СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 10, 2021

Обзорные и теоретические статьи

Частная история нейрогенетики: ген *swiss cheese* и его ортологи

П. А. Мелентьев, Е. В. Рябова, С. В. Саранцева 1103

Гемофилия В Лейден: литературные и собственные данные

Т. С. Бескоровайная, В. В. Забненкова, Р. А. Зинченко, О. А. Щагина, А. В. Поляков 1121

Общая генетика

Активность генов и некодирующих РНК как подход к определению ранних биомаркеров радиоиндуцированного опухолеобразования у мышей

В. Ф. Михайлов, Д. В. Салеева, Л. М. Рождественский, Л. В. Шуленина, Н. Ф. Раева, Г. Д. Засухина 1131

Влияние добавок карнитина, ресвератрола и ароматических аминокислот к рациону с избытком жира и фруктозы на экспрессию генов в печени крыс: полнотранскриптомное исследование

Н. В. Трусов, С. А. Апрятин, В. А. Шипелин, А. А. Шумакова, И. В. Гмошинский, Д. Б. Никитюк, В. А. Тутельян 1141

Генетика животных

Инвазивные популяции цикадок *Metcalfa pruinosa* (Hemiptera: Flatidae) и *Arboridia kakogawana* (Hemiptera: Cicadellidae) не инфицированы внутриклеточными симбиотическими бактериями

Б. В. Андрианов, Д. А. Романов, Е. А. Матвейкина 1158

Гаплотипическое разнообразие монгольских и тувинских пород коз (*Capra hircus*) на основе полиморфизма мтДНК и Y-хромосомы

В. Н. Воронкова, А. К. Пискунов, Э. А. Николаева, М. Т. Семина, Е. А. Коноров, Ю. А. Столповский 1164

Идентификация популяций соболя (*Martes zibellina* L.) южной части ареала вида

С. Н. Каштанов, М. В. Шитова, М. М. Сомова, П. А. Филимонов, О. Ю. Тютеньков, А. А. Ходырева, Г. Р. Свищева, И. Г. Мещерский, Ю. А. Столповский, В. В. Рожнов 1174

Генетика человека

Гендерные особенности ассоциаций полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с развитием язвенной болезни у населения Центрального Черноземья России

О. Н. Миняйло, И. В. Пономаренко, М. И. Чурносов 1185

Математические модели и методы

К анализу случайных процессов изонимии. I. Структура изонимии

В. П. Пасеков 1194

Краткие сообщения

Генетическая изменчивость древовидных можжевельников секции Sabina: данные из Дагестана, Армении и Крыма

Г. А. Садыкова, Е. В. Хантемирова, М. А. Полежаева, Х. У. Алиев 1205

Роль сайтов связывания белка CLAMP в поддержании дистанционных взаимодействий в трансгенных линиях дрозофилы

Е. А. Тихонова, В. А. Могила, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко 1211

Ассоциация VNTR-полиморфизма генов антагониста рецептора интерлейкина 1 (*IL1RN*) и интерлейкина 4 (*IL4*) с кариесом зубов у детей

И. Г. Удина, Ю. А. Васильев, В. В. Волобуев, А. С. Грачева, О. В. Гуленко 1215

Contents

Vol. 57, No. 10, 2021

Reviews and Theoretical Articles

A Private History of Neurogenetics: The *swiss cheese* Gene and Its Orthologs

P. A. Melentev, E. V. Ryabova, and S. V. Sarantseva 1103

Haemophilia B Leyden: Literature and Own Data

T. S. Beskorovainaya, V. V. Zabnenkova, R. A. Zinchenko, O. A. Shchagina, and A. V. Polyakov 1121

General Genetics

Activity of Genes and Non-Coding RNA as an Approach to Early Biomarkers Determination of Radiation-Induced Cancer in Mice

V. F. Mikhailov, D. V. Saleeva, L. M. Rozhdestvensky, L. V. Shulenina, N. F. Raeva, and G. D. Zasukhina 1131

Effect of Carnitine, Resveratrol and Aromatic Amino Acids Supplements in the Diet with Excess Fat and Fructose on Gene Expression in Liver of Rats: Full Transcriptome Analysis

N. V. Trusov, S. A. Apryatin, V. A. Shipelin, A. A. Shumakova, I. V. Gmoshinski, D. B. Nikityuk, and V. A. Tutelyan 1141

Animal Genetics

Invasive Populations of Cicadas Species *Metcalfa pruinosa* (Hemiptera: Flatidae) and *Arboridia kakogawana* (Hemiptera: Cicadellidae) are Not Infected with Intracellular Symbiotic Bacteria

B. V. Andrianov, D. A. Romanov, and E. A. Matveykina 1158

Haplotype Diversity of Mongolian and Tuvan Goatbreeds (*Capra hircus*) Based on mtDNA and Y-Chromosome Polymorphism

V. N. Voronkova, A. K. Piskunov, E. A. Nikolaeva, M. T. Semina, E. A. Konorov, and Yu. A. Stolpovsky 1164

Identification of the Sable (*Martes zibellina* L.) Populations in the Southern Part of the Species' Range

S. N. Kashtanov, M. V. Shitova, M. M. Somova, P. A. Filimonov, O. Yu. Tyutenkov, A. A. Khodireva, G. R. Svishcheva, I. G. Meshchersky, Yu. A. Stolpovsky, and V. V. Rozhnov 1174

Human Genetics

Gender-Specific Features of Associations of Polymorphism of Matrix Metalloproteinase Genes with the Development of Peptic Ulcer Disease in the Population of the Central Chernozem Region of Russia

O. N. Minyaylo, I. V. Ponomarenko, and M. I. Churnosov 1185

Mathematical Models and Methods

To Analysis of Random Processes of Isonymy. I. Isonymic Structure

V. P. Passekov 1194

Short Communications

Genetic Variability of Tree Junipers of Section Sabina:
Data from Dagestan, Armenia and Crimea
G. A. Sadykova, E. V. Hantemirova, M. A. Polezhaeva, and Kh. U. Aliev 1205

The Role of CLAMP Binding Sites in Maintaining of Distant Interactions
in *Drosophila* Transgenic Lines
E. A. Tikhonova, V. A. Mogila, P. G. Georgiev, and O. G. Maksimenko 1211

Association of VNTR Polymorphims of the Genes Antagonist of Receptor
of Interleikine 1 (*IL1RN*) and Interleikine 4 (*IL4*)
with Dental Caries in Children
I. G. Udina, Yu. A. Vasiliev, V. V. Volobuyev, A. S. Gracheva, and O. V. Gulenko 1215

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1103–1120

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.162

ЧАСТНАЯ ИСТОРИЯ НЕЙРОГЕНЕТИКИ: ГЕН *swiss cheese* И ЕГО ОРТОЛОГИ

© 2021 г. П. А. Мелентьев[1], Е. В. Рябова[1], С. В. Саранцева[1, *]

[1]*Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Ленинградская область, Гатчина, 188300 Россия*

**e-mail: Sarantseva_SV@pnpi.nrcki.ru*

Поступила в редакцию 28.10.2020 г.
После доработки 11.01.2021 г.
Принята к публикации 04.02.2021 г.

Один из вопросов генетики посвящен роли наследственности в определении поведенческих признаков человека и животных. Как считалось долгие годы, поведение определяется как действием среды, так и плейотропным действием множества генов, и потому дискретные наследственные факторы поведения являются неуловимыми. Целенаправленное получение и исследование мутантов дрозофилы с измененным поведением, начатые более полувека назад Сеймуром Бензером, заложили основу направления, названного нейрогенетикой. Дальнейшее установление связи мутаций с различными фенотипами позволило выявить роль генов в детерминации функций нервной системы и в соответствующей регуляции поведения. Один из таких генов был открыт благодаря новаторским подходам Сеймура Бензера и его последователей, в частности Мартина Хайзенберга, в ходе исследований мутантов дрозофилы – ген *swiss cheese*, контролирующий жизнеспособность нервных и глиальных клеток. Многочисленные исследования этого эволюционно-консервативного гена и его ортологов, вызванные интересом к анализу генетического контроля жизнедеятельности клеток нервной ткани, расшифровке биологических механизмов действия фосфорорганических ядов и изучению некоторых наследственных синдромов человека, позволили выявить аспекты роли гена *swiss cheese* и его ортологов в метаболизме клеток, функционировании нервной системы, регуляции поведения.

Ключевые слова: нейрогенетика, *swiss cheese*, *NTE*, *PNPLA6*, Сеймур Бензер, нейродегенерация.

DOI: 10.31857/S0016675821090071

ВВЕДЕНИЕ: К 100-ЛЕТИЮ СЕЙМУРА БЕНЗЕРА (1921–2007)

История науки знает множество примеров блестящих личностей, определивших развитие той или иной дисциплины, которые благодаря своей особой проницательности и трудоспособности открыли закономерности, кажущиеся теперь совершенно обыденными явлениями. Среди таких личностей в истории биологии XX в. встречаются физики, мышление которых находило удачные редукционистские подходы, представляющие сложные биологические процессы в виде простых "атомарных" моделей. Одним из таких ученых является "основатель нейрогенетики" Сеймур Бензер, 100-летие со дня рождения которого приходится на 2021-й год. Во время Второй мировой войны он работал над разработкой германиевых полупроводников в университете Пёрдью. Затем стал интересоваться молекулярной биологией: стажировался в Cold Spring Harbor, в Калифорнийском техническом институте, в институте Пастера. Вернувшись в Пёрдью, выполнил работу по изучению "тонкой структуры" локуса *rII* у бактериофага T4: картировал тысячи мутаций, рассчитывал рекомбинационные расстояния и вычислял реальное расстояние в нуклеотидах. Так он доказал, что фенотипически проявляющиеся мутации соответствуют изменениям нескольких нуклеотидов. Тем самым, сопоставив функциональный и рекомбинационный тесты на аллелизм, он первый показал связь между классической формальной генетикой и моделью ДНК по Уотсону и Крику [1–5]. Далее Бензер решил заняться еще одной нерешенной проблемой генетики, а именно проблемой генетической детерминации форм поведения. К середине XX в. уже было проведено достаточно много исследований по изучению наследуемости различных поведенческих признаков, например таланта и характера у человека, специфического поведения у "вальсирующих" мышей, различных форм поведения у крыс. Такие исследования, как правило, заканчивались выводом, содержание которого можно передать следующим тезисом: "Поведенческие признаки определяются множе-

ством (генетических) факторов” [6]. Такой результат не удовлетворял Бензера, поэтому он хотел найти элементарные факторы, определяющие признаки поведения, и выбрал в качестве объекта изучения плодовую мушку *Drosophila melanogaster*. Благодаря работам лабораторий Вильяма Касла и Томаса Ханта Моргана в первые два десятилетия XX в. было изучено несколько форм поведения дрозофилы: фото-, анемо- и геотаксис, реакция на обонятельные стимулы, половое поведение. Эксперименты второй четверти XX в. по изучению наследования признаков при постановке разнообразных скрещиваний дрозофил и селекции того или иного поведенческого признака в ряду поколений приводили все к тому же выводу о генетической многофакторности, определяющей поведение. Например, Джерри Хирш утверждал, что поведенческие признаки определяются как наследственными факторами, так и действием окружающей среды. А существующие в инбредных линиях дрозофилы индивидуальные отличия детерминированы, тем не менее, генетической гетерогенностью популяции [7]. Хотя некоторые исследователи допускали, что поведение может определяться даже одним геном, но не имели достаточных доказательств, чтобы подтвердить свою гипотезу [8]. Эти и другие работы проводили, используя уже известных мутантов *white*, *brown*, *eyeless*, *Bar*, *yellow*, *ebony*, *cut*, *vestigial*, *tan*, и обнаруживали различные особенности поведения мутантных мух, объясняя это плейотропным действием изучаемых генов [6]. Такие работы ничего не говорили о роли нервной системы в регуляции поведения. И потому идея Бензера заключалась в возможности “микрохирургического препарирования нервной системы с помощью изучения мутантов”, которую он воплотил впервые в 1967 г. в Калифорнийском техническом институте: “Complex as it is, much of the vast network of cellular functions has been successfully dissected, on a microscopic scale, by the use of mutants in which one element is altered at a time” [9]. Тогда в практику вошел метод химически индуцированного мутагенеза: самцов дрозофилы пересаживали на среду, содержащую смесь сахарозы и этилметансульфоната, и инкубировали в течение 24 ч при температуре 25°C [10, 11]. Затем каждого самца отсаживали отдельно к виргинным самкам со сцепленными X-хромосомами (генотип XXY), получая в первом поколении самцов, унаследовавших свою мутантную X-хромосому от отца, а нормальную Y-хромосому – от матери. Таким образом выводили линии, в которых самцы несли мутации в X-хромосоме [9]. И проводили скрининг этих мутантов на наличие каких-либо поведенческих, электрофизиологических или морфологических девиаций, для чего разрабатывали соответствующие специальные методы анализа, в частности метод “противоточного разделения”, принцип которого Бензер позаимствовал из хроматографии. Для этого он использовал сдвоенные стаканчики, куда помещал мух и скидывал их на дно, и в течение минуты позволял мухам подниматься вверх, к источнику света. Затем нижний стаканчик закрывал и брал новый; повторял такую процедуру 15 раз. Наконец, строил график зависимости числа оставшихся мух в нижнем стаканчике от порядкового номера стаканчика [9]. Метод противоточного разделения может быть использован для разделения популяции мух на группы в зависимости от ответа особей на различные стимулы, такие как: земное притяжение, запах, звук, видимые образы. С помощью принципиально нового подхода в лаборатории Бензера или при его участии были получены и охарактеризованы различные мутанты с измененными характеристиками: *period* (циркадные ритмы), *dunce* (обучаемость), *fruitless* (половое поведение), *sluggish-A* (двигательная активность), *sevenless* (дифференцировка фоторецепторных клеток), *methuselah* (продолжительность жизни), *comatose* и *no action potential* (температурно-чувствительный паралич), *drop-dead*, *spongecake*, *eggroll* (морфология мозга и продолжительность жизни).

Бензер оставил после себя десятки воодушевленных учеников, коллег и последователей; продолжал браться за новые задачи, описывал функции разных генов дрозофилы, в последние годы интересовался моделированием нейродегенеративных заболеваний человека у дрозофилы. Его блестящие и элегантные экспериментальные подходы вскрыли “тонкую” структуру гена. Он обосновал роль генов в контроле поведения, показал возможность разложения сложных поведенческих признаков на элементарные, способствовал открытию множества генов дрозофилы, показал их роль в нервной системе и предложил способ выявления участка нервной системы, ответственного за тот или иной фенотип с помощью генетически маркированных мозаиков. Потому Сеймура Бензера называют одним из основоположников современной нейрогенетики. Однако заметим, что параллельно с нейрогенетическими работами Бензера, в России были заложены основы нейроэпигенетики М.Е. Лобашёвым. Им был предложен принципиально иной, эволюционно-физиологический, подход к наследованию поведенческих признаков и их изменчивости [12–14].

Значимый вклад в развитие нейрогенетических исследований внес последователь Бензера из университета Вюрцбурга – Мартин Хайзенберг, желавший сопоставить поведенческие фенотипы с особенностями строения нервной системы. Традиционные подходы к решению такой задачи основывались на хирургическом препарировании нервной системы, что влекло за собой два недостатка. Во-первых, гетерогенность материала, обусловленная невозможностью нанести идентичные повреждения разным особям. Во-

вторых, малое количество материала, обусловленное трудоемкостью процедуры. Пытаясь решить указанную проблему, Бензер получал наборы различных мозаиков-гинандроморфов, где мутантная (мужская гемизиготная) часть организма маркировалась внешне отличимыми фенотипическими признаками (*yellow*, *forked*, *white*). Тем самым он сделал первый шаг к определению звена нервной системы, подверженного действию мутации: определял части организма, мутация в которых ведет к характерному поведенческому фенотипу. При этом Бензер замечал, что внутренние ткани могут иметь генотип, отличный от генотипа внешних тканей, что сильно ограничивает выводы, полученные при анализе мозаиков [15]. Хайзенберг выбрал другой путь решения упомянутой проблемы, что привело к разработке нового метода, который помог вести отбор мутантов еще по одному признаку – морфологии головного мозга насекомых. Созданный Хайзенбергом и его коллегами метод массового гистологического скрининга позволил достаточно быстро выявлять новых мутантов дрозофилы, у которых нарушалась морфология структур мозга или его частей [16]. Например, среди обнаруженных в таком исследовании мутантов был вариант, названный *Vacuolar medulla*, который характеризовался дегенерацией нескольких нейронов в медулле и втором зрительном ганглии, униполярных нейронов L1 и L2 ламины. Поведение мутантных особей оказалось нарушено: они были не способны различать движущиеся объекты, реализовывать реакцию посадки. Электроретинограмма выявила отсутствие возбуждающих и тормозных реакций в ламине, однако фоторецепторный потенциал не отличался от нормального. А это уже означало присутствие нарушений на уровне обработки зрительной информации, но не ее сенсорного восприятия [17]. Так Хайзенберг подошел к решению сложной проблемы расшифровки центрального звена в анализе сенсорной информации. Другие полученные Хайзенбергом мутанты характеризовались изменениями грибовидного тела: *vacuolar pedunculi*, *beta lobes fused*, *mushroom body defect*, *mushroom bodies deranged*. Рассматривая гипотезы о причинах возникновения того или иного фенотипа у указанных мутантов, Хайзенберг приблизился к выявлению механизмов генетического контроля процессов развития нервной системы, поддержания ее жизнеспособности и функционирования [18]. Таким образом, нейрогенетические исследования вышли на новый уровень. Схема эксперимента оставалась классической: индукция генетических нарушений, селекция мутанта по фенотипу, картирование гена, исследование его молекулярных и клеточных функций. Но это оставалось бы генетикой поведения, если бы свойства “гена поведения” рассматривали вне контекста его роли в нервной системе. Метод Хайзенберга разрешил ограничение метода Бензера – гистологический анализ наглядно показывал изменения структур нервной системы. Благодаря работам Бензера, Хайзенберга и их коллег было открыто множество генов, играющих роль в нервной системе.

Один из них – *swiss cheese* (*sws*, от англ. swiss cheese – швейцарский сыр), названный по фенотипу мутанта, полученного в 1979 г. в ходе гистологического скрининга [16, 19]. На срезах мозга мутантных особей было обнаружено множество полостей; нейродегенерация прогрессировала с возрастом. Нейроны мозга погибали путем апоптоза, также наблюдалась гибель глиальных клеток. Заметнее всего последствия нейродегенерации были видны в ламине. Мозг молодых мутантных мух не отличался от нормального, однако на пятый–шестой день их жизни обнаруживались первые полости. Кроме того, было показано, что глиальные клетки, оборачивающие тела и отростки нейронов, образуют аберрантные мембранные структуры и множественные слои, покрывающие нейроны [19]. При этом оказалось, что *sws* является аллельным вариантом гена *olfE*, обнаруженного в 1990 г. в скрининге индуцированных этилметансульфонатом мутантов. Мухи с мутацией *olfE* характеризовались нарушенным поведением в ответ на запах бензальдегида [20]. Вскоре ген *olfE* был клонирован [21], а уже в 1997 г. в комплементационном тесте доказан аллелизм *sws* и *olfE* [19].

Таким образом, был открыт ген, ответственный за поддержание жизнеспособности нейронов и глии, контролирующий обонятельную функцию. А значит, открылись новые возможности для исследования особенностей жизнедеятельности нервной ткани, в том числе и связанных с регуляцией поведения. Исследованиям свойств гена *swiss cheese* и его ортологов посвящено множество работ. В настоящем обзоре мы попытались обобщить имеющуюся на сегодняшний день информацию об этом гене и его ортологах, их роли в нервной системе.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА *sws* И ЕГО ОРТОЛОГОВ

Ген *sws D. melanogaster* картирован на X-хромосоме в положении 7D1. Его длина составляет 11417 п.н. Ген кодирует три транскрипта, два из которых образуются вследствие альтернативного сплайсинга: содержат либо 8-й, либо 9-й экзон. Длина обоих транскриптов, названных *sws-RA* и *sws-RC*, составляет 5571 нуклеотид (размер соответствующих белков – 1425 аминокислот). Третий транскрипт *sws-RB* образуется вследствие наличия альтернативной точки старта транскрипции, не содержит 1–8-й экзоны, имеет длину 1928 нуклеотидов, кодирует белок длиной в 341 аминокислоту (рис. 1,*а*, *б*). Показано, что ген *sws* является консервативным, его ортологи найдены у различных видов от бактерий до человека. Сход-

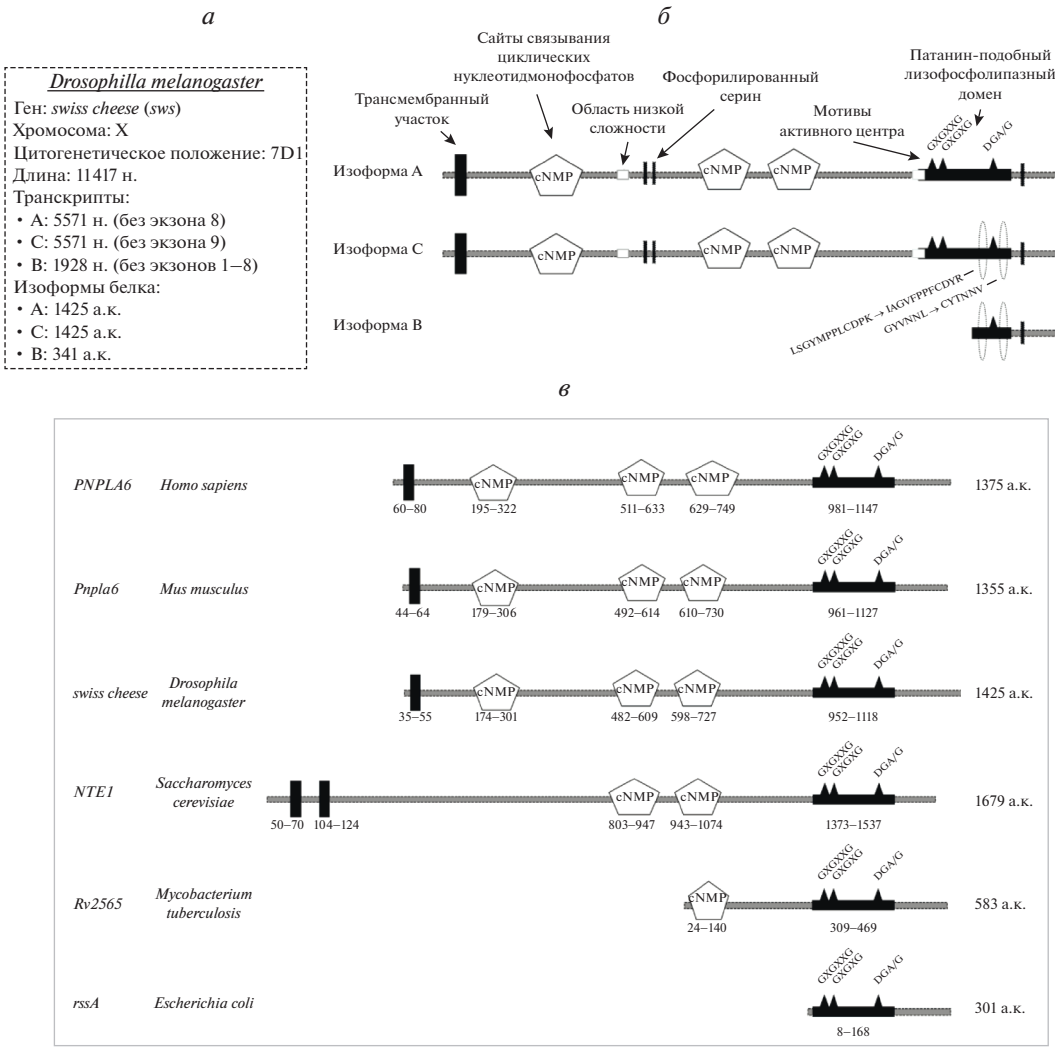

Рис. 1. Белок SWS и его ортологи. *а* – общая информация о цитогенетическом положении гена *sws*, длине известных транскриптов и изоформ белка; *б* – структура известных изоформ белка SWS у дрозофилы. Указаны названия, основные структурные элементы и аминокислотная длина изоформ; *в* – названия генов-ортологов *sws* у разных видов, структура канонических изоформ соответствующих белков и их длина в аминокислотах. Под трансмембранными, нуклеотид-связывающими и эстеразными участками указано их аминокислотное положение в белке.

ство последовательностей продуктов этого гена при сравнении между мышью и человеком составляет 96%, между мышью и дрозофилой – 36% [22]. Белок SWS (обозначение заимствовано из литературы и удобно, хоть оно и отходит от классической традиции обозначения белков дрозофилы) имеет консервативный пататин-подобный лизофосфолипазный (эстеразный) домен, поэтому одно из названий белка-ортолога SWS у человека и некоторых других животных – PNPLA6 (patatin-like lysophospholipase domain containing 6). Сходство эстеразных доменов SWS дрозофилы и PNPLA6 человека составляет 61% [23]. Эстеразный домен SWS образован аминокислотным участком 952–1118, имеет два активных центра: нуклеофильный Ser^{985} и протон-акцепторный Asp^{1105}, а также регуляторный мотив GXGXXG (положение 956–961, рис. 1,*в*).

Кроме эволюционно-консервативного эстеразного домена в структуре SWS есть сайты, связывающие циклические нуклеотидмонофосфаты. В соответствующих белках у дрозофилы, человека, мыши и большинства других Metazoa по три таких сайта, у одноклеточных грибов *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* присутствует два сайта, у белощекого хохлатого гиббона *Nomascus leucogenys* и бактерии *Mycobacterium tuberculosis* только один, а у *Escherichia coli* они вовсе отсутствуют. В структуре SWS дрозофилы нуклеотид-связывающие сайты занимают следующие аминокислотные позиции: 174–301; 482–609; 598–727 (рис. 1,*в*).

Белок SWS является интегральным, имеет трансмембранный участок с 35-й по 55-ю аминокислоты, заякоривающий SWS в клеточной мембране или в мембране эндоплазматического ретикулума (**ЭР**) [24–26]. Длинный С-концевой фрагмент белка обращен в цитоплазму. Белок может быть фосфорилирован по остаткам Ser в позициях 444, 453, 1160 [27].

Функциональное сходство SWS дрозофилы и PNPLA6 человека было продемонстрировано при изучении мутанта *sws*^{5}. Индуцированная с помощью пищевой добавки RU486 экспрессия гетерологичного *PNPLA6* в нейронах взрослых генетически модифицированных особей *sws*^{5}*;GS-elav-GAL4>UAS-PNPLA6* препятствовала развитию характерных для мутантов *sws*^{5} нейропатологических и поведенческих изменений. Более того, заметного улучшения удавалось добиться даже при индукции экспрессии *PNPLA6* на 5-й день жизни особей, что предотвращало развитие дальнейшей нейродегенерации [28]. Еще один эксперимент показал функциональное сходство генов человека и *Danio rerio*. Подавление экспрессии гена *pnpla6* рыбы с помощью введения морфолиновых олигонуклеотидов ведет к нарушению ее эмбриогенеза, которое удается предотвратить инъекцией мРНК *PNPLA6* человека [29]. Эти данные свидетельствуют о функциональной консервативности ортологов гена *sws*.

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИЙ ОРТОЛОГОВ *sws* С ПОМОЩЬЮ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Ортолог *sws* человека – ген *PNPLA6* – имеет еще одно название, историческое, а именно *NTE* (от английских названий соответствующего белка: neurotoxic esterase, neuropathy target esterase). Ген *NTE* был предсказан в середине XX в. при исследованиях причин возникновения отсроченного синдрома, вызванного отравлением токсичными органическими соединениями фосфора (OPIDN, organophosphorus compound induced delayed neurotoxicity). Оказалось, что продукт этого гена является мишенью для действия ряда веществ, содержащих пятивалентный фосфор: фосфатов, фосфонатов, фосфорамидатов, фосфинатов. Эти соединения ковалентно связываются с активным центром белка NTE (Ser^{966} для изоформы-2) через атом фосфора, обратимо ингибируя фермент. Некоторые из этих веществ способны участвовать во второй реакции, называемой “старением”, в ходе которой от атома фосфора отщепляется один из боковых радикалов, в результате чего электронная плотность перераспределяется между атомом фосфора и двумя связанными с ним атомами кислорода. Такой интермедиат приобретает отрицательный заряд и не может быть реактивирован даже сильными нуклеофилами. Реакция “старения” необратима, продолжается она несколько минут.

Исследованные фосфорорганические соединения являются по своей природе эфирами. Было предсказано, что ингибируемый ими фермент взаимодействует с последними из-за их подобия естественному субстрату (предположительно тоже эфиру) [30–32]. Из этого следует, что сам фермент является эстеразой.

Возможность взаимодействия белка NTE с некоторыми фосфорорганическими эфирами позволила разработать метод определения активности NTE (и его ортологов). Для этого используют специальный субстрат (фенилвалерат), красящие агенты (аминоантипирин-4 и гексацианоферрат(III) калия) и колориметрически определяют долю расщепившегося субстрата. Однако фениловый эфир пентановой кислоты (фенилвалерат) может быть расщеплен не только NTE, но и ацетилхолинэстеразой и бутирилхолинэстеразой. Поэтому для определения активности NTE в биологическом образце параллельно проводят два эксперимента с добавлением в образец фосфорорганических ингибиторов эстераз: только параоксона (ингибирует эстеразы кроме NTE) или мипафокса (ингибирует NTE) вместе с параоксоном. Чувствительное к мипафоксу, но устойчивое к параоксону расщепление субстрата в таком **дифференциальном тесте** и вызвано активностью NTE [33, 34].

Накопленные токсикологические данные позволяют предположить, что для развития синдрома OPIDN необходимы два явления: во-первых, ингибирование ферментативной активности NTE более чем на 70% и, во-вторых, “старение” белка. Считается, что “постаревший” интермедиат обладает собственным токсическим эффектом. Некоторые органофосфаты (фосфинаты), а также сульфонаты и карбаматы (эти вещества относят к типу ингибиторов “класса Б”) ингибируют NTE, но не вызывают его “старения”. Поэтому даже если падение активности фермента превышает 70%, синдром OPIDN у модельных животных не развивается. Более того, такие ингибиторы предотвращают последующее “старение” белка при добавлении так называемых ингибиторов “класса А” (фосфатов, фосфонатов, фосфорамидатов, вызывающих “старение”). Например, один из органофосфатов, способных индуцировать OPIDN, триортокрезилфосфат (англ. TOCP) известен как соединение, вызвавшее отравление около 70000 человек в XX в. Еще одним распространенным ингибитором NTE является диизопропилфторфосфат (DFP), а самым сильным ингибитором NTE является этилоктилфторфосфонат (EOPF) [33, 34].

Изучение свойств белка с помощью фосфорорганических соединений привело к идентификации функций, которые белок выполняет в клетке.

Оказалось, что подавление эстеразной активности PNPLA6 мыши (здесь и далее в тексте мы будем использовать современное название белка и соответствующего гена у человека и мыши – PNPLA6) с помощью органофосфатов как *in vivo*, так и *in vitro* (в лизатах мозга) коррелирует со снижением активности лизофосфолипазы (расщепляющей лизолецитин), из чего был сделан вывод, что 1-пальмитоиллизофосфатидилхолин (лизолецитин) является субстратом PNPLA6. Подтверждением этой гипотезы стал и факт того, что в мозге гетерозиготных мышей с генотипом *Pnpla6*$^{+/-}$ активность лизофосфолипазы составила 59%, а эстеразная активность PNPLA6 в дифференциальном тесте – 55% (от значений, полученных для мышей дикого типа) [35]. Таким образом была охарактеризована эстеразная функция белков-ортологов SWS.

СВОЙСТВА ЭСТЕРАЗНОГО ДОМЕНА

Как было упомянуто выше, у дрозофилы активным центром является Ser^{985}, ответственный за реализацию эстеразной функции SWS. Результатом экспрессии мутантного *sws*, полученного методом направленного мутагенеза, приводящего к замене Ser^{985}Asp, стало отсутствие эстеразной активности SWS в лизатах мозга дрозофилы при анализе в дифференциальном тесте. Напротив, гиперэкспрессия нормального *sws* в нейронах увеличивала активность эстеразы в 2 раза и не вызывала нейродегенерацию. Гиперэкспрессия функционального *sws* в глии повышала эстеразную активность в 12 раз и приводила к дегенерации глиальных клеток (в особенности эпителиальной астроцитоподобной глии) в ламине и в первой зрительной хиазме [24].

Активность SWS выражается в гидролизе фосфатидилхолина (**ФХ**) до глицерофосфохолина и двух молекул жирных кислот. Это означает, что SWS выполняет функции фосфолипазы Б, расщепляющей фосфолипиды по сайтам A1 и A2. Мутантная линия *sws*^{1}, у которой вследствие мутации *c.*[*C1616A*] появляется преждевременный нонсенс-кодон Ser^{375}*, характеризуется повышенным содержанием ФХ. Линия с гиперэкспрессией *sws* дикого типа, напротив, имеет сниженный уровень ФХ по сравнению с линией дикого типа *CantonS* [24].

Эксперименты *in vitro* доказали, что эстеразный домен PNPLA6 человека (727–1216 а.к. в изоформе-2) расщепляет фосфолипиды, лизофосфолипиды и моноацилглицериды, высвобождая жирные кислоты. Бóльшая активность проявляется в *sn-1* реакциях: в случае расщепления моноацилглицеридов скорость реакций по положению *sn-1* в 8–10 раз выше, чем по *sn-2*. Наибольшая скорость реакции наблюдается при расщеплении лизофосфолипидов, в 10 раз превышающая значения известных специфических лизофосфолипаз. Жирные кислоты высвобождаются еще быстрее из 1-пальмитоил-лизоФХ – в 200 раз быстрее, чем если бы субстратом был 1-пальмитоил-2-арахидонил-ФХ [36].

СВОЙСТВА НУКЛЕОТИД-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА

Участок SWS, содержащий сайты связывания циклических нуклеотидмонофосфатов, структурно похож на фрагмент регуляторной субъединицы R1α протеинкиназы A (PK_A) дрозофилы и человека. Нуклеотид-связывающий домен SWS взаимодействует с каталитической субъединицей C3 протеинкиназы PK_A дрозофилы, но не с другими субъединицами (C1 и C2). Любопытно, что то же самое способен делать и белок PNPLA6 человека, что вновь доказывает эволюционную консервативность молекулярных процессов, контролируемых ортологами *sws*. Нормальный SWS ингибирует активность PK_AC3: увеличение экспрессии *sws* в нейронах у особей с генотипом *elav-GAL4;UAS-sws*$^{+}$ ведет к снижению общей активности PK_A [37].

Обнаружена колокализация PK_AC3 и SWS в нервных клетках мозга дрозофилы на мембранах ЭР и цитоплазматических везикул. В клетках мутантной линии *sws*^{1} такого явления не замечено, поэтому предполагают, что нормальный SWS рекрутирует PK_AC3 к мембранам компартментов клетки, обращенным в цитоплазму. Функциональные нарушения SWS, наблюдаемые в случае мутации *sws*^{1}, приводят к невозможности связывания регуляторных субъединиц SWS с каталитическими субъединицами PK_AC3, в результате чего последние становятся, как предполагают авторы исследования [25], конститутивно активными. Гиперэкспрессия гена, кодирующего PK_AC3, в мутантных особях *sws*^{1} приводит к усугублению патологических процессов в мозге дрозофилы. При этом не изменяется эстеразная активность фермента SWS; т.е. к патологическим проявлениям приводит именно измененная активность PK_AC3, а не нарушенная эстеразная активность SWS. Удаление одной копии гена, кодирующего PK_AC3, не влияет на нейродегенерацию в центральном мозге у мутанта *sws*^{1}. Более того, в кортексе ламины наблюдается супрессия мутантного фенотипа у таких мух [25]. Однако нокдаун гена *PKA-C3* сам по себе тоже способствует нейродегенерации, проявляющейся на 30-й день жизни имаго [37].

Показано, что PK_AC3 мало похожа на другие известные субъединицы (C1 и C2), и отсутствие ее активности у мутантных *D. melanogaster* не может быть компенсировано, например, дополнительной

экспрессией гена *PKA-C1*. Экспрессия *PKA-C3* обнаружена у имаго в промежуточных натализин-положительных нейронах, связывающих нейроны мозга и мотонейроны брюшной нервной цепочки. Оказалось, что мутантные по *PKA-C3* самцы не спариваются с самками, хотя их половое поведение остается нормальным: они способны проявлять реакцию "ухаживания" за виргинными самками; их локомоторная активность не отличается от нормы [38].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДОМЕНОВ

Любопытны результаты исследований взаимодействия доменов SWS (или его ортологов). На культурах трансфицированных клеток фибробластов почки зеленой мартышки (COS) была проанализирована эстеразная активность и локализация белка PNPLA6 человека в зависимости от наличия того или иного домена. Оказалось, что отсутствие трансмембранного участка ведет к попаданию белка в цитоплазму и снижению эстеразной активности в 2 раза по сравнению с полноценным белком. Эстеразная активность PNPLA6 не зависит ни от присутствия нуклеотид-связывающего домена, ни от цАМФ. Белок без нуклеотид-связывающего домена колокализуется с маркером ЭР, кальнексином, при этом сам ЭР меняет морфологию, образуя тубулообразные выпячивания. Такая же картина наблюдается при экспрессии полноценного гена, а также мутантного его варианта, имеющего замену $S^{966}A$. Следует заметить, что эти эксперименты проведены на фоне нормальной активности эндогенного PNPLA6, т.е. имела место "сверхэкспрессия" генетической конструкции. Авторы предположили, что вследствие гидрофобности эстеразного домена белки PNPLA6 агрегируют С-концами, притягивая мембраны ЭР друг к другу [39]. Это явление было обнаружено и у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, белок NTE1 которых заякоривается в мембране гладкого ЭР. Гиперэкспрессия *NTE1* ведет к образованию тубулообразных выпячиваний ЭР за счет межмолекулярных взаимодействий гидрофобных эстеразных доменов [40].

В другой работе исследователи проанализировали взаимодействие доменов PNPLA6 в клетках нейробластомы человека (SH-SY5Y). Оказалось, что эстеразный домен (в том числе и тот, активность которого отсутствовала вследствие замены $S^{966}A$) сам по себе способен взаимодействовать с липидными каплями (или их предшественниками) – специализированными органеллами, накапливающими в своем составе липиды, в первую очередь триацилглицериды [41]. Несмотря на обнаруженное сродство эстеразного домена к липидной фазе, реализация эстеразной активности PNPLA6 не нуждается в липидном окружении [36]. Нуклеотид-связывающий домен ингибирует взаимодействие эстеразного домена с липидными каплями. Отсутствие первого ведет к тому, что белок остается на поверхности ЭР, но собирается в небольшие скопления рядом с липидными каплями или их предшественниками, формирующимися на мембране ЭР. Таким образом, полноценный PNPLA6 находится в мембране ЭР и не способен взаимодействовать с липидными каплями. До сих пор неизвестно могут ли какие-либо воздействия изменить конформацию нормального белка таким образом, чтобы он смог связать липидные капли. В работе [41] также было показано, что дополнительный синтез эстеразного домена приводил к увеличению количества липидных капель в клетках SH-SY5Y, снижению уровня ФХ, но не влиял на количество триацилглицеридов. Подавление экспрессии *PNPLA6* на 70% с помощью интерференции РНК не влияло ни на уровень ФХ, ни на уровень триацилглицеридов, ни на распределение липидных капель в клетках. Это может означать, что в такой модели остаточный 30%-ный уровень мРНК обеспечивает нормальную функцию PNPLA6. Однако эта гипотеза остается недоказанной [41].

По-видимому, в норме нуклеотид-связывающий участок влияет на эстеразную активность белка. Мутация sws^5 у дрозофилы, имеющая вследствие замены *c.*[*G2431A*] миссенс-эффект $Gly^{648}Arg$ в нуклеотид-связывающем домене белка, вызывает снижение эстеразной активности SWS. Это приводит к прогрессирующей с возрастом нейродегенерации, выявляемой в мозге в виде образования полостей; нарушению нормальной реакции отрицательного геотаксиса, наблюдаемому как на первой, так и на четвертой неделе жизни имаго; ускорению утомляемости мух, непрерывно скидываемых на дно стаканчика в автоматизированной установке. Например, если особи дикого типа *BerlinK* перестают подниматься по стенкам стаканчика через 7 ч постоянного стряхивания, то особи sws^5 устают уже через 2 ч. Анализ кривых продолжительности жизни показывает сокращение и этого показателя у мутантов по сравнению с контролем [28].

С другой стороны, эстеразный домен, вероятно, влияет на нуклеотид-связывающий участок. Ингибирование эстеразной активности SWS с помощью TOCP приводит к снижению оной до 20% от первоначального уровня у особей дикого типа (после их кормления TOCP в течение 16 ч) и вызывает нейродегенерацию на 14-й день жизни имаго. Заметнее всего последствия нейродегенерации видны в ламине. У самок с генотипом sws^1/*CantonS* снижена эстеразная активность на 50% по сравнению с особями дикого типа. Действие на них TOCP не вызывает нейродегенерацию к 14-му дню жизни имаго. Гиперэкспрессия

sws в нейронах, осуществляющаяся у особей с генотипом *elav-GAL4;UAS-sws*$^{+}$, увеличивает эстеразную активность до 160% по сравнению с таковой у особей дикого типа. Это не ведет к нейродегенерации. Кормление таких особей в течение 16 ч TOCP вызывает у них гораздо более сильную нейродегенерацию на 14-й день жизни, чем у особей дикого типа, принимавших TOCP. Сходные наблюдения оказались справедливыми и для поведенческого теста на фототаксис у всех перечисленных особей, коррелируя с уровнем нейродегенерации, выражающимся в доле полостей в мозге особей [37]. Такие противоречивые результаты не удается объяснить, рассматривая взаимодействие TOCP только с эстеразным доменом.

Вместе с тем было обнаружено, что кормление особей дикого типа TOCP в течение суток значительно снижает активность протеинкиназы А в лизатах, полученных из голов имаго. Такой же эффект имеет действие TOCP на культуру клеток гиппокампа крысы. Напротив, не нейротоксичный ингибитор эстераз параоксон (не ингибирует SWS/PNPLA6) не вызывает подобных изменений. Как было уже упомянуто, нокдаун *PKA-C3* в нейронах дрозофилы способствует нейродегенерации, наблюдаемой на 30-й день жизни имаго. По-видимому, TOCP не только ингибирует эстеразную активность SWS/PNPLA6, связывая активный центр Ser, но и приводит к удержанию PK_AC3, инактивируя ее [37]. Однако эту гипотезу еще предстоит проверить.

КЛЕТОЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ, ЗАВИСИМЫЕ ОТ SWS И ЕГО ОРТОЛОГОВ

Главной и наиболее изученной функцией SWS и его ортологов является (лизо)фосфолипазная, реализуемая эстеразным доменом. Нарушение этой функции приводит к различным патологическим эффектам вследствие гибели нервных клеток. Но некоторые клетки способны адаптироваться к дисфункции такой липазы, среди них – клетки дрожжей.

Эстеразный домен ортолога SWS у *Saccharomyces cerevisiae* – NTE1 – на 39% похож на такой же домен PNPLA6 у человека. Известно, что белок дрожжей в среднем представлен 500 копиями на клетку. С помощью метода измерения активности фермента при дифференциальном ингибировании эстераз фосфорорганическими соединениями было показано, что NTE1 способен расщеплять фенилвалерат, а замена в активном центре Ser^{1406} ведет к отсутствию эстеразной активности. Этот белок чувствителен к действию “нейропатических” фосфорорганических соединений, но в 5–10 раз меньше, чем человеческий PNPLA6. Белок дрожжей способен расщеплять как лизоФХ, так и ФХ и, по-видимому, является мажорной, если не единственной, фосфолипазой Б у дрожжей по отношению к ФХ. Однако нокаут *NTE1* не влияет ни на жизнеспособность, ни на рост клеток. Это объясняется следующей динамикой метаболизма холина. Если пометить холин изотопом [^{14}C] и выращивать дрожжи на содержащей его среде, а затем перевести культуру на среду с немеченым холином и выращивать их при температуре 37°C, то у клеток-нокаутов по гену *NTE1* [^{14}C]-меченный холин попадает в клетку в 2 раза медленнее, чем у клеток дикого типа. Холин используется для образования промежуточного продукта – CDP-холина, который нужен для синтеза ФХ. В эксперименте у дрожжей-нокаутов концентрация меченого CDP-холина, как и ФХ, была в разы ниже, чем у нормальных клеток. Полученный из CDP-холина ФХ расщепляется в клетках дрожжей: в норме через 1 ч при 37°C концентрация меченого ФХ сокращается вдвое. У нокаутов она остается практически неизменной. Основным (>85%) продуктом расщепления ФХ является глицерофосфохолин. У нокаутов эта молекула отсутствовала в течение 25 ч проведения эксперимента, т.е. они были неспособны расщеплять ФХ с образованием глицерофосфохолина и двух жирных кислот. Оказывается, однако, что общий уровень ФХ одинаков у нормальных и мутантных клеток. Это косвенно доказали в эксперименте, где сперва дрожжи выращивали на [метил-^{14}C]-метионине, который служил источником для метилирования фосфатидилэтаноламина, в результате чего образовывался меченый ФХ: его концентрация не отличалась у нокаута и дикого типа. Как показывают исследования, изменение уровня ФХ токсично для дрожжей. Поэтому при нокауте *NTE1* замедляется метаболизм ФХ – дрожжи меньше потребляют холин и медленнее синтезируют ФХ, так как медленнее его расщепляют (активной остается только фосфолипаза Д, отщепляющая холин от ФХ) [40].

Изменения липидома, вызванные дисфункцией SWS/PNPLA6, могут влиять на различные свойства клетки, например на электрическую проводимость мембран. В эксперименте было показано, что подавление эстеразной функции с помощью нейропатических органофосфатов или при замене $S^{966}A$ в активном центре ведет к изменению профиля ионных токов через мембрану липосом, состоящих из диолеилФХ и эстеразного домена PNPLA6 человека [42].

