Yu H. et al. Common variants in *TRDN* and *CALM1* are associated with risk of sudden cardiac death in chronic heart failure patients in chinese Han population // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 7. P. e0132459.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132459>
46. Altmann H.M., Tester D.J., Will M.L. et al. Homozygous/compound heterozygous triadin mutations associated with autosomal-recessive long-QT syndrome and pediatric sudden cardiac arrest. Elucidation of the triadin knockout syndrome // *Circulation.* 2015. V. 131. P. 2051–2060.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015397>

Role of Phospholamban (*PLN*), Triadin (*TRDN*), and Junctin (*ASPH*) Genes in the Development of Contractive Myocardial Dysfunction

E. F. Muslimova^{a,*}, T. Yu. Rebrova^a, D. S. Kondratieva^a, and S. A. Afanasiev^a

^aCardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634012 Russia

*e-mail: muslimovef@yandex.ru

The review covers studies evaluating the role of genes and proteins of phospholamban (*PLN*), triadin (*TRDN*), and junctin (*ASPH*) in the development of contractile myocardial dysfunction. The results reflecting the effect of changes in the structure and expression of these genes on the functioning of the Ca²⁺ transporting system of the cardiomyocytes' sarcoplasmic reticulum are presented.

Keywords: heart failure, phospholamban, triadin, junctin, gene expression, polymorphic variants.

ГЕНЫ-МОДИФИКАТОРЫ КАК ПРИЧИНА КЛИНИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА–КОНОВАЛОВА

© 2021 г. А. Е. Постригань¹, *, И. Ж. Жалсанова¹, Е. А. Фонова¹, Н. А. Скрябин¹

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

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

Поступила в редакцию 24.06.2020 г.

После доработки 20.10.2020 г.

Принята к публикации 03.11.2020 г.

Более чем за 100 лет после выделения болезни Вильсона–Коновалова в самостоятельную нозологическую форму этиология и патогенез этого заболевания изучены с разных точек зрения — как врачами-клиницистами, так и генетиками. Однако и по нынешний день появляются все новые сведения не только о мутациях в самом гене *ATP7B*, но и о модифицирующих факторах, влияющих на клиническую картину заболевания. С генетической точки зрения влияние генов-модификаторов неоспоримо, ведь за счет их действия (протективного или компенсирующего) можно объяснить клиническую вариабельность болезни Вильсона–Коновалова и возможно в дальнейшем использовать эти знания в рамках персонализированного лечения пациента. В настоящем обзоре рассматривается влияние различных модификаторов (внутри- и внегенных) на течение и проявление клинических форм болезни Вильсона–Коновалова. Авторами обозначены возможные механизмы возникновения более мягких или более тяжелых форм болезни Вильсона–Коновалова при участии определенных генов.

Ключевые слова: болезнь Вильсона–Коновалова, гены-модификаторы, *ATOX1*, *COMMD1*, *XIAP*, *HFE*.

DOI: 10.31857/S001667582105009X

Болезнь Вильсона–Коновалова (OMIM 277900, гепатолентикулярная дегенерация, гепатоцеребральная дистрофия, БВК) — тяжелое прогрессирующее наследственное заболевание, в основе которого лежит нарушение экскреции меди из организма, приводящее к избыточному накоплению этого микроэлемента в тканях и сочетанному поражению паренхиматозных органов (прежде всего печени) и головного мозга (преимущественно подкорковых ядер) [1]. Тип передачи этого заболевания аутосомно-рецессивный, проявляется у гомозиготных носителей мутации или у компаунд-гетерозигот [2].

Болезнь Вильсона–Коновалова относится к редким заболеваниям. Распространенность БВК по данным Orphanet составляет 1–9 случаев на 100000 населения (в среднем 1 на 25000), ежегодная частота выявления новых случаев — от 1 на 30000–100000 населения.

Носителем дефектного гена по ориентировочным оценкам является каждый 90–100-й человек (1%). Еще недавно считалось, что БВК крайне редкое наследственное заболевание, однако проведенные в Европе исследования 2013 г., основанные на анализе результатов секвенирования

2000 экзомов, показали, что гетерозиготное носительство патогенетически значимых мутаций значительно превышает прежние показатели. По последним данным в некоторых странах Европы расчетная частота болезни Вильсона–Коновалова равна 1 : 7000–1 : 9000, тогда как по клиническим данным распространение БВК в этих странах колеблется от 1.2 до 2 : 100000 [3, 4]. Для РФ информация о частоте встречаемости БВК отсутствует, что связано в первую очередь с этногеографическими особенностями страны. Однако уже появились отдельные исследования расчетной частоты (1 : 10000) носительства болезни Вильсона–Коновалова в Российской Федерации [5].

Причиной болезни Вильсона–Коновалова являются мутации в гене *ATP7B*, расположенном в длинном плече 13-й хромосомы (13q14.3). Ген кодирует металлопереносящую аденозинтрифосфатазу (АТФазу) Р-типа, которая транспортирует медь в желчь и включает ее в церулоплазмин (гликопротеин, содержит около 95% общего количества меди сыворотки крови человека) [6].

В норме всасывание меди в организме происходит в тонком кишечнике, с помощью транспортного белка СМТ1 (Copper Membrane Transporter 1)

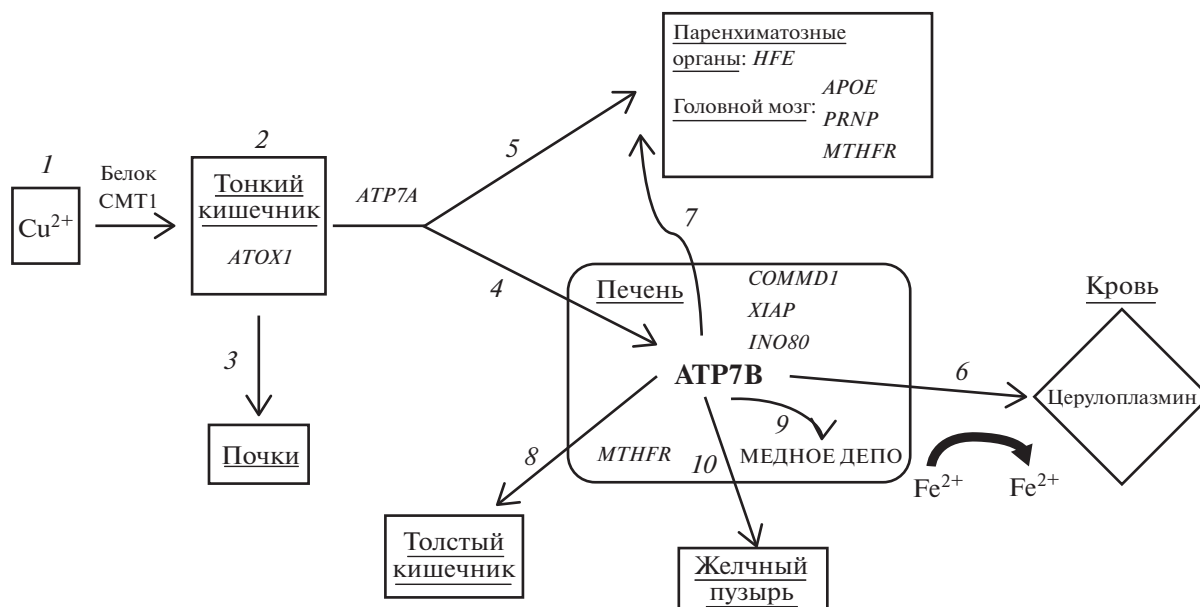


Рис. 1. Патогенез болезни Вильсона–Коновалова. 1 – поступление меди с пищей; 2 – всасывание меди в тонком кишечнике; 3 – выведение меди через почки; 4 – поступление меди в печень через воротную вену; 5 – снабжение медью других органов и систем; 6 – катализ окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} и выход меди в составе церулоплазмينا в кровь; 7 – поступление ионов меди из печени в другие органы; 8 – выведение меди через толстый кишечник; 9 – накопление меди в печени в “медном депо”; 10 – экстракция избытка меди в желчь.

(рис. 1). СМТ1 перемещает медь внутрь клеток, где часть ее связывается с металлотioneином, а оставшаяся – перемещается в комплекс Гольджи с помощью транспортного белка АТОХ1. В ответ на повышение концентрации меди в комплексе Гольджи активируется фермент АТР7А и высвобождает медь через воротную вену в печень. В гепатоцитах происходит связывание меди с церулоплазмином и высвобождение комплекса в кровь с помощью белка АТР7В. Кроме того, АТР7В осуществляет экстракцию избытка меди в желчь [7]. Мутации в гене АТР7В приводят к снижению функциональности фермента, в результате чего измененная АТФаза теряет способность транспортировать медь к церулоплазмину и лизосомам [6, 8]. Нарушение транспорта меди приводит к снижению экстракции меди в желчь, накоплению меди в печени, повреждению гепатоцитов и выходу свободной токсичной меди в кровь, с дальнейшим накоплением ее в других тканевых депо – глазах, суставах, почках, головном мозге [6, 8, 9]. Регуляция процесса экстракции меди из гепатоцитов в желчные каналцы осуществляется двумя генами – АТР7В и *COMMD1*. Избыток меди в печени влечет за собой разрушение клеток за счет окислительного стресса, что в свою очередь приводит к воспалению печени, ее фиброзу и как следствие – к циррозу. Экстракция меди в сыворотку крови осуществляется путем внедрения ионов меди в церулоплазмин (этот процесс также контролируется геном АТР7В). Церулоплазмин

является главным медьсодержащим белком в организме (в нем содержится до 95% меди в плазме крови); кроме того, он принимает участие в метаболизме железа, катализируя окисление Fe^{2+} в Fe^{3+} . Таким образом, метаболические пути меди и железа в организме тесно пересекаются и оказывают влияние друг на друга. Так, при нарушении абсорбции железа в результате мутации в гене *HFE* происходит его накопление в клетках паренхиматозных органов и усиление их окислительного повреждения. Также деструктивным процессам в клетках способствует повышение уровня гомоцистеина, так как гомоцистеин и медь обладают синергической цитотоксичностью. Уровень гомоцистеина зависит от активности метилфолатредуктазы, которая, в свою очередь, контролируется геном *MTHFR*. Однако интенсивность повреждения может быть снижена за счет протективного действия гена *INO80*, стабилизирующего ДНК клеток путем увеличения подвижности хроматина. Накопление меди в других органах вызывает нарушение их функции и снижение качества жизни пациентов. Так, накопление меди в головном мозге приводит к нейродегенеративным процессам, на степень выраженности которых оказывают влияние мутации не только в гене АТР7В, но и в ряде других генов; в частности, продукты генов *APOE* и *PRNP* оказывают влияние на процессы миелинизации нервных волокон в головном мозге, что напрямую воздействует на неврологическую компоненту БВК.

В настоящее время используется классификация, построенная на клинических признаках болезни, сочетания поражения печени и центральной нервной системы, предложенная J. Walsh (1983): бессимптомная форма, печеночная форма, церебральная форма, смешанная форма болезни Вильсона—Коновалова.

Кроме того, согласно классификации Н.В. Коновалова (1960), в зависимости от вовлечения в патологический процесс печени и центральной нервной системы и характера экстрапирамидной симптоматики распознают пять форм болезни Вильсона—Коновалова: брюшная (абдоминальная), ригидно-аритмогиперкинетическая, дрожательно-ригидная, дрожательная и экстрапирамидно-корковая.

При постановке диагноза выраженный клинический полиморфизм признаков болезни Вильсона—Коновалова и их экспрессивность могут затруднять работу врача.

Болезнь Вильсона—Коновалова обладает широким спектром клинических проявлений, зависящих и от конкретного типа мутаций. Большинство миссенс-мутаций приводят к снижению активности фермента (в результате потери целостности белка, мисфолдинга, нарушения взаимодействия между белками, нарушения фосфорилирования, изменения способности связывать АТФ) [10]. Мутации со сдвигом рамки считывания (фрэймшифт-мутации), нонсенс-мутации, инсерции/делеции и мутации сайта сплайсинга приводят к прерыванию (нарушению) синтеза белка АТР7В, что ведет к ранней манифестации заболевания, более низкому уровню церулоплазмينا, фульминантной печеночной недостаточности и другим тяжелым клиническим проявлениям БВК, по сравнению с миссенс-мутациями [11, 12].

Интерес к этиологической причине болезни Вильсона—Коновалова не угасает и по сей день. Ряд исследователей из Университета Альберты даже создали открытую базу данных по болезни Вильсона—Коновалова, которая представляет собой сборник научных публикаций и отдельных материалов по исследованиям патологических вариантов мутаций в гене *АТР7В* [<http://www.wilsonsdisease.med.ualberta.ca/>]. Однако данных о специфических мутациях для российской популяции там крайне мало и, кроме того, данная база данных не пополнялась с 2010 г. В настоящее время в гене *АТР7В* идентифицировано более 800 различных мутаций, а нарушение обмена меди может происходить как на уровне АТФазы, так и на любом уровне каскада металлошаперонов, доставляющих медь АТФазе. Кроме того, спектр мутаций гена *АТР7В* имеет свои особенности проявления в различных популяциях [8, 13].

Наиболее распространена у европейских пациентов мутация Н1069Q (доля мутации среди

всех мутантных аллелей составляет 30–73% у пациентов с БВК в европеоидной популяции) [14]. В России замена Н1069Q также является наиболее частой среди прочих мутантных аллелей в гене *АТР7В* (30–50%), при этом частота гетерозиготного носительства составляет 1 : 130 [15]. Другие часто встречаемые мутации в российской популяции — G126R и DelC3402 [8, 16, 17].

Мутация Н1069Q представляет собой точечную замену С>А в положении 3027, в результате которой происходит замена гистидина на глутамин в высококонсервативном мотиве SENPL белка АТР7В [18]. Это приводит к изменению пространственного расположения АТФ-связывающего сайта и нарушению фосфорилирования Р-домена и, как следствие, уменьшению способности фермента связывать АТФ. Другая мутация в мотиве SENPL, E1064K, ведет к полной потере связывания АТФ. У пациентов с этой мутацией БВК протекает особенно тяжело и сопровождается печеночной фульминантной недостаточностью [14, 19].

Помимо мутаций, инактивирующих АТР7В, существует относительно большое количество мутантных вариантов (G626A, D765N, M769V, I857T, A874V и др.), способных связывать и гидролизовать АТФ и обладающих частичной активностью транспорта меди. Этим объясняется фенотипическая гетерогенность и существование легких форм заболевания [10, 20]. Такие мутации могут приводить к более позднему началу заболевания и более легкому течению болезни. Следовательно, для лучшего понимания корреляции генотип—фенотип БВК, и более точного прогноза течения болезни у конкретного пациента, может потребоваться детальная характеристика каждого мутантного варианта АТР7В. Хотя мутации, расположенные в одном и том же домене, могут иметь сходные свойства, локализация только в определенном домене не является предиктором свойств мутации и степени тяжести болезни [10].

Вариабельность клинических проявлений БВК зависит, помимо прочего, от пола пациента [14]. Механизмом формирования этих различий считают влияние половых гормонов и метаболических процессов, особенно связанных с метаболизмом железа [21]. По результатам исследований 627 пациентов с болезнью Вильсона—Коновалова было выявлено, что неврологическая форма более присуща мужчинам, чем женщинам. При церебральной форме болезнь Вильсона—Коновалова у мужчин проявлялась в среднем на 2 года раньше, чем у женщин. А абдоминальная форма болезни Вильсона—Коновалова, как и различные гепатопатологии, чаще наблюдались у женщин [22]. Как полагают авторы исследования, мозг мужчин более чувствителен к накоплению меди, что может быть обусловлено разным уровнем по-

ловых гормонов. Одним из механизмов возникновения такого гендерного неравенства называют защитное действие эстрогенов [14]. Возможно, что у женщин с БВК эстрогены могут также защищать нейроны от накопления меди и окислительного стресса, который является следствием этого накопления, и таким образом ведут к уменьшению частоты проявления неврологических симптомов. Поэтому неврологические симптомы у мужчин проявляются раньше, чем у женщин, ведь у мужчин нет протективного действия эстрогенов [22]. Фактически влияние различий, связанных с полом, приводит к своеобразному модифицирующему эффекту на тяжесть и течение клинической картины БВК.

Влияние на клиническую картину болезни Вильсона—Коновалова, помимо мутаций в гене *ATP7B*, оказывают и определенные гены-модификаторы, являющиеся причиной формирования разных фенотипов у пациентов с идентичными генотипами [14, 23]. Гены-модификаторы — это группа генов, способных как утяжелять, так и облегчать фенотипические проявления генов, являющихся причиной заболевания. Генами-модификаторами при болезни Вильсона—Коновалова на сегодняшний день считаются *ATP7A* и *APOE*, в то же время существует ряд генов, функциональные характеристики белковых продуктов которых также указывают на возможность их включения в этот ряд (*HFE*, *ATOX1*, *COMMD1*, *XIAP*, *PRNP*, *MTHFR*, *ESD*, *INO80*).

ATP7A

Клетки человека экспрессируют две гомологичные Cu-АТФазы: *ATP7A* и *ATP7B*. Эти транспортеры используют энергию гидролиза АТФ для транспортировки меди из цитозоля через клеточные мембраны, тем самым снижая концентрацию цитозольной меди. Хотя и *ATP7A*, и *ATP7B* отвечают за экспорт меди, происходит он в разных типах клеток. При мутации в гене *ATP7A* клинические признаки являются последствиями нарушений медьзависимых ферментов. Дефицит меди вызывается дефектным *ATP7A*-опосредованным транспортом меди из кишечника в кровотоки. Ген *ATP7A* экспрессируется почти во всех типах клеток и тканей, но уровни его экспрессии различаются в клетках и тканях и зависят от возраста [24], в то время как ген *ATP7B* преимущественно экспрессируется в печени взрослого человека [25]. Поэтому органом-мишенью при болезни Вильсона—Коновалова является печень — медь накапливается в печени в результате нарушенного *ATP7B*-обусловленного экспорта меди из гепатоцитов.

Мутации в гене *ATP7A* приводят к развитию болезни Менкеса — тяжелому X-сцепленному заболеванию с дефицитом меди, которое обычно приводит к смерти больного в возрасте до 3 лет.

Для этой болезни существует гендерное неравенство: преимущественно поражаются лица мужского пола, что объясняется гемизиготностью X-хромосомы у мужчин. В редких описанных случаях болезни Менкеса у женщин фенотипическое проявление болезни связывают с асимметричной инактивацией X-хромосомы или же с наличием транслокационной формы заболевания [26, 27]. Так, описан единственный случай выявленной сбалансированной транслокации *de novo* 46,X,t(X;13)(q13.3;q14.3), при которой данная мутация затронула *ATP7A* (Xq13.3) и *ATP7B* (13q14.3) [28]. При этой мутации у женщины патологический фенотип соответствовал классической форме болезни Менкеса.

Поскольку ген *ATP7A* экспрессируется почти во всех клетках, патологический фенотип при поражении и гена *ATP7A* и гена *ATP7B* будет формироваться как при болезни Менкеса, и заболевание будет протекать значительно тяжелее, чем при классической болезни Вильсона—Коновалова. В литературе не описано случаев живорожденных детей с одновременной мутацией в генах *ATP7A* и *ATP7B*; вероятнее всего, такая патология несовместима с жизнью уже на стадии внутриутробного развития. К тому же недавние исследования показали, что *ATP7A* и *ATP7B* имеют различные и непересекающиеся функции в нейронах, экспрессирующих дофамин-β-гидроксилазу [29]. Соответственно *ATP7A* не обладает защитным или компенсаторным действием на метаболизм меди при БВК, а если на фоне мутации в гене *ATP7B* существуют мутации в гене *ATP7A* — это только усугубляет течение БВК.

HFE

Описаны редкие случаи сочетания болезни Вильсона—Коновалова с другими наследственными патологиями, в частности с наследственным гемохроматозом (НГХ). У пациентов с БВК были обнаружены, помимо мутации в гене *ATP7B*, также мутации в гене *HFE*, являющиеся причиной возникновения НГХ. Ген *HFE* (Homeostatic iron regulator) расположен в коротком плече шестой хромосомы и состоит из семи экзонов. Ген кодирует мембранный белок, подобный белкам главного комплекса гистосовместимости класса I и ассоциированный с бета2-микроглобулином (бета2М). Функция белка связана с регуляцией абсорбции железа путем взаимодействия трансферрина с рецептором [30]. Хотя вероятность возникновения мутаций одновременно в генах *ATP7B* и *HFE* невысока, описанные в литературе клинические случаи демонстрируют более раннее клиническое проявление заболевания Вильсона—Коновалова, чем при наличии только мутации в гене *ATP7B* [31–33]. В результате мутации происходит избыточное накопление железа в виде гемосидерина в

клетках паренхиматозных органов, суставах и сердце, вследствие нарушения процессов всасывания железа в тонком кишечнике. Железо в свободной форме, как и медь, обладает токсическими свойствами, избыточное накопление этих металлов в организме приводит к образованию свободных радикалов и возникновению окислительного стресса, что в итоге приводит к разрушению клеток и нарушению функций жизненно важных органов. Кроме того, пути метаболизма меди и железа тесно пересекаются как в норме, так и при патологических состояниях [34]. Таким образом, сочетание двух связанных с нарушениями обмена металлов наследственных патологий приводит к более тяжелому поражению органов и течению заболевания в целом; следовательно, наличие мутации в гене *HFE* может рассматриваться как модифицирующий фактор болезни Вильсона–Коновалова.

АТОХ1

Перенос меди из акцепторных белков обеспечивается уникальным классом белков, называемых медными шаперонами (такие как *АТОХ1* — Antioxidant 1 copper chaperone) [35], которые впервые были идентифицированы в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Ген *АТОХ1* (*НАН1*, *АТХ1*) расположен на длинном плече хромосомы 5 (5q33.1), кодирует цитозольный белок массой 8 кДа и содержит четыре экзона. *АТОХ1* содержит одну N-концевую копию консервативного связывающего медь МХСХХС-мотива, расположенного между первым бета-листом и альфа-спиралью, доставляет этот металл в транспортирующую медь АТФазу типа Р-ССС2 в просвет транс-отдела сети Гольджи для последующей транспортировки по секреторному пути и включения в гомолог церулоплазмينا — FET3. С помощью того же мотива *АТОХ1*, помимо меди, связывает Hg(II), Cd(II), Ag(I) и цисплатин, но его физиологическая роль, если таковая имеется, пока не известна [36].

В клетках млекопитающих было показано, что белок *АТОХ1* доставляет медь к транспортирующим медь АТФазами — белкам болезни Менкеса и болезни Вильсона–Коновалова (*АТР7А* и *АТР7В* соответственно). Затем эти белки используют энергию гидролиза АТФ для того, чтобы либо перенести металл в просвет транс-отдела сети Гольджи для включения в медьзависимые ферменты, либо для вывода избытка меди из клетки. Выключение гена *Atox1* у мышей приводит к внутриклеточному накоплению меди и снижению активности секреторируемых медьзависимых ферментов, таких как тирозиназа, что подтверждает предполагаемую роль *АТОХ1* в качестве донора металла для транспортирующих медь АТФаз [37].

Существуют экспериментальные данные, показывающие наличие функциональной связи че-

ловеческого шаперона *АТОХ1* и транспортирующих медь АТФаз. Было показано, что некоторые мутации, обнаруженные у пациентов с БВК, нарушают способность *АТР7В* взаимодействовать с *АТОХ1*, это позволяет предположить, что данное взаимодействие необходимо для нормального гомеостаза меди [38].

В недавнем исследовании 50 индийских пациентов с БВК N. Kumari с соавт. [40] выявили четыре новые мутации в гене *АТОХ1* (причем одна из них — с.40G>A, р.(G14S)), которые были идентифицированы в гетерозиготном состоянии у двух пациентов. Интересно, что при сравнении двух пациентов с аналогичными мутациями в гене *АТР7В*, но различающихся по статусу носительства мутации р.(G14S) в гене *АТОХ1*, были выявлены существенные клинические различия: показано, что замена р.(G14S) ассоциирована с ранним возрастом начала заболевания, сниженным уровнем церулоплазмينا в сыворотке и изменениями в печени и мозге у пациента с БВК в отличие от другого пациента, не имеющего мутаций в гене *АТОХ1* [40]. В то же время исследование данных секвенирования гена *АТОХ1* не выявило существенной связи или влияния на клиническое течение БВК [39].

Возможно, дальнейшие экспериментальные исследования на расширенных выборках, а также в различных популяциях дадут более четкую картину модификационной роли гена *АТОХ1* в патогенезе БВК.

COMMD1/XIAP

Одним из генов-кандидатов, которые могут играть роль гена-модификатора, является регулятор гомеостаза меди *COMMD1* (copper metabolism domain containing 1, ранее известный как *MURR1*). Ген *COMMD1* расположен на 2-й хромосоме (2p13), содержит восемь экзонов и кодирует растворимый белок массой 21 кДа, являющийся цитозольным белком и связывающий липиды с другими белками. *COMMD1* — недавно идентифицированный фактор, который в основном участвует в двух процессах: регуляции фактора транскрипции NF-κB и контроле метаболизма меди. Впервые ген был упомянут в исследовании собак породы бедлингтон-терьеров, у которых отмечался токсикоз с симптомами высокого накопления меди в печени, что приводит к гепатиту и циррозу и возможной смерти, дальнейшие исследования выявили основную причину заболевания — делецию 2-го экзона гена *Commd1*, которая приводит к деградации белка [41, 42]. *COMMD1* взаимодействует с N-терминальным доменом *АТР7В*, он может образовывать олигомерные гетерокомплексы с другими клеточными белками в дополнение к белку *АТР7В* [43].

Ген *XIAP* кодирует белок XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), относящийся к семейству белков – ингибиторов апоптоза (IAP) и обладающий выраженными антиапоптотическими свойствами [44–46]. Регуляция апоптоза осуществляется путем ингибирования специфических каспаз – цистеиновых протеаз [47]. Было показано, что XIAP, помимо основных своих функций, вовлечен в процесс регуляции гомеостаза меди через отрицательную регуляцию уровня белка COMMD1, по не связанному с апоптозом пути. Белок XIAP работает как регулятор уровня COMMD1, путем образования на нем полиубиквитиновых цепей, способствующих деградации белка COMMD1. Было показано, что повышение уровня экспрессии XIAP приводило к накоплению меди в клеточных моделях, а дефицит XIAP – к снижению содержания меди в тканях печени [48].

К.Н. Weiss с соавт. [49] было проведено исследование групп пациентов с БВК и хотя бы одной подтвержденной мутацией в гене *ATP7B*: с пониженным и нормальным уровнем церулоплазмينا, ни в одной из групп мутации в кодирующей последовательности гена *COMMD1* обнаружено не было. Мутации в других частях гена *COMMD1* не были проанализированы, но могли повлиять на экспрессию гена и таким образом повлиять на фенотип. По мнению авторов, выявление того, что ген *COMMD1* не изменяется у пациентов с болезнью Вильсона–Коновалова с нормальным уровнем церулоплазмينا в крови, необходимо оценить в более широком клиническом исследовании [49].

Таким образом, несмотря на немаловажную роль в регуляции метаболизма меди в организме, доказательств прямого влияния генов *COMMD1* и *XIAP* на клиническое течение БВК получено не было.

APOE

Один из известных генов-модификаторов – ген *APOE*, расположенный на хромосоме 19. Аполипопротеин Е (АпоЕ), кодируемый данным геном, вовлечен в метаболизм липидов в организме. Он является лигандом для нескольких типов рецепторов, в том числе для рецептора липопротеинов низкой плотности, который необходим для нормального катаболизма богатых триглицеридами липопротеинов. К основным функциям АпоЕ относится транспорт липидов, жирорастворимых липидов и холестерина через лимфатическую систему в кровь, что обеспечивает метаболизм холестерина. В крови АпоЕ регулирует всасывание остатков хиломикронных и остатков ЛПОНП печенью. В ЦНС он участвует в транспорте холестерина и других липидов к нейронам, обеспечивает их поглощение клетками. АпоЕ осуществляет доставку холестерина к месту миелинизации, что

обуславливает его необходимость для поддержания миелиновой и нейрональной мембран как в центральной, так и в периферической нервной системе [50]. Существуют три основные изоформы белка – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ и $\epsilon 4$, встречающиеся в популяциях с частотами 6.4, 78.3 и 14.5% соответственно [51]. Структурные отличия в изоформах АпоЕ играют важную роль в развитии сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и инфекционных заболеваний [52, 53]. Основным источником синтеза этого белка – печень (до 75%), вторым наиболее распространенным местом синтеза является мозг [54]. Макрофаги и другие типы клеток также синтезируют АпоЕ [52–54]. Ген *APOE* человека локализуется в хромосоме 19 и состоит из четырех экзонов, трех интронов, 3597 пар нуклеотидов, характеризуется высоким уровнем полиморфизма. Было показано, что данный ген оказывает влияние на клиническое проявление болезни Вильсона–Коновалова, в частности у пациентов с генотипом $\epsilon 3/\epsilon 3$ была отмечена манифестация болезни в более позднем возрасте [14, 55, 56].

В то же время другой группой исследователей [14, 22] была обнаружена связь аллельного варианта $\epsilon 4$ гена *APOE* с более ранним началом болезни Вильсона–Коновалова у женщин. Наиболее выражено влияние данного аллеля у женщин, являющихся носительницами мутации р.Н1069G в гене *ATP7B*. Согласно полученным авторами данным, у этих пациенток болезнь Вильсона–Коновалова проявлялась на 6 лет раньше, чем у женщин с генотипом $\epsilon 3/\epsilon 3$ [14, 22].

V. Medici и К.Н. Weiss [18] связывают аллель $\epsilon 4$ гена *APOE* с повышенной уязвимостью головного мозга в процессе развития болезни, тогда как генотип *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 3$ обеспечивает умеренный нейропротективный эффект.

PRNP

Ген *PRNP* находится на коротком плече 20-й хромосомы в локусе 20p13 и содержит два экзона. Ген кодирует прионный белок (PrPC) молекулярной массой 27–30 кДа. PrPC при помощи гликозилфосфатидилинозитола закреплен на внешней стороне клеточной мембраны и синтезируется в основном в клетках нервной системы и лимфоэпителиальной ткани [14]. Его функция до конца не изучена, однако известно об участии PrPC в формировании миелиновой оболочки нервных волокон и процессах связывания низкоаффинных ионов меди, особенно в центральной нервной системе, где экспрессия белка наиболее высока [18, 57–59]. Было установлено, что взаимодействие меди с прионным белком может иметь нейропротективный эффект [60]. В другом исследовании была показана ассоциация замены гена *PRNP* в кодоне 129 (*M129V*) с началом и последующим развитием болезни Вильсона–Коновалова [61]. Согласно полу-

ченными исследователями данным, распространенность генотипа *M129V* у пациентов с БВК была сходной с контрольной популяционной выборкой. Также было показано влияние полиморфных вариантов *PRNP* на клиническую картину БВК: у пациентов с вариантом *PRNP* 129M, приводящим к гомозиготному метионину, возраст начала болезни был примерно на 5 лет выше, с возникновением неврологических симптомов в среднем через 7 лет после начала болезни, по сравнению с носителями гетерозиготного варианта.

В то же время оказывать влияние на фенотип при болезни Вильсона–Коновалова могут и прионные болезни (ОММ #123400, #137440, #600072). Прионные болезни возникают, как правило, спорадически, либо в очень редких случаях в результате инфекции, но также могут возникать (в 5–15% случаев) в связи с фенотипически доминантными мутациями в гене *PRNP*. Прионные болезни, так же как и болезнь Вильсона–Коновалова, приводят к прогрессирующей необратимой нейродегенерации с когнитивными и психиатрическими проявлениями. N. Forbes с соавт. [62] был описан клинический случай пациента с быстро прогрессирующими неврологическими симптомами БВК. У данного пациента были обнаружены несинонимичные варианты кодирующей последовательности в генах *ATP7B* и *PRNP*. Авторы считают, что именно синергетическое взаимодействие между наблюдаемыми вариантами *ATP7B* и *PRNP*, опосредованное эффектами кодируемых ими белков на метаболизм меди, было причиной ухудшения течения болезни пациента [62].

MTHFR

Еще одним геном, для которого показано влияние на возраст манифестации БВК, является ген *MTHFR* (хромосомная локализация 1p36.3), который состоит из 20200 пар нуклеотидов и содержит 11 экзонов. Этот ген кодирует метилентетрагидрофолатредуктазу (*MTHFR*) – внутриклеточный фермент, играющий роль в метаболизме гомоцистеина и фолата. Фермент катализирует восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат. Последний является активной формой фолиевой кислоты, необходимой для образования метионина из гомоцистеина и далее – S-аденозилметионина, играющего ключевую роль в процессе метилирования ДНК.

Наиболее значимые с точки зрения патогенеза болезни Вильсона–Коновалова полиморфные варианты гена *MTHFR* – С677Т и А1298С. Данные замены приводят к снижению активности метилентетрагидрофолатредуктазы и, как следствие, развитию гипергомоцистеинемии. Вариант С677Т гена *MTHFR* представляет собой замену цитозина на тимидин в позиции 677, что, в свою очередь, приводит к замене аланина на ва-

лин в апобелке этого фермента. А1298С – полиморфизм гена *MTHFR* с заменой аденина на цитозин в позиции 1298, не сопровождающийся повышением уровня гомоцистеина в крови, однако сочетание гетерозиготного носительства аллелей 677Т и 1298С сопровождается повышением уровня гомоцистеина в плазме и приводит к снижению активности фермента *MTHFR*. Установлено, что повышение уровня гомоцистеина влияет на гомеостаз меди в организме и внутриклеточную токсичность ионов меди [63, 64]. Кроме того, значительное повышение концентрации гомоцистеина в клетках приводит к сильному окислительному стрессу и клеточной гибели [65].

G. Gromadzka и соавт. [66] предположили, что гепатотоксические эффекты при болезни Вильсона–Коновалова могут быть более выраженными, чем при патологиях печени другой этиологии, так как гомоцистеин и медь проявляют сильные синергические цитотоксические эффекты. Кроме того, этой же группой исследователей была установлена связь полиморфных вариантов гена *MTHFR* с возрастом манифестации БВК. У носителей гомозиготного варианта 1298С начало заболевания фиксировалось примерно на 6 лет раньше, чем у пациентов с генотипом 677СС/1298АА. На основании полученных данных авторы предполагают, что гомоцистеин может также быть вовлечен в нейродегенеративные процессы при БВК [66].

ESD и *INO80*

Помимо вышеописанных генов, влияние которых на фенотип БВК достаточно изучено и однозначно, существуют гены, о которых известно только то, что они модифицируют течение БВК, но информация о механизмах их влияния либо отсутствует, либо не является исчерпывающей. К таким малоизученным, но, несомненно, важным для патогенеза БВК генам относятся *ESD* и *INO80*.

Недавние исследования показали, что при редких аллельных вариантах *ESD* значительно чаще отмечалось появление у пациентов неврологической симптоматики, в то время как эффекты вариантов в гене *INO80* были прямо противоположными – неврологические нарушения БВК возникали гораздо реже [67].

Ген *ESD* расположен в длинном плече хромосомы 13 и состоит из 11 экзонов. Ген кодирует сериновую гидролазу, которая принадлежит семейству эстеразы D. Кодируемый фермент активен по отношению к многочисленным субстратам, включая O-ацетилированные сиаловые кислоты, и может участвовать в рециркуляции сиаловых кислот. Ген используется в качестве генетического маркера для ретинобластомы и БВК [68]. Влияние гена *ESD* на фенотипические проявления

Таблица 1. Участие генов в патогенезе болезни Вильсона—Коновалова и их эффект

№	Ген	Локализация на хромосомах	Продукт гена	Влияние на течение БВК, источник
1	<i>ATP7A</i>	Xq12-q13	Белок ATP7A	<i>ATP7A</i> и <i>ATP7B</i> имеют различные и пересекающиеся функции в нейронах, экспрессирующих дофамин- β -гидроксилазу [27]
2	<i>ATOX1</i>	5q33.1	Белок ATOX1	p.(G14S) была ассоциирована с ранним возрастом начала заболевания, сниженным уровнем церулоплазмينا в сыворотке, изменениями в печени и мозге [38]
3	<i>COMMD1</i>	2p13	Регулятор гомеостаза меди COMMD1	Гетерозиготное состояние <i>GAT/GAC</i> в кодоне Asn164 связано с более ранним началом заболевания [47]
4	<i>XIAP</i>	Xq25	X-связанный ингибитор апоптоза	Повышение уровня экспрессии <i>XIAP</i> приводит к накоплению меди в клеточных моделях, а дефицит – к снижению содержания меди в тканях печени [46]
5	<i>HFE</i>	6p22.2	Белок HFE	Усиливает окислительный стресс и повреждение клеток [29]
6	<i>APOE</i>	19q13.32	Белок ApoE	Нейропротективный эффект генотипа $\epsilon 3/\epsilon 3$ [57, 58], усиливающий повреждение нейронов генотип $\epsilon 4$ [16]
7	<i>PRNP</i>	20p13	Прионный белок PrP ^C	Нейропротективный эффект варианта 129 M/M [62]
8	<i>MTHFR</i>	1p36.3	Метилентетрагидрофолатредуктаза	Более выраженные гепатотоксические и нейродегенеративные процессы [68]
9	<i>ESD</i>	13q14.2	Сериновая гидролаза из семейства эстеразы D	Более выраженные нейродегенеративные процессы [69]
10	<i>INO80</i>	15q15.1	Белок INO80	Нейропротективный эффект [71]

БВК исследователи объясняют его близким хромосомным расположением к *АТР7В* и возможным сцеплением между ними, однако точных доказательств этой гипотезы предложено не было [67, 69].

Ген *INO80* расположен в длинном плече хромосомы 15, состоит из 37 экзонов. Кодированная каталитическая АТФазная субъединица комплекса ремоделирования хроматина, которая принимает участие в процессах транскрипции, репарации и репликации ДНК. О конкретных механизмах участия продуктов данного гена на патогенез болезни Вильсона–Коновалова известно мало, но предполагается, что он оказывает влияние на поддержание стабильности ДНК путем увеличения подвижности хроматина, тем самым оказывая нейропротективное действие (в том числе при окислительном повреждении клеток нервной системы, сопровождающем болезнь Вильсона–Коновалова) [70, 71].

Таким образом, вариабельность клинических фенотипов при болезни Вильсона–Коновалова может быть обусловлена различными мутациями не только в гене *АТР7В*, но и в тех генах, которые участвуют в гомеостазе меди, а также различиями, связанными с полом (табл. 1).

К фенотипически более легкому течению болезни Вильсона–Коновалова (преимущественно за счет нейропротективного эффекта) предрасполагают полиморфные варианты генов *АРОЕ* ($\epsilon 3/\epsilon 3$), *PRNP*, *INO80*. В то же время полиморфизм генов *АРОЕ* ($\epsilon 4$), *COMMD1*, *АТОХ1*, *HFE*, *МТНFR* и *ESD*, напротив, может усугубить течение и симптоматику болезни Вильсона–Коновалова.

Дальнейшее изучение причин клинического полиморфизма и различий начала манифестации болезни Вильсона–Коновалова важно для практической медицины, поскольку может помочь врачу поставить верный диагноз и обосновать выбор молекулярно-генетического метода для подтверждения этиологии заболевания и соответственно скорректировать лечение в рамках персонализированной медицины.

Исследование выполнено в рамках государственного задания на фундаментальные научные исследования НИИ медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук” по теме “Персонализированное геномное профилирование при орфанных заболеваниях человека” (№ АААА-А19-119090990020-0).

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. Асанов А.Ю., Соколов А.А., Волгина С.Я. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Вильсона–Коновалова. М., 2015. 71 с.
2. Корягина О.Ю., Назаренко Л.П., Филимонова М.Н. Гепатолентикулярная дегенерация // Сиб. бюл. 2005. С. 61.
3. Poujois A., Woimant F. Wilson's disease: A 2017 update // Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. 2018. V. 42. № 6. P. 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2018.03.007>
4. Coffey A.J., Durkie M., Hague S. et al. A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom // Brain. 2013. V. 136. № 5. P. 1476–1487. <https://doi.org/10.1093/brain/awt035>
5. Баязутдинова Г.М., Шагина О.А., Карунас А.С. и др. Спектр мутаций в гене *АТР7В* у российских больных с болезнью Вильсона–Коновалова // Генетика. 2019. Т. 55. № 12. С. 1433–1441. <https://doi.org/10.1134/s0016675819120026>
6. Ala A., Walker A.P., Ashkan K. et al. Wilson's disease // The Lancet. 2007. V. 369. № 9559. P. 397–408. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60196-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60196-2)
7. De Bie P., Muller P., Wijmenga C., Klomp L.W.J. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes // J. Med. Genet. 2007. V. 44. № 11. P. 673–688. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.052746>
8. Тулузановская И.Г., Балашова М.С., Жученко Н.А. и др. Мутации в гене *HFE*, ответственном за наследственный гемохроматоз, у пациентов с болезнью Вильсона–Коновалова // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. 2018. № 11(159). С. 33.
9. Maxwell K.L., Kowdley K.V. Metals and the liver // Curr. Opin. Gastroenterol. 2012. V. 28. № 3. P. 217–222. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3283521d82>
10. Huster D., Kühne A., Bhattacharjee A. et al. Diverse functional properties of Wilson disease *АТР7В* variants // Gastroenterology. 2012. V. 142. № 4. P. 947–956. e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.048>
11. Okada T., Shiono Y., Kaneko Y. et al. High prevalence of fulminant hepatic failure among patients with mutant alleles for truncation of *АТР7В* in Wilson's disease // Scand. J. Gastroenterol. 2010. V. 45. № 10. P. 1232–1237. <https://doi.org/10.3109/00365521.2010.492527>
12. Gromadzka G., Schmidt H.J., Genschel J. et al. Frame-shift and nonsense mutations in the gene for *АТР7В* are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease // Clin. Genet. 2005. V. 68. № 6. P. 524–532. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00528>
13. Perri R.E., Hahn S.H., Ferber M.J. et al. Wilson disease – keeping the bar for diagnosis raised // Hepa-

- tology. 2005. V. 42. № 4. P. 974.
<https://doi.org/10.1002/hep.20893>
14. *Баязутдинова Г.М., Шагина О.А., Поляков А.В.* Молекулярный патогенез болезни Вильсона–Коновалова // Медицинская генетика. 2017. Т. 16. № 7. С. 18–24.
 15. *Баязутдинова Г.М., Шагина О.А., Поляков А.В.* Мутация с.3207С>А гена *АТР7В* – наиболее частая причина гепатолентикулярной дегенерации в России: частота и причина распространения // Мед. генетика. 2018. Т. 17(4). С. 25–30.
 16. *Ivanova-Smolenskaya I.A., Ovchinnikov I.V., Karabanov A.V. et al.* The His1069Gln mutation in the *АТР7В* gene in Russian patients with Wilson disease // J. Med. Genet. 1999. V. 36. № 2. P. 174.
<https://doi.org/10.1136/jmg.36.2.174>
 17. *Matveeva T., Zaklyazminskaya E., Polyakov A.* The molecular-genetic analysis of *АТР7В* gene at the Russian patients with Wilson disease // Eur. J. Hum. Genet. 2008. V. 16. P. 54.
 18. *Medici V., Weiss K.H.* Genetic and environmental modifiers of Wilson disease // Handb. Clin. Neurol. 2017. V. 142. P. 35–41.
 19. *Firneisz G., Szonyi L., Ferenci P. et al.* The other mutation is found: follow-up of an exceptional family with Wilson disease // The Am. J. Gastroenterol. 2004. V. 99. № 12. P. 2504.
https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.41389_8.x
 20. *Lutsenko S.* Modifying factors and phenotypic diversity in Wilson’s disease // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2014. V. 1315. P. 56.
<https://doi.org/10.1111/nyas.12420>
 21. *Shulman L.M.* Gender differences in Parkinson’s disease // Gender Med. 2007. V. 4. № 1. P. 8–18.
[https://doi.org/10.1016/S1550-8579\(07\)80003-9](https://doi.org/10.1016/S1550-8579(07)80003-9)
 22. *Litwin T., Gromadzka G., Członkowska A.* Gender differences in Wilson’s disease // J. Neurol. Sci. 2012. V. 312. № 1–2. P. 31–35.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.08.028>
 23. *Chen C., Shen B., Xiao J.J. et al.* Currently clinical views on genetics of Wilson’s disease // Chin. Med. J. 2015. V. 128. № 13. P. 1826.
<https://doi.org/10.4103/0366-6999.159361>
 24. *Lenartowicz M., Wiczerzak K., Krzeptowski W. et al.* Developmental changes in the expression of the *Atp7a* gene in the liver of mice during the postnatal period // J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol. 2010. V. 313. № 4. P. 209–217.
<https://doi.org/10.1002/jez.586>
 25. *Ogórek M., Lenartowicz M., Starzyński R. et al.* *Atp7a* and *Atp7b* regulate copper homeostasis in developing male germ cells in mice // Metallomics. 2017. V. 9. № 9. P. 1288–1303.
<https://doi.org/10.1039/c7mt00134g>
 26. *Lenartowicz M., Moos T., Ogórek M. et al.* Metal-dependent regulation of *АТР7А* and *АТР7В* in fibroblast cultures // Front. Mol. Neurosci. 2016. V. 9. P. 68.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00068>
 27. *Desai V., Donsante A., Swoboda K.J. et al.* Favorably skewed X-inactivation accounts for neurological sparing in female carriers of Menkes disease // Clin. Genet. 2011. V. 79. № 2. P. 176–182.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01451.x>
 28. *Abusaad I., Mohammed S.N., Ogilvie C.M. et al.* Clinical expression of Menkes disease in a girl with X; 13 translocation // Am. J. Med. Genet. 1999. V. 87. № 4. P. 354–359.
 29. *Schmidt K., Ralle M., Schaffer T. et al.* *АТР7А* and *АТР7В* copper transporters have distinct functions in the regulation of neuronal dopamine- β -hydroxylase // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. № 52. P. 20085–20098.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004889>
 30. *Pruitt K.D., Tatusova T., Klimke W., Maglott D.R.* NCBI reference sequences: current status, policy and new initiatives // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. Suppl. 1. P. D32–D36.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn721>
 31. *Ala A., Schilsky M.* Genetic modifiers of liver injury in hereditary liver disease // Semin. Liver Dis. 2011. V. 31. № 02. P. 208–214.
<https://doi.org/10.1055/s-0031-1276648>
 32. *Abuzetun J.Y., Hazin R., Suker M., Porter J.* A rare case of hemochromatosis and Wilson’s disease coexisting in the same patient // J. Natl. Med. Assoc. 2008. V. 100. № 1. P. 112.
[https://doi.org/10.1016/s0027-9684\(15\)31185-8](https://doi.org/10.1016/s0027-9684(15)31185-8)
 33. *Dib N., Valsesia E., Malinge M.C. et al.* Late onset of Wilson’s disease in a family with genetic haemochromatosis // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2006. V. 18. № 1. P. 43–47.
<https://doi.org/10.1097/00042737-200601000-00008>
 34. *Багаева М.Э., Каганов Б.С., Готье С.В. и др.* Клиническая картина и течение болезни Вильсона у детей // Вопр. соврем. педиатрии. 2004. Т. 3. № 5. С. 13–18.
 35. *Culotta V.C., Klomp L.W.J., Strain J. et al.* The copper chaperone for superoxide dismutase // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 38. P. 23469–23472.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23469>
 36. *Maret W., Wedd A.* Binding, transport and storage of metal ions in biological cells // Royal Society Chem. 2014. V. 2.
<https://doi.org/10.1039/9781849739979>
 37. *Hamza I., Faisst A., Prohaska J. et al.* The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis // PNAS. 2001. V. 98. № 12. P. 6848–6852.
<https://doi.org/10.1073/pnas.111058498>
 38. *Hamza I., Schaefer M., Klomp L.W.J. et al.* Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis // PNAS USA. 1999. V. 96. № 23. P. 13363–13368.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13363>
 39. *Simon I., Schaefer M., Reichert J., Stremmel W.* Analysis of the human Atox 1 homologue in Wilson patients // World J. Gastroenterol. 2008. V. 14. № 15. P. 2383.
<https://doi.org/10.3748/wjg.14.2383>
 40. *Kumari N., Kumar A., Pal A. et al.* In silico analysis of novel p.(Gly14Ser) variant of *АТОХ1* gene: plausible role in modulating *АТОХ1*–*АТР7В* interaction // Mol. Biol. Rep. 2019. V. 46. № 3. P. 3307–3313.
<https://doi.org/10.1007/s11033-019-04791-x>
 41. *Brewer G.J., Dick R.D., Schall W. et al.* Use of zinc acetate to treat copper toxicosis in dogs // J. Am. Vet. Med. Assoc. 1992. V. 201. № 4. P. 564.