Локализованный в мембране ЭР белок SWS может влиять и на эту органеллу. Было замечено, что у мутантов *sws*^{1} с возрастом менялась форма ЭР в нейронах, что выявили методом электронной микроскопии [24]. Позднее выяснилось, что

дисфункция гена *sws* ведет к стрессовому ответу ЭР. Мутация sws^1 вызывает четырехкратное увеличение уровня сплайсированного транскрипта, кодирующего транскрипционный фактор XBP1, который отвечает за стресс ЭР посредством активации шаперонов, ферментов синтеза липидов, факторов деградации белков. При этом увеличивается количество шаперона ЭР GRP78/BiP в головах молодых мух (возраст которых составил 4–6 дней жизни). Это сопровождается уменьшением уровня кальциевой АТФазы сарко-ЭР (SERCA) и соответствующим увеличением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме натализин-положительных нейронов, экспрессирующих *sws*. В результате увеличивается уровень моно- и полиненасыщенных форм ФХ, а также различных форм лизоФХ [43].

Регуляция обнаруженных стрессовых реакций способна уменьшить патологические проявления, наблюдаемые у мутанта sws^1. Экспрессия в нейронах дополнительного *XBP1* снижала уровень GRP78/BiP к нормальному. На 7-й день жизни такие мухи не имели отклонений в локомоторной активности, анализируемой в тестах на отрицательный геотаксис; замедлялось развитие нейродегенерации: на 14-й день жизни мух полостей в мозге было больше, чем в норме, но меньше, чем у мутантов. При этом снижался уровень лизоФХ (но не достигал нормальных значений), в то время как уровень ФХ не менялся. К подобным фенотипическим эффектам приводила и дополнительная экспрессия SERCA в нейронах, однако она не влияла на уровень GRP78/BiP [43].

Нейродегенеративные и поведенческие изменения, наблюдаемые у мутантов sws^1, удалось предотвратить, используя таурурсодеоксихолевую кислоту (TUDCA), производное одной из желчных кислот. TUDCA оказывает противоапоптотическое действие, предотвращая активацию каспазы-3, высвобождение Bax и цитохрома C [43].

Еще одно исследование, посвященное изучению реакции организма на дисфункцию *sws*, показало, что мутанты sws^1 и sws^{olfE} имеют более низкую выживаемость при 96-часовой инкубации на пище с окислителями (метилвиолет и перекись водорода). Мутант sws^{olfE} при этом характеризуется бóльшим уровнем окисленных липидов (измеренным с помощью тиобарбитуровой кислоты) по сравнению с контролем, что свидетельствует о возможном изменении окислительно-восстановительного статуса клеток при нарушении функции гена *sws* [44].

Другие исследования показали связь *sws* и митохондрий. У особей с гиперэкспрессией *sws* в нейронах (*elav-GAL4;UAS-sws*$^+$) выявлено нарушение формы и распределения митохондрий в нейронах, выявляемое методом электронной микроскопии. И как было отмечено выше, нейродегенерация у таких мух не наблюдается [37]. Напротив, у мутантов sws^1 наблюдается нейродегенерация, но не замечено изменение митохондрий в нейронах [24]. Однако у личинок-мутантов sws^1, так же как и у личинок с нокдауном *sws* в нейронах, в пресинаптических окончаниях нейромышечных соединений заметно уменьшалось количество митохондрий [45].

Представленные исследования показывают множественность клеточных функций, зависимых от действия гена *sws*, и указывают на сложный ответ клетки при изменении работы гена *sws*.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *sws* С ДРУГИМИ ГЕНАМИ

Существуют данные о взаимодействии *sws* с некоторыми другими генами. Например, исследования обонятельной функции у мутантов sws^{olfE} выявили взаимодействие *sws* с генами, кодирующими субъединицы интегринов: *myospheroid* и *inflated*. Несмотря на то что использованные мутации в этих генах рецессивны и не влияют на обоняние будучи в гетерозиготном состоянии, в положении транс-аллельного взаимодействия (дигетерозиготное носительство) некоторые мутации ведут к нарушению чувствительности мух как к бензальдегиду, так и к изоамилацетату (восприятие которого нарушено у мутантов по гену *myospheroid*). Однако мутация, определяющая полную дисфункцию гена интегрина, не вызывает такие эффекты. Подобные результаты получены и для гена α2-субъединицы интегрина (*inflated*): транс-дигетерозиготы хуже чувствовали бензальдегид, чем моногетерозиготы [46].

Еще одна работа посвящена изучению двух генов, открытых при участии Сеймура Бензера. Было показано, что нейродегенерация у мутанта sws^1 усиливается при потере функции гена циркадных ритмов *per*: увеличивались как количество, так и площадь полостей в нейропиле дейтоцеребрума. Это свидетельствует о взаимодействии указанных генов по типу кумулятивной полимерии при рассмотрении нейродегенеративного фенотипа, а значит, существует независимый контроль ими клеточных функций [47]. В свою очередь это говорит о сложных взаимодействиях генов, определяющих тот или иной фенотип, и предлагает рассматривать более сложные модели в нейрогенетике.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ *sws* И ЕГО ОРТОЛОГОВ

Вопрос регуляции экспрессии *sws* пока остается неизученным. На сегодняшний день нам известна только одна работа, посвященная исследованию контроля экспрессии ортолога *sws*, а именно гена *PNPLA6* человека. Добавление в питательную среду к клеткам нейробластомы человека (SK-N-SH) активатора протеинкиназы С – форбол-12-миристат-13-ацетата – вело к снижению уровня мРНК гена *PNPLA6* на 60–70%, что обусловило остаточный уровень белка и соответственно остаточную эстеразную активность на уровне около 1/3 от нормы. Ингибитор протеинкиназы С – стауроспорин – не влиял на исследуемые показатели, как и введение в клетки вектора для гиперэкспрессии *PNPLA6* под собственным промотором. Исходя из полученных данных и информации о времени жизни мРНК гена *PNPLA6*, авторы заключили, что активация протеинкиназы С влияет на экспрессию эндогенного *PNPLA6*, но не на сам белок или его мРНК [48].

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ *sws* У ДРОЗОФИЛЫ

Длинные транскрипты гена *sws* (*sws-RA* и *sws-RC*) появляются на первой–третьей стадиях эмбриогенеза в большом количестве, затем к стадии личинки третьего возраста и куколки уровень длинного транскрипта падает. У имаго длинные транскрипты обнаружены как в теле, так и в голове. Короткий транскрипт (*sws-RB*) появляется только у имаго в голове [21].

Исследование экспрессии *sws* с помощью транскриптомных методов выявило, что транскрипты *sws* можно обнаружить на всех стадиях онтогенеза особей. Наибольший уровень мРНК *sws* найден в первые часы развития эмбриона и у взрослых особей. Низкая экспрессия *sws* характерна для слюнных желез личинок, умеренный уровень экспрессии наблюдается в пищеварительной системе личинок и имаго, высокая экспрессия происходит в головах особей вне зависимости от их возраста, и очень высокий уровень транскриптов *sws* обнаружен в семенниках и жировом теле имаго [49, 50].

У личинок третьего возраста *sws* экспрессируется в нейронах и в глиальных клетках мозга и брюшной нервной цепочки. С помощью иммуногистохимического окрашивания белок SWS был обнаружен в периферических нервах: аксонах нейронов и в глиальных клетках, их окружающих, а также в нейромышечных окончаниях [45].

Дисфункция *sws* влияет на развитие нейромышечных контактов личинок. Так, у самцов sws^1 и особей с нокдауном *sws* в нейронах было обнаружено увеличение числа сателлитных бутонов и нарушение цитоскелета. Вместе с тем количество активных зон в одном бутоне, содержащих активные синапсы, оказалось уменьшенным у личинок с нарушенной функцией *sws*. Хотя сам SWS располагается пресинаптически и отсутствует в постсинапсе, было замечено снижение уровня белка DLG – постсинаптического маркера – ортолога PSD-95 млекопитающих [45].

Экспрессия *sws* в мозге имаго *D. melanogaster* в первые дни жизни происходит повсеместно, но с возрастом ограничивается крупными клетками [24]. Ген *sws* экспрессируется в фоторецепторных клетках; его дисфункция ведет к прогрессирующей с возрастом дегенерации фасеток [26].

Реакция нервных и глиальных клеток на дисфункцию *sws* различается. Тканеспецифичная экспрессия нормального аллеля *sws* в глии мутантов sws^1 препятствовала патологическому множественному обертыванию, однако нейроны продолжали гибнуть. Экспрессия аллеля *sws* дикого типа только в нейронах мутантных особей sws^1, но не в глии, приводила к отсутствию полостей в мозге, однако морфология глиальных клеток имела фенотип как у мутанта. Похожие явления были обнаружены и при тканеспецифичной экспрессии у дрозофилы мышиного *Pnpla6*, что вновь показывает функциональное сходство соответствующих белков [24]. Позднее выяснилось, что нокдаун *sws* только в нейронах или только в глии не влияет на образование множественных мембранных слоев, образованных глиальными клетками, из чего следует, что для этого необходима дисфункция *sws* во всех клетках нервной системы (проявляющаяся у мутантов sws^1) [19, 51]. Более того, для поддержания жизнедеятельности клеток требуется конститутивная экспрессия *sws*. Использование факультативного промотора генов теплового шока для экспрессии нормального *sws* не супрессировало мутантный фенотип sws^1 [24].

Ингибирование эстеразной активности SWS с помощью TOCP имеет отсроченный нейродегенеративный эффект. После однодневного кормления токсичным органофосфатом у только что вылупившихся дрозофил фиксировали снижение эстеразной активности SWS на 80%, и к 14-му дню жизни этих особей образовывались полости в мозге, нарушалась быстрая реакция фототаксиса [37].

Действие TOCP на первичную культуру нейронов дрозофилы вело к заметному сокращению

длины отростков, прямо пропорционально зависящему от дозы токсина [37].

Наличие глиального фенотипа у мутанта *sws*[1] подтолкнуло исследователей к выявлению типов глии, где экспрессируется *sws*. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания выявили белок SWS в пограничной глии между кортексом и нейропилем в протоцеребруме, фенестрированной (периневральной) и сателлитной (кортексной) глии ламины, глии нейропиля медуллы. В глии нейропиля в протоцеребруме белок не был обнаружен таким методом, так же как и в гигантской глии первой зрительной хиазмы, и в эпителиальной (астроцитоподобной) глии ламины [24].

Однако факт экспрессии гена в том или ином типе клеток сам по себе не свидетельствует о функциональной роли исследуемого гена в этих клетках. Поэтому с помощью метода электронной микроскопии был проведен анализ влияния подавления экспрессии гена *sws* в глии на морфологию этих клеток. Индуцированный интерференцией РНК посттранскрипционный сайленсинг *sws* во всех глиальных клетках (с помощью драйверов экспрессии *repo-GAL4* или *loco-GAL4*) вызывал образование полостей, наиболее заметных в кортексе ламины, на границе между ретиной и ламиной. Количество полостей увеличивалось с возрастом имаго, однако число глиальных клеток при этом не менялось. Оказалось, что при подавлении экспрессии *sws* апоптоз глии происходит до второго дня жизни имаго. У двухдневных мух число глиальных клеток было ниже, чем у нормальных особей. Наибольшее снижение – до 58% – выявили для глиальных клеток, окружающих оптические доли. В меньшей степени падало число клеток эпителиальной (астроцитоподобной) глии ламины [51].

К подобным изменениям приводило подавление экспрессии *sws* в отдельных типах глии, а именно в субпериневральной или оборачивающей глии центральной нервной системы, но не в астроцитоподобной или кортексной. При нокдауне *sws* в субпериневральной глии образовывались крупные аберрантные мембранные структуры, происходило это преимущественно в ламине. Напротив, подавление экспрессии *sws* в оборачивающей глии центральной нервной системы вело к дегенерации ее отростков в нейропиле ламины, медуллы, лобулы и лобулярной пластинки, где аксоны нейронов становились в результате оголенными [51].

Авторы предположили, что именно недостаток эстеразной функции SWS ведет к нарушениям жизнедеятельности глиальных клеток, так как синтез дополнительного мутантного по активному центру SWS не влияет на развитие нейродегенерации у особей с нокдауном *sws*, в то время как мутантный по нуклеотид-связывающему домену белок снижает темпы нейродегенерации. Обнаруженная при дисфункции SWS в глии нейродегенерация влияла на поведение особей – с возрастом ухудшалась реакция фототаксиса. Такие изменения наблюдались как при нокдауне *sws* во всех типах глии, так и в оборачивающей и субпериневральной в отдельности, и прогрессировали с возрастом. При этом зрительная или моторная функция не нарушалась, а страдало центральное звено обработки информации. Мухи с нокдауном *sws* во всех типах глии хуже различали специальные ориентиры в “Буридановом” эксперименте, и с возрастом их гигантские интернейроны (giant fibres, обрабатывают входящую зрительную информацию от сенсорных нейронов и передают сигнал на моторные нейроны) хуже отвечали на электрическое возбуждение. Нокдаун не влиял на электроретинограмму или возбудимость моторных нейронов. Не менялся и уровень маркера активных зон нейромышечного синапса – белка Bruchpilot, но увеличивался уровень белка CSP, ответственного за Ca^{2+}-индуцируемый экзоцитоз [51].

РОЛЬ ГЕНА *sws* В КОНТРОЛЕ ПОВЕДЕНИЯ

Выше мы уже отмечали, что связанная с дисфункцией *sws* нейродегенерация может влиять на нарушение поведения у *D. melanogaster*: подавлять реакции положительного фототаксиса [37, 51] или отрицательного геотаксиса [28]. Мутация *sws*^{olfE} была обнаружена у мух с нарушенным поведением в ответ на запах бензальдегида [20]. Мутант *olfE* был изучен среди прочих (из группы мутантов *olfactory*) в исследовании группового поведения мух, в ходе которого было показано, что в группах более 50 особей есть мухи, которые ищут пищу, а затем оставшиеся особи собираются вокруг “первопроходцев”. Однако при описании результатов работы авторы не указали данные, полученные при исследовании мутанта *olfE*. Утверждалось, что мутанты группы *olf* имеют более низкие разработанные количественные показатели для оценки такого поведения, чем контрольные мухи *Canton-Special* [52].

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ *Pnpla6* У МЫШИ

У мыши экспрессия *Pnpla6* начинается на 7-й день жизни эмбриона и важна для его выживания [53]. Экспрессия гена у эмбрионов обнаружена в мезонефросе, метанефросе, обонятельном, кишечном, трахеальном эпителии, в языкоглоточном и трой-

ничном ганглиях. Постнатальная экспрессия повсеместна в центральной нервной системе, однако с возрастом сокращается до структур моста, нижних бугров четверохолмия, гипоталамуса, зубчатого ядра мозжечка, продолговатого мозга и коры. С возрастом экспрессия *Pnpla6* отчетливо выявляется в крупных нейронах (например, в пирамидных клетках гиппокампа и в клетках Пуркинье мозжечка) [22]. Кроме того, экспрессия *Pnpla6* обнаружена в гормон-продуцирующих клетках семенников – клетках Лейдига [53].

Нокаут *Pnpla6* имеет летальный эффект – особи гибнут на 9-й день эмбриогенеза из-за дефектов развития плаценты матери. Особи, несущие лишь один нормальный аллель *Pnpla6*, жизнеспособны и развиваются нормально, хотя и имеют сниженную на 50% активность PNPLA6 [53, 54].

Гетерозиготные мыши *Pnpla6*$^{+/-}$ не имеют нейропатологических изменений, характеризуются нормальными обучаемостью и памятью. Введение таким мышам малой дозы нейропатического органофосфата EOPF вызывает увеличение локомоторной активности, при этом ни в головном, ни в спинном мозге не наблюдается патологических изменений. Введение токсичных доз EOPF вызывает снижение двигательной активности и судороги [53].

Ингибирование PNPLA6 с помощью фосфорорганического соединения MOCDPP при ежедневном (в течение пяти дней) добавлении токсина в пищу мышам вело к увеличению уровня ФХ до 120% только через неделю после окончания отравления, затем уровень восстанавливался до нормального. Вместе с тем развивалась дегенерация дистальных отделов сенсорных и моторных нейронов в спинном мозге, но это не влияло на двигательную активность особей [55].

Инактивация экспрессии *Pnpla6* в нейронах мыши также ведет к нейродегенерации – гибнут клетки гиппокампа, таламуса, клетки Пуркинье мозжечка [56]. У мышей с нокаутом *Pnpla6* в нейронах (*nestin-cre:NTEfl/fl*) происходит дегенерация дистальных участков сенсорных и моторных нейронов в спинном мозге уже у молодых особей (возраст 1–3 мес.), эффект сохраняется и у взрослых (возраст 6–12 мес.). При этом, как заметили авторы работы [56], мыши страдают от двигательных нарушений в конечностях. Взятые у 7-дневных мышей клетки гранулярных нейронов мозжечка характеризовались сниженным образованием конститутивно секретируемых sAPPα и рилина (до 80% от нормального уровня). В мозге таких особей уровень ФХ увеличивался до 120% от нормальных значений [55].

В периферической нервной системе белок PNPLA6 обнаружен в аксонах, а также в зрелых немиелинизирующих и миелинизирующих шванновских клетках. Белок локализован вокруг ядра. Нормальный *Pnpla6* не влияет на образование миелиновой оболочки вокруг отростков нервных клеток в периферической нервной системе, но важен для образования шванновской оболочки (Remak bundles) вокруг немиелинизированных нервных волокон (Remak fibers). Дефицит PNPLA6 в немиелинизирующих шванновских клетках способствует неполному обертыванию нервных волокон и индуцирует их дегенерацию. При повреждении нервного волокна значительно усиливается экспрессия *Pnpla6* в шванновских клетках, что может играть роль в демиелинизации и защитных функциях периферической глии [57].

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ *PNPLA6* У ЧЕЛОВЕКА

Согласно транскриптомным данным мРНК гена *PNPLA6* найдена практически во всех тканях человека [58]. Эстеразная активность PNPLA6 обнаружена помимо нервной ткани в лимфоцитах [59] и тромбоцитах [60], плаценте [61], фибробластах [62].

Ингибирование продукта гена *PNPLA6*, наблюдающееся у отравившихся TOCP, приводит к развитию синдрома OPIDN, характеризующегося дегенерацией длинных аксонов моторных нейронов в пирамидном тракте спинного мозга. В меньшей степени страдают сенсорные нейроны. Это вызывает спастичность, поражающую нижние конечности сильнее, чем верхние.

Рецессивные мутации в гене *PNPLA6* в состоянии гомозиготы или транс-дигетерозиготного компаунда приводят к различным нейродегенеративным заболеваниям. При этом могут погибать нейроны спинного мозга, мозжечка, гипофиза, фоторецепторные клетки. Это, в свою очередь, вызывает спастичность, атаксию, гипогонадотропный гипогонадизм, пигментный ретинит, хориоретинальную дистрофию. Более подробно роль гена *PNPLA6* в нейропатологиях человека описана в нашем обзоре [63].

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *PNPLA6*

Обнаружение заболеваний, ассоциированных с мутациями в гене *PNPLA6*, инициировало ряд исследований по изучению функций “мутантных” белков. Например, короткий белок PNPLA6^{D376GfsX18}, образующийся вследствие инсерции *c2494_2495InsTGTGGGCCTGGGG* у паци-

ентов с синдромом Gordon Holmes [23], не является функциональным. Экспрессия соответствующего гена у мух-мутантов *sws*[1] не улучшала ни один из показателей: долю полостей в мозге мух, параметры реакции быстрого фототаксиса, уровень ФХ или лизоФХ [64].

Эксперименты по восстановлению эмбриогенеза *Danio rerio* с нокдауном гена *pnpla6*, индуцированным с помощью введения морфолиновых олигонуклеотидов, показали, что человеческая мРНК *PNPLA6* дикого типа почти полностью восстанавливает морфологию личинок, в отличие от мутантных мРНК, ведущих к заменам в белке, встречающимся у пациентов с синдромами Oliver–McFarlane/Laurence–Moon. Наблюдаемые явления подтверждают негативное влияние указанных мутаций на функциональную состоятельность белка PNPLA6 [29].

Оказалось, что мутации, обнаруженные у пациентов с различными *PNPLA6*-ассоциированными заболеваниями, по-разному влияют на функции белка. Для проведения исследования анализировали гены, приводящие к заменам в нуклеотид-связывающих доменах ($L^{524}P$, $G^{578}W$, $T^{629}R$) или в эстеразном домене ($A^{1029}T$, $R^{1099}Q$). Чтобы изучить свойства дефектных вследствие мутаций белков, экспрессировали соответствующие генетические конструкции у мух, имеющих мутацию *sws*[1]. Чтобы получить одинаковый уровень экспрессии конструкций, трансгенез проводили с помощью интегразы PhiC31, а затем подтверждали равенство уровней белка в тканях головы с помощью Вестерн-блоттинга. Оказалось, что белки с заменами $L^{524}P$ и $G^{578}W$, по-видимому, менее стабильны, так как экспрессия соответствующих генов не приводила к образованию того же уровня белка, что и в других вариантах [64].

Для изучения биологических функций различных вариантов PNPLA6 использовали систему UAS-GAL4: в нейронах (с помощью драйвера *Appl-GAL4*) у мутантных мух (*sws*[1]) экспрессировали варианты гена человека (*UAS-PNPLA6*). Расщепляющий ФХ SWS не способен эффективно делать это в случае мутации *sws*[1]. При этом экспрессия ни нормального аллеля *PNPLA6*, ни какого-либо из исследованных мутантных аллелей не ведет к нормализации уровня ФХ у мух, возраст которых составил 3–5 дней. Однако иная картина обнаруживается с другим субстратом SWS – лизоФХ. Если нормальный аллель *PNPLA6* возвращает уровень лизоФХ к норме у мух того же возраста, то ни один из изученных мутантных аллелей делать это не способен. При этом 7-дневные мухи с экспрессией какого-либо из мутантных вариантов *PNPLA6* имеют нормальную или близкую к нормальной локомоторную активность в тесте на фототаксис. Но у 14-дневных мух ни аллель дикого типа, ни мутантные аллели *PNPLA6* не способны восстановить поведение мух до нормального. Тем не менее экспрессия гена дикого типа или дефектных по фосфолипазному домену вариантов “спасает” мух от нейродегенерации, характерной для мутанта *sws*[1]. Кроме того, если экспрессировать “мутантные” конструкции в глиальных клетках (с помощью драйвера *loco-GAL4*), то поведение таких мух в тесте на фототаксис не отличается от поведения контрольных особей [64].

Результаты этих экспериментов показывают, что нормальная функция SWS зависит как от эстеразного, так и от нуклеотид-связывающего участка и в первую очередь связана с расщеплением лизоФХ. Нормальный аллель *PNPLA6* способствует восстановлению к норме как поведения, так и морфологии мозга. Мутантные аллели *PNPLA6* не способны восстанавливать ни уровень лизоФХ на фоне дисфункции *sws*, ни поведение у 14-дневных особей; они по-нейродегенерации в мозге. Известно уже множество мутаций, связанных с различными *PNPLA6*-ассоциированными синдромами у человека, и не замечено корреляции клинической симптоматики и локализации мутации. Авторы обсуждаемой статьи предполагают, что отличия в клинических проявлениях мутаций *PNPLA6* вообще связаны с влиянием генетического фона, а не с вариабельностью функций белка в зависимости от поражения нуклеотид-связывающего или эстеразного домена [64].

Результаты другого исследования, в котором анализировали эстеразную активность в фибробластах, полученных от пациентов с различными *PNPLA6*-ассоциированными заболеваниями, предлагают к рассмотрению альтернативную гипотезу. Полученные значения активности PNPLA6 в фибробластах разделили на четыре группы, сделав вывод, что разные мутации по-разному влияют на функцию белка [29]. Возможно, из-за разной чувствительности к дисфункции PNPLA6 у пациентов страдают разные клетки (чем сильнее снижение эстеразной функции, тем больше клеток погибает). А значит, развиваются разные синдромы. Однако эта любопытная гипотеза еще нуждается в тщательной экспериментальной проверке.

Так, в одной из работ изучали влияние мутаций *PNPLA6* на эстеразную активность фермента в первичных культурах фибробластов, полученных от пациентов с наследственной спастической параплегией (тип SPG39) или их родственников [62]. Рецессивные гомозиготы, имеющие замену $M^{1012}V$, и гетерозиготные компаунды с заменой

$R^{890}H$ и нарушенной структурой белка из-за инсерции *c2946_2947InsCAGC* имели сниженную эстеразную активность на 59–65% по сравнению с клетками, имеющими хотя бы один нормальный аллель *PNPLA6*. Однако снижения эстеразной активности, как оказалось, недостаточно для развития заболевания. Так, еще большее снижение эстеразной активности обнаружено в фибробластах двух здоровых взрослых родственников пациентов, гетерозиготных носителей аллеля *c2946_2947InsCAGC* [62]. Это свидетельствует о неоднозначности связи клинических проявлений, эстеразной активности, локализации мутации в гене *PNPLA6*. А значит, несмотря на многочисленные исследования, мы еще далеки от понимания механизмов развития *PNPLA6*-ассоциированных патологий, роли этого гена (и его ортологов) в функционировании разных структур нервной системы и поддержании жизнеспособности нервных и глиальных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За прошедшие 100 лет, с рождения Сеймура Бензера, генетика человека и животных чрезвычайно преобразилась. Казавшаяся когда-то невероятной расшифровка геномов многих видов значительно упростила и конкретизировала общее представление о наследственной информации, определяющей различные, в том числе и поведенческие, свойства организма. Исследования конкретных генов, обнаруженных вследствие изучения мутантов, позволили описать многообразные функции, находящиеся под контролем изучаемых генов, на клеточном и молекулярном уровнях, и связать эти дискретные единицы наследственности с поведенческими признаками.

На частном примере исследований гена *sws* (открытого благодаря новаторским подходам С. Бензера и М. Хайзенберга), а также его ортологов, выявляются успехи и проблемы современной нейрогенетики, а также прослеживается история ее развития. Ортолог гена *sws* впервые был открыт у курицы [65], а затем у человека [66–68] в ходе токсикологических исследований третьей четверти XX в. [34]. Позднее, к концу XX в., описан ген *sws* у дрозофил, полученных в скрининге нейродегенеративных мутантов [19]. И вскоре обнаружены несколько ортологов у кишечной палочки, микобактерии, дрожжей, нематоды; показана их эволюционная консервативность [69]; а затем исследован ортолог у мыши [22]. Оказалось, что эти гены контролируют функцию фосфолипазы Б и именно ее дефицит ответствен за наблюдаемые нейродегенеративные фенотипы. Однако более подробное исследование структуры белка выявило еще и необычную роль нуклеотид-связывающего домена как в реализации эстеразной активности, так и в развитии нейродегенерации. Таким образом, соотнесение структуры белка с его функциями выявило, как минимум, роль метаболизма фосфатидилхолина в поддержании жизнеспособности нервных клеток. В 2008 г. открыто первое наследственное заболевание, ассоциированное с ортологом *sws* у человека [70]. А в последующее десятилетие, благодаря внедрению геномных исследований в медицину, обнаружено еще несколько подобных синдромов [63]. Это, во-первых, способствовало более тонкому изучению функциональной структуры соответствующего белка и, во-вторых, открыло его роль в нескольких отделах нервной системы человека. Исследования дрозофилы и мыши помогли открыть типы клеток нервной системы, нуждающиеся в нормальной работе *sws/Pnpla6*: как нервных, так и глиальных [51, 57]. Так, анализ морфологии чувствительных к дисфункции гена клеток привел к установлению связи различных клеточных популяций с контролем некоторых особенностей поведения. Наконец, проведены исследования, касающиеся ответа клетки на дисфункцию гена *sws*, и предложен механизм как генетического, так и фармакологического вмешательства для подавления характерных патогенных процессов [43]. Значит, открываются перспективы для лечения редких наследственных заболеваний человека, связанных с геном *PNPLA6*. Это становится особенно актуально в связи с тем, что функции *sws* и его ортологов позволили открыть нейропатические свойства целого ряда токсичных фосфорорганических соединений, используемых в качестве пестицидов или рассматриваемых как потенциальное химическое оружие [33, 34, 66].

Как мы видим, редукционистский подход к изучению нейрогенетики оказался чрезвычайно плодотворным. Многие вопросы, однако, остаются по-прежнему открытыми и возникают новые проблемы, требующие решения. В частности, не расшифрованы механизмы регуляции экспрессии гена *sws* (и его ортологов); не выявлены все молекулярные события, происходящие при дисфункции этих генов; неизвестна реакция всех типов клеток организма на нарушение функции генов; неизвестны причины гибели клеток; не ясно, какие именно нарушения в работе гена достаточны для развития патологии. Эти и другие вопросы ожидают дальнейших исследований.

Но еще более важно понимание работы генома как целого функционального комплекса. Ведь показано, что дисфункция гена *sws* плейотропно

влияет на различные процессы в клетке, а также действует на проявление работы других генов. Кроме того, разные клетки организма по-разному чувствительны к дисфункции *sws*, вероятно, в силу отличий на уровне реализации генетической информации из-за дифференцированности клеточных популяций. Есть и тысячи других генов, экспрессия которых необходима для работы нервной системы. Это означает, что нейрогенетику ждут в будущем новые принципиальные изменения. Требуется применение холистического подхода для интеграции полученных частных знаний о функциях конкретных генов, роли конкретных клеток в реализации той или иной формы поведения. Методы биоинформатики, системной биологии и компьютерного моделирования, возможно, смогут помочь в решении таких задач.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90148.

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. *Harris W.A.* Seymour Benzer 1921–2007 the man who took us from genes to behaviour // PLoS Biol. 2008. V. 6. № 2. P. e41. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060041
2. *Jan Y.N., Jan L.* Seymour Benzer (1921–2007) // Science. 2008. V. 319. № 5859. P. 45. https://doi.org/10.1126/science.1154050
3. *Dudai Y.* Seymour Benzer (1921–2007) // Neuron. 2008. V. 57. № 1. P. 24–26. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.12.01
4. *Tanouye M.A.* Seymour Benzer 1921–2007 // Nat. Genet. 2008. V. 40. № 2. P. 121. https://doi.org/10.1038/ng0208-121
5. *Anderson D., Brenner S.* Seymour Benzer (1921–2007) // Nature. 2008. V. 451. № 7175. P. 139. https://doi.org/10.1038/451139a
6. *Greenspan R.J.* The origins of behavioral genetics // Curr. Biol. 2008. V. 18. № 5. P. R192–R198. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.015
7. *Hirsch J., Boudreau J.C.* Studies in experimental behavior genetics: I. The heritability of phototaxis in a population of *Drosophila melanogaster* // J. Comparative and Physiol. Psychology. 1958. V. 51. № 6. P. 647–651. https://doi.org/10.1037/h0039498
8. *Scott J.P.* Effects of single genes on the behavior of *Drosophila* // The Am. Naturalist. 1943. V. 77. № 769. P. 184–190.
9. *Benzer S.* Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1967. V. 58. № 3. P. 1112. https://doi.org/10.1073/pnas.58.3.1112
10. *Alderson T.* Chemically induced delayed germinal mutation in *Drosophila* // Nature. 1965. V. 207. № 4993. P. 164–167. https://doi.org/10.1038/207164a0
11. *Lewis E.B., Bacher F.* Method of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males // Dros. Inf. Serv. 1968. V. 43. № 193. P. 193.
12. *Лобашев М.Е.* Сигнальная наследственность // Сб. исследований по генетике. Вып. 1. Л.: Изд-во ЛГУ, 1961. С. 3–11.
13. *Лопатина Н.Г.* М.Е. Лобашев и новые главы в науке – биология, физиология и генетика условного рефлекса // Экол. генетика. 2007. Т. 5. № 4. С. 5–10. https://doi.org/10.17816/ecogen545-10
14. *Савватеева-Попова Е.В., Никитина Е.А., Медведева А.В.* От нейрогенетики к нейроэпигенетике // Генетика. 2015. Т. 51. № 5. С. 613–624. https://doi.org/10.1134/S1022795415050075
15. *Hotta Y., Benzer S.* Genetic dissection of the *Drosophila* nervous system by means of mosaics // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1970. V. 67. № 3. P. 1156–1163. https://doi.org/10.1073/pnas.67.3.1156
16. *Heisenberg M.A., Böhl K.* Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means // Zeitschrift für Naturforschung C. 1979. V. 34. № 1–2. P. 143–147.
17. *Coombe P.E., Heisenberg M.* The structural brain mutant *Vacuolar medulla* of *Drosophila melanogaster* with specific behavioral defects and cell degeneration in the adult // J. Neurogenetics. 1986. V. 3. № 3. P. 135–158. https://doi.org/10.3109/01677068609106845
18. *Heisenberg M.* Mutants of brain structure and function: what is the significance of the mushroom bodies for behavior? // Development and Neurobiol. *Drosophila*. Boston, MA: Springer, 1980. P. 373–390.
19. *Kretzschmar D., Hasan G., Sharma S. et al.* The *swiss cheese* mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* // J. Neuroscience. 1997. V. 17. № 19. P. 7425–7432. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-19-07425.1997
20. *Ayyub C., Paranjape J., Rodrigues V., Siddiqi O.* Genetics of olfactory behavior in *Drosophila melanogaster* // J. Neurogenetics. 1990. V. 6. № 4. P. 243–262. https://doi.org/10.3109/01677069009107114
21. *Hasan G.* Molecular cloning of an olfactory gene from *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 22. P. 9037–9041. https://doi.org/10.1073/pnas.87.22.9037

22. *Moser M., Stempfl T., Li Y. et al.* Cloning and expression of the murine *sws/NTE* gene // Mechanisms of Development. 2000. V. 90. № 2. P. 279–282. https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00239-7

23. *Topaloglu A.K., Lomniczi A., Kretzschmar D. et al.* Loss-of-function mutations in *PNPLA6* encoding neuropathy target esterase underlie pubertal failure and neurological deficits in Gordon Holmes syndrome // The J. Clin. Endocrinology & Metabolism. 2014. V. 99. № 10. P. E2067–E2075. https://doi.org/10.1210/jc.2014-1836

24. *Mühlig-Versen M., Da Cruz A.B., Tschäpe J.A. et al.* Loss of Swiss cheese/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult *Drosophila* // J. Neuroscience. 2005. V. 25. № 11. P. 2865–2873. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5097-04.2005

25. *Da Cruz A.B., Wentzell J., Kretzschmar D.* Swiss Cheese, a protein involved in progressive neurodegeneration, acts as a noncanonical regulatory subunit for PKA-C3 // J. Neuroscience. 2008. V. 28. № 43. P. 10885–10892. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3015-08.2008

26. *Kmoch S., Majewski J., Ramamurthy V. et al.* Mutations in *PNPLA6* are linked to photoreceptor degeneration and various forms of childhood blindness // Nat. Communications. 2015. V. 6. № 1. P. 1–10. https://doi.org/10.1038/ncomms6614

27. https://www.uniprot.org/uniprot/Q9U969

28. *Sujkowski A., Rainier S., Fink J.K., Wessells R.J.* Delayed induction of human *NTE* (*PNPLA6*) rescues neurodegeneration and mobility defects of *Drosophila swiss cheese* (*sws*) mutants // PLoS One. 2015. V. 10. № 12. P. e0145356. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145356

29. *Hufnagel R.B., Arno G., Hein N.D. et al.* Neuropathy target esterase impairments cause Oliver–McFarlane and Laurence–Moon syndromes // J. Med. Genet. 2015. V. 52. № 2. P. 85–94. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102856

30. *Greenfield J.G., Aring C.D.* The Spino-Cerebellar Degenerations // Ed. Charles D. Aring. Blackwell Sci. Publ., 1954. 112 p.

31. *Johnson M.K.* The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase // Biochemical J. 1969. V. 114. № 4. P. 711–717. https://doi.org/10.1042/bj1140711

32. *Behan W.M.H., Maia M.* Strümpell's familial spastic paraplegia: genetics and neuropathology // J. Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 1974. V. 37. № 1. P. 8–20. https://doi.org/10.1136/jnnp.37.1.8

33. *Richardson R.J., Fink J.K., Worden R.M. et al.* Neuropathy target esterase as a biomarker and biosensor of delayed neuropathic agents // Handbook of Toxicology of Chem. Warfare Agents. Acad. Press. 2020. P. 1005–1025.

34. *Richardson R.J., Fink J.K., Glynn P. et al.* Neuropathy target esterase (NTE/PNPLA6) and organophosphorus compound-induced delayed neurotoxicity (OPIDN) // Adv. Neurotoxicology. 2020. V. 4. P. 1. https://doi.org/10.1016/bs.ant.2020.01.001

35. *Quistad G.B., Barlow C., Winrow C.J. et al.* Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 13. P. 7983–7987. https://doi.org/10.1073/pnas.1232473100

36. *van Tienhoven M., Atkins J., Li Y., Glynn P.* Human neuropathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids // J. Biol. Chemistry. 2002. V. 277. № 23. P. 20942–20948. https://doi.org/10.1074/jbc.M200330200

37. *Wentzell J.S., Cassar M., Kretzschmar D.* Organophosphate-induced changes in the PKA regulatory function of Swiss Cheese/NTE lead to behavioral deficits and neurodegeneration // PLoS One. 2014. V. 9. № 2. P. e87526. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087526

38. *Cassar M., Sunderhaus E., Wentzell J.S. et al.* The PKA-C3 catalytic subunit is required in two pairs of interneurons for successful mating of *Drosophila* // Sci. Reports. 2018. V. 8. № 1. P. 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20697-3

39. *Li Y., Dinsdale D., Glynn P.* Protein domains, catalytic activity, and subcellular distribution of neuropathy target esterase in mammalian cells // J. Biol. Chemistry. 2003. V. 278. № 10. P. 8820–8825. https://doi.org/10.1074/jbc.M210743200

40. *Zaccheo O., Dinsdale D., Meacock P.A., Glynn P.* Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells // J. Biol. Chemistry. 2004. V. 279. № 23. P. 24024–24033. https://doi.org/10.1074/jbc.M400830200

41. *Chang P., He L., Wang Y. et al.* Characterization of the interaction of neuropathy target esterase with the endoplasmic reticulum and lipid droplets // Biomolecules. 2019. V. 9. № 12. P. 848. https://doi.org/10.3390/biom9120848

42. *Forshaw P.J., Atkins J., Ray D.E., Glynn P.* The catalytic domain of human neuropathy target esterase mediates an organophosphate-sensitive ionic conductance across liposome membranes // J. Neurochemistry. 2001. V. 79. № 2. P. 400–406. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00562.x

43. *Sunderhaus E.R., Law A.D., Kretzschmar D.* ER responses play a key role in Swiss-Cheese/Neuropathy Target Esterase-associated neurodegeneration // Neurobiol. Disease. 2019. V. 130. P. 104520. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104520

44. *Mohylyak I.I., Matiytsiv N.P., Hrunyk N.I., Chernyk Y.I.* Sensitivity of neurodegenerative mutants of *Drosophila melanogaster* from *Swiss cheese* group to the oxidative stress conditions // Biopolymers & Cell. 2011. V. 27. № 6.

45. *Ryabova E., Matiytsiv N., Trush O. et al. Swiss cheese, Drosophila* ortholog of hereditary spastic paraplegia gene *NTE*, maintains neuromuscular junction develop-

ment and microtubule Network // *Drosophila melanogaster* – Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics. In Tech. 2018. P. 209–225. https://doi.org/10.5772/intechopen.73077

46. *Ayyub C., Paranjape J.* Genetic interactions provide evidence for the role of integrins in specifying normal olfactory behavior in *Drosophila melanogaster* // J. Neurogenetics. 2002. V. 16. № 3. P. 165–174. https://doi.org/10.1080/01677060215308
47. *Krishnan N., Rakshit K., Chow E.S. et al.* Loss of circadian clock accelerates aging in neurodegeneration-prone mutants // Neurobiol. Disease. 2012. V. 45. № 3. P. 1129–1135. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.034
48. *Chen R., Chang P.A., Long D.X. et al.* Down-regulation of neuropathy target esterase by protein kinase C activation with PMA stimulation // Mol. Cell. Biochemistry. 2007. V. 302. № 1–2. P. 179–185. https://doi.org/10.1007/s11010-007-9439-0
49. http://flybase.org/reports/FBgn0003656
50. http://flyatlas.gla.ac.uk/FlyAtlas2
51. *Dutta S., Rieche F., Eckl N. et al.* Glial expression of Swiss cheese (SWS), the *Drosophila* orthologue of neuropathy target esterase (NTE), is required for neuronal ensheathment and function // Disease Models & Mechanisms. 2016. V. 9. № 3. P. 283–294. https://doi.org/10.1242/dmm.022236
52. *Tinette S., Zhang L., Robichon A.* Cooperation between *Drosophila* flies in searching behavior // Genes, Brain and Behavior. 2004. V. 3. № 1. P. 39–50. https://doi.org/10.1046/j.1601-183x.2003.0046.x
53. *Winrow C.J., Hemming M.L., Allen D.M. et al.* Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity // Nat. Genet. 2003. V. 33. № 4. P. 477–485. https://doi.org/10.1038/ng1131
54. *Moser M., Li Y., Vaupel K. et al.* Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice // Mol. Cell. Biology. 2004. V. 24. № 4. P. 1667–1679. https://doi.org/10.1128/mcb.24.4.1667-1679.2004
55. *Read D.J., Li Y., Chao M.V. et al.* Neuropathy target esterase is required for adult vertebrate axon maintenance // J. Neuroscience. 2009. V. 29. № 37. P. 11594–11600. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3007-09.2009
56. *Akassoglou K., Malester B., Xu J. et al.* Brain-specific deletion of *neuropathy target esterase/swiss cheese* results in neurodegeneration // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 14. P. 5075–5080. https://doi.org/10.1073/pnas.0401030101
57. *McFerrin J., Patton B.L., Sunderhaus E.R., Kretzschmar D.* NTE/PNPLA6 is expressed in mature Schwann cells and is required for glial ensheathment of Remak fibers // Glia. 2017. V. 65. № 5. P. 804–816. https://doi.org/10.1002/glia.23127
58. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10908.
59. *Bertoncin D., Russolo A., Caroldi S., Lotti M.* Neuropathy target esterase in human lymphocytes // Archiv. Environmental Health: An Intern. J. 1985. V. 40. № 3. P. 139–144. https://doi.org/10.1080/00039896.1985.10545905
60. *Maroni M., Bleecker M.L.* Neuropathy target esterase in human lymphocytes and platelets // J. Applied Toxicol. 1986. V. 6. № 1. P. 1–7. https://doi.org/10.1002/jat.2550060102
61. *Williams D.G.* Intramolecular group transfer is a characteristic of neurotoxic esterase and is independent of the tissue source of the enzyme. A comparison of the aging behaviour of di-isopropyl phosphorofluoridate-labelled proteins in brain, spinal cord, liver, kidney and spleen from hen and in human placenta // Biochemical J. 1983. V. 209. № 3. P. 817–829.
62. *Hein N.D., Rainier S.R., Richardson R.J., Fink J.K.* Motor neuron disease due to neuropathy target esterase mutation: Enzyme analysis of fibroblasts from human subjects yields insights into pathogenesis // Toxicol. Letters. 2010. V. 199. № 1. P. 1–5. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.06.020
63. *Melentev P.A., Agranovich O.E., Sarantseva S.V.* Human diseases associated with *NTE* gene // Ecol. Genet. 2020. V. 18. № 2. P. 229–242. https://doi.org/10.17816/ecogen16327
64. *Sunderhaus E.R., Law A.D., Kretzschmar D.* Disease-associated *PNPLA6* mutations maintain partial functions when analyzed in *Drosophila* // Frontiers in Neurosci. 2019. V. 13. P. 1207. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01207
65. *Johnson M.K.* Organophosphorus and other inhibitors of brain 'neurotoxic esterase' and the development of delayed neurotoxicity in hens // Biochemical J. 1970. V. 120. № 3. P. 523–531. https://doi.org/10.1042/bj1200523
66. *Johnson M.K.* Organophosphorus esters causing delayed neurotoxic effects: mechanism of action and structure activity studies // Archiv. Toxicology. 1975. V. 34. № 4. P. 259–288. https://doi.org/10.1007/BF00353848
67. *Lotti M., Johnson M.K.* Neurotoxicity of organophosphorus pesticides: Predictions can be based on in vitro studies with hen and human enzymes // Archiv. Toxicology. 1978. V. 41. № 3. P. 215–221. https://doi.org/10.1007/BF00354093
68. *Hierons R., Johnson M.K.* Clinical and toxicological investigations of a case of delayed neuropathy in man after acute poisoning by an organophosphorus pesticide // Archiv. Toxicology. 1978. V. 40. № 4. P. 279–284. https://doi.org/10.1007/BF00310333
69. *Lush M.J., Li Y., Read D.J. et al.* Neuropathy target esterase and a homologous *Drosophila* neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man // Biochemical J. 1998. V. 332. № 1. P. 1–4. https://doi.org/10.1042/bj3320001
70. *Rainier S., Bui M., Mark E. et al.* Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease // The Am. J. Hum. Genet. 2008. V. 82. № 3. P. 780–785. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.12.018

A Private History of Neurogenetics: The *swiss cheese* Gene and Its Orthologs

P. A. Melentev[a], E. V. Ryabova[a], and S. V. Sarantseva[a, *]

[a] *Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Center "Kurchatov Institute", Leningrad oblast, Gatchina, 188300 Russia*

**e-mail: Sarantseva_SV@pnpi.nrcki.ru*

One of genetic problems is devoted to the role of heredity in determination of behavioral traits of humans and animals. As it was believed for many years, behavior is determined by both the environment and the pleiotropic action of many genes, and therefore discrete hereditary factors of behavior are elusive. The purposeful obtaining and study of behavior-altered mutants in *Drosophila*, launched more than half a century ago by Seymour Benzer, laid the foundation of the direction called neurogenetics. Further establishment of connection between mutations and various phenotypes made it possible to reveal genes' role in the determination of functions of the nervous system and in the corresponding regulation of behavior. Among many genes discovered by Seymour Benzerand his followers, in particular Martin Heisenberg, in the course of research on *Drosophila* mutants is the *swiss cheese* gene, which regulates viability of neurons and glial cells. Numerous studies of this evolutionary conservative gene and its orthologues, prompted by interest to analysis of genetic control of viability of nervous tissue cells, deciphering the biological mechanisms organophosphate poisons action, and studies of some hereditary human syndromes have made it possible to identify aspects of the *swiss cheese* gene and its orthologues role in cell metabolism, functioning of the nervous system, regulating behavior.

Keywords: neurogenetics, *swiss cheese*, *NTE*, *PNPLA6*, Seymour Benzer, neurodegeneration.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1121–1130

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 616.151.514

ГЕМОФИЛИЯ В ЛЕЙДЕН: ЛИТЕРАТУРНЫЕ И СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

© 2021 г. Т. С. Бескоровайная[1, *], В. В. Забненкова[1], Р. А. Зинченко[1], О. А. Щагина[1], А. В. Поляков[1]

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

*e-mail: t-kovalevskaya@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.11.2020 г.
После доработки 29.01.2021 г.
Принята к публикации 11.02.2021 г.

Гемофилия В – это моногенное Х-сцепленное рецессивное заболевание, связанное с нарушением свертываемости крови, вызванное мутациями в гене фактора свертывания IX (*F9*). Описана необычная форма данного заболевания “гемофилия В Лейден”, обусловленная мутациями в промоторной области гена *F9*, при которой происходит значительное, (до нормальных значений), увеличение фактора IX в плазме после полового созревания больного. Мутации в промоторе группируются в дискретных участках связывания транскрипционных факторов и по-разному изменяют экспрессию гена *F9* в процессе развития. Данное заболевание иллюстрирует, как однонуклеотидные патогенные варианты в цис-регуляторных регионах могут оказывать радикальное воздействие на экспрессию генов. В статье представлены современные данные о структуре промотора гена *F9* и результаты обследования трех пациентов с гемофилией В Лейден, проходивших генетическое тестирование в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ “МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова”.

Ключевые слова: гемофилия В, ген *F9*, промотор, мутация.

DOI: 10.31857/S0016675821100039

Гемофилия В (MIM 306900) – это Х-сцепленное рецессивное заболевание, при котором происходит нарушение свертываемости крови. Его частота составляет 1 : 30000 мужчин [1]. Различают легкую степень гемофилии В – уровень фактора IX в плазме составляет 5–40%, среднюю степень тяжести – 1–5% и тяжелую – менее 1% (https://www.ehc.eu/ru/). Заболевание обусловлено мутациями гена *F9*, которые влияют на экспрессию или функцию фактора свертывания крови IX (фактор Кристмаса). Фактор IX – это витамин К-зависимая сериновая протеаза, которая совместно с кофактором – фактором VIII участвует во внутреннем пути коагуляции, активируя фактор X. Ген *F9* (MIM 300746) локализован на длинном плече хромосомы X в локусе Xq27. Белок синтезируется в печени [2], после чего подвергается множественным посттрансляционным модификациям [3, 4]. Известно, что в норме у плода до 20-й нед. гестации количество мРНК и белка фактора IX составляет <10% от уровня взрослого человека [5]. В постнатальный период уровень FIX составляет 50%, а в раннем детстве – 75% от показателей у взрослых [6]. Следующее значительное повышение содержания фактора IX в плазме наблюдается у человека после полового созревания, когда у обоих полов зафиксировано увеличение экспрессии на 25% [6, 7].

В настоящее время нумерация нуклеотидов гена *F9*, согласно рекомендациям HGVS (https://varnomen.hgvs.org/), начинается со стартового кодона трансляции, однако ранее нумерация велась от основного стартового сайта транскрипции (major transcription start site, TSS), который находится на 29 нуклеотидов ранее стартового кодона ATG. Соответственно данные 29 нуклеотидов теперь включены в промоторную некодирующую область, что необходимо учитывать при изучении ранней литературы, посвященной гену *F9*.

В 1970 г. в городе Лейден (Нидерланды) была описана необычная форма гемофилии В [8]. Этот подтип заболевания, получивший название “гемофилия В Лейден”, имеет некоторую особенность клинического течения. У больных мальчиков в возрасте до 15 лет отмечается значительное снижение уровня фактора IX:C в плазме (≤1–10%), а после пубертатного периода уровень данного фактора восстанавливается со скоростью около 5% в год практически до нормальных значений (максимально до 40–80%) [9–11]. Клиническое течение заболевания в детстве может быть как мягким, умеренным, так и тяжелым, приводящим к

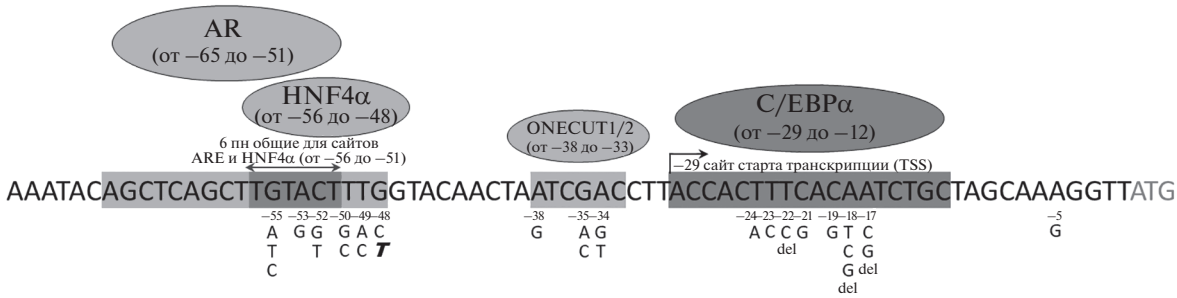

Рис. 1. Патогенные варианты в промоторе гена *F9*, описанные в базах “The Human Gene Mutation Database”, “Factor IX Gene Variant Database”, “CHBMP”. Курсивом выделена неописанная нуклеотидная замена, выявленная в данном исследовании.

частым кровотечениям, гемартрозам, и может требовать заместительной терапии. На сегодняшний день зарегистрировано более 100 случаев гемофилии В Лейден [12].

При секвенировании кодирующей последовательности гена *F9*, сайтов сплайсинга и регуляторных областей у больных из семей с Лейден-подобными симптомами гемофилии В были выявлены точковые мутации в области промотора данного гена [9, 13–21]. В базах “The Human Gene Mutation Database”, “Factor IX Gene Variant Database” и “CHBMP” всего зарегистрировано 30 патогенных вариантов промотора гена *F9*. Данные варианты сгруппированы в три кластера: один в области с.–55–48 пн, второй – с.–38–34 пн и третий – с.–24–17 пн выше стартового кодона трансляции (рис. 1). Эти участки были признаны потенциальными регуляторными элементами. Известно, что помимо основных факторов транскрипции, которые непосредственно связывают РНК-полимеразу с промотором рядом со стартовой точкой транскрипции, существуют транскрипционные факторы, которые называются активаторами. Они узнают определенные короткие консенсусные нуклеотидные последовательности промотора (элементы ответа) или энхансера и повышают эффективность связывания основного аппарата транскрипции с промотором, т.е. определяют частоту событий инициации транскрипции, поддерживая ее на адекватном уровне. Было выдвинуто предположение, что каждый кластер мутаций разрушает сайт связывания белка-активатора транскрипции и тем самым нарушает экспрессию гена *F9*, по крайней мере до наступления половой зрелости. Таким образом, результаты генетического тестирования пациентов с гемофилией В Лейден послужили важным материалом для изучения транскрипции в печени человека. Влияние выявленных у данных пациентов нуклеотидных замен в промоторе гена *F9* на его экспрессию изучалось с помощью функционального анализа *in vitro* на клеточных линиях HeLa и HepG2 и *in vivo* на трансгенных мышах [10, 22–25].

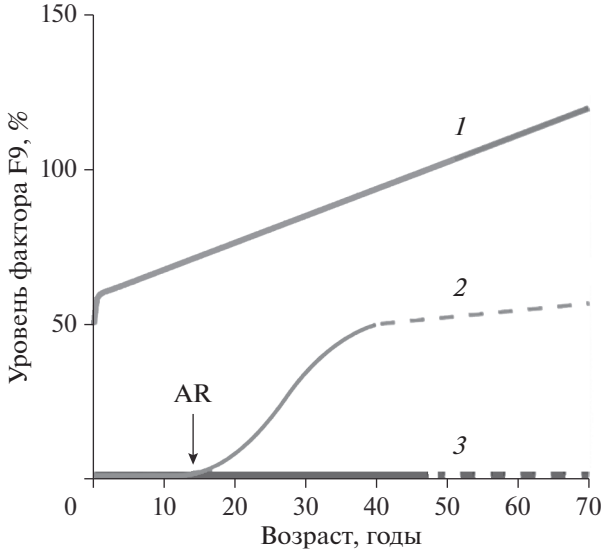

Рис. 2. Экспрессия гена *F9* в норме, у больных гемофилией В Лейден и гемофилией В Бранденбург [26]. У здоровых людей (линия *1*) уровень экспрессии гена *F9* постепенно растет в течение жизни. У больных гемофилией В Лейден (линия *2*) этот рост начинается только после полового созревания согласно одной из гипотез в связи с повышением активности экспрессии гена при связывании с сайтом тестостерон-зависимого фактора андрогеновых рецепторов (AR). У больных гемофилией В Бранденбург (линия *3*) такого роста не наблюдается и после полового созревания, так как данный сайт связывания поврежден. Пунктирные линии представляют собой экстраполяции из-за отсутствия доступных клинических данных.

Мутации в промоторе генов интересны тем, что демонстрируют, как изменения последовательности нуклеотидов в данной области могут приводить к глубоким нарушениям экспрессии генов в разные периоды развития организма. В частности, в случае гена *F9* экспрессия начинается только после полового созревания (рис. 2).

Поиск транскрипционных факторов, которые связываются с тремя функциональными цис-регуляторными элементами в промоторе гена *F9*, начался в конце 1980-х гг., когда были идентифицированы первые транскрипционные факторы млекопитающих. Ген *F9* экспрессируется преимущественно в гепатоцитах. Печень – большой и относительно однородный орган, поэтому она была подходящей моделью для ранних исследований по выделению и очистке транскрипционных факторов. Несколько исследовательских групп успешно идентифицировали и клонировали кДНК специфичных для печени ДНК-связывающих белков [27, 28]. Были определены консенсусные последовательности для этих факторов транскрипции и соответственно были идентифицированы некоторые кандидатные ДНК-связывающие белки, регулирующие экспрессию фактора IX.

Первым открытым белком-активатором гена *F9* был CCAAT/энхансер-связывающий белок α (C/EBPα), относящийся к транскрипционным факторам из группы “лейциновых молний”. Данный фактор связывается с сайтом TTGNNCAA, последовательность которого похожа на –24–17 регион промотора гена *F9* (рис. 1). После связывания с ДНК данный белок может индуцировать транскрипцию через свой активационный домен, взаимодействуя с компонентами основного аппарата транскрипции. Более поздние исследования на мышах, нокаутированных по C/EBPα, подтвердили, что данный фактор функционально необходим для нормального уровня экспрессии гена [29].

Далее был открыт ядерный фактор гепатоцитов 4α (HNF4α). Ген *HNF4A* клонирован в начале 1990-х гг. [28]. Было показано, что очищенный белок связывается с областью с.–56–48 промотора гена *F9* [22, 30], а известные мутации из данного региона нарушают это связывание и ингибируют трансактивацию посредством HNF4α. В настоящее время данный ядерный рецептор широко известен как главный регулятор дифференцировки печени, так как влияет на экспрессию большого количества специфичных для гепатоцитов генов.

Примерно в то же время исследователи начали изучать причину увеличения экспрессии гена *F9* у больных с гемофилией B Лейден после полового созревания. Систематизированный анализ пациентов с гемофилией B позволил выявить еще один подтип заболевания, получивший название “гемофилия B Бранденбург” [30]. Пациенты имели очень низкий уровень фактора IX, и геморрагические симптомы наблюдались на протяжении всей жизни. У данных пациентов были выявлены мутации в положении с.–55 (рис. 1) [12, 30–34], при которых, в отличие от других мутаций в промоторе *F9*, не происходит восстановления экспрессии гена в период полового созревания (рис. 2). Было отмечено, что данный регион промотора напоминает элемент андрогенного ответа (androgen response element, ARE), т.е. сайт связывания для транскрипционного фактора андрогенового рецептора (AR). Белок AR является транскрипционным фактором из семейства рецепторов стероидных гормонов. Он взаимодействует с последовательностями ДНК, соответствующими консенсусу ARE, и активирует транскрипцию в присутствии тестостерона. Было показано, что AR может связываться с областью вокруг позиции с.–55 и что мутации при гемофилии B Бранденбург нарушают данное связывание [30]. При этом пациенты с патогенными вариантами промотора гена *F9* в позициях с.–48–50, с.–38–34 и с.–24–17 действительно имели увеличение экспрессии фактора после полового созревания, так как ARE оставался интактным. Следует отметить, что сайты связывания факторов HNF4α и AR частично перекрываются (на протяжении шести нуклеотидов) (рис. 1). Таким образом, при гемофилии B Бранденбург повреждаются оба сайта связывания – для HNF4α и для AR, обусловливая такую форму гемофилии B, при которой не наблюдается улучшения клинической картины при воздействии тестостерона [33]. Отсутствие в базах данных описанных мутаций в позициях с.–57–65, вероятно, свидетельствует о несущественном влиянии на уровень экспрессии гена *F9* нуклеотидных замен в сайте связывания только андрогенового рецептора.

Гипотеза о влиянии половых гормонов на экспрессию гена *F9* была проверена на мышах [24]. Было выявлено, что у самцов линии Tfm, имеющих укороченный белок AR, не способный связываться с тестостероном, не происходит увеличения экспрессии фактора IX после полового созревания. В дальнейшем у человека важность сайта ARE в промоторе гена *F9* также подтвердилась. Было выявлено, что введение тестостерона подростку в пре-пубертатном возрасте с гемофилией B Лейден привело к увеличению уровня FIX:C [35]. Кроме того, в литературе описан случай, когда мужчина с гемофилией B Лейден использовал анаболические стероиды для увеличения мышечной массы, что побочно вызвало еще и повышение уровня FIX:C в плазме [36]. Однако после прекращения использования стероидов количество фактора IX у него снизилось. Данные наблюдения дают весомые аргументы в пользу причастности андрогенов к регуляции экспрессии гена *F9*.

В позициях с.–53 и с.–52, в которых также перекрываются сайты связывания AR и HNF4α, зарегистрированы еще три миссенс-мутации (рис. 1). К сожалению, у данных пациентов не было про-

ведено лонгитюдного наблюдения, поэтому невозможно сделать вывод о влиянии данных нуклеотидных вариантов на клиническое течение заболевания после полового созревания больного [12, 37]. Вместе с тем описан пациент с делецией c.–52del, которому диагноз гемофилия B был поставлен в возрасте трех лет, и уровень фактора FIX:C в его плазме был <1% [38]. После пубертатного периода качество жизни больного значительно улучшилось, FIX:C варьировал от 4 до 11%. Как ни странно, у его племянника с такой же мутацией, также страдающего гемофилией B (FIX:C < 1%), повышение уровня фактора IX не произошло [39]. Исходя их данного семейного случая, можно предположить, что дополнительные факторы – генетические, эпигенетические, факторы внешней среды – также могут влиять на симптомы и клиническую тяжесть гемофилии B Лейден.

Несколько позже был предложен другой механизм регуляции экспрессии фактора IX, обусловленный возрастом. Он был убедительно продемонстрирован в экспериментах Kurachi et al. на трансгенных мышах [25]. Согласно данной гипотезе, в регуляции задействован элемент возрастной стабильности (ASE, age-related stability element), расположенный в 5'-некодирующей области на расстоянии 831 нуклеотида (802 нуклеотидов согласно исторической номенклатуре) от промотора гена *F9*. В экспериментах было показано специфическое связывание ядерного белка ETS1 с данной областью. ETS1 является транскрипционным фактором, ранее известным своими протоонкогенными свойствами [40]. В исследованиях Kurachi et al. [25] была показана новая роль ETS1 в физиологической регуляции возрастной экспрессии генов. Связывание данного транскрипционного фактора с возрастным элементом стабильности обусловлено действием гормона роста (соматропином). Данное явление было продемонстрировано на мышах, которым хирургическим путем был резецирован гипофиз. Это позволило проанализировать прямое действие экзогенно вводимых гормонов и исключило возможность нисходящих эффектов, опосредованных другими гормональными путями. Было показано, что при введении дигидротестостерона или эстрадиола уровень FIX восстанавливался только на 10% от показателей до гипофизэктомии, однако при введении гормона роста этот уровень восстанавливался на 80%. Причем содержание фактора в плазме возрастало как у самцов, так и у самок. Таким образом, была установлена важная роль гормона роста в регуляции возраст-зависимой экспрессии гена *F9* независимо от пола. Результаты данных экспериментов на модельных животных в дальнейшем нашли свое подтверждение у женщин – носительниц мутаций гемофилии B Лейден. Например, была описана семья, в которой у двух девочек с неравной инактивацией хромосомы X, имеющих мутацию c.–22T>C в гетерозиготном состоянии, в возрасте 6 и 11 лет уровень фактора IX составлял 11 и 17% соответственно [41]. При этом у первой пациентки этот уровень увеличился к 16 годам до 21%, а у второй пациентки к 14 годам – до 35%. Нормализация уровня FIX:C наблюдалась и у двух носительниц мутации c.–35G>A из Ирландии [42]. Также было выявлено, что при серийном измерении количества фактора IX в группе детей с мутацией c.–35G>A в течение первых трех лет жизни наблюдается постепенное увеличение его содержания в плазме от значений, соответствующих тяжелой/среднетяжелой форме, до значений при мягкой форме гемофилии B [43]. Причем данное увеличение в столь раннем возрасте не может быть обусловлено андрогенами, а, вероятно, связано с постепенным повышением содержания гормона роста от низких значений в раннем детстве до максимальных пиковых значений в период полового созревания [44]. Несмотря на столь убедительные свидетельства в пользу данной гипотезы, на сегодняшний день ни одной мутации из области c.–831 не описано. Кроме того, гипотеза не объясняет отсутствия улучшения состояния у больных с гемофилией B Бранденбург.

Белок-активатор для третьего локуса, в котором располагается кластер мутаций (c.–38–34), искали в течение 20 лет. Мотивация для поиска этого белка была особенно сильной, потому что на долю этого кластера приходится около половины всех случаев гемофилии B Лейден [12, 31]. Кроме того, разные нуклеотидные замены на этом участке приводят к различной степени тяжести течения заболевания [10, 12, 14, 16]. Понимание данного механизма регуляции представляло большой интерес. Указанная область содержит динуклеотид CpG, который, как известно, является горячей мутационной точкой как в гене *F9*, так и в других локусах [45]. Загадка данного регуляторного участка промотора была решена одновременно двумя исследовательскими группами, которые совместно опубликовали свои результаты [46]. Данные метода ChIP-Seq для транскрипционного фактора ONECUT1 (также известного как ядерный фактор гепатоцитов 6, HNF6) позволили предположить его в качестве кандидатного белка для связывания с элементом c.–38–34 в промоторе *F9* [47]. Исследования показали, что ONECUT1 специфически связывается с областью c.–38–34 промотора *F9* в гепатоцитах человека [46] (рис. 1). Он также занимает проксимальный промотор гена *F9* в гепатоцитах мышей [48], а нокаутированные по ONECUT1 эмбрионы мышей имеют

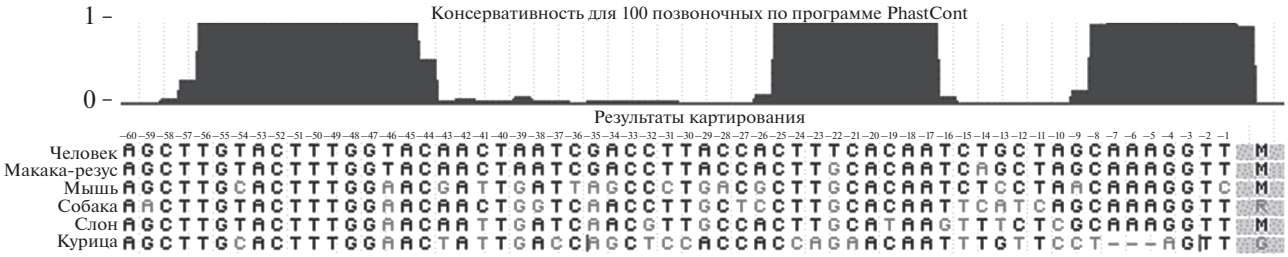

Рис. 3. Промоторная область гена *F9* у млекопитающих (https://genome.ucsc.edu). Пики отображают консервативность данных последовательностей, которые являются кандидатными сайтами связывания транскрипционных факторов.

пониженный уровень FIX [46]. Родственный фактор ONECUT2 тоже связывается с сайтом с.–34–38 *in vitro*, а исследования на эмбрионах мышей с двойным нокаутом *Onecut1/Onecut2* подтвердили, что при отсутствии обоих белков ген *F9* не транскрибируется [46].

В базе HGMD описан еще один патогенный вариант в позиции с.–5A>G у пациента с мягкой формой гемофилии В Лейден. Данный вариант не попадает ни в один из известных кластеров для транскрипционных факторов [49]. Кроме того, в базе Genome Aggregation Database (gnomAD, https://gnomad.broadinstitute.org) у одной женщины в промоторе гена *F9* в гетерозиготном состоянии встретилась нуклеотидная замена с.–4G>T (частота аллеля 0.0005%), у другой женщины – с.–3G>T (частота аллеля 0.0005%). Вероятно, они также являются патогенными и могут нарушать транскрипцию или процессинг РНК, тем не менее данных, подтверждающих их патогенность, на настоящий момент нет.

Существует предположение, что в природе могут встречаться нуклеотидные варианты в промоторной области гена *F9*, которые не имеют клинических проявлений [46]. Однако в выборке gnomAD, в которую включены результаты секвенирования 125748 экзомов и 15708 геномов людей без тяжелых патологий, в 5'-UTR области изучаемого гена не представлено ни одного частого полиморфизма, кроме упомянутых редких вариантов с.–3G>T и с.–4G>T. В базе dbSNP в промоторе *F9* зарегистрированы еще несколько вариантов с крайне низкой частотой альтернативного аллеля: с.–7A>T (rs1569481540), с.–13G>C (rs372382059), с.–15C>G (rs375594466), с.–19C>T (rs761036720), с.–39A>C (rs371045754), с.–41C>A (rs750827465), с.–44C>G (913707665), но для них не установлено клинического значения и не представлены данные о клиническом статусе людей, у которых они были выявлены. В выборке, включающей данные секвенирования 1223 экзомов пациентов, не страдающих коагулопатиями, обследованных в МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова, в промоторе гена *F9* ни одной нуклеотидной замены не обнаружено. Из этого можно предположить, что изучаемая область гена *F9* все же более консервативна, чем предполагалось. Это также подтверждается филогенетической консервативностью данной последовательности у разных видов млекопитающих (рис. 3).

В некоторых исследованиях было предсказано наличие еще одного сайта для связывания транскрипционных факторов в локусе с.–231–248, с которым в частности взаимодействует альбумин D-сайт-связывающий белок (DBP) и GA-связывающий белок (GABPα/β), которые также могут влиять на регуляцию экспрессии фактора IX после полового созревания [50, 51], хотя на сегодняшний день ни одной мутации из этой области не описано.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе проведено генетическое тестирование трех пациентов, имевших/имеющих в детстве диагноз “гемофилия В, тяжелая форма”. От пациентов или их законных представителей было получено информированное согласие на проведение исследования.

Выделение ДНК из цельной крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА, проводили с помощью набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) согласно протоколу производителя.

Секвенирование по Сенгеру ПЦР-продуктов, полученных с праймеров, комплементарных последовательности гена *F9*, фланкирующих экзоны 1–8 и промоторную область, проводили на приборе для капиллярного электрофореза 3130 ABI genetic analyzer (Applied Biosystems, США). Частоту выявленных вариантов гена *F9* определяли по базам данных dbSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/) и Genome Aggregation Database (http://gnomad.broadinstitute.org/), патогенность – по их описанию в базах “The Human Gene Mutation Database” (https://my.qiagendigitalinsights.com/bbp/) и “Factor IX Gene Variant Database” (http://

www.factorix.org/), “CHBMP” (https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При обследовании пациентов с гемофилией B, проходивших генетическое тестирование гена *F9* в ФГБНУ “Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова”, у троих были обнаружены мутации в промоторной области гена.

Пациент ГВ_382.1 2002 г. рождения. На момент обследования пациенту 14 лет. Наблюдается у гематолога с 5 лет с диагнозом “гемофилия B” (болезнь Кристмаса). При осмотре: нормальное телосложение, умственное и физическое развитие соответствует возрасту, выявлены коленные гемартрозы. Из семейного анамнеза известно, что в детстве у дедушки по материнской линии наблюдались частые кровотечения, однако обследования он не проходил. К сожалению, более подробный анамнез собрать не удалось из-за проживания больного в труднодоступной местности. При проведении генетического тестирования в гене *F9* выявлена описанная ранее Reitsma et al. мутация c.–17A>G в гемизиготном состоянии [9]. Родословная больного из семьи 382 схожа с родословной американской семьи. У представленного в статье [9] пробанда в детстве уровень фактора IX в плазме был <1%, наблюдались частые кровотечения, но после 14 лет кровотечения стали более редкими, уровень FIX:C постепенно увеличивался и к 18 годам достиг 24%, оставшись в дальнейшем на постоянном уровне. Известно также о дяде больного по материнской линии с такими же клиническими проявлениями, которому впервые обследование было проведено в 39 лет и FIX:C у него составил 42%. У матери больного, которая являлась носительницей данной мутации, FIX:C был 79%. Интересно, что у мужчин из одной семьи, описанной в статье [9], после полового созревания уровень фактора IX вырос в разной степени – у пробанда остался диагноз “мягкая форма гемофилии B”, а у дяди пробанда уровень фактора достиг нормальных значений. На сегодняшний день известно, что данная мутация находится в сайте связывания транскрипционного фактора C/EBPα. Исходя из этого, а также из данных о семейном анамнезе больного 382.1, можно предположить, что в ближайшее время состояние данного пациента улучшится.

Пациент ГВ_266.1 1985 г. рождения. На момент обследования пациенту 29 лет. Обследование проводилось с целью дальнейшего уточнения статуса сестры пробанда на предмет носительства гемофилии B. Из анамнеза известно, что пациент с 5 лет наблюдался в НМИЦ гематологии г. Москвы с клиническим диагнозом “тяжелая коагулопатия, гемофилия B”. У больного в детстве наблюдались кровотечения из слизистых, геморрагии на коже, гематомы мягких тканей, гемартрозы крупных суставов. Больной получал гемостатическую терапию концентратом фактора IX, несколько раз проходил лечение в стационаре. В 16 лет пациенту поменяли диагноз на “гемофилия B, легкая форма”, FIX:C в плазме составлял 13%, в 18 лет – 26%. Далее больной перестал наблюдаться у гематолога в связи с исчезновением клинических проявлений заболевания. При проведении секвенирования гена *F9* у данного пациента был обнаружен ранее не описанный вариант c.–48G>T. В 1995 г. Ketterling в данной позиции описал вариант c.–48G>C у 12-летнего мальчика с гемофилией B средней тяжести (FIX:C 3%) [37]. Также известны патогенные варианты в соседних нуклеотидах (c.–49T>A, c.–49T>C, c.–50T>G, c.–50T>C) у больных со схожим фенотипом [13, 21, 52, 53]. У всех больных произошло значительное смягчение клинических симптомов гемофилии B после полового созревания, как и у пробанда 266.1. Известно, что в позициях c.–56–48 находится сайт связывания для транскрипционного фактора HNF4α, при этом только в позициях c.–50–48 он не перекрывается с сайтом для андрогенового рецептора, что обеспечивает увеличение концентрации фактора IX после полового созревания. Вариант c.–48G>T также выявлен у сестры пробанда в гетерозиготном состоянии.

Пациент ГВ_401.1 2014 г. рождения. На момент обследования пациенту 4 года, наблюдается у гематолога с клиническим диагнозом “гемофилия B, тяжелая форма”. Из анамнеза известно, что в 2016 г. он проходил стационарное лечение по причине образовавшейся гематомы в области лба после травмы и повторявшихся кровотечений из раны после проведенного вскрытия гематомы. Также были отмечены множественные небольшие подкожные кровоизлияния по всему телу и умеренное увеличение селезенки, суставы были не изменены. Выявлены отклонения в коагулограмме: АЧТВ – 102.2 с, фактор IX – 0.9%. На сегодняшний день ребенок получает заместительную терапию плазматическим концентратом фактора IX. При генетическом тестировании у пациента был обнаружен ранее описанный патогенный вариант в промоторе гена *F9* – c.–52C>T в гемизиготном состоянии. Мать пробанда является гетерозиготной носительницей данного патогенного варианта. Согласно описанным в литературе случаям при наличии у больных мутации в этой области, выздоровления после полового созревания не происходит в связи с тем, что данная нуклеотидная замена попадает на сайты связывания как фактора HNF4α, так и

тестостерон-зависимого фактора AR. Однако дает надежду разное течение заболевания у двух больных из одной семьи с мутацией c.–52del, при которой у одного из больных наступило улучшение состояния [38].

Гемофилия В Лейден является примером генетического заболевания, обусловленного мутациями в промоторной области гена *F9*, при котором в большинстве случаев происходит выздоровление или облегчение состояния пациента после полового созревания. Степень ингибирования транскрипции и соответственно тяжесть течения гемофилии В зависят от мутации, в той или иной мере нарушающей связывание белка-активатора с промотором. При этом следует подчеркнуть, что на фенотип также могут влиять дополнительные факторы (генетические, эпигенетические и др.), поэтому тяжесть течения заболевания не может быть достоверно предсказана только по выявленной мутации.

Были предложены две гипотезы, объясняющие улучшение состояния больных в период полового созревания. Обе они нашли подтверждение в ряде проведенных экспериментов. Возможно, что оба механизма – регуляция экспрессии гена *F9* половыми гормонами и гормоном роста – являются составными частями еще более сложного биологического процесса. Поэтому причины выздоровления при гемофилии В Лейден являются предметом дальнейших исследований.

В настоящее время известно около 1600 факторов транскрипции человека [54, 55]. Основополагающим для этого было клонирование практически всех ДНК-связывающих белков и появление ChIP-Seq метода. Современные методы позволяют определять функциональное значение для все большего количества SNPs и мутаций в регуляторных областях генов. Несомненно существуют многочисленные сложности, которые затрудняют этот процесс. Например, исследования ChIP-Seq показали, что транскрипционные факторы обычно связываются с тысячами сайтов по всему геному, и многие такие события связывания считаются функционально несущественными [56]. Кроме того, эухроматические цис-регуляторные области часто совместно заняты множеством транскрипционных факторов [56]. Таким образом, отличить функционально значимые белки от тех, которые связываются просто вследствие доступности хроматина, может оказаться затруднительным. Кроме того, стандартные анализы ChIP-Seq обычно определяют относительно широкую область, которая может содержать несколько предполагаемых сайтов связывания для данного фактора транскрипции. В таких случаях более точно сайты связывания могут быть идентифицированы только путем последующего функционального анализа или с помощью методов высокого разрешения, таких как ChIP-exo [57]. Наконец, хотя число установленных факторов транскрипции человека увеличивается, определить их функцию в каждой ткани и влияние на регуляцию генов *in vivo* остается сложной задачей. Тем не менее значительный технический прогресс позволяет надеяться, что постепенно будет достигнуто понимание всех процессов генной регуляции.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России.

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

От пациентов или их законных представителей было получено информированное согласие на проведение исследования и публикацию результатов на условии анонимности.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mannucci P.M., Tuddenham E.G.* The hemophilias–from royal genes to gene therapy // N. Engl. J. Med. 2001. V. 344. № 23. P. 1773–1779. https://doi.org/10.1056/nejm200106073442307
2. *Yoshitake S., Schach B.G., Foster D.C. et al.* Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B) // Biochemistry. 1985. V. 24. № 14. P. 3736–3750. https://doi.org/10.1021/bi00335a049
3. *Larson P.J., Stanfield-Oakley S.A., VanDusen W.J. et al.* Structural integrity of the gamma-carboxyglutamic acid domain of human blood coagulation factor IXa is required for its binding to cofactor VIIIa // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 7. P. 3869–3876. https://doi.org/10.1074/jbc.271.7.3869
4. *Derian C.K., VanDusen W., Przysiecki C.T. et al.* Inhibitors of 2-ketoglutarate-dependent dioxygenases block aspartyl beta-hydroxylation of recombinant human factor IX in several mammalian expression systems // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 12. P. 6615–6618.
5. *Hassan H.J., Leonardi A., Chelucci C. et al.* Blood coagulation factors in human embryonic-fetal development: Preferential expression of the FVII/tissue factor pathway // Blood. 1990. V. 76. № 6. P. 1158–1164.
6. *Andrew M., Vegh P., Johnston M. et al.* Maturation of the hemostatic system during childhood // Blood. 1992. V. 80. № 8. P. 1998–2005.
7. *Sweeney J.D., Hoernig L.A.* Age-dependent effect on the level of factor IX // Am. J. Clin. Pathol. 1993. V. 99. № 6. P. 687–688. https://doi.org/10.1093/ajcp/99.6.687
8. *Veltkamp J.J., Meilof J., Remmelts H.G. et al.* Another genetic variant of haemophilia B: haemophilia B Ley-

den // Scand. J. Haematol. 1970. V. 7. № 2. P. 82–90. https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1970.tb01873.x

9. *Reitsma P.H., Mandalaki T., Kasper C.K. et al.* Two novel point mutations correlate with an altered developmental expression of blood coagulation factor IX (hemophilia B Leyden phenotype) // Blood. 1989. V. 73. № 3. P. 743–746.
10. *Crossley M., Brownlee G.G.* Disruption of a C/EBP binding site in the factor IX promoter is associated with haemophilia B // Nature. 1990. V. 345. № 6274. P. 444–446. https://doi.org/10.1038/345444a0
11. *Briët E., Bertina R.M., van Tilburg N.H., Veltkamp J.J.* Hemophilia B Leyden: A sex-linked hereditary disorder that improves after puberty // N. Engl. J. Med. 1982. V. 306. № 13. P. 788–790. https://doi.org/10.1056/nejm198204013061306
12. *Rallapalli P.M., Kemball-Cook G., Tuddenham E.G. et al.* An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B // J. Thromb. Haemost. 2013. V. 11. № 7. P. 1329–1340. https://doi.org/10.1111/jth.12276
13. *Reitsma P.H., Bertina R.M., Ploos van Amstel J.K. et al.* The putative factor IX gene promoter in hemophilia B Leyden // Blood. 1988. V. 72. № 3. P. 1074–1076.
14. *Hirosawa S., Fahner J.B., Salier J.P. et al.* Structural and functional basis of the developmental regulation of human coagulation factor IX gene: factor IX Leyden // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 12. P. 4421–4425. https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4421
15. *Royle G., Van de Water N.S., Berry E. et al.* Haemophilia B Leyden arising de novo by point mutation in the putative factor IX promoter region // Br. J. Haematol. 1991. V. 77. № 2. P. 191–194. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1991.tb07976.x
16. *Vidaud D., Tartary M., Costa J.M. et al.* Nucleotide substitutions at the -6 position in the promoter region of the factor IX gene result in different severity of hemophilia B Leyden: consequences for genetic counseling // Hum. Genet. 1993. V. 91. № 3. P. 241–244. https://doi.org/10.1007/bf00218264
17. *Hall A.J., Chuansumrit A., Peake I.R., Winship P.R.* A single base pair deletion in the promoter region of the factor IX gene is associated with haemophilia B // Thromb. Haemost. 1994. V. 72. № 6. P. 799–803.
18. *Nielsen L.R., Scheibel E., Ingerslev J., Schwartz M.* Detection of ten new mutations by screening the gene encoding factor IX of Danish hemophilia B patients // Thromb Haemost. 1995. V. 73. № 5. P. 774–778.
19. *Crossley P.M., Winship P.R., Black A. et al.* Unusual case of haemophilia B // Lancet. 1989. V. 1. № 8644. P. 960. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)92540-3
20. *Picketts D.J., D'Souza C., Bridge P.J., Lillicrap D.* An A to T transversion at position -5 of the factor IX promoter results in hemophilia B // Genomics. 1992. V. 12. № 1. P. 161–163. https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90421-n
21. *Reijnen M.J., Peerlinck K., Maasdam D. et al.* Hemophilia B Leyden: Substitution of thymine for guanine at position –21 results in a disruption of a hepatocyte nuclear factor 4 binding site in the factor IX promoter // Blood. 1993. V. 82. № 1. P. 151–158.
22. *Reijnen M.J., Sladek F.M., Bertina R.M., Reitsma P.H.* Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. № 14. P. 6300–6303. https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6300
23. *Yao S.N., DeSilva A.H., Kurachi S. et al.* Characterization of a mouse factor IX cDNA and developmental regulation of the factor IX gene expression in liver // Thromb. Haemost. 1991. V. 65. № 1. P. 52–58.
24. *Brady J.N., Notley C., Cameron C., Lillicrap D.* Androgen effects on factor IX expression: in vitro and in vivo studies in mice // Br. J. Haematol. 1998. V. 101. № 2. P. 273–279. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00694.x
25. *Kurachi S., Huo J.S., Ameri A. et al.* An age-related homeostasis mechanism is essential for spontaneous amelioration of hemophilia B Leyden // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 19. P. 7921–7926. https://doi.org/10.1073/pnas.0902191106
26. *Funnell A.P., Crossley M.* Hemophilia B Leyden and once mysterious cis-regulatory mutations // Trends Genet. 2014. V. 30. № 1. P. 18–23. https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.09.007
27. *Landschulz W.H., Johnson P.F., Adashi E.Y. et al.* Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP // Genes Dev. 1988. V. 2. № 7. P. 786–800. https://doi.org/10.1101/gad.2.7.786
28. *Sladek F.M., Zhong W.M., Lai E., Darnell J.E., Jr.* Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily // Genes Dev. 1990. V. 4. № 12b. P. 2353–2365. https://doi.org/10.1101/gad.4.12b.2353
29. *Davies N., Austen D.E., Wilde M.D. et al.* Clotting factor IX levels in C/EBP alpha knockout mice // Br. J. Haematol. 1997. V. 99. № 3. P. 578–579. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.4603263.x
30. *Crossley M., Ludwig M., Stowell K.M. et al.* Recovery from hemophilia B Leyden: An androgen-responsive element in the factor IX promoter // Science. 1992. V. 257. № 5068. P. 377–379. https://doi.org/10.1126/science.1631558
31. *Giannelli F., Green P.M., Sommer S.S. et al.* Haemophilia B: Database of point mutations and short additions and deletions–eighth edition // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. № 1. P. 265–268. https://doi.org/10.1093/nar/26.1.265
32. *Belvini D., Salviato R., Radossi P. et al.* Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B // Haematologica. 2005. V. 90. № 5. P. 635–642.
33. *Morgan G.E., Rowley G., Green P.M. et al.* Further evidence for the importance of an androgen response ele-

ment in the factor IX promoter // Br. J. Haematol. 1997. V. 98. № 1. P. 79–85.
https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.1712991.x

34. *Heit J.A., Ketterling R.P., Zapata R.E. et al.* Haemophilia B Brandenberg-type promoter mutation // Haemophilia. 1999. V. 5. № 1. P. 73–75.
https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.1999.00193.x

35. *Briët E., Wijnands M.C., Veltkamp J.J.* The prophylactic treatment of hemophilia B Leyden with anabolic steroids // Ann. Intern. Med. 1985. V. 103. № 2. P. 225–226.
https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-2-225

36. *Rimmer E.K., Seftel M.D., Israels S.J., Houston D.S.* Unintended benefit of anabolic steroid use in hemophilia B Leiden // Am. J. Hematol. 2012. V. 87. № 1. P. 122–123.
https://doi.org/10.1002/ajh.22190

37. *Ketterling R.P., Liu J.Z., Liao D. et al.* Two novel factor IX promoter mutations: Incremental progress towards 'saturation in vivo mutagenesis' of a human promoter region // Hum. Mol. Genet. 1995. V. 4. № 4. P. 769–770.
https://doi.org/10.1093/hmg/4.4.769

38. *Lannoy N., Lambert C., Farrugia A. et al.* Usual and unusual mutations in a cohort of Belgian patients with hemophilia B // Thromb. Res. 2017. V. 149. P. 25–28.
https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.11.006

39. *Nathwani A.C., Reiss U.M., Tuddenham E.G. et al.* Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B // N. Engl. J. Med. 2014. V. 371. № 21. P. 1994–2004.
https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407309

40. *Wasylyk B., Hahn S.L., Giovane A.* The Ets family of transcription factors // Eur. J. Biochem. 1993. V. 211. № 1–2. P. 7–18.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-78757-7_2

41. *Hildyard C., Keeling D.* Effect of age on factor IX levels in symptomatic carriers of Haemophila B Leyden // Br. J. Haematol. 2015. V. 169. № 3. P. 448–449.
https://doi.org/10.1111/bjh.13223

42. *Lavin M., Jenkins P.V., Healy M.L. et al.* Age-related factor IX correction in symptomatic female carriers with haemophilia B Leyden // Haemophilia. 2015. V. 21. № 6. P. e498–e500.
https://doi.org/10.1111/hae.12761

43. *Ahmed S.Z., O'Rourke M., Jenkins V. et al.* Progressive increase in FIX level in males with haemophilia B Leyden and c.35G>A mutation in early childhood not related to androgen effect // Br. J. Haematol. 2020. V. 189. № 6. P. e262–e265.
https://doi.org/10.1111/bjh.16688

44. *Steyn F.J., Tolle V., Chen C., Epelbaum J.* Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion // Compr. Physiol. 2016. V. 6. № 2. P. 687–735.
https://doi.org/10.1002/cphy.c150002

45. *Green P.M., Montandon A.J., Bentley D.R. et al.* The incidence and distribution of CpG→TpG transitions in the coagulation factor IX gene. A fresh look at CpG mutational hotspots // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 11. P. 3227–3231.
https://doi.org/10.1093/nar/18.11.3227

46. *Funnell A.P., Wilson M.D., Ballester B. et al.* A CpG mutational hotspot in a ONECUT binding site accounts for the prevalent variant of hemophilia B Leyden // Am. J. Hum. Genet. 2013. V. 92. № 3. P. 460–467.
https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.02.003

47. *Laudadio I., Manfroid I., Achouri Y. et al.* A feedback loop between the liver-enriched transcription factor network and miR-122 controls hepatocyte differentiation // Gastroenterology. 2012. V. 142. № 1. P. 119–129.
https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.001

48. *Odom D.T., Zizlsperger N., Gordon D.B. et al.* Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors // Science. 2004. V. 303. № 5662. P. 1378–1381.
https://doi.org/10.1126/science.1089769

49. *Thompson A.R., Bajaj S.P., Chen S.H., MacGillivray R.T.* "Founder" effect in different families with haemophilia B mutation // Lancet. 1990. V. 335. № 8686. P. 418.
https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)90259-8

50. *Picketts D.J., Lillicrap D.P., Mueller C.R.* Synergy between transcription factors DBP and C/EBP compensates for a haemophilia B Leyden factor IX mutation // Nat. Genet. 1993. V. 3. № 2. P. 175–179.
https://doi.org/10.1038/ng0293-175

51. *Boccia L.M., Lillicrap D., Newcombe K., Mueller C.R.* Binding of the Ets factor GA-binding protein to an upstream site in the factor IX promoter is a critical event in transactivation // Mol. Cell Biol. 1996. V. 16. № 5. P. 1929–1935.
https://doi.org/10.1128/mcb.16.5.1929

52. *Ghanem N., Costes B., Martin J. et al.* Twenty-four novel hemophilia B mutations revealed by rapid scanning of the whole factor IX gene in a French population sample // Eur. J. Hum. Genet. 1993. V. 1. № 2. P. 144–155.
https://doi.org/10.1159/000472401

53. *Сурин В.Л., Демидова Е.Ю., Селиванова Д.С., Лучинина Ю.А., Саломашкина В.В., Пшеничникова О.С., Лихачева Е.А.* Мутационный анализ гемофилии В в России с использованием молекулярно-генетических методов // Генетика. 1916. Т. 52. № 4. С. 466–473.

54. *Vaquerizas J.M., Kummerfeld S.K., Teichmann S.A., Luscombe N.M.* A census of human transcription factors: function, expression and evolution // Nat. Rev. Genet. 2009. V. 10. № 4. P. 252–263.
https://doi.org/10.1038/nrg2538

55. *Babu M.M., Luscombe N.M., Aravind L. et al.* Structure and evolution of transcriptional regulatory networks // Curr. Opin. Struct. Biol. 2004. V. 14. № 3. P. 283–291.
https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.05.004

56. *Biggin M.D.* Animal transcription networks as highly connected, quantitative continua // Dev. Cell. 2011. V. 21. № 4. P. 611–626.
https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.09.008

57. *Rhee H.S., Pugh B.F.* Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution // Cell. 2011. V. 147. № 6. P. 1408–1419.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.013

Haemophilia B Leyden: Literature and Own Data

T. S. Beskorovainaya[a], *, V. V. Zabnenkova[a], R. A. Zinchenko[a], O. A. Shchagina[a], and A. V. Polyakov[a]

[a] *Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia*

**e-mail: t-kovalevskaya@yandex.ru*

Haemophilia B is a monogenic X-linked recessive disorder associated with blood clotting reduction caused by mutations in the clotting factor IX gene (*F9*). An unusual form of this disorder, "haemophilia B Leyden", caused by mutations in the promoter region of the *F9* gene, is described. There is a significant, within norm, factor IX increase in plasma after the patient's puberty with this form of haemophilia B. Mutations in the promoter are grouped in discrete regions of transcription factor binding sites. They alter the *F9* gene expression in different ways during the development. This disorder illustrates how single-nucleotide pathogenic variants in cis-regulatory regions can cause a dramatic impact on gene expression. In this article, we presentthe current data on the *F9* gene promoter structure and the examination results of three patients with haemophilia B Leyden who underwent genetic testing in the DNA-diagnostics laboratory of the Research Centre for Medical Genetics.