42. van de Sluis B., Rothuizen J., Pearson P.L. et al. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. № 2. P. 165–173. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.2.165>
43. Tao T.Y., Liu F., Klomp L. et al. The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 43. P. 41593–41596. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300391200>
44. Chai J., Shiozaki E., Srinivasula S.M. et al. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP // *Cell.* 2001. V. 104. № 5. P. 769–780. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00272-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00272-0)
45. Huang Y., Park Y.C., Rich R.L. et al. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain // *Cell.* 2001. V. 104. № 5. P. 781–790. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)02075-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)02075-5)
46. Riedl S.J., Renatus M., Schwarzenbacher R. et al. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP // *Cell.* 2001. V. 104. № 5. P. 791–800. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00274-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00274-4)
47. Lewis J., Burstein E., Refeffy S.B. et al. Uncoupling of the signaling and caspase-inhibitory properties of X-linked inhibitor of apoptosis // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 10. P. 9023–9029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312891200>
48. Harlin H., Refeffy S.B., Duckett C.S. et al. Characterization of XIAP-deficient mice // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. № 10. P. 3604–3608. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.10.3604-3608.2001>
49. Weiss K.H., Merle U., Schaefer M. et al. Copper toxicosis gene *MURR1* is not changed in Wilson disease patients with normal blood ceruloplasmin levels // *World J. Gastroenterol.* 2006. V. 12. № 14. P. 2239. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i14.2239>
50. Leduc V., Jasmin-Bélanger S., Poirier J. APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease // *Trends Mol. Med.* 2010. V. 16. № 10. P. 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.008>
51. Eisenberg D.T.A., Kuzawa C.W., Hayes M.G. Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2010. V. 143. № 1. P. 100–111. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21298>
52. Mahley R.W., Rall Jr S.C. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2000. V. 1. № 1. P. 507–537. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.1.1.507>
53. Harris F.M., Brecht W.J., Xu Q. et al. Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice // *PNAS.* 2003. V. 100. № 19. P. 10966–10971. <https://doi.org/10.1073/pnas.1434398100>
54. Elshourbagy N.A., Liao W.S., Mahley R.W., Taylor J.M. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets // *PNAS USA.* 1985. V. 82. № 1. P. 203–207. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.1.203>
55. Członkowska A., Gromadzka G., Chabik G. Monozygotic female twins discordant for phenotype of Wilson's disease // *Mov. Disord.* 2009. V. 24. № 7. P. 1066–1069. <https://doi.org/10.1002/mds.22474>
56. Wang X.P., Wang X.H., Bao Y.C., Zhou J.N. Apolipoprotein E genotypes in Chinese patients with Wilson's disease // *QJM.* 2003. V. 96. № 7. P. 541–542. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcg093>
57. Ford M.J., Burton L.J., Morris R.J., Hall S.M. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse // *Neuroscience.* 2002. V. 113. № 1. P. 177–192. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00155-0)
58. Brown D.R., Qin K., Herms J.W. et al. The cellular prion protein binds copper *in vivo* // *Nature.* 1997. V. 390. № 6661. P. 684–687. <https://doi.org/10.1038/37783>
59. Bremer J., Baumann F., Tiberi C. et al. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance // *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. № 3. P. 310–318. <https://doi.org/10.1038/nn.2483>
60. Gasperini L., Meneghetti E., Pastore B. et al. Prion protein and copper cooperatively protect neurons by modulating NMDA receptor through S-nitrosylation // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. V. 22. № 9. P. 772–784. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6032>
61. Merle U., Stremmel W., Gefßner R. Influence of homozygosity for methionine at codon 129 of the human prion gene on the onset of neurological and hepatic symptoms in Wilson disease // *Arch. Neurol.* 2006. V. 63. № 7. P. 982–985. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.7.982>
62. Forbes N., Goodwin S., Woodward K. et al. Evidence for synergistic effects of PRNP and ATP7B mutations in severe neuropsychiatric deterioration // *BMC Med. Genet.* 2014. V. 15. № 1. P. 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-15-22>
63. Tamura T., Picciano M.F. Folate and human reproduction // *Am. J. Clin. Nutr.* 2006. V. 83. № 5. P. 993–1016. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.5.993>
64. Friso S., Girelli D., Trabetti E. et al. The MTHFR 1298A>C polymorphism and genomic DNA methylation in human lymphocytes // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005. V. 14. № 4. P. 938–943. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0601>
65. Мещерякова Т.И., Маркова С.И., Жилина С.С. и др. Изучение влияния полиморфизма С677Т гена *MTHFR* на риск формирования несиндромальных орофациальных расщелин // *Рос. вестник перинатологии и педиатрии.* 2013. Т. 58. № 3.
66. Gromadzka G., Rudnicka M., Chabik G. et al. Genetic variability in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (*MTHFR*) affects clinical expression of Wilson's disease // *J. Hepatol.* 2011. V. 55. № 4. P. 913–919. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.030>
67. Kluska A., Kulecka M., Litwin T. et al. Whole-exome sequencing identifies novel pathogenic variants across the *ATP7B* gene and some modifiers of Wilson's disease phenotype // *Liver Int.* 2019. V. 39. № 1. P. 177–186. <https://doi.org/10.1111/liv.13967>
68. Frydman M., Bonné-Tamir B., Farrer L.A. et al. Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: Linkage to the esterase D locus // *PNAS USA.* 1985. V. 82. № 6. P. 1819–1821. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.6.1819>

69. *Chuang L.M., Tai T.Y., Wang T.R. et al.* Esterase D and retinoblastoma gene loci are tightly linked to Wilson's disease in Chinese pedigrees from Taiwan // *Hum. Genet.* 1991. V. 87. № 4. P. 465–468. <https://doi.org/10.1007/BF00197170>
70. *Poli J., Gasser S.M., Papamichos-Chronakis M.* The INO80 remodeller in transcription, replication and re- pair // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2017. V. 372. № 1731. P. 20160290. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0290>
71. *Medici V., LaSalle J.M.* Genetics and epigenetic factors of Wilson disease // *Ann. Transl. Med.* 2019. V. 7. Suppl. 2. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.01.67>

Modifier Genes as a Cause of Wilson–Konovalov Disease Clinical Polymorphism

A. E. Postrigan^{a, *}, I. Zh. Zhalsanova^a, E. A. Fonova^a, and N. A. Skryabin^a

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

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

For more than 100 years of the Wilson–Konovalov disease existence as an independent nosological form, etiology and pathogenesis of this disease have been studied from different points of view – both clinical and genetic. However, to this day, new information is emerging not only about mutations in the *ATP7B* gene itself but also about modifying factors affecting the disease clinical picture. From a genetic point of view, the influence of modifier genes is undeniable, because due to their action (protective or compensating), some forms of Wilson–Konovalov disease can be explained and it is possible to further use this knowledge in the framework of personalized patient treatment. In this review, the authors consider the various modifiers influence (intra- and extra-gene) on the course and manifestation of the Wilson–Konovalov's disease clinical forms. The authors show the possible mechanisms for the occurrence of milder or more severe Wilson–Konovalov disease forms with the participation of certain genes.

Keywords: Wilson–Konovalov disease, modifier genes, *ATOX1*, *COMMD1*, *XIAP*, *HFE*.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЯДЕР ШТАММОВ
Pyrenophora tritici-repentis ПО ГЕНАМ-ЭФФЕКТОРАМ *ToxA* И *ToxB*© 2021 г. Н. В. Мироненко¹, *, А. С. Орина¹, Н. М. Коваленко¹¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург, Пушкин, 196608 Россия

*e-mail: nina2601mir@mail.ru

Поступила в редакцию 14.05.2020 г.

После доработки 23.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Фитопатогенный гриб *Pyrenophora tritici-repentis* образует специфичные фитотоксины, кодируемые генами *ToxA* и *ToxB*. Цель исследования – выявление генетического полиморфизма ядер по генам-эффекторам *ToxA* и *ToxB* как свидетельства гетерокариотичного состояния штаммов *P. tritici-repentis*. Новизна исследования заключается в использовании оригинального подхода для доказательства гетерокариотичной природы штаммов *P. tritici-repentis*, заключающегося в оценке доли ядер, несущих гены-эффекторы *ToxA* и *ToxB*, относительно общего пула ядер с референтным геном *Act1* методом количественной ПЦР. Материалом исследования являлись 21 штамм из трех популяций гриба, а также митотическое (конидиальное) и мейотическое потомство отдельных штаммов (103 субклонов). У 70% *ToxA*⁺-штаммов казахстанской популяции *P. tritici-repentis* доля ядер с геном *ToxA* оказалась в диапазоне 0.24–0.65, что указывает на их гетерокариотичное состояние. В греческой популяции гриба было выявлено 20% штаммов, у которых доля ядер, несущих ген *ToxB*, оказалась существенно больше единицы, что указывает на дупликацию этого гена по крайней мере в части ядер. При этом минимум 40% штаммов также оказались гетерокариотичными по гену *ToxB*. Среди митотического потомства штаммов *ToxA*⁺ и *ToxB*⁺ выявлен незначительный полиморфизм ядер по наличию в них генов-эффекторов. Доля ядер с определенным геном-эффектором, предположительно, представляет собой генетически наследуемый признак. Выявлена более широкая вариабельность признака “доля ядер с геном *ToxA*” среди мейотического потомства, чем среди митотического. Функциональная роль полиморфизма ядер для жизнедеятельности изолятов *P. tritici-repentis* в составе популяции требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: грибы, *Pyrenophora tritici-repentis*, гетерокарионы, гены-эффекторы, количественная ПЦР, соотношение ядер.

DOI: 10.31857/S0016675821040093

Аскомицетный гомоталличный гриб *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler является возбудителем желтой пятнистости листьев пшеницы. Его патогенные свойства определяются продуцированием хозяин-специфичных фитотоксинов [1], из которых наиболее изучены два белковых токсина Ptr *ToxA* и Ptr *ToxB*, индуцирующие соответственно некроз и хлороз на листьях сортов пшеницы с комплементарными генами восприимчивости *Tsn1* и *Tsc2* [2]. Ранее с помощью молекулярно-генетических методов было показано, что *ToxA* *P. tritici-repentis* практически идентичен гомологичному гену *ToxA* другого патогена пшеницы – гриба *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous [3, 4]. Также установлено, что *ToxA* попал в геном *Pyrenophora tritici-repentis* путем горизонтального переноса генов (ГПГ) от *Parastagonospora nodorum* [5], в результате чего *Pyrenophora tritici-repentis* приобрел свойство поражать сорта пшеницы

с геном *Tsn1*. Ген *ToxA* широко распространен в популяциях гриба: доля изолятов *ToxA*⁺ в популяциях может составлять от 50% в Северо-Западном регионе России и Тунисе [6, 7] до 90–100% в Краснодарском крае, а также в Юго-Восточном Казахстане, США и Канаде [8–10]. В отличие от однокопийного гена *ToxA* [3, 11], ген *ToxB* является многокопийным [12, 13] и может быть представлен в некоторых изолятах расы 5 девятью копиями [14]. Ген *ToxB*, очевидно, является эволюционно более “старым” в геноме *P. tritici-repentis*. Отсутствие полиморфизма между копиями *ToxB* свидетельствует о том, что амплификация гена произошла относительно недавно [14]. Многими исследователями отмечалась крайне низкая встречаемость или полное отсутствие в популяциях *P. tritici-repentis* *ToxB*⁺ изолятов [9, 10, 15–17], что также подтверждено нашими исследованиями россий-

ских популяций гриба [6, 8, 18]. В Греции нами обнаружена уникальная локальная популяция *P. tritici-repentis*, состоящая только из штаммов $ToxB^+$, что дало возможность использовать ген *ToxB*, наряду с *ToxA*, для характеристики гетерокариотичности штаммов *P. tritici-repentis*.

Гриб *P. tritici-repentis* характеризуется высокой изменчивостью морфологических признаков [19, 20] и патогенных свойств, что выражается в изменениях расового состава популяций [21–23]. С помощью методов молекулярного фингерпринтинга, таких как RAPD [24], AFLP [25] и SSR [18, 26], была изучена внутри- и межпопуляционная изменчивость патогена по молекулярным маркерам. Высокие показатели генного и генотипического разнообразия изолятов *P. tritici-repentis* связывают преимущественно с нестабильностью генома гриба, а не с комбинативной изменчивостью при половом процессе, поскольку гриб является гомоталлическим [27, 28]. В литературе отсутствуют сведения о существенном вкладе бесполого размножения, а именно гетерокариоза и парасексуального процесса, в изменчивость *P. tritici-repentis*.

Парасексуальный процесс у фитопатогенных грибов хорошо изучен в лабораторных условиях [29]. Мы не имеем информации о доказательстве существования гетерокариоза у *P. tritici-repentis* в природе. Значительную вариабельность изолятов *P. tritici-repentis* по морфологическим признакам и патогенным свойствам [20, 23] некоторые авторы объясняют хромосомным полиморфизмом [12] и наличием значительной доли повторяющихся последовательностей ДНК и транспозабельных элементов (ТЭ) в геноме гриба [30, 31]. Полногеномное секвенирование штаммов *P. tritici-repentis* позволило выявить многочисленные перестройки хромосом [28] и обосновать роль ТЭ в создании новых генов, подтвердить гипотезу о горизонтальном переносе *ToxA* и впервые открыть у грибов явление трансдупликации [27]. Таким образом, влияние мобильных элементов и хромосомного полиморфизма играет значительную роль в изменчивости грибов [8], в то же время реальный потенциал гетерокариоза и парасексуального процесса у фитопатогенных грибов в природе остается малоизученным. Наблюдаемую изменчивость *P. tritici-repentis* можно объяснить гетерокариотичным состоянием мицелия и переносом ядер как между сливающимися гифами мицелия, так и в результате образования анастомозов между конидиями, которые наблюдали у изолятов этого вида [27]. На наш взгляд, доказательство существования генетического полиморфизма ядер в мицелии и конидиях грибов является весомым аргументом для утверждения о существовании в природе гетерокариоза.

Цель данного исследования – доказать гетерокариотичную природу штаммов гриба *P. tritici-repentis* по генам-эффекторам *ToxA* и *ToxB*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили 20 штаммов *P. tritici-repentis*, которые были выделены из листьев пшеницы с симптомами желтой пятнистости, собранных в Казахстане (Алматинская обл.; 10 штаммов) и Греции (регион Халкидики; 10 штаммов) в 2019 г.

Все штаммы были отобраны по наличию генов-эффекторов *ToxA* и *ToxB* методом ПЦР с геноспецифичными праймерами [32]. Штаммы $ToxA^+$ из казахстанской популяции обозначены Каз, $ToxB^+$ штаммы из греческой популяции – Гр. Кроме того, в исследование был включен штамм БЛ-6, выделенный из листьев пшеницы, выращенной в Ленинградской обл. в 2017 г.

Субклоны (конидиальное = митотическое потомство), полученные из штаммов Гр-2, Гр-3 и Гр-5 (13, 11 и 10 шт. соответственно), Каз-3 и Каз-5 (по 12 шт.), БЛ-6 (24 шт.) путем пересева отдельных конидий, также были включены в исследование. Кроме того, для штамма БЛ-6 было получено мейотическое потомство (21 аскоспоровый клон) по методике, описанной ранее [33].

Штаммы *P. tritici-repentis* выращивали в течение семи суток по ранее описанной методике [34]. Выделение геномной ДНК из мицелия грибов проводили СТАВ-методом [35].

Долю ядер, несущих генетический локус (*R*), у штаммов из казахстанской и греческой популяций, а также в полученном митотическом и мейотическом потомствах, определяли методом количественной ПЦР, который заключается в одновременной амплификации гена-мишени (*ToxA* или *ToxB*) и референтного однокопийного гена, в качестве которого был выбран ген актина *Act1* [36]. Ранее этот подход был использован для анализа копийности отдельных генов грибов [37]. Реакции проводили в объеме 20 мкл, содержащем 4 мкл $5\times qPCRmix-HS SYBR$ мастер-микса (Евроген, Россия), 500 нМ каждого праймера и 2 мкл раствора ДНК с использованием следующего протокола амплификации: 50°C – 2 мин; 95°C – 15 мин; [95°C – 15 с; 62°C – 60 с] \times 40 на термоциклере CFX96 Real-Time System (BioRad, США) в трехкратной повторности. Обработку первичных данных осуществляли с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 1.6. Усредненные данные по каждому гену-мишени нормировали по усредненному показателю референтного гена *Act1* для получения величины ΔCt ($\Delta Ct = Ct (ToxA/ToxB) - Ct (Act1)$). Долю ядер, несущих генетический локус, рассчитывали по формуле $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ [38]. Полученная величина отражает соотношение коли-

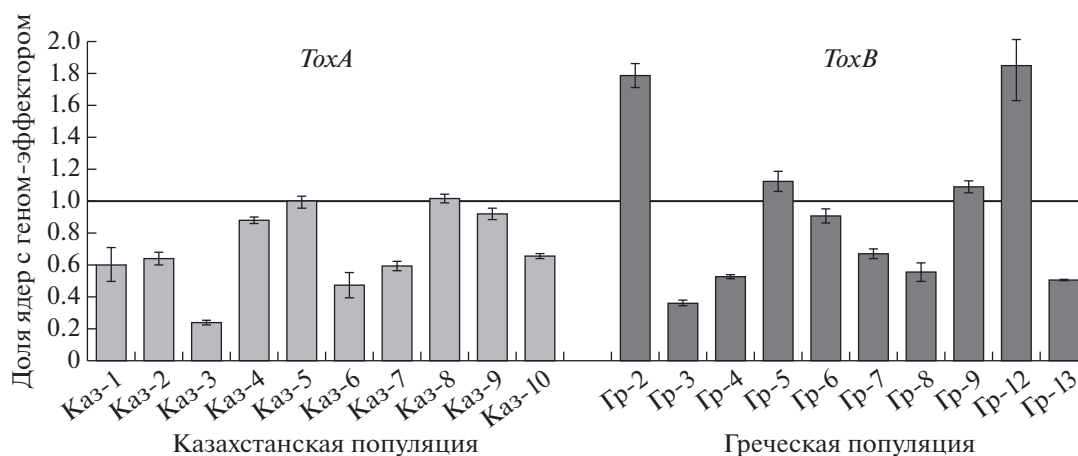


Рис. 1. Доля ядер с генами-эффекторами *ToxA* и *ToxB* у изолятов *P. tritici-repentis* разного географического происхождения.

честв копий гена-эффектора (*ToxA* или *ToxB*) относительно однокопийного гена “домашнего хозяйства” *Act1*, в каждом ядре. Значение $R < 1$, предполагающее наличие гена-эффектора не в каждом ядре, также как и значение $R > 1$, которое свидетельствует о дупликации генов-эффекторов по крайней мере в части ядер, указывают на гетерокариотичное состояние мицелия штамма гриба.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ MS Excel 2010 и STATISTICA 10.0. Средние значения показателей сравнивали помощью *t*-критерия для независимых переменных, различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ доли ядер, несущих гены ToxA и ToxB, у штаммов из природных популяций P. tritici-repentis

Штаммы *P. tritici-repentis* из казахстанской популяции, выделенные в 2019 г., различались по доле ядер (R), несущих ген *ToxA*, которая варьировала от 0.24 до 1.02, и в среднем оказалась равна 0.70 (рис. 1). У шести штаммов из казахстанской популяции показатель R оказался существенно меньше 1, что указывает на их гетерокариотичное состояние и наличие в мицелии как $ToxA^+$, так и $ToxA^-$ ядер.

Доля ядер, несущих ген *ToxB*, у штаммов из греческой популяции в среднем составляла 0.93. У двух штаммов количество копий гена *ToxB* значительно превышало общее количество ядер, выделенное через референтный ген *Act1* (R равно 1.78 и 1.84 соответственно). Количество копий *ToxB* у четырех других штаммов, наоборот, было существенно меньше общего числа ядер с геном *Act1*: величина $R = 0.36-0.55$. Таким образом, в грече-

ской популяции *P. tritici-repentis* присутствуют гетерокариотичные штаммы с разным соотношением $ToxB^+$ и $ToxB^-$ ядер. Число копий гена *ToxB* в ядре гриба остается неизвестным, но судя по результатам оценки доли ядер $ToxB^+$ у штаммов Гр-2 и Гр-12 ($R = 1.78$ и 1.84), оно должно быть не менее двух (рис. 1).

Анализ доли ядер, несущих ген ToxA, в митотическом и мейотическом потомствах штаммов P. tritici-repentis

Для изучения стабильности ядерного состава штаммов $ToxA^+$ при бесполом размножении конидиями выбрали два штамма из казахстанской популяции Каз-3 и Каз-5, а также штамм БЛ-6 из северо-западной популяции, и оценили долю ядер с геном *ToxA* в их митотическом потомстве (рис. 2).

Доля ядер с геном *ToxA* у субклонов Каз-3 составляла от 0.20 до 0.34 и не имела достоверных отличий от “материнского” штамма ($R = 0.24$). У 10 из 12 субклонов Каз-5 доля ядер с геном *ToxA* оказалась в диапазоне 0.85–1.08, близком к уровню “материнского” штамма Каз-5 ($R = 0.99$). Однако для двух субклонов Каз-5 этот показатель существенно отличался и составил 1.32 и 1.73 соответственно.

Доля ядер с геном *ToxA* у субклонов штамма БЛ-6 из северо-западной популяции варьировала в узком диапазоне 0.93–1.11 и в среднем оказалась 1.01, что не имеет достоверных отличий от показателя “материнского” штамма ($R = 1.02$).

Установлено достоверное отличие между митотическими потомствами штаммов Каз-3 и Каз-5 по доле ядер, несущих ген *ToxA*.

В мейотическом потомстве БЛ-6 доля ядер с геном *ToxA* у 20 аскоспоровых клонов составила

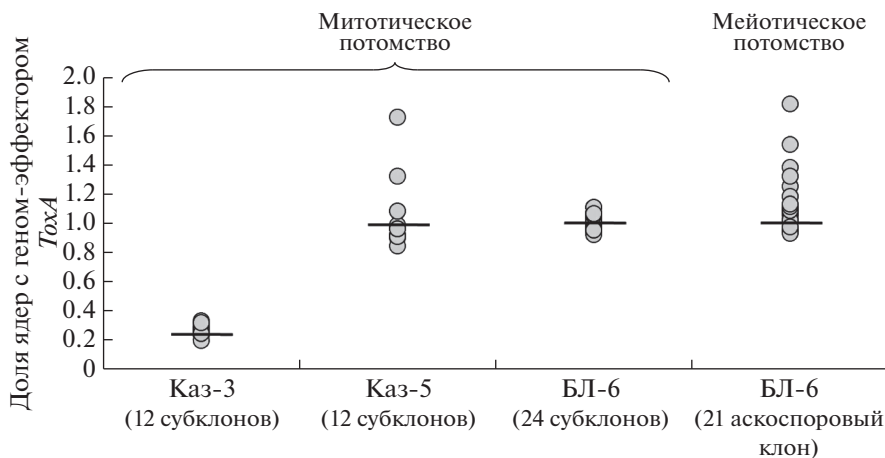


Рис. 2. Доля ядер с геном-эффектором *ToxA* у митотических и мейотических потомков штаммов *P. tritici-repentis* разного географического происхождения. Линией показана доля ядер с *ToxA* у “материнского” штамма.

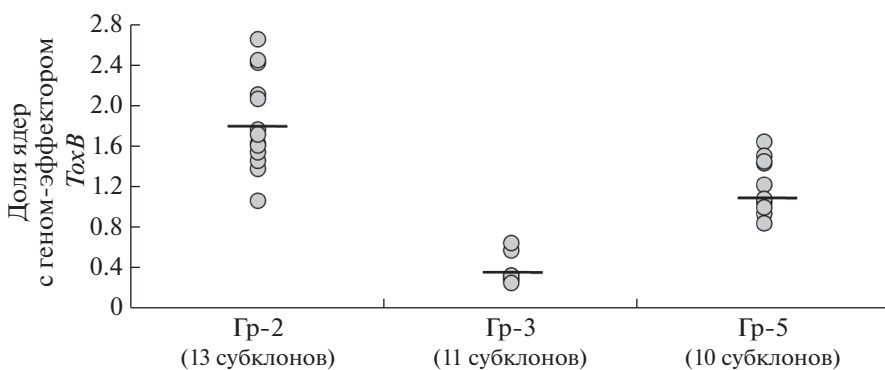


Рис. 3. Доля ядер с геном-эффектором *ToxB* у митотических потомков штаммов *P. tritici-repentis* из греческой популяции. Линией показана доля ядер с *ToxB* у “материнского” штамма.

от 0.94 до 1.82. Существенное увеличение доли ядер с геном-эффектором в сравнении с “материнским” штаммом было выявлено у четырех аскоспоровых потомков, у которых эта величина оказалась 1.33–1.82.

Анализ доли ядер, несущих ген ToxB, в митотическом потомстве штаммов P. tritici-repentis

Из греческой популяции *P. tritici-repentis* были выбраны три штамма Гр-2, Гр-3 и Гр-5, характеризующиеся наибольшим, наименьшим и средним числом ядер с геном *ToxB*. У штамма Гр-2 $R = 1.78$, тогда как у его субклонов этот показатель варьировал от 1.06 до 2.65 и в среднем оказалась 1.83 (рис. 3). У 9 из 11 субклонов штамма Гр-3 значение R для *ToxB* оказалось в диапазоне 0.25–0.33, что соответствовало показателю “материнского” штамма ($R = 0.36$), однако у двух субклонов наблюдалось увеличение значения R до 0.57 и 0.65 соответственно (рис. 3). Субклоны штамма Гр-5,

в котором отмечали примерно равное количество копий генов *ToxB* и *Act1* ($R = 1.12$), характеризовались величиной R для гена *ToxB* в диапазоне 0.84–1.64. Установлено достоверное отличие между митотическими потомствами штаммов Гр-2, Гр-3 и Гр-5 по доле ядер, несущих *ToxB*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для доказательства гетерокариотичной природы штаммов *P. tritici-repentis* мы использовали оригинальный подход – оценку доли ядер, несущих гены-эффекторы, методом количественной ПЦР. С помощью предложенной методики оценили долю ядер с генами *ToxA* и *ToxB* относительно референтного гена *Act1* в 20 природных штаммах, выделенных в 2019 г. Ранее этот подход был использован для анализа копийности отдельных генов грибов [37].

Полученные результаты свидетельствуют о существовании значительных различий между штаммами в природных популяциях по составу ядер раз-

личного генотипа, несущих или не несущих ген-эффектор *ToxA* или *ToxB*. У ряда $ToxA^+$ -штаммов, так же как и у части $ToxB^+$ -штаммов, не все ядра, имеющие референтный ген *Act1*, несут ген-эффектор, что позволяет считать их гетерокарионами. Полиморфизм штаммов *P. tritici-repentis* из природных популяций по соотношению ядер с генами-эффекторами и без них оказался значительно выше, чем полиморфизм конидиального потомства отдельных штаммов. Это обстоятельство позволяет предположить, что соотношение ядер определенного генотипа является специфичным для штамма. Возможно такой значительный полиморфизм среди природных штаммов по соотношению ядер с генами-эффекторами можно объяснить селекцией ядер в результате взаимодействия с растением-хозяином в процессе развития болезни.

Ранее при анализе генетического полиморфизма между штаммами микоризного гриба *Rhizoglyphus irregularis* было установлено, что по крайней мере часть изолятов в составе популяции являются гетерокарионами [39]. Авторами также было показано, что генетический полиморфизм ядер каждого штамма сохранялся в популяции с течением времени. Был выявлен разный уровень полиморфизма ядер у отдельных штаммов *R. irregularis*, причем выявленные различия между ядрами заключались в разной копийности отдельных участков ДНК.

Средний уровень величины *R* по гену *ToxA* сохранялся в митотическом потомстве, полученном из трех штаммов (Каз-3, Каз-5 и БЛ-6) разного происхождения, и не имел достоверных отличий от значения *R* “материнского” штамма. Однако в митотическом потомстве штамма Каз-5 были выявлены субклоны, у которых доля ядер с геном *ToxA* увеличилась на 40% и более по сравнению с “материнским” штаммом. Ранее в казахстанской популяции нами были выявлены $ToxA^+$ -изоляты, дававшие в ПЦР со специфичными к гену *ToxA* праймерами продукт амплификации гораздо большего размера (около 2000 пн), чем ожидаемый (573 пн) [8]. Подобные случаи также отмечались другими исследователями [40]. Можно предположить, что продукты амплификации большего размера представляют собой дубликации гена *ToxA* у *P. tritici-repentis* посредством механизма трансдубликации [27].

Факт многокопийности гена *ToxB* усложняет выявление гетерокариоза у $ToxB^+$ -штаммов *P. tritici-repentis* и интерпретацию полученных данных по доле $ToxB^+$ -ядер. Среднее значение *R* по гену *ToxB* в митотическом потомстве штаммов *P. tritici-repentis* греческой популяции не имело достоверных отличий от значения *R* соответствующего “материнского” штамма. Тем не менее в митотическом потомстве Гр-2 выявлен самый широкий диапазон варьирования величины *R* по гену *ToxB* —

от 1.06 до 2.65, при самом высоком среди штаммов греческой популяции значении *R* “материнского” штамма — 1.78. Подобную вариабельность можно объяснить параллельным существованием двух генетических процессов: дубликации *ToxB* в отдельных ядрах при постоянном элиминировании $ToxB^+$ -ядер за счет селективного преимущества $ToxB^-$ -ядер. Можно предположить, что в мицелии гриба присутствуют ядра с разным количеством копий *ToxB*, соотношение которых в новых сформированных конидиях и выросших из них культурах будут разным вследствие различий в скорости деления ядер и других неизвестных причин.

Анализ митотического и мейотического потомств одного штамма *P. tritici-repentis* из северо-западной популяции продемонстрировал более широкую вариабельность признака *R* для гена *ToxA* среди моноаскоспоровых потомков (от 0.94 до 1.26), чем среди субклонов (от 0.93 до 1.11) при сходных средних значениях *R*.

Как мы отмечали в предыдущем нашем исследовании, гомоталличный способ размножения *P. tritici-repentis* способствует сохранению гена *ToxA* как чужеродной транслокации [33]. Однако выявленный полиморфизм ядер по гену *ToxA* среди аскоспоровых клонов штамма БЛ-6 логично объяснить происхождением данных аскоспор в результате гетероталличного скрещивания. Гипотеза о псевдогомоталличной природе изолятов *P. tritici-repentis* была высказана нами ранее [33]. Другими исследователями также отмечается, что скрещивания между изолятами *P. tritici-repentis* происходят с низкой частотой [41]. Остается неизвестным, насколько широко распространены “гетероталличные” скрещивания *P. tritici-repentis* в природе. С другой стороны, между конидиями часто наблюдали анастомозы в период их прорастания и проникновения в растение, т. е. через 17–24 ч после инокуляции; среди 22-х проанализированных изолятов в 19 обнаружили анастомозы [27]. Логично предположить, что в результате анастомозов происходит перемещение ядер, что ведет к образованию гетерокариотичного мицелия. В нашей работе мы доказали, что мицелий гриба включает генетически неоднородные ядра, которые размножаются с разной скоростью, конкурируют между собой, в результате чего штаммы отличаются друг от друга по соотношению генетически различных ядер в мицелии.

Полученные результаты позволяют по-новому взглянуть на проблемы в изучении изменчивости грибов — селекцию ядер в гетерокарионах и проблему индивидуальности у грибов [42]. В данной работе нам удалось на молекулярном уровне продемонстрировать появление митотических и мейотических потомков с различным соотношением разнокачественных ядер у гетерокариотичного

гриба *P. tritici-repentis*. Интересно, что на материале штаммов из природных популяций мы не наблюдали преимущества в размножении для ядер, несущих гены-эффекторы, скорее наоборот, они составляли меньшую часть от общего пула ядер. Анализ субклонов отдельных штаммов, различающихся по копийности генов-эффекторов, подтвердил предположение, что уровень полиморфизма гаплоидных ядер является специфичным для каждого штамма.

При исследовании гетерокариотичности у гриба *Rhizophagus irregularis* была обнаружена более высокая вариабельность между ядрами в кодирующих участках ДНК, по сравнению с некодирующими, что, по мнению авторов, указывает на “функциональную важность” генетического полиморфизма ядер у штаммов *R. irregularis* [39]. В этом контексте, функциональная роль полиморфизма ядер для жизнеспособности штаммов *P. tritici-repentis* в составе популяции требует дальнейшего изучения. Выявленные нами ранее различия между штаммами *P. tritici-repentis* по экспрессии генов *ToxA* и фактора транскрипции *PtrPj2* как *in vitro*, так и *in planta* [43, 44] могут быть связаны с долей ядер, несущих эти гены, в общем пуле ядер у отдельных изолятов.

В заключение считаем нужным подчеркнуть значимость гетерокариоза для фитопатогенных грибов в процессах адаптации, освоения новых растений-хозяев и обмена генетической информацией посредством ГПГ. Именно конкуренция ядер в процессе размножения мицелия и образования конидий приводит к формированию конидий с отличающимся соотношением ядер, несущих разные генетические детерминанты. Этот механизм может влиять на экспрессию генов и иметь фенотипическое выражение в агрессивности и патогенности изолятов. Вопрос о конкуренции ядер в гетерокарионе в процессе заражения растения остается открытым и требует дальнейших исследований.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 18-04-00128а).

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. Ciuffetti L.M., Manning V.A., Pandelova I. et al. Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction // *New Phytologist*. 2010. V. 187. № 4. P. 911–919. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03362.x>
2. Faris J.D., Liu Z., Xu S.S. Genetics of tan spot resistance in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2013. V. 126. P. 2197–2217. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2157-y>
3. Ciuffetti L.M., Tuori R.P., Gaventa J.M. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat // *The Plant Cell*. 1997. V. 9. P. 135–144. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.135>
4. Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z. et al. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer // *Nature Genetics*. 2006. V. 38. № 8. P. 953–956. <https://doi.org/doi.org/10.1038/ng1839>
5. Faris J.D., Zhang Z., Lu H.J. et al. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens // *PNAS USA*. 2010. V. 107. P. 13544–13549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004090107>
6. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Михайлова Л.А. Частота гена *ToxA* в популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и северо-западе России // *Микол. и фитопатол.* 2015. Т. 49. № 5. С. 325–329.
7. Kamel S., Cherif M., Hafez M. et al. *Pyrenophora tritici-repentis* in Tunisia: Race structure and effector genes // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. Article 1562. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01562>
8. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М. Характеристика географически отдаленных популяций *Pyrenophora tritici-repentis* по вирулентности и генам токсинообразования *ToxA* и *ToxB* // *Вестник защиты растений*. 2019. Т. 1. С. 24–29. [https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1\(99\)-24-29](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1(99)-24-29)
9. Abdullah S., Sehgal S.K., Ali S. Race diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* in South Dakota and response of predominant wheat cultivars to tan spot // *J. Plant Pathol. Microbiol.* 2017. V. 8. № 5. P. 1–7. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000409>
10. Aboukhaddour R., Turkington T.K., Strelkov S.E. Race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* (tan spot of wheat) in Alberta, Canada // *Can. J. Plant Pathol.* 2013. V. 35. № 2. P. 256–268. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.782470>
11. Ballance G.M., Lamari L., Kowatsch R., Bernier C.C. Cloning expression and occurrence of the gene encoding the Ptr necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* // *Mol. Plant Pathol.* 1996. On-line: www.bspp.org.uk/mppol/1996/1209ballance.
12. Aboukhaddour R., Cloutier S., Balance G.M., Lamari L. Genome characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates reveals high plasticity and independent chromosomal location of *ToxA* and *ToxB* // *Mol. Plant Pathol.* 2009. V. 10. P. 201–212. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00520.x>
13. Strelkov S.E., Lamari L. Host-parasite interaction in tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* of wheat // *Can. J. Plant Pathol.* 2003. V. 25. P. 339–349. <https://doi.org/10.1080/07060660309507089>
14. Martinez J.P., Oesch N.W., Ciuffetti L.M. Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, *ToxB*, in pathogenic and nonpathogenic isolates of

- Pyrenophora tritici-repentis* // MPMI. 2004. V. 17. № 5. P. 467–474.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.5.467>
15. Momeni H., Aboukhaddour R., Javan-Nikkhah M. et al. Race identification of *Pyrenophora tritici-repentis* in Iran // J. Plant Pathol. 2014. V. 96. P. 287–294.
<https://doi.org/10.4454/JPP.V96I2.036>
 16. Antoni E.A., Rybak K., Tucker M.P. et al. Ubiquity of *ToxA* and absence of *ToxB* in Australian populations of *Pyrenophora tritici-repentis* // Australas. Plant Pathol. 2010. V. 39. P. 63–68.
<https://doi.org/10.1071/AP09056>
 17. Ali S., Gurung S., Adhikari T.B. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas // Plant Dis. 2010. V. 94. P. 229–235.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0229>
 18. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М. и др. Генетическая структура популяций *Pyrenophora tritici-repentis*, существующих на территории России, по микросателлитным маркерам // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 885–894.
<https://doi.org/10.7868/S0016675816080099>
 19. Hunger R.M., Brown D.A. Colony color, growth, fungicide sensitivity, and pathogenicity of *Pyrenophora tritici-repentis* // Plant Dis. 1987. V. 71. P. 907–910.
<https://doi.org/10.1094/PD-71-0907>
 20. Benslimane H., Aouali S., Khalfi A. et al. In vitro morphological characteristics of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates from several Algerian agro-ecological zones // Plant Pathol. J. 2017. V. 33. P. 109–117.
<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2015.0189>
 21. Михайлова Л.А., Тернюк И.Г., Мироненко Н.В. Структура популяций *Pyrenophora tritici-repentis* из европейской части России по признаку вирулентности // Микол. и фитопатол. 2007. Т. 41. № 3. С. 269–275.
 22. Михайлова Л.А., Тернюк И.Г., Мироненко Н.В. Характеристика популяций *Pyrenophora tritici-repentis* по признаку вирулентности // Микол. и фитопатол. 2010. Т. 44. № 3. С. 263–272.
 23. Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Популяции *Pyrenophora tritici-repentis* на северном Кавказе и северо-западе России: расовый состав и динамика вирулентности // Микол. и фитопатол. 2014. Т. 48. № 6. С. 393–400.
 24. Mironenko N.V., Timopheeva E.N., Mikhailova L.A. et al. Intraspecific genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (*Drechslera tritici-repentis* [Died.] Shoem.) detected by random amplified polymorphic DNA assays // Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz. 2007. V. 40. № 6. P. 431–440.
<https://doi.org/10.1080/03235400600627965>
 25. Leisová L., Hanzalová A., Kucera L. Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP analysis // J. Plant Pathol. 2008. V. 90. P. 233–245.
<https://doi.org/10.4454/jpp.v90i2.658>
 26. Gurung S., Short D.P.G., Adhikari T.B. Global population structure and migration patterns suggest significant population differentiation among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* // Fungal. Genet. Biol. 2013. V. 52. P. 32–41.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.01003>
 27. Manning V.A., Pandelova I., Dhillon B. et al. Comparative genomics of a plant-pathogenic fungus, *Pyrenophora tritici-repentis*, reveals transduplication and the impact of repeat elements on pathogenicity and population divergence // G3 (Bethesda). 2013. V. 3. P. 41–63.
<https://doi.org/10.1534/g3.112.004044>
 28. Moolhuijzen P., See P.T., Hane J.K. et al. Comparative genomics of the wheat fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* reveals chromosomal variations and genome plasticity // BMC Genomics. 2018. V. 19. P. 279.
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4680-3>
 29. Левитин М.М. Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов. Л.: Агропромиздат, 1986. 208 с.
 30. Daboussi M.J. Fungal transposable elements and genome evolution // Evolution and Impact of Transposable Elements. Contemporary Issues in Genetics and Evolution. Volume 6 / Ed. Capy P., Dordrecht: Springer, 1997. P. 253–260.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-4898-6_25
 31. Tsushima A., Gan P., Kumakura N. Genomic plasticity mediated by transposable elements in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum* // Genome Biol. Evol. 2019. V. 11. P. 1487–1500.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evz087>
 32. Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti L.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification // Phytopathol. 2007. V. 97. P. 694–701.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-6-0694>
 33. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М. Роль полового процесса в сохранении чужеродной транслокации гена *ToxA* в геноме *Pyrenophora tritici-repentis* // Микол. и фитопатол. 2019. Т. 53. № 2. С. 115–123.
<https://doi.org/10.1134/S0026364819020077>
 34. Михайлова Л.А., Гультаева Е.И., Кокорина Н.М. Лабораторные методы культивирования возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora tritici-repentis* // Микол. и фитопатол. 2002. Т. 36. № 1. С. 63–67.
 35. Murray H.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Nucl. Ac. Res. 1980. V. 8. P. 4321–4325.
<https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
 36. Rybak K., See P.T., Phan H.T. et al. A functionally conserved Zn2Cys6 binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and hostspecific virulence of two major *Pleosporales* fungal pathogens of wheat // Mol. Plant Pathol. 2017. V. 18. P. 420–434.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12511>
 37. Solomon P.S., Ipcho S.V., Hane J.K. et al. A quantitative PCR approach to determine gene copy number // Fungal Genet. Rep. 2008. V. 55. Article 2.
<https://doi.org/10.4148/1941-4765.1082>
 38. Livak K., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method // Methods. 2001. V. 25.

- P. 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
39. Wyss T., Masclaux F.G., Rosikiewicz P. et al. Population genomics reveals that within-fungus polymorphism is common and maintained in populations of the mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* // ISME J. 2016. V. 10. P. 2514–2526.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2016.29>
40. Lepoint P., Renard M.E., Legreve A. et al. Genetic diversity of the mating type and toxin production genes in *Pyrenophora tritici-repentis* // Phytopathol. 2010. V. 100. P. 474–483.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-5-0474>
41. McCallum B.D., Bernier C.C., Lamari L. Generation and utilization of chemical-resistant mutants in *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot of wheat // Can. J. Bot. 1994. V. 72. P. 100–105.
<https://doi.org/10.1139/b94-014>
42. Захаров И.А., Мироненко Н.В. Гетерокариоз и проблемы структуры популяций грибов // Микол. и фитопатол. 1983. Т. 17. № 5. С. 414–424.
43. Мироненко Н.В., Орина А.С., Коваленко Н.М. Межштаммовые различия *Pyrenophora tritici-repentis* по экспрессии генов *ToxA* и *PtrPf2* в культуре // Генетика. 2020. Т. 56. № 4. С. 488–492.
<https://doi.org/10.31857/S0016675820040086>
44. Мироненко Н.В., Орина А.С., Коваленко Н.М. Экспрессия генов *ToxA* и *PtrPf2* фитопатогенного гриба *Pyrenophora tritici-repentis* в начале инфекционного процесса // Экол. генетика. 2020. Т. 18. № 2. С. 19–25.
<https://doi.org/10.17816/ecogen16362>

Nuclear Genetic Polymorphism in *Pyrenophora tritici-repentis* Strains for *ToxA* and *ToxB* Effector Genes

N. V. Mironenko^{a,*}, A. S. Orina^a, and N. M. Kovalenko^a

^aAll-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, 196608 Russia

*e-mail: nina2601mir@mail.ru

Pyrenophora tritici-repentis is phytopathogenic fungus which forms specific phytotoxins encoded by the *ToxA* and *ToxB* genes. The aim of the study was to identify the genetic nuclear polymorphism on *ToxA* and *ToxB* genes as the evidence of the heterokaryotic condition of *P. tritici-repentis* strains. The novelty of the study was the evaluation of proportion of nuclei with the *ToxA* or *ToxB* gene relative to total pool of nuclei with the reference gene *Act1* by quantitative PCR for detection of the heterokaryons. Twenty-one *P. tritici-repentis* strains from three geographical populations, as well as mitotic (conidial) and meiotic generations of individual strains (103 subclones) were analyzed in the study. The proportion of nuclei with the *ToxA* gene in 70% of *P. tritici-repentis* *ToxA*⁺ strains from the Kazakhstan population was in range of 0.24–0.65, which indicated their heterokaryotic state. In the Greek population 20% of *P. tritici-repentis* *ToxB*⁺ strains characterized by the proportion of nuclei with *ToxB* gene higher significantly than 1 were detected, while at least 40% of the strains were also heterokaryotic. Probably the proportion of nuclei with effector genes is a genetically inherited trait. A low polymorphism of the proportion of nuclei with effector genes among mitotic generation was revealed. Whereas, a broader variability of the proportion of nuclei with *ToxA* among meiotic generation was revealed. The functional role of nuclear polymorphism for the life of *P. tritici-repentis* isolates in the population requires further study.

Keywords: fungi, *Pyrenophora tritici-repentis*, heterokaryons, effector gene, quantitative PCR, proportion of nuclei.

ПРИМЕНЕНИЕ SRAP-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ РОССИЙСКИХ СОРТОВ ЛЮЦЕРНЫ

© 2021 г. А. О. Шамустакимова¹, Ю. М. Мавлютов¹*, И. А. Клименко¹

¹Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса ФНЦ “ВИК им. В.Р. Вильямса”,
Московская обл., Лобня, 141055 Россия

*e-mail: yulian92@mail.ru

Поступила в редакцию 02.06.2020 г.

После доработки 28.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Проведена оценка 17 сортов и одного сортообразца люцерны с использованием маркерной системы SRAP (*sequence-related amplified polymorphism*) с целью определения ее эффективности для сортовой идентификации. Из 25 протестированных комбинаций SRAP-маркеров семь оказались информативными для выявления ДНК-полиморфизма в исследуемых сортах. Эти комбинации генерировали 129 ПЦР-продуктов с уровнем полиморфизма от 21 до 50%. Для 14 сортов удалось выявить специфические продукты амплификации с целью последующей разработки генетических паспортов.

Ключевые слова: люцерна, SRAP-маркеры, полиморфизм ДНК, генетическое разнообразие, геном.

DOI: 10.31857/S0016675821050118

Люцерна является важнейшей сельскохозяйственной культурой, которая возделывается в качестве источника высококачественного белкового корма для всех видов скота и птицы [1]. Род люцерны насчитывает более 100 видов, из которых наиболее значимыми на территории Российской Федерации являются четыре: люцерна изменчивая (*Medicago varia* Mart.), люцерна посевная (*M. sativa* L.), люцерна желтая (*M. falcata* L.) и люцерна хмелевидная (*M. lupulina* L.). На их основе создана система сортов, обладающих высокой урожайностью и устойчивостью к болезням и вредителям [1, 2]. С целью успешного решения практических задач, связанных с использованием новых сортов в кормопроизводстве, для развития семеноводства, а также для обеспечения правовой защиты селекционных достижений необходима надежная система идентификации [3, 4].

Современные подходы анализа генетического разнообразия, основанные на полимеразной цепной реакции, позволяют идентифицировать виды и сорта различных культур, в частности с целью последующей паспортизации [5]. При этом одной из главных проблем является адекватный подбор маркерной системы, соответствующей основным требованиям и задачам исследования. Среди важнейших характеристик маркерной системы, необходимых при анализе генетического разнообразия, можно выделить уровень полиморфизма, принцип наследования маркера, а также воспроизводимость полученных результатов [6]. Особый

интерес в настоящий момент представляет маркерная система SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*), основанная на амплификации открытых рамок считывания (*Open reading Frame, OR*), или интрон-экзонных областей генома. Длина SRAP-праймеров, используемых для этого метода, составляет 17–18 нуклеотидов. Коровая последовательность содержит 13–14 оснований, включающих неспецифический участок из 10–11 нуклеотидов на 5'-конце, а также GC-богатый регион в прямом праймере и AT-богатый — в обратном. Вариабельность продуктов ПЦР достигается за счет использования обратного праймера, нацеленного на некодирующую область генома, обладающую низкой консервативностью [7]. SRAP-маркерная система на данный момент успешно используется в ряде исследований: для изучения генетического разнообразия и описания зародышевой плазмы [8], разработки генетических карт [9], идентификации генов, отвечающих за целевой признак [10], контроля гибридизации [11] и сравнительного геномного анализа [12].

Цель исследования — ДНК-идентификация российских сортов люцерны с использованием SRAP-маркеров для последующей паспортизации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и ДНК-экстракция. В исследовании использовали 17 сортов и один перспективный сортообразец люцерны российской

Таблица 1. Перечень исследуемых сортов люцерны

№	Аббревиатура	Сорт	Вид	Оригинатор
1	ЛГВ	Луговая 67	<i>Medicago varia</i> Mart.	ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса
2	ВГА	Вега 87		То же
3	ЛДА	Лада		»
4	АГН	Агния		ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса ООО “НТЦ Травы Сибири”
5	КМЛ	Камелия		Пензенский НИИСХ
6	ВРЖ	Воронежская 6		ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса
7	ВЛД	Влада		НИИСХ Юго-Востока
8	СЛН	Селена		ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса
9	ТСА	Таисия		То же
10	ВЕЛ	Вела		»
11	СРГ	Сарга		УрФАНИЦ УрО РАН
12	ПСА	Пастбищная 88		ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса
13	А2	А2		То же
14	НКА	Находка		»
15	БЛД	Благодать		»
16	ТМБ	Тамбовчанка	<i>Medicago sativa</i> L.	ОНО “Моршанская селекционная станция”
17	УЗН	Узень		НИИСХ Юго-Востока
18	МРА	Мира	<i>Medicago lupulina</i> L.	ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности SRAP-праймеров, использованных для выявления ДНК-полиморфизма в сортах люцерны

Прямой праймер (F)	Последовательность праймера (5' → 3')	Обратный праймер (R)	Последовательность праймера (5' → 3')
F9	GTAGCACAAGCCGGACC	R9	GACTGCGTACGAATTTCA
F13	CGAATCTTAGCCGGCAC	R7	GACTGCGTACGAATTGAG
Me4	CGAATCTTAGCCGGAAT	Em2	GACTGCGTACGAATTCGG
F10	GTAGCACAAGCCGGAAG	R14	CGCACGTCCGTAATTAAC
F11	CGAATCTTAGCCGGATA	R8	GACACCGTACGAATTGAC

селекции (табл. 1), принадлежащих к разным видам: *Medicago varia* Mart. ($N = 15$), *Medicago sativa* L. ($N = 2$), *Medicago lupulina* L. ($N = 1$). Экспериментальная работа по генотипированию сортов проводилась на семидневных проростках (по 30 шт. на образец), выращенных в чашках Петри. Тотальную геномную ДНК выделяли с помощью модифицированного SDS метода [13] и разбавляли до концентрации 20 нг/мкл.

SRAP-анализ. В исследовании использовали пять прямых и пять обратных SRAP-праймеров, образующих в общей сложности 25 комбинаций (табл. 2).

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10× Taq Turbo buffer, 50× dNTP mix, 5 U Taq-ДНК полимеразы, а также по 0.2 мкМ каждого праймера и 20 нг ДНК. Амплификация осуществлялась на приборе “Bio-Rad iCycler, USA” в соответствии с условиями, предложенными Li и Quiros [7] с внесением некоторых модификаций. Детекция результатов ПЦР проводилась путем электрофореза в 1.6%-ном агарозном геле. Для оценки размера фрагментов продуктов амплификации использовался молекулярный маркер 1kb DNA Ladder (“Евроген”, Россия). Визуализация фрагментов амплификации проводилась на приборе “Gel Doc™ XR+” (Bio-Rad, USA).

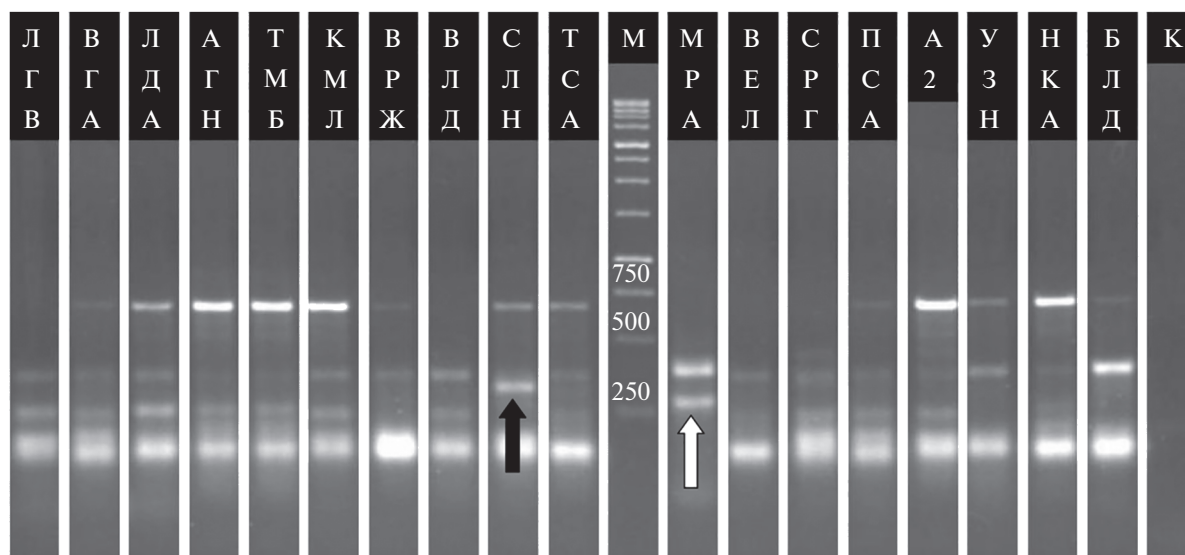


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК сортов люцерны с комбинацией SRAP-праймеров F10-R7. Расшифровка аббревиатур дана в табл. 1.

Анализ данных. Размер продуктов амплификации определяли с использованием программы Image Lab. Для каждой праймерной пары были составлены бинарные матрицы. Показатели генетического разнообразия рассчитывали с помощью программы PopGene. Определяли: эффективное число аллелей на локус, индекс Шеннона, индекс генетического разнообразия, индекс генетического сходства и дистанции Нея. На основе данных генетических дистанций Нея составлена дендрограмма методом невзвешенной попарной группировки с усреднением UPGMA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

SRAP-анализ. В нашем исследовании семь из 25 протестированных комбинаций SRAP-праймеров генерировали четкие и воспроизводимые продукты амплификации на большинстве тестируемых сортов люцерны.

Показатели генетического разнообразия сортового материала, полученные с помощью семи информативных праймерных пар, представлены в табл. 3. В общей сложности с использованием SRAP-маркеров удалось выявить 129 воспроизводимых ПЦР-продуктов длиной от 50 до 708 пн, из которых 41 оказался полиморфным. Количество полученных ПЦР-фрагментов на одну комбинацию SRAP-маркеров варьировало от девяти до 27 при среднем показателе 18.4 ампликона на праймерную пару. Число полиморфных бэндов составляло от 3 до 9, в среднем 5.9 – на комбинацию праймеров. Наибольшее количество полиморфных продуктов (9) было получено с праймерами F13-R7. Уровень полиморфизма при использова-

нии данной комбинации составил 50%. Эффективное число аллелей (N_e) находилось в диапазоне от 1.2637 до 1.4367. Коэффициент генетического разнообразия по Нею составил от 0.1941 (F13-R7) до 0.2716 (F13-R9) со средним значением 0.2503. Индекс разнообразия Шеннона варьировал от 0.3357 до 0.4305 со средней 0.4038.

На рис. 1 представлена электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с использованием пары праймеров F10-R7, где черной стрелкой обозначен специфический ампликон для сорта Селена (316 пн), белой стрелкой – для сорта Мира (275 пн).

На базе бинарных матриц подсчитали индексы генетического сходства и дистанции Нея для выявления филогенетических отношений между сортами (табл. 4). Наименьший коэффициент генетического сходства (0.6667) был обнаружен между сортами Сарга и Лада, а также Пастбищная и Тамбовчанка. Наибольший (0.8837) – между образцами Камелия и Воронежская 9. Наименьшие генетические дистанции (0.1236) наблюдались между сортами Камелия и Воронежская.

Дендрограмма, полученная по методу UPGMA (рис. 2), позволила выявить пять кластеров и подгрупп. В первую группу вошли сорта Луговая 67 и Вега 87. Вторая группа представлена тремя подгруппами, а именно: 2а – Лада, Агния и Тамбовчанка; 2б – Камелия, Воронежская, 2в – Влада, Таисия и Селена. В третью группу вошел сорт люцерны хмелевидной Мира. Четвертая группа включает такие сорта как Вела и Сарга, выделившиеся в подгруппу 4а, Пастбищная 88 и А2 – подгруппа 4б. Пятая группа представлена тремя сортами – Узень, Находка, Благодать. Проведенный

Таблица 3. Показатели изменчивости при анализе сортов люцерны с использованием SRAP-маркеров

Праймерная пара	Последовательности праймеров (5'-3')	Размер ПЦР-продукта (пн)	Общее количество ПЦР-продуктов	Количество полиморфных продуктов	Процент полиморфных продуктов	Эффективное число аллелей (N _e)	Индекс генетического разнообразия по Нею (H _e)	Индекс Шеннона (I)
F9-R9	GTAGCACAAGCCGGACC GACTGCGTACCGAATTCA	105-490	25	7	28	1.3498	0.2368	0.3882
F9-R8	GTAGCACAAGCCGGACC GACACCGTACCGAATTGAC	125-385	14	3	21	1.4102	0.2654	0.4235
F13-Em2	CGAATCTTAGCCGGCACC GACTGCGTACCGAATTGGG	125-235	9	3	33	1.3925	0.2524	0.4050
F10-R7	GTAGCACAAGCCGGGAAG GACTGCGTACCGAATTGAG	165-708	16	6	38	1.4367	0.2685	0.4220
F10-R8	GTAGCACAAGCCGGGAAG GACACCGTACCGAATTGAC	145-708	27	8	30	1.3934	0.2634	0.4223
F13-R9	CGAATCTTAGCCGGCACC GACTGCGTACCGAATTCA	60-485	20	5	25	1.4230	0.2716	0.4305
F13-R7	CGAATCTTAGCCGGCACC GACTGCGTACCGAATTGAG	50-305	18	9	50	1.2637	0.1941	0.3357
Среднее			18.4	5.9	32	1.3813	0.2503	0.4038

Таблица 4. Индексы генетического сходства (над диагональю) и дистанции Нея (под диагональю)

	ЛГВ	ВГА	ЛДА	АГН	ТМБ	КМЛ	ВРЖ	ВЛД	СЛН	ТСА	МРА	ВЕЛ	СРГ	ПСА	А2	УЗН	НКА	БЛД
ЛГВ		0.7442	0.6744	0.7287	0.6744	0.7442	0.7364	0.7054	0.6899	0.7054	0.7132	0.7054	0.7287	0.7132	0.6977	0.6977	0.6744	0.6977
ВГА	0.2955		0.7287	0.7674	0.6977	0.7209	0.7442	0.7442	0.7132	0.7132	0.7364	0.7287	0.6899	0.7209	0.7674	0.6744	0.6822	0.6589
ЛДА	0.3939	0.3165		0.8217	0.8140	0.7597	0.7829	0.7674	0.7829	0.7519	0.7287	0.7209	0.6667	0.6822	0.7132	0.6822	0.6589	0.6357
АГН	0.3165	0.2647	0.1964		0.7442	0.7519	0.7752	0.7442	0.7597	0.7287	0.7364	0.7287	0.7364	0.7054	0.7364	0.7054	0.6822	0.6744
ТМБ	0.3939	0.3600	0.2059	0.2955		0.7752	0.7674	0.7054	0.7364	0.7364	0.7287	0.7364	0.6822	0.6667	0.7132	0.6977	0.6589	0.6357
КМЛ	0.2955	0.3272	0.2748	0.2851	0.2546		0.8837	0.7907	0.7752	0.7287	0.7364	0.6822	0.7054	0.7054	0.7364	0.7364	0.7132	0.7364
ВРЖ	0.3059	0.2955	0.2447	0.2546	0.2647	0.1236		0.8140	0.7984	0.7829	0.7442	0.7209	0.7132	0.7442	0.7287	0.7132	0.7054	0.7132
ВЛД	0.3490	0.2955	0.2647	0.2955	0.3490	0.2348	0.2059		0.8295	0.8760	0.7442	0.7829	0.7597	0.7597	0.7907	0.6822	0.7054	0.6977
СЛН	0.3712	0.3380	0.2447	0.2748	0.3059	0.2546	0.2251	0.1870		0.8140	0.7597	0.7674	0.7597	0.7597	0.7597	0.6822	0.7209	0.6822
ТСА	0.3490	0.3380	0.2851	0.3165	0.3059	0.3165	0.2447	0.1324	0.2059		0.7752	0.8140	0.7907	0.7597	0.7752	0.7132	0.7054	0.7287
МРА	0.3380	0.3059	0.3165	0.3059	0.3165	0.3059	0.2955	0.2955	0.2748	0.2546		0.7442	0.7364	0.7209	0.7364	0.7364	0.7287	0.7209
ВЕЛ	0.3490	0.3165	0.3272	0.3165	0.3059	0.3825	0.3272	0.2447	0.2647	0.2059	0.2955		0.8372	0.7287	0.8217	0.6977	0.7054	0.7132
СРГ	0.3165	0.3712	0.4055	0.3059	0.3825	0.3490	0.3380	0.2748	0.2748	0.2348	0.3059	0.1777		0.7829	0.7984	0.7209	0.7287	0.7209
ПСА	0.3380	0.3272	0.3825	0.3490	0.4055	0.3490	0.2955	0.2748	0.2748	0.2748	0.3272	0.3165	0.2447		0.8450	0.7209	0.7287	0.7364
А2	0.3600	0.2647	0.3380	0.3059	0.3380	0.3059	0.3165	0.2348	0.2748	0.2546	0.3059	0.1964	0.2251	0.1685		0.7364	0.7597	0.7364
УЗН	0.3600	0.3939	0.3825	0.3490	0.3600	0.3059	0.3380	0.3825	0.3825	0.3380	0.3059	0.3600	0.3272	0.3272	0.3059		0.8372	0.7519
НКА	0.3939	0.3825	0.4172	0.3825	0.4172	0.3380	0.3490	0.3490	0.3272	0.3490	0.3165	0.3490	0.3165	0.3165	0.2748	0.1777		0.8372
БЛД	0.3600	0.4172	0.4531	0.3939	0.4531	0.3059	0.3380	0.3600	0.3825	0.3165	0.3272	0.3380	0.3272	0.3059	0.3059	0.2851	0.1777	

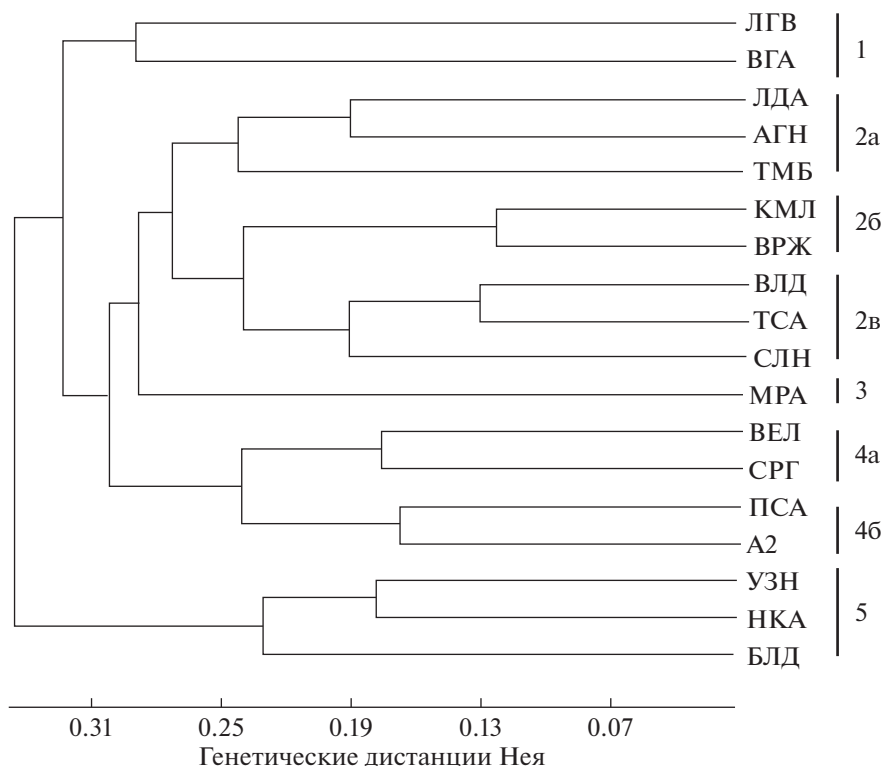


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма, основанная на значениях генетических дистанций Нея для исследуемых сортов люцерны.

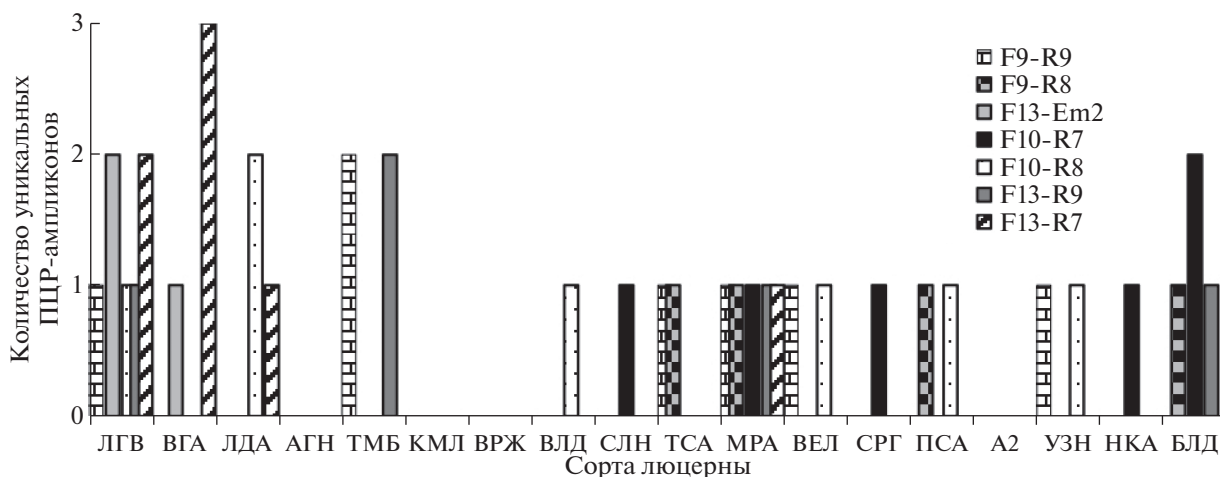


Рис. 3. Информативные комбинации SRAP-праймеров, выявляющие специфические ампликоны в сортах люцерны.

анализ позволил выявить специфические продукты амплификации для 14 из 18 исследуемых сортов (рис. 3).

Так, наибольшим числом комбинаций SRAP-праймеров ($N = 5$) удалось идентифицировать сорта Мира и Луговая 67. Для сортов Агния, Камелия, Воронежская и сортообразца А2 протестированные комбинации не образовали специ-

фических продуктов. Две пары праймеров (F9-R9 и F10-R8) обнаружили различия в шести исследуемых сортах. Комбинация F13-Em2 позволила идентифицировать два сорта: Луговая 67 и Вега 87. Для некоторых сортов с использованием одной комбинации праймеров одновременно было получено от двух (F13-Em2 и F13-R7 на сорте Луговая 67; F9-R9 на сорте Тамбовчанка; F10-R7 на

сорте Благодать; F10-R8 на сорте Лада) до трех специфических продуктов амплификации (F13-R7 на сорте Вега 87).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время исследования с использованием SRAP-маркеров проведены на большом количестве сельскохозяйственных культур [14, 15]. В частности, этот вид ДНК-маркеров применяется для изучения генетического разнообразия зарубежных видов и сортов люцерны [16–20].

По результатам настоящей работы на сортах люцерны российской селекции уровень полиморфизма равнялся 31.7%. При этом его максимальное значение зафиксировано на комбинации праймеров F13-R7 (50%), а минимальное – на F9-R9 (28%), что свидетельствует о различной эффективности праймерных пар на исследуемых сортах. Эти показатели различаются с данными других авторов. В частности, при изучении генетического разнообразия 15 популяций люцерны [16] уровень полиморфизма составил 90%. В исследованиях Н.В. Rhoima с соавт. [17] анализировались сорта и естественные популяции из Туниса, Казахстана, Сербии, Австралии и США с помощью SRAP-маркеров. В этом случае процент полиморфизма достигал 100%. При изучении сортов люцерны из Саудовской Аравии уровень полиморфизма равнялся 98.3% [18]. В работах 2011 г., проведенных на иранских [19] и китайских [20] сортах люцерны, уровень полиморфизма составил 49 и 40.93% соответственно. Полученные различия по-видимому могут быть связаны с высоким уровнем генетического сходства большинства исследуемых сортов (оригинатор ФНЦ “ВИК им. В.Р. Вильямса”).

Исходя из значения коэффициента генетического сходства, можно сделать вывод о наибольшей степени ДНК-полиморфизма между сортами Сарга и Лада, а также между Пастбищная 88 и Тамбовчанка (0.6667). При этом наибольшее сходство (0.8837) наблюдалось между сортами Камелия и Воронежская 9.

По значениям генетических дистанций Нея наиболее отдаленными оказались сорта Находка (ФНЦ “ВИК им. В.Р. Вильямса”) и Тамбовчанка (ОНО “Моршанская селекционная станция”). Это может быть обусловлено видовой принадлежностью этих сортов и различиями в происхождении. Наименьшая генетическая дистанция выявлена между сортами Камелия и Воронежская 9 (оба сорта отличаются повышенной зимостойкостью). Из 18 анализируемых образцов с использованием маркерной системы SRAP удалось выявить специфические продукты амплификации для 14 сортов. Это свидетельствует о высокой информативности тестируемой маркерной системы. Таким образом, маркерная система SRAP может использоваться

для ДНК-идентификации российских сортов люцерны с целью их последующей паспортизации.

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. Писковацкий Ю.М., Косолапов В.М., Михалев В.Е. и др. Агротехника возделывания сортов люцерны селекции ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса на семенные и кормовые цели. М.: ФГУ РЦСК, 2008. С. 3–15.
2. Veronesi F., Brummer E.C., Huyghe C. Alfalfa // Fodder Crops and Amenity Grasses. N.Y.: Springer, 2010. P. 395–437.
3. Чесноков Ю.В., Косолапов В.М. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса. М.: Угрешская типография, 2016. 172 с.
4. Писковацкий Ю.М., Ломова М.Г., Соложенцева Л.Ф. и др. Создание перспективного материала люцерны с высокой семенной продуктивностью // Научное обеспечение кормопроизводства и его роль в сельском хозяйстве, экономике, экологии и рациональном природопользовании России: Матер. междунар. науч.-практ. конф., посвя. памяти акад. А.А. Жученко (Лобня, 19–20 июня 2013 г.). М.: Угрешская типография, 2013. С. 97–103.
5. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавил. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 1044–1054.
6. Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений // Вавил. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 4. С. 757–767.
7. Li G., Quiros C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 103. № 2–3. P. 455–461. <https://doi.org/10.1007/s001220100570>
8. Osman G., Suleyman K., Kazim A. Diversity and relationships among Turkish okra germplasm by SRAP and phenotypic marker polymorphism // Biologia (Bratislava). 2007. V. 62. № 1. P. 41–45. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0010-y>
9. Lin Z., Zhang X., Nie Y. et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP // Chin. Sci. Bull. 2003. V. 48. № 19. P. 2064–2068. <https://doi.org/10.1360/03wc0193>
10. Luo Y.X., Du D.Z., Fu G. et al. Inheritance of leaf color and sequence-related amplified polymorphic (SRAP) molecular markers linked to the leaf color gene in *Brassica juncea* // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10. № 66. P. 14724–14730. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1096>

11. *Hao Q., Liu Z.A., Shu Q.Y. et al.* Studies on *Paonia* cultivars and hybrids identification based on SRAP analysis // *Hereditas*. 2008. V. 145. № 1. P. 38–47. <https://doi.org/10.1111/j.0018-0661.2008.2013.x>
12. *Guo D.L., Luo Z.R.* Genetic relationships of some PC-NA persimmons (*Diospyros kaki* Thumb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis // *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2006 V. 53. № 8. P. 1597–1603. <https://doi.org/10.1007/s10722-005-8717-5>
13. *Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B.* A plant DNA mini-preparation: version II // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983. V. 1. № 4. P. 19–21.
14. *Robarts D.W.H., Wolfe A.D.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology // *Appl. In Plant Sci.* 2014. V. 2. № 7. P. 1400017. <https://doi.org/10.3732/apps.1400017>
15. *Aneja B., Yadav N.R., Chawla V., Yadav R.C.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement // *Mol. Breeding*. 2012. V. 30. № 4. P. 1635–1648. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9747-2>
16. *Vandemark J.G., Ariss J.J., Bauchan G.A. et al.* Estimating genetic relationships among historical sources of alfalfa germplasm and selected cultivars with sequence related amplified polymorphisms // *Euphytica*. 2006. V. 152. № 1. P. 9–16. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9167-7>
17. *Rhouma H.B., Taski-Ajdukovic K., Zitouna N. et al.* Assessment of the genetic variation in alfalfa genotypes using SRAP markers for breeding purposes // *Chil. J. Agric. Res.* 2017. V. 77. № 4. P. 332–339. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000400332>
18. *Al-Faifi S., Migdadi H., Al-Doss A. et al.* Morphological and molecular genetic variability analyses of Saudi Lucerne (*Medicago sativa* L.) // *Crop and Pasture Sci.* 2013. V. 64. № 2. P. 137–146. <https://doi.org/10.1071/CP12271>
19. *Talebi M.B., Hajiahmadi Z., Rahimalek M.* Genetic diversity and population structure of four Iranian alfalfa populations revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers // *J. Crop. Sci. Biotech.* 2011. V. 14. № 3. P. 173–178. <https://doi.org/10.1007/s12892-011-0030-6>
20. *Yuan Q., Gao J., Gui Z. et al.* Genetic relationships among alfalfa germplasms resistant to common leaf spot and selected Chinese cultivars assessed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers // *Afr. J. Biotech.* 2011. V. 10. № 59. P. 12527–12534. <https://doi.org/10.5897/AJB11.901>

Application of SRAP Markers for DNA Identification of Russian Alfalfa Cultivars

A. O. Shamustakimova^a, Y. M. Mavlyutov^{a, *}, and I. A. Klimenko^a

^a*Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology (FWRC FPA), Moscow oblast, Lobnya, 141055 Russia*

**e-mail: yulian92@mail.ru*

This study was carried out to estimate genetic diversity between cultivars of alfalfa using SRAP marker system (*sequence-related amplified polymorphism*). We tested 25 combinations of SRAP markers and revealed that seven among them was informative for DNA polymorphism identification. These combinations generated 129 PCR products with the percentage of polymorphic bands per pair ranged from 21 to 50%. Specific amplification products were identified for 14 cultivars for genetic certification.

Keywords: genome, alfalfa, SRAP markers, DNA polymorphism, genetic diversity.

СТРУКТУРА И ПУТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГОРДЕИНОВ, КОНТРОЛИРУЕМЫХ АЛЛЕЛЯМИ ГОРДЕИН-КОДИРУЮЩИХ ЛОКУСОВ В КУЛЬТУРНОМ ЯЧМЕНЕ (*Hordeum vulgare* L.)

© 2021 г. А. А. Поморцев¹, *, А. В. Рубанович¹, Е. В. Лялина¹

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

*e-mail: pomortsev@vigg.ru

Поступила в редакцию 02.07.2020 г.

После доработки 03.08.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Методом электрофореза в крахмальном геле изучен полиморфизм гордеина в 2244 образцах ячменя. Выборка включала 1197 стародавних местных сортов из 22 стран, входящих в основные центры разнообразия ячменя и граничащих с ними, 428 сортов ячменя, возделывавшихся на территории бывшего СССР и Российской Федерации с 1929 по 2019 гг. и 619 сортов из стран Европы, Азии, Америки и Африки. По гордеинам, контролируемым аллелями локуса *Hrd A*, выявлено 156 вариантов блоков компонентов, локуса *Hrd B* – 271 вариант и локуса *Hrd F* – 5 вариантов. Основываясь на данных литературы о молекулярных механизмах формирования полиморфизма гордеинов и исследовании искусственных мутантов по гордеин-кодирующим локусам, среди вариантов гордеинов А и В выделены группы фенотипически схожих блоков компонентов – семейства блоков компонентов. Для HRD А выделено 12 семейств (AI–AXII), для HRD В – 17 семейств (BI–BXVII). Семейства существенно различаются по числу составляющих их вариантов блоков: для HRD А от 5 (AXII) до 60 (AI), для HRD В – от 3 (BXVII) до 41 (BXII). Сделано предположение, что семейства, включающие наибольшее число вариантов гордеинов А и В, являются наиболее древними в культурном ячмене. Показана мозаичность и неравномерность частот в распространении семейств вариантов HRD А и HRD В в исследованных местных популяциях из различных стран мира. Предполагается, что появление собственно семейств HRD А и HRD В обусловлено спонтанной гибридизацией между *H. vulgare* и *H. spontaneum* при распространении культурного ячменя. Сделан вывод, что полиморфизм гордеинов в культурном ячмене – результат спонтанной гибридизации культурного ячменя с диким предшественником и накоплением мутаций в генах локусов *Hrd A* и *Hrd B* у *H. vulgare*.

Ключевые слова: культурный ячмень, гордеин-кодирующие локусы, полиморфизм гордеина, семейства блоков компонентов гордеина.

DOI: 10.31857/S0016675821050088

Спирторастворимые белки зерна ячменя – гордеины – характеризуются уникальным разнообразием и по своей информативности не уступают AFLP- и RAPD-маркерам [1]. Наиболее полная информация по наследованию и генетическому контролю этих белков получена при использовании метода электрофореза гордеинов в крахмальном геле. Установлено, что электрофоретические компоненты гордеинов наследуются группами (блоками) и контролируются семью сцепленно наследуемыми локусами, локализованными в коротком плече хромосомы 5 (1Н) ячменя, обозначенными как: *Hrd A*, *Hrd B*, *Hrd C*, *Hrd D*, *Hrd E*, *Hrd F* и *Hrd G* (рис. 1). Локусы *Hrd C*, *Hrd D*, *Hrd E*, *Hrd F* и *Hrd G* контролируют отдельные компоненты гордеина и у большинства сортов не обнаружены. Три локуса – *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F* – яв-

ляются полиморфными [2–4]. При электрофорезе в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия выделяют четыре группы белковых полос: А, В, С и D. Группы полипептидов В, С и D контролируются локусами, обозначенным *Hor 2*, *Hor 1* и *Hor 3* соответственно [5, 6]. Локус *Hor 1* соответствует локусу *Hrd A*, локус *Hor 2* – локусу *Hrd B* [7]. Группа полипептидов А, которые при электрофорезе в крахмальном геле мигрируют в нижний буфер, по своему аминокислотному составу не являются гордеинами [8], а D-гордеины, не выявляемые при электрофорезе в крахмальном геле, и контролируемые локусом *Hor 3*, относятся к глютелинам [9]. Позднее Р.Р. Sewry с соавт. [10, 11], используя электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, подтвердили информацию

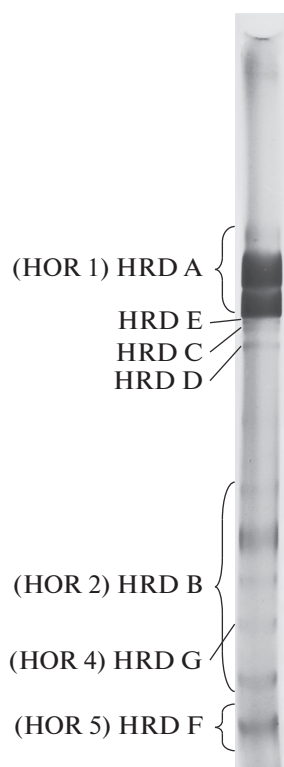


Рис. 1. Генетический контроль компонентов гордеина, выявляемых при электрофорезе в крахмальном геле.

о существовании локусов *Hrd F* и *Hrd G*, обозначив их как *Hor 5* и *Hor 4* соответственно.

Как видно из рис. 1, блоки компонентов гордеина, контролируемые локусами *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F*, на электрофореграмме пространственно разделены. Это позволяет как идентифицировать известные варианты блоков компонентов в анализируемых образцах ячменя, так и выделять новые варианты блоков компонентов, контролируемые аллелями указанных локусов при исследовании коллекции. Ранее, в результате электрофоретического анализа гордеинов в крахмальном геле в 619 сортах озимого и ярового ячменя из 27 стран Европы, Азии, Америки и Африки были идентифицированы 29 вариантов блоков компонентов, контролируемых аллелями локуса *Hrd A*, 34 – локуса *Hrd B* и 5 – локуса *Hrd F* [7]. Среди обнаруженных вариантов гордеинов А и В присутствовали группы блоков компонентов, различающиеся между собой по числу, подвижности или интенсивности отдельных белковых полос. Такие группы фенотипически схожих блоков компонентов были названы “семействами блоков компонентов”. Для гордеина А было выделено пять семейств блоков компонентов, для гордеина В – восемь семейств. Варианты гордеина F различались только по электрофоретической подвижности. При этом в отдельных сортах гордеин F отсутствовал (F0). Было высказано предполо-

жение, что локусы, контролирующие блоки компонентов, являются сложными и включают несколько генов, а возникновение семейств блоков компонентов гордеинов является следствием различного рода мутаций в генах, входящих в состав сложных локусов.

К настоящему времени информация о полиморфизме гордеинов в культурном ячмене существенно увеличилась. Кроме этого, в литературе появились сведения о молекулярной организации гордеин-кодирующих локусов. В настоящей работе приведены новые данные о полиморфизме гордеинов, контролируемых локусами *Hrd A* и *Hrd B*, обобщены сведения о молекулярной организации гордеин-кодирующих локусов, позволяющие понять механизмы формирования структуры полиморфизма гордеина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разнообразие запасных белков, контролируемых локусами *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F* в *H. vulgare*, изучали путем электрофоретического анализа гордеинов в 2244 образцах ячменя. Выборка включала: 1197 стародавних местных сортов из 22 стран, входящих в основные центры разнообразия ячменя и граничащих с ними государств, 228 сортов ярового ячменя, возделывавшихся на территории бывшего СССР с 1929 по 1991 гг., 200 сортов, допущенных к использованию в России с 1992 по 2019 гг. Кроме этого использовали полученные ранее данные по полиморфизму гордеинов в 619 сортах ярового и озимого ячменя из стран Европы, Азии, Америки и Африки [7] (табл. 1). Материал для исследований был получен: из Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), National Small Grains Research Collection USDA (Aberdeen, Idaho, США), Research Institute for Bioresources Okayama University (Япония), International Center for Agricultural Research in the Dry Areas – ICARDA (Алеppo, Сирия), кафедры селекции Самаркандского сельскохозяйственного института (Узбекистан), Памирского биологического института (Таджикистан, Хорог), ФГУ “Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений” Министерства сельского хозяйства РФ. Значительная часть образцов местных ячменей была собрана в начале XX в. экспедициями Н.И. Вавилова, Е.Г. Черняковской, А.К. Гольбека, В.Е. Писарева и других сотрудников ВИРа, а также экспедициями Д.Р. Харлана (J.R. Harlan). Коллекция местных ячменей из Узбекистана была собрана в 1930-е годы с приусадебных участков декхан селекционерами В.Н. Покровским и Ф.А. Квятковским. Для каждого образца местных ячменей анализировали гордеины в 5–

Таблица 1. Число исследованных образцов местных и коммерческих сортов культурного ячменя из различных стран

№ п/п	Страна	Число образцов	№ п/п	Страна	Число образцов
1	Марокко (образцы местного ячменя)	9	13	Иран (то же)	63
2	Алжир (то же)	22	14	Туркменистан (то же)	51
3	Тунис (то же)	7	15	Узбекистан (то же)	202
4	Египет (то же)	39	16	Таджикистан, Горный Бадахшан (то же)	3
5	Эфиопия (то же)	147	17	Киргизстан (то же)	47
6	Турция (то же)	93	18	Афганистан (то же)	84
7	Сирия (то же)	60	19	Пакистан (то же)	28
8	Иордания (то же)	34	20	Китай (то же)	96
9	Ирак (то же)	33	21	Непал (то же)	30
10	Палестина (то же)	8	22	Индия (то же)	47
11	Израиль (то же)	5	23	Сорта ячменя, районированные в СССР с 1929 по 1991 гг.	228
12	Йемен (то же)	89	24	Сорта ярового и озимого ячменя из стран Европы, Азии, Америки, Африки	619

10 линиях, а для селекционных сортов – в 40–100 линиях или индивидуальных зерновках.

Электрофорез гордеинов проводили в столбиках 12–14%-ного крахмального геля с 3 М мочевиной в алюминий-лактатном буфере с рН 3.1 по методике А.А. Созинова и Ф.А. Поперели [12] с некоторыми модификациями [13]. Анализ сходства исследованных местных популяций ячменя проводили методом главных компонент с помощью пакета программ SPSS 19.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате электрофоретического анализа гордеинов в 2244 образцах ячменя к настоящему времени обнаружено 156 вариантов блоков компонентов, контролируемых аллелями локуса *Hrd A* (рис. 2), 271 – локуса *Hrd B* и 5 – локуса *Hrd F* (рис. 3). Среди выявленного разнообразия гордеинов А мы выделяем группы фенотипически схожих вариантов блоков компонентов – семейства вариантов блоков компонентов. На рис. 4 в качестве примера приведены две такие группы блоков компонентов. Из рис. 4,а видно, что блок компонентов А100 отличается от А2 уменьшением подвижности компонента 4. Блок А30 отличается от А2 и А100 двойным компонентом 4. Вариант А9, в сравнении с А2, характеризуется снижением интенсивности компонента 1, увеличением подвижности компонента 2 и появлением двух минорных компонентов в районе компонента 4. У блока А149, в сравнении с А9, отсутствует компонент 4. Варианты А4 и А58 характеризуются отсутствием компонента 5 или уменьшением его электрофоретической подвижности, соответственно. Аналогичные

различия по числу компонентов гордеина А, их подвижности и относительной интенсивности наблюдаются между блоками компонентов на рис. 4,б. Формирование таких семейств можно продемонстрировать на следующем примере. При электрофоретическом анализе гордеинов в ряде мутантных по морфологическим признакам линий, полученных Г.Г. Шведовым (Селекционно-генетический институт, Одесса) путем химического мутагенеза из сорта Одесский 46, нами были обнаружены формы, электрофореграммы гордеина А которых представлены на рис. 5. Из рисунка видно, что на электрофореграмме А-гордеина мутантов М564 и М109 в сравнении с электрофореграммой гордеина исходного сорта, отсутствуют компоненты 6 и 3 соответственно, а у мутанта М88 – изменилась подвижность компонента 5. Таким образом, вариант блока гордеина А3 и его мутантные варианты составляют одно семейство. Каждый из этих вариантов в дальнейшем может служить исходным для возникновения новых вариантов блоков компонентов в результате мутаций.

Возникновение полиморфизма запасных белков злаков длительное время рассматривалось как результат посттрансляционных изменений, таких как агрегация, дезамидирование, протеолиз и гликозилирование. Однако экспериментальных данных, подтверждающих эти предположения, нет [14]. К настоящему времени известно, что группы полипептидов С- и В-гордеинов кодируются локусами *Hor 1* (*Hrd A*) и *Hor 2* (*Hrd B*), включающими несколько десятков генов [15, 16]. В результате анализа клонированных нуклеотидных последовательностей из различных сортов ячменя было показано, что гены в локусе *Hor 1* могут располагаться отно-

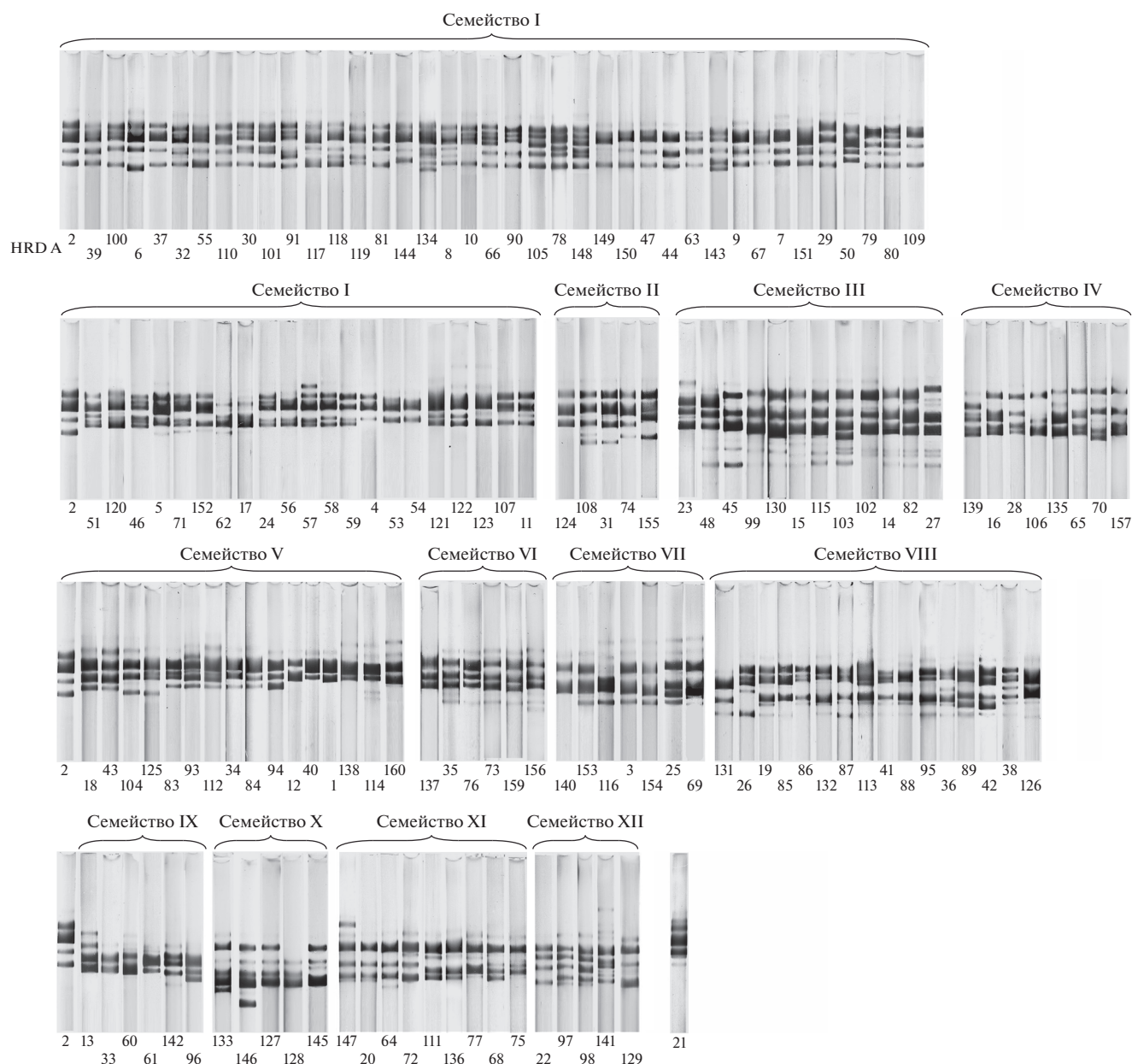


Рис. 2. Варианты блоков компонентов гордеина А, обнаруженные при анализе 2244 образцов культурного ячменя.

нительно друг друга по типу “голова к голове” в непосредственной близости друг от друга. Были также обнаружены различия длин кодирующих последовательностей (363–1000 пн), что является молекулярной основой полиморфизма размеров С-гордеинов [17]. Кроме этого степень различий зависит от замен только одной аминокислоты (заряженная/незаряженная), а также от делеций/инсерций отдельных триплетов или блоков. Не исключены значительные делеции кодирующей части генов С-гордеинов [17, 18]. Обработка у ряда сортов и дигаплоидных линий ячменя рестриктазами генов В-гордеинов, амплифицирован-

ных с использованием праймеров, гомологичных районам, фланкирующим кодирующие последовательности, выявила полиморфизм, обусловленный приобретением или потерей сайтов рестрикции как внутри, так и между генотипами. При амплификации с использованием праймеров, гомологичных районам внутри кодирующей последовательности и фланкирующих множественные тандемные повторы некоторых генов В-гордеина, была выявлена вариация по длине повторяющегося домена гена В-гордеина как внутри, так и между сортами. Эта изменчивость объясняется изменением числа тандемных повторов в повторяющемся до-

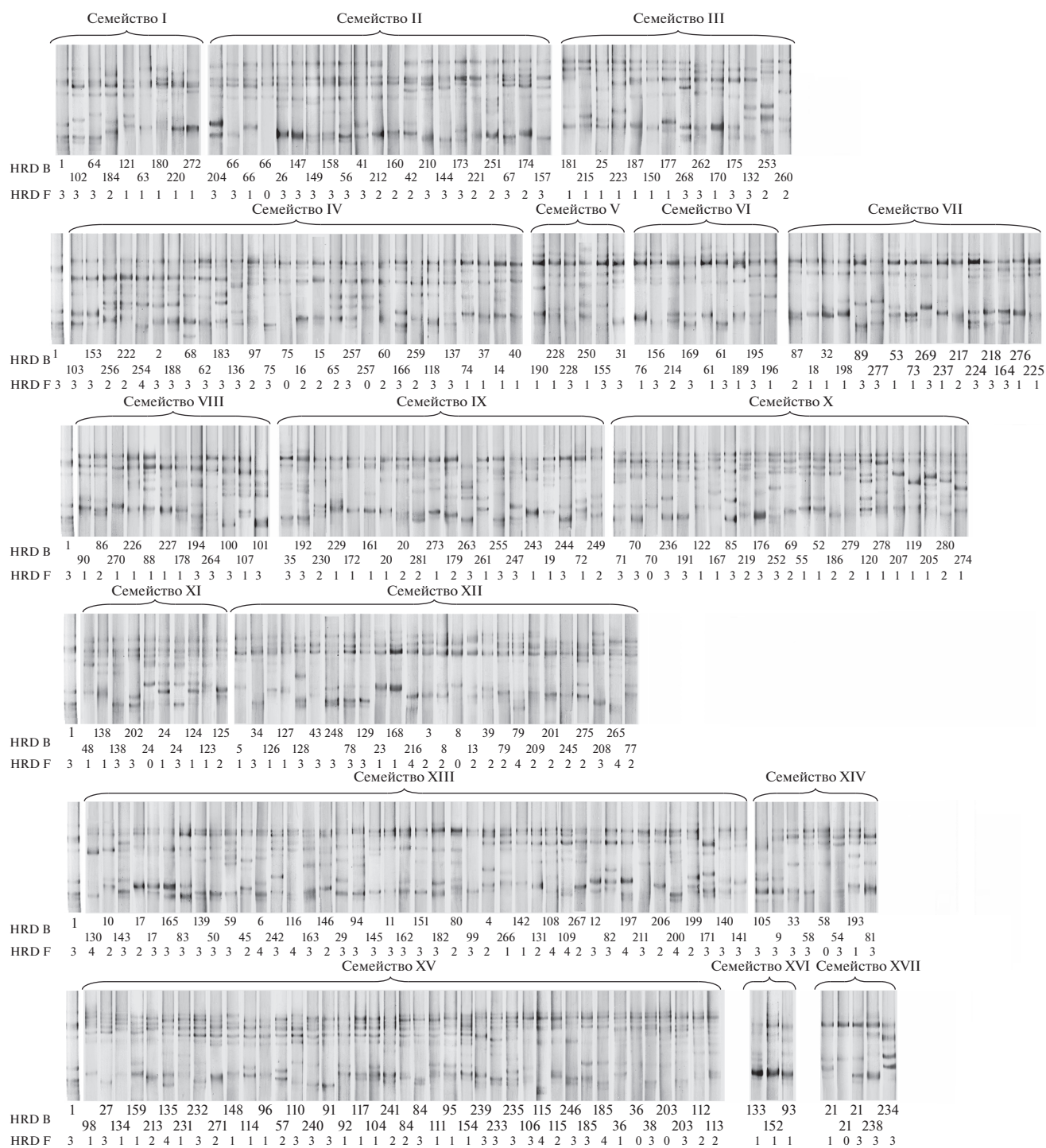


Рис. 3. Варианты блоков компонентов гордеина В, обнаруженные при анализе 2244 образцов культурного ячменя.

мене в результате неравного кроссинговера и проскальзывания нити ДНК (DNA-slippage) во время репликации [19]. Однако в литературе имеется информация только об одном доказанном рекомбинанте между генами в локусе *Hor 2* [19, 20]. Таким образом, наблюдаемый полиморфизм гордеинов ячменя определяется не посттрансляционными

изменениями белков, а различиями между генотипами на уровне ДНК.

Основываясь на данных о механизмах формирования полиморфизма гордеинов и фенотипическом сходстве электрофоретических спектров, 156 вариантов блоков компонентов, контролируемых аллелями локуса *Hrd A*, мы объединили в 12

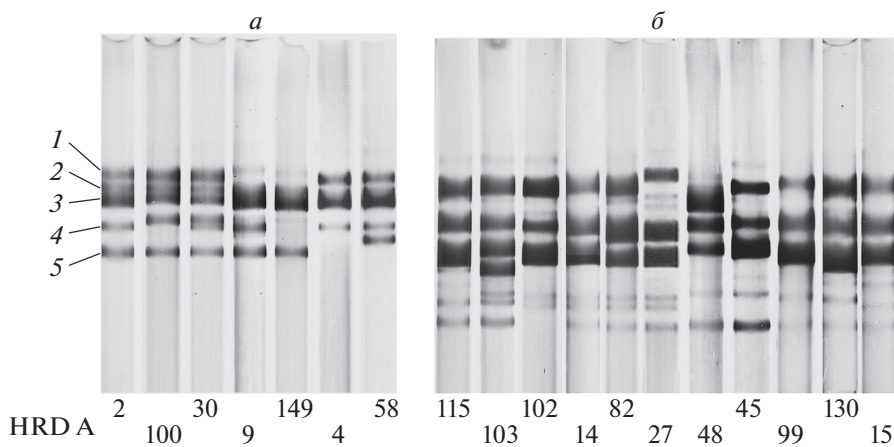


Рис. 4. Некоторые варианты фенотипически сходных блоков компонентов гордеина А, объединяемые в семейства: *a* – семейство I, *б* – семейство III.

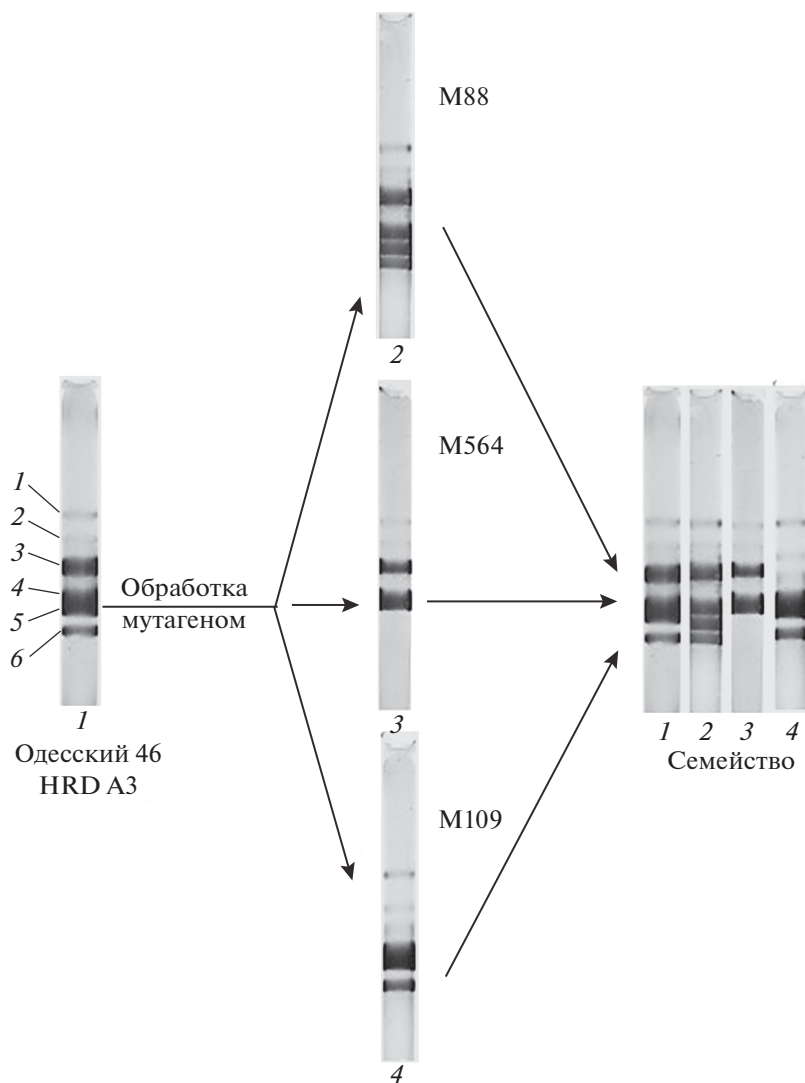


Рис. 5. Формирование семейства блоков компонентов гордеина А в результате химического мутагенеза.

Таблица 2. Число вариантов блоков компонентов гордеинов А и В, объединяемых в различные семейства

Семейства вариантов блоков компонентов гордеина А					
семейство	число вариантов	семейство	число вариантов	семейство	число вариантов
AI	*58/60	AVI	3/6	AXI	8/9
API	4/5	AVII	6/7	AXII	5/5
APII	9/12	AVIII	15/16	B2I	1/1
APIV	8/8	AIX	6/6	Всего	142(91%)/156
AV	14/16	AX	5/5		
Семейства вариантов блоков компонентов гордеина В					
BI	8/9	BVII	13/16	BXIII	35/41
BII	16/19	BVIII	10/12	BXIV	7/7
BIII	14/14	BIX	17/19	BXV	34/36
BIV	26/26	BX	17/22	BXVI	3/3
BV	5/5	BXI	7/7	BXVII	3/3
BVI	8/8	BXII	18/24	Всего	241(88.9%)/271

* В числителе – число вариантов блоков компонентов гордеинов А и В, обнаруженных только в местных сортах, в знаменателе – общее число вариантов блоков компонентов, обнаруженных как в местных, так и в селекционных сортах ячменя.

семейств, обозначенных римскими цифрами (AI–AXII). При этом вариант A2I не был отнесен ни к одному из семейств (табл. 2, рис. 2). Из табл. 2 следует, что семейства значительно различаются по числу входящих в них вариантов блоков компонентов. Самое большое семейство – AI – включает 60 (38.5%) вариантов. Сравнительно высокую численность имеют семейства APII – 12 (7.7%) вариантов, AV и AVIII – по 16 (10.3%) вариантов. Остальные восемь семейств объединяют от 5 (3.2%) до 9 (5.8%) вариантов. Таким образом, четыре семейства из двенадцати объединяют 66.8% известных вариантов блоков компонентов гордеина А.

Среди идентифицированных в *H. vulgare* 271 вариант гордеина В мы выделили 17 семейств (BI–BXVII) (рис. 3, табл. 2). Семейства вариантов гордеина В, как и семейства вариантов гордеина А, значительно различаются по числу входящих в них вариантов блоков компонентов. Наибольшее число вариантов объединяют семейства BXIII – 41 (15.1%) и BXV – 36 (13.3%). Сравнительно высокое число вариантов блоков включают так же семейства BIV – 26 (9.6%), BXII – 24 (8.9%), BX – 22 (8.1%), BII и BIX – по 19 (7.0%). Остальные десять семейств включают от 3 (1.1%) до 16 (5.9%) вариантов блоков компонентов гордеина В. Таким образом, семь семейств из семнадцати объединяют 69.0% вариантов HRD В, выделенных в культурном ячмене. Следует отметить, что от общего числа известных электрофоретических вариантов гордеинов А и В в исследованных местных популяциях ячменя обнаружено 91 и 88.9% вариантов блоков компонентов соответственно. Это на наш взгляд объясняется тем, что в основе генофонда современных селекционных сортов лежит генофонд

местных популяций ячменя. Однако в современной селекции ячменя с целью поиска новых хозяйственно ценных признаков используется мутагенез. Также в селекционный процесс вовлекается дикий ячмень *Hordeum spontaneum* С. Koch [21–23]. Здесь мы не рассматриваем распространение пяти вариантов HRD F, так как локус *Hrd F*, контролирующей эти белки, тесно сцеплен с локусом *Hrd B*, величина рекомбинации между ними составляет 1.5% рекомбинации [3].