Keywords: haemophilia B, gene *F9*, promoter, mutation.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1131–1140

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 575.224:616-006

АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ И НЕКОДИРУЮЩИХ РНК КАК ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ РАННИХ БИОМАРКЕРОВ РАДИОИНДУЦИРОВАННОГО ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ У МЫШЕЙ

© 2021 г.
В. Ф. Михайлов[1], Д. В. Салеева[1, *], Л. М. Рождественский[1], Л. В. Шуленина[1], Н. Ф. Раева[1], Г. Д. Засухина[1, 2]

[1]*Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна, Москва, 123098 Россия*

[2]*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*

**e-mail: dasha_saleeva@inbox.ru*

Поступила в редакцию 18.01.2021 г.
После доработки 09.04.2021 г.
Принята к публикации 20.04.2021 г.

Была изучена активность генов и некодирующих РНК у 183 мышей-гибридов (CBA × C57Bl) F_1 после пролонгированного низкомощностного облучения (в течение 21 ч в дозе 12.6 Гр, при мощности дозы 10 мГр/мин). Анализ исследуемых показателей проведен в костном мозге мышей на восьмой и десятый месяцы после облучения. На десятый месяц у 14 из 94 животных обнаружены радиоиндуцированные злокачественные лимфомы в печени, брюшной полости и подкожно. Исследуемые молекулярно-генетические показатели были разделены на две группы: онкогены и онкосупрессоры, активация которых сравнивалась на восьмой и десятый месяцы после облучения. Выявлено, что в группах мышей с опухолями активность онкосупрессоров (ген *PTEN* и длинная некодирующая РНК lncp21) была ниже по сравнению с группой мышей без новообразований, тогда как активность онкогенов (*NFkB(p65)*, *IkBα*, *iNOS*, *TAL1*, *CTCF*, днРНК NEAT1 и miR-125b) повышалась. Исследуемые показатели можно рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров радиоиндуцированного опухолеобразования.

Ключевые слова: биомаркеры, радиоиндуцированное опухолеобразование, длинные некодирующие РНК, микроРНК.

DOI: 10.31857/S0016675821100076

Изменение активности определенных генов и их регуляторов – некодирующих РНК, а также баланса взаимодействия между ними при действии радиации может сопровождаться развитием опухолей. Выявление таких генетических структур может служить пониманию механизмов формирования патологии.

Прикладным аспектом этой проблемы является необходимость создания панели биомаркеров для прогнозирования опухолеобразования в условиях различных радиационных воздействий на человека. Необходимость таких исследований диктуется не только возможностью аварий, подобных Чернобылю или Фукусима, но и опасностью профессиональных радиационных воздействий, а также некоторых диагностических процедур.

В последние несколько лет для прогноза и понимания механизмов радиационного действия используют профили экспрессии некодирующих РНК: микроРНК (miR) и длинных некодирующих РНК (днРНК), которые, обладая разной чувствительностью к радиации, могут регулировать активность генов-мишеней, влияя на изменения функций и развитие разных патологий, что может служить показателем тяжести и прогноза заболевания. С этой целью используют профили активности генов, микро- и днРНК и их изменения после радиационного воздействия.

МикроРНК являются классом эндогенных маленьких некодирующих РНК (20–25 нуклеотидов), которые регулируют гены-мишени, влияя на деградацию мРНК или репрессию трансляции. Они включаются в регуляцию клеточных функций (дифференциацию, пролиферацию, апоптоз). Аберрантная экспрессия микроРНК может приводить к активации или ингибированию многочисленных физиологических процессов. Профили экспрессии микроРНК могут отражать особенности различных типов опухолей и потенциально дифференцировать различные дозы гамма-радиации [1–3]. Так была установлена связь уровней экспрессии miR-26в-5P и ее мишени TRPS1 с раком груди у пациентов после аварии в Чернобыле [4]. Циркулирующие микроРНК используют как биомаркер ра-

диационной экспозиции [5]. MiR-122 отражает репрессию трансляции PEG-10 при гепатоцеллюлярной карциноме [6].

ДнРНК модулируют транскрипцию посттрансляционных процессов, принимая участие в ряде биологических событий (геномный импринтинг, хромосомная дозовая компенсация, хроматиновая модуляция и др.). ДнРНК состоят более чем из 200 нуклеотидов, которые не транслируются в протеины [7]. Их функции зависят от вида животных, типа тканей и клеток. У человека обнаружено порядка 17000 днРНК [8]. Полагают, что днРНК, подобно губке, связывают разные микроРНК, что может ингибировать их функциональную активность. Отмечена тесная связь активности днРНК с рядом патологий (опухолеобразование, аутоиммунные болезни и др.). Анализ профиля экспрессии днРНК дает возможность рассматривать их как потенциальные биомаркеры радиационных осложнений [9, 10]. Было показано, что днРНК PARTICLE модулирует экспрессию опухолевого супрессора MAT2A, регулируя локусспецифическое метилирование. Этот показатель может расцениваться как возможный биомаркер подавления процессов транскрипции генов при исследовании плазмы пациентов после радиотерапии [11]. Связь между днРНК и микроРНК была исследована в свете патогенеза разных заболеваний и осуществляет регуляцию разных клеточных процессов [12]. Радиационно-индуцированные днРНК являются прекрасной моделью для изучения динамики изменения их экспрессии в различных органах мышей после облучения всего тела [13].

Исходя из вышеперечисленных данных, нами были исследованы в комплексе активность генов, днРНК и микроРНК на восьмой и десятый месяцы в костном мозге мышей линии (CBA × C57Bl) F_1 после пролонгированного облучения в дозе 12.6 Гр (в отличие от других авторов, которые исследовали или микроРНК, или днРНК в ответ на действие радиации) [5]. При этом на десятый месяц была исследована активность этих соединений у облученных мышей без опухоли и с образовавшимися опухолями. Эти данные важны, с одной стороны, для понимания механизмов радиоиндуцированного канцерогенеза, а с другой, исследованные гены и некодирующие РНК могут быть использованы в качестве показателей риска развития опухоли, а также могут служить в качестве биомаркеров этого процесса и возможных мишеней для терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе использовали 183 самца мышей-гибридов (CBA × C57Bl) F_1 массой 20–24 г. Исследования проводили в соответствии с требованиями нормативно-правовых актов.

Облучение животных. Низкомощностное пролонгированное облучение мышей в дозе 12.6 Гр осуществляли на цезиевой гамма-установке Панорама-3С (с мощностью дозы 10 мГр/мин) в течение 21 ч.

Получение биологического материала. Мышей подвергали эвтаназии методом дислокации шейных позвонков, после чего извлекали бедренные кости. Концы костей удаляли, диафизы дважды промывали 0.8 мл буфера RPMI-1640 с pH 7.2 с содержанием в 0.1 мкл 0.5–2 × 10^6 клеток. Полученная суспензия костного мозга хранилась при –70°С до использования.

Определение жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток в экспериментальных группах оценивали с помощью набора Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Molecular Technologies, Inc., США). Для этого, не меняя среду, в ячейки планшета к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 10 мкл раствора CCK-8, содержащего водорастворимую тетразолиевую соль WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disul-fophenyl)-2Htetrazolium, monosodium salt] и электронный медиатор. Число живых клеток оценивали спектрофотометрически с помощью микропланшетного ридера Bio Rad Elisa Reader (США) при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 690 нм).

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Общую РНК получали из костного мозга у 89 и 94 мышей на восьмой и десятый месяцы после облучения с использованием наборов фирмы ООО “Лаборатория Изоген” (Россия) по стандартному протоколу фирмы-производителя. Конверсию РНК в кДНК проводили с помощью набора реагентов для проведения реакции обратной транскрипции GenePak RT Core с использованием рандомизированных праймеров. Реакцию обратной транскрипции для микроРНК осуществляли по технологии “stem loop” с использованием праймеров 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACAT-3' для miR-21 и 5'-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCACAAGT-3' для miR-125b (50 нМ). ПЦР-РВ осуществляли с применением наборов “Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2X)”. В качестве эндогенного контроля экспрессии генов и их регуляторов использовался ген *GAPDH*. Нуклеотидная последовательность праймеров для исследуемых генов, а также условия ПЦР-РВ представлены в табл. 1.

Уровень экспрессии исследуемых показателей нормировали относительно мРНК гена *GAPDH*. Расчет относительной экспрессии исследуемых показателей проводили с использованием метода ΔΔCt [14].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы “STATISTICA7.0”. Для оценки значимости различий приме-

Таблица 1. Температурно-временной режим ПЦР-РВ для мРНК и микроРНК

Показатель	Праймеры: прямой (F) и обратный (R), концентрация (нМ)	Условия ПЦР-РВ
P53	F: 5'-TCTGGGACAGCCAAGTCTGT-3' (300) R: 5'-GGAGTCTTCCAGTGTCATGA-3' (300)	Предварительная денатурация (ПД): 95°C – 10 мин; далее 35 циклов: 94°C – 30 с, 51.9°C – 50 с, 72°C – 80 с
PTEN	F: 5'-AATTCCCAGTCAGAGGCGCTATGT-3' (100) R: 5'-GATTGCAAGTTCCGCCACTGAACA-3' (100)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 20 с, 64°C – 20 с
TAL1	F: 5'-CTGTGTCAATCCAGGTGGTG-3' (300) R: 5'-GATGGGGCCTTTGGATATTT-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 94°C – 30 с, 62°C – 30 с
CTCF	F: 5'-CGCGAAGAATGACCACAAAT-3' (300) R: 5'-GACTCCTCCACAATGGCTTC-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 51.4°C – 45 с, 72°C – 60 с
TNFa	F: 5'-CCAGGCAGTCAGATCATCTTC-3' (300) R: 5'-TTGATGGCAGAGAGGAGGTT-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с
IAP1	F: 5'-TTCTGTACTGGCCACCTAGTGTTC-3' (300) R: 5'-CATCATTGCGATCCACGTAATAG-3' (300)	ПД: 95°C – 2 мин; далее 40 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 30 с, 70°C – 30 с
IAP2	F: 5'-ATGTCAGAGCACCAGAGGCATT-3' (300) R: 5'-AGAGACAGTGTATCTCGAAGCAGAT-3' (300)	ПД: 95°C – 2 мин; далее 40 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 30 с, 70°C – 30 с
IkBa	F: 5'-CGCTTGGTGGACGATCG-3' (300) R: 5'-TTGCTCGTACTCCTCGTCCTTC-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 59°C – 30 с, 72°C – 30 с
iNOS	F: 5'-CTATCAGGAAGAAATGCAGGAGAT-3' (300) R: 5'-GAGCACGCTGAGTACCTCATT-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 61°C – 30 с, 72°C – 30 с
NFkB(p50)	F: 5'-GAAATTCCTGATCCAGACAAAAAC-3' (600) R: 5'-ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG-3' (600)	ПД: 95°C – 2 мин; далее 40 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 30 с, 70°C – 30 с
NFkB(p65)	F: 5'-CTTCCTCAGCCATGGTACCTCT-3' (300) R: 5'-CAAGTCTTCATCAGCATCAAACTG-3' (300)	ПД: 95°C – 2 мин; далее 45 циклов: 95°C – 30 с, 60°C – 60 с
G-SCF	F: 5'-CTCAACTTTCTGCCCAGAGG-3' (300) R: 5'-AGCTGGCTTAGGCACTGTGT-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 56°C – 30 с, 72°C – 30 с
NEAT1	F: 5'-GCTCTGGGACCTTCGTGACTCT-3' (100) R: 5'-CTGCCTTGGCTTGGAAATGTAA-3' (100)	ПД: 94°C – 10 мин; далее 40 циклов: 94°C – 10 с, 60°C – 45 с
MALAT1	F: 5'-AGCGAGTTGGTGATGAAG-3' (300) R: 5'-TGCCGACCTCAAGGAATGTTAC-3' (300)	ПД: 94°C – 10 мин; далее 45 циклов: 94°C – 10 с, 60°C – 45 с
DINO	F: 5'-GCAATGGTGTGCCTGACTAT-3' (300) R: 5'-ACTTCTGGCTTCCCAGAG-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 5 циклов: 94°C – 15 с, 60°C – 45 с
lncp21	F: 5'-CCTGTCCACTCGCTTTC-3' (300) R: 5'-GGAACTGGAGACGGAATGTC-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 50°C – 35 с
miR-21	F: 5'-TGCCGCCTAGCTTATCAGACTG-3' (300) R: 5'-AAGTGCAGGGTCCGAGG-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 40 циклов: 94°C – 20 с, 57°C – 45 с, 72°C – 45 с
miR-125b	F: 5'-ACACTCCAGCTGGGTCCCTGAGACCCTAAC-3' (250) R: 5'-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG-3' (250)	ПД: 94°C – 10 мин; далее 30 циклов: 94°C – 15 с, 60°C – 60 с
GAPDH	F: 5'-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3' (100) R: 5'-ACGGACACATTGGGGGTAGG-3' (100)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 20 с, 60°C – 25 с

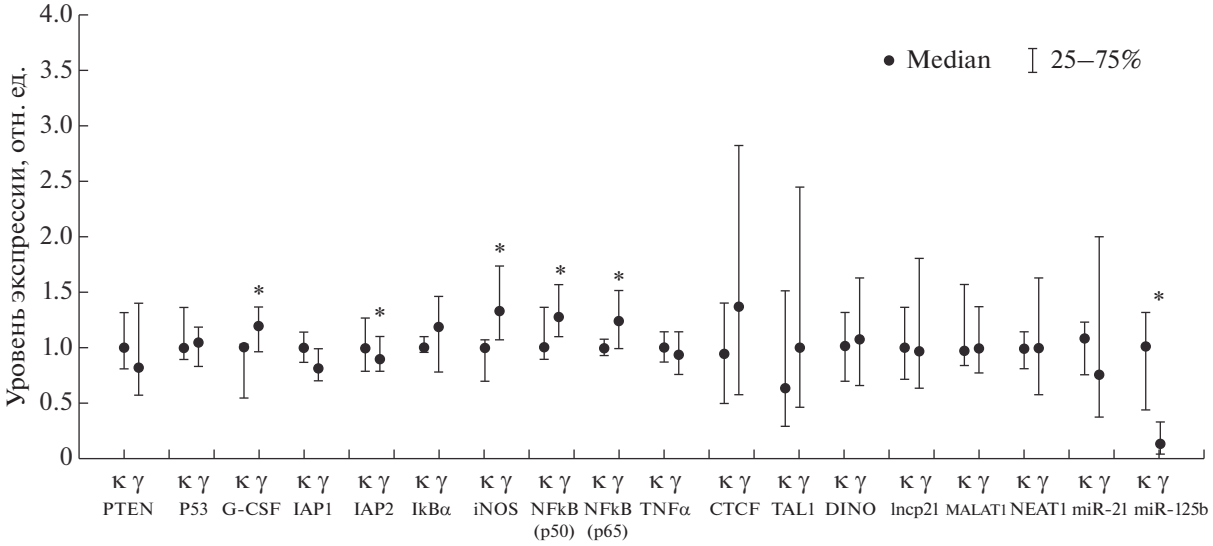

Рис. 1. Содержание мРНК генов, микроРНК и днРНК (медиана и квартили) в костном мозге мышей через восемь месяцев после облучения. к – необлученная группа (“Биоконтроль”), γ – группа облученных мышей (“Облучение”), * – указывает на достоверные статистические изменения ($p < 0.05$) по критерию Манна–Уитни между группами “Облучение” и “Биоконтроль”. Медиана группы “Биоконтроль” принята за единицу.

няли непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми при уровне показателя $p < 0.05$. Результаты представлены в виде медиан изменения экспрессии показателей в группах “Облучение” и “Облучение + опухоль”, выраженных по отношению к медиане группы “Биоконтроль”, принятой за единицу. В эксперименте “Биоконтроль” представляет собой контрольную группу интактных мышей, “Облучение” – группу мышей, подвергающихся низкомощностному пролонгированному облучению, “Облучение + опухоль” – мышей, у которых на десятый месяц после облучения обнаружены опухоли (14 мышей).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 и 2 представлено относительное содержание мРНК генов, днРНК и микроРНК (медиана и квартили) в группах “Биоконтроль”, “Облучение”, “Облучение + опухоль” в костном мозге мышей на восьмой и десятый месяцы после облучения.

Акцент сделан на особенностях экспрессии отдельно взятых онкогенов и онкосупрессоров.

Из данных на рис. 1 видно, что через восемь месяцев после облучения отмечается статистически значимое повышение экспрессии онкогенов *NFkB(p50)*, *NFkB(p65)* и их генов-мишеней: *G-SCF* и *iNOS* в группе “Облучение” в 1.27, 1.23, 1.19 и 1.32 раза ($p < 0.05$) соответственно, в то время как изменение активности остальных исследуемых генов и некодирующих РНК не выявлено.

Через десять месяцев после облучения у 14 из 94 мышей гистологически были выявлены лимфомы в печени, брюшной полости и подкожно. При этом значительно изменялась экспрессия различных генов и их регуляторов. В частности, отмечалось снижение функциональной активности генов *NFkB(p65)* и *iNOS* в 1.15 и 1.17 раз ($p < 0.05$) в группах “Облучение” и “Облучение + опухоль” соответственно, а для гена *iNOS* – в 1.62 раза ($p < 0.05$) в группе “Облучение + опухоль” по отношению к группе “Биоконтроль” (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в нормальных клетках костного мозга мышей независимо от образования опухоли статистически значимо снижалась активность гена *NFkB*.

Из рис. 2 видно, что экспрессия генов *PTEN*, *iNOS*, *CTCF*, *TAL1*, днРНК lncp21, NEAT1 и микроРНК miR-125b снижена в группе “Облучение + опухоль” ($p < 0.05$) и подавлялась активность генов *IkBα*, *TAL1* и микроРНК miR-125b в группе “Облучение”.

Снижение экспрессии днРНК NEAT1 было показано также при раке желудка [15], однако было отмечено и увеличение ее активности при раке гортани [16], что ассоциировалось с неблагоприятным прогнозом и метастазированием опухолей. Это свидетельствует о специфичности ответа на действие радиации.

В клетках костного мозга мышей после пролонгированного облучения отмечалось подавление активности микроРНК. Так, экспрессия miR-125b снижалась в 8.3 и в 4.3 раза ($p < 0.05$) на восьмой и десятый месяц соответственно в группе “Облучение” и в 33 раза в группе “Облучение + опухоль” на десятый месяц. В литературе показано, что miR-125b проявляет свойства онкосу-

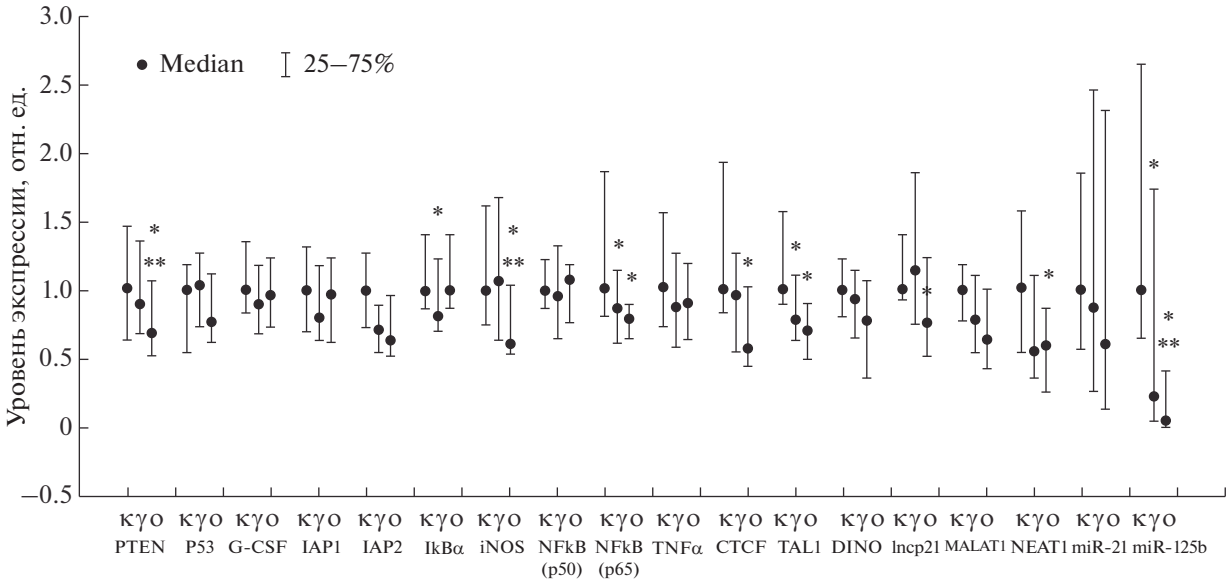

Рис. 2. Содержание мРНК генов, микроРНК и днРНК (медиана и квартили) в костном мозге мышей через десять месяцев после облучения. Для рис. 2, 3: к – необлученная группа (“Биоконтроль”), γ – группа облученных мышей (“Облучение”), о – группа облученных мышей с опухолями (“Облучение + опухоль”), * – указывает на достоверные статистические изменения ($p < 0.05$) по критерию Манна–Уитни между группами “Облучение” и “Биоконтроль” или “Облучение + опухоль” и “Биоконтроль”. ** – указывает на достоверные статистические изменения ($p < 0.05$) по критерию Манна–Уитни между группами “Облучение + опухоль” и “Облучение”. Медиана группы “Биоконтроль” принята за единицу.

прессора при немелкоклеточном раке легкого и раке молочной железы [17]. Наши данные также свидетельствуют о вовлеченности в процесс опухолеобразования miR-125b.

ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из направлений радиобиологических исследований является поиск биомаркеров для ранней диагностики опухолей и оптимизация лучевой терапии при онкопатологиях. Важным вопросом остается определение профиля экспрессии генов и некодирующих РНК как регуляторов, принимающих участие в опухолевом процессе.

На примере активности гена *NFkB* на восьмой и десятый месяцы после облучения можно рассмотреть механизм его изменений и возможность его использования как раннего показателя опухолеобразования. При анализе активности гена *NFkB* в костном мозге мышей нами показано увеличение его экспрессии на восьмой месяц после облучения. Из литературы известно, что транскрипционный фактор (ТФ) NFkB может активироваться двумя различными путями. В отсутствие стрессовых сигналов NFkB находится в цитоплазме клетки в связанном состоянии с его ингибитором IkBα. Активация NFkB связана с деградацией IkBα за счет фосфорилирования IkBα-киназы в ответ на внешние или внутренние воздействия на клетку, такие как провоспалительные цитокины (например, TNFα), бактериальные и вирусные агенты, а также ионизирующее излучение (ИИ). В ответ на эти воздействия запускается канонический путь передачи сигналов, в результате которого свободный NFkB транслоцируется в ядро, где активирует транскрипцию своих генов-мишеней, в том числе гена *IkB*α. Ингибитор IkBα по механизму отрицательной обратной связи тормозит транскрипционный ответ NFkB, связываясь с его димерами и удерживая их в цитоплазме. Таким образом, запускается активация адаптивного иммунитета, клеточное деление, воспалительные и опухолевые процессы [18]. Второй путь активации NFkB осуществляется через протеинкиназу AKT. AKT инициируется в PI3K-сигнальном пути и приводит к клеточному росту, образованию белков теплового шока и делению клеток, а также AKT способна блокировать процессы апоптоза. Это осуществляется за счет фосфорилирования и последующей транспортировки белка mdm2 внутрь ядра с последующим блокированием активности P53. С другой стороны, киназа AKT фосфорилирует белок ikk, что приводит к деградации комплекса NFkB–IkBα и транслокации NFkB в ядро. Функционирование NFkB-системы контролируют активные формы кислорода, в частности iNOS, которая ассоциирована с оксидативным стрессом и генерацией свободных радикалов, оказывающих генотоксическое воздействие и участвующих в онкогенезе [19].

Показано, что после ИИ в течение 30 мин димеры NFkB (p50 и p65) транслоцируются в ядро, где активируют свои гены – мишени [20].

С другой стороны, деградация комплекса NFkB–IkBα осуществляется в ответ на активацию МАРК-пути под воздействием ИИ и сопровождается последующей инициацией клеточной пролиферации как нормальных, так и опухолевых клеток [21]. Кроме того, активация NFkB-системы в клетках различных типов рака может быть связана с устойчивостью опухолей к радио- и химиотерапии [22], а блокирование активности NFkB в различных клеточных линиях включает процессы апоптоза и снижает рост опухоли [23].

Таким образом, основные процессы, возникающие как результат ответа клеток на пролонгированное облучение, были связаны с изменениями NFkB-системы воспалительного ответа и его генов-мишеней – антиапоптотических генов, таких как *IAP1* и *IAP2*, активирующие процессы прогрессии и развития опухолевых клеток и, кроме того, увеличивающие резистентность злокачественных новообразований к терапии.

Подавление NFkB-активности может быть достигнуто за счет сверхэкспрессии его главного регулятора – IkBα, что увеличивает радиочувствительность опухолей при терапии. Однако через десять месяцев после облучения нами выявлено снижение активности гена *NFkB*. Аналогичные результаты изменения экспрессии гена *NFkB* были выявлены при воздействии повреждающей острой дозы (5 Гр) на нормальные лимфоциты человека и клетки линии Jurkat [24]. Пониженная экспрессия гена *NFkB* также наблюдалась и после радиотерапии рака слизистой оболочки рта, что, скорее всего, было связано со снижением активности процессов деления, поскольку NFkB является ТФ для гена *CCND1*, вовлеченного в процессы клеточного цикла [25]. Следовательно, ген *NFkB* может рассматриваться как ранний показатель опухолеобразования.

Кроме того, к десятому месяцу после облучения было показано снижение содержания мРНК гена *PTEN*. Функциональная инактивация *PTEN* может происходить в раковых клетках посредством точечной мутации, делеции гена или эпигенетических механизмов. Мутации гена также могут влиять на рецепторы тирозинкиназы, факторы роста, Ras и субъединицу PI3K p110, что приводит к аномальной сигнальной активности, характерной для опухолевых клеток. Следовательно, многие из генов и белков этого метаболического пути могут быть мишенями при лечении рака. Помимо этого, *PTEN* взаимодействует с *P53* через различные механизмы. Первый из них заключается в ингибировании геном *PTEN* активности *MDM2*, который в нормальных клетках нацелен на деградацию *P53*. Благодаря внешним воздействиям (например, ИИ) происходит подавление активности *MDM2*, разрушение его связи с *P53*, следствием чего является активация последнего. Второй путь активируется за счет индукции повреждений ДНК, что приводит к накоплению белка p53 и активации транскрипции *PTEN*, который по механизму положительной обратной связи защищает *P53* от деградации [26]. Таким образом, ген *PTEN* имеет важное значение в процессах опухолеобразования и может являться биомаркером этого процесса.

В работах по изучению днРНК и микроРНК показано, что они играют важную роль в инициации и развитии опухолей, а дисрегуляция экспрессии обнаружена в различных типах рака. Наиболее значимые изменения были описаны для днРНК lncp21, NEAT1 и miR-125b [27–29].

В наших экспериментах было показано недостоверное повышение экспрессии lncp21 в костном мозге мышей на десятый месяц после облучения в группе “Облучение” и снижение содержания этой днРНК в группе “Облучение + опухоль” ($p < 0.05$).

Известно, что lncp21 является прямой мишенью гена *P53*, а ее экспрессия понижается при раке желудка. Кроме того, продемонстрирована сверхэкспрессия lncp21 после ИИ, что приводило к подавлению пролиферации опухолевых клеток желудка и увеличению радиочувствительности злокачественных клеток. Таким образом, lncp21 проявляла свойства онкосупрессора [27].

Как видно из рис. 2, экспрессия днРНК NEAT1 в группе “Облучение + опухоль” снижалась по сравнению с контрольной группой. В литературе показана его роль и как онкогена [16, 28], и как онкосупрессора [30].

В отношении микроРНК miR-125b нами отмечено снижение ее экспрессии как на восьмой месяц после облучения (в 8.3 раза) в группе “Облучение”, так и на десятый месяц (в 4.3 и 25 раз) в обеих исследуемых группах “Облучение” и “Облучение + + опухоль”. Аналогичные данные были получены при исследовании экспрессии miR-125b в клетках рака шейки матки [31]. MiR-125b является триггером активации NFkB-патологического пути, который запускает процессы клеточной пролиферации, миграции и инвазии за счет воздействия на PI3K/Akt/mTOR патологический путь [29]. Можно полагать, что miR-125b также может служить как показатель ответа на действие радиации.

Оценка активности генов и некодирующих РНК обсуждается при разных патологиях человека в качестве показателей ответа на действие радиации. По этой причине предлагается использовать разные генные структуры в качестве ранних биомаркеров развития патологии, в том числе опухолеобразования, а также ответа на терапию. Некоторые авторы предлагают в качестве чувствительных к радиации мишеней микроРНК. МикроРНК репрезентативны при действии облучения. Так, при иссле-

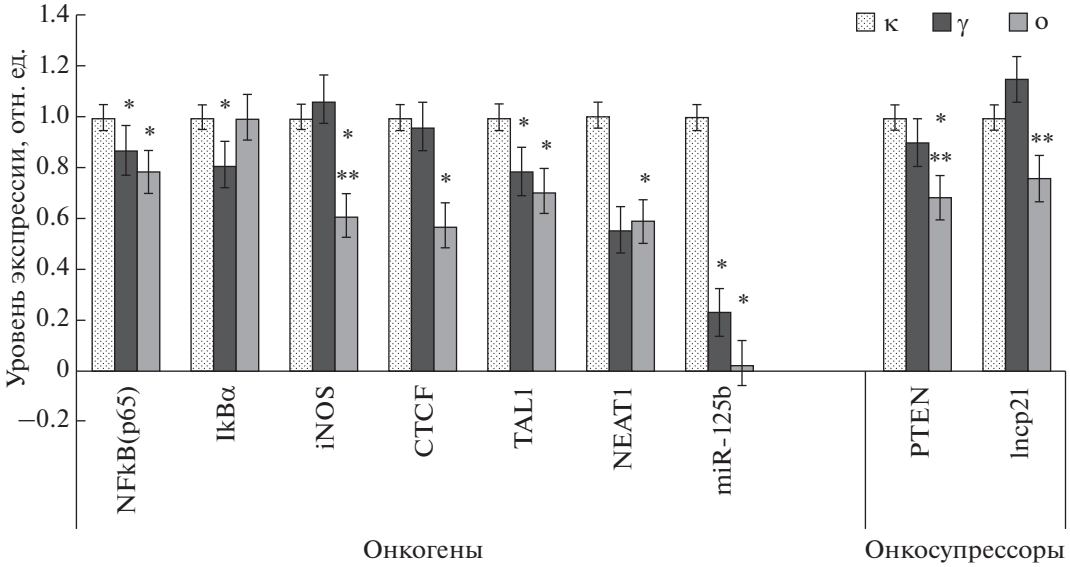

Рис. 3. Содержание мРНК онкогенов и онкосупрессоров (медиана), имеющих статистически значимые различия между изученными группами в костном мозге мышей через десять месяцев после облучения.

довании 576 микроРНК в клетках печени 21 из них могли быть предикторами облучения, что было доказано при использовании девяти разных методов оценки их активности. Преимуществом этих структур является возможность выявления их активности в разных биологических материалах (плазма, слюна, слезы, даже при экстракции из парафинизированных материалов). МикроРНК достаточно стабильны в организме по сравнению с другими молекулами [1].

Другими авторами сделан акцент на днРНК, являющиеся регуляторами генов, поскольку их роль особенно высока в иммунном ответе на радиационное воздействие, что считается главным вкладом в положительные эффекты радиации при разных патологических процессах [10].

Нами использован комплекс генетических структур при анализе изменения экспрессии генов, микроРНК и днРНК как возможных ранних предикторов радиоиндуцированных опухолей.

Исследованные гены и некодирующие РНК были разделены на структуры, обладающие по существующим представлениям онкогенными или супрессорными функциями. На рис. 3 представлены только статистически значимые данные по активности генов, микроРНК и днРНК на десятый месяц после облучения мышей с опухолями и без них.

Суммируя данные по результатам изменения активности исследуемых показателей, можно прийти к выводу о комплексном участии ряда генов, микроРНК и днРНК в радиоиндуцированном опухолеобразовании (рис. 4). За счет активации гена *NFkB* под воздействием ИИ активируются также его гены-мишени (*TNFα*, *G-SCF*, *IAP-1*, *IAP-2*, *IkBα*, *iNOS*, *CTCF*), параллельно с этим происходит подавление активности гена *P53* и его мишеней – гена *PTEN* и днРНК lncp21. В случае микроРНК miR-125b отмечался разнонаправленный эффект. Так, на восьмой месяц после облучения активность гена *NFkB* возрастала, при сниженной активности miR-125b, проявляющей свойства как онкогена, так и онкосупрессора, однако к десятому месяцу экспрессия гена *NFkB* снижалась, в то время как активность miR-125b оставалась пониженной. Такие изменения могут быть связаны не только с ответом клетки на воздействие ИИ, но и с проникновением в костный мозг “онкосом”, выделяемых опухолью.

К восьмому месяцу после облучения 46% онкогенов (6 из 13) проявили свою активность в ответ на действие ИИ (*G-SCF*, *IkBa*, *iNOS*, *NFkB(p50)*, *NFkB(p65)* и *CTCF*) и лишь 31% – подавлялись. Для 60% онкосупрессоров (3 из 5) было характерно ингибирование их экспрессии (*PTEN*, lncp21, miR-125b). К десятому месяцу после облучения в группе “Опухоль” подавлялись все онкосупрессоры и онкогены (100%). Таким образом, к восьмому месяцу после облучения преобладало число активированных онкогенов, что связано с выходом опухолей к десятому месяцу.

Информация о механизмах действия радиации на генетические структуры может быть использована для создания панели биомаркеров конкретных опухолей. Полученные показатели об изменении генных структур в дальнейшем могут служить мишенью для специфической терапии.

Анализ представленных результатов позволяет сделать предварительный вывод о том, что оценка активности генетических показателей (*NFkB(p65)*, *iNOS*, *CTCF*, *TAL1*, днРНК lncp21, NEAT1 и miR-

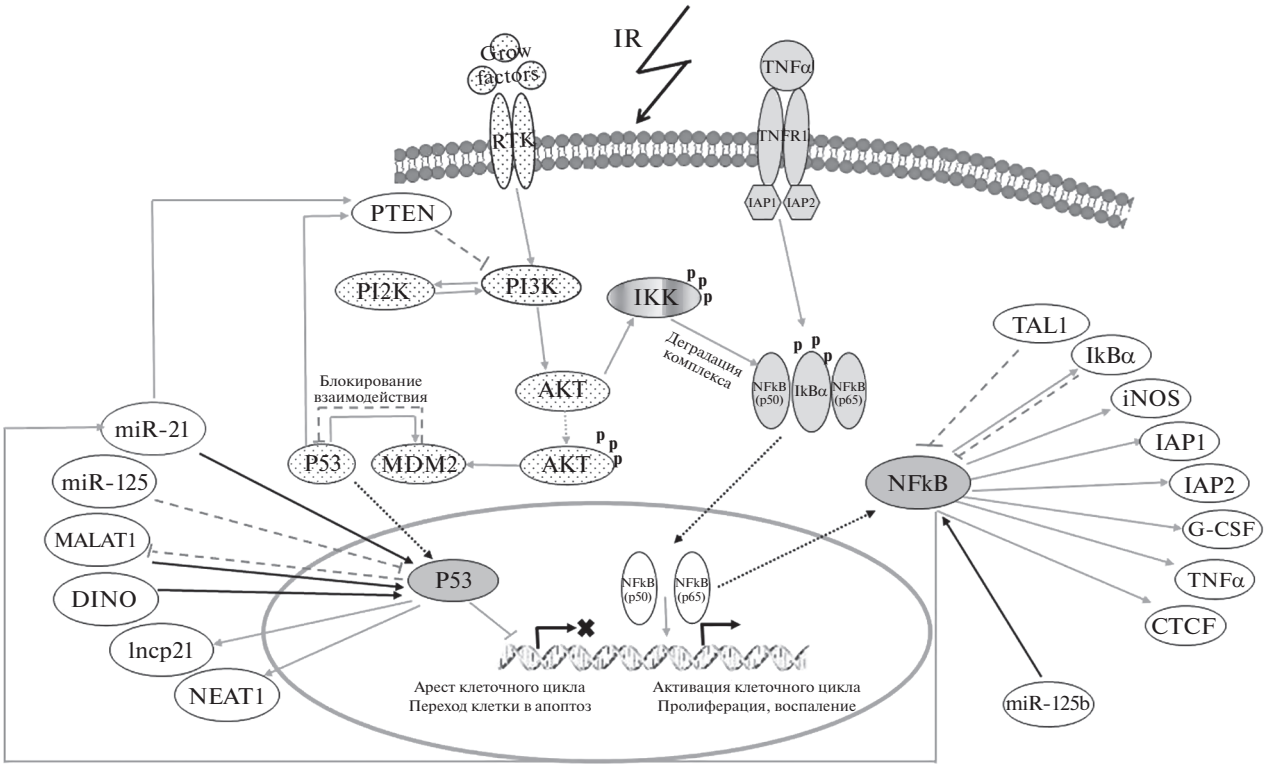

Рис. 4. Формирование патологических путей генов *P53* и *NFkB* при действии радиации в опухолевых клетках. Овалы с черными точками – PI3K-путь, светло-серые – NFkB-путь, серые – активированные гены *P53* и *NFkB*, белые – мишени/активаторы генов *P53* и *NFkB*. p – фосфорилированный продукт. Черные стрелки – пути активации P53 и NFkB, серые стрелки – мишени генов *P53* и *NFkB*, серые штриховые линии – блокирование транскрипции и экспрессии гена, прерывистые линии – активация гена с транслокацией в/из ядра.

125b) может быть использована для раннего прогноза радиоиндуцированного опухолеобразования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы развития ядерной медицины “АО Наука и инновация” ГК Росатом и по теме Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН (госзадание № 0112-2019-0002).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Duale N., Eide D.M., Amberger M.L. et al.* Using prediction models to identify miRNA-based markers of low dose rate chronic stress // Science Total Environment. 2020. V. 717. № 137068. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137068

2. *GaiC., Camussi F., Broccoletti R. et al.* Salivary extracellular vesicle-associated miRNAs as potential biomarkers in oral squamous cell carcinoma // B.M.C. Cancer. 2018. V. 18. № 439. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4364-z

3. *Tomasik B., Chalubinska-Fendler J., Chowdhury D., Fendleret W.* Potential of serum microRNAs as biomarkers of radiation injury and tools for individual of radiotherapy // Transl. Res. 2018. V. 201. P. 71–83. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.06.001

4. *Wilke C.M., Hess J., Klymenko S.V. et al.* Expression of miRNA-26B-5P and its target TRPS1 is associated with radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer // Int. J. Cancer. 2018. V. 142. № 3. P. 573–583. https://doi.org/10.1002/ijc.31072

5. *Melachowska B., Tomasik B., Stawiski K. et al.* Circulating microRNA as biomarkers of radiation exposure: A systematic review and meta-analysis // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2020. V. 106. № 2. P. 390–402. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.10.028

6. *Shyu Y.C., Lee T.-L., Lu M.-J. et al.* miR-122-mediated translational repression of PEG10 and its suppression in human hepatocellular carcinoma // J. Transl. Med. 2016. V. 14. № 200. https://doi.org/10.1186/s12967-016-0956-z

7. *Zampetaki A., Albrecht A., Steinhofel K.* Long non-coding RNA structure and function: Is there a link? // Front. Physiol. 2018. V. 9. № 1201. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01201

8. Gencode V 37 release EMBL-EBI. 2020. URL: https://www.gencodegenes.org/human/stats.html (дата обращения: 15.03.2021 г.).

9. *Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Васильева И.М. и др.* Профили экспрессии генов и некодирующих РНК в биоптатах тканей и клетках крови пациентов с разной патологией после радиационного воздействия // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2019. № 1. С. 103–111.

10. *Qi Z., Guo S., Li C. et al.* Integrative analysis for the roles of IncRNAs in the immune responses of mouse PBMC exposed to low-dose ionizing radiation // Dose-Response. 2020. V. 18. № 1. P. 1–11. https://doi.org/10.1177/1559325820913800

11. *O'Leary V.B., Ovsepian S.V., Carrascosa L.G. et al.* PARTICLE, A triplex-forming long ncRNA, regulates locus-specific methylation in response to low-dose irradiation // Cell Rep. 2015. V. 11. № 3. P. 474–485. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.043

12. *Bayoumi A.S., Sayed A., Broskova Z. et al.* Crosstalk between long noncoding RNAs and microRNAs in health and disease // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 3. P. 356. https://doi.org/10.3390/ijms17030356

13. *Aryankalayil M.J., Chopra S., Levin J. et al.* Radiation-induced long noncoding RNAs in a mouse model after whole-body irradiation // Radiat. Res. 2018. V. 189. № 3. P. 251–263. https://doi.org/10.1667/RR14891.1

14. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods (San Diego, Calif.). 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

15. *Jiang Y., Jin S., Tan S. et al.* Long noncoding RNA NEAT1 regulates radio-sensitivity via microRNA-27b-3p in gastric cancer // Cancer Cell Intern. 2020. V. 20. № 581. https://doi.org/10.1186/s12935-020-01655-4

16. *Салеева Д.В., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В. и др.* Функционирование регуляторных РНК, влияющих на развитие опухолевых клеток, у больных раком гортани // Патол. физиология и эксперим. терапия. 2018. Т. 62. № 4. С. 67–74. https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.67-74

17. *Vo D.T., Karanam N.K., Ding L. et al.* MiR-125ba-5p functions as tumor suppressor microRNA and is a marker of locoregional recurrence and poor prognosis in head and neck cancer // Neoplasia. 2019. V. 21. № 9. P. 849–862. https://doi.org/10.1016/j.neo.2019.06.004

18. *Karin M., Greten F.R.* NFkB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression // Nat. Rev. Immunol. 2005. V. 5. № 10. P. 749–759. https://doi.org/10.1038/nri1703

19. *Simon P.S., Sharman S.K., Lu C. et al.* The NF-kB p65 and p50 homodimer cooperate with IRF8 to activate iNOS transcription // B.M.C. Cancer. 2015. V. 15. № 770. https://doi.org/10.1186/s12885-015-1808-6

20. *Chishti A.A., Baumstark-Khan C., Koch K. et al.* Linear energy transfer modulates radiation-induced NF-kappaB activation and expression of its downstream target genes // Radiat. Res. 2018. V. 189. № 4. P. 354–370. https://doi.org/10.1667/RR14905.1

21. *Suzuki K., Kodama S., Watanabe M.* Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells // Cancer Res. 2001. V. 61. № 14. P. 5396–5401.

22. *Orlowski R.Z., Baldwin A.S.* NF-kappaB as a therapeutic target in cancer // Trends. Mol. Med. 2002. V. 8. № 8. P. 385–389. https://doi.org/10.1016/s1471-4914(02)02375-4

23. *Tang G., Minemoto Y., Dibling B. et al.* Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes // Nature. 2001. V. 414. № 6861. P. 313–317. https://doi.org/10.1038/35104568

24. *Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф. и др.* Влияние малых доз ионизирующей радиации на экспрессию генов и некодирующих РНК в нормальных и злокачественных клетках человека // Цитология. 2019. Т. 61. № 6. С. 427–438. https://doi.org/10.1134/S0041377119060051

25. *Sonis S.T.* The pathobiology of mucositis // Nat. Rev. Cancer. 2004. V. 4. P. 277–284. https://doi.org/10.1038/nrc1318

26. *Trotman L.C., Pandolfi P.P.* PTEN and p53: Who will get the upper hand? // Cancer Cell. 2003. V. 3. № 2. P. 97–99. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00022-9

27. *Chen L., Yuan D., Yang Y., Ren M.* LincRNA-p21 enhances the sensitivity of radiotherapy for gastric cancer by targeting the β-catenin signaling pathway // J. Cell Biochem. 2018. V. 120. № 4. P. 6178–6187. https://doi.org/10.1002/jcb.27905

28. *Li S.F., Li J.M., Chen C. et al.* Pan-cancer analysis of long non-coding RNA NEAT1 in various cancers // Genes Dis. 2018. V. 5. № 1. P. 27–35. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.11.003

29. *Zheng Z., Qu J.-Q., Yi H.-M. et al.* MiR-125b regulates proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma by targeting A20/NF-κB signaling pathway // Cell Death & Disease. 2017. V. 8. P. e2855. https://doi.org/10.1038/cddis.2017.211

30. *Zeng C., Liu S., Lu S. et al.* The c-Myc-regulated lncRNA NEAT1 and paraspeckles modulate imatinib-induced apoptosis in CML cells // Mol. Cancer. 2018. V. 17. № 1. P. 130. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0884-z

31. *Pedroza-Torres A., Campos-Parra A.D., Millan-Catalan O. et al.* MicroRNA-125 modulates radioresistance through targeting p21 in cervical cancer // Oncol. Rep. 2018. V. 39. № 3. P. 1532–1540. https://doi.org/10.3892/or.2018.6219

Activity of Genes and Non-Coding RNA as an Approach to Early Biomarkers Determination of Radiation-Induced Cancer in Mice

V. F. Mikhailov[a, †], D. V. Saleeva[a, *], L. M. Rozhdestvensky[a], L. V. Shulenina[a], N. F. Raeva[a], and G. D. Zasukhina[a, b]

[a] *Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, 123098 Russia*

[b] *Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: dasha_saleeva@inbox.ru*

The activity of genes and non-coding RNAs was studied in 183 hybrid mice (CBA × C57Bl) F_1 after low-power prolonged irradiation (during 21 hours with a dose of 12.6 Gy, with a dose rate of 10 mGy/min). The parameters in the bone marrow of mice at eight and ten months after irradiation were analyzed. After ten months, 14 of the 94 studied animals were found to have radiation-induced lymphomas in the liver, abdominal cavity and subcutaneously. Genetic parameters were divided into two groups: oncogenes and tumor suppressors, the activation of which was compared at eight and ten months after irradiation. We found out, that the activity of tumor suppressors (*PTEN* and lncp21) in the groups of mice with tumors was lower in comparison with the group of mice without cancer, while the activity of oncogenes (*NFkB (p65)*, *IkBa*, *iNOS*, *TAL1*, *CTCF*, lncRNA NEAT1 and miR-125b) increased. These parameters can be considered as potential biomarkers of radiation-induced cancer.