Возникает вопрос о причинах столь значительных различий между семействами гордеинов А и В по числу входящих в них вариантов блоков компонентов, а также как и откуда в культурном ячмене возникли собственно семейства дискретные по фенотипу? В настоящее время установлено, что диким предшественником *H. vulgare* является *H. spontaneum* [24]. Однако время и место доместикации ячменя до сих пор не установлены. Так например J.R. Harlan и D. Zohary, опираясь на исследования археологов, выдвинули гипотезу, что ячмень был введен в культуру в Дуге Плодородия в VII тысячелетии до н. э. [25]. При этом наиболее раннее использование ячменя человеком в Юго-Западной Азии, датированное 17 тысячелетием до н. э., зафиксировано в Охало II (Ohalo II) около Галилейского моря [26]. В то же время зерна культурного ячменя, возраст которых оценивается в 18000 лет, найдены в археологических раскопках в южном Египте, около Асуана в районе Каббания [27]. Следует отметить, что количество и качество археоботанических доказательств значительно варьируют от района к району. Имеется обширная информация по Балканским странам, Центральной и Западной Европе, но документация

по России, Центральной Азии и Индии намного более разрознена. Из Африки только по Египту существуют достаточные данные по растительным остаткам [28]. Таким образом, по имеющимся данным, время доместикации ячменя насчитывает не менее 18 тыс. лет.

Учитывая, что формирование полиморфизма гордеинов во многом обусловлено возникновением различного рода мутаций в генах локусов *Hrd A* и *Hrd B*, можно предположить, что число вариантов блоков компонентов, входящих в то или иное семейство, отражает длительность существования такого семейства в культурном ячмене. Таким образом, самым “древним” семейством гордеина А может быть семейство АI, включающее 58 вариантов, обнаруженных в местных популяциях ячменя (табл. 2). При этом представители семейства АI с суммарными частотами от 0.1203 (Узбекистан) до 0.9429 (Тунис) были обнаружены в местных популяциях из 21 страны, кроме Горного Бадахшана (табл. 3). Наибольшее распространение имели три варианта, объединенные в это семейство: в 21-ной стране – А2 с частотами от 0.0719 (Йемен) до 0.4125 (Палестина); в 15 странах – А62 с частотами от 0.001 (Узбекистан) до 0.125 (Палестина), в 14 странах – А24 с частотами от 0.0033 (Иран) до 0.4572 (Эфиопия). Следующим по числу вариантов гордеина А семейством является АVIII – 15 вариантов. Представители этого семейства с суммарными частотами от 0.0020 (Узбекистан) до 0.9218 (Горный Бадахшан) обнаружены в популяциях из 16 стран. Самым распространенным вариантом является вариант А19, присутствовавший в образцах из 15 стран с частотами от 0.0020 в Узбекистане до 0.5527 в Горном Бадахшане. Высокие частоты этого варианта гордеина А обнаружены также в популяциях из Непала (0.2733), Ирака (0.2148), Израиля (0.1800), Китая (0.1417), Пакистана (0.1072). Остальные 14 вариантов присутствовали в местных популяциях ячменя от одной до пяти стран.

Семейство АV включает 14 вариантов блоков компонентов с суммарными частотами от 0.0022 (Турция) до 0.7742 (Узбекистан), обнаруженных в местных популяциях ячменя из 19 стран кроме Марокко, Туниса и Палестины (табл. 2, 3). Среди вариантов гордеина А, вошедших в это семейство, самое широкое распространение наблюдается для HRD A1 – в 11 странах с частотами от 0.0017 (Киргизия) до 0.1400 (Сирия), HRD A18 – в 11 странах с частотами от 0.0011 (Йемен) до 0.6441 (Узбекистан) и HRD A12 – в 10 странах с частотами от 0.0033 (Сирия) до 0.1362 (Киргизия). Одиннадцать вариантов блоков компонентов гордеина А из этого семейства были обнаружены в популяциях ячменя от одной до восьми стран.

В семейство АIII входят девять вариантов гордеина, идентифицированных в местных популяциях

из 17 стран, с суммарными частотами от 0.0026 (Египет) до 0.2606 (Туркмения). При этом вариант HRD A14 был обнаружен в образцах ячменя из 15 стран с частотами от 0.0014 в Сирии до 0.1176 в Ираке. Остальные варианты присутствовали в популяциях ячменя из отдельных стран, за исключением HRD A15, найденного в образцах из шести стран с частотами 0.0026 (Египет) – 0.0357 (Пакистан).

Среди 17 семейств гордеина В наибольшее число вариантов блоков компонентов включают семейства ВXIII – 35 вариантов, ВXV – 34 варианта и ВIV – 26 вариантов. В остальные 14 семейств входят от 3 до 18 вариантов (табл. 2). Представители семейства ВXIII выявлены в популяциях ячменя из 21 страны, кроме Горного Бадахшана, с суммарными частотами от 0.0200 (Непал) до 0.4000 (Израиль) (табл. 4). Наибольшее распространение имел HRD B17, обнаруженный в образцах из 14 стран с частотами от 0.0011 (Йемен) до 0.0383 (Сирия). Вариант HRD B11 присутствовал в популяциях из 11 стран с частотами от 0.0049 (Узбекистан) до 0.2583 (Китай). Каждый из вариантов HRD B12 и HRD B82 с частотами от 0.0011 (Узбекистан) до 0.2507 (Йемен) и от 0.0010 (Узбекистан) до 0.1000 (Палестина) соответственно были обнаружены в образцах из 10 стран. Тридцать один вариант блоков компонентов гордеина В, входящие в это семейство, обнаружены в образцах от одной до девяти стран.

Варианты, составляющие семейство ВXV, присутствовали в исследованных популяциях из 19 стран, за исключением Марокко, Туниса и Израиля, с суммарными частотами от 0.0133 (Сирия) до 0.4349 (Йемен). Самым распространенным вариантом из этого семейства является HRD B84, идентифицированный в образцах из 12 стран с частотами от 0.0024 (Афганистан) до 0.1456 (Эфиопия). Сравнительно широкое распространение имел HRD B111, найденный в популяциях из семи стран с частотами от 0.0012 (Афганистан) до 0.1456 (Эфиопия). Остальные 32 варианта, составляющие семейство ВXV, присутствовали в местных ячменях от одной до пяти стран.

Представители семейства ВIV были обнаружены в местных популяциях ячменя из 21 страны, за исключением Израиля, с суммарными частотами от 0.0227 (Эфиопия) до 0.4686 (Сирия). Наибольшее распространение имел вариант HRD B14 – в 15 странах с частотами от 0.0032 (Иран) до 0.2334 (Марокко). В исследованных образцах из десяти стран был обнаружен вариант HRD B2 с частотами от 0.0010 (Узбекистан) до 0.0733 (Сирия). В популяциях из семи стран идентифицированы варианты блоков компонентов HRD B16 и HRD B65. При этом частоты HRD B16 варьировали от 0.0024 (Афганистан) до 0.1146 (Китай), а варианта HRD B65 – от 0.0011 (Турция) до 0.2180 (Сирия). Другие варианты блоков компонентов, входящие в

Таблица 3. Распространение семейств блоков компонентов гордеина А в популяциях местных сортов ячменя в различных странах

Страна	Численности и частоты семейств блоков компонентов гордеина А											
	AI	AIИ	AIИИ	AIV	AV	AVI	AVII	AVIII	AIX	AX	AXI	AXII
Марокко	*7/0.4444	0	0	0	0	0	2/0.3223	0	1/0.1222	0	1/0.0889	1/0.0222
Тунис	2/0.9429	0	0	0	0	0	1/0.0571	0	0	0	0	0
Алжир	7/0.4819	0	1/0.0317	2/0.0273	1/0.0455	0	1/0.1455	0	1/0.1273	0	3/0.1182	1/0.0226
Египет	9/0.6180	1/0.0769	1/0.0026	2/0.1001	1/0.0307	2/0.0589	0	1/0.0077	1/0.0256	0	3/0.0795	0
Эфиопия	17/0.8412	1/0.0068	1/0.0068	0	3/0.0221	0	0	1/0.0068	3/0.1163	0	0	0
Йемен	21/0.8498	1/0.0517	1/0.0048	1/0.0112	3/0.0033	0	0	2/0.0268	2/0.0449	2/0.0022	1/0.0011	2/0.0045
Турция	26/0.6913	2/0.0730	0	3/0.0398	1/0.0022	0	5/0.1141	1/0.0022	3/0.0634	1/0.0011	3/0.0129	0
Сирия	11/0.2899	0	2/0.0447	0	4/0.1549	2/0.005	3/0.0567	1/0.0067	3/0.2337	1/0.0717	4/0.0867	3/0.05
Иордания	9/0.1881	1/0.0088	2/0.0442	4/0.2648	3/0.1087	1/0.0059	1/0.0266	0	2/0.2854	3/0.0293	3/0.0235	3/0.0147
Израиль	2/0.2400	0	0	2/0.08	1/0.020	1/0.2000	1/0.2800	1/0.1800	0	0	0	0
Палестина	4/0.6625	0	0	2/0.125	0	0	1/0.1500	0	1/0.0250	0	1/0.0375	0
Ирак	2/0.2559	1/0.0294	2/0.2352	1/0.0294	1/0.0059	0	1/0.0589	4/0.3265	0	1/0.0294	1/0.0294	0
Иран	14/0.4796	1/0.1476	3/0.0142	2/0.0142	5/0.1524	0	1/0.0968	4/0.0412	2/0.0317	0	2/0.0064	1/0.0159
Туркмения	10/0.3235	0	5/0.2606	0	6/0.2746	0	1/0.0784	2/0.0491	2/0.0138	0	0	0
Узбекистан	10/0.1203	1/0.0020	3/0.0207	1/0.0296	5/0.7742	0	2/0.0404	1/0.0020	1/0.0049	0	2/0.0059	0
Таджикистан	0	0	1/0.0043	0	1/0.0739	0	0	5/0.9218	0	0	0	0
Киргизия	9/0.5702	0	1/0.0255	1/0.0213	4/0.2936	0	1/0.0511	0	0	0	1/0.0383	0
Афганистан	14/0.2535	1/0.0012	3/0.0929	0	8/0.4213	0	1/0.0667	5/0.1048	4/0.0536	0	1/0.0024	2/0.0036
Пакистан	3/0.1805	0	2/0.107	1/0.0081	4/0.5472	0	0	2/0.1429	1/0.0143	0	0	0
Индия	10/0.3873	0	3/0.1575	0	5/0.0979	0	1/0.0467	1/0.0776	2/0.0255	0	1/0.0213	1/0.1862
Китай	11/0.4062	2/0.0146	3/0.0667	2/0.0063	5/0.2104	0	1/0.0187	8/0.2646	0	0	0	1/0.0125
Непал	3/0.5267	0	1/0.0333	0	3/0.1400	0	0	3/0.3000	0	0	0	0
Число стран	21	10	17	13	19	4	16	16	15	5	14	9

* Здесь и в табл. 4 в числителе — число вариантов блоков компонентов, представляющих семейство, в знаменателе — суммарная частота вариантов блоков компонентов, входящих в семейство.

Таблица 4. Распространение семейств блоков компонентов гордеина В в популяциях местных сортов ячменя в различных странах

Страна	Численности и частоты семейств блоков компонентов гордеина В								
	VI	VII	VIII	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Марокко	0	0	0	1/0.2334	0	1/0.0222	2/0.3779	0	1/0.0444
Тунис	0	0	0	1/0.1429	0	0	1/0.4858	0	1/0.0444
Алжир	0	0	0	2/0.0728	0	1/0.0091	1/0.1727	0	3/0.1365
Египет	1/0.0256	0	1/0.0256	5/0.2744	0	0	1/0.1385	0	0
Эфиопия	4/0.0341	1/0.0068	0	4/0.0227	0	1/0.0125	1/0.0057	3/0.3511	3/0.0381
Йемен	0	0	3/0.0146	4/0.0338	1/0.0067	1/0.0022	2/0.0157	3/0.0123	5/0.1023
Турция	2/0.0430	1/0.0032	1/0.0011	3/0.0559	2/0.0990	1/0.0516	5/0.0420	3/0.0183	3/0.0914
Сирия	2/0.0117	2/0.005	3/0.0116	1/0.4686	2/0.0083	2/0.0150	1/0.0317	0	3/0.0133
Иордания	1/0.0088	2/0.0088	1/0.0765	9/0.2735	1/0.0029	1/0.0029	2/0.0176	1/0.0176	3/0.0707
Израиль	1/0.0400	0	0	0	1/0.0800	0	1/0.2400	0	1/0.0400
Палестина	0	0	0	1/0.175	1/0.0250	1/0.0250	2/0.150	0	2/0.1375
Ирак	1/0.0088	0	0	4/0.1118	0	0	1/0.0059	1/0.0118	4/0.4660
Иран	3/0.0222	4/0.0461	1/0.0016	5/0.0651	2/0.1016	4/0.0651	2/0.0825	2/0.0159	5/0.1602
Туркмения	2/0.0079	3/0.1117	3/0.0333	3/0.0824	0	1/0.0020	2/0.0236	1/0.0588	4/0.3901
Узбекистан	3/0.0060	5/0.4135	2/0.0059	4/0.0390	1/0.0413	4/0.0139	5/0.0109	1/0.0010	1/0.0030
Таджикистан	0	0	0	2/0.3708	0	0	0	0	1/0.0241
Киргизия	2/0.2808	2/0.1277	0	3/0.0638	1/0.0170	1/0.0213	1/0.0170	1/0.0426	3/0.2297
Афганистан	4/0.0274	1/0.1429	4/0.0476	8/0.0785	1/0.0274	1/0.0036	3/0.0096	4/0.0464	5/0.1572
Пакистан	0	3/0.2858	0	3/0.1428	0	0	1/0.0143	0	2/0.0500
Индия	2/0.0852	4/0.2638	1/0.0128	7/0.1745	1/0.0213	1/0.0128	2/0.0084	4/0.0425	0
Китай	3/0.0667	2/0.0208	2/0.0250	5/0.2209	2/0.0167	1/0.0042	1/0.0021	1/0.0104	3/0.0416
Непал	0	0	0	2/0.2200	0	0	0	0	0
Число стран	14	12	11	21	12	15	20	12	19
Страна	Численности и частоты семейств блоков компонентов гордеина В								
	VX	VXI	VXII	VXIII	VXIV	VXV	VXVI	VXVII	
Марокко	0	2/0.2333	0	2/0.0444	1/0.0444	0	0	0	
Тунис	1/0.0285	2/0.2857	0	1/0.0571	0	0	0	0	
Алжир	1/0.0455	4/0.1272	3/0.1454	5/0.2046	0	2/0.0862	0	0	
Египет	1/0.0128	2/0.2026	5/0.1462	3/0.1076	1/0.0051	2/0.0360	1/0.0256	0	
Эфиопия	1/0.0023	0	2/0.0250	7/0.0727	0	9/0.4290	0	0	
Йемен	0	0	0	7/0.3360	0	19/0.4349	0	3/0.0415	
Турция	7/0.1549	3/0.0312	6/0.1452	10/0.1375	2/0.0161	3/0.1096	0	0	
Сирия	4/0.0200	2/0.0850	5/0.0416	10/0.2649	1/0.0050	4/0.0133	1/0.0017	1/0.0033	
Иордания	2/0.1912	1/0.0176	6/0.1264	11/0.1442	0	1/0.0413	0	0	
Израиль	1/0.1200	0	0	4/0.4800	0	0	0	0	
Палестина	0	0	2/0.0500	5/0.4000	0	1/0.0375	0	0	
Ирак	0	0	3/0.1634	3/0.1765	0	2/0.0558	0	0	
Иран	2/0.0222	1/0.0143	6/0.1047	9/0.1111	3/0.0651	5/0.1128	0	1/0.0095	
Туркмения	3/0.0236	0	2/0.0274	8/0.1294	1/0.0176	4/0.0902	0	1/0.0020	
Узбекистан	3/0.0630	1/0.0020	4/0.0315	7/0.0886	2/0.0688	6/0.2067	1/0.0039	1/0.0010	
Таджикистан	3/0.4134	0	0	0	3/0.0951	1/0.0923	0	1/0.0043	
Киргизия	0	1/0.0255	2/0.0256	5/0.0596	0	1/0.0894	0	0	
Афганистан	4/0.1141	2/0.0464	4/0.0547	12/0.1655	2/0.0298	6/0.0334	0	1/0.0155	
Пакистан	1/0.0714	0	1/0.0214	1/0.0571	1/0.0143	2/0.1285	0	1/0.2144	
Индия	2/0.0426	0	1/0.0042	3/0.0893	0	5/0.1064	1/0.0042	1/0.1320	
Китай	2/0.0271	0	4/0.0271	10/0.3853	1/0.0021	4/0.1146	0	1/0.0354	
Непал	0	0	0	1/0.0200	0	3/0.2067	0	1/0.5533	
Число стран	16	11	16	21	11	19	4	11	

См. примечание к табл. 3.

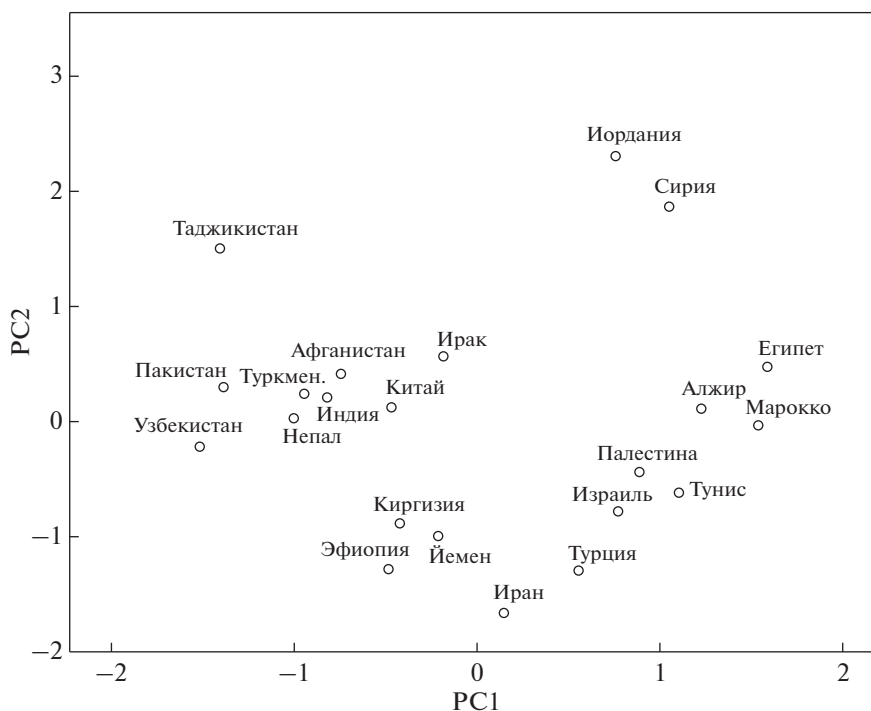


Рис. 6. Положение местных популяций ячменя из 22 стран в координатах первой и второй главных компонент изменчивости частот вариантов семейств гордеинов А и В.

это семейство, присутствовали в исследованных образцах от одной до пяти стран.

Таким образом, наблюдается мозаичность и неравномерность частот в распространении семейств вариантов блоков компонентов HRD А и HRD В в исследованных местных популяциях из различных стран мира. Матрицу суммарных частот семейств одновременно гордеинов А и В в местных популяциях ячменя из 22 стран подвергли кластерному анализу методом главных компонент. Первые две компоненты описывают 38.8% изменчивости частот вариантов семейств А и В (рис. 6). Как видно из рис. 6, по первой главной компоненте исследованные популяции разделились следующим образом: в отрицательную область значений попали образцы ячменя из стран Азии восточнее Ирана, а так же из Ирака, Йемена и Эфиопии. В положительной области значений первой главной компоненты оказались популяции из стран Северной Африки, Ближнего Востока, Передней Азии и Ирана. Таким образом, “восточные” и “западные” местные популяции культурного ячменя различаются как по составу, так и по суммарным частотам семейств блоков компонентов гордеинов А и В. Причиной такой мозаичности в распространении семейств вариантов HRD А и HRD В могут служить, на наш взгляд, несколько факторов: эффект основателя и неоднократная интродукция популяций культурного ячменя в те или иные регионы из различных

стран [29]; зависимость распространения аллелей годреин-кодирующих локусов от распределения таких климатических факторов как количество осадков в год, средние температуры июля и континентальность климата [30], высота выращивания популяций над уровнем моря [31].

Однако каким образом возникли собственно семейства вариантов блоков компонентов? Можно предположить, что возникновение семейств связано с постепенным накоплением мутаций в гордеиновых локусах культурного ячменя в течение длительного периода. Но тогда следовало ожидать присутствие в культурном ячмене неких “переходных” вариантов от одного семейства к другому. Но, как видно из рис. 3 и 4, семейства дискретны, и мы не обнаружили промежуточных вариантов между ними. Вместе с тем, при исследовании полиморфизма гордеина в 116 образцах *H. spontaneum* из Ирана, Израиля, Сирии и Иордании [32–35] нами были обнаружены блоки компонентов идентичные вариантам, присутствующим в культурном ячмене и относящиеся к 8 семействам гордеина А и 11 семействам гордеина В (табл. 5). Полученные результаты позволяют сделать вывод, что существующий полиморфизм гордеинов А и В у культурного ячменя является следствием двух процессов: с одной стороны, интрогрессии аллелей (вариантов блоков компонентов) гордеин-кодирующих локусов от *H. spontaneum* в результате спонтанной гибридизации при рас-

Таблица 5. Число вариантов блоков компонентов семейств гордеинов А и В, присутствующих в *H. vulgare* и обнаруженных в образцах *H. spontaneum* из Ирана, Израиля, Сирии и Иордании

Страна	Семейства гордеинов А и В																		
	AI	AII	AIV	AV	AVII	AIX	AXI	AXII	BI	BII	BIII	BIV	BV	BVI	BVII	BIX	BXII	BXIII	BXVII
Иран	3	1	3	1	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1
Израиль	7	1	1	3	1	3	0	0	1	1	1	3	1	3	1	0	0	5	0
Сирия	1	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Иордания	2	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0

пространении культурного ячменя, с другой стороны — накоплением мутаций в генах локусов *Hrd A* и *Hrd B* у *H. vulgare*.

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. Dakir El.-H., Ruiz M.-L., Garcia P. et al. Genetic variability evaluation in Moroccan collection of barley, *Hordeum vulgare* L., by means of storage proteins and RAPDs // Genet. Res. and Crop Evol. 2002. V. 49. P. 619–631.
2. Созинов А.А., Нецветаев В.П., Григорян Э.М. и др. Картирование локусов *Hrd* у ячменя (*Hordeum vulgare* L. emed. Cav. et Vach.) // Генетика. 1978. Т. 14. № 9. С. 1610–1619.
3. 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.
4. Нецветаев В.П., Образцов И.С., Созинов А.А. Картирование локуса *Hrd G* в хромосоме 5 ячменя // Молекулярные механизмы генетических процессов. V Всесоюз. симп. Тез. докл. М.: Наука, 1983. С. 110.
5. Shewry P.R., Faulks A.J., Pickering R.A. et al. The genetic analysis of barley storage proteins // Heredity. 1980. V. 44. P. 383–389.
6. Blake T.K., Ullrich S.E., Nilan R.A. Mapping of the *Hor-3* locus encoding D hordein in barley // Theor. Appl. Genet. 1982. V. 63. P. 367–372.
7. Поморцев А.А., Нецветаев В.П., Созинов А.А. Полиморфизм культурного ячменя (*Hordeum vulgare* L.) по гордеинам // Генетика. 1985. Т. 21. № 4. С. 629–639.
8. Mifflin B.J., Shewry P.R. An introduction to the extraction and characterisation of barley and maize proteins // Techniques for the separation of barley and maize proteins / Eds Mifflin B.J., Shewry P.R. Luxembourg: EEC, 1982. P. 13–25.
9. Ладогина М.П., Поморцев А.А., Нецветаев В.П. и др. Наследование и генетический контроль компонентов глютелина у ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Генетика. 1988. Т. 24. № 2. С. 316–323.
10. Shewry P.R., Parmar S. The *Hrd F* (*Hor 5*) locus encodes γ -type hordeins // Barley Genet. Newslet. 1987. V. 17. P. 32–34.
11. Shewry P.R., Parmar S., Franklin J. et al. Mapping and biochemical analysis of *Hor 4* (*Hrd G*), a second locus encoding B hordein seed proteins in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Genet. Res. Camb. 1988. V. 51. P. 5–12.
12. Созинов А.А., Попереля Ф.А. Методика вертикального дискового электрофореза в крахмальном геле и генетический принцип классификации глиадинов. Одесса: 1978. 16 с.
13. Поморцев А.А., Лялина Е.В. Оценка сортовой принадлежности и сортовой чистоты семян ячменя методом электрофоретического анализа запасных белков зерна // Методическое пособие к практикуму “Белковые маркеры для генетической паспортизации и улучшения геномов растений хозяйственно ценных видов”. М.: 2011. 86 с.
14. Kreis M., Shewry P.R., Forde B.G. et al. Structure and evolution of seed storage proteins and their genes with particular reference of those of wheat, barley and rye // Oxford Surveys Plant Mol. Cell Biol. 1985. № 2. P. 253–317.
15. Shewry P.R., Bunce N.A.C., Kreis M. et al. Polymorphism at the *Hor 1* locus of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Biochem. Genetics. 1985. V. 23. № 5/6. P. 391–403.
16. Bunce N.A.C., Forde B.G., Kreis M. et al. DNA restriction fragment length polymorphism of hordein loci: Application to identifying and fingerprinting barley cultivars // Seed Sci. Techn. 1986. V. 14. P. 419–429.
17. Саянова О.В., Мехедов С.Л., Буркитбаев Е.М. и др. Структурная организация генов С-гордеинов ячменя // Генетика. 1994. Т. 30. № 6. С. 749–755.
18. Sayanova O., Pomortsev A., Ladogina M. et al. Analysis of C-hordein deficient mutant of barley // Barley Genet. Newslet. 1992. V. 22. P. 53–56.
19. Kanazin V., Ananiev E., Blake T. Variability among members of *Hor-2* multigene family // Genome. 1993. V. 26. P. 397–403.
20. Shewry P.R., Parmar S., Franklin J. Recombinant within the *Hor 2* locus // Barley Genet. Newslet. 1988. V. 18. P. 31–33.
21. Wiberg A. Genetical studies of spontaneous sources of resistance to powdery mildew in barley // Heredity. 1974. V. 77. P. 89–148.
22. Mozeman J.G., Nevo E., Zohary D. Resistance of *Hordeum spontaneum* collected in Israel to infection with *Erysiphe graminis hordei* // Crop Sci. 1983. V. 23. P. 1115–1119.

23. Mastebroek H.D., Balkema-Boomstra A.G., Gaj M. Genetic analysis of powdery-mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) derived from wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) // Plant Breeding. 1995. V. 114. P. 121–125.
24. Provan J., Russell J.R., Booth A. et al. Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum* // Mol. Ecol. 1999. № 8. P. 505–511. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00545.x>
25. Harlan J.R., Zohary D. Distribution of wild wheats and barley // Sciences. 1966. V. 153. № 3741. P. 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/science.153.3740.1074>
26. Willcox G. Archeobotanical evidence for the beginnings of agriculture in Southwest Asia // The Origins of Agriculture and Crop Domestication. Proceed. of Harlan Symp. Aleppo, Syria. 10–14 May. 1997. P. 25–38.
27. Wendorf F., Schild R., El Hadidi N. et al. Use of barley in the Egyptian late paleolithic // Science. 1979. V. 205. P. 1341–1347. <https://doi.org/10.1126/science.205.4413.1341>
28. Zohary D., Hopf M. Domestication of Plants in the Old World. The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe, and Nile Valley. Oxford: Clarendon Press, 1988. 245 p.
29. Поморцев А.А. Исследование полиморфизма гордеинов у ячменей Эфиопии // Генетика. 2001. Т. 37. № 10. С. 1371–1382.
30. 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.
31. Поморцев А.А., Калабушкин Б.А., Бланк М.Л. и др. Изучение естественного отбора в искусственных гибридных популяциях ярового ячменя // Генетика. 1996. Т. 32. № 11. С. 1536–1544.
32. Поморцев А.А., Лялина Е.В. Аллельное разнообразие гордеин-кодирующих локусов *Hrd A* и *Hrd B* у культурного (*Hordeum vulgare* L.) и дикого (*H. spontaneum* С. Koch) ячменя в Иране (как части Дуги плодородия) // Генетика. 2016. Т. 52. № 10. С. 1146–1158. <https://doi.org/10.7868/S001667581610009X>
33. Поморцев А.А., Болдырев С.В., Лялина Е.В. Аллельное разнообразие гордеин-кодирующих локусов *Hrd A* и *Hrd B* у культурного (*Hordeum vulgare* L.) и дикого (*Hordeum spontaneum* С. Koch) ячменя в Иордании (как части Дуги плодородия) // Генетика. 2019. Т. 55. № 3. С. 290–299. <https://doi.org/10.1134/S0016675819030135>
34. Поморцев А.А., Болдырев С.В., Лялина Е.В. Аллельное разнообразие гордеин-кодирующих локусов *Hrd A* и *Hrd B* у культурного (*Hordeum vulgare* L.) и дикого (*Hordeum spontaneum* С. Koch) ячменя в Сирии (как части Дуги плодородия) // Генетика. 2018. Т. 54. № 11. С. 1275–1284. <https://doi.org/10.1134/S0016675818110127>
35. Поморцев А.А., Рубанович А.В., Ковалева О.Н., Лялина Е.В. Аллельное разнообразие гордеин-кодирующих локусов *Hrd A* и *Hrd B* у дикого (*Hordeum spontaneum* С. Koch) и культурного (*Hordeum vulgare* L.) ячменя в Израиле и Палестине // Генетика. 2019. Т. 55. № 11. С. 1298–1311. <https://doi.org/10.1134/S0016675819110092>

Structure and Formation Mechanisms of Polymorphism of Hordein-Coding Loci in Domesticated Barley (*Hordeum vulgare* L.)

A. A. Pomortsev^{a,*}, A. V. Rubanovich^a, and E. V. Lialina^a

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

*e-mail: pomortsev@vigg.ru

Using starch gel electrophoresis, hordein polymorphism in 2244 barley accessions was studied. 1.197 old local accessions from 22 countries located in the main centers of barley diversity and the bordering regions, 428 varieties cultivated in the territory of the former USSR and Russian Federation from 1929 to 2019, and 619 varieties from Europe, Asia, America and Africa were analyzed. For the hordeins encoded by the *Hrd A* locus, 156 variants of blocks of components were revealed, 271 variants were detected for the *Hrd B* locus, and 5 variants, for the *Hrd F* locus. Based on the literature data on the molecular mechanisms of hordein polymorphism formation and analysis of artificial mutants at the hordein-coding loci, among hordein A and B variants, groups of phenotypically similar blocks of components, families of blocks of components, were isolated. For HRD A, 12 families (AI–AXII) were isolated, and for HRG B, 17 families (BI–BXII) were discriminated. The families differ significantly in the number of block variants: for HRD A, from 5 (AXII) to 60 (AI), for HRD B, from 3 (BXVII) to 41 (BXII). It is suggested that the families with the largest number of hordein A and B variants are the most ancient in domesticated barley. The mosaic structure and irregular distribution of frequencies of HRD A and HRD B family variants in local populations of different countries was shown. It is assumed that the appearance of HRD A and HRD B families was due to spontaneous hybridization between *H. vulgare* and *H. spontaneum* during the spreading of the domesticated barley. It is concluded that hordein polymorphism in domesticated barley resulted from spontaneous hybridization between the cultivated barley with a wild ancestor and accumulation of mutations in the genes at *Hrd A* and *Hrd B* loci in *H. vulgare*.

Keywords: cultivated barley, hordein-coding loci, hordein polymorphism, families of blocks of components of hordein.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ЭВОЛЮЦИЯ
УССУРИЙСКОЙ ВОСКОВОЙ ПЧЕЛЫ *Apis cerana ussuriensis*
ИЗ ПРИМОРСКОГО КРАЯ РОССИИ

© 2021 г. Р. А. Ильясов^{1,2,*}, Г. Ю. Хан², М. Л. Ли², К. В. Ким², М. Ю. Прощалькин³,
А. С. Лелей³, Д. Х. Парк^{2,4}, Д. И. Такахаша⁵, Х. В. Квон^{2,**}, А. Г. Николенко¹

¹Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Отделение наук о жизни и Исследовательский центр насекомых-переносчиков болезней,
Инчхонский национальный университет, Инчхон, 22012 Корея

³Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

⁴Биоинформатическая компания 3BIGS CO. LTD, Хвасон-си, 18454 Корея

⁵Факультет естественных наук, Университет Киото Сангё, Киото, 603-8555 Япония

*e-mail: apismell@hotmail.com

**e-mail: hwkwon@inu.ac.kr

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

После доработки 04.09.2020 г.

Принята к публикации 09.10.2020 г.

Apis cerana ussuriensis Piyasov et al., 2019 — самый северный подвид восковой пчелы *A. cerana* Fabricius, 1793, распространенный в лесах Приморского и Хабаровского краев до 47°54' с.ш. Генетические исследования этого подвида представляют большой интерес для науки и пчеловодства, поскольку все адаптивные признаки сформировались под действием окружающей среды без участия человека. Мы секвенировали и аннотировали последовательности полной митохондриальной ДНК (мтДНК) пчел подвидов *Apis cerana ussuriensis* Piyasov et al., 2019 (номер в Генбанке AP018450) из Приморского края и *Apis cerana koreana* Piyasov et al., 2019 (AP018431) из Южной Кореи и шести экзонов гена вителлогенина *VG E2–E7* ядерной ДНК (ядДНК) подвидов пчел *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica* Radoszkowski, 1887, *A. c. cerana* и *A. c. indica* Fabricius, 1798. Методом кластерного анализа последовательностей мтДНК и гена *VG* яДНК было показано разделение пчел на две группы, включающие южный подвид *A. c. indica* и северные подвиды *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*. На основе генетической дивергенции было показано, что подвид *A. c. ussuriensis* генетически ближе к подвидам *A. c. japonica*, *A. c. koreana* и *A. c. cerana* чем к подвиду *A. c. indica*. Значения генетической дивергенции (0.80–8.00%) и генетической дистанции Jukes–Cantor (0.005–0.100) по мтДНК и гену *VG* яДНК между подвидами *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica* находятся в пределах внутривидовых различий между подвидами насекомых. Предположительное время возникновения подвидов *A. cerana* — от двух до одного млн лет назад.

Ключевые слова: *Apis cerana*, *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica*, митохондриальный геном, подвид, дивергенция, эволюция, Приморский край, вителлогенин, мтДНК, яДНК.

DOI: 10.31857/S0016675821050039

Восковая пчела *Apis cerana* Fabricius, 1793 является второй по значимости для человека после медоносной пчелы *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Их естественные ареалы не перекрывались до настоящего времени и были ограничены Европой и Африкой у *A. mellifera* и Азией у *A. cerana*. Оба вида пчел приспособлены к обитанию в широком диапазоне климатических поясов — от холодного умеренного до жаркого экваториального [1]. В азиатских странах *A. cerana* разводится на пасеках, а в России встречается только в диком состо-

янии в дальневосточных лесах на территориях Хабаровского и Приморского краев до 47°54' с.ш. и включен в красную книгу [2, 3]. В.Н. Кузнецов [3] обнаружил 80 деревьев, в дуплах которых обитали дикие семьи *A. cerana*, и предположил, что в лесах Приморского и Хабаровского краев до 47°54' с.ш. обитают более 1000 семей китайской восковой пчелы.

Восковая пчела *A. cerana* является важным и известным опылителем сельскохозяйственных

культур в Азии и производителем меда, воска, маточного молочка и пчелиной пыльцы [4], не уступает медоносной пчеле *A. mellifera* по уровню коммерческого использования и обладает высоким потенциалом для генетического улучшения путем селекции на основе молекулярных маркеров. В последнее время численность *A. cerana* резко сократилась в странах Азии в связи с распространением вируса мешотчатого расплода (SBV) и массового импорта *A. mellifera* [5–7].

Согласно опубликованным данным внутри *A. cerana* выделяется более 20 подвидов, большинство из которых не имеют четких таксономических диагнозов [8–19]. Сохранение генофонда локальных подвидов *A. cerana* возможно при маркер-опосредованной идентификации и селекции. Молекулярно-генетические исследования позволяют разработать базовые стратегии сохранения *A. cerana*. Маркеры митохондриальной ДНК (мтДНК) являются эффективными инструментами в исследовании эволюции и межвидовых и внутривидовых филогенетических взаимоотношений медоносных пчел [18, 20–25].

В настоящей работе мы секвенировали и аннотировали последовательности полной митохондриальной ДНК (мтДНК) пчел подвидов *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 (GenBank/DBJ AP018450) (ZooBank 06874b0a-029b-40e2-b4a8-1a20f7692ed3) из Приморского края и *Apis cerana koreana* Ilyasov et al., 2019 (GenBank/DBJ AP018431) (ZooBank 290e12ba-fc5f-4907-ae50-ef0fa8dc8d9c) из Южной Кореи и шести экзонов гена вителлогенина *VG E2–E7* ядерной ДНК (ядНК) подвидов пчел *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana* и *A. c. indica*. Была проведена оценка филогенетических взаимоотношений *A. c. ussuriensis* с другими подвидами из Южной Кореи, Китая, Японии, Тайваня и Индонезии на основе полной мтДНК и гена *VG* ядНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было отобрано по 10 взрослых особей рабочих пчел из следующих семей: *A. c. ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 из дупла в лесном массиве пригорода Владивостока, Приморский край, Россия (43°11' с.ш. 132°55' в.д.); *A. c. koreana* Ilyasov et al., 2019 с пасеки Gokseong-gun, Gokseong-eup, Nakjung-ri, Jeollanam-do, Южная Корея (35°24' с.ш., 127°27' в.д.), с пасеки Sangju-si, Gyeongsangbuk-do, Южная Корея (36°42' с.ш., 128°18' в.д.), с пасеки Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do, Южная Корея (35°36' с.ш., 128°88' в.д.); *A. c. japonica* с пасеки Kitahiroshima, Hokkaido, Япония (42°95' с.ш., 141°53' в.д.); *A. c. indica* с пасеки Taichung, Тайвань (24°04' с.ш., 120°73' в.д.). Видовая принадлежность пчел *A. cerana* была определена морфометрически согласно В.Н. Кузнецову [3].

Тотальную ДНК экстрагировали из грудной мышечной ткани каждой пчелы с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, Madison, WI, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы ДНК хранили при –20°C до дальнейшего использования. Полимеразную цепную реакцию экзонов 2–7 гена вителлогенина (*VG*) проводили на 96-луночном термоциклере Applied Biosystems Veriti HiD на основе уже разработанных праймеров [26] с набором для ПЦР TaKaRa (100 мкл ПЦР × 100 реакций) (TAKARA BIO INC., Shiga, Япония) в соответствии с инструкциями производителя. Все продукты ПЦР были очищены с помощью набора для очистки ПЦР QIAquick (250) (QIAGEN, Hilden, Германия), следуя инструкциям производителя.

По одной рабочей особи из каждой семьи пчел было использовано для секвенирования мтДНК с помощью набора NextSeq 500/550 High Output Kit v. 2 (75 циклов) (ILLUMINA, США) и парных циклов считывания (2 × 150 пн), следуя инструкции производителя, на секвенаторе Illumina NextSeq 500 (ILLUMINA, США) в Университете Киото Сангё (Kyoto, Япония). Геномные библиотеки были приготовлены с помощью набора для подготовки ДНК-библиотеки Nextera (ILLUMINA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Сборка геномов проводилась на основе 1662000 прочтений со средним покрытием 75 с помощью Geneious R9 (BIOMATTERS, Новая Зеландия). Аннотация геномов выполнена на MITOS (Германия) [27] и tRNAscan-SE (СА, США) [28]. По одной рабочей особи из каждой семьи пчел было использовано для секвенирования экзонов гена вителлогенина *VG* ядНК с обоих концов с помощью дидезокси-метода Sanger [29] с использованием набора ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 на секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, США) в Инчхонском национальном университете (Incheon, Южная Корея).

Нуклеотидные последовательности полной мтДНК были депонированы в базы данных GenBank/DBJ под номерами AP018431 для *A. c. koreana* (15925 пн) (ZooBank 290e12ba-fc5f-4907-ae50-ef0fa8dc8d9c) (Gokseong-gun, Jeollanam-do, Южная Корея) и AP018450 для *A. c. ussuriensis* (15919 пн) (ZooBank 06874b0a-029b-40e2-b4a8-1a20f7692ed3) (Приморский край, Россия). Нуклеотидные последовательности экзонов 2–7 гена *VG* были депонированы под номерами MH755745, MH755780, MH755815, MH755850, MH755885, MH755920 (4125 пн) и MH755746, MH755781, MH755816, MH755851, MH755886, MH755921 (4125 пн) для двух представителей *A. c. ussuriensis* (Приморский край, Россия); под номерами MH755735, MH755770, MH755805, MH755840, MH755875, MH755910 для *A. c. koreana* (Sancheong,

Gyeongsangnam-do, Южная Корея); МН755741, МН755776, МН755811, МН755846, МН755881, МН755916 (4125 пн) и МН755742, МН755777, МН755812, МН755847, МН755882, МН755917 (4125 пн) для *A. c. japonica* (Kitahiroshima, Hokkaido, Япония); МН755747, МН755782, МН755817, МН755852, МН755887, МН755922 (4128 пн) и МН755748, МН755783, МН755818, МН755853, МН755888, МН755923 (4128 пн) для *A. c. indica* (Taichung, Тайвань).

Сравнительный анализ полной мтДНК был проведен с использованием последовательностей из Генбанка: *A. c. japonica* AP017314 (15917 пн) (Kyoto, Япония), *A. c. japonica* AP017941 (15778 пн) (Amami, Япония), *A. c. cerana* AP017983 (15460 пн) (Jiangsu, Китай), *A. c. cerana* KM244704 (15712 пн) (Yunnan, Китай), *A. c. indica* AP017984 (15376 пн) (Taipei, Тайвань), *A. c. indica* AP018149 (15884 пн) (Sabah, Борнео, Малайзия), *A. c. koreana* AP018431 (15925 пн) (Jeollanam-do, Южная Корея), *A. c. koreana* KX908206 (15904 пн) (Chungcheongbukdo, Южная Корея), *A. m. ligustica* NC 001566 (16324 пн) (внешняя группа, США). Сравнительный анализ гена *VG* яДНК был проведен с использованием последовательностей из Генбанка: *A. c. cerana* KT725235 (4125 пн) (Yunnan, Китай), *A. c. cerana* ApisCC1.0 (4125 пн, фрагмент 781683–788069 из геномной последовательности KZ288206) (Yunnan, Китай), *A. m. mellifera* JN557295, JN557387, JN557201, JN557573, JN557481, JN557109 (4074 пн) (внешняя группа, изолят M2261, Warsaw, Польша).

Дивергенция нуклеотидных последовательностей и генетические дистанции Jukes–Cantor [30], Tamura–Nei [31] и *p*-distance [32] были рассчитаны с использованием Unipro UGENE 1,28 (UNIPRO, Россия) и CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания). Филогенетический анализ на основе последовательностей ДНК был проведен с использованием MEGA7 [33] и Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, США), JMP14 (SAS Institute Inc., North Carolina, США). Филогенетические деревья были построены с использованием метода ближайшего соседа [34] на основе дистанций Jukes–Cantor с 1000 бутстреп-репликациями и Reltime [35] метода оценки длины ветвей. Физическая карта полного митохондриального генома была построена с использованием CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания) и Artemis 17.0.1 (The Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Митохондриальный геном *A. c. ussuriensis* (Приморский край, Россия) содержит 42% А, 42% Т, 6% G, 10% С нуклеотидов, обогащен АТ на 84%, содержит наиболее высокие частоты динуклеотидов АА (19%), АТ (18%), ТТ (18%) и ТА (16%) и наиболее низкие частоты динуклеотидов GG

(1%), GC (1%), CG (1%) и CC (2%), что характерно для большинства перепончатокрылых [25, 36, 37]. Среднее содержание GC в мтДНК *A. c. ussuriensis* составляет 16%, а максимальный уровень не превышает 40%. Значение генетического разнообразия и варибельности зависит прямо пропорционально от GC-состава – чем выше содержание GC, тем выше генетическое разнообразие и варибельность генов. Содержание GC в мтДНК менее 40% считается низкой [38] (табл. 1).

МтДНК *A. c. ussuriensis* (15919 пн) незначительно короче мтДНК *A. mellifera* (16343 пн) и *Drosophila yakuba* (16019 пн). Сумма всех межгенных некодирующих регионов мтДНК *A. c. ussuriensis* (1252 пн) также немного короче *A. mellifera* (1639 пн) и *D. yakuba* (1262 пн) [36].

Митохондриальный геном *A. c. ussuriensis* содержит 30 белок-кодирующих генов (CDS), 22 гена транспортной РНК (tRNA), два гена субъединиц рибосомальной РНК (rRNA) – *16S rRNA* и *12S rRNA*, четыре некодирующих межгенных участка (*NC1–NC4*). Синтения мтДНК *A. c. ussuriensis* сходна с синтением мтДНК большинства перепончатокрылых с небольшими различиями [25, 36]. Большинство генов (*ATP6*, *ATP8*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *CYTB*, *ND2*, *ND3*, *ND6*, *tRNA-Ala*, *tRNA-Asn*, *tRNA-Asp*, *tRNA-Gln*, *tRNA-Glu*, *tRNA-Gly*, *tRNA-Ile*, *tRNA-Leu(UUR)*, *tRNA-Lys*, *tRNA-Met*, *tRNA-Ser(AGN)*, *tRNA-Ser(UCN)*, *tRNA-Thr* и *tRNA-Trp*) расположены на легкой цепи мтДНК, за исключением четырех генов субъединиц (*ND1*, *ND4*, *ND4L* и *ND5*), двух генов rRNA (*12S* и *16S rRNA*) и восьми генов тРНК (*tRNA-Arg*, *tRNA-Cys*, *tRNA-His*, *tRNA-Leu(CUN)*, *tRNA-Phe*, *tRNA-Pro*, *tRNA-Tyr* и *tRNA-Val*), которые расположены на тяжелой цепи мтДНК (табл. 2, рис. 1).

Белок-кодирующие гены *ND3*, *ND4L*, *ND5*, *COX1*, *ND6*, *COX2*, *ND1*, *ND2* имеют стартовый кодон АТТ, гены *COX3*, *ATP6* и *CYTB* – стартовый кодон АТG, ген *ND4* – стартовый кодон АТA, ген *ATP8* – стартовый кодон АТC. Все белок-кодирующие гены мтДНК *A. c. ussuriensis* имеют единый стоп-кодон ТAА. Для некоторых генов мтДНК (*tRNA-Gln* и *tRNA-Ala* (4 пн), *ND2* и *tRNA-Cys* (1 пн), *COX1* и *tRNA-Leu(UUR)* (5 пн), *COX2* и *tRNA-Asp* (1 пн), *ATP8* и *ATP6* (19 пн)) *A. c. ussuriensis* характерно перекрывание, что возможно унаследовано от прокариотического генома с полицистронным типом транскрипции (табл. 2).

Размер всех белок-кодирующих генов мтДНК *A. c. ussuriensis* 11058 пн, они кодируют 3686 аминокислот. Гены rRNA мтДНК *A. c. ussuriensis* имеют суммарный размер 2116 пн (*12S rRNA* – 787 пн и *16S rRNA* – 1329 пн). Размеры генов тРНК мтДНК *A. c. ussuriensis* варьируют от 60 пн (*tRNA-Ser(AGN)*) до 78 пн (*tRNA-Pro*).

МтДНК *A. c. ussuriensis* содержит четыре некодирующих межгенных участка (*NC1–NC4*), что

Таблица 1. Характеристика нуклеотидного состава полной мтДНК *A. c. ussuriensis* Приморского края России

Нуклеотиды	Число (частота)
GC-состав	2540 (0.16)
AT-состав	13373 (0.84)
Аденин А	6729 (0.42)
Цитозин С	1542 (0.10)
Гуанин G	998 (0.06)
Тимин Т	6644 (0.42)
Динуклеотид AA	2973 (0.19)
Динуклеотид AC	475 (0.03)
Динуклеотид AG	358 (0.02)
Динуклеотид AT	2921 (0.18)
Динуклеотид CA	675 (0.04)
Динуклеотид CC	239 (0.02)
Динуклеотид CG	70 (0.01)
Динуклеотид CT	558 (0.04)
Динуклеотид GA	471 (0.03)
Динуклеотид GC	116 (0.01)
Динуклеотид GG	136 (0.01)
Динуклеотид GT	275 (0.02)
Динуклеотид TA	2609 (0.16)
Динуклеотид TC	712 (0.05)
Динуклеотид TG	432 (0.03)
Динуклеотид TT	2886 (0.18)
Нуклеотид А в позиции 1/2/3	240 (0.47)/128 (0.25)/249 (0.48)
Нуклеотид С в позиции 1/2/3	37 (0.07)/70 (0.14)/22 (0.04)
Нуклеотид G в позиции 1/2/3	50 (0.1)/19 (0.04)/11 (0.02)
Нуклеотид Т в позиции 1/2/3	188 (0.37)/298 (0.58)/233 (0.45)
Размер, пн	15919
Вес одной цепи, кДа	4904.98

характерно для всех представителей *A. cerana* [39]. Некодирующий межгенный участок *NC1* (228 пн) расположен между генами *tRNA-Met* и *tRNA-Gln*, *NC2* (89 пн) – между генами *tRNA-Leu* (TAA) и *COX2*, *NC3* (68 пн) – между генами *COX3*, *tRNA-Gly*, *NC4* (51 пн) – между генами *tRNA-Pro* и *ND6*. Все не кодирующие межгенные и AT-богатые участки *A. c. ussuriensis* составляют менее 8% от всего размера мтДНК. Некодирующие межгенные и AT-богатые участки являются регуляторными областями и содержат повторяющиеся мотивы. Мотив ААТГААТТ встречался в мтДНК *A. c. ussuriensis* 48 раз, мотив ААТАААТТ – 74 раза, мотив ТАСТТА (вероятный сайт связывания митохондриального терминатора транскрипции (mtTERM)) – 8 раз [40].

Некодирующий межгенный участок *NC2* *A. c. ussuriensis* идентичен с гаплотипом *Japan01* (последовательности КР064995 и АР018431), он не обладает идентичностью ни с одним из 10 опу-

ликованных гаплотипов (*ACNC101–ACNC110*) [18, 19, 39] и был обозначен как гаплотип *ACNC111* (рис. 2). Гаплотип *ACNC111* наиболее близок к гаплотипу *ACNC101* (последовательности КР064870 и КР064972) и отличается вставкой 31insT относительно начала последовательности *NC1* (рис. 2).

Сравнительный анализ последовательности полной мтДНК позволил рассчитать транзиции и трансверсии между представителями *A. cerana* разных популяций. Сходно с геномами большинства организмов, транзиции у *A. cerana* происходят чаще, чем трансверсии. Были рассчитаны транзиции и трансверсии между представителями *A. cerana* разных популяций для всей мтДНК, а также только для белок-кодирующих генов мтДНК. Это позволяет оценить вклад кодирующей и не кодирующей частей митохондриального генома в генетическую вариабельность. Отмечено, что роль не кодирующей части мтДНК в под-

Таблица 2. Аннотация полной мтДНК *A. c. ussuriensis* Приморского края России

№	Ген	Позиция начала	Позиция конца	Размер, пн
1	<i>tRNA-Ser</i> (AGN)	1	60	60
2	<i>tRNA-Glu</i>	64	129	66
3	<i>tRNA-Met</i>	164	229	66
4	<i>tRNA-Gln</i>	462	527	66
5	<i>tRNA-Ala</i>	524	589	66
6	<i>tRNA-Ile</i>	608	673	66
7	<i>ND2</i>	674	1669	996
8	* <i>tRNA-Cys</i>	1669	1734	66
9	* <i>tRNA-Tyr</i>	1740	1808	69
10	<i>tRNA-Trp</i>	1825	1893	69
11	<i>COX1</i>	1894	3459	1566
12	<i>tRNA-Leu</i> (UUR)	3455	3524	70
13	<i>COX2</i>	3614	4294	681
14	<i>tRNA-Asp</i>	4294	4361	68
15	<i>tRNA-Lys</i>	4368	4439	72
16	<i>ATP8</i>	4446	4607	162
17	<i>ATP6</i>	4589	5266	678
18	<i>COX3</i>	5284	6063	780
19	<i>tRNA-Gly</i>	6136	6202	67
20	<i>ND3</i>	6203	6556	354
21	* <i>tRNA-Arg</i>	6577	6645	69
22	<i>tRNA-Asn</i>	6665	6732	68
23	* <i>tRNA-Phe</i>	6751	6821	71
24	* <i>ND5</i>	6828	8495	1668
25	* <i>tRNA-His</i>	8496	8561	66
26	* <i>ND4</i>	8579	9910	1332
27	* <i>ND4L</i>	9913	10176	264
28	<i>tRNA-Thr</i>	10200	10266	67
29	* <i>tRNA-Pro</i>	10282	10359	78
30	<i>ND6</i>	10411	10923	513
31	<i>CYTB</i>	10936	12084	1149
32	<i>tRNA-Ser</i> (UCN)	12108	12174	67
33	* <i>ND1</i>	12187	13101	915
34	* <i>tRNA-Leu</i> (CUN)	13102	13170	69
35	* <i>16S rRNA</i>	13171	14499	1329
36	* <i>tRNA-Val</i>	14500	14566	67
37	* <i>12S rRNA</i>	14567	15353	787
	Вся мтДНК	1	15919	15919

* Гены, транскрибирующиеся с тяжелой цепи мтДНК.

держании генетической вариабельности выше кодирующей (табл. 3).

Дивергенция (%) и генетические дистанции между *A. c. japonica* и *A. c. cerana* — 2.85 и 0.80 по мтДНК и гену *VG* яДНК соответственно; между

A. c. japonica и *A. c. indica* — 5.26 и 0.85; между *A. c. japonica* и *A. c. koreana* — 1.33 и 0.80; между *A. c. cerana* и *A. c. indica* 4.95 и 0.80; между *A. c. cerana* и *A. c. koreana* — 2.85 и 0.80; между *A. c. koreana* и *A. c. indica* — 5.45 и 0.88; между *A. c. ussuriensis* и *A. c. cerana* — 2.55 и 1.25; между *A. c. ussuriensis* и

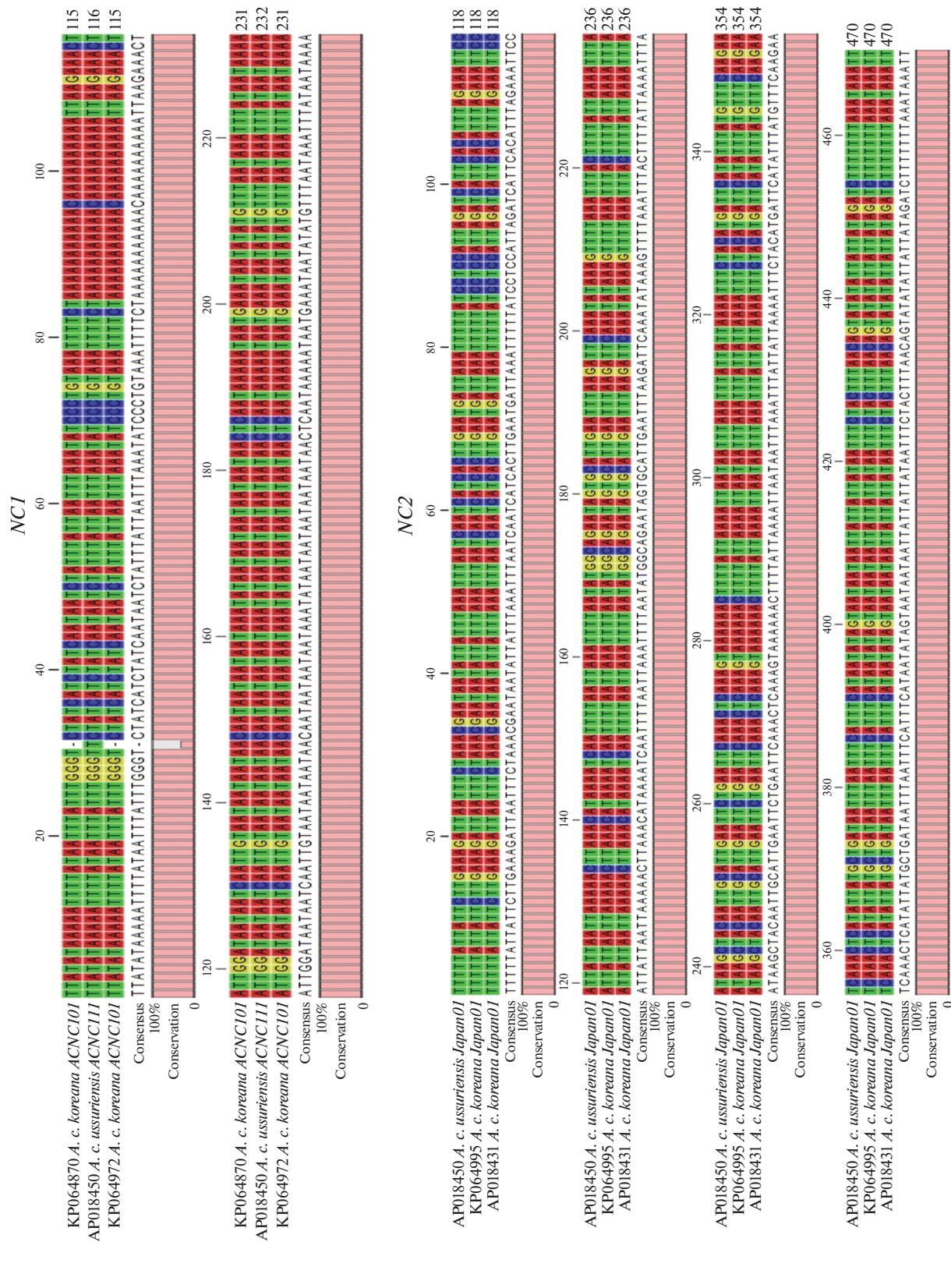


Рис. 2. Выравнивание последовательностей двух некодирующих межгенных областей NC1 и NC2 *Apis c. ussuriensis* Приморского края России с гаплотипами ACNC101 и Japan01.

Таблица 3. Транзиции и трансверсии последовательности полной мтДНК между представителями *A. segeta* разных популяций

Представители <i>A. segeta</i>	Транзиции полной мтДНК/белок-кодирующих генов мтДНК									
	AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия	KM244704, <i>A. c. segeta</i> , Yunnan, Китай	AP017983, <i>A. c. segeta</i> , Jiangsu, Китай	AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	AP017984, <i>A. c. indica</i> Taipei, Тайвань	AP018149, <i>A. c. indica</i> Sabah, Borneo, Малайзия	NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США
Представители <i>A. segeta</i>	AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия	29/12	26/15	15/5	14/5	18/8	42/10	99/65	308/138	1506/957
	KM244704, <i>A. c. segeta</i> , Yunnan, Китай		9/3	17/9	17/9	21/12	53/18	88/59	274/130	1438/950
	AP017983, <i>A. c. segeta</i> , Jiangsu, Китай	64/52		14/12	14/12	18/15	50/21	85/58	225/131	1367/951
	AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	29/21	60/49		2/1	9/5	43/13	89/62	311/135	1492/953
	AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	30/23	61/51	9/8		6/5	45/13	89/62	285/135	1452/952
	KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	38/25	73/54	80/63	31/20		48/16	92/65	316/136	1498/955
	AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	40/24	63/48	73/57	45/33	39/23		122/71	317/142	1510/959
	AP017984, <i>A. c. indica</i> , Taipei, Тайвань	237/197	251/209	253/214	244/206	253/207	245/204		228/139	1320/947
	AP018149, <i>A. c. indica</i> , Sabah, Borneo, Малайзия	339/272	337/273	334/277	338/278	355/281	337/274	345/294		1492/931
	NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США	715/550	713/554	704/556	718/557	725/558	709/546	691/543	694/539	

Таблица 4. Генетические дистанции (выше диагонали) и генетические различия (ниже диагонали) между последовательностями полной мтДНК образцов *A. cerana*

Представители <i>A. cerana</i>	AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия	KM244704, <i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	AP017983, <i>A. c. cerana</i> , Jiangsu, Китай	AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	AP017984, <i>A. c. indica</i> Taipei, Тайвань	AP018149, <i>A. c. indica</i> Sabah, Borneo, Малайзия	NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США
AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия		0.006/ 0.002/ 0.002	0.006/ 0.002/ 0.002	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.006/ 0.006	0.042/ 0.013/ 0.013	0.159/ 0.097/ 0.088
KM244704, <i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	1.8/ 85/ 13		0.002/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.007/ 0.003/ 0.003	0.022/ 0.005/ 0.005	0.040/ 0.013/ 0.013	0.155/ 0.096/ 0.087
AP017983, <i>A. c. cerana</i> , Jiangsu, Китай	3.3/ 90/ 16	1.5/ 35/ 5		0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.008/ 0.003/ 0.003	0.022/ 0.005/ 0.005	0.037/ 0.013/ 0.013	0.152/ 0.096/ 0.087
AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	0.9/ 44/ 7	2.8/ 77/ 13	3.5/ 84/ 16		0.002/ 0.001/ 0.001	0.003/ 0.001/ 0.001	0.003/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.005/ 0.005	0.042/ 0.014/ 0.014	0.158/ 0.096/ 0.087
AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	1.2/ 44/ 8	2.2/ 78/ 14	2.9/ 85/ 17	0.7/ 11/ 3		0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.005/ 0.005	0.041/ 0.014/ 0.014	0.156/ 0.096/ 0.087
KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	1.1/ 56/ 13	1.9/ 94/ 19	3.4/ 98/ 22	0.9/ 39/ 12	1.2/ 37/ 13		0.003/ 0.003/ 0.003	0.023/ 0.006/ 0.006	0.044/ 0.014/ 0.014	0.159/ 0.096/ 0.087
AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	1.5/ 82/ 12	2.4/ 116/ 19	3.9/ 123/ 22	1.3/ 88/ 15	1.9/ 90/ 16	1.1/ 87/ 17		0.024/ 0.007/ 0.008	0.043/ 0.014/ 0.014	0.159/ 0.097/ 0.088
AP017984, <i>A. c. indica</i> , Taipei, Тайвань	5.5/ 336/ 46	4.5/ 339/ 48	3.1/ 338/ 47	5.7/ 333/ 45	5.12/ 331/ 44	5.6/ 345/ 51	6.1/ 367/ 52		0.038/ 0.014/ 0.014	0.148/ 0.095/ 0.087
AP018149, <i>A. c. indica</i> , Sabah, Borneo, Малайзия	4.8/ 647/ 89	5.5/ 611/ 88	6.7/ 559/ 85	4.9/ 649/ 87	5.3/ 627/ 90	4.9/ 671/ 93	5.2/ 654/ 95	6.9/ 573/ 93		0.156/ 0.095/ 0.087
NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США	20.6/ 2221/ 585	21.2/ 2151/ 585	22.2/ 2071/ 583	20.5/ 2210/ 581	20.9/ 2162/ 580	20.5/ 2223/ 588	20.6/ 2219/ 587	22.2/ 2011/ 584	20.5/ 2186/ 590	

ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание АТ-нуклеотидов в полной последовательности мтДНК *A. c. ussuriensis* 84% было сходно с другими насекомыми: *A. c. cerana* – 84%, *A. c. koreana* – 84.1%, *A. mellifera* – 84.9%, *Bombus hypocrita* – 85.3%, *B. ignitus* – 86.8%, *Cephus cinctus* – 82%, *Enicospilus* sp. – 85.2%, *Melipona bicolor* – 86.7%, *Polistes humilis* – 84.7% и *Spathius agrili* – 84% [18, 25].

Филогенетический анализ последовательности некодирующего межгенного участка *NC1* выявил девять гаплотипов *A. cerana* (*ACNC101*, *ACNC102*, *ACNC103*, *ACNC104*, *ACNC105*, *ACNC106*, *ACNC107*, *ACNC108*, *ACNC109*), подразделенных на две группы – А и В [39]. Гаплотип *ACNC110* был обнаружен у *A. c. koreana* [18]. В настоящем исследовании у *A. c. ussuriensis* обнаружен новый гаплотип *ACNC111*, который отличался от *ACNC110* инсерцией 31insT относительно начала последо-

Таблица 5. Генетические дистанции (выше диагонали) и генетические различия (ниже диагонали) между последовательностями гена *VG* яДНК образцов *A. cerana*

Представители <i>A. cerana</i>	Дистанции Jukes–Cantor/Тamura–Nei/ <i>p</i> -distance											
	<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 01	<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 02	<i>A. c. cerana</i> , Jiangxi, Китай	<i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 01	<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 02	<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangbuk-do, Южная Корея	<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangnam-do, Южная Корея	<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 01	<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 02	<i>A. m. mellifera</i> , Warsaw, Польша	
<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 01		0.002/ 0.003/ 0.001	0.013/ 0.013/ 0.005	0.013/ 0.013/ 0.005	0.008/ 0.008/ 0.004	0.009/ 0.009/ 0.004	0.010/ 0.010/ 0.005	0.010/ 0.011/ 0.005	0.014/ 0.014/ 0.005	0.014/ 0.014/ 0.005	0.081/ 0.082/ 0.026	
<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 02	0.3/ 12/ 6		0.012/ 0.012/ 0.004	0.012/ 0.012/ 0.005	0.010/ 0.010/ 0.004	0.010/ 0.010/ 0.005	0.008/ 0.008/ 0.004	0.008/ 0.008/ 0.004	0.013/ 0.012/ 0.004	0.013/ 0.013/ 0.004	0.081/ 0.082/ 0.026	
<i>A. c. cerana</i> , Jiangxi, Китай	1.3/ 52/ 22	1.2/ 48/ 22		0.007/ 0.007/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.006/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.009/ 0.009/ 0.001	0.009/ 0.010/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	1.3/ 53/ 26	1.2/ 49/ 24	0.8/ 27/ 6		0.008/ 0.008/ 0.002	0.006/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 01	0.8/ 32/ 20	1.0/ 40/ 22	0.8/ 30/ 6	0.8/ 31/ 10		0.002/ 0.002/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.002	0.007/ 0.007/ 0.002	0.009/ 0.009/ 0.002	0.008/ 0.008/ 0.002	0.076/ 0.077/ 0.023	
<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 02	0.9/ 37/ 20	1.0/ 41/ 22	0.7/ 25/ 4	0.7/ 26/ 8	0.2/ 7/ 2		0.006/ 0.006/ 0.001	0.005/ 0.005/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.007/ 0.008/ 0.001	0.075/ 0.076/ 0.022	
<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangbuk-do, Южная Корея	1.0/ 42/ 24	0.8/ 32/ 18	0.8/ 30/ 6	0.8/ 27/ 8	0.8/ 28/ 8	0.7/ 25/ 6		0.002/ 0.002/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangnam-do, Южная Корея	1.0/ 43/ 25	0.8/ 31/ 19	0.8/ 27/ 7	0.8/ 28/ 9	0.8/ 27/ 9	0.7/ 24/ 7	0.2/ 7/ 1		0.008/ 0.008/ 0.001	0.009/ 0.009/ 0.001	0.078/ 0.079/ 0.022	
<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 01	1.4/ 56/ 24	1.4/ 54/ 24	0.9/ 36/ 8	0.8/ 31/ 10	0.9/ 36/ 8	0.8/ 31/ 6	0.8/ 32/ 8	0.9/ 33/ 9		0.001/ 0.001/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 02	1.4/ 56/ 23	1.4/ 54/ 23	1.0/ 38/ 9	0.8/ 31/ 11	0.9/ 34/ 9	0.8/ 29/ 7	0.9/ 34/ 9	0.9/ 35/ 10	0.1/ 4/ 1		0.076/ 0.077/ 0.022	
<i>A. m. mellifera</i> , Warsaw, Польша	9.0/ 311/ 157	9.1/ 312/ 158	8.7/ 296/ 143	8.7/ 297/ 145	8.7/ 295/ 146	8.6/ 292/ 144	8.7/ 298/ 147	8.8/ 300/ 148	8.8/ 297/ 145	8.7/ 295/ 146		

вательности *NC1*. Филогенетический анализ последовательности второго некодирующего межгенного участка *NC2* выявил шесть гаплотипов *A. cerana* (*Japan1*, *Nepal1*, *ThaiS1*, *BurmaN1*, *BurmaN2* и *BurmaN3*), подразделенных на две группы – материковая Азия и Sundaland [41]. По нуклеотидной последовательности *NC2* *A. c. ussuriensis* относится к гаплотипу материковой Азии *Japan1*. Вероятно, что присутствие гаплотипа *Japan1* во всех

популяциях *A. cerana* в Азии свидетельствует об общем происхождении всей популяции *A. cerana* и последующем распространении по всей Азии. Таким образом, по некодирующим межгенным участкам *NC1* и *NC2* *A. c. ussuriensis* относится к континентальной азиатской группе *A. cerana* и отличается от популяций *A. c. cerana*, *A. c. koreana* и *A. c. japonica*. Предполагается, что генетические различия *A. c. ussuriensis* являются результатом

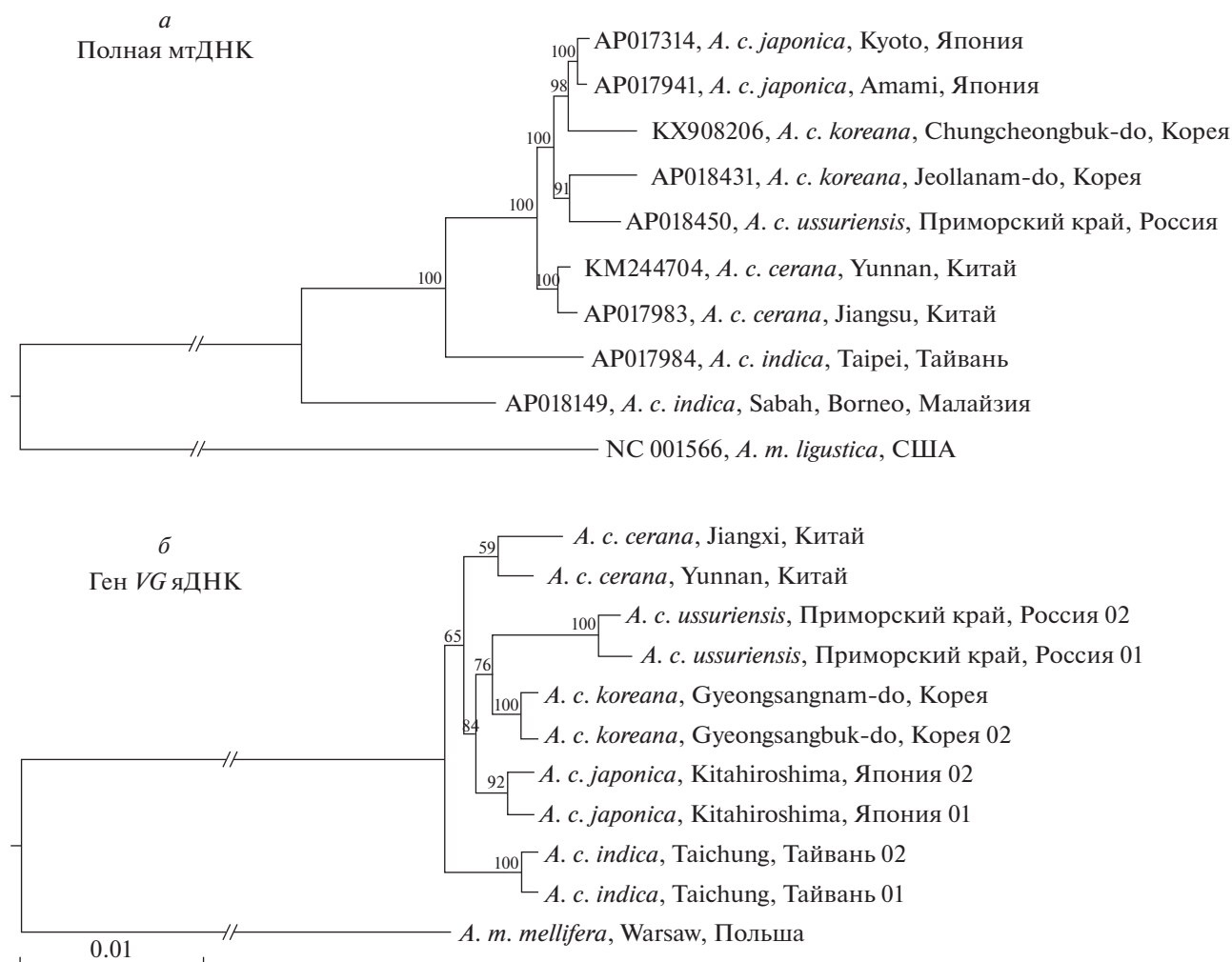


Рис. 3. Филогенетические взаимоотношения представителей *A. cerana* разных популяций на основе кластерного анализа методом ближайшего соседа и генетических дистанций Jukes–Cantor. *а* – на основе последовательности полной мтДНК; *б* – на основе последовательности гена *VG* яДНК.

естественного отбора и адаптивной эволюции *A. cerana* в условиях резко континентального климата Приморского края.

Локальные свойства мутационного процесса можно описывать не только вероятностью однонуклеотидных мутаций на сайт, но и соотношением транзиций (tr) к трансверсиям (tv). Отношение tr/tv считается базовой характеристикой мутационного процесса и является широко употребляемой однопараметрической характеристикой мутационного спектра. Для большинства известных эукариот в норме отношение tr/tv > 1, в то время как tr/tv < 1 свидетельствует о том, что повысилась частота однонуклеотидных мутаций, инсерций или делеций (инделов) или понизилась эффективность репарации ДНК. Изменчивость отношения tr/tv в геноме может свидетельствовать в пользу локальной смены мутационного механиз-

ма в ходе адаптации к сменяющимся условиям окружающей среды [42–44].

Отношение транзиций к трансверсиям полной мтДНК было 2.46 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. cerana*; 2.14 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. japonica*; 2.11 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. koreana*; 2.39 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. indica*; 0.47 между *A. c. ussuriensis* и *A. m. ligustica* (табл. 3), что сходно с соотношением tr/tv мтДНК 2.06 между *Drosophila melanogaster* и *D. yakuba* [45]. Наименьшее значение отношения tr/tv между *A. cerana* и *A. mellifera* 0.47 является свидетельством смены мутационного механизма в ходе приспособления к сменяющимся условиям окружающей среды в результате дивергенции и аллопатрического видообразования.

Генетические дистанции Jukes–Cantor, Tamura–Nei, *p*-distance по полной мтДНК и *VG* яДНК показали, что их абсолютные значения не расходятся сильно и могут быть успешно использованы в

кластерном анализе. По каждому из дистанций можно получить сходный паттерн кластеризации. Было выявлено, что подвид *A. c. ussuriensis* генетически более близок к *A. c. japonica* (дивергенция 1.10% по мтДНК и 0.93% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.005 по мтДНК и 0.009 по гену *VG* яДНК) и *A. c. koreana* (дивергенция 1.30% по мтДНК и 0.90% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.005 по мтДНК и 0.012 по гену *VG* яДНК), *A. c. cerana* (дивергенция 2.55% по мтДНК и 1.25% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.006 по мтДНК и 0.012 по гену *VG* яДНК), чем к *A. c. indica* (дивергенция 5.15% по мтДНК и 1.50% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.032 по мтДНК и 0.013 по гену *VG* яДНК) (табл. 4, 5). Таким образом, по генетическим дистанциям и дивергенции наблюдается подразделение подвидов на две группы – Северной и Южной Азии.

Филогенетические деревья, построенные по полной мтДНК и гену *VG* яДНК, показали сходство в кластеризации на две группы – Южной и Северной Азии (рис. 3). Образцы *A. mellifera* располагаются отдельно и служат в качестве внешней группы. Все подвиды *A. cerana*, за исключением *A. c. koreana*, группируются в отдельные кластеры по полной мтДНК и гену *VG* яДНК, что свидетельствует о том, что отцовская и материнская составляющие генома географически распространялись совместно. Это возможно при естественной миграции, а также при перемещении пчеловодом семей пчел. В случае с *A. c. koreana* представители этого подвида группировались по мтДНК как с *A. c. japonica*, так и с *A. c. ussuriensis*, что может быть следствием потока генов по материнской линии от этих подвидов в популяцию *A. c. koreana*, ареал которой расположен географически между ними. Такое может произойти в результате импорта маток *A. c. japonica* и *A. c. ussuriensis* в Южную Корею, где они в дальнейшем скрещивались с местными трутнями *A. c. koreana*.

Как известно, диапазон генетической дивергенции 0.80–8.00% и генетическая дистанция Jukes–Cantor 0.005–0.100 соответствовали диапазону внутривидовых уровней различий у насекомых [19, 25, 46, 47]. Значения генетической дивергенции и генетической дистанции по мтДНК и гену *VG* яДНК между *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica* находятся в пределах внутривидовых различий между подвидами.

Поскольку дивергенция мтДНК идет со скоростью 2.3% на 1 млн лет [48, 49], можно рассчитать, что возраст изоляции и последующей дивергенции *A. c. ussuriensis* может составлять 0.50 млн лет (1.10%) с *A. c. japonica*, 0.56 млн лет (1.30%) с *A. c. koreana*, 1.1 млн лет (2.55%) с *A. c. cerana*, 2.2 млн лет (5.15%) с *A. c. indica* (табл. 4, 5). Можно предполо-

жить, что вероятное время возникновения подвидов *A. cerana* около 2–1 млн лет назад.

Таким образом, *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 наименее изученный из всех подвидов в связи с тем, что встречается редко и только в диком виде в лесах Приморского и Хабаровского краев до 47°54' с.ш. Генетические исследования подвида представляют большой интерес для науки, поскольку подвид подвержен естественному отбору и адаптивной эволюции, где все признаки пчел должны формироваться критическими условиями Северной Азии. Мы секвенировали и аннотировали последовательности полной мтДНК пчел подвидов *A. c. ussuriensis* (AP018450) и *A. c. koreana* (AP018431) и шести экзонов гена вителлогенина *VG* яДНК подвидов *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica*. Последовательность мтДНК имеет длину 15919 пн, содержит АТ 84% и GC 16%, включает 22 гена тРНК, 13 белок-кодирующих генов, два гена рибосомной РНК *16S* и *12S rRNA*, один АТ-богатый регион и четыре некодирующие межгенные области *NC1–4*. Все белок-кодирующие гены начинаются с кодонов АТТ и АТГ, за исключением гена *ATP8* со стартовым кодоном АТС, а заканчивается стоп-кодонами ТАА и TAG. Было показано, что по *NC1* участку *A. c. koreana* относится к гаплотипу *ACNC110*, а *A. c. ussuriensis* – к гаплотипу *ACNC111*, тогда как по участку *NC2* оба подвида относятся к гаплотипу *Japan1*. Методом кластерного анализа последовательностей мтДНК и гена *VG* яДНК было показано разделение подвидов пчел на две группы – южных регионов (*A. c. indica*) и северных регионов (*A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*). Было показано, что подвид *A. c. ussuriensis* генетически более сходен с *A. c. japonica*, *A. c. koreana* и *A. c. cerana*, чем с *A. c. indica*. Значения генетической дивергенции (0.80–8.00%) и генетической дистанции Jukes–Cantor (0.005–0.100) по мтДНК и гену *VG* яДНК между подвидами *A. c. ussuriensis* Ilyasov et al., 2019, *A. c. koreana* Ilyasov et al., 2019, *A. c. japonica* Radoszkowski, 1887, *A. c. cerana* Fabricius, 1793, *A. c. indica* Fabricius, 1798 находятся в пределах внутривидовых различий между подвидами.

Авторы благодарны доктору Hisashi Okuyama за помощь в секвенировании, а также фонду e-ASIA JRP (The East Asia Science and Innovation Area Joint Research Program) за поддержку в выполнении проекта (<https://www.the-easia.org>).

Работа выполнена при поддержке государственного задания (регистрационный номер АААА-А21-121011990120-7) (И.Р.), гранта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (№ 19-54-70002 e-Asia_t) (Н.А.) и программ постдокторских исследований в Инчхонском Национальном университете за 2017–2019 годы (И.Р.).

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ruttner F.* Breeding Techniques and Selection for Breeding of the Honeybee. Derby, UK: British Isles Bee Breeders Association, 1988. 150 p.
2. *Прощалькин М.Ю., Новомодный Е.В., Безбородов В.Г., Кошкин Е.С.* Первые современные находки восковой пчелы *Apis cerana* Fabricius, 1793 (Hymenoptera, Apidae) в Хабаровском крае // Евразийский энтомолог. журн. 2014. Т. 13. № 3. С. 295–298.
3. *Кузнецов В.Н.* Китайская восковая пчела *Apis cerana* F. (Hymenoptera, Apidae) на Дальнем Востоке России. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2005. 112 с.
4. *Behura S.K.* Analysis of nuclear copies of mitochondrial sequences in honeybee (*Apis mellifera*) genome // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. № 7. P. 1492–1505. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm068>
5. *Choi Y.S., Lee M.Y., Hong I.P. et al.* Occurrence of sacbrood virus in Korean apiaries from *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) // J. Apiculture. 2010. V. 25. № 3. P. 187–191.
6. *Koetz A.H.* Ecology, behaviour and control of *Apis cerana* with a focus on relevance to the Australian incursion // Insects. 2013. V. 4. № 4. P. 558–592. <https://doi.org/10.3390/insects4040558>
7. *Vung N., Lee M.-L., Lee M.-Y. et al.* Breeding and selection for resistance to sacbrood virus for *Apis cerana* // J. Apiculture. 2017. V. 32. P. 345–352. <https://doi.org/10.17519/apiculture.2017.11.32.4.345>
8. *Песенко Ю.А., Лелей А.С., Радченко В.Г., Филаткин Г.Н.* Китайская восковая пчела *Apis cerana cerana* F. (Hymenoptera, Apidae) на Дальнем Востоке СССР // Энтомолог. обозрение. 1989. Т. 68. № 3. С. 527–548.
9. *Zhuang D.* New subspecies of *Apis cerana* (in Chinese) // Southwest China J. Agricultural Sci. 1989. V. 2. P. 61–65.
10. *Zhen-ming J., Yang G., Huang S. et al.* The advancement of beekeeping science and technology in China // Honeybees in Mountain Agriculture / Ed. Verma L.R. New Delhi: Oxford and IBH Publ. Co., 1992. 274 p.
11. *Diniz-Filho J.A.F., Malapsina O., Pignata M.I.B.* Geographic variation in *Apis cerana indica* F.: A spatial autocorrelation analysis of morphometric patterns // J. Apicultural Res. 1993. V. 32. № P. 65–72. <https://doi.org/10.1080/00218839.1993.11101289>
12. *Engel M.S.* The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera, Apidae, Apis) // J. Hymenoptera Res. 1999. V. 8. № 2. P. 165–196. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-718>
13. *Sugawara M.* Feral colonies of Japanese honey bees, *Apis cerana japonica* and their life history. 2. Natural nests and swarming // Mitsubachi Kagaku (Honeybee Science). 2000. V. 21. № 1. P. 35–39.
14. *Hepburn H.R., Smith D.R., Radloff S.E., Otis G.W.* Intraspecific categories of *Apis cerana*: morphometric, allozymal and mtDNA diversity // Apidologie. 2001. V. 32. № 1. P. 3–23. <https://doi.org/10.1051/apido:2001108>
15. *Takahashi J., Yoshida T.* The origin of Japanese honey bee *Apis cerana japonica* inferred from mitochondrial DNA // Mitsubachi Kagaku (Honeybee Science). 2003. V. 24. № 2. P. 71–76.
16. *Radloff S.E., Hepburn C., Hepburn R.H. et al.* Population structure and classification of *Apis cerana* // Apidologie. 2010. V. 41. № 6. P. 589–601. <https://doi.org/10.1051/apido/2010008>
17. *Takahashi J., Wakamiya T., Kiyoshi T. et al.* The complete mitochondrial genome of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA Part B. 2016. V. 1. № 1. P. 156–157. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1144108>
18. *Ilyasov R.A., Park J., Takahashi J., Kwon H.W.* Phylogenetic uniqueness of honeybee *Apis cerana* from the Korean peninsula inferred from the mitochondrial, nuclear, and morphological data // J. Apicultural Sci. 2018. V. 62. № 2. P. 189–214. <https://doi.org/10.2478/Jas-2018-0018>
19. *Ilyasov R.A., Han G.Y., Lee M.L. et al.* Phylogenetic relationships of Russian Far-East *Apis cerana* with other north Asian populations // J. Apicultural Sci. 2019. V. 63. № 2. P. 297–322. <https://doi.org/10.2478/JAS-2019-0024>
20. *Cornuet J.-M., Garnery L., Solignac M.* Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA // Genetics. 1991. V. 128. № 2. P. 393–403.
21. *Garnery L., Cornuet J.-M., Solignac M.* Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis // Mol. Ecol. 1992. V. 1. № 3. P. 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1992.tb00170.x>
22. *Garnery L., Mosshine E.H., Oldroyd B.P., Cornuet J.-M.* Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations // Mol. Ecol. 1995. V. 4. P. 465–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1995.tb00240.x>
23. *Arias M.C., Sheppard W.S.* Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence // Molecular Phylogenet. Evol. 1996. V. 5. № 3. P. 557–566. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0050>
24. *Songrarn O., Sittipraneed S., Klinbunga S.* Mitochondrial DNA diversity and genetic differentiation of the honeybee (*Apis cerana*) in Thailand // Biochem. Genet. 2006. V. 44. № 5–6. P. 256–269. <https://doi.org/10.1007/s10528-006-9030-5>
25. *Tan H.W., Liu G.H., Dong X. et al.* The complete mitochondrial genome of the Asiatic cavity-nesting honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) // PLoS One.

2011. V. 6. № 8. P. e23008.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023008>
26. Kent C.F., Issa A., Bunting A.C., Zayed A. Adaptive evolution of a key gene affecting queen and worker traits in the honey bee, *Apis mellifera* // Mol. Ecol. 2011. V. 20. № 24. P. 5226–5235.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05299.x>
27. Bernt M., Donath A., Jühling F. et al. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. V. 69. № 2. P. 313–319.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023>
28. Lowe T.M., Eddy S.R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence // Nucl. Ac. Res. 1997. V. 25. № 5. P. 955–964.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.5.0955>
29. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with Chain-terminating inhibitors // PNAS USA 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
30. Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of protein molecules // Mammalian Protein Metabolism / Ed. Munro H.N. N. Y.: Acad. Press, 1969. P. 21–132.
31. Tamura K., Battistuzzi F.U., Billings-Ross P. et al. Estimating divergence times in large molecular phylogenies // PNAS USA. 2012. V. 109. № 47. P. 19333–19338.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1213199109>
32. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000. 333 p.
33. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
34. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. № 4. P. 406–425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
35. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. № 3. P. 512–526.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
36. Crozier R.H., Crozier Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and genome organization // Genetics. 1993. V. 133. № 1. P. 97–117.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x>
37. Okuyama H., Tingek S., Takahashi J. The complete mitochondrial genome of the cavity-nesting honeybee, *Apis cerana* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) from Borneo // Mitochondrial DNA Part B. 2017. V. 2. № 2. P. 475–476.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1361344>
38. Kent C.F., Minaei S., Harpur B.A., Zayed A. Recombination is associated with the evolution of genome structure and worker behavior in honey bees // PNAS USA. 2012. V. 109. № 44. P. 18012–18017.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1208094109>
39. Lee J.Y., Wang A.R., Choi Y.S. et al. Mitochondrial DNA variations in Korean *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) and development of another potential marker // Apidologie. 2016. V. 47. № 1. P. 123–134.
<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0381-y>
40. Tan Y.D., Wan C.L., Zhu Y.F. et al. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm // Genetics. 2001. V. 157. № 3. P. 1277–1284.
41. Smith C.R., Smith C.D., Robertson H.M. et al. Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus* // PNAS USA. 2011. V. 108. № 14. P. 5667–5672.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007901108>
42. Tian D., Wang Q., Zhang P. et al. Single-nucleotide mutation rate increases close to insertions/deletions in eukaryotes // Nature. 2008. V. 455. № 7209. P. 105–108.
<https://doi.org/10.1038/nature07175>
43. McDonald M.J., Wang W.C., Huang H.D., Leu J.Y. Clusters of nucleotide substitutions and insertion/deletion mutations are associated with repeat sequences // PLoS Biology. 2011. V. 9. № 6. P. e1000622.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000622>
44. Koren A., Polak P., Nemesh J. et al. Differential relationship of DNA replication timing to different forms of human mutation and variation // Am. J. Hum. Genet. 2012. V. 91. № 6. P. 1033–1040.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.10.018>
45. Seplyarskiy V.B., Kharchenko P., Kondrashov A.S., Bazykin G.A. Heterogeneity of the transition/transversion ratio in *Drosophila* and Hominidae genomes // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. № 8. P. 1943–1955.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mss071>
46. Han T., Lee W., Lee S. et al. Reassessment of species diversity of the subfamily Denticollinae (Coleoptera: Elateridae) through DNA barcoding // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. P. e0148602.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148602>
47. Eimanifar A., Kimball R.T., Braun E.L. et al. The complete mitochondrial genome of the Egyptian honey bee, *Apis mellifera* lamarckii (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA Part B. 2017. V. 2. № 1. P. 270–272.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1325343>
48. DeSalle R., Freedman T., Prager E.M., Wilson A.C. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila* // J. Mol. Evol. 1987. V. 26. № 1–2. P. 157–164.
<https://doi.org/10.1007/BF02111289>
49. Johns G.C., Avise J.C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial Cytochrome B gene // Mol. Biol. Evol. 1998. V. 15. P. 1481–1490.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025875>

Genetic Properties and Evolution of Ussurian Wax Bee *Apis cerana ussuriensis* from the Primorsky Territory of Russia

R. A. Ilyasov^{a, b, *}, G. Y. Han^b, M. L. Lee^b, K. W. Kim^b, M. Y. Proshchalykin^c, A. S. Lelej^c,
J. H. Park^{b, d}, J. I. Takahashi^e, H. W. Kwon^{b, **}, and A. G. Nikolenko^a

^aUfa Federal Research Center, Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^bDivision of Life Sciences, Major of Biological Sciences, Incheon National University Convergence Research Center for Insect Vectors, Incheon National University, Incheon, 22012 Korea

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

^dBioinformatics Company 3BIGS CO.LTD, Hwaseong-si, 18454 Korea

^eFaculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Kyoto, 603-8555 Japan

*e-mail: apismell@hotmail.com

**e-mail: hwkwon@inu.ac.kr

A. c. ussuriensis is the most northern subspecies of the honey bee *A. cerana*, distributed in the taiga of Primorsky and Khabarovsk territories up to 47°54' N. Genetic studies of this subspecies are of great interest for science and beekeeping, since all adaptive characters were formed under the influence of the environment without human intervention. We sequenced and annotated the complete mitochondrial DNA (*mtDNA*) sequences of honey bee subspecies *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 (*AP018450*) from Primorsky Territory and *Apis cerana koreana* Ilyasov et al., 2019 (*AP018431*) from South Korea and six exons of the gene vitellogenin *VG E2–E7* of nuclear DNA (nDNA) of honey bee subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, and *A. c. indica* Fabricius, 1798. The method of cluster analysis of the sequences of *mtDNA* and the gene *VG* of nDNA showed the separation of bees into two groups, including the southern subspecies *A. c. indica* and northern subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*. Based on genetic divergence, it was shown that the subspecies *A. c. ussuriensis* is genetically close to *A. c. japonica*, *A. c. koreana* and *A. c. cerana* than with a subspecies *A. c. indica*. Values of genetic divergence (0.80–8.00%) and Jukes-Cantor genetic distance (0.005–0.100) for *mtDNA* and gene *VG* of nDNA between *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica* are within intraspecies differences between insect subspecies. The estimated time of origin of *A. cerana* subspecies was rated about 2–1 million years ago.

Keywords: *Apis cerana*, *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica*, mitochondrial genome, subspecies, divergence, evolution, Primorsky Territory, vitellogenin, *mtDNA*, nDNA.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА rs1799998, с.–344Т>С ГЕНА АЛЬДОСТЕРОНСИНТАЗЫ (CYP11B2) С РАЗВИТИЕМ САРКОИДОЗА ЛЕГКИХ

© 2021 г. И. Е. Малышева¹*, Л. В. Топчиева¹, Э. Л. Тихонович²

¹Институт биологии Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр
Российской академии наук”, Петрозаводск, 185910 Россия

²Республиканская больница им. В.А. Баранова, Петрозаводск, 185019 Россия

*e-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.05.2020 г.

После доработки 31.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Саркоидоз легких относится к иммуновоспалительным заболеваниям. Альдостерон способен активировать клетки врожденного иммунитета, его уровень зависит от активности альдостеронсинтазы (CYP11B2). Роль гена CYP11B2 в этиологии и патогенезе саркоидоза легких не изучена. В настоящей статье изучены ассоциация полиморфизма (rs1799998, с.–344Т>С) гена CYP11B2 с развитием саркоидоза легких и оценка взаимосвязи полиморфных вариантов гена CYP11B2 с биохимическими показателями плазмы крови (CRP, VCAM1, IL1, IL6, TNF). В исследование включено 255 человек (119 пациентов с диагнозом “саркоидоз легких” и 136 здоровых доноров), проживающих в Республике Карелия. Анализ локуса rs1799998 гена CYP11B2 в указанных группах проводили методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Содержание CRP, VCAM1, IL1, IL6, TNF в плазме крови здоровых людей определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Установлено, что в группе больных саркоидозом легких частота генотипа TT по rs1799998 гена CYP11B2 значимо выше, чем в группе здоровых людей ($\chi^2 = 4.05$; $p = 0.045$). Выявлено повышение риска развития саркоидоза легких у носителей аллеля T (OR = 1.60; 95% CI: 1.102–2.221) и генотипа TT (OR = 2.16; 95% CI: 1.181–3.947). Содержание VCAM1 в плазме крови здоровых доноров достоверно выше у лиц с генотипом TT по сравнению с носителями альтернативных генотипов (1465.91 и 967.05 нг/мл соответственно; $p = 0.002$).

Ключевые слова: саркоидоз легких, ген альдостеронсинтазы, легочная гипертензия, VCAM1.

DOI: 10.31857/S001667582104007X

Саркоидоз относится к системным иммуновоспалительным заболеваниям с неустановленной этиологией. Образование эпителиоидно-клеточных гранулём в различных органах и тканях (преимущественно в легких, до 90% случаев) – характерная особенность патологии [1]. Одним из частых осложнений данного заболевания является развитие легочной гипертензии, которая, по мнению ряда авторов, возникает у 5–74% больных [2, 3]. Развивающиеся вследствие этого функциональные нарушения – неблагоприятный прогностический фактор, связанный со значительным увеличением (в 8–10 раз) смертности больных [2]. Распространенность саркоидоза в Российской Федерации колеблется от 22 до 47 чел. на 100 тыс. населения. В последние десятилетия наблюдается неуклонный рост заболеваемости саркоидозом. Распространенность в Республике Карелия составляет 73 чел. на 100 тыс. населения, больше чем в среднем по стране [4, 5].

В настоящее время этиопатогенез саркоидоза трактуется как генетически обусловленная гиперактивность иммунной системы, которая приводит к гранулематозному воспалению посредством реакции гиперчувствительности замедленного типа в результате воздействия неизвестного причинного фактора [6]. Патогенез саркоидоза характеризуется активацией клеток врожденного и адаптивного иммунитета. В связи с этим считается, что восприимчивость людей к данному заболеванию может определяться носительством аллельных вариантов генов, кодирующих самые различные белки, являющиеся компонентами иммунной системы [7]. Среди генов, продукты которых участвуют в регуляции иммунного ответа при саркоидозе легких, называются гены Toll-подобных поверхностных рецепторов, внутриклеточных NOD-подобных рецепторов, гены, кодирующие провоспалительные цитокины, например TNF и др. Широко исследуется роль генов основного комплекса ги-

Таблица 1. Клиническая характеристика группы пациентов

Признак	Число пациентов (N = 119) n (%)
Мужчины	35 (29.41)
Женщины	84 (70.59)
Стадия 1	14 (11.76)
Стадия 2	95 (79.83)
Стадия 3	9 (7.56)
Стадия 4	1 (0.84)
Генерализованный саркоидоз	3 (2.52)
Пациенты с рецидивирующим течением саркоидоза	25 (21.01)
Функция внешнего дыхания	
Нормальная	109 (91.60)
Обструктивные нарушения	3 (2.52)
Рестриктивные нарушения	7 (5.88)
Нарушения диффузионной способности легких	12 (10.08)

Примечание. Классификация саркоидоза по K. Wurm (1958 г.).

стосовместимости в повышении риска развития данного заболевания и тяжести его течения. В стимулировании клеток иммунной системы играют роль компоненты ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС). Так, повышенная экспрессия ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) способствует увеличению уровня АФК и транскрипционного фактора с/ЕВРβ в макрофагах, что приводит к усилению продукции TNFα и снижению экспрессии нескольких маркеров M2 макрофагов [8]. Таким образом, изменение уровня АПФ может быть причиной переключения дифференцировки макрофагов с фенотипа M1 (активно вырабатывающих провоспалительные цитокины и цитотоксические молекулы) на фенотип M2 с высокой фагоцитарной активностью [9].

Показано, что в крови больных саркоидозом значимо повышен уровень ангиотензин-превращающего фермента [10, 11]. Кроме того, образующийся при участии АПФ вазоконстриктор ангиотензин II также обладает провоспалительным эффектом [12]. Этот эффект ангиотензина II опосредован через активацию фактора транскрипции NF-κB и последующей продукцией каскада медиаторов воспаления [13].

Другим, не менее значимым компонентом РААС, который может быть медиатором воспаления, является альдостерон, основной регулятор синтеза и секреции которого – ангиотензин II. Данный гормон обуславливает накопление в организме натрия и способствует возрастанию объ-

ема циркулирующей крови (ОЦК), что приводит к повышению артериального давления и увеличению вывода калия из организма [14]. Ключевой фермент синтеза альдостерона – альдостеронсинтаза, кодируемая геном цитохрома P450 11b2 (*CYP11B2*). Установлено, что некоторые мутации в гене *CYP11B2* могут приводить к изменению уровня экспрессии гена и активности альдостеронсинтазы [15, 16]. В работе White и соавт. [17] показано, что однонуклеотидная замена цитозина на тимин в положении –344 промоторной области гена *CYP11B2* (rs1799998, с.–344Т>С) изменяет эффективность связывания стероидогенного транскрипционного фактора (SF-1), что отражается на экспрессии гена *CYP11B2*.

Опубликованные данные по ассоциации полиморфных локусов гена *CYP11B2* с развитием патологического процесса при саркоидозе легких на сегодняшний день отсутствуют.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении ассоциации полиморфизма (rs1799998, с.–344Т>С) гена *CYP11B2* с развитием саркоидоза легких у больных, проживающих в Республике Карелия, и оценки взаимосвязи полиморфных вариантов гена *CYP11B2* с биохимическими показателями плазмы крови (CRP, VCAM1, IL1, IL6, TNF).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 255 человек (119 пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом саркоидоза легких (средний возраст 44.25 ± 1.16 года) и 136 здоровых доноров (контроль), средний возраст 43.78 ± 1.24 года), проживающих на территории Республики Карелия. Группы больных и контроля, включенные в исследование, были смешанными по этническому составу.

Материалом для исследований служили образцы периферической крови, полученные при содействии Отделения интенсивной респираторной терапии Республиканской больницы им. В.А. Баранова Республики Карелия. Характеристика больных представлена в табл. 1. Информационное согласие было получено от всех пациентов. Работа одобрена локальным этическим комитетом ГБУЗ “Республиканская больница им. В.А. Баранова”, протокол № 96 от 11.07.2017.

Диагноз саркоидоза легких устанавливался на основании клинико-рентгенологических и лабораторных изменений, соответствовал международным критериям выявления этого гранулематоза [18]. У всех пациентов (100%) саркоидоз был верифицирован гистологически на основании исследования биоптата. Для морфологической верификации диагноза саркоидоза использовались следующие методы диагностики: видеоторакоскопия – 50% случаев, трансбронхиальная биопсия – 43%, открытая биопсия легких – 3%,

биопсия другого органа (кожа, периферический лимфатический узел) – 4%.

Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, выраженные нарушения функции внутренних органов, а также перенесенные в последний месяц инфекционные заболевания, курение табака, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела ≥ 30 кг/м. Пациенты, включенные в настоящее исследование, не принимали каких-либо лекарственных препаратов (в том числе гормональных) и находились в состоянии ремиссии.

Геномную ДНК из цельной крови выделяли с помощью набора Analytik jena (Германия). Генотипирование полиморфного локуса rs1799998, с.–344Т>С гена *CYP11B2* осуществляли методом ПЦР-ПДРФ. ПЦР проводили на приборе Maxugene (США). Для амплификации использовали набор ScreenMix-HS (набор включал: высокопроцессивную Taq ДНК-полимеразу со специфическими моноклональными антителами, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg^{2+} , ПЦР-буфер, красители) и праймеры производства фирмы “Евроген” (Россия). Последовательность праймеров представлена в работе [19]. ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *HaeIII* (1 е.а.) (“Сиб-энзим”, Россия) в течение 4 ч при 37°C, согласно инструкции к набору. После рестрикции фрагменты ДНК разделяли в 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), использовали трис-ацетатный буфер, окрашивали 1%-ным раствором бромистого этидия и визуализировали в проходящем УФ свете.