Keywords: biomarkers, radiation-induced cancer, long non-coding RNAs, microRNAs.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1141–1157

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 577.214.5:612.392.98:613.24:616-092.9

ВЛИЯНИЕ ДОБАВОК КАРНИТИНА, РЕСВЕРАТРОЛА И АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ К РАЦИОНУ С ИЗБЫТКОМ ЖИРА И ФРУКТОЗЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС: ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2021 г.
Н. В. Трусов[1, *], С. А. Апрятин[1], В. А. Шипелин[1, 2], А. А. Шумакова[1], И. В. Гмошинский[1, **], Д. Б. Никитюк[1, 3], В. А. Тутельян[1, 3]

[1]Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, 109240 Россия

[2]Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, Москва, 117997 Россия

[3]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*e-mail: nikkitosu@yandex.ru

**e-mail: gmosh@ion.ru

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.
После доработки 16.02.2021 г.
Принята к публикации 02.03.2021 г.

В печени крыс-самцов линии Wistar, получавших в течение 63 сут рационы с избытком жира и фруктозы и добавками l-карнитина, ресвератрола, тирозина или триптофана, изучали дифференциальную экспрессию 30584 генов, представленных на микрочипе, методом полнотранскриптомного профилирования по протоколу Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling (version 6.8). Для выявления метаболических путей (KEGGS), являющихся мишенями применявшихся диетических воздействий, транскриптомные данные анализировали методами биоинформатики в среде “R”. Полученные данные позволяют предположить, что поступление в организм биологически активных веществ – модуляторов липидного обмена, включая l-Кар, Рес и ароматические аминокислоты Тир и Трп, несмотря на явные различия в первичных мишенях их воздействия и фенотипических последствиях для организма на тканевом и органном уровне, задействует на промежуточных стадиях комплекс во многом сходных и взаимосвязанных по своей функции генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, пролиферации, апоптоза, межклеточных взаимодействий, иммунной реакции и воспаления, причем знак ДЭ каждого из этих генов, взятых по отдельности, не позволяет однозначно прогнозировать направленность процессов, проявляющихся в усилении или, напротив, ослаблении липогенеза и наблюдаемого накопления жировых включений в клетках печени. Новым не описанным в доступной литературе стал дифференцированный эффект между l-Кар, Рес и Тир, с одной стороны, и Трп, с другой, на метаболический путь арахидоновой кислоты, включая процессы образования из нее оксилипинов (липоксинов), простагландинов и тромбоксанов.

Ключевые слова: транскриптом, крысы, ресвератрол, l-карнитин, тирозин, триптофан.

DOI: 10.31857/S0016675821100131

Использование минорных биологически активных веществ (**БАВ**), способных активно влиять на процессы липидного и углеводно-энергетического обмена, модулировать пищевое поведение, создавать условия для повышения физической активности в сценариях повседневной деятельности, рассматривается как одно из магистральных направлений развития диетотерапии ожирения и связанных с ним алиментарно-зависимых заболеваний (метаболического синдрома, сахарного диабета 2-го типа, артериальной гипертонии, атеросклероза и др.) [1–3]. Диетическое применение различных групп таких веществ в персонифицированной терапии затруднено без понимания природы и механизмов их воздействия на обменные процессы у больных, различающихся как по своему генотипу, так и по тяжести и развитию патологического процесса. В роли наиболее популярных БАВ, потенциальных модуляторов жирового и углеводно-энергетического обмена, выступают: 1) l-карнитин (l-Кар), витаминоподобное вещество с функцией транспорта жирных кислот через двойную мембрану митохондрий, действие которого механистически трактуется в

качестве “сжигателя жира” [4, 5]; 2) полифенольные соединения, традиционно рассматриваемые по характеру своего действия как антиоксиданты, в том числе кверцетин и ресвератрол (Рес) [6, 7]; 3) большие нейтральные аминокислоты, роль которых сводится к модуляции транспорта через гематоэнцефалический барьер тирозина (Тир) и триптофана (Трп) – предшественников нейротрансмиттеров дофамина и серотонина, играющих ключевую роль в центральной регуляции систем вознаграждения, пищевого поведения и направленности метаболических реакций [8]. Вместе с тем исследования последних лет позволяют предположить, что природа действия указанных БАВ на организм больного не исчерпывается приведенными простыми механистическими объяснениями, а связана со сложной группой факторов, включая экспрессию целого комплекса генов. Этим может объясняться неоднозначность результатов клинического применения БАВ в диетическом и специализированном питании [9, 10].

Цель настоящего исследования – выявление новых нутригеномных механизмов воздействия БАВ (l-Кар, Рес, Тир, Трп) на организм крыс, получающих избыточный по удельной энергетической ценности рацион, с использованием метода полнотранскриптомного профилирования ткани печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы 48 самцов крыс (возраст 8 нед., исходная масса тела 200 ± 10 г) аутбредной линии Wistar, полученных из питомника “Столбовая”. Работу с животными выполняли в соответствии с международными рекомендациями [11]. Дизайн эксперимента был одобрен Комитетом по этике ФГБУН “ФИЦ питания и биотехнологии” (протокол № 4 от 20.04.2017 г.).

Крысы были разделены на шесть групп равной численностью по восемь особей. Средняя масса тела в сформированных группах изначально достоверно не различалась ($p > 0.1$; ANOVA). Животные 1-й (контрольной) группы получали сбалансированный полусинтетический рацион по AIN93M с некоторыми модификациями [12] и очищенную обратным осмосом питьевую воду, 2-й группы – высокоуглеводный, высокожировой рацион, в котором по сравнению с контрольным рационом было повышено до 30% по массе сухих веществ содержание жира (в форме смеси 1 : 1 подсолнечного масла и свиного лярда) и питьевая вода заменена на 20%-ный раствор фруктозы (ВУВЖР), 3-й группы – ВУВЖР с добавлением l-Кар (производства фирмы Wirud (Германия), 98% чистоты по данным ВЭЖХ) в расчетной дозе 300 мг/кг массы тела (м.т.), 4-й группы – ВУВЖР с добавлением Рес (производства фирмы DSM, Голландия, торговая марка resVida®, 98% чистоты по данным ВЭЖХ) в расчетной дозе 25 мг/кг м.т., 5-й и 6-й групп – ВУВЖР с добавлением соответственно Тир в расчетной дозе 1250 мг/кг м.т. и Трп в расчетной дозе 250 мг/кг м.т. Аминокислоты Тир и Трп производства компании Wirud имели показатели чистоты 99.5% по данным ВЭЖХ.

Крыс содержали по две особи в клетках из поликарбоната при температуре 21 ± 1°C и режиме освещения 12/12 ч. Общая продолжительность кормления рационами составила 63 сут. На протяжении эксперимента ежедневно определяли количество потребленного корма и выпитой жидкости, еженедельно – м.т. животных с точностью ±0.1 г, наблюдали за внешним видом, активностью, состоянием шерстного покрова, особенностями поведения.

Выведение животных из эксперимента осуществляли на 64-е сут путем декапитации под эфирной анестезией. Отбирали две пробы ткани печени, первую из которых фиксировали в растворе 3.7%-ного формальдегида в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.00 ± 0.05, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации, пропитывали ксилолом и заливали гомогенизированной парафиновой средой Histomix. Парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм изготавливали на микротоме Microm HM355s (Leica, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике и исследовали в микроскопе AxioImager Zl (Zeiss, Германия) с цифровой фотокамерой при ув. ×200.

Из второй пробы печени выделяли тотальную РНК с помощью набора Agilent Total RNA Isolation Mini Kit (Agilent Technologies, США). Навеску 20 мг печени гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эдельвейма в 500 мкл лизирующего буфера (с добавлением 5 мкл β-меркаптоэтанола на 500 мкл буфера) при температуре 0–2°C. Дальнейшие процедуры проводили в соответствии со стандартным протоколом [13]. Полученную тотальную РНК дополнительно обрабатывали ДНКазой I для удаления следов геномной ДНК. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000, после чего разбавляли ее водой без нуклеаз до концентрации 200 нг/мкл и проводили анализ степени фрагментации на Agilent Bioanalyzer 2100 с определением показателя RIN (RNA Integrity Number). РНК хранили в воде, свободной от нуклеаз, или в виде изопропанольных осадков при –80°C.

Полнотранскриптомное профилирование печени на микрочипах, входящих в состав Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies), проводили по протоколу Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling, version 6.8 [14]. В работе использовали микрочипы SurePrint G3 Rat Gene Expression v2 8x60K Microarray Kit (каталожный номер

G4852A-074036). Согласно информации производителя на микрочипе представлены олигонуклеотидные зонды длиной 60 нуклеотидов для покрытия 30584 генов крысы. На трех микрочипах представлены 24 независимых образца РНК печени по четыре образца из каждой группы. Сканирование микрочипов выполняли на приборе SureScan Microarray Scaner производства Agilent Technologies. Величину дифференциальной экспрессии (ДЭ) выражали в виде логарифма по основанию 2 ($\log_2$FC) возрастания или убывания флуоресценции по сравнению с контрольной группой или по сравнению с внутренними контролями микрочипа (Spike-In). Достоверность изменения экспрессии оценивали путем анализа логарифмов интенсивности флуоресценции, нормализованных по внутренним контролям (Spike-In) с использованием Т-теста с множественной коррекцией Benjamini–Hochberg [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интегральные показатели животных

В ходе эксперимента крысы всех групп постоянно прибавляли в массе тела, были активными, имели нормальный внешний вид, нормальное состояние шерстного покрова и слизистых оболочек; заболеваемость и летальность отсутствовали. Животные всех групп, получавших ВУВЖР, потребляли на 35–45% больше энергии рациона в расчете на единицу массы тела в сравнении с контрольной группой на протяжении всего эксперимента ($p < 0.05$, t-тест Стьюдента для попарно связанных среднегрупповых значений). Энергетическая ценность рациона, потребляемого крысами групп ВУВЖР и ВУВЖР со всеми добавками, различалась в пределах ±10–15%. Крысы, получавшие только ВУВЖР, характеризовались наибольшими прибавками массы тела, а добавка к этому рациону Трп и l-Кар приводила к достоверному снижению скорости прибавки массы тела ($p < 0.05$, t-тест Стьюдента). При выведении из эксперимента (см. ниже) крысы всех групп, получавших ВУВЖР, характеризовались увеличенной относительной массой печени и забрюшинного белого жира по сравнению с контрольной группой, независимо от применявшихся добавок ($p < 0.05$, ANOVA, по фактору “рацион”).

Морфологическое исследование печени

Светооптическое морфологическое исследование печени (рис. 1) показало в целом нормальную структуру ткани органа у крыс контрольной группы с небольшим количеством жирозапасающих клеток, свойственным животным данного возраста (рис. 1,*а*). У крыс, получавших ВУВЖР, отмечается выраженная картина жировой дистрофии печени с резким возрастанием объема вакуолей в жирозапасающих клетках (рис. 1,*б*). Добавка l-Кар приводила к значительному сокращению проявлений жирового гепатоза, однако сопровождалась усиленной пролиферацией эозинофилов (рис. 1,*в*). При потреблении добавки Рес признаки жировой дистрофии печени изменялись (рис. 1,*г*), а именно жирозапасающие клетки распределялись неравномерно, концентрируясь в основном в периваскулярной области печеночных долек. Введение в рацион добавки Тир приводило (рис. 1,*д*) к небольшому ослаблению выраженности жировой дистрофии, судя по количеству и объему жирозапасающих клеток, что согласуется с данными, полученными нами ранее на крысах линий Wistar и DAT-KO [12], свидетельствующими о влиянии дофамина (предшественником которого является Тир) как на метаболические процессы в печени, так и липидный и углеводный обмен в целом. Наконец, в условиях потребления Трп (рис. 1,*е*) признаки жирового гепатоза (с признаками стеатоза) значительно усиливались с появлением крупных жировых вакуолей, не имеющих хорошо различимых ядер и другой внутриклеточной структуры.

Полнотранскриптомное профилирование печени

Из числа проанализированных генов дифференциальная экспрессия по сравнению с контролем на уровне $|\log_2 FC| \geq 0.5$ (в сторону как усиления, так и ослабления, по сравнению с показателями для контрольной группы 1), вызванная потреблением экспериментальных рационов в группах 2–6, получавших ВУВЖР и соответствующие добавки БАВ, установлена в общей сложности для 213 (0.7% от общего количества), 179 (0.6%), 415 (1.4%), 355 (1.2%) и 357 (1.2%) генов соответственно. По сравнению с группой 2, получавшей ВУВЖР, в группах крыс с 3-й по 6-ю, получавших добавки БАВ, выявлена ДЭ для 26, 12, 19 и 19 генов (0.085, 0.039, 0.062 и 0.062% от общего количества). Таким образом, общая величина ответа транскриптома печени (по числу ответивших генов) оказывается многократно большей на потребление собственно ВУВЖР, чем на потребление любой из изученных добавок по сравнению с ВУВЖР без добавки.

Двумерное распределение изученных генов по величине их ДЭ, в зависимости от статистической достоверности (p_{value}) результата в виде т.н. “Volcano plots” приведено на рис. 2. Эти данные показывают, что степень выраженности ответа транскриптома, определяемая количеством генов в верхних левом и правом квадрантах диаграмм, намного выше на потребление ВУВЖР, чем на потребление всех применявшихся добавок.

Общее число генов с ДЭ большей 0.5 по модулю, по группам животных, получавших четыре вида БАВ, по сравнению с группой 2, получавшей ВУВЖР (с учетом дублирования генов в ряде

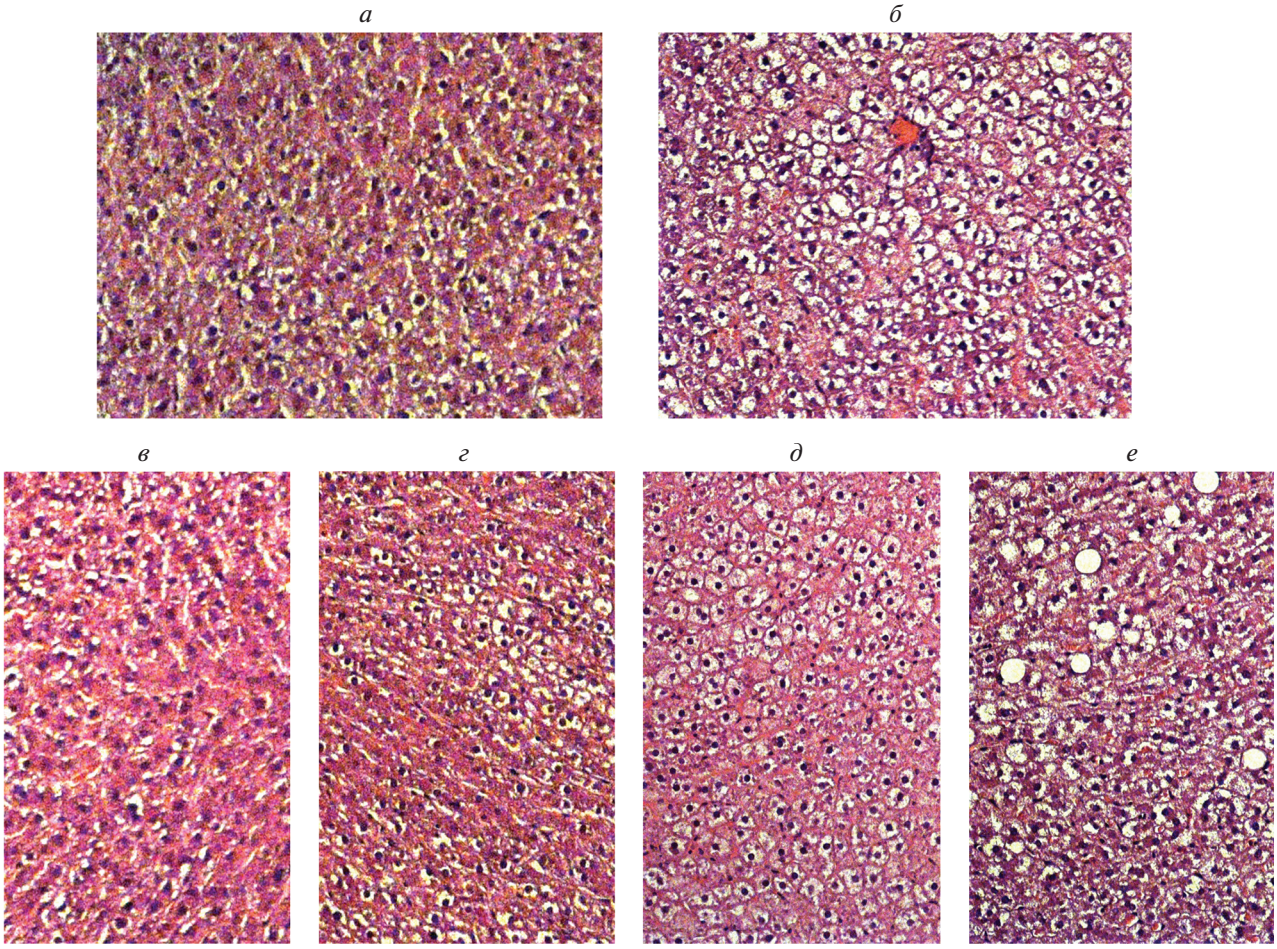

Рис. 1. Репрезентативные микрофотографии срезов печени крыс: *а* – контрольная группа (1-я); *б* – группа, получавшая ВУВЖР (2-я); *в* – группа, получавшая добавку l-Кар (3-я); *г* – группа, получавшая добавку Рес (4-я); *д* – группа, получавшая добавку Тир (5-я); *е* – группа, получавшая добавку Трп (6-я). Окраска гематоксилин-эозином. Микроскоп AxioImager Zl (Zeiss), ув. ×200.

групп), составило 39 генов. Их теоретико-множественное распределение (диаграмма Венна) представлено на рис. 3.

Как показывает диаграмма, в группе 3 (l-Кар), выявлено 11 генов, уникально ответивших на потребление этой добавки, в группе 4 (Рес) – пять генов, в группе 5 (Тир) – четыре гена и в группе 6 (Трп) – пять генов. Общими ответившими только для групп 3 и 5, групп 5 и 6 были по два гена, для групп 3 и 4; 3 и 6; 4 и 5; 3, 4 и 5; 4, 5 и 6 – по одному гену, 3, 5 и 6 – четыре гена. Общим ответившим во всех группах, получавших БАВ, был только один ген – *Proser2*, функция которого в печени недостаточно изучена. Перечень дифференциально ответивших генов, с указаниями их ДЭ, приведен в табл. 1.

Как следует из полученных данных, имеется только очень ограниченное соответствие между генами крыс, ответившими достоверной ДЭ (adj.p.value < 0.05) на потребление ВУВЖР (по сравнению с контрольным рационом) и на потребление всех тестируемых БАВ. Так, в случае l-Кар (группа 3) выявлен только один такой ген (*Defb43*), для Рес (группа 4) – два (*Defb43* и один неидентифицированный транскрипт), для Трп (группа 6) – один (*Abcg8*). Для Тир такие гены не выявлены. На рис. 4 представлена “тепловая” карта (heat map) экспрессии генов во всех экспериментальных группах животных по отношению к внутренним контролям (Spike-In), которая демонстрирует степень сходства либо различия вызванных диетическими факторами изменений в генной экспрессии, произошедших во всех экспериментальных группах. Видно, что по данному показателю группы животных 3 и 5, получавшие l-Кар и Тир, входят в один тесный кластер, к ним примыкает группа 6, получавшая Трп, и в меньшей степени группа 4 (Рес). Сходство в ДЭ генов на всех видах добавок

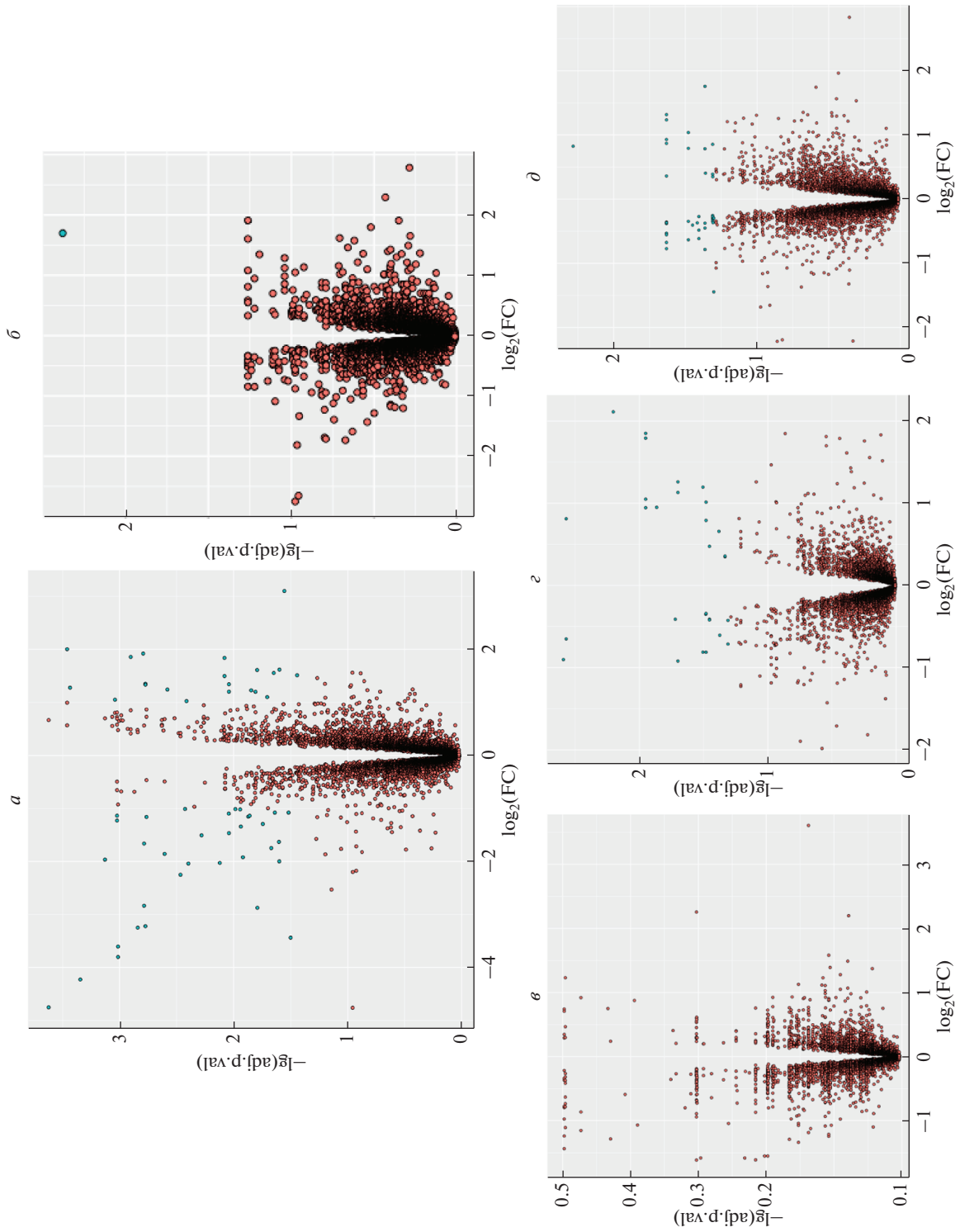

Рис. 2. Диаграммы Volkano plots распределения ДЭ генов в зависимости от статистической достоверности ее определения: *а* – группа 2 по сравнению с группой 1; *б–д* – группы 3–6 по сравнению с группой 2. Ось абсцисс – ДЭ ($\log_2$FC); ось ординат – достоверность различия с поправкой Benjamini–Hochberg, –lg(adj. P value). Обозначения групп – см. подпись к рис. 1.

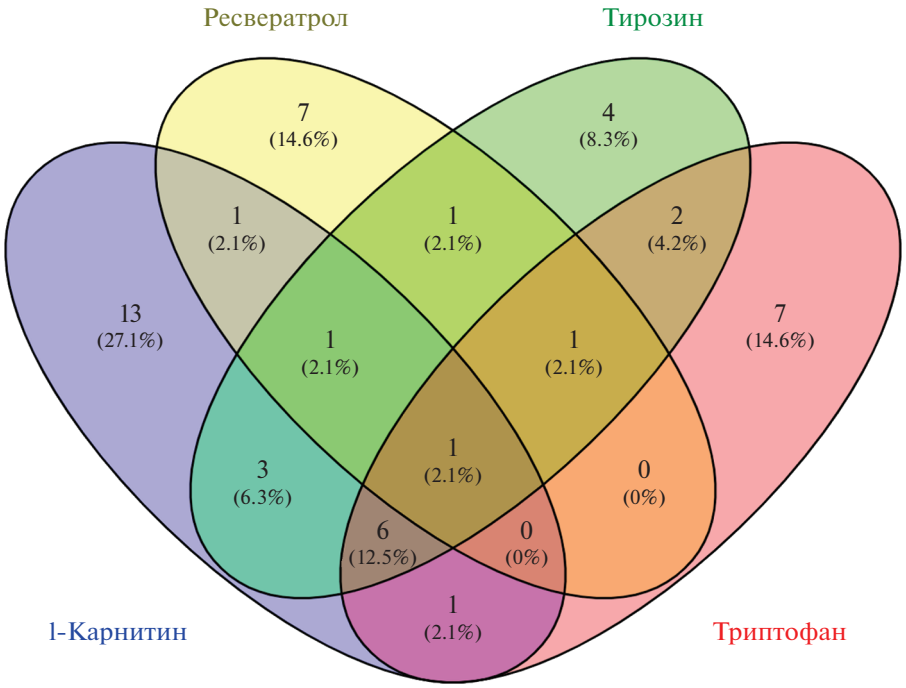

Рис. 3. Диаграмма Венна распределения числа генов, ответивших достоверной ДЭ на применяемые диетические воздействия (добавки l-Кар, Рес, Тир, Трп), по сравнению с группой крыс, получавших ВУВЖР.

с таковым в группе, получавшей только ВУВЖР, практически отсутствует.

Анализ профилей ДЭ генов по группам животных в среде "R" позволил выявить 28 метаболических путей (KEGGs), являющихся мишенями воздействия применяемых экспериментальных условий (табл. 2). Из числа затронутых под воздействием БАВ метаболических путей наибольшее число (9) относится к путям липидного метаболизма, шесть – пищеварения (полостного и внутриклеточного), четыре – иммунного ответа и распознавания, по три – обмена стеринов, клеточной пролиферации и дифференцировки, два – метаболизма ксенобиотиков, один – мембранного транспорта.

Обращает на себя внимание, что PPAR- и JAK-STAT-сигнальные пути, являющиеся согласно ранее полученным данным [16, 17] объектами воздействия избытка жира, фруктозы и холестерина рациона, в условиях данного эксперимента модифицируются только под действием l-Кар и Рес соответственно. Для добавки Тир характерным является влияние на метаболизм ксенобиотиков и лекарственных препаратов (системы цитохромов P450 (CYP450)) и сопряженный с ним метаболизм стероидных гормонов в печени, а также на метаболизм ретиноидов, являющийся, по данным [18], также мишенью воздействия избытка жира и углеводов в рационе. Метаболический путь биосинтеза стероидных гормонов (rno00100) оказывается затронутым у крыс, получавших добавки Рес и обеих аминокислот, а метаболизм арахидоновой кислоты и ее производных (rno00590) – под влиянием всех диетических воздействий. Метаболических путей, являющихся специфическими мишенями воздействия Трп (но не других БАВ), выявлено не было.

Анализ влияний, оказываемых различными БАВ на идентифицированные метаболические пути, показывает, что направленность этих изменений является в большом числе случаев противоположной той, которая наблюдается под влиянием ВУВЖР по сравнению с контрольным рационом. В качестве примера можно привести метаболический путь окисления арахидоновой кислоты (rno00590), продуктами которого являются различные липоксины (оксилипины), представляющие собой гидроксиэйкозатриеновые и гидроксиэйкозатетраеновые кислоты, простагландины и тромбоксаны. Как следует из данных, представленных на рис. 5, при потреблении ВУВЖР наблюдается метаболический блок в образовании простациклина, 6-keto-$PGF_1\alpha$ и 6-keto-PGE_1 из PGH_2. Под действием Рес, Тир и в относительно меньшей степени l-Кар, но не Трп, данный метаболический блок преодолевается. Помимо этого, у крыс, получающих ВУВЖР, снижена экспрессия фосфолипазы A2 (лецитиназа, код фермента (КФ) 3.1.1.4), осуществляющей

Таблица 1. Список генов крыс с дифференциальной экспрессией в печени в ответ на применяемые диетические воздействия

Группа	Гены		
	обозначение	функция**	ДЭ (lgFC)****
Гены с дифференциальной экспрессией по сравнению с контролем (группой 1)			
Группа 2*	*Oat*	Ornithine aminotransferase	2.00
	Abcg8	ATP binding cassette subfamily G member 8	1.92
	Cyp7b1	Cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1	1.86
	Inmt	Indolethylamine N-methyltransferase	1.62
	Dhrs7l1	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7-like 1	1.51
	Nrep	Neuronal regeneration related protein	1.50
	Akr1c3	Aldo-keto reductase family 1, member C3	1.35
	Gpt	Glutamic-pyruvic transaminase	1.34
	Cyp3a9	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 9	1.28
	Obp3	Alpha-2u globulin PGCL4	1.24
	Apof	Apolipoprotein F	–2.00
	Tnfrsf9	TNF receptor superfamily member 9	–2.03
	Mthfd2	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2	–2.04
	Psat1	Phosphoserine aminotransferase 1	–2.25
	Adm2	Adrenomedullin 2	–2.84
	Pla2g2a	Phospholipase A2 group IIA	–2.88
	Asns	Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	–3.25
	Cib2	Calcium and integrin binding family member 2	–3.44
	Asns	Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	–3.80
	Phgdh	Phosphoglycerate dehydrogenase	–4.75
Гены с дифференциальной экспрессией по сравнению с группой 2 (ВУВЖР)			
Только группа 3 (l-Кар)	*Insig1*	Insulin-induced gene 1	1.34
	Sez6	Seizure-related 6	0.856
	Btg1	b-Cell translocation gene 1	0.586
	Car5a	Carbonic anhydrase va	–0.847
	Pheta1	Family with sequence similarity 109, member a	–0.521
	Hist1h1d	h1 histone family, member d	–0.537
	Zkscan7	Zinc finger protein with krab and scan domains 1	–0.576
	Nedd4l	Ubiquitin protein ligase nedd4-like	–0.579
	Ajuba	Ajuba lim protein	–0.732
	Tnfaip2	Tumor necrosis factor-alpha-induced protein 2	–0.753
	Ablim3	Actin-binding lim protein family, member 3	–1.088
Только группа 4 (ресвератрол)***	*Trappc3l*	Trafficking protein particle complex 3-like	–0.734
	Tns1	Tensin 1	–0.783
	Plk2	Polo-like kinase 2	–0.797
	Evc2	Evc ciliary complex subunit 2	–0.975

Таблица 1. Окончание

Группа	Гены		
	обозначение	функция**	ДЭ (lgFC)****
Только группа 5 (тирозин)	*Mfsd2a*	Major facilitator superfamily domain containing 2A	1.851
	Ankrd37	Ankyrin repeat domain 37	0.658
	Hba1	Hemoglobin, alpha 1	–0.713
Только группа 6 (триптофан)	*Exosc5*	Exosome component 5	–0.530
	Nlrp12	NLR family, pyrin domain containing 12	–0.556
	Gata4	GATA binding protein 4	–0.614
	Dhcr24	24-Dehydrocholesterol reductase	–0.784
	Abcg8	ATP binding cassette subfamily G member 8	–1.446
Общие только для групп 3 и 4	*Defb43*	Defensin beta 43	–0.847/–0.775
Общие только для групп 3 и 5***	*Per1*	Period circadian regulator 1	1.602/2.112
	Car2	Carbonic anhydrase 2	–0.846/–0.971
Общие только для групп 3 и 6	*Lpin1*	Lipin 1	1.908/1.757
Общие только для групп 5 и 6	*Calr*	Calreticulin	0.811/0.823
	Baiap2	BAI1-associated protein 2	–0.605/–0.603
Общие для групп 3–5	*Rasgef1b*	RasGEF domain family, member 1B	1.285/1.226/1.792
Общие для групп 3, 5, 6	*Irf2bp2*	Interferon regulatory factor 2 binding protein 2	1.697/1.261/1.316
	Gadd45b	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	0.983/1.120/1.234
	Jdp2	Jun dimerization protein 2	0.699/0.792/0.790
	Lpar6	Lysophosphatidic acid receptor 6	–0.670/–0.902/–0.676
Общие для групп 4–6	*Cebpd*	CCAAT/enhancer binding protein delta	0.740/0.945/0.868
Общие для всех групп 3–6	*Proser2*	Proline and serine rich 2	0.810/0.707/0.950/0.783

* По 10 генов с наибольшей по модулю положительной и отрицательной ДЭ.
** Согласно OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man) [https://www.omim.org/about].
*** Без указания неидентифицированных транскриптов.
**** Данные через слэш (/) для указанных групп соответственно.

мобилизацию арахидоновой кислоты из фосфолипидов мембран. Все четыре вида изученных БАВ (в наименьшей степени – Трп) способствуют снятию данного метаболического блока. С другой стороны, в условиях потребления ВУВЖР наблюдается положительная ДЭ ряда оксидоредуктаз, принадлежащих к семейству CYP450 и отвечающих за образование оксилипинов 11,14,15- и 11,12,15-THETA; 5,6-, 8,9-, 11,12- и 14,15-DHETA. Введение в рацион добавок l-Кар, Рес, Тир и в меньшей степени Трп приводит к отмене этих эффектов, что может, предположительно, привести к подавлению синтеза указанных оксилипинов.

Аналогичным образом добавки l-Кар, Рес и Тир (но не Трп) приводили к обращению ДЭ, вызванной потреблением ВУВЖР, для ряда метаболических звеньев PPAR-сигналинга (rno03320) (рис. 6) и β-окисления жирных кислот (rno00071). При этом для l-Кар было характерно обращение или отмена ряда эффектов ВУВЖР в отношении связывания и транспорта липидов и жирных кислот факторами CD36, FATP и FABP, липогенеза (D6-десатураза, малик-энзим, ацил-KoA-синтаза), системы трансмембранного переноса жирных кислот в митохондрии (l-Кар-пальмитоилтрансфераза 1-го, но не 2-го типа) (рис. 6). В ме-

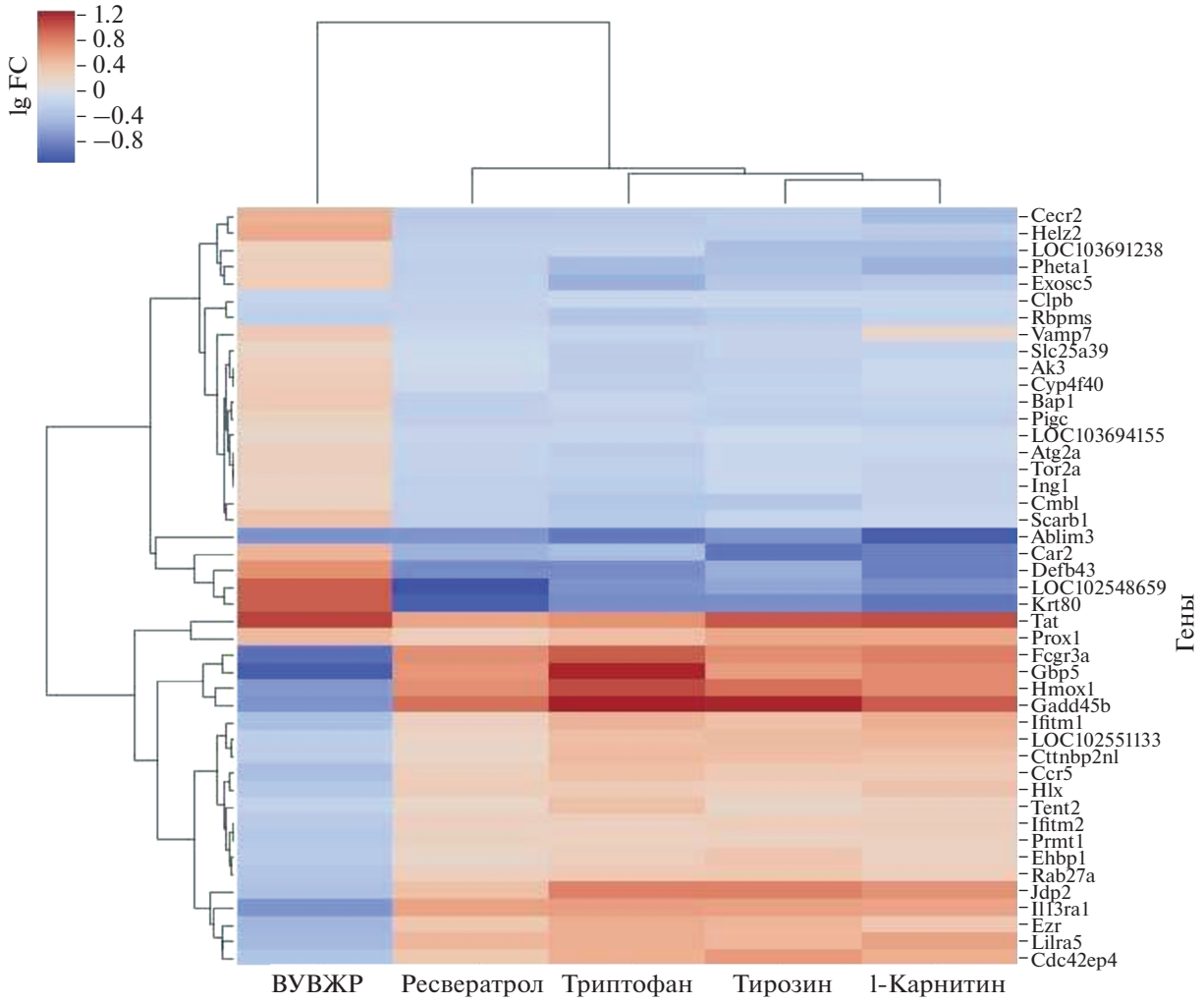

Рис. 4. “Тепловая” карта экспрессии генов во всех экспериментальных группах животных по отношению к внутренним контролям (Spike-In).

таболическом пути β-окисления жирных кислот добавки l-Кар, Рес и Тир (но не Трп) приводили к обращению эффекта, оказываемого ВУВЖР на экспрессию еноил-KoA гидратазы (КФ 4.2.1.17). Для метаболического пути процессинга и презентации антигенов (rno04612) было характерно подавление экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости MHCI и II, тогда как при использовании всех четырех видов добавок их ДЭ меняла знак на положительный.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты позволяют сделать ряд выводов о специфическом для каждого из исследованных БАВ характере влияния на обменные процессы, приводящие на фенотипическом уровне к различному влиянию на картину жирового перерождения печени, вызванного потреблением ВУВЖР. Ранее в работе [18] нами было показано, что полифенольное соединение кверцетин при введении в рацион крыс линии Zucker^{Fa} способно модулировать экспрессию большого числа генов, включая участвующие в процессах липогенеза и β-окисления жирных кислот, метаболизме ретиноидов, стероидов, арахидоновой и линолевой кислот. На модели крыс Wistar, являющихся относительно более резистентными к развитию ожирения в сравнении с вышеуказанной линией, для примененных БАВ выявлен ряд как сходных, так и принципиально различных эффектов.

Особенностью действия l-Кар на транскриптомном уровне стало повышение экспрессии ряда генов, включая *Insig1*. По данным [19] продукт данного гена представляет собой белок эндоплазматического ретикулума (ЭР), который связывает чувствительный к стеролам домен SREBP, акти-

Таблица 2. Список метаболических путей (KEGGs), идентифицированных как мишени воздействия применяемых БАВ у крыс, получавших ВУВЖР

Группа	Метаболические пути		
	обозначение	функция	p_{value}
Только группа 3 (l-Kap)	rno03320	PPAR signaling pathway	0.010
	rno04973	Carbohydrate digestion and absorption	0.040
Только группа 4 (ресвератрол)	rno04630	Jak-STAT signaling pathway	0.033
	rno02010	ABC transporters	0.033
Только группа 5 (тирозин)	rno00982	Drug metabolism – cytochrome P450	0.004
	rno00830	Retinol metabolism	0.007
	rno01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	0.018
	rno04974	Protein digestion and absorption	0.018
	rno00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0.022
	rno00140	Steroid hormone biosynthesis	0.028
	rno04972	Pancreatic secretion	0.031
	rno04146	Peroxisome	0.042
Только группы 4 и 5	rno00900	Terpenoid backbone biosynthesis	0.005/0.015
Только группы 4 и 5	rno04380	Osteoclast differentiation	0.025/0.050
Только группы 5 и 6	rno00591	Linoleic acid metabolism	0.011/0.034
	rno00565	Ether lipid metabolism	0.047/0.044
Группы 3, 4 и 5	rno00071	Fatty acid metabolism	0.008/0.015/0.005
	rno04976	Bile secretion	0.020/0.004/0.16
	rno04920	Adipocytokine signaling pathway	0.030/0.032/0.017
Группы 3, 5 и 6	rno04975	Fat digestion and absorption	0.040/0.042/0.040
Группы 3, 4 и 6	rno04062	Chemokine signaling pathway	0.040/0.040/0.012
Группы 4, 5 и 6	rno00100	Steroid biosynthesis	0.005/0.012/0.022
Все группы	rno04145	Phagosome	0.003/0.001/0.010/0.001
	rno04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	0.003/0.0002/0.013/0.007
	rno04612	Antigen processing and presentation	0.005/0.0003/0.003/0.001
	rno04640	Hematopoietic cell lineage	0.007/0.019/0.028/0.0132
	rno04672	Intestinal immune network for IgA production	0.003/0.011/0.017/0.006
	rno00590	Arachidonic acid metabolism	0.004/0.041/0.006/0.027

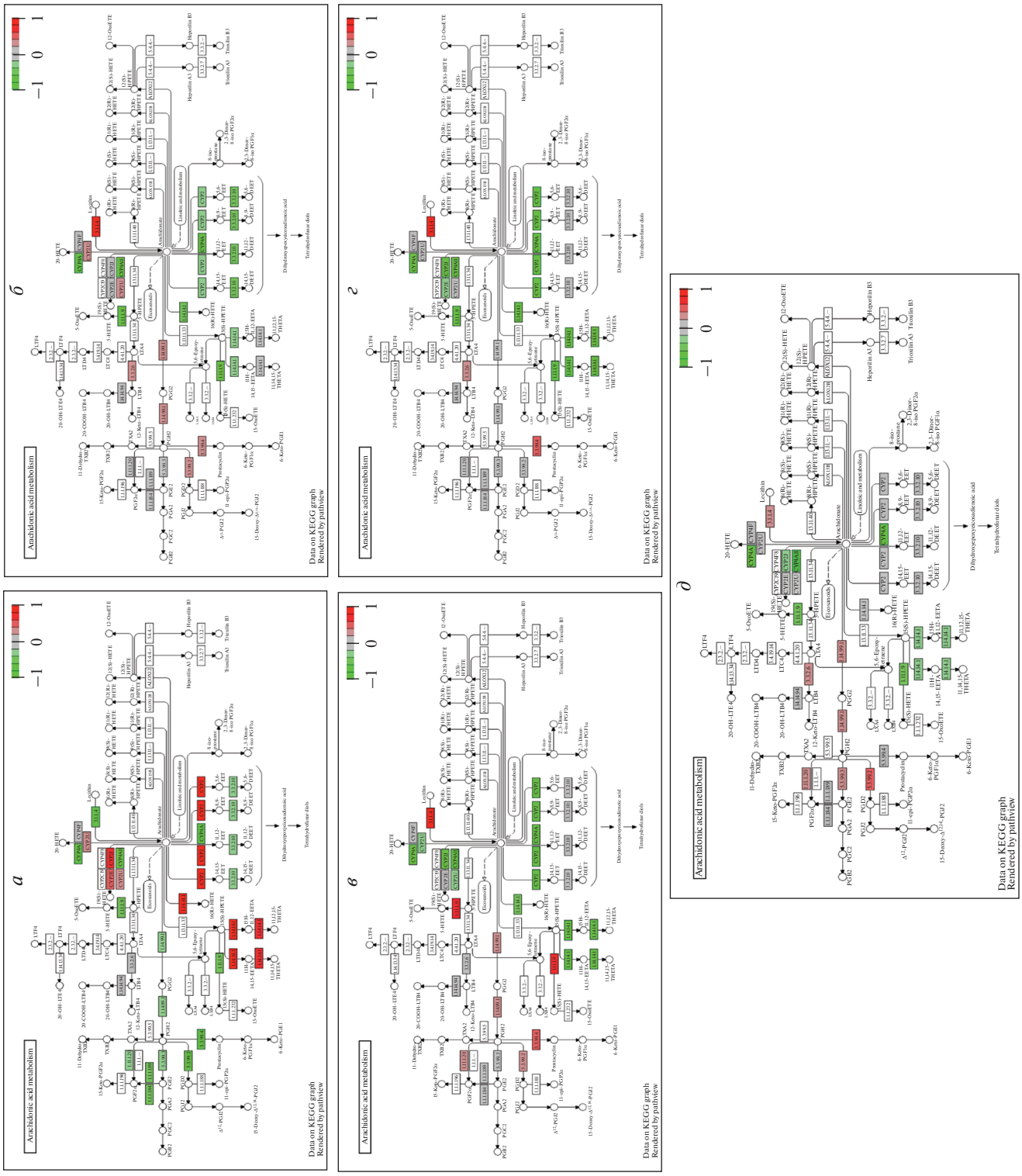

Рис. 5. Сопоставление изменений в метаболическом пути “rno00590 Arachidonic acid metabolism”, вызываемом добавками: *а* – ВУВЖР, *б* – l-Кар, *в* – Рес, *г* – Тир, *д* – Трп. Диаграммы здесь и на рис. 6 получены с использованием данных ресурса https://www.genome.jp/kegg/pathway.html.

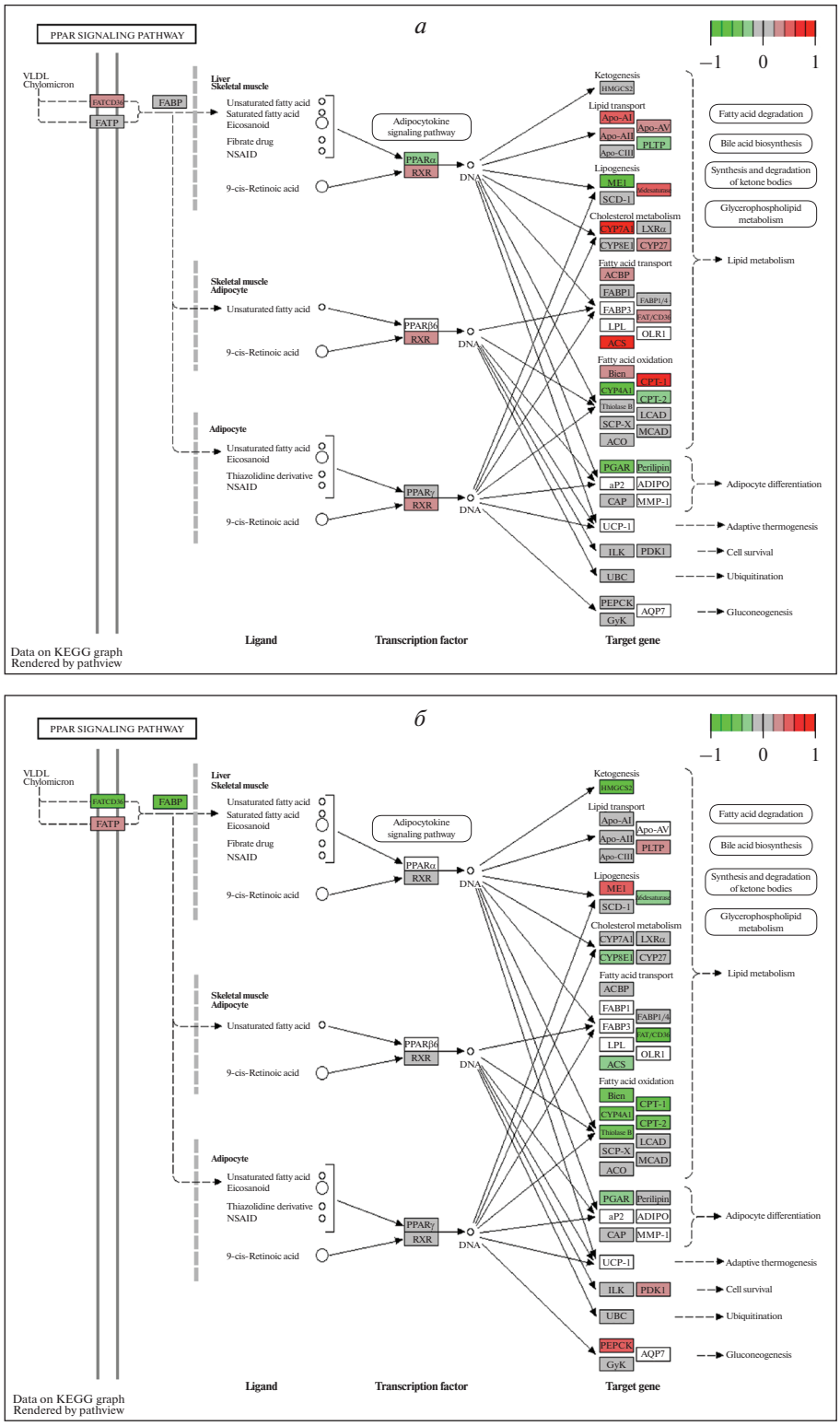

Рис. 6. Сопоставление изменений в метаболическом пути “rno03320 PPAR signaling pathway”, вызываемом добавками: *а* – ВУВЖР, *б* – l-Кар.

вирующий расщепление белка SCAP, и стабилизирующий комплекс SCAP/SREBP. Ввиду этого *Insig1* играет центральную роль в гомеостазе холестерина. Согласно Li et al. [20] белок INSIG1 ограничивает липогенез в зрелых адипоцитах и блокирует дифференцировку в преадипоцитах в жировой ткани нормальных мышей при ожирении, вызванном высокожировым рационом.

Другим геном, активируемым под действием добавки l-Кар, является *Lpin1* (липин), подавление продукции которого наблюдается при развитии метаболического синдрома [21]. Отмечается совместная экспрессия *Lpin1* с генами *Per1*, *Rasgef1b* [22], также ответившими положительной ДЭ на потребление l-Кар. Per1 – это один из основных белков циркадного ритма, экспрессия которого подавляется при избытке углеводов [23]. Продукция PER1 по данным [24] может повышаться под действием полифенольных соединений пищи при посредстве транскрипционного фактора Bmal1. *Rasgef1b* играет, по-видимому, важную роль в регуляции клеточной адгезии и пролиферации [25].

В числе генов, ответивших выраженной отрицательной ДЭ на потребление l-Кар, следует указать на *Ablim3*, участвующий в формировании аномальных “стрессорных” филаментов F-актина в немышечных клетках [26], и *TNFAIP2*, необходимый для реализации функции провоспалительных цитокинов TNFα и IL-1β. Последнее указывает на роль иммунного компонента в резорбции жирозапасающих клеток в печени под действием l-Кар.

Экспрессия гена *Defb43* подавляется под влиянием как l-Кар, так и Рес. Кодируемый им белок дефензин участвует в обеспечении неспецифического иммунитета на слизистых оболочках [27]. Пониженная экспрессия данного белка может рассматриваться как маркер ослабления воспалительного процесса [28].

Ген *Cebpd*, экспрессия которого специфически повышается под действием Рес, функционально связан с протоонкогенами *Fos*, *JunB*, *Spi1* и *Myc* [29]. По данным [30] образование его транскрипта контролируется деацетилазами гистонов (сиртуинами). Мишенями действия CEBPD являются гены инсулиноподобного фактора роста (IGF) и рецепторов эстрогенов.

В числе генов, характеризуемых достоверно пониженной экспрессией при воздействии добавки Рес, идентифицированы *Tns1* (тензин 1) и *Plk2*. Первый из них кодирует актин-связывающий белок, влияющий на функцию JNK, TNFα и инсулинового рецептора IRS2 [31]. Продуктом экспрессии второго из этих генов является протеинкиназа SNK, отвечающая за удвоение центросом в G1/S-фазе клеточного цикла [32], а также являющаяся негативным регулятором белков семейства Rap [33], к которым принадлежит рассмотренный выше продукт экспрессии *Rasgef1b*.

К генам, ответившим ДЭ исключительно на добавку Тир, относятся *Mfsd2a*, *Ankrd37* и *Hba1*. *Mfsd2a* кодирует мембранный транспортер лизофосфатидов. Его повышенная экспрессия маркирует повышение активности CD8+ (T_{reg}) лимфоцитов и может свидетельствовать о противовоспалительном действии [34]. По данным [35] MFSD2A, отвечающий за перенос через мембраны длинноцепочечных ПНЖК семейства ω3, способствует усилению синтеза их противовоспалительных производных из группы оксилипинов. Понижение эктопической экспрессии *Hba1* (α-цепь гемоглобина) может быть связано с модуляцией сигнального пути, опосредуемого оксидом азота [36].

Все специфические только для добавки Трп гены (*Exosc5*, *Gata4*, *Dhcr24*, *Abcg8* и *Nlrp12*) ответили на его потребление отрицательной ДЭ. Из них *Dhcr24* (3-beta-hydroxysterol delta-24-reductase) кодирует один из ключевых ферментов метаболизма холестерина, обладающий также плейотропным действием благодаря способности связывать проапоптотический фактор p53 [37]. *Abcg8* отвечает за синтез АТФ-зависимого транспортера стероидов, нарушение синтеза которого приводит к аномальному накоплению холестерина в тканях [38]. Продукт экспрессии *Gata4* является фактором, повышающим мембранный потенциал митохондрий и способствующим защите клеток от гипоксии и окислительного стресса [39]. *Nlrp12* кодирует белок, который ингибирует альтернативный (опосредуемый Toll-рецепторами) сигнальный путь NF-κB, приводящий к усилению воспаления [40]. Функция в печени остальных генов, являющихся мишенями воздействия Тир и Трп, недостаточно изучена.

Обобщая полученные данные, можно предположить, что потребление дополнительных количеств Тир приводит к активации в ткани печени группы генов, оказывающих противовоспалительное действие, в то время как под влиянием Трп экспрессия ряда противовоспалительных факторов подавляется, отражением чего возможно является противоположный характер влияния этих добавок на развитие жирового гепатоза, вызванного ВУВЖР.

Биоинформатический анализ позволил получить информацию о влиянии ВУВЖР и применяемых биологически активных веществ на ряд метаболических путей (KEGGs). Полученные данные согласуются с исследованиями [41–46], в которых при индуцированном диетой ожирении у мышей

и крыс происходит изменение метаболических путей метаболизма липидов, защитных реакций на стресс, функции цитоскелета и клеточной адгезии, инсулинового и PPAR-сигналинга, метаболизма стероидов и аминокислот. Большинство этих метаболических путей явились мишенями воздействия биологически активных веществ (l-Кар, Рес, Тир и Трп). При этом для l-Кар, характеризуемого наиболее благоприятным влиянием на накопление жира в печени при условии потребления ВУВЖР, было также в наибольшей степени характерно влияние на метаболические пути PPAR-сигналинга, а для Рес, оказывающего по ряду показателей выраженное иммунотропное действие [47], – на JAK-STAT-сигнальный путь. Наиболее характерными мишенями действия добавки Тир явились метаболические пути, связанные с экспрессией различных генов семейства CYP450 и с метаболизмом ретиноидов.

Новым не описанным в доступной литературе стал дифференцированный эффект между l-Кар, Рес и Тир, с одной стороны, и Трп – с другой, на метаболический путь арахидоновой кислоты, включая процессы образования из нее оксилипинов (липоксинов) [48, 49], простагландинов и тромбоксанов. Дисбаланс различных оксилипинов рассматривается как причина хронического системного воспаления при ожирении, диабете 2-го типа, гипертензии, коронарной болезни сердца, аутоиммунных и других алиментарно-зависимых заболеваниях [50, 51]. Такой представитель класса эйкозаноидов как простациклин выступает в роли ведущего регулятора разрастания жировой ткани [52]. Модуляция синтеза различных классов оксилипинов и эйкозаноидов рассматривается и в качестве универсального механизма биологического действия Рес [7].

Таким образом, проведенные исследования показали, что действие на организм таких нутрицевтиков как l-Кар, Рес и ароматические аминокислоты характеризуется специфическим для каждого из этих БАВ изменением экспрессии сложного комплекса генов. Критическими “точками приложения” действующих веществ являются метаболические пути, охватывающие процессы биосинтеза и деградации жирных кислот, стеринов и ретиноидов, внутриклеточного транспорта, рецепции, межклеточного распознавания, программируемой клеточной гибели (апоптоза), иммунного ответа. Выявленные эффекты далеко не исчерпываются постулируемыми для изученных БАВ механизмами, такими как интенсификация окисления жира для l-Кар, антиоксидантный эффект Рес, влияние Тир и Трп на обмен биогенных аминов. Дифференцированный учет разнообразных эффектов воздействия БАВ на генную экспрессию необходим при их персонифицированном назначении в составе специализированных продуктов и диет в диетотерапии ожирения, с учетом генотипа больного, тяжести и причин развития заболевания.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 17-16-01043 “Поиск эффекторных звеньев метаболизма, регулируемых алиментарными факторами при ожирении, для разработки инновационных специализированных пищевых продуктов”.

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. *Тутельян В.А., Киселева Т.Л., Кочеткова А.А. и др.* Перспективные источники фитонутриентов для специализированных пищевых продуктов с модифицированным углеводным профилем: опыт традиционной медицины // Вопр. питания. 2016. Т. 85. № 4. С. 46–60.
2. *Тутельян В.А., Кочеткова А.А., Саркисян В.А.* Специализированные пищевые продукты в современной парадигме алиментарной коррекции нарушений метаболома // FOODLIFE 2018. Генетические ресурсы растений и здоровое питание: потенциал зерновых культур: Материалы конф. 2018. С. 22. [Электронный ресурс: https://docplayer.ru/77452959-I-mezhdisciplinarnaya-konferenciya.html, дата обращения 22.05.2020]
3. *Bojanowska E., Ciosek J.* Can we selectively reduce appetite for energy-dense foods? An overview of pharmacological strategies for modification of food preference behavior // Curr. Neuropharmacol. 2016. V. 14. № 22. P. 118–142. https://doi.org/10.2174/1570159x14666151109103147
4. *Раджабкадиев Р.М., Коростелева М.М., Евстратова В.С. и др.* L-карнитин: свойства и перспективы применения в спортивной практике // Вопр. питания. 2015. Т. 84. № 3. С. 4–12.
5. *Brass E.P.* Carnitine and sports medicine: use or abuse? // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004. V. 1033. № 1. P. 67–78. https://doi.org/10.1196/annals.1320.006
6. *Rauf A., Imran M., Suleria H.A.R. et al.* A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol // Food Funct. 2017. V. 8. № 12. P. 4284–4305. https://doi.org/10.1039/c7fo01300k
7. *Repossi G., Das U., Eynard A.R.* Molecular basis of the beneficial actions of resveratrol // Arch. Med. Res. 2020. V. 51. № 2. P. 105–114. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.01.010
8. *Herrera C.P., Smith K., Atkinson F. et al.* High-glycaemic index and -glycaemic load meals increase the availability of tryptophan in healthy volunteers // Br. J. Nutr. 2011.

V. 105. № 11. P. 1601–1606.
https://doi.org/10.1017/S0007114510005192

9. *Christenson J., Whitby S.J., Mellor D. et al.* The effects of resveratrol supplementation in overweight and obese humans: A systematic review of randomized trials // Metab. Syndr. Relat. Disord. 2016. V. 14. № 7. P. 323–333.
https://doi.org/10.1089/met.2016.0035

10. *Pooyandjoo M., Nouhi M., Shab-Bidar S. et al.* The effect of (L-)carnitine on weight loss in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // Obes. Rev. 2016. V. 17. № 10. P. 970–976.
https://doi.org/10.1111/obr.12436

11. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research (ILAR); Division on Earth and Life Studies (DELS); National Research Council of the national academies. Washington: The National Academies Press. 2011.

12. *Apryatin S.A., Shipelin V.A., Trusov N.V. et al.* Comparative analysis of the influence of a high-fat/high-carbohydrate diet on the level of anxiety and neuromotor and cognitive functions in Wistar and DAT-KO rats // Physiol. Rep. 2019. V. 7. № 4. P. e13987.
https://doi.org/10.14814/phy2.13987

13. Agilent Total RNA Isolation Mini Kit Protocol. Электронный ресурс: http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/5188_2710_A1.pdf

14. Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling, version 6.8. Электронный ресурс: http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G4140-900-40_GeneExpression_OneColor_6.9.pdf

15. *Benjamini Y., Hochberg Y.* Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing // J. Royal Statist. Soc. Series B. 1995. V. 57. № 1. P. 289–300.

16. *Апрятин С.А., Трусов Н.В., Горбачев А.Ю. и др.* Полнотранскриптомное профилирование печени мышей C57Black/6J, получавших рационы с избытком жира, фруктозы и холестерина // Генетика. 2019. Т. 55. № 4. С. 369–382.
https://doi.org/10.1134/S0016675819040027

17. *Apryatin S.A., Trusov N.V., Gorbachev A.Yu. et al.* Comparative whole transcriptome profiling of liver tissue from Wistar rats fed with diets containing different amounts of fat, fructose, and cholesterol // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. № 9. P. 1093–1106.
https://doi.org/10.1134/S0006297919090128

18. *Трусов Н.В., Апрятин С.А., Горбачев А.Ю. и др.* Влияние гиперкалорийного рациона и кверцетина на полно-транскриптомный профиль ткани печени крыс линии Zucker- LEPRfa // Пробл. эндокринологии. 2018. Т. 64. № 6. С. 371–382.
https://doi.org/10.14341/probl9936

19. *Yang T., Espenshade P.J., Wrigh M.E. et al.* Crucial step in cholesterol homeostasis: Sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER // Cell. 2002. V. 110. № 4. P. 489–500.
https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00872-3

20. *Li J., Takaishi K., Cook W. et al.* Insig-1 brakes lipogenesis in adipocytes and inhibits differentiation of preadipocytes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 16. P. 9476–9481.
https://doi.org/10.1073/pnas.1133426100

21. *Chen S.H., Zhuang X.H., Liu Y.T. et al.* Expression and significance of lipin1 and AMPKα in hepatic insulin resistance in diet-induced insulin resistance rats // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 2012. V. 120. № 2. P. 84–88.
https://doi.org/10.1055/s-0031-1298013

22. *Römer M., Eichner J., Metzger U. et al.* Cross-platform toxicogenomics for the prediction of non-genotoxic hepatocarcinogenesis in rat // PLoS One. 2014. V. 9. № 5. P. e97640.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097640

23. *Hirota T., Okano T., Kokame K. et al.* Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 46. P. 44244–44251.
https://doi.org/10.1074/jbc.M206233200

24. *Qi G., Wu W., Mi Y. et al.* Tea polyphenols direct Bmal1-driven ameliorating of the redox imbalance and mitochondrial dysfunction in hepatocytes // Food. Chem. Toxicol. 2018. V. 122. P. 181–193.
https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.031

25. *Yaman E., Gasper R., Koerner C. et al.* RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide exchange // FEBS J. 2009. V. 276. № 16. P. 4607–4616.
https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07166.x

26. *Barrientos T., Frank D., Kuwahara K. et al.* Two novel members of the ABLIM protein family, ABLIM-2 and -3, associate with STARS and directly bind F-actin // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 11. P. 8393–8403.
https://doi.org/10.1074/jbc.M607549200

27. *Biragyn A., Ruffini P.A., Leifer C.A. et al.* Toll-like receptor 4–dependent activation of dendritic cells by defensin 2 // Science. 2002. V. 298. № 5595. P. 1025–1029.
https://doi.org/10.1126/science.1075565

28. *Yang D., Chertov O., Bykovskaia S.N. et al.* β-Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 // Science. 1999. V. 286. № 5439. P. 525–528.
https://doi.org/10.1126/science.286.5439.525

29. *Chang W., Parra M., Centrella M., McCarthy T.L.* Interactions between CCAAT enhancer binding protein delta and estrogen receptor alpha control insulin-like growth factor I (igf1) and estrogen receptor-dependent gene expression in osteoblasts // Gene. 2005. V. 345. № 2. P. 225–235.
https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.11.017

30. *Turgeon N., Valiquette C., Blais M. et al.* Regulation of C/EBPdelta-dependent transactivation by histone deacetylases in intestinal epithelial cells // J. Cell. Biochem. 2008. V. 103. № 5. P. 1573–1583. https://doi.org/10.1002/jcb.21544

31. *Katz B.Z., Zohar M., Teramoto H. et al.* Tensin can induce JNK and p38 activation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. V. 272. № 3. P. 717–720. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2853

32. *Chang J., Cizmecioglu O., Hoffmann I., Rhee K.* PLK2 phosphorylation is critical for CPAP function in procentriole formation during the centrosome cycle // EMBO J. 2010. V. 29. № 14. P. 2395–2406. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.118

33. *Lee K.J., Lee Y., Rozeboom A. et al.* Requirement for Plk2 in orchestrated ras and rap signaling, homeostatic structural plasticity, and memory // Neuron. 2011. V. 69. № 5. P. 957–973. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.004

34. *Piccirillo A.R., Hyzny E.J., Beppu L.Y. et al.* The lysophosphatidylcholine transporter MFSD2A is essential for CD8+ memory T cell maintenance and secondary response to infection // J. Immunol. 2019. V. 203. № 1. P. 117–126. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801585

35. *Ungaro F., Tacconi C., Massimino L. et al.* MFSD2A Promotes endothelial generation of inflammation-resolving lipid mediators and reduces colitis in mice // Gastroenterology. 2017. V. 153. № 5. P. 1363–1377. e6. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.07.048

36. *Straub A.C., Lohman A.W., Billaud M. et al.* Endothelial cell expression of haemoglobin alpha regulates nitric oxide signaling // Nature. 2012. V. 491. № 7424. P. 473–477. https://doi.org/10.1038/nature11626

37. *Wu C., Miloslavskaya I., Demontis S. et al.* Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1 // Nature. 2004. V. 432. № 7017. P. 640–645. https://doi.org/10.1038/nature03173

38. *Berge K.E., Tian H., Graf G.A. et al.* Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters // Science. 2000. V. 290. № 5497. P. 1771–1775. https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1771

39. *Li H.-X., Zhou Y.-F., Zhao X. et al.* GATA-4 Protects against hypoxia-induced cardiomyocyte injury: Effects on mitochondrial membrane potential // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2014. V. 92. № 8. P. 669–678. https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0009

40. *Allen I.C., Wilson J.E., Schneider M. et al.* NLRP12 suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the negative regulation of noncanonical NF-κB signaling // Immunity. 2012. V. 36. № 5. P. 742–754. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.012

41. *Ferrante A.W., Thearle M., Liao T., Leibel R.L.* Effects of leptin deficiency and short-term repletion on hepatic gene expression in genetically obese mice // Diabetes. 2001. V. 50. № 10. P. 2268–2278. https://doi.org/10.2337/diabetes.50.10.2268

42. *Liang C.P., Tall A.R.* Transcriptional profiling reveals global defects in energy metabolism, lipo-protein, and bile acid synthesis and transport with reversal by leptin treatment in ob/ob mouse liver // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 52. P. 49066–49076. https://doi.org/10.1074/jbc.M107250200

43. *Kim S., Sohn I., Ahn J.I. et al.* Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model // Gene. 2004. V. 340. № 1. P. 99–109. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.015

44. *Inoue M., Ohtake T., Motomura W. et al.* Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 336. № 1. P. 215–222. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.070

45. *Patsouris D., Reddy J.K., Muller M., Kersten S.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression // Endocrinology. 2006. V. 147. № 3. P. 1508–1516. https://doi.org/10.1210/en.2005-1132

46. *Yang R.-L., Li W., Shi Y.-H., Le G.-W.* Lipoic acid prevents high-fat diet-induced dyslipidemia and oxidative stress: a microarray analysis // Nutrition. 2008. V. 24. № 6. P. 582–588. https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.02.002

47. *Palacz-Wrobel M., Borkowska P., Paul-Samojedny M. et al.* Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages // Biomed. Pharmacother. 2017. V. 93. P. 1205–1212. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.054

48. *Судьина Г.Ф., Мирзоева О.К., Щукин И.А. и др.* Липоксины. Исследование различных путей биосинтеза // Биохимия. 1991. Т. 56. № 6. С. 1113–1122.

49. *Гесслер Н.Н., Белозерская Т.А., Гроза Н.В. и др.* Оксилипины и пути их синтеза у грибов // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 6. С. 568–579.

50. *Pickens C.A., Sordillo L.M., Zhang C., Fenton J.I.* Obesity is positively associated with arachidonic acid-derived 5- and 11-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) // Metabolism. 2017. V. 70. P. 177–191. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.01.034

51. *Das U.N.* Bioactive lipids in age-related disorders // Adv. Exp. Med. Biol. 2020. V. 1260. P. 33–83. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42667-5_3

52. *Rahman M.S.* Prostacyclin: A major prostaglandin in the regulation of adipose tissue development // J. Cell Physiol. 2019. V. 234. № 4. P. 3254–3262. https://doi.org/10.1002/jcp.26932

Effect of Carnitine, Resveratrol and Aromatic Amino Acids Supplements in the Diet with Excess Fat and Fructose on Gene Expression in Liver of Rats: Full Transcriptome Analysis

N. V. Trusov[a, *], S. A. Apryatin[a], V. A. Shipelin[a, b], A. A. Shumakova[a], I. V. Gmoshinski[a, **], D. B. Nikityuk[a, c], and V. A. Tutelyan[a, c]

[a] *Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, 109240 Russia*

[b] *Plekhanov Russian University of Economics, Moscow, 117997 Russia*

[c] *Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: nikkitosu@yandex.ru*

***e-mail: gmosh@ion.ru*

The differential expression of 30584 genes was studied in the liver of male Wistar rats fed diets with excess fat and fructose and supplemented with l-carnitine, resveratrol, tyrosine or tryptophan for 63 days. For this purpose the method of full transcriptome profiling by the Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling protocol (version 6.8) was used. To identify metabolic pathways (KEGGs) that are targets of the applied dietary treatments, the transcriptome data were analyzed by bioinformatics methods in the "R" environment. The obtained data suggest that the intake of biologically active substances – modulators of lipid metabolism, including l-Car, Res and aromatic amino acids Tyr and Trp, despite the obvious differences in the primary targets of their impact and phenotypic consequences for the body at the tissue and organ levels, involves at intermediate stages a complex of genes that are largely similar and interrelated in their function, which are involved in the regulation of the cell cycle, proliferation, apoptosis, intercellular interactions, immune response and inflammation. The differential expression sign of each of these genes, taken separately, does not allow unambiguous prediction processes manifested in the strengthening or, on the contrary, weakening of lipogenesis and the observed accumulation of fatty inclusions in liver cells. New, not described in the available literature, is the differentiated effect between l-Car, Res and Tyr, on the one hand, and Trp, on the other, on the metabolic pathway of arachidonic acid, including the formation of oxylipins (lipoxins), prostaglandins and thromboxanes.

Keywords: transcriptome, rats, resveratrol, l-carnitine, tyrosine, tryptophan.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1158–1163

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 634.8:632.75

ИНВАЗИВНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ ЦИКАДОК *Metcalfa pruinosa* (Hemiptera: Flatidae) И *Arboridia kakogawana* (Hemiptera: Cicadellidae) НЕ ИНФИЦИРОВАНЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ СИМБИОТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИЯМИ

© 2021 г. Б. В. Андрианов[1, 3, *], Д. А. Романов[1], Е. А. Матвейкина[1, 2]

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

[2]*Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия "Магарач", Российская академия наук, Ялта, 298600 Россия*

[3]*Московский государственный областной университет, Москва, 141014 Россия*

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

Поступила в редакцию 03.12.2020 г.
После доработки 14.01.2021 г.
Принята к публикации 18.01.2021 г.

Появление и быстрое распространение в России новых инвазивных видов цикадовых *Metcalfa pruinosa* (Say, 1830) и *Arboridia kakogawana* (Matsumura, 1932) требует изучения как причин инвазий, так и вероятных последствий этих инвазий для виноградарства. Особенный интерес представляет изучение возможной роли новых для ампелоценозов России видов цикадок в распространении патогенных бактерий фитоплазмозов винограда. В настоящее время эти вопросы являются малоизученными. Изучили изменчивость BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI* в популяционных выборках *M. pruinosa* и *A. kakogawana* из Крыма и черноморского побережья Кавказа. Методом ПЦР на специфические гены был проведен поиск зараженности цикадок бактериями фитоплазмоза винограда из группы столбура *Candidatus Phytoplasma solani* и внутриклеточными симбиотическими бактериями *Wolbachia, Rickettsia* и *Spiroplasma*. Обнаружили цикадку *M. pruinosa* только на черноморском побережье Кавказа. Популяция *M. pruinosa* близка к мономорфности. Цикадка *A. kakogawana* обнаружена нами и в Крыму, и на Кавказе. Выявили две новые формы этого вида в России. Не выявили возбудителя фитоплазмоза винограда и внутриклеточных симбиотических бактерий в изученных популяциях цикадок.

Ключевые слова: инвазивные популяции, *Vitis vinifera*, *COI*, цикадки, фитоплазма.

DOI: 10.31857/S0016675821100027

Природные популяции *M. pruinosa* (Say, 1830) существуют в Северной Америке на обширной территории от южных районов Канады до Флориды и Мексики включительно [1]. В Европе инвазивная популяция *M. pruinosa* впервые была замечена в 1979 г. [2]. Однако наличие покоящейся стадии в жизненном цикле *M. pruinosa* и многочисленность видов культурных растений, на которых она развивается в Северной Америке, позволяет обоснованно предполагать, что этот вид цикадок завозился случайно в Европу множество раз до его натурализации в конце XX в. Генетические отличия инвазивной популяции *M. pruinosa* от природных популяций неизвестны, но, вероятно, существуют. После обнаружения первой европейской популяции *M. pruinosa* ее ареал активно расширялся [3–5]. На территории России *M. pruinosa* впервые найдена в 2009 г. на черноморском побережье Кавказа (в окрестностях Сочи) и на Северном Кавказе [6, 7]. Цикадка белая является полифагом, развивается на древесно-кустарниковой растительности, крапиве и на винограде. В Европе развитие цикадки отмечено на 110 видах цветковых растений [8]. В условиях Краснодарского края *M. pruinosa* дает одно поколение в год. Развитие включает пять личиночных стадий. Зимует *M. pruinosa* на стадии яйца, которые откладываются осенью в трещины коры растений [9].

Arboridia kakogawana обитает в Японии, Корее и на Дальнем Востоке России [10, 11]. Появление инвазивной популяции *A. kakogawana* в Краснодарском крае отмечено в 1999 г., а уже к 2004 г. вид стал массовым на виноградниках Северного Кавказа [12, 13]. В Крыму *A. kakogawana* впервые найдена в 2008 г., а распространилась по всему полуострову к 2012 г. [14]. *A. kakogawana* питается и может развиваться только на растениях винограда. В условиях Крыма и Краснодарского края

A. kakogawana дает три поколения. Яйца откладываются в ткани жилок листа, после чего сразу начинается их развитие. Цикадки зимуют на стадии имаго. Перед зимовкой имаго *A. kakogawana* покидают растения винограда [15].

Вредоносность самих цикадок для растений винограда как правило незначительна, большие опасения вызывает возможность переноса цикадками патогенных бактерий, вызывающих фитоплазмозы. Наиболее эффективным переносчиком фитоплазменного золотистого пожелтения винограда (Flavecsence dorée) и фитоплазменного почернения древесины винограда (Bois noir) является цикадка *Scaphoideus titanus* (Ball, 1932). Переносчиками фитоплазм являются, по крайней мере, те формы этой цикадки, которые встречаются в Западной Европе [16]. Цикадка *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) встречается в Крыму и переносит фитоплазму столбура на картофеле и помидорах. Известны случаи переноса фитоплазмы столбура на виноград этой цикадкой в Западной Европе [17]. Эффективность переноса фитоплазм для большинства видов цикадок неизвестна, но, по всей видимости, должна быть невелика с учетом обилия цикадок в природе и сравнительной редкости фитоплазменных болезней растений. Фактов передачи фитоплазменных заболеваний с участием цикадок *A. kakogawana* и *M. pruinosa* не обнаружено.

Следует отметить, что до настоящего времени определение видов инвазивных видов цикадок *A. kakogawana* и *M. pruinosa* в России проводилось только по морфологическим признакам. В настоящем сообщении мы впервые получили данные по нуклеотидной изменчивости BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI* в популяционных выборках цикадок *A. kakogawana* и *M. pruinosa* на территории Южного берега Крыма и на черноморском побережье Кавказа в России. Показана мономорфность вида *M. pruinosa* по изученному маркеру. Более сложная картина наблюдается в отношении *A. kakogawana*. Кавказская выборка разделяется на два типа с различиями, соответствующими межвидовому уровню. В Крыму присутствует только один из этих типов, что свидетельствует в пользу предположения о происхождении крымской популяции *A. kakogawana* от популяции Кавказа. Оба типа *A. kakogawana* из России отличаются от известных типов этого вида из Северной Америки на межвидовом уровне изменчивости.

Мы не обнаружили инфицирования обоих видов цикадок бактериями возбудителя фитоплазмоза винограда из группы столбура подгруппы 16SrXII-A *Candidatus Phytoplasma solani* и внутриклеточными симбиотическими бактериями *Wolbachia, Rickettsia* и *Spiroplasma*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сборы цикадок

Цикадок собирали в июне и июле 2019 г. в Крыму на территории виноградника филиала “Ливадия” – ГУП РК “ПАО “Массандра” на техническом сорте винограда “Бастардо магарачский”. На Кавказе цикадок собирали на приусадебных виноградниках в двух локальностях на территории большого Сочи. Имаго цикадок индивидуально собирали в пластиковые пробирки в спирт и транспортировали в них в лабораторию для выделения суммарной ДНК. Точки сбора цикадок распределяли равномерно по территории виноградника для репрезентативного представления популяции. Сбор проводился только для массовых видов. В Крыму собрано 45 имаго цикадок с растений винограда и 18 имаго с сорной растительности по краю виноградника. На Кавказе собрано 41 имаго цикадок с растений винограда и 20 имаго с сорной растительности по краю виноградника. Все собранные имаго цикадок анализировались индивидуально.

Выделение ДНК и ПЦР

Тотальную ДНК из имаго цикадок выделяли фенол-хлороформным методом [18]. После очистки ДНК растворяли в деионизованной воде. Концентрация ДНК определялась спектрофотометрическим методом с использованием Implen NanoPhotometer NP80. Чистоту препарата ДНК тестировали по величине отношения 260/280 нм. Концентрацию ДНК в препаратах выравнивали до 4 нг/мкл. ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл с использованием наборов для амплификации “EncycloPlus PCR kit” (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

BOLD-фрагменты митохондриального гена *COI* получали с помощью стандартных фолмеровских праймеров: LCO1490 и HCO2198 в условиях, описанных ранее [19]. Полученные фрагменты секвенировали. Идентификацию внутриклеточных симбиотических бактерий *Wolbachia*, *Rickettsia* и *Spiroplasma* проводили методом ПЦР на специфические гены. Ген *fbpA* использовался для обнаружения *Wolbachia* [20]. Последовательности праймеров: fbpA_F1, fbpA_R1 и условия ПЦР приведены в статье [21]. Ген *gltA* использовался для обнаружения *Rickettsia*. Последовательности праймеров RicF141, RicR548 и условия ПЦР описаны в работе [22]. Рибосомный повтор ITSI использовался для обнаружения *Spiroplasma* [23]. Последовательности праймеров SP-ITS-JO4, SP-ITS-N5550 и условия ПЦР описаны в работе [22]. Фрагмент гена 16S rDNA для идентификации 16SrXII-A *Candidatus Phytoplasma solani* получали с праймеров fU5/rU3 [24]. В качестве положительных

Таблица 1. Характеристика выборок цикадок в окрестностях Ялты на территории южного берега Крыма и в районе большого Сочи на Кавказе

№	Место сбора	Вид цикадки по морфологическим признакам имаго	*COI* миохондриальный гаплотип (в скобках число особей с данным гаплотипом)	GenBank, ID
1	Ялта – виноградник	*Arboridia kakogawana*	Yal-1 (45)	MW301812
2	Ялта – сорная растительность по краю виноградника	*Psammotettix confinis*	Rub-1 (18)	MW301811
3	Сочи – виноградник	*Arboridia kakogawana*	Yal-1 (24)	MW301812
4	То же	*Arboridia kakogawana*	Laz-1 (7)	MW301813
5	»	*Metcalfa pruinosa*	Vit-1 (10)	MW301809
6	Сочи – сорная растительность по краю виноградникатl	*Metcalfa pruinosa*	Vit-1 (16)	MW301809
7	То же	*Metcalfa pruinosa*	Hed-2 (4)	MW301810

контролей для идентификации бактерий *Wolbachia*, *Rickettsia* и *Spiroplasm* использовались препараты ДНК *Harmonia axyridis*, инфицированные соответствующим бактериальным симбионтом [21, 22]. В качестве положительного контроля на фитоплазму использовалась суммарная ДНК из флоэмы растений винограда с явными признаками заболевания (почернением древесины), полученная из лаборатории органического виноградарства Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия “Магарач” РАН.

Элюция продуктов амплификации

Фрагменты, полученные в результате амплификации, очищали в 1.5%-ном агарозном геле. Элюция фрагментов из геля проводилась с использованием набора для элюции Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Секвенирование

Нуклеотидную последовательность ПЦР-фрагментов определяли с прямого и обратного праймеров на приборе ABI PRISM 3500 с использованием реагентов BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Биоинформационный анализ

Анализ хроматограмм проводили с помощью программы CromasPro 13.3 (Technelysium, Australia). Выравнивание последовательностей, полученных в результате секвенирования, с последовательностями, размещенными в базах данных, было выполнено с использованием ресурсов NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Для построения дендрограмм применяли программу MEGA7 [25] с использованием метода ближайших соседей (NJ) и *p*-дистанцию как модель нуклеотидных замен. Статистическую достоверность полученных деревьев оценивали при помощи величины бутстрэп-поддержки с числом репликаций 1000.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлен результат определения митохондриальных гаплотипов всех собранных экземпляров цикадок. Единственным массовым видом цикадок на растениях винограда в Крыму в 2019 г. была цикадка *A. kakogawana*. Все полученные сиквенсы фрагмента гена цитохромоксидазы этого вида идентичны. Митохондриальный гаплотип (Yal-1), обнаруженный у *A. kakogawana* из Крыма оказался самым массовым в выборке цикадок из Сочи. В Сочи найдены два митохондриальных гаплотипа *A. kakogawana* (Yal-1 и Laz-1). Имаго *A. kakogawana* с разными митохондриальными гаплотипами морфологически неразличимы, но степень дивергенции нуклеотидных последовательностей между гаплотипами оказалась необычно высокой. Хотя величина изменчивости нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COI* между близкородственными видами и внутривидовыми формами у насекомых сильно колеблется, значение в 3% часто принимается в качестве порога для внутривидовой изменчивости [26]. При сравнении двух гаплотипов *A. kakogawana* эта величина оказалась равной 16%. Как и в случае с гаплотипом Yal-1, все последовательности относящиеся к гаплотипу Laz-1 идентичны.

Помимо *A. kakogawana* на винограде и окружающей сорной растительности в Сочи была обнаружена белая цитрусовая цикадка *M. pruinosa*.

Мы провели сравнения полученных нами митохондриальных гаплотипов с наиболее сходными последовательностями, зарегистрированными в GenBank. Дендрограмма, построенная в программе MEGA7, представлена на рис. 1. В качестве внешней группы были добавлены последовательности генов цитохромоксидазы видов цикадок-фитофа-

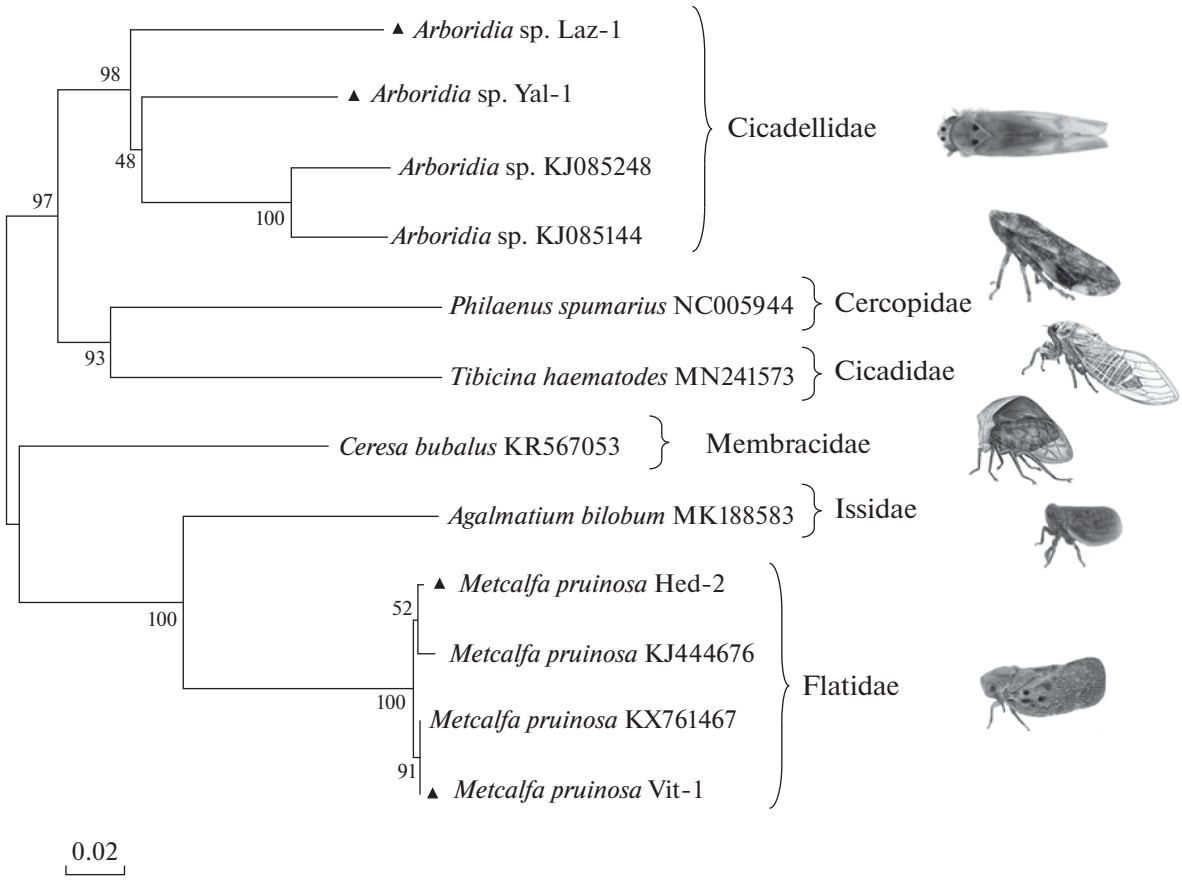

Рис. 1. Изменчивость BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI* у цикадок фитофагов винограда в России. Треугольниками отмечены нуклеотидные последовательности, полученные в настоящем исследовании и перечисленные в табл. 1. Нуклеотидные последовательности, взятые для срвавнения, приведены с номером из GenBank.

гов винограда, которые образуют природные популяции в Крыму [14].

M. pruinosa с Кавказа и из Северной Америки оказалась исключительно мономорфной, с величиной нуклеотидной изменчивости не более 1%. Сравнение продуктов трансляции *in silico* разных митохондриальных гаплотипов *M. pruinosa* показывает их идентичность. Совершенно отличная ситуация выявлена для *A. kakogawana*. Нуклеотидные последовательности BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI Arboridia kakogawana* ранее не были депонированы в GenBank. Наибольшее сходство с нашими последовательностями обнаруживается у неидентифицированного вида цикадок из Северной Америки, относящегося к роду *Arboridia*. Гаплотипы *A. kakogawana* из Крыма и Кавказа отличаются друг от друга и от гаплотипов североамериканских видов из рода *Arboridia* даже не на межвидовом, а на межродовом уровне в 16–18%. Дивергенция полученных гаплотипов от близкого рода цикадок *Eratoneura* из Северной Америки даже несколько менее – около 13%.

Те же препараты ДНК цикадок, которые были использованы для получения BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI*, были тестированы на наличие маркерных последовательностей внутриклеточных симбиотических бактерий *Wolbachia, Rickettsia* и *Spiroplasma* и бактерии-возбудителя фитоплазмоза винограда из группы столбура подгруппы 16SrXII-A. Положительные сигналы были получены только в препаратах положительных контролей. Мы не обнаружили инфицирования обоих видов цикадок бактериями возбудителя фитоплазмоза винограда из группы столбура, подгруппы 16SrXII-A *Candidatus Phytoplasma solani* и внутриклеточными симбиотическими бактериями *Wolbachia, Rickettsia* и *Spiroplasma*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Появление в районах виноградарства России новых инвазивных видов цикадок *A. kakogawana* и *M. pruinosa* поднимает вопросы о точной идентификации инвазивных форм этих видов и о возможном влиянии этих видов на виноградарство. Полученные нами данные по нуклеотидной изменчивости BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI* в популяционных выборках цикадок

A. kakogawana и *M. pruinosa* на территории Южного берега Крыма и на черноморском побережье Кавказа в России показывают мономорфность вида *M. pruinosa* и наличие двух форм *A. kakogawana*, которые следует рассматривать как возможные виды-близнецы. Для подтверждения видового статуса найденных форм необходимы дальнейшие исследования их экологии и генетики, поскольку молекулярная идентификация не вызывает проблем. В настоящее время в базах данных GenBank отсутствуют похожие последовательности. Следовательно, источник инвазии *A. kakogawana* на территорию России неизвестен.

Практическое значение цикадок во многом определяется их возможной ролью как векторов фитоплазмозов винограда. Впервые фитоплазменное заболевание столбуром винограда в Крыму было отмечено в 2012 г. [27]. Предполагается, что фитоплазма – возбудитель почернения древесины, переносится на виноград с вьюнка полевого, повоя заборного и крапивы двудомной цикадкой *Hyalesthes obsoletus* [17]. Однако это предположение в отношении российских популяций *H. obsoletus* не доказано и маловероятно. Цикадка *H. obsoletus* обитает в Крыму [15]. Если бы *H. obsoletus* осуществляла местную передачу фитоплазмы с дикоросов и культурных пасленовых (картофеля и томатов) на виноград с заметной эффективностью, зараженными оказалось бы значительное число виноградных растений. Однако в Крыму столбуром инфицированы только те растения винограда, которые происходят от посадочного материала из разных европейских стран [27]. Поэтому хотя любой вид цикадок можно рассматривать в качестве предполагаемого переносчика возбудителя фитоплазмоза винограда, это отнюдь не означает доказанного факта переноса фитоплазмы.