Для оценки взаимосвязи генотипов полиморфного локуса rs1799998, с.–344Т>С гена *CYP11B2* с биохимическими показателями использовали периферическую кровь здоровых людей с целью исключить влияние на них терапии и воспалительного процесса (28 человек, ср. возраст 44.15 ± 2.70 года). Забор крови для иммуноферментного анализа проводился натощак. В работе использованы наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) фирмы “Biomerica”, США (для определения CRP, VCAM1), “Invitrogen”, США (для определения уровня цитокинов IL1, IL6, TNF). Содержание указанных белков определяли в плазме после центрифугирования (15 мин при 1200 об./мин) цельной крови согласно инструкциям к наборам. Оптическую плотность растворов определяли при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере Tecan Sunrise (Tecan, Швейцария).

Для статистической обработки результатов исследования использовали пакет программ Statgraphics Centurion XV и MS Excel. С помощью критерия χ^2 оценивали достоверность различий частот аллелей и генотипов в исследуемых группах. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Для оценки риска развития саркоидоза легких рассчитывали отношение шансов (OR) с

95%-ным доверительным интервалом (95% CI). Различия считались значимыми при $p < 0.05$.

Для анализа достоверности различий содержания белков в плазме крови между группами был использован непараметрический критерий *U* Вилкоксона–Манна–Уитни. Для оценки влияния генотипа на биохимические показатели плазмы крови использовали дисперсионный анализ по Краскелу–Уоллису (*H*). Данные по содержанию белков в плазме крови представлены в виде медианы. Возраст обследованных представлен в виде среднего и ошибки среднего. Для оценки взаимосвязи генотипов полиморфного локуса rs1799998, с.–344Т>С с биохимическими показателями использован дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение генотипов по полиморфному локусу rs1799998, с.–344Т>С гена *CYP11B2* соответствовало равновесию Харди–Вайнберга в группе больных ($\chi^2 = 0.04$; $p = 0.980$) и в контрольной группе ($\chi^2 = 1.86$; $p = 0.395$).

При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов по локусу rs1799998 гена *CYP11B2* установлено статистически значимое увеличение частоты аллеля *T* ($\chi^2 = 6.31$; $p = 0.013$) и генотипа *TT* в группе больных саркоидозом легких по сравнению с контрольной группой ($\chi^2 = 4.05$; $p = 0.045$) (табл. 2).

Согласно рассчитанному коэффициенту соотношения шансов (OR) у носителей *T*-аллеля риск развития саркоидоза легких повышен в 1.60 раза по сравнению с индивидами, имеющими в генотипе аллель *C* по rs1799998 гена *CYP11B2*: [OR = 1.60; 95% CI: 1.102–2.221]. Установлено, что у носителей генотипа *TT* по полиморфному локусу rs1799998 гена *CYP11B2* риск развития саркоидоза легких повышен в 2.16 раза по сравнению с носителями *CC* и *CT* генотипов: [OR = 2.16; 95% CI: 1.181–3.947].

Изучено содержание белков (CRP, VCAM1, IL1, IL6, TNF) в плазме крови здоровых людей, носителей разных генотипов по полиморфному локусу rs1799998, с.–344Т>С гена *CYP11B2* (табл. 3).

По результатам иммуноферментного анализа содержание молекул адгезии VCAM1 в плазме крови здоровых доноров достоверно выше у носителей генотипа *TT*, по сравнению с носителями других генотипов ($U = 21.0$; $p = 0.002$) (табл. 3). Дисперсионный анализ по Краскелу–Уоллису выявил значимую взаимосвязь между уровнем

Таблица 2. Распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs1799998 гена *CYP11B2* в группе больных саркоидозом легких и в контрольной группе

Генотип/Аллель	Контрольная группа (<i>N</i> = 136) <i>n</i> (%)	Больные саркоидозом легких (<i>N</i> = 119) <i>n</i> (%)	Критерий χ^2
<i>CC</i>	42 (30.9)	26 (21.8)	7.136 (<i>d.f.</i> = 2, <i>p</i> = 0.029)
<i>CT</i>	72 (52.9)	58 (48.8)	
<i>TT</i>	22 (16.2)	35 (29.4)	
<i>C</i>	156 (57.4)	110 (46.2)	6.31 (<i>d.f.</i> = 1, <i>p</i> = 0.013)
<i>T</i>	116 (42.6)	128 (53.8)	

Примечание. χ^2 – критерий хи-квадрат Пирсона; *d.f.* – число степеней свободы; *p* – уровень значимости.

Таблица 3. Биохимические показатели плазмы крови здоровых людей, носителей аллельных вариаций гена *CYP11B2* (с.–344Т>С)

Показатель	Генотип		<i>p</i>
	индивиды с генотипом <i>TT</i> (<i>n</i> = 10), Ме	индивиды с генотипами <i>TC</i> + <i>CC</i> (<i>n</i> = 18), Ме	
CRP, мг/мл	0.99 (0.76; 1.56)	1.35 (0.94; 1.67)	0.23
IL1 β , пг/мл	4.95 (4.19; 5.52)	4.95 (4.19; 6.09)	0.72
IL6, пг/мл	3.78 (3.35; 4.00)	4.16 (3.26; 5.33)	0.39
VCAM1, нг/мл	1465.91 (1265.91; 1625.00)	967.05 (809.09; 1111.36)	0.002
TNF α , пг/мл	8.00 (6.67; 9.67)	7.33 (6.67; 7.83)	0.30

Примечание. Ме – медиана и интерквартильный диапазон (Ме (25%; 75%)); *p* – уровень значимости для критерия *U* Вилкоксона–Манна–Уитни.

VCAM1 и полиморфными вариантами гена *CYP11B2* (*H* = 4.91; *p* = 0.027).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе исследована ассоциация полиморфного локуса rs1799998, с.–344Т>С гена *CYP11B2* с риском развития саркоидоза легких у жителей Республики Карелия. Данная мутация в регуляторной области гена *CYP11B2* ассоциирована с изменением уровня альдостерона в плазме крови, как отмечено ранее [15, 16]. Установлено, что повышенный уровень альдостерона усиливает воспалительный процесс, что может привести, например, к ремоделированию кровеносных сосудов, гипертрофии сердца, тубулоинтерстициальному фиброзу и повреждению клубочков в почках [20]. В настоящем исследовании нами изучен вклад полиморфизма rs1799998, с.–344Т>С гена *CYP11B2* в патогенез саркоидоза легких, заболевания, связанного с развитием воспаления.

Аллельный полиморфизм генов, кодирующих компоненты РААС, например гена АПФ, играет значимую роль в патогенезе саркоидоза, что, в свою очередь, может оказывать влияние на клиническое течение заболевания [21]. Так, по данным метаанализа показана связь между риском развития саркоидоза и носительством *D*-аллеля I/D-полиморфного маркера гена АПФ (rs1799752) [22]. Наличие *D*-аллеля связано с более высокой активностью циркулирующего и тканевого АПФ [23].

В качестве провоспалительного фактора при развитии и прогрессировании гранулематозного воспаления при саркоидозе легких может выступать, по-видимому, также гормон альдостерон (другой компонент РААС), уровень которого может зависеть от ряда факторов, в том числе и генетического полиморфизма [17]. Ключевым ферментом, участвующим в синтезе гормона альдостерона, является альдостеронсинтаза, кодируемая геном *CYP11B2*. Данный фермент относится к суперсе-

мейству цитохрома P450 и катализирует последнюю стадию синтеза альдостерона из дезоксикортикостерона [24]. Известно, что полиморфные локусы в промоторной или в 3'-нетранслируемой области гена *CYP11B2* могут оказывать влияние на уровень его экспрессии и активность образуемого белка [25]. К таким полиморфным локусам относится однонуклеотидная замена rs1799998, с.-344Т>С в промоторной области гена. В проведенном нами исследовании выявлена ассоциация полиморфизма rs1799998, с.-344Т>С гена *CYP11B2* с риском развития саркоидоза легких. У носителей аллеля Т и генотипа ТТ риск развития данного заболевания повышен в 1.60 и в 2.16 раза соответственно. По данным литературы, с.-344Т>С гена *CYP11B2* оказывает влияние на степень связывания с транскрипционным фактором SF-1, который является регулятором экспрессии гена альдостеронсинтазы и синтеза альдостерона [17]. Так, наличие С в положении с.-344 промотора гена *CYP11B2* позволяет более эффективно связывать транскрипционный фактор SF-1, по сравнению с Т в данном положении, увеличивая тем самым экспрессию гена более чем в 4 раза [26].

Изменения содержания и активности альдостеронсинтазы, обусловленные наличием мутаций в разных областях гена *CYP11B2*, могут быть связаны с вариабельностью уровня альдостерона в крови [27, 28]. Потенциальная роль альдостерона как посредника клеточных и молекулярных изменений при развитии гранулематозного воспаления при саркоидозе легких может быть обусловлена его влиянием на процессы локального воспаления, наблюдаемые в саркоидной гранулёме. В ряде исследований показано, что альдостерон способствует развитию воспалительных реакций в различных тканях [29, 30]. При связывании альдостерона с минералокортикоидными рецепторами (MR) (которые экспрессируются также на поверхности мононуклеарных лейкоцитов) происходит активация MR с последующей транслокацией гормон-рецепторного комплекса в ядро клетки, где он связывается с HRE (hormone response elements) и модулирует экспрессию генов [31]. В пользу специфичности связывания MR с альдостероном свидетельствует более высокая стабильность образуемого комплекса альдостерон-MR по сравнению с комплексом кортизол-MR [32]. Важная роль альдостерона в патогенезе саркоидоза легких, а также провоспалительный эффект, который данный гормон оказывает на процессы локального воспаления, заключаются, по видимому, в активации NF-kB-пути. Активация фактора транскрипции NF-kB (ядерный фактор "каппа-би"; Nuclear Factor kappa B) приводит к повышенному синтезу разнообразных медиаторов воспаления, таких как цитокины, хемокины и др. [33]. Кроме того, альдостерон MR-зависимым образом индуцирует фосфорилирование регулиру-

емой сыворотки/глюкокортикоид-индуцируемой киназы 1 (SGK1; serum/glucocorticoid regulated kinase 1), транскрипция которой контролируется широким спектром гормонов и регуляторов. SGK1, в свою очередь, вовлечена в многочисленные внутриклеточные сигнальные пути, в том числе в регуляцию процессов воспаления и модулирования воспалительного фенотипа моноцитов и макрофагов в самой гранулёме [34].

Учитывая вовлеченность альдостеронсинтазы и альдостерона в формирование системного воспаления, мы предположили, что носительство вариантов гена *CYP11B2* может обуславливать вариабельность содержания белков, связанных с развитием воспалительных реакций, например уровня цитокинов. Согласно результатам нашего исследования у носителей различных генотипов по полиморфному локусу rs1799998, с.-344Т>С гена *CYP11B2* не выявлено различий в содержании провоспалительных цитокинов и С-реактивного белка. Тем не менее обнаружена взаимосвязь содержания растворимой формы VCAM1 с полиморфными вариантами гена *CYP11B2*. Так, у носителей генотипа ТТ гена *CYP11B2* этот показатель в плазме крови был значимо выше.

Известно, что уровень VCAM1 в плазме повышается при активации воспалительных процессов в организме и служит в качестве чувствительного маркера эндотелиальной дисфункции, которая является одним из звеньев патологического процесса легочной гипертензии и саркоидоза легких.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о значимой ассоциации полиморфного локуса rs1799998, с.-344Т>С гена *CYP11B2* с развитием саркоидоза легких. Учитывая малочисленность выборки и ее смешанный этнический состав, необходимы проведение дальнейших исследований на расширенной выборке и репликация результатов в других этнических группах и популяциях. Необходимо проведение функциональных исследований для определения роли гена *CYP11B2* в развитии и прогрессировании патологического процесса при саркоидозе.

Таким образом, генетический фон может определять не только восприимчивость людей к возникновению саркоидоза с поражением легких, но и клинические характеристики протекания данного заболевания. В связи с этим важное значение имеют попытки найти аллельные вариации, которые могли бы выступать в качестве прогностических маркеров предрасположенности населения к данному заболеванию и характеризовали бы особенности его протекания у пациентов.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карель-

ского научного центра Российской академии наук (тема № 0218-2019-0077).

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. Judson M.A. The clinical features of sarcoidosis: A comprehensive review // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2015. V. 49. № 1. P. 63–78.
<https://doi.org/10.1007/s12016-014-8450-y>
2. Авдеев С.Н. Легочная гипертензия при саркоидозе // *Пульмонология.* 2016. Т. 26. № 6. С. 725–735.
3. Boucly A., Cottin V., Nunes H. et al. Management and long-term outcomes of sarcoidosis-associated pulmonary hypertension // *Eur. Respir. J.* 2017. V. 50. № 4. pii: 1700465.
<https://doi.org/10.1183/13993003.00465-2017>
4. Визель А.А., Визель И.Ю., Амиров Н.Б. Эпидемиология саркоидоза в Российской Федерации // *Вестник соврем. клин. мед.* 2017. Т. 10. № 5. С. 66–73.
5. Тихонович Э.Л., Везикова Н.Н., Маркелова О.А., Малышева И.Е. Эпидемиология, особенности клиники, диагностики и лечения саркоидоза в Карелии // *Уч. зап. Петрозаводского гос. ун-та.* 2015. № 6(151). С. 67–71.
6. Johns C.J., Michele T.M. The clinical management of sarcoidosis. A 50-year experience at the Johns Hopkins Hospital // *Medicine (Baltimore).* 1999. V. 78. № 2. P. 65–111.
<https://doi.org/10.1097/00005792-199903000-00001>
7. Малышева И.Е., Топчиева Л.В., Тихонович Э.Л. Роль полиморфизма генов в чувствительности к саркоидозу легких // *Пульмонология.* 2019. Т. 29. № 5. С. 596–603.
<https://doi.org/10.18093/0869-0189-2019-29-5-596-603>
8. Khan Z., Cao D.Y., Giani J.F. et al. Overexpression of the C-domain of angiotensin-converting enzyme reduces melanoma growth by stimulating M1 macrophage polarization // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. № 12. P. 4368–4380.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006275>
9. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. M1 и M2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // *Патогенез.* 2008. Т. 6. № 4. С. 31–39.
10. Lieberman J. Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis // *Am. J. Med.* 1975. V. 59. № 3. P. 365–372.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(75\)90395-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(75)90395-2)
11. Lynch J.P., Kazerooni E.A., Gay S.E. Pulmonary sarcoidosis // *Clin. Chest Med.* 1997. V. 18. № 4. P. 755–785.
[https://doi.org/10.1016/s0272-5231\(05\)70417-2](https://doi.org/10.1016/s0272-5231(05)70417-2)
12. Li Y. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and essential hypertension in the Chinese population: A meta-analysis including 21,058 participants // *Intern. Med. J.* 2012. V. 42. № 4. P. 439–444.
<https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2011.02584.x>
13. Kranzhofer R., Kranzhöfer R., Browatzki M. et al. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor kappa B in human monocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 257. P. 826–828.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0543>
14. Барышникова Г.А., Аверин Е.Е. Альдостерон при артериальной гипертензии: новые терапевтические возможности // *CONSILIUM MEDICUM.* 2013. Т. 15. № 10. С. 18–23.
15. Holloway C.D., MacKenzie S.M., Fraser R. et al. Effects of genetic variation in the aldosterone synthase (CYP11B2) gene on enzyme function // *Clin. Endocrinol. (Oxf.).* 2009. V. 70. № 3. P. 363–371.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03383.x>
16. Lövås K., McFarlane I., Nguyen H.H. et al. A novel CYP11B2 gene mutation in an Asian family with aldosterone synthase deficiency // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009. V. 94. № 3. P. 914–919.
<https://doi.org/10.1210/jc.2008-1524>
17. White P.C., Hautanen A., Kupari M. Aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphisms and cardiovascular function // *Endocr. Res.* 1998. V. 24. № 3–4. P. 797–804.
<https://doi.org/10.3109/07435809809032690>
18. Baughman R.P., Culver D.A., Judson M.A. A concise review of pulmonary sarcoidosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011. V. 183. № 5. P. 573–581.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0865CI>
19. Hlubocká Z., Jáchymová M., Heller S. et al. Association of the –344T/C aldosterone synthase gene variant with essential hypertension // *Physiol. Res.* 2009. V. 58. № 6. P. 785–792.
20. Brown N.J. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis // *Nat. Rev. Nephrology.* 2013. V. 9. № 8. P. 459–469.
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.110>
21. de Man F.S., Tu L., Handoko M.L. et al. Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012. V. 186. № 8. P. 780–789.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201203-0411OC>
22. Song G.G., Kim J.H., Lee Y.H. Associations between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and susceptibility to sarcoidosis: A meta-analysis // *J. Renin. Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015. V. 16. № 1. P. 219–226.
<https://doi.org/10.1177/1470320313489059>
23. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F. et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels // *J. Clin. Invest.* 1990. V. 86. № 4. P. 1343–1346.
<https://doi.org/10.1172/JCI114844>
24. Williams J.S., Williams G.H. 50th Anniversary of aldosterone // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. V. 88. № 6. P. 2364–2372.
<https://doi.org/10.1210/jc.2003-030490>

25. Jia M., Zhang H., Song X. et al. Association of CYP11B2 polymorphisms with susceptibility to primary aldosteronism: a meta-analysis // *Endocr. J.* 2013. V. 60. № 7. P. 861–870.
<https://doi.org/10.1507/endocrj.ej12-0455>
26. White P.C., Slutsker L. Haplotype analysis of CYP11B2 // *Endocr. Res.* 1995. V. 21. № 1–2. P. 437–442.
<https://doi.org/10.3109/07435809509030459>
27. Tamaki S., Iwai N., Tsujita Y. Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese // *Hypertension.* 1999. V. 33. P. 266–270.
28. Mopidevi B., Sivankutty I., Hao S. et al. Effects of intron conversion in the human CYP11B2 gene on its transcription and blood pressure regulation in transgenic mice // *J. Biol. Chem.* 2020. Jun 15; jbc.RA120.013047.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013047>
29. Herrada A.A., Campino C., Amador C.A. et al. Aldosterone as a modulator of immunity: implications in the organ damage // *J. Hypertension.* 2011. V. 29. № 9. P. 1684–1692.
<https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32834a4c75>
30. Muñoz-Durango N., Barake M.F., Letelier N.A. Immune system alterations by aldosterone during hypertension: From clinical observations to genomic and nongenomic mechanisms leading to vascular damage // *Curr. Mol. Med.* 2013. V. 6. P. 1035–1046.
<https://doi.org/10.2174/1566524011313060015>
31. Lombès M., Binart N., Oblin M.E. et al. Characterization of the interaction of the human mineralocorticoid receptor with hormone response elements // *Biochem. J.* 1993. V. 292. № 2. P. 577–583.
<https://doi.org/10.1042/bj2920577>
32. Muñoz-Durango N., Vecchiola A., Gonzalez-Gomez L.M. et al. Modulation of immunity and inflammation by the mineralocorticoid receptor and aldosterone // *Biomed. Res. Int.* 2015;2015:652738.
<https://doi.org/10.1155/2015/652738>
33. Namsolleck P., Unger T. Aldosterone synthase inhibitors in cardiovascular and renal diseases // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2014. V. 9. P. 62–68.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gft402>
34. Lang F., Artunc F., Vallon V. The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2009. V. 18. P. 439–448.
<https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32832f125e>

Association of Polymorphic Locus rs1799998, c.–344T>C of Aldosterone Synthase (*CYP11B2*) Gene with Pulmonary Sarcoidosis Development

I. E. Malysheva^{a, *}, L. V. Topchieva^a, and E. L. Tikhonovich^b

^a*Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia*

^b*Republican Hospital named after V.A. Baranov, Petrozavodsk, 185019 Russia*

*e-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

Pulmonary sarcoidosis is an immune-inflammatory disease. Aldosterone is able to activate cells of innate immunity, its level depends on the activity of aldosterone synthase (*CYP11B2*). The role of the *CYP11B2* gene in pulmonary sarcoidosis etiology and pathogenesis has not been studied. The aim of this study was to study the association of *CYP11B2* polymorphism (rs1799998, c.–344T>C) with development of sarcoidosis of the lungs and to assess the relationship of polymorphic variants of *CYP11B2* with biochemical parameters of plasma (CRP, VCAM1, IL1, IL6, TNF). The sample included 255 people (119 patients with pulmonary sarcoidosis diagnosis and 136 healthy donors) inhabiting the Republic of Karelia. Analysis of rs1799998 locus of *CYP11B2* in the groups indicated was carried out by the method of polymerase chain reaction followed by the analysis of restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The content of CRP, VCAM1, IL1, IL6, TNF in healthy people plasma was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In the group of patients with pulmonary sarcoidosis, the frequency of *TT* genotype for rs1799998 of *CYP11B2* gene was found to be significantly higher than in the group of healthy people ($\chi^2 = 4.05$; $p = 0.045$). An increased risk of pulmonary sarcoidosis development was revealed in carriers of *T* allele (OR = 1.60; 95% CI: 1.102–2.221) and *TT* genotype (OR = 2.16; 95% CI: 1.181–3.947). The content of VCAM1 in plasma of healthy donors was significantly higher in persons with *TT* genotype compared with carriers of alternative genotypes (1465.91 ng/ml and 967.05 ng/mL, respectively; $p = 0.002$).

Keywords: pulmonary sarcoidosis, aldosterone synthase gene, pulmonary hypertension, VCAM1.

ГЕНЫ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНОЙ СИСТЕМЫ И ГЕН ТРАНСМЕМБРАННОГО БЕЛКА 18 В РАЗВИТИИ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖИРЕНИЕМ

© 2021 г. О. В. Кочетова^{1, *}, Д. Ш. Авзалетдинова², З. А. Шангареева², Л. З. Ахмадишина¹, Г. Ф. Корыгина¹, В. В. Виктор², Т. В. Викторова²

¹Институт биохимии и генетики, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450008 Россия

*e-mail: Olga_mk78@mail.ru

Поступила в редакцию 28.05.2020 г.

После доработки 07.09.2020 г.

Принята к публикации 12.11.2020 г.

Расстройство пищевого поведения обуславливает переизбыток и рост избыточной массы тела. Сложный патогенез формирования пищевой зависимости имеет генетическую основу. Цель нашего исследования – изучить ассоциацию полиморфных вариантов генов, кодирующих рецепторы глутамата (*GRIK5* rs8099939, *GRIK3* rs534131, *GRIA1* rs2195450, *GRIN2B* rs7301328, rs2268132, rs1805476, *GRIN1* rs6293), гамма-аминомасляной кислоты (*GABBR2* rs3750344), гена рецепторов серотонина (*HTR2A* rs6313, rs6311), гена нейротрофического фактора мозга (*BDNF* rs925946, rs11030107) и гена трансмембранного белка 18 (*TMEM18* rs2860323, rs6548238) с расстройством пищевого поведения у индивидов с избыточной массой тела и ожирением. Ассоциация с уровнем показателя ИМТ обнаружена для генотипа *GG* гена *GRIN1* (rs6293), генотипами *CC-AC* *GRIK5* (rs8099939), *CC-CT* *TMEM18* (rs6548238), *CT-TT* *GRIA1* (rs2195450). Расстройство ограничительного пищевого поведения было выявлено у носителей генотипов *AC-AA* локуса rs1805476 гена *GRIN2B* ($P = 0.04$), носителей генотипа *GG* локуса rs6293 гена *GRIN1* ($P = 0.028$). Расстройство эмоциогенного пищевого поведения было характерно носителям аллеля *A* локуса rs1805476 гена *GRIN2B* ($P = 0.005$) и носителям генотипов *AC-CC*. Нарушение экстернатального пищевого поведения было выявлено у носителей генотипов *AA* и *AC* полиморфного локуса rs1805476 гена *GRIN2B* ($P = 0.0003$). Таким образом, полиморфные варианты генов глутаматных, серотониновых рецепторов, а также гена трансмембранного белка 18 являются важными факторами развития расстройства пищевого поведения и ожирения.

Ключевые слова: ожирение, расстройство пищевого поведения, серотониновые рецепторы, рецепторы глутамата, ассоциация.

DOI: 10.31857/S0016675821050040

Расстройство пищевого поведения (ПП), или пищевая зависимость, обуславливает переизбыток и рост избыточной массы тела [1]. Сложный патогенез формирования пищевой зависимости имеет генетическую основу [2]. По результатам Genome Wide Association Study (GWAS), были выявлены локусы, обуславливающие менее 10% наследуемости ожирения, вероятность наследования ожирения в близнецовых исследованиях достигает 85% [3], тогда как исследование пищевого поведения остается малоизученной проблемой. Одним из обсуждаемых генов ожирения является ген нейротрофического фактора мозга (*BDNF*), ассоциированный с массой тела по результатам GWAS [4]. Масштабное исследование генетических антропометрических признаков (GIANT-консор-

циум) выявил дополнительные локусы, вносящие вклад в развитие ожирения, например ген трансмембранного белка 18 (*TMEM18*) [5].

Гены, продукты которых принимают участие в формировании личностных характеристик, могут обуславливать аддиктивное поведение человека, включая депрессию, алкоголизм, расстройство пищевого поведения. Известно, что полиморфные варианты генов нейротрансмиттерной системы способствуют формированию личностных качеств, в том числе влияют на ПП [6].

Гены глутаматных рецепторов играют центральную роль в развитии синаптической пластичности и нейротоксичности [7]. Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером центральной нервной системы (ЦНС)

[8]. Была установлена глутаматергическая природа многих нейродегенеративных расстройств, и нейротоксическое действие глутамата стало предметом исключительно интенсивного изучения после того, как к нейропатологическим состояниям, обусловленным гиперактивностью глутаматергической системы, отнесли не только классические нейродегенеративные расстройства (болезнь Альцгеймера, хорею Гентингтона, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз), но и ишемические поражения головного мозга, различные энцефалопатии (включая диабетические), когнитивные и мнестические расстройства, алкоголизм и др. [9–15].

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК, GABA) — один из основных тормозных нейромедиаторов ЦНС. ГАМК играет ключевую роль в процессах торможения ЦНС. В этом контексте гамма-аминомасляная кислота является полным антагонистом глутамата (нейромедиатор возбуждения).

Известно, что серотонин влияет на настроение, состояние сна и бодрствования, и в том числе, на потребление пищи и/или выборочное потребление продуктов, содержащих простые углеводы [16]. Установлено действие этого нейромедиатора на энергетический баланс в организме. Увеличение уровня серотонина в ЦНС способствует снижению потребления пищи и уменьшению массы тела. Гиперпродукция периферического серотонина посредством взаимодействия с адипоцитами приводит к ожирению [17]. Чаще всего в основе психических нарушений лежит ряд общих нейробиологических механизмов, поэтому мы провели исследование как генов ассоциированных с ожирением (по GWAS), так и общеизвестные гены с риском развития расстройства пищевого поведения.

Цель нашего исследования — изучить ассоциацию полиморфных вариантов генов, кодирующих рецепторы глутамата (*GRIK5 rs8099939*, *GRIK3 rs534131*, *GRIA1 rs2195450*, *GRIN2B rs7301328*, *rs2268132*, *rs1805476*, *GRIN1 rs6293*), гамма-аминомасляной кислоты (*GABBR2 rs3750344*), гена рецептора серотонина (*HTR2A rs6313*, *rs6311*), гена нейротрофического фактора мозга (*BDNF rs925946*, *rs11030107*), гена трансмембранного белка 18 (*TMEM18 rs2860323*, *rs6548238*) с расстройством пищевого поведения у индивидов с избыточной массой тела и ожирением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы ДНК. Изучали ДНК неродственных индивидов, татар по этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан. Число обследованных составило

275 человек. Средний возраст испытуемых составил 55.6 ± 7.68 лет. В группу вошли 172 женщины и 103 мужчины. Средний рост — 171.56 ± 8.63 см, средняя масса тела — 79.7 ± 13.23 , избыточная масса тела (ИМТ) — 29.18 ± 3.30 кг/м². Испытуемые были дифференцированы по пищевому поведению, в первую группу вошло 60 человек без нарушений ПП, т.е. все параметры по трем видам ПП входили в референсные значения, вторую группу составили испытуемые с нарушением ПП хотя бы по одному параметру ($N = 215$). Пациентов с ожирением (ИМТ ≥ 30 кг/м²) обследовали в “Центре коррекции веса и сопутствующих заболеваний” на базе больницы скорой медицинской помощи, в 21-ой больнице г. Уфа, на Республиканской станции переливания крови.

Для оценки пищевого поведения использовали Голладский опросник пищевого поведения (DEBQ) [18]. Анкета опросника включала 33 пункта, учитывающих следующие пищевые особенности: сдержанность (десять пунктов) растороженности (десять пунктов), измеряемая как внешнее питание, и эмоциональное питание (13 вопросов). Данная анкета была адаптирована Ю.Л. Савчиковой для России [19]. Полученные нами референсные значения пищевого поведения: для ограничительного ПП (ОПП) — 2.41 баллов, для эмоционального (ЭмПП) — 1.88 баллов, для экстернального ПП (ЭкПП) — 3.22 балла.

Исследование одобрено комитетом по этике ИБГ УНЦ РАН. От всех участников получали информированное добровольное согласие на использование биологического материала в планируемых исследованиях.

Генотипирование. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием метода фенольно-хлороформной очистки. Полиморфные варианты генов *GRIK5 rs8099939* (g.42016956T>G), *GRIK3 rs534131* (g.20608A>G), *GRIN2B rs2268132* (g.152108G>A), *GABBR2 rs3750344* (g.98578034T>C), *HTR2A rs6313* (g.6230C>T), *rs6311* (g.4692G>A), *BDNF rs925946* (g.27645655T>G), *rs11030107* (g.27673288A>G), *TMEM18 rs2860323* (g.614210A>G), *rs6548238* (g.634905T>C) анализировали при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием коммерческих наборов с флуоресцентной детекцией (FLASH/RTAS) (<http://testgen.ru>, ООО “Тест-Ген”, Россия) и прибора BioRad CFX96 TM (“Bio-Rad Laboratories”, Inc., USA). Флуоресценцию “по конечной точке” и дискриминацию генотипов определяли по протоколу BioRad CFX96TM, используя программу CFX Manager TM Software.

Полиморфные локусы *GRIN2B rs7301328* (c.366C>G), *rs1805476* (1354C>A), *GRIK3 rs534131*

Таблица 1. Полиморфные маркеры, локализация, нуклеотидные последовательности праймеров, рестриктазы и аллели

Ген, локус	Полиморфизм, локализация	Праймер, рестриктаза	Аллель, размер фрагмента, пн
<i>GRIN2B</i> <i>rs7301328</i>	12:13865843 c.366C>G nsSNP	F 5'-TCAGCACAGACTCTCACCTC-3' R 5'-CCTCAGCACAAACCCGC-3' <i>TaqI</i>	C – 112 G – 93, 19
<i>GRIN2B</i> <i>rs1805476</i>	12:13561429 c.*1354C>A regSNP	F 5'-TTAAGAGAAATGAGCTTGGC-3' R 5'-TGTTAAGTGAAGGGAGCATC-3' <i>HindIII</i>	A – 135, 181 C – 19, 116, 181
<i>GRIK3</i> <i>rs534131</i>	1:37018636 g.20608A>G	F 5'-GGCTGTGTGAGGGCAGAC-3' R 5'-CCCGATTCTACTGGGACCTT-3'	G – 156 A – 125, 31
<i>GRI1</i> <i>rs2195450</i>	5:153491449 c.-750C>T	F 5'-TCTAAGAGGAGGGGGCAAGG-3' R 5'-GCTTGGTAGATGGTGCTTGA-3' <i>TaqI</i>	T – 122 C – 94, 24
<i>GRIN1</i> <i>rs6293</i>	9:137156786 c.789A>G	F 5'-CGTTCTTGCCGTTTCATGA-3' R 5'-GTAAGAGCCAGCAGCAACGGAG-3' <i>MspI</i>	G – 138, 113, 59, 114 A – 251, 173

(g.20608A>G), *GRI1 rs2195450* (c.-750C>T) и *GRIN1 rs6293* (c.789A>G) исследовали при помощи ПЦР с последующим расщеплением продукта соответствующими рестриктазами *TaqI*, *HaeIII*, *PstI*, *TaqI*, *MspI*. Условия проведения ПЦР, последовательности праймеров представлены в табл. 1.

Статистическая обработка результатов. Рассчитывали частоты аллелей и генотипов, соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга; оценивали статистическую значимость различий между группами по распределению частот аллелей и генотипов с использованием критерия χ^2 Пирсона. В ряде случаев для оценки достоверности различий частот использовался также трендовый тест Кохрана–Армитажа [20]. Вклад генотипов изучаемых локусов в вариабельность количественных признаков, характеризующих пищевое поведение (показатели пищевого поведения по трем видам нарушений), отражающего уровень пищевой зависимости и характеристики ожирения определяли при помощи критерия Крускала–Уоллиса (в случае трех групп) или Манна–Уитни (в случае двух групп). Для расчетов использовали программу Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., USA) [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Прежде чем приступить к анализу ассоциации генов-кандидатов с развитием ожирения и нару-

шенного ПП, мы проверили соответствие распределения частот генотипов полиморфных вариантов генов равновесию Харди–Вайнберга, данные для группы сравнения; в нее входили лица без расстройства ПП, данные представлены в табл. 2. Распределение частот генотипов полиморфных локусов не отклонялось от распределения Харди–Вайнберга в группе сравнения.

По результатам анализа распределения частот генотипов и аллелей 14-ти полиморфных вариантов генов: *GRIK5 rs8099939*, *GRIK3 rs534131*, *GRI1 rs2195450*, *GRIN2B rs7301328*, *rs2268132*, *rs1805476*, *GRIN1 rs6293*, *GABBR2 rs3750344*, *HTR2A rs6313*, *rs6311*, *BDNF rs11030107*, *rs925946*, *TMEM18 rs2860323*, *rs6548238* – с развитием нарушенного пищевого поведения выявлена ассоциация по локусам *rs2195450* гена *GRI1*, *rs6293* гена *GRIN1* и *rs8099939* гена *GRIK5*.

Далее мы провели анализ количественных параметров ожирения среди всех испытуемых с учетом индекса массы тела (ИМТ). Были обнаружены статистически значимые различия в значениях ИМТ у некоторых индивидов с различными генотипами полиморфного локуса *rs2195450* гена *GRI1* (табл. 3). Для индивидов с гетерозиготным и гомозиготным по редкому аллелю генотипами локуса *rs2195450* гена *GRI1* характерны более высокие значения ИМТ ($P = 0.0071$). Ассоциация выявлена и для локуса *rs2268132* гена *GRIN2B*, в этом

Таблица 2. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов *GABBR2*, *GRIK3*, *GRIK5*, *HTR2A*, *GRIN2B*, *GRIN1*, *BDNF* и *TMEM18* в группах индивидов с нормальным и нарушенным пищевым поведением

№	Ген, полиморфизм	Генотипы, аллели	Нормальное ПП, абс. (%), N = 60	Расстройство ПП, абс. (%), N = 215	P^a	P^b	P^c
1	<i>GABBR2</i> <i>rs3750344</i>	<i>TT/CT/CC</i> <i>T/C</i>	36 (60.0)/21 (35.0)/3 (5.0) 93 (78.0)/27 (22.0)	116(54.5)/80(37.6)/17(8.0) 312 (73)/114 (27)	1	0.62 0.41	0.35
2	<i>GRIK3</i> <i>rs534131</i>	<i>GG/GA/AA</i> <i>G/A</i>	22 (36.7)/34 (56.7)/4 (6.7) 78 (65.0)/42 (35.0)	82 (38.1)/114 (53.0)/19 (8.8) 278 (65.0)/152 (35.0)	0.09	0.81 0.97	0.93
3	<i>GRIA1</i> <i>rs2195450</i>	<i>CC/CT/TT</i> <i>C/T</i>	37 (61.7)/20 (33.3)/3 (5.0) 94 (78.0)/26 (22.0)	103 (47.9)/90 (41.9)/22 (12.0) 296 (69.0)/134 (31.0)	1	0.12 0.05	0.02
4	<i>GRIN2B</i> <i>rs7301328</i>	<i>GG/GC/CC</i> <i>G/C</i>	18 (30.0)/31 (51.7)/11 (18.3) 257 (60.0)/173 (40.0)	81 (37.7)/95 (44.2)/39 (18.1) 67 (56.0)/53 (44.0)	0.8	0.51 0.50	0.45
5	<i>GRIN2B</i> <i>rs2268132</i>	<i>CC/AC/AA</i> <i>C/A</i>	32 (53.3)/22 (36.7)/6 (10.0) 86 (72.0)/34 (28.0)	84 (39.1)/98 (45.6)/33 (15.3) 266 (62.0)/164 (38.0)	0.5	0.13 0.06	0.05
6	<i>GRIN2B</i> <i>rs1805476</i>	<i>CC/ACA</i> <i>C/A</i>	12 (20.0)/29 (48.3)/19 (31.7) 53 (44.0)/67 (56.0)	63 (29.3)/98 (45.6)54 (25.1) 224 (52.0)/206 (48.0)	1	0.3 0.15	0.13
7	<i>GRIN1</i> <i>rs6293</i>	<i>AA/AG/GG</i> <i>A/G</i>	35 (58.3)/24 (40.0)/1 (1.7) 94 (78.0)/26 (22.0)	99 (46.0)/102 (47.4)/14 (6.5) 300 (70.0)/130 (30.0)	0.26	0.1 0.08	0.04
8	<i>GRIK5</i> <i>rs8099939</i>	<i>CC/AC/AA</i> <i>C/A</i>	18 (30.0)/26 (43.3)/16 (26.7) 62(52.0)/58 (48.0)	87 (45.0)/95 (44.2)/33 (15.3) 269 (63.0)/161 (37.0)	0.31	0.11 0.04	0.00
9	<i>HTR2A</i> <i>rs6313</i>	<i>CC/CT/TT</i> <i>C/T</i>	21 (35.0)/29 (48.3)/10 (16.7) 71 (59.0)/49 (41.0)	59 (27.4)/107 (49.8)/49 (22.8) 225 (52.0)/205 (48.0)	0.75	0.41 0.22	0.26
10	<i>HTR2A</i> <i>rs6311</i>	<i>CC/CA/AA</i> <i>C/A</i>	23 (38.3)/28 (46.7)/9 (15) 74 (62.0)/46 (38.0)	58 (27.0)/105 (48.8)/52(24.2) 221 (51.0)/209 (49.0)	0.66	0.14 0.05	0.15
11	<i>BDNF</i> <i>rs11030107</i>	<i>AA/AG/GG</i> <i>A/G</i>	39 (65.0)/20 (33.3)/1 (1.7) 98 (81.7)/22 (18.3)	159 (73.9)/54 (25.1)/2 (1.0) 372 (86.5)/58 (13.5)	0.34	0.38 0.23	0.16
12	<i>BDNF</i> <i>rs925946</i>	<i>GG/GT/TT</i> <i>G/T</i>	31 (51.7)/24 (40.0)/5 (8.3) 86 (71.6)/34 (28.4)	129 (60.0)/70 (32.6)/16 (7.4) 328 (76.3)/102 (23.7)	0.90	0.50 0.36	0.31
13	<i>TMEM18</i> <i>rs2860323</i>	<i>CC/CT/TT</i> <i>C/T</i>	40 (66.7)/18 (30.0)/2 (3.3) 98 (81.7)/22 (18.3)	155 (75.6)/49 (23.9)/1 (0.5) 359 (87.6)/51 (12.4)	0.98	0.10 0.13	0.08
14	<i>TMEM18</i> <i>rs6548238</i>	<i>CC/CT/TT</i> <i>C/T</i>	37 (61.7)/21 (35.0)/2 (3.3) 95 (79.2)/25 (20.8)	146 (67.9)/60 (27.9)/9 (4.2) 352 (81.9)/78 (18.1)	0.63	0.56 0.59	0.51

Примечание. Уровни значимости: P^a – для равновесия Харди–Вайнберга, P^b – для критерия χ^2 , P^c – для трендового теста Армитажа.

случае высокие показатели уровня ИМТ характерны для генотипов *AC* и *AA* ($P = 0.04$). Ассоциация определена для локуса *rs6293* гена *GRIN1*. Носители генотипов *AG* и *GG* этого локуса имеют высокие значения ИМТ, достигающие 29.92 и 33.31 кг/м² соответственно ($P = 0.0068$). Носители

генотипов *CC* и *AC* полиморфного локуса *rs8099939* гена *GRIK5* также обладают повышенным уровнем ИМТ, достигавшим 30.16 и 30.06 кг/м² соответственно ($P = 0.0069$). Статистически значимые ассоциации наблюдались и в случае полиморфного локуса *rs6548238* гена *TMEM18*. У лиц с гомозиготным

Таблица 3. Результаты анализа ассоциации полиморфных локусов генов-кандидатов с уровнем ИМТ

№	Ген, полиморфизм	Генотип	M (\pm SEM), N = 275	P^a
1	<i>GABBR2</i> <i>rs3750344</i>	<i>TT/CT/CC</i>	29.51 (0.44) 29.46 (0.46) 31.39 (1.44)	0.3
2	<i>GRIK3</i> <i>rs534131</i>	<i>GG/GA/AA</i>	29.98 (0.53) 29.44 (0.42) 29.48 (1.17)	0.72
3	<i>GRIA1</i> <i>rs2195450</i>	<i>CC/CTTT</i>	28.75 (0.42) 30.34 (0.52) 31.66 (0.9)	0.0071
4	<i>GRIN2B</i> <i>rs7301328</i>	<i>GG/GC/CC</i>	30.01 (0.52) 29.73 (0.5) 28.73 (0.62)	0.36
5	<i>GRIN2B</i> <i>rs2268132</i>	<i>CC/AC/AA</i>	28.78 (0.44) 30.09 (0.48) 30.88 (1.01)	0.04
6	<i>GRIN2B</i> <i>rs1805476</i>	<i>AA/AC/CC</i>	29.77 (0.48) 29.77 (0.47) 29.3 (0.72)	0.8
7	<i>GRIN1</i> <i>rs6293</i>	<i>AA/AG/GG</i>	28.98 (0.45) 29.92 (0.46) 33.31 (1.31)	0.0068
8	<i>GRIK5</i> <i>rs8099939</i>	<i>CC/AC/AA</i>	30.16 (0.54) 30.06 (0.48) 27.53 (0.56)	0.0069
9	<i>HTR2A</i> <i>rs6313</i>	<i>CC/CT/TT</i>	29.42 (0.62) 29.66 (0.44) 29.92 (0.66)	0.85
10	<i>HTR2A</i> <i>rs6311</i>	<i>CC/CA/AA</i>	29.26 (0.62) 29.71 (0.45) 30.02 (0.63)	0.68
11	<i>BDNF</i> <i>rs11030107</i>	<i>AA/AG/GG</i>	29.99 (0.5) 30.67 (0.64) 28.98 (0.45)	0.7
12	<i>BDNF</i> <i>rs925946</i>	<i>GG/GT/TT</i>	31.63 (0.25) 31.5 (0.32) 31.94 (0.79)	0.88
13	<i>TMEM18</i> <i>rs2860323</i>	<i>CC/CT/TT</i>	31.7 (0.22) 31.25 (0.5) 29.78 (3.83)	0.42
14	<i>TMEM18</i> <i>rs6548238</i>	<i>CC/CT/TT</i>	31.64 (0.24) 31.88 (0.34) 29.56 (0.83)	0.027

Примечание. M (\pm SEM) – среднее значение и ошибка среднего, P^a – достоверность для *H*-критерия Крускала–Уоллиса.

Таблица 4. Вклад полиморфных вариантов гена *GRI1*, *GRIN1*, *GRIK5*, *GRIN2B*, *TMEM18* в варибельность показателей характеризующих ожирение и пищевое поведение

Ген, полиморфизм	Генотип	М (±SEM), N = 275	P ^a
Вес, кг			
<i>GRI1</i> rs2195450	CC/CT/TT	78.06 (1.19)/81.02 (1.5)/86.86 (3.07)	0.01
<i>GRIN1</i> rs6293	AA/AG/GG	78.43 (1.33)/80.79 (1.3)/88 (3.42)	0.048
<i>GRIK5</i> rs8099939	CC/CA/AA	80.65 (1.56)/81.15 (1.38)/75.9 (1.66)	0.11
	CC-CA/AA	80.92 (1.03)/75.9 (1.66)	0.035
Объем талии, см			
<i>GRI1</i> rs2195450	CC/CT/TT	96.48 (1.17)/100.81 (1.31)/104.71(3.73)	0.006
<i>GRIK5</i> rs8099939	CC/AC/AA	100.95 (1.64)/98.97 (1.24)/94.77 (1.54)	0.04
<i>GRIN2B</i> rs2268132	CC/AC/AA	96.29 (1.24)/100.23 (1.42)/102.97 (2.24)	0.024
Общий холестерин			
<i>GRIN2B</i> rs1805476	AA/AC/CC	5.66 (0.16)/5.41 (0.11)/5.15 (0.16)	0.04
<i>GRI1</i> rs2195450	CC/CT/TT	5.39 (0.11)/5.37 (0.13)/5.95 (0.3)	0.093
	CC-CT/TT	5.38 (0.08)/5.95 (0.3)	0.03
ОПП			
<i>GRIN2B</i> rs1805476	AA/AC/CC	2.67 (0.12)/2.47 (0.11)/2.22 (0.13)	0.04
<i>GRIN1</i> rs6293	AA/AG/GG	2.34 (0.1)/2.47 (0.1)/ 3.22 (0.49)	0.028
	AA-AG/GG	2.4 (0.07)/3.22 (0.49)	0.012
<i>TMEM18</i> rs6548238	CC/CT/TT	2.68 (0.14)/2.24 (0.14)/2.56 (0.29)	0.09
	CC/CT-TT	2.68 (0.14)/2.28 (0.12)	0.03
ЭмПП			
<i>GRIN2B</i> rs1805476	AA/AC/CC	3.57 (0.26)/3.07 (0.21)/2.37 (0.24)	0.005
<i>GRIK5</i> rs8099939	CC/AC/AA	3.05 (0.24)/3.2 (0.22)/2.36 (0.24)	0.08
	CC-AC/AA	3.13 (0.16)/2.36 (0.24)	0.027
ЭкПП			
<i>GRIN2B</i> rs1805476	AA /AC/CC	3.39 (0.15)/3.08 (0.1)/2.65 (0.11)	0.0003

Примечание. М (±SEM) – среднее значение и ошибка среднего, P^a – достоверность для H-критерия Крускала–Уоллиса.

генотипом *TT* гена *TMEM18* (rs6548238) были определены более низкие значения ИМТ, по сравнению с носителями *CC* и *CT* ($P = 0.027$).

Ассоциация была выявлена и с другими антропометрическими и клиническими параметрами ожирения, эти данные представлены в табл. 4. Полиморфные локусы rs2195450 гена *GRI1*, rs2268132 гена *GRIN2B*, rs6293 гена *GRIN1* и rs8099939 гена *GRIK5* связаны с повышенной массой тела. Носители генотипов *CT* и *CC* локуса rs2195450 гена *GRI1* имели повышенную массу тела, достигавшую 81.02 и 86.86 кг соответственно ($P = 0.0071$) (табл. 4).

У гомозиготных носителей редкого аллеля локуса rs6293 гена *GRIN1* масса тела достигала 88 кг по сравнению с 78.43 и 81.02 кг у гомозиготных носителей частого аллеля и гетерозигот ($P = 0.048$). Гомозиготные носители редкого аллеля локуса

rs8099939 гена *GRIK5* напротив демонстрировали снижение уровня массы тела ($P = 0.035$) (табл. 4).

Объем талии является важной характеристикой метаболических расстройств. Анализ выявил ассоциации данного показателя с частотами локусов: rs2195450 гена *GRI1*, rs8099939 гена *GRIK5* и rs2268132 гена *GRIN2B*. Носители генотипов *CT* и *TT* локуса rs2195450 гена *GRI1* в среднем имеют уровень талии 100.81 и 104.71 см соответственно ($P = 0.006$). Для носителей генотипов *AC* и *AA* локуса rs2268132 гена *GRIN2B* данный размер более 100.23 и 102.97 см ($P = 0.24$). Гомозиготные носители аллеля *C* локуса rs8099939 гена *GRIK5* имели в среднем талии 100.95 см, гетерозиготы – 98.97 см, а гомозиготные носители аллеля *A* – 94.77 см ($P = 0.04$). Ассоциация с повышенным уровнем холестерина была выявлена для локусов rs1805476 гена *GRIN2B* ($P = 0.024$) и rs2195450 гена *GRI1* ($P = 0.03$).

Анализ различных расстройств пищевого поведения выявил ассоциации с локусами: *rs1805476* гена *GRIN2B*, *rs6293* гена *GRIN1* и *rs8099939* гена *GRIK5* и *rs6548238* гена *TMEM18*. Нарушение ограничительного пищевого поведения было выявлено у носителей аллеля *A* локуса *rs1805476* гена *GRIN2B* в гомозиготном и гетерозиготном состояниях ($P = 0.04$) и у носителей генотипа *GG* локуса *rs6293* гена *GRIN1* ($P = 0.028$). Носители генотипов с *AG* и *AA* имели значение баллов, соответствующее нормальному пищевому поведению (2.4 балла), тогда как носители генотипа *GG* страдают от пищевых самоограничений или бессистемных строгих диет ($P = 0.03$). Нарушения эмоциогенного пищевого поведения были установлены для носителей аллеля *A* локуса *rs1805476* гена *GRIN2B* ($P = 0.005$). Обладатели аллеля *A* в гомозиготном и гетерозиготном состояниях имели показатели, отклоняющиеся от нормы, что свидетельствует о наличии гиперфагии. Носители редкого аллеля в гомозиготном состоянии (генотип *AA*, локус *rs8099939* гена *GRIK5* ($P = 0.027$)) имели эмоциогенное пищевое поведение соответствующее норме, тогда как носители генотипов *AC* и *CC* имели баллы с повышенным значением, т.е. выше нормы (табл. 4).

Нарушение экстерналичного пищевого поведения было выявлено у носителей генотипов *AA* и *AC* полиморфного локуса *rs1805476* гена *GRIN2B* ($P = 0.0003$), обладатели этих генотипов способны принимать пищу всегда, когда только ее видят.

Известны данные о наличии гендерных различий при анализе гена рецептора серотонина [22], в этой связи мы провели анализ распределения полиморфных вариантов гена *HTR2A rs6313*, *rs6311* отдельно у мужчин и женщин. Была выявлена ассоциация локуса *rs6311* гена *HTR2A* с уровнем ИМТ у мужчин ($P = 0.04$): для носителей генотипа *CC* ИМТ равен 29 ± 0.87 кг/м², для генотипа *AC* — 23.38 ± 0.55 кг/м², для носителей генотипа *AA* ИМТ составил 27.52 ± 1.11 кг/м² ($P = 0.04$). Вместе с тем для локуса *rs6313* гена *HTR2A* такие различия выявлены не были ($P = 0.27$). В отношении остальных ОНП также проводился анализ различий в зависимости от гендерной принадлежности. Ассоциации были выявлены для полиморфных локусов: *rs2195450* гена *GRI1A1* ($P = 0.008$), *rs6293* гена *GRIN1* ($P = 0.022$) и *rs8099939* гена *GRIK5* ($P = 0.017$). Таким образом, полученные ассоциации сохранились, однако уровень значимости уменьшился.

ОБСУЖДЕНИЕ

После проведения большого количества широкомасштабных исследований GWAS и ген-кандидатного анализа стали известны гены, потенциально вовлеченные как в развитие ожирения, так и в формировании расстройств пищевого поведения. Такими потенциальными генами-кандидатами являются: гены нейротрансмиттеры (гены рецепторов серотонина, рецепторов глутамата, гамма-аминомасляной кислоты), гены, ассоциированные с ожирением по результатам GWAS (нейротрофического фактора мозга, трансмембранного белка 18, рецептора меланокортина 4, ген, ассоциированный с массой тела (*FTO*) и др.). Проведенный анализ показал наличие ассоциаций с развитием нарушений ПП при сравнении частот генотипов и аллелей генов *GRIN1 rs6293*, *GRI1A1 rs2195450*, *GRIN2B rs2268132*, *GRIK5 rs8099939* в исследуемых группах. Анализ количественных параметров выявил ассоциацию локусов *GRI1A1 rs2195450*, *GRIN1 rs6293*, *GRIK5 rs8099939*, *TMEM18 rs6548238* с уровнем ИМТ, также ассоциация была выявлена для локуса *rs6311* гена *HTR2A* с ожирением только у мужчин.

Отдельный анализ проводился для изучения пищевого поведения испытуемых с использованием результатов опросника DEBQ. Ассоциация с расстройством пищевого поведения была установлена для локусов: *rs1805476* гена *GRIN2B*, *rs6293* гена *GRIN1* и *rs8099939* гена *GRIK5* и *rs6548238* гена *TMEM18*. Проводимые ранее исследования показали взаимосвязь локусов *rs6293* гена *GRIN1* и *rs1805476* гена *GRIN2B* с расстройством нарушенного ПП при сахарном диабете типа 2 [15]. Полученные ассоциации подтвердились в нашей выборке пациентов с ожирением, а также расстройством ОПП. Генотипы *CC* и *CT* гена *TMEM18* (*rs6548238*) чаще встречались у индивидов с расстройством ограничительного ПП и у лиц с повышенной массой тела. Аллель *C* ассоциируется с нарушенным пищевым поведением и ожирением. В 2009 г. Консорциум “Генетические исследования антропометрических признаков” провел крупномасштабный мета-анализ данных и выявил ассоциацию аллеля *C* (частого аллеля полиморфного локуса *rs6548238* гена *TMEM18*) с ожирением [23]. Известно, что ген *TMEM18* экспрессируется в некоторых областях мозга, особенно в гипоталамусе, а также в регионах, которые играют решающую роль в регуляции энергетического гомеостаза и в областях регулирующих калорийность питания. Установлено, что калорийность питания, изменение энергетических потребностей организма, массы тела, влияют на экспрессию генов [24]. Однако молекулярная функция

белка неизвестна. Известно, что *TMEM18* локализуется на ядерной мембране и связывает ДНК с ее С-концом, подавляя ее транскрипцию. Этот результат был подтвержден как у взрослых, так и у детей [25].

В ряде исследований была установлена ассоциация полиморфных локусов генов серотонинергических рецепторов и нейротрофического фактора мозга с риском развития ожирения [16, 26]. Тем не менее в данной работе такой ассоциации выявлено не было, за исключением локуса *rs6311* гена *HTR2A* в группе мужчин. Возможно это связано с различными частотами этих локусов в разных этнических группах или наличием гендерных различий [26]. Серотонин-нейротрансмиттер регулирует основные физиологические процессы – сон, аппетит, секреторную функцию. Рецептор серотонина *HTR2A* участвует в регуляции секреции кортизола [27], которая может играть патогенетическую роль при абдоминальном ожирении. Показано, что полиморфные варианты гена *HTR2A* ассоциированы с ожирением у шведов [28] и с повышенным потреблением энергии и жира у детей из Франции [29]. Анализ пищевого поведения и его ассоциация с полиморфными вариантами гена *HTR2A* статистически значимых различий не выявил. Об отсутствии ассоциации с пищевым поведением и ожирением сообщалось в исследованиях Т. Ando с соавт. в популяциях японцев и испанцев [30, 31]. С другой стороны, в работах [32–34] ассоциация с нарушенным ПП поведением установлена для аллеля *A*. Продолжение исследования рецепторов серотонина представляется актуальным при изучении пищевого поведения.

Наибольшее количество статистически значимых ассоциаций в настоящем исследовании выявлено для полиморфных локусов генов глутаматных рецепторов. Исследований глутаматергической системы по проблеме алиментарного ожирения немного. Так, в работе J. Wright с соавт. указывается на то, что системное введение антагонистов рецепторов глутамата N-метил-d-аспаратного типа (антагонистов NMDAR) повышает аппетит и увеличивает количество съеданной пищи [35]. Установлено, что холецистокинин (ССК) путем активации желудочно-кишечных афферентов блуждающего мозга и антагонистов NMDA-рецепторов способствует быстрому насыщению и формированию состояния сытости. Это может свидетельствовать о роли глутаматергической системы в контроле потребления пищи. Установлено, что гены глутаматных рецепторов играют центральную роль в развитии синаптической пластичности (формировании памяти и процессов

обучения), нейротоксичности, а также нейрональной выживаемости или смерти нейронов [7]. Так, например, нейрональный рецептор N-метил-D-аспартата (NMDAR) играет ключевую роль в патофизиологии шизофрении, биполярного расстройства, депрессии и других психоэмоциональных расстройств [6]. Установлено снижение экспрессии NMDAR рецепторов у пациентов с депрессивным синдромом.

Ген *GRIN2B* рецептора N-метил-d-аспартата (NMDA), расположен в 12p12, состоит из 13 экзонов. Кодировывает субъединицу NR2, ионотропных глутаматных рецепторов, участвует в длительном потенцировании, зависящем от активности повышения эффективности синаптической передачи [6]. В настоящей работе также для носителей аллеля *C* локуса *rs1805476* выявлена ассоциация с расстройством ПП по трем шкалам. Полиморфный локус *rs1805476* является заменой в 3' области гена *GRIN2B*. Согласно базе RegulomeDB (Version1.1) (<http://regulome.stanford.edu/>) оценивали регуляторный показатель однонуклеотидного полиморфизма (ОНП). ОНП *rs1805476* расположен в регионе, являющемся сайтом связывания с транскрипционными факторами. Данному полиморфному варианту соответствует коэффициент 5 и уровень *sco*го равный 0.00143, однако эти значения отражают низкий регуляторный потенциал. Вместе с тем известно, что ОНП *rs1805476* и *rs1805502* гена *GRIN2B* находятся в неравновесии по сцеплению $D' = 0.9$. В работе S.C. Weickert с соавт. показано, что полиморфный локус *rs1805502* ассоциирован со сниженной экспрессией мРНК и уровнем белка. Вариативность гена, кодирующего NR2B-субъединицу глутаматного NMDA-рецептора, может отрицательно влиять на экспрессию других субъединиц NMDAR [37].

Полиморфный вариант гена *GRIN2B* (*rs2268132*) связан со статусом курения и количественными показателями, отражающими интенсивность курения [38]. Полиморфный вариант гена *GRIN1* (*rs6293*) ассоциирован с ограничительным пищевым поведением. Изучение полиморфизма *rs6293* проводилось при исследовании заболеваний мозга, ассоциация была выявлена с возрастом манифестации у пациентов при болезни Гентингтона в турецкой популяции [39]. Интронный полиморфизм *rs2195450* гена *GRI1A1* ассоциирован с риском развития мигрени особенно в популяциях Азии. Вероятно его ассоциация с заболеваниями объясняется тесным сцеплением с другим функционально значимым полиморфизмом, либо этот полиморфизм обуславливает вариативное посттранскрипционное редактирование белка, изменяющее скорость десенсibilизации рецептора [40].

Риск развития ожирения ассоциирован с аллелем *C* полиморфного локуса *rs809993* гена *GRIK5*. Согласно базе RegulomeDB данному признаку соответствует коэффициент 5 — указание на то, что этот локус является местом связывания транскрипционных факторов.

Полученные результаты указывают на наличие ассоциации полиморфных вариантов генов глутаматных, серотониновых рецепторов и трансмембранного белка 18 с нарушением пищевого поведения и формирования ожирения.

Исследование частично финансировалось Российским фондом фундаментальных исследований (№ 20-013-00261) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации НИР № АААА-А16-116020350031-4.

Биологический материал (ДНК) для исследования взят из биологических материалов человека ИБГ УНЦ РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

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. *Вознесенская Т.Г.* Расстройства пищевого поведения при ожирении и их коррекция // Ожирение и метаболизм. 2004. № 2. С. 2–6.
2. *Bulik C., Sullivan P., Kendler K.* Genetic and environmental contributions to obesity and binge eating // Int. J. Eat. Disord. 2003. V. 33. № 3. P. 293–298. <https://doi.org/10.1002/eat.10140>
3. *Andreasen C.H., Andersen G.* Gene–environment interactions and obesity — further aspects of genomewide association studies // Nutr. 2009. V. 25. № 10. P. 998–1003. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.001>
4. *Speliotes E.K., Willer C.J., Berndt S.I. et al.* Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index // Nat. Genet. 2010. V. 42. № 11. P. 937–948. <https://doi.org/10.1038/ng.686>
5. *Thorleifsson G., Walters G.B., Gudbjartsson D. et al.* Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity // Nat. genet. 2009. V. 41. № 1. P. 18–24. <https://doi.org/10.1038/ng.274>
6. *Georgi A., Jamra R.A., Klein K. et al.* Possible association between genetic variants at the *GRIN1* gene and schizophrenia with lifetime history of depressive symptoms in a German sample // Psych. Genet. 2007. V. 17. № 5. P. 308–310. <https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e3280c1e5fb>
7. *Metzler M.* Mutations in NMDA receptors influence neurodevelopmental disorders causing epilepsy and intellectual disability // Clin. Genet. 2011. V. 79. № 3. P. 219–220. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01610>
8. *Shepherd G.M.* The Synaptic Organization of the Brain. Oxford University Press. 2004.
9. *Leigh P.N., Meldrum B.S.* Excitotoxicity in ALS // Neurology. 1996. V. 47. № 6. Suppl. 4. P. 221S–227S.
10. *Chapman A.G.* Glutamate receptors in epilepsy // Prog. Brain Res. Els. 1998. V. 116. P. 371–383. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)60449-5](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)60449-5)
11. *Loopuijt L.D., Schmidt W.J.* The role of NMDA receptors in the slow neuronal degeneration of Parkinson's disease // Amino Acids. 1998. V. 14. № 1–3. P. 17–23. <https://doi.org/10.1007/BF01345237>
12. *Arning L., Kraus P., Valentin S. et al.* *NR2A* and *NR2B* receptor gene variations modify age at onset in Huntington disease in a sex-specific manner // Hum. Genet. 2007. V. 122. № 2. P. 175–182. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0393-4>
13. *Tang J., Chen, X., Xu, X. et al.* Significant linkage and association between a functional (GT)_n polymorphism in promoter of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene (*GRIN2A*) and schizophrenia // Neur. Lett. 2006. V. 409. № 1. P. 80–82. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.09.022>
14. *Seripa D., Matera M.G., Franceschi M. et al.* Association analysis of *GRIN2B*, encoding N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit, and Alzheimer's disease // Dem. Ger. Cog. Disord. 2008. V. 25. № 3. P. 287–292. <https://doi.org/10.1159/000118634>
15. *Kochetova O.V., Avzaletdinova D.S., Korytina G.F. et al.* The association between eating behavior and polymorphisms in *GRIN2B*, *GRIK3*, *GRI1* and *GRIN1* genes in people with type 2 diabetes mellitus // Mol. Biol. Rep. 2020. V. 47. № 3. P. 2035–2046. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05304-x>
16. *Загребаяева О.Ю.* Роль серотонинергической системы в развитии ожирения // Мед. новости. 2016. № 4. С. 259.
17. *Namkung J., Kim H., Park S.* Peripheral serotonin: a new player in systemic energy homeostasis // Mol. Cells. 2015. V. 38. № 12. P. 1023. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0258>
18. *Van Strien T., Frijters J.E., Bergers G.P. et al.* The Dutch Eating Behavior Questionnaire (DEBQ) for assessment of restrained, emotional, and external eating behavior // Int. J. Eating Disorders. 1986. V. 5. № 2. P. 295–315.

- [https://doi.org/10.1002/1098-108X\(198602\)5:2<295-AID-EAT2260050209>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1098-108X(198602)5:2<295-AID-EAT2260050209>3.0.CO;2-T)
19. Савчикова Ю.Л. Психологические особенности женщин с проблемами веса: Дис. ... д. б. н. СПб. гос. ун-т, 2005. 225 с.
 20. Slager S.L., Schaid D.J. Case-control studies of genetic markers: Power and sample size approximations for Armitage's test for trend // *Hum. Hered.* 2001. V. 52. № 3. P. 149–153.
<https://doi.org/10.1159/000053370>
 21. Statistica v. 6.0 program (StatSoft Inc., USA) (<http://www.statistica.com>).
 22. Zhao H., Wilkinson A., Shen J. et al. Genetic polymorphisms in genes related to risk-taking behaviours predicting body mass index trajectory among Mexican American adolescents // *Ped. Obes.* 2017. V. 12. № 5. P. 356–362.
<https://doi.org/10.1111/ijpo.12151>
 23. Willer C.J., Speliotes E.K., Loos R.J. et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation // *Nat. Gen.* 2009. V. 41. № 1. P. 25.
<https://doi.org/10.1038/ng.287>
 24. Almén M.S., Jacobsson J.A., Shaik J.H. et al. The obesity gene, TMEM18, is of ancient origin, found in majority of neuronal cells in all major brain regions and associated with obesity in severely obese children // *BMC Med. Gen.* 2010. V. 11. № 1. P. 58.
<https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-58>
 25. Felix J.F., Bradfield J.P., Monnereau C. et al. Genome-wide association analysis identifies three new susceptibility loci for childhood body mass index // *Hum. Mol. Gen.* 2016. V. 25. № 2. P. 389–403.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddv472>
 26. Genis-Mendoza A.D., Ruiz-Ramos D., López-Narvaez M. et al. Genetic association analysis of 5-HT2A gene variants in eating disorders in a Mexican population // *Brain Beh.* 2019. V. 9. № 7. P. e01286.
<https://doi.org/10.1002/brb3.1286>
 27. Rittenhouse P.A., Bakkum E.A., Levy A.D. et al. Central stimulation of renin secretion through serotonergic, noncardiovascular mechanisms // *Neuroendocrinology.* 1994. V. 60. № 2. P. 205–214.
<https://doi.org/10.1159/000126754>
 28. Rosmond R., Bouchard C., Björntorp P. Increased abdominal obesity in subjects with a mutation in the 5-HT2A receptor gene promoter // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 2002. V. 967. № 1. P. 571–575.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04319.x>
 29. Herbeth B., Aubry E., Fumeron F. et al. Polymorphism of the 5-HT2A receptor gene and food intakes in children and adolescents: The stanislas family study // *Am. J. Clin. Nutr.* 2005. V. 82. № 2. P. 467–470.
<https://doi.org/10.1093/ajcn.82.2.467>
 30. Ando T., Komaki G., Karibe M. et al. 5-HT2A promoter polymorphism is not associated with anorexia nervosa in Japanese patients // *Psych. Genet.* 2001. V. 11. № 3. P. 157–160.
<https://doi.org/10.1097/00041444-200109000-00008>
 31. Fuentes J.A., Lauzurica N., Hurtado A. et al. Analysis of the –1438 G/A polymorphism of the 5-HT2A serotonin receptor gene in bulimia nervosa patients with or without a history of anorexia nervosa // *Psych. Genet.* 2004. V. 14. № 2. P. 107–109.
<https://doi.org/10.1097/01.ypg.0000107933.32051.55>
 32. Gorwood P., Adès J., Bellodi L. et al. The 5-HT 2A–1438G/A polymorphism in anorexia nervosa: A combined analysis of 316 trios from six European centres // *Mol. Psych.* 2002. V. 7. № 1. P. 90–94.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000938>
 33. Kang Q., Chen J., Yu S. et al. Association of the 5-HT2A receptor gene promoter polymorphism–1438G/A with anorexia nervosa and psychopathological traits in the Chinese Han population: A preliminary study // *Asia-Pacific Psych.* 2017. V. 9. № 3. P. e12284.
<https://doi.org/10.1111/appy.12284>
 34. Ricca V., Nacmias B., Boldrini M. et al. Psychopathological traits and 5-HT2A receptor promoter polymorphism (–1438 G/A) in patients suffering from Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa // *Neur. Lett.* 2004. V. 365. № 2. P. 92–96.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.04.057>
 35. Wright J., Campos C., Herzog T. et al. Reduction of food intake by cholecystokinin requires activation of hind-brain NMDA-type glutamate receptors // *Am. J. Physiol.-Regulatory, Integrative and Comparative Phys.* 2011. V. 301. № 2. P. R448–R455.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00026.2011>
 36. Гареева А.Э., Закиров Д.Ф., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциации полиморфных вариантов гена *GRIN2B* с параноидной шизофренией и эффективностью терапии типичными нейролептиками у русских и татар из Республики Башкортостан // *Генетика.* 2013. V. 49. № 9. P. 1106–1106.
<https://doi.org/10.7868/s001667581308002x>
 37. Weickert C.S., Fung S.J., Catts V.S. et al. Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia // *Mol. Psych.* 2013. V. 11. № 18. P. 1185–1192.
<https://doi.org/10.1038/mp.2012.137>
 38. Корытина Г.Ф., Ахмадишина Л.З., Кочетова О.В. и др. Полиморфные варианты генов глутаматных (*GRIK5*, *GRIN2B*) и серотонинового (*HTR2A*) рецепторов ассоциированы с хронической обструктивной болезнью легких // *Мол. биология.* 2017. V. 51. № 4. P. 603–614.
<https://doi.org/10.7868/S0026898417040127>
 39. Tunal N.E. Huntington's Disease: Molecular Pathogenesis and Current Models. London: IntechOpen, 2017. 152 p.
 40. Kerner B., Jasinska A., De Young J. et al. Polymorphisms in the *GRI1A1* gene region in psychotic bipolar disorder // *Am. J. Med. Gen. Part B: Neuropsych. Genet.* 2009. V. 150. № 1. P. 24–32.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30780>

The Association of Neurotransmitter Gene Polymorphism and *TMEM18* Gene with Obesity its Related Traits and Eating Behavior

O. V. Kochetova^{a, *}, D. S. Avzaletdinova^b, Z. A. Shangareeva^b, L. Z. Akhmadishina^a,
G. F. Korytina^a, V. V. Victorov^b, and T. V. Victorova^b

^a*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^b*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Bashkir State Medical University”
of Healthcare Ministry of the Russian Federation, Ufa, 450008 Russia*

*e-mail: Olga_mk78@mail.ru

Obesity and the complications associated with obesity are caused by an eating disorder. The complex pathogenesis of the formation of food dependence has a genetic basis. The aim of our study was to study the relationship between polymorphic variants of genes glutamate receptors *GRIK5* rs8099939, *GRIK3* rs534131, *GRIA1* rs2195450, *GRIN2B* rs7301328, rs2268132, rs1805476, *GRIN1* rs6293, (GABA) B receptor (*GABBR2* rs3750344), serotonin receptor (*HTR2A* rs6313, rs6311), brain-derived neurotrophic factor (*BDNF* rs925946, rs11030107), transmembrane protein 18 (*TMEM18* rs2860323, rs6548238) with an eating disorder in patients who are overweight and obese. The association is shown with the *GG* genotype of the rs6293 locus of the *GRIN1* gene, *CC-AC* genotypes rs8099939 *GRIK5*, *CC-CT* rs6548238 *TMEM18*, *CT-TT* rs2195450 *GRIA1* with a BMI level. Disorders of restrictive eating behavior have been identified in carriers of *AC-AA* genotypes of the rs1805476 locus of the *GRIN2B* gene ($P = 0.04$), carriers of the *GG* genotype of the rs6293 locus of the *GRIN1* gene ($P = 0.028$). An upset of emotogenic eating behavior was determined for carriers of the *A* allele of the rs1805476 locus of the *GRIN2B* gene ($P = 0.005$) and carriers of *AC-CC* genotypes. Violation of external eating behavior was detected in carriers of genotypes *AA* and *AC* of the polymorphism *GRIN2B* rs1805476 gene ($P = 0.0003$). Polymorphisms of the glutamate, and serotonin receptor genes, as well as the transmembrane protein gene 18 are important factors in the development of eating disorders and obesity.

Keywords: obesity, eating disorder, serotonin receptors, glutamate receptors, association.

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ РЯДА ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ИХ ТКАНЕВЫХ ИНГИБИТОРОВ В РАЗВИТИИ РАКА ЖЕЛУДКА

© 2021 г. Л. Ф. Галлямова^{1, *}, А. Х. Нургалиева¹, И. И. Хидиятов², Т. Р. Насибуллин³,
Ф. Р. Мунасыпов⁴, Ш. М. Хуснутдинов⁴, Р. Р. Рахимов⁴, Р. Р. Абдеев⁴,
Д. Д. Сакаева², Э. К. Хуснутдинова^{1, 3}

¹Башкирский государственный университет, Уфа, 450076 Россия

²Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450008 Россия

³Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

⁴Республиканский клинический онкологический диспансер, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: liliyagallyamova@mail.ru

Поступила в редакцию 24.06.2020 г.

После доработки 15.10.2020 г.

Принята к публикации 27.10.2020 г.

Основная функция матриксных металлопротеиназ – деградация внеклеточного матрикса и участие в сигнальной трансдукции. Кроме этого известно, что они вовлечены во все этапы прогрессии опухолевого процесса. Активность металлопротеиназ может регулироваться взаимодействиями со специфическими ингибиторами матриксных металлопротеиназ, таким образом последние также способны участвовать в опухолевом росте. Для генов матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, как и для многих других генов, характерен полиморфизм. Проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов rs1799750 и rs494379 гена *MMP1*, rs2285053 гена *MMP2*, rs3025058 гена *MMP3*, rs3918242 и rs17576 гена *MMP9*, rs2276109 гена *MMP12*, rs8179090 гена *TIMP2* и rs9619311 гена *TIMP3* у 314 пациентов с установленным диагнозом “рак желудка”, а также у 339 неродственных здоровых индивидов, проживающих на территории Республики Башкортостан. Показано, что маркерами повышенного риска развития рака желудка для татар являются генотипы rs1799750*IG/2G гена *MMP1* и rs2276109*A/A гена *MMP12*, для русских – генотип rs9619311*T/T гена *TIMP3*. Обнаружены ассоциации аллеля rs494379*G гена *MMP1* с риском развития злокачественных опухолей желудка у мужчин. С помощью алгоритма APSampler выявлены сочетания аллелей/генотипов, ассоциированные с повышенным, а также с пониженным риском развития онкопатологий желудка. Полученные результаты подтверждают влияние исследованных полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов на риск развития рака желудка и имеют важное значение для понимания генетической структуры изучаемой патологии.

Ключевые слова: рак желудка, матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ, ассоциация, полиморфный вариант.

DOI: 10.31857/S0016675821050027

Рак желудка (РЖ) входит в число лидирующих причин смерти от онкологических заболеваний во всем мире. В Российской Федерации рак данной локализации занимает шестое место среди всех злокачественных опухолей по заболеваемости и второе – по смертности. В 2018 г. выявлен 36941 новый случай РЖ. Заболеваемость составила 25.16 на 100000 населения и заняла шестое место (5.9%) в структуре онкозаболеваний. Смертность достигла уровня 19.42 на 100000 населения (9.5%), что соответствует второму месту среди мужчин (10.4%) и третьему – среди женщин (8.4%) [1]. В Республике Башкортостан (РБ) также на-

блюдаются высокие показатели заболеваемости и смертности от РЖ. В 2017 г. в структуре смертности от злокачественных новообразований населения РБ опухоли желудка заняли второе место (10.5%, или 703 случая) (<http://02.rospotrebнадзор.ru/content/228/37374/>). Поскольку смертность от РЖ остается на очень высоком уровне, это диктует необходимость разработки новых концепций диагностики, прогноза течения и лечения болезни.

Трансформация клеток в раковые и прогрессия онкологического процесса связаны с накоплением генетических и эпигенетических измене-

Таблица 1. Характеристика выборки больных РЖ и контрольной группы

Характеристика	Больные РЖ (<i>N</i> = 314)	Контроль (<i>N</i> = 339)
Средний возраст (mean ± SE), годы	62.67 ± 0.58	58.06 ± 0.73
Этническая принадлежность, <i>n</i> (%)		
Русские	134 (42.67)	170 (50.15)
Татары	145 (46.18)	129 (38.05)
Башкиры	29 (9.24)	28 (8.26)
Другие (чуваши, евреи, украинцы, метисы)	6 (1.91)	12 (3.54)
Пол, <i>n</i> (%)		
Мужчины	180 (57.32)	201 (59.29)
Женщины	134 (42.68)	138 (40.71)
Стадия по TNM, <i>n</i> (%)		
I	17 (5.52)	—
II	56 (18.18)	—
III	207 (67.21)	—
IV	28 (9.09)	—
Степень дифференцировки опухоли, <i>n</i> (%)		
Высоко- и умереннодифференцированный РЖ	135 (45.30)	—
Низко- и недифференцированный РЖ	163 (54.70)	—
Умершие в последующие 2–3 года после оперативного вмешательства, <i>n</i> (%)	61 (19.43)	—

ний в геноме, возникающих в результате нарушения нормального его функционирования [2].

В изучении генетической предрасположенности к развитию РЖ особое внимание привлекает класс генов, кодирующих матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы. Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой семейство цинк-зависимых эндопептидаз, обладающих способностью разрушать основные компоненты экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), играют важнейшую роль в процессах его регулируемой (физиологической) деградации, т.е. в тканевом морфогенезе, репарации тканей, эмбриогенезе и ангиогенезе. Ряд патологических состояний, в их числе язвенная болезнь, опухолевая инвазия и метастазирование, развиваются с нарушением регуляции деградации ЭЦМ, а значит с участием ММП [3]. В настоящее время уже известно, что ММП вовлечены во все этапы прогрессии опухолевого процесса при РЖ и других онкопатологиях [4].

В этой связи исследование полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов при РЖ — одно из важных, клинически перспективных направлений.

Целью настоящей работы стал поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ *MMP1* (rs1799750 и rs494379), *MMP2* (rs2285053), *MMP3* (rs3025058), *MMP9* (rs3918242 и rs17576), *MMP12* (rs2276109) и генов

тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ *TIMP2* (rs8179090) и *TIMP3* (rs9619311) с риском развития рака желудка в Республике Башкортостан.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы ДНК больных РЖ и здоровых доноров в возрасте от 21 до 88 лет, проживающих в РБ. Группа больных состояла из 314 человек с клинически установленным диагнозом “рак желудка”, находящихся на лечении в ГАУЗ “Республиканский клинический онкологический диспансер”. Диагноз был поставлен на основании данных клинического и гистологического обследования. В качестве контроля исследована группа здоровых доноров без каких-либо признаков заболевания желудочно-кишечного тракта, состоящая из 339 человек. Характеристика выборки пациентов и индивидов контрольной группы представлена в табл. 1.

Все испытуемые прошли анкетирование, учитывая национальную принадлежность до трех поколений, год рождения, статус курения, тип питания, наличие у близких родственников отягощенности по онкологическим заболеваниям, а также подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании в со-

ответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации “Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта”.

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции по К.Г. Мэтью [5]. Отбор полиморфных локусов для исследования проводили на основе следующих критериев: 1) наличие ассоциации с исследуемым признаком по результатам ранее проведенных ассоциативных (в том числе репликативных) исследований; 2) наличие ассоциации с фенотипами, имеющими общие биологические пути с исследуемым признаком; 3) регуляторный потенциал; 4) влияние на экспрессию генов; 5) связь с несинонимическими заменами; 6) частота полиморфного варианта не менее 5% [6]. Амплификацию исследованных локусов ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе GeneAmp PCR System 2720 производства компании “Applied Biosystems” (США). Определение нуклеотидных замен проводили методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ). Перечень исследованных локусов, последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров, названия рестриктаз, размеры амплифицируемых фрагментов представлены в табл. 2. Результаты ПЦР и ПДРФ-анализа оценивали методом электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с применением программного обеспечения MS Office Excel. При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность (<http://www.biometrika.tomsk.ru/>). Все статистические тесты выполнялись для двустороннего уровня значимости. Поправку на множественное тестирование проводили с помощью метода оценки доли ложно-положительных результатов FDR (False Discovery Rate; Benjamini Hochberg), предусмотренного пакетом программы Plink 1.9. Статистически значимыми считали различия при $p_{\text{fdr}} < 0.05$, где p – уровень значимости критерия. При обнаружении статистически значимых различий между исследуемыми выборками проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR), а также границ его 95%-ного доверительного интервала (95% CI) [7].

Поиск сочетаний аллелей/генотипов, ассоциированных с РЖ, осуществлялся с помощью программы APSampler 3.6.1 (<http://sourceforge.net/projects/apsampler/>). Основной алгоритм этой про-

граммы описан в статье А.В. Фаворова с соавт. [8]. В качестве поправки на множественность сравнений использовали перестановочный тест (Permutation Test), статистически значимыми считали различия при $p_{\text{perm}} < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У больных РЖ и индивидов контрольной группы из Республики Башкортостан проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов девяти полиморфных локусов: rs1799750 и rs494379 гена *MMP1*, rs2285053 гена *MMP2*, rs3025058 гена *MMP3*, rs3918242 и rs17576 гена *MMP9*, rs2276109 гена *MMP12*, rs8179090 гена *TIMP2* и rs9619311 гена *TIMP3*. Наблюдаемое распределение частот генотипов по всем полиморфным локусам соответствует ожидаемым из уравнения Харди–Вайнберга. Поскольку население РБ в этническом отношении является неоднородным, исследуемая выборка была разделена на подгруппы в зависимости от этнической принадлежности. В отдельные подгруппы были выделены русские и татары. Другие национальности в данном исследовании не учитывались ввиду их немногочисленности в обеих репрезентативных выборках. Было проведено сравнение распределения частот аллелей и генотипов полиморфных ДНК-локусов с целью выявления маркеров повышенного и пониженного риска развития РЖ между выборками больных и индивидов контрольной группы соответствующей этнической и гендерной принадлежности.

Ген *MMP1* локализован на длинном плече хромосомы 11, кодирует фермент коллагеназу, способную расщеплять коллаген межклеточного матрикса [9]. Нами проведен анализ ассоциации аллелей и генотипов полиморфных локусов rs1799750 ($-1607 \text{ IG} > 2\text{G}$) и rs494379 ($-519 \text{ A} > \text{G}$), расположенных в промоторном регионе гена *MMP1*, с риском развития РЖ для жителей РБ.

В результате сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs1799750 гена *MMP1* среди больных РЖ и здоровых индивидов обнаружено, что для татар маркером повышенного риска развития РЖ является гетерозиготный генотип rs1799750*IG/2G ($\chi^2 = 7.82$; $p_{\text{fdr}} = 0.016$; OR = 2.08; 95% CI 1.27–3.41) (табл. 3).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов однонуклеотидной замены rs494379 гена *MMP1* у больных РЖ и здоровых доноров из РБ показал, что для мужчин носительство аллеля rs494379*A и генотипа rs494379*A/A связано с пониженным риском развития РЖ ($\chi^2 = 8.95$; $p_{\text{fdr}} = 0.030$; OR = 0.62; 95% CI 0.46–0.84 и $\chi^2 = 6.13$; $p_{\text{fdr}} = 0.040$; OR = 0.58; 95% CI 0.39–0.88 соответственно), а носительство мужчинами аллеля rs494379*G, напротив, повышает риск развития за-

Таблица 2. Полиморфные локусы, последовательности праймеров, номенклатура аллелей анализируемых ДНК-локусов

Ген, локализация	Полиморфный локус, dbSNP	Последовательности праймеров	Рестриктаза	Аллели, размер фрагментов
<i>MMP1</i> , 11q22.2	rs1799750 (g.3471del)	TGAGGAAATTTAGTTAAATCCTTAGAAAAG TCCSCTATGGATTCCTGTTTCTTT	<i>Bse</i> LI	2G – 118 пн, 1G – 29 + 89 пн
<i>MMP1</i> , 11q22.2	rs494379 (g.102798479 A>G)	CATGGTGCATCGCAATAGGGT TGCTACAGGTTCTCCACACAC	<i>Kpn</i> I	G – 200 пн, A – 176 + 24 пн
<i>MMP2</i> , 16q12.2	rs2285053 (g.4297 C>T)	ATAGGGTAAACCTCCCCACATTT GGTAAATGAGGCTGAGACCTG	<i>Hinf</i> I	C – 300 пн, T – 254 + 46 пн
<i>MMP3</i> , 11q22.2	rs3025058 (g.13452_13453insA)	GGTTCCTCCATTCCTTTGATGGGGGAAAGA CTTCCTGGAATTCACACTACTGCCACCCACT	<i>Pvu</i> I	6A – 129 пн, 5A – 97 + 32 пн
<i>MMP9</i> , 20q13.12	rs3918242 (g.3430 C>T)	TTCTGTACGCAAAAGCAGA AGCAGCCTCCCTCACTCCT	<i>Sph</i> I	C – 560 пн, T – 300 + 260 пн
<i>MMP9</i> , 20q13.12	rs17576 (g.7679 A>G)	AATTCACCCCTCCCGCACTCT GTTTTGGGGGCCAATACATGA	<i>Sma</i> I	A – 397 пн, G – 224 + 173 пн
<i>MMP12</i> , 11q22.2	rs2276109 (g.4974 A>G)	GAGATAGTCAAGGGATGATATCAG AAGAGCTCCAGAACGAGTGG	<i>Pvu</i> II	A – 199 пн, G – 175 + 24 пн
<i>TIMP2</i> , 17q25.3	rs8179090 (g.76921889 C>G)	CGTCTCTTTGTTGGCTGGTCA CCTTCAGCTCGACTCTGGAG	<i>Eco</i> 881	G – 230 + 51 + 23 пн, C – 253 + 51 пн
<i>TIMP3</i> , 22q12.3	rs9619311 (g.4892 T>C)	CAAGCAGAAATCAAGATGTCAAT CTGGGTTAAGCAACACAAAAGC	<i>Acl</i> I	C – 204 + 160 + 69 + 55 пн, T – 204 + 128 + 69 + 55 + 32 пн

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs1799750 гена *MMR1* в выборках больных РЖ и индивидов контрольной группы в зависимости от этнической принадлежности

Генотип, аллель		Больные (в целом)		Контроль (в целом)		Русские с РЖ		Русские, контроль		Татары с РЖ		Татары, контроль		
<i>IG/IG</i>	n_i	79	81	39	35	29	38							
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	25.16 ± 2.45 (20.45–30.34)	25.47 ± 2.44 (20.77–30.63)	29.10 ± 3.92 (21.58–37.57)	21.88 ± 3.27 (15.73–29.09)	20.00 ± 3.32 (13.82–27.44)	32.20 ± 4.30 (23.90–41.43)							
	χ^2	0.000001		1.66		4.48								
	p (p_{fdr})	0.999 (0.999)		0.198 (0.475)	0.034 (0.051)									
<i>IG/2G</i>	n_i	170	163	70	94	84	47							
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	54.14 ± 2.81 (48.45–59.75)	51.26 ± 2.80 (45.62–56.87)	52.24 ± 4.32 (43.44–60.93)	58.75 ± 3.89 (50.71–66.46)	57.93 ± 4.10 (49.46–66.07)	39.83 ± 4.51 (30.93–49.25)							
	χ^2	0.42		1.00	7.82									
	p (p_{fdr})	0.518 (0.777)		0.316 (0.475)	0.005 (0.016)									
<i>2G/2G</i>	OR (CI)					2.08 (1.27–3.41)								
	n_i	65	74	25	31	32	33							
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	20.70 ± 2.29 (16.36–25.61)	23.27 ± 2.37 (18.74–28.31)	18.66 ± 3.37 (12.45–26.30)	19.38 ± 3.12 (13.56–26.36)	22.07 ± 3.44 (15.61–29.70)	27.97 ± 4.13 (20.10–36.98)							
	χ^2	0.47		0.00005	0.92									
<i>IG</i>	p (p_{fdr})	0.494 (0.777)		0.994 (0.994)	0.338 (0.927)									
	n_i	328	325	148	164	142	123							
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	52.23 ± 1.99 (48.24–56.20)	51.10 ± 1.98 (47.14–55.05)	55.22 ± 3.04 (49.05–61.28)	51.25 ± 2.79 (45.63–56.85)	48.97 ± 2.94 (43.08–54.88)	52.12 ± 3.25 (45.54–58.64)							
	χ^2	0.12		0.77	0.40									
<i>2G</i>	p (p_{fdr})	0.730 (0.819)		0.380 (0.512)	0.528 (0.955)									
	n_i	300	311	120	156	148	113							
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	47.77 ± 1.99 (43.80–51.76)	48.90 ± 1.98 (44.95–52.86)	44.78 ± 3.04 (38.72–50.95)	48.75 ± 2.79 (43.15–54.37)	51.03 ± 2.94 (45.12–56.92)	47.88 ± 3.25 (41.36–54.46)							
	χ^2	0.12		0.77	0.40									
	p (p_{fdr})	0.730 (0.819)		0.380 (0.512)	0.528 (0.955)									

Таблица 4. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs494379 гена *MMP1* в выборках больных РЖ и индивидов контрольной группы в зависимости от гендерной принадлежности

Генотип, аллель		Мужчины с РЖ	Мужчины, контроль	Женщины с РЖ	Женщины, контроль
A/A	n_i	73	103	51	54
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	40.78 ± 3.67 (33.51–48.36)	54.21 ± 3.61 (46.85–61.44)	38.64 ± 4.24 (30.29–47.50)	41.54 ± 4.32 (32.97–50.51)
	χ^2	6.13		0.12	
	$p (p_{\text{fidr}})$	0.013 (0.040)		0.724 (0.999)	
	OR (CI)	0.58 (0.39–0.88)			
A/G	n_i	71	65	63	52
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	39.66 ± 3.66 (32.44–47.23)	34.21 ± 3.44 (27.50–41.43)	47.73 ± 4.35 (38.97–56.59)	40.00 ± 4.30 (31.51–48.95)
	χ^2	0.96		1.29	
	$p (p_{\text{fidr}})$	0.328 (0.854)		0.256 (0.555)	
G/G	n_i	35	22	18	24
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	19.55 ± 2.96 (14.01–26.13)	11.58 ± 2.32 (7.40–17.00)	13.64 ± 2.99 (8.29–20.69)	18.46 ± 3.40 (12.20–26.21)
	χ^2	3.90		0.80	
	$p (p_{\text{fidr}})$	0.048 (0.073)		0.370 (0.555)	
A	n_i	217	271	165	160
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	60.61 ± 2.58 (55.34–65.71)	71.32 ± 2.32 (66.48–75.81)	62.50 ± 2.98 (56.36–68.36)	61.54 ± 3.02 (55.33–67.48)
	χ^2	8.95		0.02	
	$p (p_{\text{fidr}})$	0.003 (0.030)		0.891 (0.892)	
	OR (CI)	0.62 (0.46–0.84)			
G	n_i	141	109	99	100
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	39.39 ± 2.58 (34.29–44.66)	28.68 ± 2.32 (24.19–33.52)	37.50 ± 2.98 (31.64–43.64)	38.46 ± 3.02 (32.52–44.67)
	χ^2	8.95		0.02	
	$p (p_{\text{fidr}})$	0.003 (0.030)		0.891 (0.892)	
	OR (CI)	1.62 (1.19–2.20)			

болевания ($\chi^2 = 8.95$; $p_{\text{fidr}} = 0.030$; OR = 1.62; 95% CI 1.19–2.20) (табл. 4).

Ген *MMP2* локализован в 16-й хромосоме, в позиции 16q12.2. *MMP2* кодирует металлопротеиназу-2, которая специфически активна в отношении коллагена IV типа, основного компонента базальных мембран [10]. Существует мнение, что продукция *MMP2* опухолевыми клетками обеспечивает их инвазивный потенциал [11, 12]. Нами проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs2285053 (–735 C>T) гена *MMP2* среди больных РЖ и здоровых доноров из РБ. Однако полученные результаты не показали статистически зна-

чимых различий между группами больных РЖ и здоровых доноров.

Ген *MMP3* так же, как ген *MMP1*, локализован на длинном плече 11-й хромосомы. Некоторыми авторами было высказано предположение о возможности использования *MMP3* в качестве маркера инвазии, метастазирования, а также в качестве фактора для прогноза развития РЖ [13]. Проведенный нами сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs3025058 (–1171 5A>6A) гена *MMP3* между пациентами с РЖ и здоровыми лицами статистически значимых различий не выявил.

Ген *MMP9* кодирует желатиназу В. *MMP9* принимает участие в процессах воспаления (так же,

как и MMP2, может обладать про- и противовоспалительной активностью), ремоделирования тканей и репарации, мобилизации матрикс-связанных факторов роста и процессинга цитокинов [10]. Также известно, что желатиназа В обеспечивает ангиогенез, в том числе и в опухолевой ткани, тем самым способствуя ее росту [12]. В рамках нашего исследования проведен ассоциативный анализ полиморфных локусов гена *MMP9* с риском развития РЖ для жителей РБ: rs3918242 (–1562 C>T), расположенный в промоторе гена, и rs17576 (836 A>G), расположенный в экзоне 6 и приводящий к замене аминокислоты в белке (Gln279Arg). Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов по полиморфным локусам rs3918242 и rs17576 гена *MMP9* среди больных РЖ и здоровых доноров из РБ, согласно их этнической и гендерной принадлежности, не выявил ассоциаций описываемых ДНК-локусов с риском развития РЖ.

Ген *MMP12*, расположенный на коротком плече 11-й хромосомы, кодирует металлоэластазу макрофагов (MMP12). MMP12 – малоизученная металлоэластаза, ее роль в опухолевой прогрессии остается до конца неясной; известно, что данная молекула наряду с другими MMP способна ингибировать ангиогенез [10, 14]. Нами проведено ассоциативное исследование полиморфного локуса rs2276109 гена *MMP12* с риском развития РЖ для жителей РБ.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs2276109 (–82 A>G) гена *MMP12* между больными РЖ и здоровыми индивидами показал этнические различия: генотип rs2276109*A/A является для татар маркером повышенного риска развития изучаемой патологии ($\chi^2 = 9.64$; $p_{\text{fidr}} = 0.003$; OR = 2.55; 95% CI 1.43–4.53), а маркером пониженного риска для этой же подгруппы испытуемых – гетерозиготный генотип rs2276109*A/G ($\chi^2 = 11.75$; $p_{\text{fidr}} = 0.002$; OR = 0.35; 95% CI 0.19–0.63) (табл. 5).

Экспериментальные данные многих авторов свидетельствуют о том, что тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (TIMP) являются многофункциональными молекулами, способными влиять на прогрессирование опухоли [15–17]. Механизм онкотрансформации при молекулярно-генетических изменениях гена *TIMP2* может быть обусловлен низкой активностью промотора при экспрессии TIMP2, что приводит к медленному ингибированию металлопротеиназ и, как следствие, к воспалительным изменениям микроокружения и канцерогенезу [18].

В настоящей работе рассмотрен полиморфный локус rs8179090 (–418 G>C), расположенный в промоторной области гена *TIMP2*. Сравнение выборки больных со здоровыми донорами согласно их этнической и гендерной принадлежности не выявило статистически значимых разли-

чий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs8179090 гена *TIMP2* среди населения нашей республики.

Ген *TIMP3* кодирует белок TIMP3 массой 24 кДа, который, в отличие от других членов семейства TIMP, находится исключительно в связи с внеклеточным матриксом [19, 20]. Есть сведения о том, что TIMP3 способен индуцировать апоптоз раковых клеток, а также подавлять рост опухоли и ангиогенез [20].

В рамках настоящей работы нами проведен анализ ассоциации полиморфного локуса rs9619311 (–1296 T>C) гена *TIMP3* с риском развития РЖ для жителей РБ. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs9619311 между больными РЖ и здоровыми донорами показал, что генотип rs9619311*T/T является для русских маркером повышенного риска развития злокачественных опухолей желудка ($\chi^2 = 8.11$; $p_{\text{fidr}} = 0.013$; OR = 2.04; 95% CI 1.27–3.27), а генотип rs9619311*C/T – маркером пониженного риска развития РЖ для представителей данной этнической подгруппы ($\chi^2 = 6.84$; $p_{\text{fidr}} = 0.013$; OR = 0.51; 95% CI 0.31–0.83) (табл. 6).

Кроме оценки влияния полиморфных вариантов отдельных генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов на риск развития РЖ, нами также рассмотрены сочетания аллелей и генотипов изученных ДНК-локусов. С помощью алгоритма APSampler выявлены сочетания, ассоциированные с повышенным, а также с пониженным риском развития РЖ. В табл. 7 отражены результаты с p_{perm} менее 0.05 и OR более 3.50 или менее 0.33 [21] (табл. 7).

В этнической выборке русских наиболее значимыми сочетаниями, ассоциированными с повышенным риском развития РЖ, оказались: rs494379*A/G гена *MMP1* + rs3025058*6A гена *MMP3* + rs9619311*T гена *TIMP3*; rs2276109*A гена *MMP12* + rs8179090*G/G гена *TIMP2*. В этнической выборке татар: rs1799750*2G гена *MMP1* + rs3025058*5A/6A гена *MMP3*; rs1799750*1G/2G гена *MMP1* + rs9619311*C гена *TIMP3* и rs1799750*2G гена *MMP1* + rs494379*G гена *MMP1* + rs3025058*5A гена *MMP3* (табл. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов на развитие и прогрессирование РЖ достаточно широко исследуется многими учеными, однако на выборке населения РБ данное исследование проведено впервые.

Известно, что полиморфный локус rs1799750, расположенный в промоторном регионе гена *MMP1*, создает сайт для связывания транскрипционного фактора Ets благодаря дополнительно-

Таблица 5. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs2276109 гена *MMP12* в выборках больных РЖ и индивидов контрольной группы в зависимости от этнической принадлежности

Генотип, аллель		Больные (в целом)	Контроль (в целом)	Русские с РЖ	Русские, контроль	Татары с РЖ	Татары, контроль
A/A	n_i	256	253	105	101	124	109
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	81.53 \pm 2.19 (76.79–85.66)	78.09 \pm 2.30 (73.18–82.47)	78.36 \pm 3.56 (70.42–85.00)	83.47 \pm 3.38 (75.63–89.60)	85.52 \pm 2.92 (78.72–90.81)	69.87 \pm 3.67 (62.02–76.95)
	χ^2	0.97		0.77		9.64	
	p (p_{fidr})	0.325 (0.547)		0.381 (0.572)		0.002 (0.003)	
	OR (CI)					2.55 (1.43–4.53)	
A/G	n_i	56	68	29	18	19	47
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	17.83 \pm 2.16 (13.76–22.53)	20.99 \pm 2.26 (16.68–25.83)	21.64 \pm 3.56 (15.00–29.58)	14.88 \pm 3.24 (9.06–22.49)	13.10 \pm 2.80 (8.08–19.70)	30.13 \pm 3.67 (23.05–37.98)
	χ^2	0.82		1.51		11.75	
	p (p_{fidr})	0.365 (0.547)		0.219 (0.572)		0.0006 (0.002)	
	OR (CI)					0.35 (0.19–0.63)	
G/G	n_i	2	3	0	2	2	0
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	0.64 \pm 0.45 (0.08–2.28)	0.93 \pm 0.53 (0.19–2.68)	0	1.65 \pm 1.16 (0.20–5.84)	1.38 \pm 0.97 (0.17–4.89)	0
	χ^2	0.001		0.16		0.14	
	p (p_{fidr})	0.972 (0.995)		0.687 (0.975)		0.705 (0.927)	
A	n_i	568	574	239	220	267	265
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	90.45 \pm 1.17 (87.87–92.63)	88.58 \pm 1.25 (85.88–90.93)	89.18 \pm 1.90 (84.83–92.63)	90.91 \pm 1.85 (86.56–94.21)	92.07 \pm 1.59 (88.34–94.91)	84.94 \pm 2.03 (80.48–88.72)
	χ^2	0.99		0.25		6.76	
	p (p_{fidr})	0.320 (0.577)		0.615 (0.644)		0.009 (0.159)	
G	n_i	60	74	29	22	23	47
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	9.55 \pm 1.17 (7.37–12.13)	11.42 \pm 1.25 (9.07–14.12)	10.82 \pm 1.90 (7.37–15.17)	9.09 \pm 1.85 (5.79–13.44)	7.93 \pm 1.59 (5.09–11.66)	15.06 \pm 2.03 (11.28–19.52)
	χ^2	0.99		0.25		6.76	
	p (p_{fidr})	0.320 (0.577)		0.615 (0.644)		0.009 (0.159)	

му гуанину. Экспериментально показано, что мутантный аллель 2G обладает повышенной способностью связываться с рекомбинантным фактором ETS-1 в комплексе с C-JUN [22]. В результате проведенного нами исследования обнаружено, что гетерозиготный генотип rs1799750*1G/2G гена *MMP1* является маркером повышенного риска развития РЖ для татар. Полученные нами данные расходятся с результатами, полученными S. Deu с коллегами [23]. В своем исследовании авторам не удалось выявить ассоциаций полиморфного локуса rs1799750 гена *MMP1* с риском развития РЖ для населения Индии. Однако ученые отмечают,

что аллель rs1799750*2G был мажорным аллелем в выборке больных и, скорее всего, является рисковым [23]. Для индийской популяции также показано, что носительство генотипов rs494379*A/G и rs494379*G/G гена *MMP1* оказывает протективный эффект в отношении метастазов в регионарные лимфатические узлы, а также в отношении отдаленного метастазирования [23]. В настоящем исследовании выявлено, что носительство аллеля rs494379*G гена *MMP1* является маркером повышенного риска развития РЖ, а носительство аллеля rs494379*A и генотипа rs494379*A/A, напротив, маркером пониженного риска развития РЖ

Таблица 6. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs9619311 гена *TIMP3* в выборках больных РЖ и индивидов контрольной группы в зависимости от этнической принадлежности

Генотип, аллель		Больные (в целом)	Контроль (в целом)	Русские с РЖ	Русские, контроль	Татары с РЖ	Татары, контроль
C/C	n_i	21	21	8	12	10	9
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	6.69 ± 1.41 (4.19–10.04)	6.69 ± 1.41 (4.19–10.04)	5.97 ± 2.05 (2.61–11.42)	7.69 ± 2.13 (4.04–13.05)	6.90 ± 2.10 (3.36–12.32)	7.56 ± 2.42 (3.52–13.87)
	χ^2	0.03		0.12		0.001	
	$p (p_{\text{fidr}})$	0.873 (0.995)		0.730 (0.975)		0.975 (1.000)	
C/T	n_i	106	129	40	71	53	40
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	33.76 ± 2.67 (28.54–39.28)	41.08 ± 2.78 (35.59–46.75)	29.85 ± 3.95 (22.26–38.36)	45.51 ± 3.99 (37.53–53.67)	36.55 ± 4.00 (28.72–44.95)	33.61 ± 4.33 (25.22–42.85)
	χ^2	3.29		6.84		0.14	
	$p (p_{\text{fidr}})$	0.070 (0.116)		0.009 (0.013)		0.713 (0.927)	
	OR (CI)			0.51 (0.31–0.83)			
T/T	n_i	187	164	86	73	82	70
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	59.55 ± 2.77 (53.90–65.03)	52.23 ± 2.82 (46.55–57.87)	64.18 ± 4.14 (55.44–72.27)	46.79 ± 3.99 (38.77–54.94)	56.55 ± 4.12 (48.08–64.75)	58.82 ± 4.51 (49.43–67.76)
	χ^2	3.13		8.11		0.06	
	$p (p_{\text{fidr}})$	0.077 (0.116)		0.004 (0.013)		0.805 (0.969)	
	OR (CI)			2.04 (1.27–3.27)			
C	n_i	148	171	56	95	73	58
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	23.57 ± 1.69 (20.30–27.09)	27.23 ± 1.78 (23.78–30.89)	20.90 ± 2.48 (16.19–26.26)	30.45 ± 2.61 (25.39–35.88)	25.17 ± 2.55 (20.28–30.58)	24.37 ± 2.78 (19.06–30.33)
	χ^2	2.03		6.35		0.01	
	$p (p_{\text{fidr}})$	0.154 (0.378)		0.012 (0.224)		0.911 (0.955)	
T	n_i	480	457	212	217	217	180
	$p_i \pm s_p$ (95% CI)	76.43 ± 1.69 (72.91–79.70)	72.77 ± 1.78 (69.11–76.22)	79.10 ± 2.48 (73.74–83.81)	69.55 ± 2.61 (64.12–74.61)	74.83 ± 2.55 (69.42–79.72)	75.63 ± 2.78 (69.67–80.94)
	χ^2	2.03		6.35		0.01	
	$p (p_{\text{fidr}})$	0.154 (0.378)		0.012 (0.224)		0.911 (0.955)	

для мужчин из РБ. Противоречия в полученных нами результатах и данных других авторов могут объясняться различиями в генетической структуре исследуемых популяций.