Мы не обнаружили инфицирования инвазивных популяций цикадок внутриклеточными симбиотическими бактериями *Wolbachia, Rickettsia* и *Spiroplasma*. Этот результат, вероятно, закономерен. Ранее нами было показано, что инвазивные популяции жука *Harmonia axyridis*, в отличие от популяций нативного ареала, так же не инфицированы внутриклеточными симбиотическими бактериями [21, 22]. Бактерии *Wolbachia, Rickettsia* и *Spiroplasma*, вероятно, являются формой генетического груза, освобождение от которого обеспечивает повышение жизнеспособности и конкурентоспособности инвазивной популяции, а значит и ее устойчивости в новых местообитаниях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ 16-16-00079.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы статьи внесли равный вклад в исследование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Metcalf Z.P., Bruner S.C.* Cuban Flatidae with new species from adjacent regions // Ann. Entomol. Soc. Am. 1948. V. 41. P. 63–97.
2. *Zangheri S., Donadini P.* Comparsa nel Veneto di un Omottero nearctico: *Metcalfa pruinosa* Say (Homoptera, Flatidae) // Redia. 1980. V. 63. P. 301–306.
3. *Jermini M., Bonavia M., Brunetti R., Mauri G., Cavalli V. Metcalfa pruinosa* Say, *Hyphantria cunea* (Drury) and *Dichelomyia oenophila* Haimah: Three entomological curiosities or a new phytosanitary problem for Ticino and Switzerland? // Switzerland Revue of Viticulture, Arboriculture, Horticulture. 1995. V. 27. № 1. P. 57–63.
4. *Lauterer P.* Citrus flatid planthopper *Metcalfa pruinosa* (Hemiptera: Flatidae), a new pest of ornamental horticulture in the Czech Republic // Plant Prot. Sci. 2002. V. 38. P. 145–148.
5. *Gogan A.I., Grozea A.M.* Virteiu *Metcalfa pruinosa* Say (Insecta: Homoptera: Flatidae) – first occurrence in western part of Romania // Res. J. Agricultural Sci. 2010. V. 42. № 4. P. 63–67.
6. *Gnezdilov V.M., Sugonyaev T.S.* First record of *Metcalfa pruinosa* (Homoptera: Fulgoroidea: Flatidae) from Russia // Zoosystematica Rossica. 2009. V. 18. № 2. P. 260–261.
7. *Балахнина И.В., Пастарнак И.Н., Гнездилов В.М.* Мониторинг и меры по контролю численности *Metcalfa pruinosa* (Say) (Hemipteran, Auchenorrhyncha: Flatidae) в Краснодарском крае // Энтомол. обозрение. 2014. Т. 3. С. 3–4.
8. *Preda C., Skolka M.* Range expansion of *Metcalfa pruinosa* (Homoptera: Fulgoroidea) in Southeastern Europe // Ecol. Balkanica. 2011. V. 3. № 1. P. 79–87.
9. *Замотайлов А.С., Щуров В.И., Белый И.А.* Цикадка белая – новая угроза сельскому и лесному хозяйству на юге России // Защита и карантин растений. 2012. № 4. С. 46–47.
10. *Matsumura S.* A revision of the Palaearctic and oriental typhlocybid-genera with descriptions of new species and new genera // Ins. Mats. 1932. V. 6. № 3. P. 93–120.
11. *Ануфриев Г.А., Емельянов А.Ф.* Определитель насекомых Дальнего Востока СССР. Т. II. Равнокрылые и полужесткрылые. Л.: Наука, 1988. 972 с.
12. *Сугоняев Е.С., Гнездилов В.М., Яковук В.А.* Новый потенциальный вредитель винограда // Защита и карантин растений. 2004. Т. 7. С. 35.
13. *Балахнина И.В., Сугоняев Е.С., Яковук В.А.* Японская виноградная цикадка – новый потенциально опасный вредитель виноградной лозы на Северном Кавказе // Защита и карантин растений. 2009. Т. 12. С. 33–34.
14. *Радионовская Я.Э., Диденко Л.В.* Оценка вредоносности нового фитофага – цикадки японской виноградной *Arboridia kakogawana* Mats. – на виноградниках Крыма // Бюллетень ГНБС. 2015. Т. 114. С. 61–68.

15. *Gnezdilov V.M., Sugonyaev E.S., Artokhin R.S. Arboridia kakogawana* (Matsumura) (Hemiptera Cicadellidae Typhlocybinae) – a new pest of grapevine in Southern Russia // REDIA. 2008. V. 1. P. 51–54.
16. *Tramontini S., Delbianco A., Vos S.* Pest survey card on flavescence dorée phytoplasma and its vector *Scaphoideus titanus* // EFSA supporting publication. 2020. V. 17. № 8. P. 1–36. https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1909
17. *Sforza R., Clair D., Daire X., Larrue J., Boudon-Padieu E.* The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of Bois Noir of grapevines in France // J. Phytopathology. 1998. V. 146. P. 549–556. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1998.tb04753.x
18. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
19. *Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. P. 294–299.
20. *Baldo L., Hotopp J.C.D., Jolley K.A. et al.* Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis* // Appl. and Environ. Microbiology. 2006. V. 72. № 11. P. 7098–7110.
21. *Горячева И.И., Блехман А.В., Андрианов Б.В., Горелова Т.В., Захаров И.А.* Генотипическое разнообразие *Wolbachia pipientis* в нативных и инвазивных популяциях *Harmonia axyridis* Pall, 1773 (Coleoptera, Coccinellidae) // Генетика. 2015. Т. 51. № 8. С. 857–863. https://doi.org/10.7868/S0016675815080032
22. *Goryacheva I., Blekhman A., Andrianov B., Zakharov I.* Heritable bacterial endosymbionts in native and invasive populations of *Harmonia axyridis* // Biol. Invasions. 2017. V. 19. Iss. 2. P. 493–502. https://doi.org/10.1007/s10530-016-1298-8
23. *Majerus T.M.O., Graf von der Schulenburg J.H., Majerus M.E.N., Hurst G.D.* Molecular identification of a male-killing agent in the ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) // Insect Mol. Biol. 1999. V. 8. P. 551–555. https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1999.00151.x
24. *Lorenz K.H., Schneider B., Ahrens U., Seemuller E.* Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA // Phytopathology. 1995. V. 85. P. 771–776.
25. *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
26. *Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R.* Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Biol. Sci. 2003. V. 270. № 1512. P. 313–321. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218
27. *Алейникова Н.В., Радионовская Я.Э.* Интродуцированный посадочный материал – источник фитоплазменной инфекции на виноградниках Крыма // Защита и карантин растений. 2015. № 9. С. 31–33.

Invasive Populations of Cicadas Species *Metcalfa pruinosa* (Hemiptera: Flatidae) and *Arboridia kakogawana* (Hemiptera: Cicadellidae) are Not Infected with Intracellular Symbiotic Bacteria

B. V. Andrianov[a, c, *], D. A. Romanov[a], and E. A. Matveykina[a, b]

[a]*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
[b]*All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" Russian Academy of Sciences, Yalta, 298600 Russia*
[c]*Moscow Region State University, Moscow oblast, Mytishi, 141014 Russia*
**e-mail: andrianovb@mail.ru*

Appearance and rapid spread of new invasive cicadas species: *Metcalfa pruinosa* (Say, 1830) and *Arboridia kakogawana* (Matsumura, 1932) in Russia requires studying both the causes of the invasion and consequences of invasion for viticulture. Of particular interest is the study of the possible role of new cicadas' species in the spread of pathogenic bacteria of grape phytoplasmosis. At present, these issues are poorly studied. We characterized the variability of the BOLD fragment of mitochondrial *COI* gene in the population samples of *M. pruinosa* and *A. kakogawana* from the populations of the Crimea and Black Sea coast of Caucasus. With the help of PCR for specific genes we searched for cicadas' infected by bacteria of phytoplasmosis of grapes from the group of stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*) and intracellular symbiotic bacteria: *Wolbachia, Rickettsia*, and *Spiroplasma*. We found *M. pruinosa* only on the Black Sea coast of Caucasus. The *M. pruinosa* populations are close to monomorphism. We found *A. kakogawana* in both the Crimea and Caucasus regions. We have identified two new forms of this species in Russia. We have not found pathogenic bacteria of phytoplasmosis of grapes and intracellular symbiotic bacterias' in studied cicadas' populations.

Keywords: invasive populations, *Vitis vinifera*, *COI*, Cicadellidae, phytoplasma.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1164–1173

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.174.015.3

ГАПЛОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МОНГОЛЬСКИХ И ТУВИНСКИХ ПОРОД КОЗ (*Capra hircus*) НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА мтДНК И Y-ХРОМОСОМЫ

© 2021 г. В. Н. Воронкова[1, *], А. К. Пискунов[1], Э. А. Николаева[1], М. Т. Семина[1], Е. А. Коноров[1, 2], Ю. А. Столповский[1]

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

[2]*Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук, Москва, 109316 Россия*

**e-mail: valery.voronkova@gmail.com*

Поступила в редакцию 14.12.2020 г.
После доработки 03.03.2021 г.
Принята к публикации 29.03.2021 г.

Впервые на основе полиморфизма гипервариабельной области D-петли мтДНК и гена *SRY* проведено сравнительное исследование гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, генетической дифференциации и филогении тувинских шерстных (двух популяций, $n = 34$) и монгольских пуховых коз (пяти популяций, $n = 94$). Проведен внутрипородный, в том числе межпопуляционный, анализ в сравнении с референсными последовательностями ДНК коз других пород. Выявлен высокий уровень генетического разнообразия исследуемых выборок. Оценка молекулярной дисперсии показала, что основной вклад в генетическое разнообразие исследуемых пород вносит внутрипопуляционное разнообразие (98.84%) и лишь 1% обусловлен межпородными отличиями. Наиболее распространена среди коз монгольской и тувинской пород гаплогруппа A мтДНК, также были обнаружены особи, относящиеся к гаплогруппам C и F; другие гаплогруппы (B, D и G) у данных выборок не обнаружены. Большинство самцов монгольской породы на основе полиморфизма гена *SRY* имели гаплотипы Y1A (66.7%) и Y2A (25%), в популяциях алтай улаан и три красавицы были выявлены особи с редким гаплотипом Y2B (8.3%). Все исследованные самцы тувинской породы коз относились к гаплотипу Y2A.

Ключевые слова: коза, *Capra hircus*, генетическое разнообразие, D-петля, Тыва, Монголия, порода, SRY, мтДНК.

DOI: 10.31857/S0016675821100155

Козоводство – одно из наиболее древних и в то же время интенсивно развивающихся отраслей животноводства в мире. Рост интереса к козоводству обусловлен высокими вкусовыми и диетическими свойствами продуктов питания, получаемых от этих животных, их сравнительной неприхотливостью, а также рядом экономических причин, в частности высоким индексом молочности коз, качеством пуха [1]. Несмотря на важную роль и существенный потенциал козоводства в сельском хозяйстве, изучение генома козы все еще находится в зачаточном состоянии по сравнению с другими сельскохозяйственными животными: крупным рогатым скотом, овцами и свиньями и т.п. Одомашнивание безоарового козла началось около 10 тыс. лет назад [2]. Современные данные исследований биологии коз показали, что первые генетические отличия домашних коз были связаны с изменением работы иммунной системы, пищеварения (адаптацией к ксенобиотикам), а также с адаптацией к перепаду температур. Интересно, что далеко не последнюю роль в вышеуказанных процессах, судя по результатам анализа древней ДНК, мог сыграть поток или интродукция “диких” генов свободноживущих сородичей. Известным примером служит появление активного варианта гена *MUC6* у ряда филогенетических ветвей домашних коз [3]. Данный ген, белковый продукт которого служит эффективной защитой от микробных и паразитических инвазий, исходно “принадлежал” не безоаровому козлу, а кавказскому туру, обитающему на влажных и теплых территориях, богатых подобными патогенами [4].

Вплоть до начала XIX в. селекция коз была слабоинтенсивной. Тем не менее козы как вид представлены большим числом пород – около 600, что составляет примерно 12% от общего числа пород всех млекопитающих [5]. По всей видимости, такое породное разнообразие возникло в результате как естественного отбора (в основном при адапта-

ции к различным условиям существования: высокогорье, засушливые равнины, жаркие летом и холодные зимой степи, каменистые долины, практически лишенные растительности), так и искусственного, направленного на избирательное улучшение отдельных качеств животных, в основном молочной, мясной и шерстной продуктивности.

Ярким примером приспособляемости коз, а также их связи с жизнью различных народов, служат тувинские и монгольские аборигенные козы. Они прекрасно адаптированы к суровым климатическим и кормовым условиям, имеют крепкую конституцию, неприхотливы, не требуя при этом затрат на производство и хранение растительных кормов. Монгольские и тувинские козы приспособлены к круглогодичной отгонно-пастбищной системе содержания. Такой способ, в отличие от интенсивного типа разведения, положительно сказывается на экологическом состоянии агро- и фитосистем региона, которые в целом крайне чувствительны к любому антропогенному воздействию.

В настоящее время тувинские и монгольские козы слабоизучены с генетической точки зрения. Очевидно, что уникальный генофонд местных коз охарактеризован недостаточно. Широко используемые во всем мире методы оценки филогении на основе мтДНК и Y-хромосомы никогда не применялись для тувинских коз и крайне редко для монгольских. Продемонстрирован низкий уровень генетической дифференциации и географической структуры монгольских коз при высоком уровне гаплотипического разнообразия D-петли мтДНК (0.977) [6]. В отличие от других азиатских пород, таких как японские, индийские [7], казахстанские [8], у монгольской и тувинской пород коз не проводилась оценка отцовского генетического разнообразия на основе полиморфизма SRY.

Таким образом, можно выделить три основные задачи данного исследования: выявление гаплотипического разнообразия, филогенетических взаимоотношений между исследуемыми популяциями, оценка генетических рисков для тувинской и монгольской пород.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые популяции. Сбор образцов и получение ДНК

Первичным материалом для определения гаплотипов мтДНК и гена *SRY* служили образцы крови домашних коз (n = 453) двух аборигенных пород: тувинской шерстной (n = 188) и монгольской пуховой (n = 255).

Образцы крови коз тувинской шерстной породы были получены в двух сельскохозяйственных производственных кооперативах (СПК) Республики Тыва: “Артыш” (n = 70, Кызылский кожуун) и “Уургай” (n = 118, Эрзинский кожуун).

Образцы крови животных монгольской пуховой породы были получены в частных хозяйствах Монголии. Эти выборки в данной работе были названы в соответствии с их географической локализацией. Всего было получено пять выборок: три красавицы (n = 48, гурван эгч, аймак Умнеговь), дархатская (n = 52, аймак Хубсугул), бурая завхан (n = 52, аймак Завхан), ульгий улаан (n = 62, аймак Увс) и алтай улаан (n = 51, аймак Ховд) (рис. 1 – карта сбора образцов).

Протокол исследования № 3 был одобрен на заседании этического комитета ИОГен РАН от 14.12.2020. Забор крови осуществлялся ветеринаром с использованием одноразовых стерильных наборов в вакуумные пробирки с K3 ЭДТА Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия) согласно ветеринарным и этическим нормам. Для дальнейшего анализа были отобраны исключительно неродственные особи на основе микросателлитных данных оценки родства с использованием программы ML-Relate [9].

Выделение ДНК проводилось из цельной крови наборами реагентов Magna Prep 200 (ООО “Лаборатория Изоген”, Москва) позволяющими получить высокомолекулярную ДНК с концентрацией 40–60 нг/мкл, согласно инструкции изготовителя. Для секвенирования D-петли мтДНК было отобрано по 20 образцов из каждой выборки, для гена *SRY* – от 4 до 14 в зависимости от числа самцов в выборке (табл. 1).

Амплификация и секвенирование D-петли мтДНК

Для амплификации гипервариабельного участка D-петли мтДНК коз были выбраны праймеры, рекомендованные в публикациях [10, 11]: CAP-F (5'-CTGATTAGTCATTAGTCCATC-3'), CAP-R (5'-CTGATTAGTCATTAGTCCATC-3'). Оптимизация условий ПЦР проводилась на амплификаторе MiniAmp Plus (Thermo Fisher Scientific, США) с зоной Veriflex, позволяющей одномоментно проводить амплификацию в трех различных температурных областях для подбора наилучшей температуры отжига праймеров. В качестве реактивов для постановки ПЦР были использованы коммерческие наборы 5X MasDDTaqMIX-2025 (Диалат Лтд, Россия), содержащие термостабильную “hot-start” полимеразу SmarTaq. Результатом оптимизации стала следующая программа амплификации участка D-петли мтДНК: 94°C – 10 мин, 35 циклов: 94°C – 30 с, 61°C – 30 с, 72°C – 30 с; элонгация 72°C – 5 мин.

Очистку фрагментов, а также определение прямой и обратной нуклеотидной последовательности в исследуемом фрагменте проводили в компании Евроген (Москва, РФ) методом автоматического секвенирования на генетическом

Рис. 1. Географическое расположение мест обитания исследуемых выборок монгольских и тувинских коз.

анализаторе ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США) с использованием наборов Big DyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem). Для дальнейшего анализа было отобрано 128 ампликонов размером 598 пн, расположенных между позициями 15653 и 16250 мтДНК коз.

Амплификация и секвенирование области гена SRY

Для секвенирования фрагмента длиной 543 пн гена *SRY* у самцов из двух выборок из Тувинской Республики и четырех из Монголии были подобраны праймеры (SRY-F 5'-CAAAGGCACGCTTTATCTCA-3', SRY-R 5'-GGCAGCAAAACTGGCTTTTTCAC-3') в соответствии с работами Waki и соавт. [7] и Vidal и соавт. [12].

Оптимизация условий ПЦР для амплификации фрагмента гена SRY проводилась на амплификаторе MiniAmp Plus (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием наборов 5X MasDDTaqMIX-2025 (Диалат Лтд, Россия), содержащих термостабильную “hot-start” полиме-

Таблица 1. Генетическое разнообразие мтДНК коз (*Capra hircus*) монгольской и тувинской пород

Порода	Выборка	Код	*n*	*H*	π	*n* гап.	A	C	F
Тувинская	Артыш	Artysh	15	0.980 ± 0.028	0.029 ± 0.004	14	13	3	–
	Уургай	Uurgay	19	0.950 ± 0.027	0.032 ± 0.005	11	19	–	–
Монгольская	Три красавицы	Tri_kras	18	0.990 ± 0.023	0.028 ± 0.007	15	14	3	–
	Дархатская	Darhat	19	0.940 ± 0.03	0.012 ± 0.001	11	13	5	–
	Бурая завхан	Buraya	20	0.960 ± 0.033	0.014 ± 0.001	16	14	6	–
	Алтай улаан	AK	20	1.000 ± 0.018	0.022 ± 0.003	17	20	–	–
	Ульгий улаан	YK	17	0.990 ± 0.023	0.025 ± 0.004	15	13	3	1

Примечание. *n* – число образцов, *H* – гаплотипическое разнообразие, π – нуклеотидное разнообразие, *n* (гап.) – число гаплотипов в выборке, A – число особей из гаплогруппы A, C – число особей из гаплогруппы C, F – число особей из гаплогруппы F.

Таблица 2. Попарные значения индекса фиксации F_{st} для монгольских и тувинских коз (*Capra hircus*) на основе анализа последовательностей D-петли мтДНК

Порода	Артыш	Уургай	Три красавицы	Дархат	Бурая завхан	Алтай улаан	Ульгий улаан
Артыш	0.000						
Уургай	0	0.000					
Три красавицы	0	0	0.000				
Дархатская	0.005	0	0	0.000			
Бурая завхан	0.007	0.047	0.035	**0.065**	0.000		
Алтай улаан	0	0.037	0.034	**0.080**	0.013	0.000	
Ульгий улаан	0	0	0	0	0.014	0.015	0.000

Примечание. Полужирным шрифтом выделены значения F_{st} достоверные при $p < 0.05$.

разу SmarTaq. В результате оптимизации температуры отжига праймеров и концентрации реактивов итоговая программа имела следующий вид: 94°C – 5 мин, 35 циклов: 94°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 1 мин 30 с; элонгация 72°C – 5 мин.

В результате прямого и обратного секвенирования в компании Евроген (Москва, РФ) и первичной обработки данных были получены 38 последовательностей гена *SRY* для пяти выборок (уургай и артыш тувинской породы коз, увс, ховд, дархат и три красавицы монгольской породы коз). Для дальнейшего анализа были отобраны 30 последовательностей, не имеющих артефактов секвенирования.

Анализ данных

Редактирование нуклеотидных последовательностей осуществлялось в программном пакете R (sangeranalyzeR) [13], выравнивание – в программах UGENE Unipro v1.28.1 [14] и MEGA7 v7.0.26 [15]. С использованием программы Arlequin v3.5.2.2 [16] были посчитаны H, π и их SD, а также F_{st} с 1000 повторностей для получения p-значения. Гаплотипы мтДНК были определены с помощью DnaSP [17] и с добавлением последовательностей HV1 из баз данных GenBank. Байесовское дерево гаплотипов было построено в программе MrBayes3.2.7 [18], число поколений MCMC 2000000, модель замен определена с помощью PartitionFinder 2 [19]. Филогенетическая сеть на основе алгоритма TCS была построена и визуализирована в программе PopART v1.7 [20].

Гаплотипы SRY были определены с использованием последовательностей ДНК из GenBank в соответствии со статьями Waki и др. [7], Vidal и др. [12] и Tabata и др. [8]. Для построения сетей был использован алгоритм Median-joining с равным весом всех замен в программе NETWORK v10.1.0.0 [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вариабельность D-петли мтДНК

В результате секвенирования были определены 128 последовательностей D-петли мтДНК длиной 506 пн у коз из семи выборок монгольской и тувинской аборигенных пород. Выявлено 18 полиморфных сайтов с общим числом мутаций 31, из которых 22 транзиции и 9 трансверсий. На основе данных вариаций (мутаций) было выявлено 76 гаплотипов D-петли мтДНК. Большинство коз принадлежали гаплогруппе A ($n = 107$), 20 животных – гаплогруппе C и одна особь – гаплогруппе F (табл. 1).

Анализ гаплотипического и нуклеотидного разнообразия (табл. 1) выявил высокий уровень изменчивости исследуемых выборок: H от 0.940 до 1.000 для монгольской породы и 0.950–0.980 для тувинской; π от 0.012 до 0.025 для монгольской и 0.029–0.032 для тувинской. Наименьшие значения данных статистик были получены для дархатской выборки ($H = 0.940$ и $\pi = 0.012$), наибольшее значение гаплотипического разнообразия отмечено у выборки алтай улаан ($H = 1.000$), а наибольшее нуклеотидное разнообразие – у тувинской уургай ($\pi = 0.032$).

Оценка генетической дифференциации выборок монгольской и тувинской пород была проведена с помощью сравнения попарных значений индекса фиксации F_{st} (табл. 2) и позволила выявить незначительный уровень дифференциации исследуемых популяций (F_{st} = 0.000–0.080). Достоверно отличалась лишь монгольская дархатская от бурой завхан ($F_{st} = 0.065$) и от алтай улаан ($F_{st} = 0.080$).

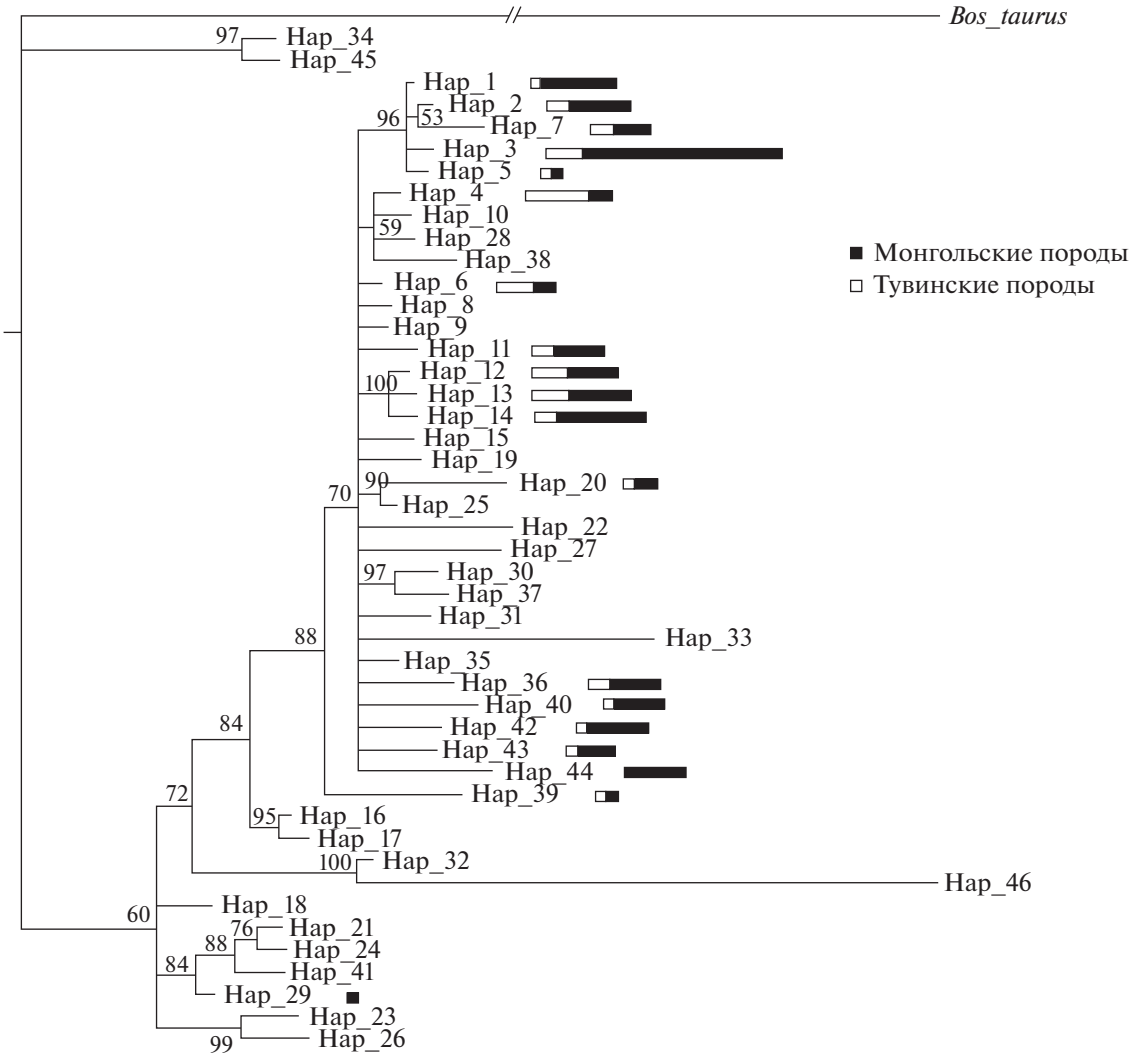

Рис. 2. Байесово филогенетическое дерево на основе гаплотипов мтДНК монгольской и тувинской коз (*Capra hircus*), а также референсных последовательностей. В качестве внешней группы была использована последовательность мтДНК коровы (*Bos taurus*). Для внутренних узлов приведены апостериорные вероятности (число поколений MCMC 2000000).

Анализ филогенетических связей и представленности гаплогрупп мтДНК монгольской и тувинской пород коз

Филогенетические взаимоотношения среди выборок были продемонстрированы с использованием байесовского анализа. Все исследованные нами образцы принадлежали к гаплогруппе A, C и F, другие гаплогруппы (B, D и G) у данных выборок не обнаружены. Гаплогруппа A наиболее широко представлена среди коз различных пород, например у оманских пород коз с частотой более 0.80 [11], у казахской породы – 0.97 [8], а также у различных российских пород с частотой более 0.95 [22]. Возможно, более редкие гаплотипы не попали в исследованные нами выборки или в целом не представлены у монгольской и тувинской пород.

Монгольская и тувинская породы не формируют отдельные кластеры на дендрограмме (рис. 2), так как у коз нет породоспецифичных гаплотипов – отличается лишь частота их встречаемости в различных популяциях.

Построение TCS-сети в программе PopART позволило визуализировать филогенетические отношения среди исследуемых выборок (рис. 3). Высокий уровень разнообразия и большое число гаплотипов отражается в отсутствии сформированных породоспецифичных кластеров сети – у монгольской и тувинской пород встречаются различные гаплотипы, а популяции также отличаются лишь частотами их встречаемости.

На основании анализа AMOVA (популяции были разделены на две группы по породам – монгольскую и тувинскую, табл. 3) было выявлено,

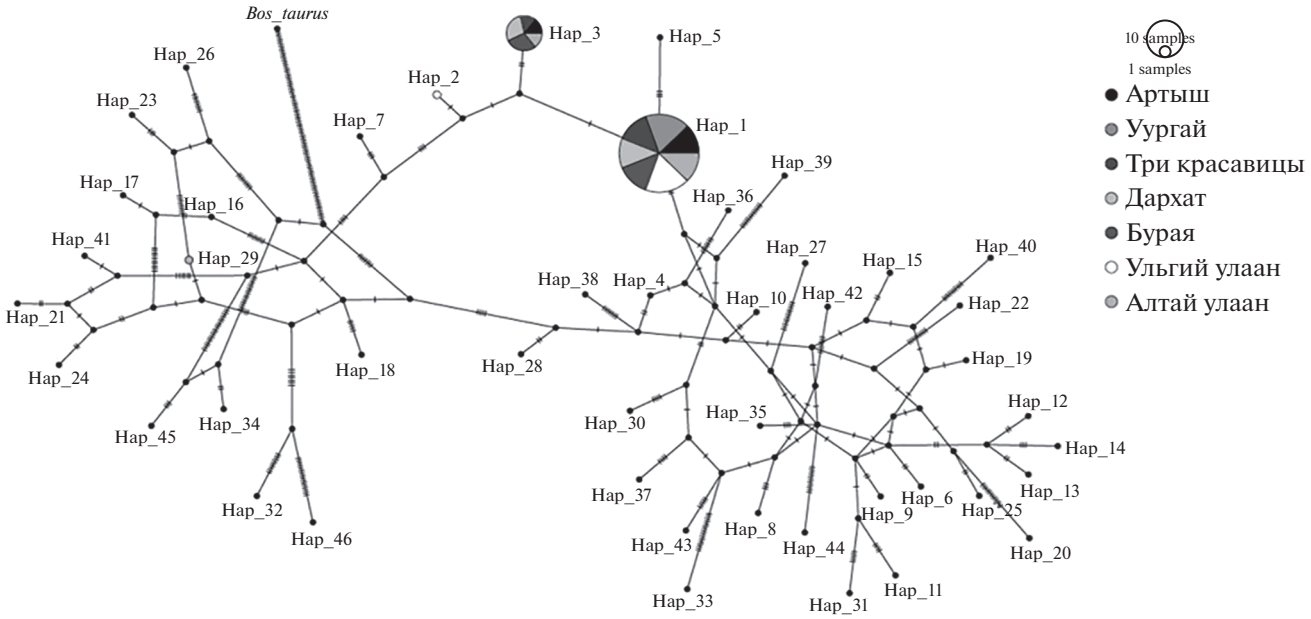

Рис. 3. TCS-сеть, отображающая генетические взаимоотношения между гаплогруппами мтДНК коз (*Capra hircus*). Размер круга соответствует числу входящих в него образцов. В качестве внешней группы использована последовательность мтДНК коровы (*Bos taurus*). Число прерывистых полос на линиях отражает число мутаций между двумя гаплотипами.

что основной вклад в генетическое разнообразие исследуемых пород вносит внутрипопуляционное разнообразие (98.84%) и лишь 1% относится к межпородным отличиям. Для пород, обитающих в близких к естественным условиях и не находящихся под давлением селекции (искусственного отбора), типичны низкий уровень дифференциации и высокий уровень внутрипородного разнообразия.

Анализ разнообразия гаплотипов Y-хромосомы на основе полиморфизма гена SRY

В данном исследовании определены гаплотипы Y-хромосомы монгольских и тувинских коз по гену SRY на основе 30 полученных нуклеотидных последовательностей длиной 548 пн. Полученные последовательности сравнивались с опубликованными ранее [7, 23, 24]. Обнаружены четыре полиморфных сайта гена *SRY*: g.2603A>T, g.2670A>G, g.2863T>A и g.2990A>G. Среди изученных популяций встречались три основных гаплотипа: наиболее распространенный среди азиатских пород Y1A (53.3%, $n = 16$), часто встречающийся у европейских пород Y2A (40%, $n = 12$) и редко встречающийся азиатский гаплотип Y2B (6.6%, $n = 2$) (табл. 4).

Большинство исследованных коз принадлежали к двум самым распространенным гаплотипам Y1A и Y2A, составив 53 и 45% соответственно.

Таблица 3. Генетическое разнообразие тувинских и монгольских коз (*Capra hircus*) на основе анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) последовательностей D-петли мтДНК

Источник изменчивости	*d.f.*	SS	VC	Процент изменчивости
Между группами	1	25.93	0.17	1.02
Между популяциями внутри групп	5	85.81	0.02	0.14
Внутри популяций	121	2025.29	16.74	98.84
Всего	127	2137.03	16.93	

Примечание. *d.f.* – число степеней свободы, SS – сумма квадратов, VC – компоненты изменчивости.

(табл. 4, рис. 4). Гаплотип Y1B не был обнаружен среди проанализированных животных: он с невысокой частотой встречается в основном в европейских популяциях коз. У монгольской породы коз встречается гаплотип Y2A, не обнаруженный в Индии, странах Юго-Восточной Азии и Японии, а также гаплотип Y2B, отсутствующий западнее Бутана, что по версии группы ученых из института Кобе [7] может быть вызвано сильным эффектом основателя на последних стадиях миграции одомашненных коз на восток. Самым распространенным гаплотипом среди монгольских популяций, исследованных нами, оказался гаплотип Y1A.

Среди тувинской породы коз был выявлен исключительно гаплотип Y2A, который наиболее полно представлен на территории Европы и Африки. Данный гаплотип также присутствует у монгольских и казахских коз (рис. 4). Вероятно, для выявления большего числа гаплотипов Y-хромосомы требуется увеличить число выборок и исследуемых образцов тувинской породы.

Таблица 4. Число гаплотипов Y-хромосомы на основе вариабельности гена *SRY* у монгольских и тувинских пород коз

Порода	Y1A	Y2A	Y2B
Дархат	7	0	0
Ульгий улаан	6	2	0
Алтай улаан	1	0	1
Три красавицы	2	4	1
Уургай	0	3	0
Артыш	0	3	0
Всего	16	12	2

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в настоящем исследовании данные (в частности, высокие значения гаплотипического разнообразия от 0.940 до 1.000 и низкие значения F_{st} от 0 до 0.080), как и результаты подобных исследований, проводимых в Монголии в последние годы [6], свидетельствуют о слабой меж- и внутрипородной дифференциации локальных пород коз. Результаты микросателлитного анализа также свидетельствуют в пользу низкого уровня дифференциации тувинских и монгольских популяций коз [25, 26]. Дифференциация между монгольскими выборками коз составляла от 1.7 до 3.5%, что характерно для свободно скрещивающихся животных, не находящихся под давлением селекции.

Для монгольских коз характерен широкий спектр полиморфизма фенотипических признаков, начиная от разнообразия мастей (черная, бурая, белая, красная, пегая, чубарая и др.), формы рогов (винтовые или прямые) и их наличия/отсутствия (комолость), бороды и заканчивая разнообразием промеров, молочной и пуховой продуктивности [27]. Для отдельных популяций различаются частоты встречаемости данных признаков, например для коз улгий улаан (YK) характерна красная масть, однако встречаются и особи красно-коричневого и коричневого окраса. Многие породы монгольских коз в XX в. были получены путем скрещивания российских пород с аборигенными монгольскими, в том числе южно-гобийская порода три красавицы была выведена на основе местных коз и коз донской породы [27].

Дархатская (darhat) популяция монгольских коз значимо отличается от бурой (buraya) и алтай улаан (AK) (F_{st} 0.065 и 0.080 соответственно), что является следствием географической удаленности, а также разведения дархатской породы “в себе”, что также отражается в низком уровне гаплотипическо-

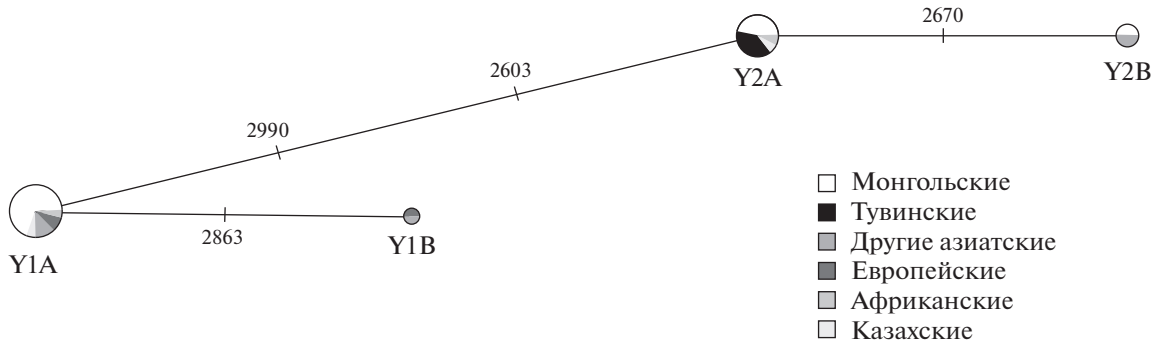

Рис. 4. Сеть гаплогрупп Y-хромосомы на основе вариабельности гена *SRY* коз. Обозначения гаплотипов указаны под кругами. Размер круга отражает число входящих в него образцов. На линиях отмечены позиции мутаций.

го и нуклеотидного разнообразия ($H = 0.940$ и $\pi = 0.012$).

Все исследованные нами особи тувинской и монгольской породы принадлежат к гаплогруппам A, C и F, другие гаплогруппы (B, D и G) у данных выборок не обнаружены. Полученные результаты согласуются с данными других работ [6], гаплогруппа A наиболее часто встречается (90.8%) среди монгольских пород коз. Низкий уровень дифференциации тувинских и монгольских пород коз отражается в отсутствии сформированных породоспецифичных кластеров сети TCS – у монгольской и тувинской пород встречаются различные гаплотипы, а популяции незначительно отличаются лишь частотами их встречаемости. Вклад межпородного разнообразия в уровень изменчивости составил лишь 1%, в то время как различия между особями внутри популяций составили 98%.

Анализ последовательности гена *SRY*, локализованного на Y-хромосоме, позволил выявить три гаплотипа, присутствующих у монгольских популяций коз. Большинство самцов имели гаплотипы Y1A (66.7%) и Y2A (25%), распространенные среди азиатских и европейских пород соответственно. Также в монгольских популяциях алтай улаан (AK) и три красавицы (Tri_kras) были выявлены два самца с гаплотипом Y2B (8.3%), редко встречающимся только у азиатских пород коз [8]. Все исследованные самцы тувинской породы коз относились к гаплотипу Y2A, преобладающему в основном у европейских пород, что может косвенно свидетельствовать об интрогрессии западных пород коз и требует увеличения выборки для проверки данной гипотезы.

Видимое благополучие – высокий уровень генетического разнообразия, в том числе высокая численность животных, продукция от которых служит основным источником прибыли региона, может маскировать под собой критическую ситуацию. Суть проблемы заключается в размывании породных характеристик и возможной потери уникальных сочетаний аллелей, которые определяли ценные качества коз тувинской и монгольской аборигенных пород. Вероятно, что определенный селекционный прогресс отрасли козоводства в регионе в последние годы обусловлен эффектом гетерозиса, возникшим в результате завоза в Тыву и Монголию коз трансграничных пород в объеме нескольких миллионов особей, и последующим их скрещиванием с местными породами [28]. В результате получены синтетические популяции. Косвенным подтверждением реальности этих процессов может служить резкое снижение выживаемости коз в особенно суровые зимы (“дзуд”), в результате которых гибли миллионы животных и страна скатывалась в затяжной экономический кризис [29].

Таким образом, генетический статус изученных животных остается неопределенным, что в будущем может сыграть негативную роль для данных пород. Потенциальная утрата породных качеств, таких как крайне широкая адаптируемость к климатическим условиям и местной кормовой базе, сведет на нет пока еще экономическую целесообразность разведения данных аборигенных пород [30]. В то же время настоящее исследование показало, что наиболее изолированные популяции, в частности козы котловины Дархат, имеют наибольшую степень генетической автономности, при этом отличаясь наибольшей выносливостью и наиболее широким диапазоном физиологической адаптивности. Таким образом, не только жители Монголии и Тывы, но научное и мировое сообщество в целом должно быть заинтересовано в сохранении генофонда аборигенных коз, в изучении их физиологии и адаптивности. С социокультурной точки зрения сохранение биоразнообразия аборигенных пород коз – почти настолько же важная задача, как и сохранение находящихся под угрозой исчезновения малых народов Дархатской долины. Без пуха аратских коз в условиях типичной резко континентальной зимы с температурами до –45–50°C выживать будет значительно сложнее.

Полученные в настоящем исследовании данные о низкой дифференциации и высоком уровне генетического разнообразия на основе анализа нуклеотидных последовательностей митохондриальной ДНК и гена *SRY* могут привлечь внимание к проблеме генетической сохранности аборигенных пород и быть полезны при составлении программ сохранения местных пород коз Саяно-Алтайского региона.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 19-76-20061).

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. *Zonaed Siddiki A., Miah G., Islam M.S. et al.* Goat genomic resources: The search for genes associated with its economic traits // Intern. J. Genomics. 2020. 5940205. https://doi.org/10.1155/2020/5940205
2. *Amills M., Capote J., Tosser-Klopp G.* Goat domestication and breeding: A jigsaw of historical, biological and molecular data with missing pieces // Animal Genet. 2017. V. 48. № 6. P. 631–644. https://doi.org/10.1111/age.12598
3. *Zheng Z., Wang X., Li M. et al.* The origin of domestication genes in goats // Sci. Advances. 2020. V. 6. № 21.

eaaz5216.
https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz5216

4. *Simpson H.V., Umair S., Hoang V.C., Savoian M.S.* Histochemical study of the effects on abomasal mucins of *Haemonchus contortus* or *Teladorsagia circumcincta* infection in lambs // Veterinary Parasitol. 2016. V. 226. P. 210–221.
https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.026
5. The second report on the state of the world's animal genetic resources for food and agriculture / Eds Scherf B.D., Pilling D. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome. 2015.
6. *Ganbold O., Lee S.H., Paek W.K. et al.* Mitochondrial DNA variation and phylogeography of native Mongolian goats // Asian-Australas J. Anim. Sci. 2020. V. 33. № 6. P. 902–912.
https://doi.org/10.5713/ajas.19.0396
7. *Waki A., Sasazaki S., Kobayashi E., Mannen H.* Paternal phylogeography and genetic diversity of East Asian goats // Anim. Genet. 2015. V. 46. № 3. P. 337–339.
https://doi.org/10.1111/age.12293
8. *Tabata R., Kawaguchi F., Sasazaki S. et al.* The Eurasian steppe is an important goat propagation route: A phylogeographic analysis using mitochondrial DNA and Y-chromosome sequences of Kazakhstani goats // Anim. Sci. J. 2018. V. 90. P. 317–322.
https://doi.org/10.1111/asj.13144
9. *Kalinowski S.T., Wagner A.P., Taper M.L.* ML-Relate: A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. P. 576–579.
https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x
10. *Luikart G., Gielly L., Excoffier L. et al.* Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 10. P. 5927–5932.
https://doi.org/10.1073/pnas.091591198
11. *Al-Araimi N.A., Gaafar O.M., Costa V. et al.* Genetic origin of goat populations in Oman revealed by mitochondrial DNA analysis // PLoS One. 2017. V. 12. № 12.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190235
12. *Vidal O., Drögemüller C., Obexer-Ruff G. et al.* Differential distribution of Y-chromosome haplotypes in Swiss and Southern European goat breeds // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 16161.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-15593-1
13. *Chao K.H., Barton K., Lanfear R.* SangeranalyseR: simple and interactive analysis of Sanger sequencing data in R // bioRxiv. 2020.
14. *Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.* Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 8. P. 1166–1167.
15. *Kumar S., Tamura K., Nei M.* MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers // Bioinformatics. 1994. V. 10. № 2. P. 189–191.
16. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinformatics. 2005. V. 1. P. 47–50.
17. *Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C. et al.* DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets // Mol. Biol. Evol. 2017. V. 34. № 12. P. 3299–3302.
18. *Huelsenbeck J.P., Ronquist F.* MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics. 2001. V. 17. № 8. P. 754–755.
19. *Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M. et al.* PartitionFinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses // Mol. Biol. Evol. 2017. V. 34. № 3. P. 772–773.
20. *Leigh J.W., Bryant D.* POPART: full-feature software for haplotype network construction // Methods Ecol. Evol. 2015. V. 6. № 9. P. 1110–1116.
21. *Bandelt H.J., Forster P., Röhl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
22. *Deniskova T., Bakoev N., Dotsev A. et al.* Maternal origins and haplotype diversity of seven russian goat populations based on the D-loop sequence variability // Animals (Basel). 2020. V. 10. № 9. P. 1603.
https://doi.org/10.3390/ani10091603
23. *Cañón J., García D., García-Atance M.A. et al.* ECONOGENE Consortium. Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East // Anim. Genet. 2006. V. 37. № 4. P. 327–334.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2006.01461.x
24. *Pereira F., Queirós S., Gusmão L. et al.* Tracing the history of goat pastoralism: New clues from mitochondrial and Y chromosome DNA in North Africa // Mol. Biol. Evol. 2009. V. 26. № 12. P. 2765–2773.
https://doi.org/10.1093/molbev/msp20
25. *Бекетов С.В., Пискунов А.К., Воронкова В.Н. и др.* Генетическое разнообразие и филогения пуховых коз Центральной и Средней Азии // Генетика. 2021. Т. 57. № 7. С. 810–819.
26. *Takahashi H., Nyamsamba D., Mandakh B. et al.* Genetic structure of Mongolian goat populations using microsatellite loci analysis // Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2008. V. 21. № 7. P. 947–953.
27. *Столповский Ю.А., Цендсурэн Ц., Кол Н.В. и др.* Генофонды домашних животных Монголии. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2013. 278 с.
28. https://trendeconomy.com/data/h2/Mongolia/0104
29. *Nandintsetseg B., Shinoda M., Du C., Munkhjargal E.* Cold-season disasters on the Eurasian steppes: Climate-driven or man-made // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 14769.
https://doi.org/10.1038/s41598-018-33046-1
30. *Энхтувшин Б., Курас Л.В., Цыбенов Б.Д.* Традиционное скотоводство монгольских кочевников в условиях глобализации // Вестник Бурятского науч. центра Сиб. отд. РАН. 2013. № 4. С. 208–223.

Haplotype Diversity of Mongolian and Tuvan Goatbreeds (*Capra hircus*) Based on mtDNA and Y-Chromosome Polymorphism

V. N. Voronkova[a, *], A. K. Piskunov[a], E. A. Nikolaeva[a], M. T. Semina[a], E. A. Konorov[a, b], and Yu. A. Stolpovsky[a]

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

[b] *Gorbatov Federal Scientific Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109316 Russia*

**e-mail: valery.voronkova@gmail.com*

For the first time, a comparative study of haplotype and nucleotide diversity, genetic differentiation, and phylogeny of Tuvan woolly (two populations, $n = 34$) and Mongolian cashmere goats (five populations, $n = 94$) was carried out on the basis of polymorphisms of the hypervariable region of the mtDNA D-loop and the SRY gene. An intrabreed, interpopulation analysis was carried out, including in comparison with the reference sequences of goats of other breeds. A high level of genetic diversity of the studied samples was revealed. The assessment of molecular variance showed that the main contribution to the genetic diversity of the studied breeds is made by intrapopulation diversity (98.84%) and only 1% is due to interbreed differences. The most common among Mongolian and Tuvan goats was haplogroup A of mtDNA; individuals belonging to haplogroups C and F were also found; other haplogroups (B, D, and G) were not found in these samples. Most of the males of the Mongolian breed, based on the SRY gene polymorphism, had haplotypes Y1A (66.7%) and Y2A (25%); in the populations of Altai Ulaan and three beauties, individuals with a rare haplotype Y2B (8.3%) were identified. All studied males of the Tuvan breed of goats belonged to the Y2A haplotype.