Нуклеотидная замена $-735 C>T$ (rs2285053) в промоторе гена *MMP2* приводит к исчезновению сайта связывания фактора Sp-1, что существенно снижает активность промотора [24]. W. Shen с коллегами [25] провели метаанализ и выяснили, что сверхэкспрессия *MMP2* оказывает неблагоприятное влияние на выживаемость пациентов и клинико-патологические особенности РЖ. Авторы пришли к выводу, что сверхэкспрессия *MMP2*

может являться прогностическим маркером при РЖ и указывать на возможное распространение метастаз [25]. В исследовании, проведенном D.Y. Zhang с коллегами [26] в Китае, показано, что распределение частот аллелей и генотипов ДНК-локуса rs2285053 гена *MMP2* в группе больных РЖ и в группе здоровых индивидов сопоставимо и статистически значимых различий между группами не наблюдается. Результаты, полученные китайскими учеными, соответствуют данным, представленным в нашем исследовании.

Мутантный аллель локуса *MMP3* $-1171 5A>6A$ (rs3025058) отличается от нормального присут-

Таблица 7. Сочетания аллелей/генотипов, ассоциированные с РЖ, полученные с помощью алгоритма APSampler

Выборка		Сочетание аллелей/генотипов	Частота, %		p_{perm}	OR	95% CI
			больные	контроль			
Русские	Женщины	<i>MMP1.2*A/G + MMP3*6A + TIMP3*T</i>	38.18	9.09	0.0443	6.18	1.31–29.16
	Мужчины	<i>MMP12*A + TIMP2*G/G</i>	100.00	91.36	0.0470	7.69	1.70–34.86
	Низко- и недифференцированный РЖ	<i>MMP3*5A + MMP9.1*C</i>	57.45	80.80	0.0071	0.32	0.15–0.67
	Высоко- и умеренно-дифференцированный РЖ	<i>MMP1.1*2G + MMP12*A + TIMP3*T</i>	56.00	79.78	0.0108	0.32	0.15–0.69
Татары	Женщины	<i>MMP1.1*2G + MMP3*5A/6A</i>	43.33	8.00	0.0047	8.79	1.90–40.71
		<i>MMP1.2*A/A + MMP12*G</i>	3.33	18.52	0.0242	0.15	0.03–0.73
	Мужчины	<i>MMP1.1*1G/2G + TIMP3*C</i>	27.38	5.36	0.0029	6.66	1.89–23.44
	Высоко- и умеренно-дифференцированный РЖ	<i>MMP1.1*2G + MMP1.2*G + MMP3*5A</i>	55.07	20.00	0.00002	4.90	2.38–10.12
		<i>MMP1.2*A + MMP12*G</i>	10.00	28.10	0.0184	0.28	0.12–0.68

Примечание. *MMP1.1* – rs1799750 гена *MMP1*; *MMP1.2* – rs494379 гена *MMP1*; *MMP3* – rs3025058 гена *MMP3*; *MMP9.1* – rs3918242 гена *MMP9*; *MMP12* – rs2276109 гена *MMP12*; *TIMP2* – rs8179090 гена *TIMP2*; *TIMP3* – rs9619311 гена *TIMP3*.

ствием дополнительного аденозина. Эксперименты с репортерными конструкциями показали снижение эффективности транскрипции для аллеля 6A. Для этого же аллеля выявлено увеличение эффективности связывания со специфическим белковым комплексом, предположительно репрессором транскрипции [27]. Оценка роли полиморфного локуса rs3025058 гена *MMP3* в развитии РЖ проводилась учеными из Индии [28]. Авторами было обнаружено, что аллель rs3025058*5A и генотип rs3025058*5A/6A – маркеры повышенного риска развития РЖ для исследуемой популяции [28]. Полученные нами данные расходятся с результатами ученых из Индии, это может объясняться значительными этническими различиями исследуемых популяций.

Для полиморфного локуса –1562 C>T (rs3918242) в гене *MMP9* показано, что увеличение транскрипционной активности, ассоциированное с редким аллелем T, вызвано предпочтительным связыванием репрессора транскрипции с аллелем дикого типа [29]. В 2017 г. Z. Peng с коллегами [30] опубликовали результаты системного метаанализа, который был призван оценить связь между SNP rs3918242 (–1562 C>T) гена *MMP9* и риском развития злокачественных новообразований желудка. В результате проведенного метаанализа авторы выяснили, что полиморфный вариант –1562 C>T, расположенный в промоторной области гена *MMP9*, увеличивает риск развития РЖ [30]. R. Okada с соавт. [31] в этом же году опубликовали работу, в которой отмечали, что носительство ге-

нотипа rs17576*G/G гена *MMP9* значительно чаще наблюдается у японцев, имеющих родственников первой и второй степени родства со злокачественными новообразованиями желудка, по сравнению с теми, у кого нет семейной истории развития РЖ. В проведенном нами ассоциативном исследовании статистически значимых результатов по полиморфным локусам rs3918242 и rs17576 гена *MMP9* для жителей нашего региона не обнаружено. Сведения из публикаций других авторов и полученные нами результаты в очередной раз подчеркивают необходимость учета этнической принадлежности индивидов в ассоциативных исследованиях.

Полиморфная замена rs2276109 (–82 A>G) гена *MMP12* оказывает влияние на связывание транскрипционного фактора AP-1 со своим респонсивным элементом в промоторе гена. Выявлено, что для аллеля A это связывание более эффективно. Для аллеля G показана ассоциация со сниженным уровнем транскрипции гена *MMP12*. По всей видимости, эта взаимосвязь обусловлена разницей в эффективности связывания AP-1 аллелем A и G [32]. Полиморфный локус rs2276109 гена *MMP12* рассматривается учеными при многих злокачественных новообразованиях, тем не менее не всегда данные исследователей согласуются между собой и позволяют однозначно утверждать об эффекте изучаемого локуса. Так, ученые из Китая [33] провели метаанализ, в котором попытались выяснить взаимосвязь между полиморфным вариантом –82 A>G гена *MMP12* и риском развития злокачественных опухолей, в

частности рассматривались девять нозологий, в том числе аденокарцинома желудка. Авторам удалось выявить ассоциацию только для эпителиальной карциномы яичника; ученые обнаружили, что аллель rs2276109*G является генетическим фактором риска развития данной патологии. Связи между SNP –82 A>G гена *MMP12* и восприимчивостью к другим опухолям авторами не обнаружено [33]. S. VAN Nguyen с коллегами [34] провели исследование, в котором оценивали связь между однонуклеотидной заменой rs2276109 гена *MMP12* и колоректальным раком у шведских пациентов. В работе показано, что генотип rs2276109*A/A гена *MMP12* связан с более высоким риском развития диссеминированного колоректального рака [34]. В нашем исследовании обнаружено, что генотип rs2276109*A/A гена *MMP12* достоверно повышает риск развития злокачественных опухолей желудка у татар, а гетерозиготный генотип rs2276109*A/G является протективным в отношении изучаемой патологии для данной этнической подгруппы.

В зарубежной литературе также имеется множество публикаций, в которых изучается роль полиморфных локусов генов тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ в канцерогенезе различной локализации. В недавнем исследовании ученые из Турции, изучая роль полиморфного локуса rs8179090 гена *TIMP2* в наследственной предрасположенности к раку мочевого пузыря, пришли к выводу, что полиморфный локус rs8179090 не связан с риском развития данной патологии [35]. Результаты ученых из Индии показали повышенный риск развития рака желчного пузыря у испытуемых, имеющих генотипы rs8179090*G/C и (C/C + G/C) по сравнению с контрольной выборкой [17]. В китайской популяции [36] носители генотипа rs8179090 (C/C + G/C) имеют на 51% более высокий риск развития РЖ по сравнению с носителями генотипа rs8179090*G/G. Повышенный риск был особенно очевиден у молодых индивидов в возрасте до 58 лет и у курильщиков [36]. В нашем исследовании значимых ассоциаций полиморфного локуса rs8179090 гена *TIMP2* с риском развития РЖ для жителей РБ не обнаружено. Возможным объяснением таких противоречивых результатов является наличие этнос-зависимых ассоциаций между аллелями генов и клиническими особенностями изучаемой патологии.

Литературные данные относительно влияния полиморфного локуса rs9619311 гена *TIMP3* на развитие онкопатологии также весьма противоречивы. Н.-Т. Tsai с соавт. [37] показали, что для тайваньских женщин носительство генотипов rs9619311*C/T или rs9619311*C/C гена *TIMP3* является протективным в отношении гепатоцеллюлярного рака по сравнению с женщинами, имеющими

генотип rs9619311*T/T. Коллективом авторов из Польши [38] опубликованы результаты исследования, в котором показано, что генетические вариации полиморфного локуса rs9619311 гена *TIMP3* не связаны с высоким риском развития рака мочевого пузыря для польской популяции. В нашем исследовании выявлено, что носительство генотипа rs9619311*T/T гена *TIMP3* достоверно повышает риск развития злокачественных новообразований желудка у русских, а гетерозиготный генотип rs9619311*C/T является маркером пониженного риска развития РЖ для данной этнической подгруппы. Полученные нами данные, а также результаты других исследований показывают, что влияние полиморфного локуса rs9619311 гена *TIMP3* на риск развития злокачественных опухолей различной локализации требует дальнейшего изучения.

Особое внимание заслуживают исследования, направленные на изучение влияния сочетаний аллелей/генотипов полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов на риск развития онкопатологии. Z. Rahimi с коллегами [39], исследуя роль полиморфных локусов rs3918242 (–1562 C>T) гена *MMP9* и rs2285053 (–735 C>T) гена *MMP2*, пришли к выводу, что сочетание аллеля rs3918242*T гена *MMP9* с аллелем rs2285053*C гена *MMP2* значительно увеличивает предрасположенность курдских женщин из Западного Ирана к раку молочной железы. Исследование, проведенное в Нидерландах [40], показало, что носительство аллеля G полиморфного локуса –181 A>G гена *MMP7* в сочетании с носительством аллеля T полиморфного локуса 303 C>T гена *TIMP2* связано с более плохим прогнозом выживаемости для больных РЖ. В проведенном нами исследовании на выборке индивидов из РБ показаны сочетания аллелей и генотипов полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов, ассоциированные с повышенным, а также с пониженным риском развития РЖ (табл. 7). Полученные нами, а также показанные другими учеными результаты часто расходятся, тем не менее выявленные сочетания аллелей и генотипов в случае подтверждения полученных результатов на независимой выборке могут служить основой для создания тест-системы по идентификации лиц с высоким риском развития онкопатологии.

Таким образом, в ходе проведенных исследований нами получены статистически значимые результаты, обладающие высокой научной новизной и практической значимостью, которые позволяют глубже понять механизмы и молекулярные основы патогенеза РЖ, а также идентифицировать важные молекулярно-генетические

маркеры риска развития заболевания для жителей нашего региона.

Исследование поддержано РФФИ (грант № 17-44-020497 р_а) и программой поддержки биоресурсных коллекций ФАНО.

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. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России, 2019. 250 с.
2. Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P.A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy // *Nature*. 2004. V. 429. № 6990. P. 457–463. <https://doi.org/10.1038/nature02625>
3. Ганусевич И.И. Роль матричных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. I. Характеристика ММП, регуляция их активности, прогностическое значение // *Онкология*. 2010. Т. 12. № 1. С. 10–16.
4. Короткова Е.А., Иванников А.А., Огнерубов Н.А. и др. Рак желудка: молекулярно-биологические особенности // *Вестник ТГУ*. 2014. Т. 19. № 3. С. 957–969.
5. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // *Methods Mol. Biol.* 1985. V. 2. P. 31–34. <https://doi.org/10.1385/0-89603-064-4:31>
6. Пономаренко И.В. Отбор полиморфных локусов для анализа ассоциаций при генетико-эпидемиологических исследованиях // *Науч. результат. Медицина и фармация*. 2018. Т. 4. № 2. С. 40–54. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-5>
7. Schlesselman J. Case-control studies: design, conduct, analysis. N.Y.; Oxford: Oxford Univ. Press, 1982. P. 58–96.
8. Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A. et al. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // *Genetics*. 2005. V. 171. № 4. P. 2113–2121. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.048090>
9. Cugino D., Gianfagna F., Ahrens W. et al. Polymorphisms of matrix metalloproteinase gene and adiposity indices in European children: results of the IDEFICS study // *Int. J. Obes.* 2013. V. 37. № 12. P. 1539–1544. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.21>
10. Ярмолинская М.И., Молотков А.С., Денисова В.М. Матричные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия // *Журн. акушерства и женских болезней*. 2012. Т. LXI. № 1. С. 113–125.
11. Zhang J., Sarkar S., Yong V.W. The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT₂-matrix metalloproteinase // *Carcinogenesis*. 2005. V. 26. № 12. P. 2069–2077. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi183>
12. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнозов Е.Л. Матричные металлопротеиназы в онкогенезе // *Сиб. онкологический журн.* 2003. № 2. С. 62–70.
13. Liu H.-Q., Song S., Wang J.-H., Zhang S.-L. Expression of MMP-3 and TIMP-3 in gastric cancer tissue and its clinical significance // *Oncol. Lett.* 2011. V. 2. № 6. P. 1319–1322. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.399>
14. Маркелова Е.В., Здор В.В., Романчук А.Л., Бирко О.Н. Матричные металлопротеиназы, их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2016. № 2. С. 11–22. <https://doi.org/10.14427/jipai.2016.2.11>
15. Benzing C., Lam H., Tsang C.M. et al. TIMP-2 secreted by monocyte-like cells is a potent suppressor of invadopodia formation in pancreatic cancer cells // *BMC Cancer*. 2019. V. 19. № 1. P. 1214–1227. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6429-z>
16. Wang K., Wang G., Huang S. et al. Association between TIMP-2 gene polymorphism and breast cancer in Han Chinese women // *BMC Cancer*. 2019. V. 19. № 1. P. 446–454. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5655-8>
17. Ondruschka C., Buhtz P., Motsch C. et al. Prognostic value of MMP-2, -9 and TIMP-1, -2 immunoreactive protein at the invasive front in advanced head and neck squamous cell carcinomas // *Pathol. Res. Pract.* 2002. V. 198. № 8. P. 509–515. [https://doi.org/10.1078/S0344-0338\(04\)70292-7](https://doi.org/10.1078/S0344-0338(04)70292-7)
18. Sharma K.L., Misra S., Kumar A., Mittal B. Higher risk of matrix metalloproteinase (MMP-2, 7, 9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) genetic variants to gallbladder cancer // *Liver Int.* 2012. V. 32. № 8. P. 1278–1286. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02822.x>
19. Рогова Л.Н., Шестернина Н.В., Замечник Т.В., Фастова И.А. Матричные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) // *Вестник новых мед. технологий*. 2011. Т. XVIII. № 2. С. 86–89.
20. Miyazaki T., Kato H., Nakajima M. et al. An immunohistochemical study of TIMP-3 expression in oesophageal squamous cell carcinoma // *Br. J. Cancer*. 2004.

- V. 91. № 8. P. 1556–1560.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602185>
21. Рубанович А.В., Хромов-Борисов Н.Н. Воспроизводимость и предсказательная ценность результатов в генетике предрасположенностей // Мол. медицина. 2014. № 2. С. 8–12.
 22. Rutter J.L., Mitchell T.I., Buttice G. et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription // *Cancer Res.* 1998. V. 58. № 23. P. 5321–5325.
 23. Dey S., Ghosh N., Saha D. et al. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphisms are well linked with lower stomach tumor formation in eastern Indian population // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 2. P. e88040.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088040>
 24. Yu C., Zhou Y., Miao X. et al. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 20. P. 7622–7628.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1521>
 25. Shen W., Xi H., Wei B., Chen L. The prognostic role of matrix metalloproteinase 2 in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2014. V. 140. № 6. P. 1003–1009.
<https://doi.org/10.1007/s00432-014-1630-6>
 26. Zhang D.Y., Wang J., Zhang G.Q. et al. Correlations of MMP-2 and TIMP-2 gene polymorphisms with the risk and prognosis of gastric cancer // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. V. 8. № 11. P. 20391–20401.
 27. Ye S., Eriksson P., Hamsten A. et al. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 22. P. 13055–13060.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.13055>
 28. Dey S., Stalin S., Gupta A. et al. Matrix metalloproteinase3 gene promoter polymorphisms and their haplotypes are associated with gastric cancer risk in eastern Indian population // *Mol. Carcinog.* 2012. V. 51. № 1. P. E42–E53.
<https://doi.org/10.1002/mc.21837>
 29. Zhang B., Ye S., Herrmann S.M. et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis // *Circulation.* 1999. V. 99. № 14. P. 1788–1794.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.99.14.1788>
 30. Peng Z., Jia J., Gong W. et al. The association of matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphisms with gastric cancer risk: a meta-analysis // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 58. P. 99024–99032.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.20931>
 31. Okada R., Naito M., Hattori Y. et al. Matrix metalloproteinase 9 gene polymorphisms are associated with a multiple family history of gastric cancer // *Gastric Cancer.* 2017. V. 20. № 2. P. 246–253.
<https://doi.org/10.1007/s10120-016-0608-2>
 32. Jormsjö S., Ye S., Moritz J. et al. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease // *Circ. Res.* 2000. V. 86. № 9. P. 998–1003.
<https://doi.org/10.1161/01.res.86.9.998>
 33. Chen S.-S., Song J., Tu X.-Y. et al. The association between MMP-12 82 A/G polymorphism and susceptibility to various malignant tumors: a meta-analysis // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. V. 8. № 7. P. 10845–10854.
 34. VAN Nguyen S., Skarstedt M., Löfgren S. et al. Gene polymorphism of matrix metalloproteinase-12 and -13 and association with colorectal cancer in Swedish patients // *Anticancer Res.* 2013. V. 33. № 8. P. 3247–3250.
 35. Pençe S., Özbek E., Ozan Tiryakioğlu N. et al. rs3918242 variant genotype frequency and increased TIMP-2 and MMP-9 expression are positively correlated with cancer invasion in urinary bladder cancer // *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 2017. V. 63. № 9. P. 46–52.
<https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.9.9>
 36. Yang L., Gu H.-J., Zhu H.-J. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 G-418C polymorphism is associated with an increased risk of gastric cancer in a Chinese population // *Eur. J. Surg. Oncol.* 2008. V. 34. № 6. P. 636–641.
<https://doi.org/10.1016/j.ejso.2007.09.003>
 37. Tsai H.-T., Hsieh M.-J., Chiou H.-L. et al. TIMP-3 –1296 T>C and TIMP-4 –55 T>C gene polymorphisms play a role in the susceptibility of hepatocellular carcinoma among women // *Tumour Biol.* 2014. V. 35. № 9. P. 8999–9007.
<https://doi.org/10.1007/s13277-014-2170-z>
 38. Wieczorek E., Reszka E., Jablonowski Z. et al. Genetic polymorphisms in matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MPs (TIMPs), and bladder cancer susceptibility // *BJU Int.* 2013. V. 112. № 8. P. 1207–1214.
<https://doi.org/10.1111/bju.12230>
 39. Rahimi Z., Yari K., Rahimi Z. Matrix metalloproteinase-9 –1562T allele and its combination with MMP-2 –735C allele are risk factors for breast cancer // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2015. V. 16. № 3. P. 1175–1179.
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.3.1175>
 40. Kubben F.J., Sier C.F., Meijer M.J. et al. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer // *Br. J. Cancer.* 2006. V. 95. № 6. P. 744–751.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603307>

The Role of Polymorphic Variants of Several Genes of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in the Development of Gastric Cancer

L. F. Gallyamova^{a, *}, A. Kh. Nurgalieva^a, I. I. Khidiyatov^b, T. R. Nasibullin^c, F. R. Munasypov^d, Sh. M. Khusnutdinov^d, R. R. Rakhimov^d, R. R. Abdeev^d, D. D. Sakaeva^b, and E. K. Khusnutdinova^{a, c}

^aBashkir State University, Ufa, 450076 Russia

^bBashkir State Medical University, Ufa, 450008 Russia

^cInstitute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^dRepublican Clinical Oncology Dispensary, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: liliyagallyamova@mail.ru

The main function of matrix metalloproteinases is the degradation of the extracellular matrix and participation in signal transduction. In addition, it is known that they are involved in all stages of the progression of the tumor process. The activity of metalloproteinases can be regulated by interactions with specific inhibitors of matrix metalloproteinases, so the latter are also able to participate in tumor growth. The genes of matrix metalloproteinases and their inhibitors, as well as many other genes, are characterized by polymorphism. We have analyzed the frequency distribution of the alleles and genotypes of the polymorphic loci rs1799750 and rs494379 of the *MMP1* gene, rs2285053 of the *MMP2* gene, rs3025058 of the *MMP3* gene, rs3918242 and rs17576 of the *MMP9* gene, rs2276109 of the *MMP12* gene, rs8179090 of the *TIMP2* gene and rs9619311 of the *TIMP3* gene in 314 patients with gastric cancer, as well as in 339 unrelated healthy individuals living in the Republic of Bashkortostan. It was shown that markers of the increased risk of developing gastric cancer for Tatars are the genotypes rs1799750*1G/2G of the *MMP1* gene and rs2276109*A/A of the *MMP12* gene, for Russians – the genotype rs9619311*T/T of the *TIMP3* gene. Were found associations of the allele rs494379*G of the *MMP1* gene with a risk of developing malignant tumors of the stomach in men. Using the APSampler algorithm were identified combinations of alleles/genotypes are associated with an increased and a reduced risk of developing gastric oncopathologies. The obtained results confirm the influence of the studied polymorphic variants of the genes of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors on the risk of developing gastric cancer and are important for understanding the genetic structure of the studied pathology.

Keywords: gastric cancer, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, association, polymorphic variant.

УДК 575.174:616-056.52

РЕПЛИКАТИВНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ С ОЖИРЕНИЕМ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

© 2021 г. Е. А. Трифонова^{1, *}, А. А. Попович¹, О. А. Макеева^{1, 2}, Л. И. Минайчева^{1, 2},
А. В. Бочарова¹, К. В. Вагайцева¹, В. А. Степанов¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национально-исследовательского центра
Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

²Центр клинических исследований Неббиоло, Томск, 634009 Россия

*e-mail: ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 11.06.2020 г.

После доработки 02.09.2020 г.

Принята к публикации 15.09.2020 г.

В работе проведен репликативный анализ ассоциаций с ожирением 53 полиморфных генетических маркеров, связанных по результатам полногеномных исследований с вариабельностью индекса массы тела и/или ожирением. Впервые в популяции русских показана ассоциация с ожирением полиморфных маркеров rs3810291 гена *ZC3H4*, rs12940622 локуса *RPTOR*, rs1800437 гена *GIPR* и rs13021737, локализованного в межгенном регионе 2-й хромосомы. Обсуждаются возможные молекулярные механизмы вовлечения изученных генов в патогенез заболевания.

Ключевые слова: полиморфные маркеры, ожирение, мультиплексное генотипирование, индекс массы тела.

DOI: 10.31857/S0016675821050131

Ожирение – хроническое заболевание, гетерогенное по этиологии и клиническим проявлениям, прогрессирующее при естественном течении и характеризующееся избыточным отложением жировой массы в организме. Ожирение и ассоциированные с ним метаболические нарушения являются актуальной проблемой современной медицины, поскольку приводят к развитию целого ряда тяжелых осложнений и заболеваний. В мире, по опубликованным в 2016 г. сведениям Всемирной организации здравоохранения, более 650 млн взрослых старше 18 лет страдали данной патологией, включая 23.5 млн лиц с ожирением в России [1].

На сегодняшний день генетическая компонента полигенной формы ожирения исследована достаточно подробно – описано более 500 генетических маркеров, ассоциированных с ожирением и/или индексом массы тела (ИМТ) в рамках полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) [2]. Однако, несмотря на огромное число работ по этой тематике, выполненных в ведущих лабораториях по всему миру, данные об ассоциации тех или иных полиморфных генетических маркеров с развитием ожирения и вариабельностью показателя ИМТ в большинстве случаев носят противоречивый характер и требуют репликации в различных популяционных когортах. В настоящей работе в популяции г. Томска был проведен ре-

пликативный анализ ассоциаций с ожирением полиморфных маркеров, связанных по результатам GWAS с вариабельностью индекса массы тела и/или ожирением.

Анализ ассоциаций генетических маркеров в дизайне случай–контроль был проведен при сравнении больных ожирением (303 неродственных индивида со средним возрастом 49.0 ± 2.7 лет с ИМТ ≥ 30 кг/м²) и контрольной группы ($N = 252$, средний возраст составил 42.2 ± 1.5 года, ИМТ менее 22.07 кг/м²). Формирование выборки индивидов с ожирением и контрольной группы проводилось на базе Центра клинических исследований Неббиоло и НИИ медицинской генетики ТНИМЦ в соответствии со следующими критериями включения и невключения.

Выборка с ожирением: ИМТ ≥ 30 кг/м²; возраст 18 лет и старше; подписание формы информированного согласия на участие в исследовании; пациенты на момент обследования не принимали оральных кортикостероидов в дозе эквивалентной 15 мг преднизолонa и более в течение более 30 дней, антипсихотических препаратов, препаратов лития; у субъекта в настоящее время или в анамнезе нет диагноза тяжелой депрессии, психоза, острого маниакального или депрессивного эпизода биполярного расстройства; небеременная (для субъектов женского пола); нет значительной по-

тери веса (4 кг и более) в результате какого-либо медицинского состояния; нет застойной сердечно-сосудистой недостаточности.

Контрольная группа: ИМТ менее 22 кг/м² на момент обследования; текущее значение ИМТ субъекта менее 40 перцентилей нормы для его пола и возраста; отсутствие в анамнезе субъекта повышения ИМТ более 50 перцентилей нормы для его возраста и пола в течение более чем двухлетнего непрерывного периода (включая временное увеличение веса, связанное с беременностью); возраст 18 лет и старше; подписание формы информированного согласия; у субъектов в анамнезе не было диагноза анорексии, булимии, компульсивного переедания или других расстройств пищевого поведения; субъект не принимал медицинских препаратов или растительных пищевых добавок для снижения веса; в анамнезе нет диагноза тяжелой депрессии, психоза или острого маниакального или депрессивного эпизода биполярного расстройства; нет значительной потери веса за последние 6 месяцев (4 кг или более) в результате медицинского состояния (беременность, гормональная терапия и т.д.). У всех субъектов были собраны анамнез жизни, медицинский анамнез, демографические показатели и семейная история; история изменения веса на протяжении жизни; проведено стандартное лабораторное обследование, включающее анализ ряда гематологических и биохимических показателей, биоимпедансометрию. Группы больных и контроля не различались по половому составу и среднему возрасту. Все участники исследования относились к европеоидной расе и проживали на территории г. Томска.

Генетические маркеры (53 однонуклеотидных полиморфных варианта (SNP)) для анализа были выбраны из каталога GWAS, где показали статистически значимые ассоциации с вариабельностью ИМТ и/или ожирением в двух и более исследованиях [3]. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из цельной венозной крови. Генотипирование проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Индекс массы тела был рассчитан по формуле: ИМТ = вес (кг)/рост (м²). Тестирование равновесия Харди–Вайнберга (РХВ) и расчет ожидаемой гетерозиготности выполняли общепринятыми методами популяционной биометрии. Сравнение частот аллелей и генотипов в группах проводили с помощью критерия максимального правдоподобия χ^2 или точного теста Фишера. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов OR и его 95%-ного доверительного интервала (95% CI).

В проанализированном массиве данных из 106 распределений генотипов (53 маркера в двух выборках) как в группе контроля, так и у больных

наблюдалось два случая отклонения от равновесия Харди–Вайнберга (для маркеров rs17381664 и rs657452). В табл. 1 приведены частоты аллелей изученных 53 SNP в выборке пациентов с ожирением и контрольной группе (данные по частотам генотипов доступны по запросу у авторов). В целом частоты аллелей у больных и в контроле близки и находятся в пределах вариаций, наблюдаемых в европеоидных популяциях по данным проектов “НарМар” и “1000 геномов”.

При сравнении исследованных выборок по частотам генотипов статистически значимая ассоциация с ожирением выявлена для четырех из 53 изученных SNP: rs1800437 гена *GIPR*, rs12940622 локуса *RPTOR*, rs3810291 гена *ZC3H4* и rs13021737, локализованного в межгенном регионе локуса 2p25.3 (табл. 2).

Так, в группе больных ожирением по сравнению с контрольной выборкой нами наблюдалось статистически значимое повышение частоты генотипа *GG* (значение критерия χ^2 составило 4.64, $p = 0.032$; OR = 1.49, CI:1.04–2.15) и аллеля *G* (значение критерия χ^2 составило 4.75, $p = 0.034$; OR = 1.31, CI:1.03–1.66) полиморфного маркера rs12940622 гена *RPTOR*, ассоциация которого с вариабельностью ИМТ была показана и в работе Mokry и коллег [4]. Результаты масштабного ассоциативного исследования “PROMIS”, проведенного в пакистанской популяции (изучены 95 SNP у 16157 индивидов), также согласуются с этими данными [5].

Известно, что ген *RPTOR* кодирует субъединицу мишени для рапамицина, обнаруженную у млекопитающих (mTOR), которая принимает участие в росте клеток в ответ на повышение уровней питательных веществ и инсулина, а также изменение окислительно-восстановительного статуса клеток. Кодируемый белок образует стехиометрический комплекс с киназой mTOR, ингибируя ее функциональную активность [6]. Учитывая центральную роль киназы mTOR в контроле клеточного метаболизма, пролиферации, роста, выживания и старения, предположительно mTOR является ключевым регулятором ряда разветвленных сигнальных сетей. Важность данных процессов для жизнедеятельности клеток подтверждается тем, что функция и компоненты сигнального пути TOR одинаковы у всех эукариот – от дрожжей до млекопитающих [7]. Наряду с этим результаты ряда эволюционно-генетических исследований, демонстрирующих значимую корреляцию между частотами аллелей и географическими или климатическими факторами, свидетельствуют о вероятной роли полиморфных маркеров гена *RPTOR* в адаптивных процессах в популяциях человека [8, 9]. Показано, что компоненты сигнального пути mTOR посредством фосфорилирования субстрата инсулинового рецептора-1 (IRS-1) серином вы-

Таблица 1. Распределение частот предковых аллелей в обследованных группах

№	Полиморфный маркер	Ген	Предковый аллель	Больные ожирением (N = 303)	Контрольная выборка (N = 252)	Значение критерия χ^2	Уровень значимости
1	rs10938397	м/р	A	0.529	0.575	2.139	0.144
2	rs1121980	<i>FTO</i>	A	0.477	0.424	2.871	0.091
3	rs11847697	м/р	C	0.975	0.972	0.016	0.899
4	rs12446632	<i>LOC105371116</i>	G	0.864	0.844	0.748	0.388
5	rs12463617	м/р	A	0.163	0.196	1.839	0.176
6	rs1421085	<i>FTO</i>	T	0.538	0.580	1.806	0.179
7	rs1558902	<i>FTO</i>	T	0.533	0.520	0.137	0.711
8	rs17381664	<i>ZZZ3</i>	T	0.597	0.631	0.268	0.606
9	rs17782313	м/р	T	0.770	0.813	2.810	0.094
10	rs1800437	<i>GIPR</i>	G	0.818	0.783	1.902	0.168
11	rs2030323	<i>BDNF</i>	A	0.187	0.202	0.300	0.585
12	rs2033529	м/р	A	0.671	0.726	3.502	0.062
13	rs2112347	<i>LOC441087</i>	G	0.392	0.442	2.612	0.107
14	rs2206277	<i>TFAP2B</i>	C	0.722	0.736	0.196	0.659
15	rs2207139	м/р	A	0.733	0.740	0.044	0.834
16	rs2531995	<i>ADCY9</i>	C	0.395	0.408	0.133	0.716
17	rs2568958	<i>LOC105378797</i>	G	0.308	0.319	0.097	0.756
18	rs3101336	<i>LOC105378797</i>	T	0.310	0.320	0.093	0.761
19	rs7141420	<i>NRXN3</i>	T	0.623	0.590	1.136	0.287
20	rs7195386	<i>RBBP6</i>	C	0.490	0.520	0.865	0.353
21	rs7498665	<i>SH2B1</i>	G	0.427	0.416	0.104	0.747
22	rs7531118	<i>LOC105378797</i>	T	0.386	0.404	0.293	0.589
23	rs7647305	м/р	T	0.181	0.176	0.018	0.893
24	rs887912	м/р	C	0.776	0.757	0.476	0.491
25	rs9540493	м/р	A	0.418	0.379	1.599	0.207
26	rs9568867	м/р	G	0.902	0.901	0.003	0.954
27	rs9941349	<i>FTO</i>	C	0.557	0.590	1.068	0.302
28	rs10182181	м/р	G	0.462	0.418	1.924	0.166
29	rs1167827	<i>HIP1</i>	G	0.521	0.498	0.472	0.492
30	rs12429545	м/р	G	0.886	0.902	0.630	0.428
31	rs12940622	<i>RPTOR</i>	A	0.395	0.460	4.753	0.034
32	rs13021737	м/р	A	0.005	0.090	—	<0.000001
33	rs13107325	<i>SLC39A8</i>	C	0.942	0.940	0.012	0.91
34	rs13191362	<i>PRKN</i>	A	0.935	0.946	0.98	0.532
35	rs1514175	<i>LRRC53,</i> <i>FPGT-TNNI3K,</i> <i>TNNI3K</i>	A	0.417	0.356	3.938	0.051
36	rs1516725	<i>ETV5</i>	C	0.906	0.902	0.011	0.915
37	rs16851483	<i>RASA2</i>	G	0.895	0.916	1.168	0.280
38	rs17094222	м/р	T	0.772	0.797	0.821	0.365
39	rs3810291	<i>ZC3H4</i>	G	0.334	0.379	2.086	0.149
40	rs3817334	<i>MTCH2</i>	C	0.547	0.572	0.602	0.438
41	rs571312	м/р	C	0.770	0.817	3.366	0.067

Таблица 1. Окончание

№	Полиморфный маркер	Ген	Предковый аллель	Больные ожирением (N = 303)	Контрольная выборка (N = 252)	Значение критерия χ^2	Уровень значимости
42	rs633715	м/р	T	0.785	0.825	2.516	0.113
43	rs6567160	м/р	T	0.770	0.811	2.508	0.114
44	rs657452	<i>AGBL4</i>	A	0.363	0.377	0.055	0.815
45	rs6804842	<i>RARB</i>	A	0.329	0.382	3.078	0.080
46	rs6864049	<i>LOC105379158</i>	G	0.498	0.532	1.113	0.292
47	rs7138803	м/р	G	0.542	0.582	1.631	0.202
48	rs7164727	м/р	C	0.337	0.351	0.162	0.688
49	rs7903146	<i>TCF7L2</i>	T	0.216	0.223	0.046	0.832
50	rs8050136	<i>FTO</i>	A	0.455	0.416	1.537	0.216
51	rs9641123	<i>CALCR</i>	G	0.596	0.566	0.913	0.340
52	rs9816226	м/р	T	0.831	0.837	0.027	0.870
53	rs987237	<i>TFAP2B</i>	A	0.723	0.741	0.379	0.539

Примечание. м/р – межгенный регион. Для локуса rs13021737 приводится уровень значимости, полученный при сравнении с помощью точного теста Фишера. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые отличия.

Таблица 2. Распределение частот генотипов полиморфных маркеров, ассоциированных с ожирением в популяции русских

Полиморфный маркер	Генотипы/предковый аллель	Больные ожирением (N = 303)	Контрольная выборка (N = 252)	Значение критерия χ^2	Уровень значимости
rs1800437	GG	0.659	0.633	6.567	0.038
	GC	0.318	0.299		
	CC	0.023	0.068		
	G	0.818	0.783	1.902	0.168
rs12940622	AA	0.147	0.191	5.239	0.073
	AG	0.497	0.538		
	GG	0.357	0.271		
	A	0.395	0.460	4.753	0.034
rs13021737	AA	0.000	0.000	–	<0.000001
	AG	0.011	0.179		
	GG	0.989	0.821		
	A	0.005	0.090	–	<0.000001
rs3810291	GG	0.130	0.117	7.114	0.029
	AG	0.410	0.522		
	AA	0.461	0.360		
	G	0.334	0.379	2.086	0.149

Примечание. Для локуса rs13021737 приводится уровень значимости, полученный при сравнении с помощью точного теста Фишера. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые отличия.

зывают инсулинорезистентность, способствующую прогрессированию ожирения [10].

В настоящей работе достоверное повышение частоты гомозиготы по производному аллелю в группе больных было зафиксировано также для локуса rs3810291 гена *ZC3H4* (значение критерия χ^2 составило 5.57, $p = 0.019$; OR = 1.52, CI:1.07–2.15), кодирующего член семейства белков, содержащих домен цинкового пальца CCCH, который связывается с нуклеиновыми кислотами. Известно, что протеины данной группы участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов [11]. Кроме того, показано, что кольцевая РНК *ZC3H4* (circ*ZC3H4*) и белок *ZC3H4* участвуют в SiO₂-индуцированной активации макрофагов, которые стимулируют пролиферацию и миграцию фибробластов посредством сигнального пути circ*ZC3H4* RNA/*ZC3H4* [12].

Другой полиморфный маркер rs13021737, продемонстрировавший высокодостоверную ассоциацию с ожирением в нашей работе (значение OR для генотипа *GG* составило 19.72, CI:6.03–64.47, для аллеля *G* – 17.88, CI:5.50–58.01, уровень значимости для точного теста Фишера $p < 0.00001$), также может быть вовлечен в молекулярные механизмы ожирения посредством процессов, связанных с регуляцией экспрессионной активности генов. Известно, что локус rs13021737 расположен в межгеномном регионе генома вблизи промоторной области гена *TMEM18*, ассоциированного с ожирением по результатам многочисленных исследований [13–16]. Известно, что ген *TMEM18* расположен приблизительно в 670 тпн от конца короткого плеча второй хромосомы (2p25) и кодирует трансмембранный белок 18, недостаточно охарактеризованный на сегодняшний день с точки зрения его функциональной активности. Предполагается, что белок *TMEM18*, физически взаимодействуя с ключевыми компонентами комплексов ядерных пор в центральной нервной системе, является наиболее вероятным медиатором, опосредующим вклад ряда генетических вариантов в развитие ожирения человека [17]. Так, показана значимая корреляция между экспрессией локуса *TMEM18* в префронтальной области коры и массой тела у крыс, свидетельствующая о потенциальной роли *TMEM18* в когнитивных особенностях, связанных с пищевым поведением [18]. Функциональные исследования, проведенные Juvansuu и Goldman [19], показали, что *TMEM18* локализуется в ядерной оболочке нервных стволовых клеток, участвует в миграции клеток и изолирует ДНК вдоль ядерной мембраны, одновременно подавляя транскрипцию. Интересными представляются результаты Wang и соавт. [20], демонстрирующие наличие общего генетического компонента в структуре наследственной предрасположенности к повышенному ИМТ и курению, реализуемого за счет эффекта плейотро-

пии 12 полиморфных маркеров (rs13021737 гена *TMEM18*, rs1528435 локуса *AC009478.1*, rs11583200 гена *ELAVL4*, rs3888190 гена *ATP2A1*, rs11165643 гена *PTBP2*, rs11030104 гена *BDNF*, rs6990042 гена *SGCZ*, rs7550711 гена *GPR61*, rs929641 локуса *LINC01122*, rs12016871 гена *MTIF3*, rs12220375 гена *NT5C2* и rs9275595, локализованный в межгеномном регионе генома) из 241 изученного.

Из четырех ассоциированных с ожирением SNP протективный эффект в отношении развития ожирения был показан нами только для полиморфного маркера rs1800437 гена *GIPR*: статистически значимое повышение частоты генотипа *CC* было обнаружено в контрольной группе по сравнению с больными (значение критерия χ^2 составило 6.55, $p = 0.011$; OR = 0.33, CI:0.13–0.80). Известно, что ген *GIPR* кодирует рецептор для глюкозозависимого инсулиноподобного пептида (ГИП), связанный с G-белком. Высказано предположение, что ГИП, представляющий собой желудочно-кишечный гормон из 42 аминокислот, выделяемый эндокринными K-клетками из двенадцатиперстной кишки в ответ на прием пищи, может быть вовлечен в сахарный диабет типа 2 и ожирение. Основным механизмом действия ГИП – стимуляция глюкозозависимой секреции инсулина, являющейся избыточной при ожирении на фоне инсулинорезистентности [21]. Показано, что медиаторы, которые могут выступать в качестве антагонистов ГИП (например, *GIP(3–30)NH₂*), снижают ожирение и резистентность к инсулину, а пациенты с ожирением, подвергшиеся бариатрической хирургии (включает в себя обход части тонкой кишки и следовательно снижение секреции ГИП), продемонстрировали восстановление нормальной толерантности к глюкозе до потери веса [22].

Известно, что ГИП реализует свою функцию через взаимодействие со специфическим рецептором – *GIPR*. Инактивация *GIPR* приводит к нарушению передачи сигналов от *GIP*. Так, при нормальной диете у мышей, нокаутированных по локусу *GIPR* (*Gipr*–/–), не наблюдается изменений в массе тела, но они имеют меньшую жировую массу по сравнению с мышами дикого типа (WT) и нормальные уровни глюкозы и инсулина. В условиях диеты с высоким содержанием жиров мыши *Gipr*–/– имеют сниженный жировой запас и у них не развиваются ожирение, инсулинорезистентность, сахарный диабет, нарушение толерантности к глюкозе и жировой гепатоз, по сравнению с мышами WT [21].

Известно, что носители функционального варианта Glu354 (rs1800437) гена *GIPR* имеют более высокий уровень глюкозы в плазме крови через 2 ч после приема углеводов, что позволяет предположить, что вариант 354Gln снижает эффект ГИП и таким образом может способствовать уменьшению риска ожирения [23]. В контексте обсуждения

плейотропного действия генов при ожирении интересными представляются данные, демонстрирующие ассоциацию полиморфизма rs1800437 гена *GIPR* с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) [24], сахарным диабетом второго типа [25], а также риском переломов и минеральной плотностью костной ткани [23].

Таким образом, впервые в популяции русских нами показана ассоциация с ожирением полиморфных маркеров rs3810291 гена *ZC3H4*, rs12940622 локуса *RPTOR*, rs1800437 гена *GIPR* и rs13021737, локализованного в межгенном регионе локуса 2p25.3. Возможные патогенетические механизмы реализации фенотипического эффекта данных SNP на развитие ожирения предположительно связаны с регуляцией транскрипционной активности генов и процессами, вовлеченными в формирование инсулинорезистентности. Однако данное предположение требует дальнейших исследований с привлечением методов функциональной геномики, транскриптомики и метабомики. Кроме того, перспективным в рамках изучения генетической архитектуры ожирения представляется анализ ген-генных и ген-средовых взаимодействий.

Исследование выполнено за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-04-00758).

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

- Commission on Ending Childhood Obesity. Report of the commission on ending childhood obesity. World Health Organization, 2016. 68 p.
- GWAS catalog [Electronic resource]. URL: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>. Accessed 05.2020.
- Трифонов 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. <https://doi.org/10.1134/S001667581910014X>
- Mokry L.E., Ross S., Timpson N.J. et al. Obesity and multiple sclerosis: A mendelian randomization study // PLoS Med. 2016. V. 13. № 6. P. e1002053. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002053>
- Ahmad S., Zhao W., Renström F. et al. Physical activity, smoking, and genetic predisposition to obesity in people from Pakistan: the PROMIS study // BMC Med. Genet. 2015. № 16. P. 114. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0259-x>
- Nakayama K., Miyashita H., Iwamoto S. Seasonal effects of the UCP3 and the RPTOR gene polymorphisms on obesity traits in Japanese adults // J. Physiol. Anthropol. 2014. V. 33. № 1. P. 38. <https://doi.org/10.1186/1880-6805-33-38>
- González A., Hall M.N. Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals // EMBO J. 2017. V. 36. № 4. P. 397–408. <https://doi.org/10.15252/embj.201696010>
- Hancock A.M., Witonsky D.B., Gordon A.S. et al. Adaptations to climate in candidate genes for common metabolic disorders // PLoS Genet. 2008. V. 4. № 2. P. e32. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040032>
- Sun C., Southard C., Witonsky D.B. et al. Allele-specific down-regulation of RPTOR expression induced by retinoids contributes to climate adaptations // PLoS Genet. 2010. V. 6. № 10. P. e1001178. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001178>
- Rachdi L., Balcazar N., Osorio-Duque F. et al. Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner // PNAS USA. 2008. V. 105. № 27. P. 9250–9255. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803047105>
- “GeneCards” [Electronic resource]. URL: <https://www.genecards.org>. Accessed 05.2020.
- Yang X., Wang J., Zhou Z. et al. Silica-induced initiation of circular ZC3H4 RNA/ZC3H4 pathway promotes the pulmonary macrophage activation // FASEB J. 2018. V. 32. № 6. P. 3264–3277. <https://doi.org/10.1096/fj.201701118R>
- Rana S., Sultana A. Association of the variant rs7561317 downstream of the TMEM18 gene with overweight/obesity and related anthropometric traits in a sample of Pakistani population // Biochem. Genet. 2020. V. 58. № 2. P. 257–278. <https://doi.org/10.1007/s10528-019-09940-2>
- Liu S., Wilson J.G., Jiang F. et al. Multi-variant study of obesity risk genes in African Americans: The Jackson Heart Study // Gene. 2016. V. 593. № 2. P. 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.041>
- Felix J.F., Bradfield J.P., Monnereau C. et al. Genome-wide association analysis identifies three new susceptibility loci for childhood body mass index // Hum. Mol. Genet. 2016. V. 25. № 2. P. 389–403. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv472>
- Ruiz-Narváez E.A., Haddad S.A., Rosenberg L. et al. Birth weight modifies the association between central nervous system gene variation and adult body mass index // J. Hum. Genet. 2016. V. 61. № 3. P. 193–198. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.139>
- Larder R., Sim M.F.M., Gulati P. et al. Obesity-associated gene TMEM18 has a role in the central control of appetite and body weight regulation // PNAS USA. 2017. V. 114. № 35. P. 9421–9426. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707310114>
- Rask-Andersen M., SällmanAlmén M., Jacobsson J.A. et al. Determination of obesity associated gene variants

- related to TMEM18 through ultra-deep targeted re-sequencing in a case-control cohort for pediatric obesity // *Genet. Res. (Camb)*. 2015. № 97. P. e16.
<https://doi.org/10.1017/S0016672315000117>
19. *Jurvansuu J.M., Goldman A.* Obesity risk gene TMEM18 encodes a sequence-specific DNA-binding protein // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 9. P. e25317.
 20. *Wang T., Moon J.Y., Wu Y. et al.* Pleiotropy of genetic variants on obesity and smoking phenotypes: Results from the Oncoarray Project of The International Lung Cancer Consortium // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 9. P. e0185660.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185660>
 21. *Vogel C.I., Scherag A., Brönner G. et al.* Gastric inhibitory polypeptide receptor: Association analyses for obesity of several polymorphisms in large study groups // *BMC Med. Genet*. 2009. № 10. P. 19.
<https://doi.org/10.1186/1471-2350-10-19>
 22. *Gasbjerg L.S., Gabe M.B.N., Hartmann B. et al.* Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor antagonists as anti-diabetic agents // *Peptides*. 2018. № 100. P. 173–181.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.11.021>
 23. *Torekov S.S., Harsløf T., Rejnmark L. et al.* A functional amino acid substitution in the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (GIPR) gene is associated with lower bone mineral density and increased fracture risk // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2014. V. 99. № 4. P. E729–E733.
<https://doi.org/10.1210/jc.2013-3766>
 24. *Nitz I., Fisher E., Weikert C. et al.* Association analyses of GIP and GIPR polymorphisms with traits of the metabolic syndrome // *Mol. Nutr. Food Res*. 2007. V. 51. № 8. P. 1046–1052.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200700048>
 25. *Shalaby S.M., Zidan H.E., Shokry A. et al.* Association of incretin receptors genetic polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in Egyptian patients // *J. Gene Med*. 2017. № 19. P. 9–10.
<https://doi.org/10.1002/jgm.2973>

Replicative Association Analysis of Genetic Markers of Obesity in the Russian Population

**E. A. Trifonova^{a,*}, A. A. Popovich^a, O. A. Makeeva^{a,b}, L. I. Minaycheva^{a,b},
 A. V. Bocharova^a, K. V. Vagaitseva^a, and V. A. Stepanov^a**

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

^b*Nebbiolo Center for Clinical Trials, Tomsk, 634009 Russia*

^{*}*e-mail: ekaterina.trifonova@medgenetics.ru*

A replicative analysis of associations with obesity of 53 polymorphic markers associated with the results of genome-wide studies with variability of the body mass index and/or obesity was performed. For the first time in the Russian population, an association with obesity of polymorphic markers rs3810291 of the *ZC3H4* gene, rs12940622 of the *RPTOR* locus, rs1800437 of the *GIPR* gene and rs13021737 located in the intergenic region of the genome is shown. Possible molecular mechanisms for the involvement of the studied genes in the pathogenesis of the disease are discussed.

Keywords: single nucleotide polymorphisms, obesity, multiplex genotyping, body mass index.