Keywords: goat, *Capra hircus*, genetic diversity, D-loop, Tuva, Mongolia, breed, SRY, mtDNA.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1174–1184

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.174.015.3:599.742.4

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ СОБОЛЯ (*Martes zibellina* L.) ЮЖНОЙ ЧАСТИ АРЕАЛА ВИДА

© 2021 г. С. Н. Каштанов[1, *], М. В. Шитова[1], М. М. Сомова[4], П. А. Филимонов[1], О. Ю. Тютеньков[5], А. А. Ходырева[1], Г. Р. Свищева[1, 3], И. Г. Мещерский[2], Ю. А. Столповский[1], В. В. Рожнов[2]

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

[2]*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия*

[3]*Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

[4]*Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт животноводства им. академика Л.К. Эрнста, Московская область, Подольск, п. Дубровицы, 142132 Россия*

[5]*Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия*

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

Поступила в редакцию 25.03.2021 г.
После доработки 15.04.2021 г.
Принята к публикации 20.04.2021 г.

Для исследования современной структуры генофонда соболя южной части ареала использована панель из 15 микросателлитных локусов. Определен высокий уровень дифференциации популяций. Выявлено существование нескольких популяционных кластеров соболя на обширной территории от Западной Сибири до Забайкалья. Эта часть ареала вида отличается высокой численностью соболя, другая особенность – разрешенные к промыслу территории чередуются со значительным числом заповедных. Определены возможности идентификации особей по популяционной и региональной принадлежности. В исследовании дана оценка надежности прогноза популяционной принадлежности (SCOR-коэффициент) особей к объединенной выборке, показавшая, что при увеличении числа локусов с 8 до 15 значимо возрастает точность (количество правильно идентифицированных особей) и надежность идентификации в среднем для каждой отдельной особи. Результаты исследования дополняют референтную базу генетических данных популяций географических регионов вида, позволяют решить ряд проблем, связанных с промыслом на территориях, граничащих с заповедными, что способствует сохранению внутривидового разнообразия соболя.

Ключевые слова: географические популяции соболя, интродукция, промысел, микросателлитные локусы, филогенетический анализ, генетическая структура, ДНК-идентификация.

DOI: 10.31857/S0016675821100052

Ареал соболя Евразии занимает обширную территорию от западных склонов гор Урала до побережья Дальнего Востока, включая и некоторые острова Охотского моря. Промысел соболя – это традиционное занятие населения таежных поселков. Значительное снижение численности вида в первой половине XX в. привело к запрету на промысел соболя, однако после восстановления численности популяций запрет был снят. Сравнительный анализ промысловой пушнины из различных регионов показал, что соболь относится к видам с хорошо выраженной географической изменчивостью. Данные накапливались с XVI в. и касаются признаков, имеющих товарную ценность, таких как окрас и качество меха, размер животных. Наиболее ценные по окрасу меха географические типы соболя обитают в районе оз. Байкал. Наиболее крупный по размеру соболь обитает в равнинной тайге Западной Сибири и на Дальнем Востоке (п-ов Камчатка). Соболь южной части ареала (Алтае-Саянский регион) значительно отличается от соболей соседних географических регионов Среднесибирского плоскогорья и Западной Сибири [1, 2]. Таксономический статус соболя этого региона был определен по ряду количественных признаков как подвид *Martes zibellina averini* Bazhanov, 1943 [3–5].

Выявленные различия на основе морфологических признаков между популяциями географических регионов сохраняются до настоящего времени [2, 6]. Популяции сохранили присущие им признаки, несмотря на фрагментацию ареала в период снижения численности и последующие

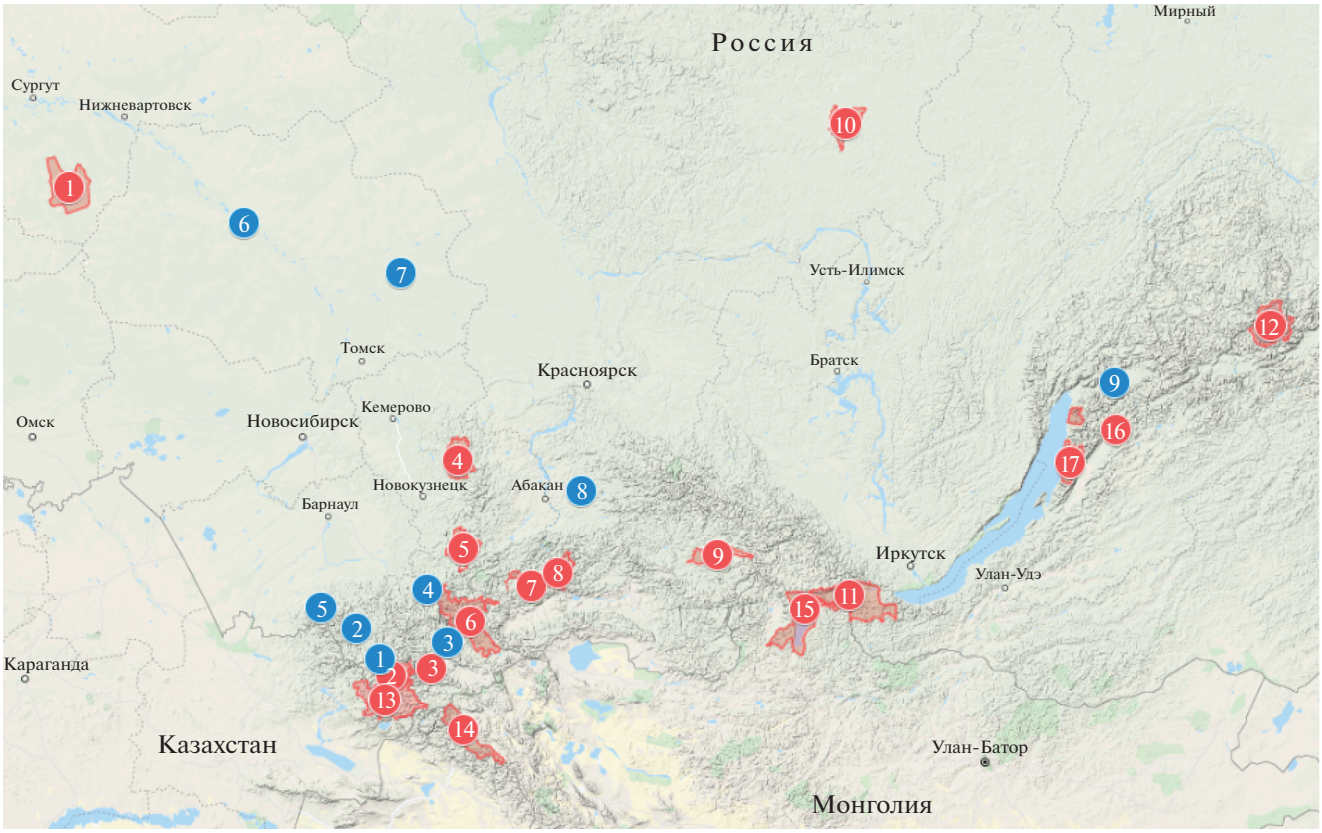

Рис. 1. Карта выборок географических популяций соболя, охваченных промыслом, и заповедных территорий южной части ареала вида. Синий маркер: 1 – Саяны, 2 – Алтай-3, 3 – Алтай-4, 4 – Алтай-1, 5 – Алтай-2, 6 – Алтай-5, 7 – Томск-2, 8 – Томск-1, 9 – Баргузин; красный маркер: 1 – гос. природный заповедник “Юганский”, 2 – Катунский биосферный резерват, 3 – Сайлюгемский национальный парк, 4 – гос. природный заповедник “Кузнецкий Алатау”, 5 – Шорский национальный парк, 6 – Алтайский гос. природный биосферный заповедник, 7 – гос. природный заповедник “Убсунурская котловина”, 8 – Саяно-Шушенский гос. природный заповедник, 9 – гос. природный заповедник Азас, 10 – Тунгусский гос. природный заповедник, 11 – Тункинский национальный парк, 12 – Витимский гос. природный заповедник, 13 – биосферный резерват “Катон-Карагай”, 14 – национальный парк “Алтай-Таван-Богд”, 15 – национальный парк оз. Хувсгул, 16 – Джергинский гос. природный заповедник, 17 – Баргузинский гос. природный биосферный заповедник им. К.А. Забелина.

мероприятия по интродукции соболя [7]. Дифференциация популяций географических регионов подтверждается исследованиями с применением генетических маркеров. Исследования генетической структуры выборок из смежных регионов позволили выявить особенности популяций, миграционные потоки и уровень изоляции отдельных популяций [8, 9].

Южную часть ареала вида населяют несколько географических популяций: соболь северо-запада Алтая, баргузинский соболь и другие [10]. Особенностью региона является наличие как разрешенных к промыслу территорий, так и значительного количества заповедных, всякая деятельность в пределах которых запрещена (рис. 1). Создание надежной референтной базы генетических данных южной части ареала вида позволит определить специфический набор маркеров для выявления популяционной принадлежности пушнины, добываемой промыслом. В дальнейшем это позволит обосновать размер промысла и поддерживать баланс численности уникальных географических популяций.

Исследования генетической идентификации природных популяций выполнены для многих видов хищных млекопитающих, например для русского волка [11], норки [12], хорька [13], а также европейской и американской куниц [14, 15]. Анализ популяционной принадлежности и генетическая индивидуализация особей соболя проведены впервые, но исследования генетической структуры популяций даны ранее [8, 9]. Эти результаты легли в основу создания референтной базы данных вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор биологического материала

Сбор биологического материала южной части ареала вида проведен в период 2014–2018 гг. (табл. 1,

Таблица 1. Районы сбора биологического материала из популяций соболя южной части ареала

Часть ареала	Выборка	Географическое положение	Административный округ	Координаты (ш., д.)
Южная	Саяны	Западные Саяны, Саянская ландшафтная область	Курагинский район, Красноярский край	53.89°, 92.67°
	Алтай-3	Алтайская ландшафтная область	Улаганский район, Республика Алтай	50.63°, 87.96°
	Алтай-4	»	Турочакский район, Республика Алтай	51.79°, 87.26°
	Алтай-1	»	Усть-Коксинский район, Республика Алтай	50.27°, 85.62°
	Алтай-2	»	Поселок Усть-Кан, р. Чарыш в Республике Алтай	50.93°, 84.76°
	Алтай-5	»	Чарышский район, Алтайский край	51.39°, 83.56°
Юго-западная	Томск-2	Чулымская равнина	Первомайский район, Томская область	57.71°, 86.30°
	Томск-1	Васюганская равнина	Каргасокский район, Томская область	58.88°, 80.67°
Юго-восточная	Баргузин	Забайкалье, Становое нагорье	Северо-Байкальский район, Республика Бурятия	56.07°, 111.45°

рис. 1). Выборки Алтай-1, Алтай-2 и Алтай-5 собраны на территориях северо-западной провинции Алтайской горной области. Выборка Алтай-4 представляет популяции северо-восточной части Горного Алтая, выборка Алтай-3 – восточной части Горного Алтая. Саянская ландшафтная область представлена выборкой из популяции центральной части этого региона Саяны. Западная Сибирь представлена двумя выборками: одна выборка Томск-2 – из района среднего течения р. Чичка-Юл (правый приток Чулыма). В период депрессии численности здесь сохранялись жизнеспособные очаги местного “чулымского” соболя [1], в дальнейшем именно они стали основой современной нативной популяции соболя. Другая выборка Томск-1 – из района р. Васюган (левый приток р. Обь), в период восстановления численности вида сюда было завезено значительное количество восточносибирского соболя [7]. Выборка Баргузин формировалась в районе Станового нагорья северовосточнее оз. Байкал.

Образцы депонированы в коллекции Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Выделение ДНК и фрагментарный анализ

В настоящей работе проанализированы девять выборок соболя, генотипирование проведено по 15 микросателлитным локусам (*Ma1*, *Ma3*, *Ma8*, *Ma15*, *Ma18*, *Ma19*, *Mer041*, *Mvi072*, *Mar08*, *Mar21*, *Mar36*, *Mar43*, *Mar53*, *Mar58*, *Mar64*). Описание всех используемых маркеров было дано в [16–18]. Методы выделения ДНК, проведения ПЦР, процедуры фрагментного анализа и идентификации аллелей микросателлитных локусов описаны ранее [8, 19].

Статистический анализ

Обработка данных фрагментного анализа микросателлитных локусов была выполнена с помощью программных пакетов, разработанных в программной среде R [20]. Основные популяционно-генетические показатели (число аллелей на локус, число аллелей на выборку, расчет попарных значений индекса F_{st} для оценки генетической дифференциации между популяциями) были получены с использованием пакета Adegenet [21]. В пакете PopGenReport были рассчитаны показатели аллельного богатства (allelic richness), а также частоты встречаемости аллелей [22]. Для оценки распределения частот аллелей использовали пакет DiveRsity [23]. Также с его помощью рассчитывали показатели ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности для каждой выборки, коэффициент инбридинга и *p*-значение для равновесного теста

Таблица 2. Уровень изменчивости используемых локусов южной части ареала вида

Локус	*A*	H_o	H_e	*PIC*	*HWE*
Ma1	12	0.849	0.874	0.859	NS
Ma3	3	0.431	0.548	0.460	**
Ma8	14	0.784	0.818	0.795	NS
Ma15	8	0.638	0.670	0.629	NS
Ma18	22	0.826	0.902	0.893	NS
Ma19	12	0.697	0.785	0.758	NS
Mer041	9	0.771	0.817	0.791	NS
Mvi072	11	0.702	0.816	0.792	**
Mar08	10	0.679	0.765	0.729	NS
Mar21	5	0.592	0.657	0.605	NS
Mar36	13	0.716	0.827	0.802	NS
Mar43	11	0.748	0.846	0.826	NS
Mar53	12	0.729	0.867	0.851	***
Mar58	14	0.706	0.766	0.747	NS
Mar64	10	0.665	0.785	0.751	***

Примечание. *A* – число выявленных аллелей, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, *PIC* – показатель полиморфного информационного содержания, *HWE* – отклонение от равновесия Харди–Вайнберга (NS – незначимо, ** – значимо при $p < 0.001$, *** – значимо при $p < 0.0001$).

Харди–Вайнберга. Для количественной оценки микросателлитных локусов использовали показатель уровня полиморфизма (polymorphism information content, *PIC*), рассчитанного в программном приложении Cervus 3.0.7 [24], значения которого основаны не только на числе аллелей в локусе, но и на распределении аллелей в популяциях [25].

Кластеризацию популяций строили методом UPGMA с оценкой надежности узлов путем бутстреп-анализа (100000 итераций) на базе генетических расстояний Нея [26] в пакете PopprR [27]. На основе байесовского подхода была оценена вероятность принадлежности каждой из проанализированных особей к той или иной географической выборке. Расчет выполняли по алгоритму “Rannala & Mountain” в программе GeneClass2 [28, 29]. На основе коэффициента Мантеля в программе Arlequin 3.1 [30] оценивали уровень корреляции межпопуляционных генетических дистанций и географических расстояний (тест изоляции расстоянием, Isolation by distance).

Значимость коэффициента линейной регрессии (R^2) определяли с помощью уровня значимости (α) по распределению Фишера.

SCOR-коэффициент, выступающий в качестве показателя надежности прогноза популяционной принадлежности особи, рассчитывали по формуле:

$$\mathrm{SCOR}_{i,l} = \frac{L_{i,l}}{\sum_{j=1}^{k} L_{i,j}},$$

где k – количество выборок, $L_{i,\,l}$ – вероятность того, что i-тая особь принадлежит выборке l.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетическая изменчивость

Всего было генотипировано 218 образцов из девяти выборок южной части ареала соболя (рис. 1, табл. 1). Число аллелей в 15 локусах варьировало от 3 до 22 (среднее $A = 11.067$), наблюдаемая гетерозиготность – от 0.431 до 0.893 (среднее $H_o = 0.703$, среднее $H_e = 0.783$) (табл. 2). Исходя из значений *PIC*, локус *Ma18* был наиболее информативным (0.893), а *Ma3* – наименее информативным (0.460). В среднем по всем локусам показатель полиморфного информационного содержания составил 0.753, что свидетельствует о высокой информативности используемой микросателлитной панели (табл. 2). Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга для всей совокупности исследуемых особей зафиксировано в четырех локусах *Mar53*, *Mar64* ($p < 0.0001$) и *Ma3*, *Mvi072* ($p < 0.001$). Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга может проявляться по разным причинам, но практически по каждому локусу выявлен дефицит гетерозигот (табл. 2), что предполагает наличие субпопуляционной структуры и инбридинга, проявление эффекта Валунда [31].

Анализ изменчивости выборок (табл. 3) показал, что аллельное богатство (*Ar*), рассчитанное для 15 локусов, изменялось от 5.19 (Алтай-2) до 5.77 (Баргузин). В популяциях Алтай-1 и Саяны выявлено максимальное количество общих аллелей (74.95 и 74.65%). В четырех популяциях (Саяны, Алтай-1, Алтай-5, Томск-1) выявлено отклонение от равновесия Харди–Вайнберга.

В выборке из Забайкалья Баргузин обнаружено четыре собственных аллеля (private alleles): *Ma8* – 114, 130, *Mar36* – 206, *Mar64* – 193, что может быть связано с возможным влиянием миграций из рефугиума юго-восточной части ареала [8].

Наличие трех приват-аллелей в выборке Томск-2 (*Ma8* – 106, *Mar53* – 235, *Mar64* – 179) вероятно является результатом частичной изоляции популяции соболя этого региона. Три собственных аллеля выявлены в северо-западной части ареала соболя Алтая (Алтай-1, *Ma1* – 228, *Ma18* – 164, *Ma18* – 174), что связано с высокой степенью изоляции популяций соболя этой части ареала. В выборках Саяны и Алтай-5 также обнаружены три

Таблица 3. Популяционно-генетическая характеристика выборок соболя южной части ареала вида

Популяция	*N*	*A*	%	*Ar*	H_o	H_e	*HWE*
Саяны	23	117	74.65	5.67	0.73	0.76	***
Алтай-3	14	104	64.32	5.63	0.71	0.74	NS
Алтай-4	24	113	70.42	5.68	0.74	0.75	NS
Алтай-1	33	116	74.95	5.58	0.67	0.72	**
Алтай-2	10	92	59.79	5.19	0.7	0.72	NS
Алтай-5	28	119	74.48	5.75	0.7	0.75	***
Томск-2	30	111	71.32	5.32	0.7	0.72	NS
Томск-1	24	118	72.32	5.67	0.69	0.71	**
Баргузин	32	118	72.96	5.77	0.7	0.74	NS

Примечание. *N* – число образцов в выборке, *A* – число аллелей в выборке, % – процент общих аллелей, *Ar* – аллельное богатство, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, *HWE* – отклонение от равновесия Харди–Вайнберга (NS – незначимо, ** – значимо при $p < 0.01$, *** – значимо при $p < 0.0001$).

собственных аллеля (Саяны: *Ma15* – 212, *Mar43* – 151; Алтай-5: *Ma18* – 172), что в данном случае может быть результатом влияния миграционных потоков северных популяций Среднесибирского плоскогорья, не задействованных в настоящем исследовании.

Генетическая дифференциация

Анализ парной дифференциации выборок (табл. 4) показал низкую дифференциацию между выборками внутри географического региона Северо-Западного Алтая: Алтай-2 и Алтай-5 (F_{st} = = 0.015, p = 0.172). Между выборками восточной части региона Алтай-3 и Алтай-4 также значения коэффициента низкие (F_{st} = 0.016, p = 0.047), что может свидетельствовать о существовании в этом регионе только двух популяционных группировок соболя. Низкий коэффициент дифференциации выявлен между группами Саяны и Баргузин (F_{st} = 0.022, p = 0.040), хотя географическое расстояние между ними составляет около 1240 км. Это обусловлено тем, что популяция Саяны находится под влиянием миграционных потоков, в том числе и из восточной части ареала [8]. Сравнительно высоко дифференцированы популяции западной части ареала соболя Томск-1 и Томск-2: коэффициент дифференциации F_{st} = 0.033 (p = = 0.003). Объяснение значительной дифференциации популяций соболя одного географического региона можно найти в истории восстановления популяций Западной Сибири. В данном случае популяция Томск-1 создавалась при значительных интродукциях соболя из восточной части ареала [7], в то время как популяция Томск-2 восстановлена на основе местных популяций.

Несмотря на относительную географическую близость выборок Алтай-1 и Алтай-3 (около 160 км), коэффициент F_{st} = 0.038 (p = 0.001), что связано с изолированностью популяций Северо-Западного Алтая.

Глобальная оценка дифференциации между исследуемыми выборками составила F_{st} = 0.0463. Наибольший вклад в подразделенность вносят локусы *Ma3* (F_{st} = 0.111) и *Mar64* (F_{st} = 0.102), наименьший – *Ma19* (F_{st} = 0.021), что соответствует различию в 5 раз (табл. 5).

Помимо коэффициента фиксации Райта (F_{st}) [32, 33], нами также был произведен расчет глобальных значений подразделенности и с помощью других тестов: G_{st} = 0.178, D = 0.140. В данном случае G_{st} – адаптированный Неем [26] индекс фиксации (F_{st}) для мультиаллельных маркеров, рассчитанный в качестве подтверждающей оценки и показавший сопоставимые с ним результаты. Индекс *D*, рассчитанный по Йосту [34], был применен в качестве уточняющей меры, поскольку по мнению ряда авторов индексы F_{st} и G_{st} могут вводить в заблуждение при расчете для мультиал-

Таблица 4. Парные значения F_{st} и соответствующие *p*-значения между выборками соболя южной части ареала

Выборки	Саяны	Алтай-3	Алтай-4	Алтай-1	Алтай-2	Алтай-5	Томск-2	Томск-1	Баргузин
Саяны		0.001	0.010	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.040
Алтай-3	0.030		0.047	0.001	0.001	0.002	0.001	0.005	0.006
Алтай-4	0.022	0.016		0.002	0.002	0.004	0.001	0.001	0.035
Алтай-1	0.036	0.038	0.030		0.008	0.011	0.001	0.001	0.001
Алтай-2	0.031	0.037	0.026	0.025		0.172	0.001	0.001	0.009
Алтай-5	0.034	0.028	0.027	0.023	0.015		0.001	0.001	0.001
Томск-2	0.027	0.034	0.040	0.044	0.036	0.046		0.003	0.002
Томск-1	0.031	0.027	0.032	0.046	0.043	0.038	0.033		0.005
Баргузин	0.022	0.028	0.022	0.049	0.030	0.040	0.036	0.035	

Примечание. Под диагональю – значения F_{st}, над диагональю – соответствующие им *p*-value (различия значимы при $p < 0.05$).

Таблица 5. Значения *F*-статистик Райта используемых 15 микросателлитных локусов

Локус	F_{is}	F_{st}	F_{it}
Ma1	0.0058	0.0270	0.0326
Ma3	0.1270	0.1106	0.2235
Ma8	0.0126	0.0321	0.0443
Ma15	0.0040	0.0584	0.0547
Ma18	0.0668	0.0219	0.0872
Ma19	0.0945	0.0213	0.1138
Mer041	0.0302	0.0305	0.0597
Mvi072	0.1025	0.0470	0.1447
Mar08	0.0694	0.0519	0.1177
Mar21	0.0676	0.0392	0.1042
Mar36	0.0861	0.0607	0.1416
Mar43	0.0892	0.0339	0.1201
Mar53	0.1384	0.0273	0.1619
Mar58	0.0256	0.0600	0.0840
Mar64	0.0687	0.1015	0.1632
Среднее	0.0648	0.0463	0.1081

лельных случаев [35–37], в частности при наличии более чем двух аллелей коэффициенты Райта (F_{st}) и Нея (G_{st}) не будут достигать единицы даже при отсутствии между популяциями общих аллелей, поскольку в популяциях всегда будет присутствовать некоторая гетерозиготность. В отличие от этого показатель дифференциации *D*, который измеряет долю аллельных вариаций среди популяций, будет равен 1 при полной дифференциации и нулю при ее отсутствии даже при высокой вариации внутри популяций.

Однако в то время как G_{st} ограничивается низкими значениями при высокой гетерозиготности, *D* чувствителен к высокополиморфным маркерам (в частности к таким, скорость мутаций которых выше 10^{-8}) и в случае микросателлитов может быть смещен вверх при наличии большого количества популяций. Одним из дополнительных решений, часто рекомендуемых для оценки структуры популяции с использованием маркеров высокой мутации, является расчет как G_{st}, так и *D*. Маркеры, где G_{st} недооценивает дифференциацию, должны иметь значительно повышенные значения *D*.

В нашем случае противоречия между значениями F_{st}, G_{st} и *D* не наблюдается: попарные значения G_{st} и *D* для всех исследуемых выборок пропорциональны соответствующим значениям F_{st} и *p*-value, приведенным в табл. 4.

Идентификация

Наличие базы данных по частотам микросателлитных локусов для ряда популяций вида дает возможность идентифицировать отдельных особей с неизвестным происхождением. Для этого необходимо знать разрешающую способность имеющейся базы данных, т.е. долю правильно идентифицированных особей. Для решения данной задачи требуется протестировать имеющуюся базу данных: провести симуляционный анализ и определить долю правильно и ошибочно идентифицированных особей среди особей с известным происхождением.

При этом необходимо иметь в виду существование двух типов ошибок идентификации. Первый тип ошибки – это доля особей, ошибочно отнесенных к несоответствующим им популяциям, т.е. доля неправильно идентифицированных особей среди всех особей, отнесенных программой к какой-нибудь популяции. Второй тип ошибки идентификации – это доля особей, ошибочно не включенных в соответствующие им популяции, т.е. неправильно идентифицированных особей среди животных с известным происхождением.

На практике при идентификации особей с неизвестным происхождением обе эти ошибки имеют значение: первый тип ошибки дает представление о количестве “как минимум” особей, а второй – о количестве “как максимум” особей конкретной группы среди всех животных с неизвестным происхождением. Так, при идентификации 70 особей с неизвестным происхождением с использованием протестированной базы данных было выявлено 40 особей, отнесенных программой к западно-алтайской группировке. Разрешающая способность базы данных при использовании первого типа ошибки для западно-алтайской группировки – 87.9%. То есть среди 40 особей как минимум 87.9% (35.2 особи) действительно относятся к западно-алтайской группировке. Разрешающая способность базы данных при использовании второго типа ошибки для западно-алтайской группировки – 81.7%, т.е. 35.2 особи составляют 81.7% от максимального количества особей данной популяции. Отсюда максимально возможное количество (100%) особей западно-алтайской группировки среди 70 анализируемых животных будет равно 43.1 особей ($43.1 = (35.2 \times 100\%)/81.7\%$). Таким образом, среди 70 животных с неизвестным происхождением к западно-алтайской группировке может относиться от 35.2 до 43.1 особей.

Девять выборок соболя были выделены в шесть популяционных групп: Северо-Западный Алтай (Алтай-1, Алтай-2, Алтай-5), Восточный Алтай (Алтай-3, Алтай-4), Саяны, Томск-1, Томск-2, Баргузин. При формировании популяционных групп учитывались как оценки генетической дифференциации выборок, так и результаты кластеризации по расстояниям Нея (рис. 2).

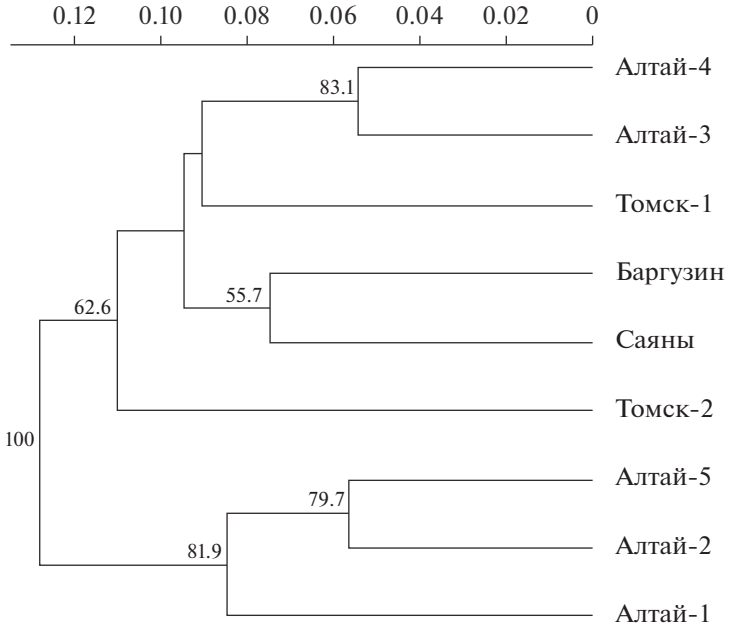

Рис. 2. UPGMA-кластеризация выборок соболя южной части ареала вида. Значения бутстрепа приведены в узлах ветвления.

Несмотря на то что выборка Алтай-1 значимо отличается от всех других выборок, ее генетический профиль близок к выборкам Алтай-2 и Алтай-5. В связи с этим мы обозначили данную группу выборок как Северо-Западный Алтай. Перечисленные шесть групп были взяты за основу для индивидуальной идентификации особей.

В процессе симуляционного анализа особь, которая в данный момент идентифицировалась, исключалась из базы. Анализ проводился для базы данных по 8, 10, 12 и 15 локусам.

Анализ проведен для выяснения оптимального числа микросателлитных локусов при определении популяционной принадлежности особи. Для 10 и 12 локусов использовались все возможные комбинации (т.е. стандартная панель из восьми локусов (*Ma1*, *Ma3*, *Ma8*, *Ma15*, *Ma18*, *Ma19*, *Mer041*, *Mvi072*) [8, 19] плюс возможные комбинации из оставшихся семи локусов (*Mar08*, *Mar21*, *Mar36*, *Mar43*, *Mar53*, *Mar58*, *Mar64*)). Таким образом, для 10 локусов использовались средняя оценка точности и ошибки идентификации из 21 варианта возможных панелей микросателлитных локусов, а для 12 локусов использовались средняя оценка точности и ошибки идентификации по 35 возможным вариантам панели микросателлитных локусов.

Была проведена оценка точности идентификации особей отдельно для каждой из шести выделенных групп соболя: Северо-Западный Алтай (Алтай-1, Алтай-2, Алтай-5), Восточный Алтай (Алтай-3, Алтай-4), Западные Саяны (Саяны), две региональные группировки Западной Сибири (Томск-2 нативный, Томск-1 интродуцированный) и баргузинский соболь (Баргузин). Анализ показал, что для некоторых группировок точность идентификации незначительно увеличивается при увеличении числа локусов: например, Северо-Западный Алтай и Томск-2. Для Томска-2 (нативный) точность идентификации как по первому (I) типу ошибки, так и по второму (II) типу не изменилась при увеличении числа локусов (рис. 3, 4; табл. 6).

Для других группировок точность идентификации значительно возросла: так, по I типу ошибки для популяции Саяны, баргузинского соболя (Баргузин) и Томск-2 (интродуцированный) на 21, 18.7 и 16.4% соответственно (рис. 3), по II типу ошибки для Томск-2 и Саяны на 29.2 и 17.4% соответственно (рис. 4).

Помимо точности идентификации (количество правильно идентифицированных особей) для характеристики базы данных также важен такой показатель, как надежность идентификации особи. В качестве такого показателя может выступать SCOR-коэффициент. Он отражает надежность прогноза популяционной принадлежности особи и оценивает долю вероятности принадлежности особи к данной популяции, в общей сумме всех возможных вероятностей.

В работе было рассчитано среднее значение индивидуальных SCOR-коэффициентов по всем выборкам для панели микросателлитных локусов из 8, 10, 12 и 15 локусов (средний SCOR – 77.44 ± 1.34,

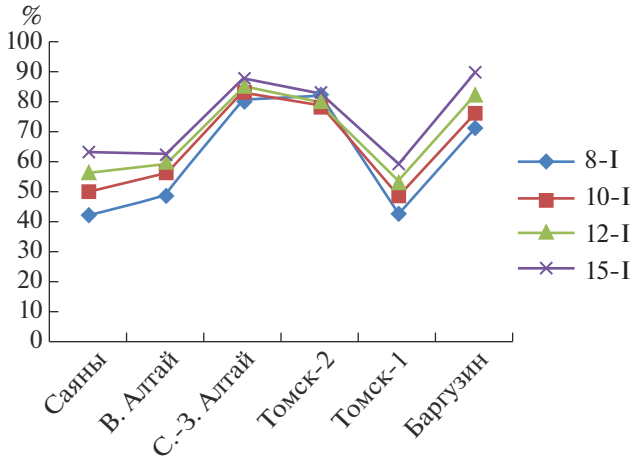

Рис. 3. Оценки точности идентификации особей по базе данных частот 8, 10, 12 и 15 микросателлитных локусов соболя для каждой группировки с учетом I типа ошибки (%).

81.42 ± 0.96, 84.86 ± 0.90, 88.74 ± 1.13 соответственно). Была проведена оценка парной линейной зависимости средней величины SCOR и числа локусов. Коэффициент детерминации $R^2 = 0.9993$ (оценка значима, $\alpha = 0.0004$), т.е. можно утверждать, что при увеличении числа локусов до 15 надежность прогноза значимо возрастает в среднем для каждой особи (средний SCOR изменяется с 77.44 ± 1.34 (для восьми локусов) до 88.74 ± 1.13 (для 15 локусов)).

Далее мы провели анализ среднего SCOR-коэффициента отдельно для особей, которые были "верно идентифицированы" (т.е. им присвоена та же выборка, из которой особь была взята), и для "неверно идентифицированных" особей (т.е. им присвоена не та выборка, из которой особь была взята) в целом по всем группам. Такой анализ был проведен для восьми и для 15 локусов (табл. 7). Было отмечено, что средний SCOR-коэффициент для "верно идентифицированных" особей достоверно выше, чем для "неверно идентифицированных" особей как для восьми ($\alpha = 5.93 \times 10^{-9}$), так и для 15 локусов ($\alpha = 2.64 \times 10^{-6}$).

В тоже время для 15 локусов средний SCOR-коэффициент достоверно выше по обоим категориям особей, чем для панели из восьми локусов (для "неверно идентифицированных" особей $\alpha = 0.0004$; для "верно идентифицированных" особей $\alpha = 4.82 \times 10^{-6}$).

ОБСУЖДЕНИЕ

К середине XX в. численность соболя в России была восстановлена, на всей территории обитания вида был организован лицензионный промысел. Анализ результатов многолетнего промысла показал, что численность вида в целом стабильна. Международный союз охраны природы (МСОП) присвоил соболю статус "Не вызывающий беспокойства" (Least concern). Но вид на территории страны представлен рядом географических популяций и подвидов, ценность пушнины которых различается между собой в несколько раз. Это приводит к разной интенсивности промысла в регионах. Кроме этого, на исследуемой нами части ареала разрешенные к промыслу территории чередуются с заповедными, всякая деятельность в которых запрещена. Так, промысловый район Северо-Западного Алтая граничит с заповедной территорией Катунского биосферного резервата (Россия) и Биосферного резервата "Катон-Карагай" (Казахстан). Выборки из Восточного Алтая граничат с Алтайским государственным природным биосферным заповедником. Рядом с забайкальским промысловым районом (восточнее оз. Байкал) располагаются три заповедные территории (Джергинский государственный природный заповедник; Витимский государственный природный заповедник; Баргузинский государственный природный биосферный заповедник им. К.А. Забелина) (рис. 1).

Несмотря на миграционную активность соболя, между популяциями существует генетическая

Таблица 6. Коэффициенты детерминации (R^2) и уровни значимости (α) парной линейной регрессии (зависимость точности идентификации от числа локусов) для каждой выборки для I и II типов ошибок

Популяции	I тип ошибки		II тип ошибки	
	R^2	α	R^2	α
Саяны	0.9959	0.0021	0.9607	0.0198
Восточный Алтай (Алтай-3, -4)	0.9979	0.0011	0.8383*	0.0844
Северо-Западный Алтай (Алтай-1, -2, -5)	0.9957	0.0022	0.9480	0.0263
Томск-2	0.0385*	0.8038	0.8043*	0.1032
Томск-1	0.9877	0.0062	0.9677	0.0163
Баргузинский соболь (Баргузин)	0.9531	0.0237	0.9946	0.0027

* – незначимые коэффициенты детерминации ($\alpha > 0.05$), т.е. статистически поддержанной зависимости нет.

Таблица 7. Средний SCOR-коэффициент для объединенной популяции южной части ареала соболя

Число локусов	“Неверно идентифицированные” особи	“Верно идентифицированные” особи
8	67.18 ± 2.16	82.94 ± 1.51
15	79.46 ± 2.63	91.65 ± 1.15

дифференциация, обусловленная в том числе изоляцией расстоянием – основным фактором формирования межпопуляционных различий на большей части ареала. Тест Мантеля показывает значимую корреляцию между межпопуляционными генетическими дистанциями и географическим расстоянием, разделяющим места обитания соболя ($cor = 0.528$, $p = 4.18 \times 10^{-7}$). Анализ генетической структуры популяций южной части ареала показал значительный уровень дифференциации между популяциями (табл. 4). Максимальные значения F_{st} (0.044–0.049) выявлены между изолированной популяцией Северо-Западного Алтая (выборки Алтай-1, Алтай-2, Алтай-5) как с популяциями Западной Сибири (Томск-1, Томск-2), так и восточной части исследуемого ареала (популяцией Забайкалья Баргузин). Результаты дифференциации подтверждаются кластерным анализом по методу невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA), показано разделение выборок на несколько кластеров (рис. 2). Основываясь на этих данных и предыдущих работах [9], были выделены шесть групп соболя, оптимально отражающих популяционно-генетическую структуру вида на изученной части ареала (табл. 1).

Оценка идентификационной способности базы данных с разным числом локусов показала, что точность идентификации для одних групп может не измениться, для других сильно возрасти. Так, для Томска-2 точность идентификации не изменилась при увеличении числа локусов. Аналогичные данные получены при идентификации изолированной группировки Северо-Западного Алтая (объединенные выборки Алтай-1, Алтай-2, Алтай-5). Это может свидетельствовать о том, что полученные оценки точности являются максимально возможными и дальнейшее увеличение числа локусов не даст ожидаемых результатов. Эти две группы находятся в значительной степени изоляции и миграционные потоки здесь ограничены.

Для других группировок точность идентификации значительно возросла при увеличении числа локусов до 15. Например, по I типу ошибки для популяций Саяны, баргузинского соболя и Томск-1 на 21, 18.7 и 16.4% соответственно (рис. 3), по II типу ошибки для Томск-1 и Саяны на 29.2 и 17.4% соответственно (рис. 4).

Таким образом, при увеличении числа локусов с восьми до 15 значимо возрастает точность индивидуальной идентификации соболя (количество правильно идентифицированных особей).

Анализ среднего значения SCOR-коэффициентов показал, что при увеличении числа локусов с восьми до 15 значимо возрастает надежность индивидуальной идентификации в среднем для каждой отдельной особи (средний SCOR изменяется с 77.44 ± 1.34 – для восьми локусов до 88.74 ± 1.13 – для 15 локусов) (табл. 7).

Средний SCOR-коэффициент “верно идентифицированных” особей по 15 локусам составил 91.65%, что является достаточно хорошей характеристикой базы данных. Более низкий средний SCOR-коэффициент у “неверно идентифицированных” особей может свидетельствовать о том, что данные особи сложно идентифицируются и их генетический профиль трудно однозначно отнести к какой-либо популяции в силу того, что (1) их популяция отсутствует в базе данных, (2) степень дифференциации разных популяций невелика, (3) такие особи могут быть гибридами. В настоящий момент все эти три причины могут иметь место в базе данных соболя. Следует также отметить, что среди “неверно идентифицированных” особей присутствовали особи с высоким значением SCOR-коэффициента, такие особи могут являться реальными мигрантами.

В работе было показано, что при использовании базы данных частот аллелей микросателлитных ло-

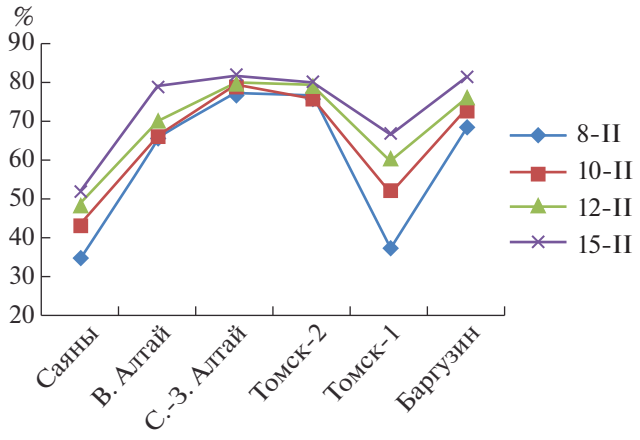

Рис. 4. Оценки точности идентификации особей по базе данных частот 8, 10, 12 и 15 микросателлитных локусов соболя для каждой группировки с учетом II типа ошибки (%).

кусов для индивидуальной идентификации особей соболя наиболее высокими показателями идентификации обладает база данных из 15 локусов. По результатам анализа был разработан алгоритм идентификации группы особей неизвестного происхождения. Была оценена идентификационная (или разрешающая) способность базы данных для каждой из шести группировок. При использовании панели из 15 микросателлитных локусов достоверно снижается количество неправильно идентифицированных особей и достоверно возрастает надежность идентификации в среднем для каждой отдельной особи по сравнению с панелью из восьми локусов. Точность идентификации изменяется от 65 до 76% в целом для всей базы, а ошибка идентификации уменьшается в 1.5 раза. Также при использовании базы данных из 15 локусов возрастает надежность идентификации в среднем для каждой отдельной особи (SCOR = 88.74).

Одной из задач настоящего исследования являлось определение генетического профиля популяций соболя, обитающих на юге Сибири, что позволило создать референтную базу данных для индивидуальной идентификации особей, обитающих на промысловых и заповедных территориях. В перспективе это позволит сохранить биологическое разнообразие вида и составляющих его географических популяций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Тимофеев В.В., Надеев В.Н.* Соболь. М.: Заготиздат, 1955. 403 с.
2. *Монахов Г.И., Бакеев Н.Н.* Соболь. 2-е изд. М.: Лесная пром-сть, 1981. 240 с.
3. *Бажанов В.С.* Новый подвид соболя с Алтая // Труды Казахского фил. АН СССР за 1942 год. Алма-Ата: Изд-во АН КазССР, 1943. С. 53–54.
4. *Кузнецов Б.А. Martes zibellina* L., 1758 – Соболь // Млекопитающие Казахстана. М.: МОИП, 1948. С. 77.
5. *Лобачев Ю.С., Афанасьев Ю.Г.* Соболь *Martes zibellina* Linnaeus, 1758 // Млекопитающие Казахстана. Алма-Ата: Изд-во АН КазССР, 1982. Т. 3. Ч. 2. С. 101–119.
6. *Монахов В.Г.* Размерная структура соболя в Прибайкалье: подекадный анализ за последние 60 лет // Изв. РАН. Серия биол. 2013. № 1. С. 40–47.
7. *Павлов М.П., Корсакова И.Б., Тимофеев В.В.* Акклиматизация охотничье-промысловых зверей и птиц в СССР. Киров: Волго-Вят. кн. изд-во, 1973. 536 с.
8. *Каштанов С.Н., Свищёва Г.Р., Пищулина С.Л. и др.* Географическая структура генофонда соболя (*Martes zibellina* L.): данные анализа микросателлитных локусов // Генетика. 2015. Т. 51. № 1. С. 78–88.
9. *Каштанов С.Н., Столповский Ю.А., Мещерский И.Г. и др.* Таксономический статус и генетическая идентификация соболя Алтая (*Martes zibellina averini* Bazhanov, 1943) // Генетика. 2018. Т. 54. № 11. С. 1327–1337.
10. *Черникин Е.М.* Экология соболя (*Martes zibellina* Lunneus, 1758) в Баргузинском заповеднике. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского гос. ун-та, 2006. 265 с.
11. *Aspi J., Roininen E., Kiiskila J. et al.* Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland // Conserv. Genet. 2009. V. 10. P. 815–826.
12. *Michaux J.R., Hardy O.J., Justy F. et al.* Conservation genetics and population history of the threatened European mink *Mustela lutreola*, with an emphasis on the west European population // Mol. Ecol. 2005. V. 14. P. 2373–2388.
13. *Pertoldi C., Breyne P., Cabria M.T. et al.* Genetic structure of the European polecat (*Mustela putorius*) and its implication for conservation strategies // J. Zool. 2006. V. 270. P. 102–105.
14. *Colli L., Cannas R., Deiana A.M. et al.* Microsatellite variability of sardinian pine martens, martesmartes // Zoolog. Sci. 2011. V. 28. P. 580–586.
15. *O'Shea K.* Genetic study of recent samples of American marten (*Martes americana*) from Vermont // UVM Honors College Senior Theses. 2014. V. 6. 29 p.
16. *Davis C.S., Strobeck C.* Isolation, variability, and cross-species amplification of polymorphic microsatellite loci in the family mustelidae // Mol. Ecol. 1998. V. 7. Is. 12. P. 1776–1778.
17. *Fleming M.A., Ostrander E.A., Cook J.A.* Microsatellite markers for American mink (*Mustela vison*) and ermine (*Mustela erminea*) // Mol. Ecol. 1999. V. 8. № 8. P. 1352–1355.
18. *Natali C., Banchi E., Ciofi C. et al.* Characterization of 13 polymorphic microsatellite loci in the European pine marten *Martes martes* // Conserv. Genet. Resources. 2010. V. 2. P. 397–399.
19. *Каштанов С.Н., Афанасьев К.И., Потапов С.Г., Лазебный О.Е.* Микросателлитный анализ двух промышленных популяций соболя (*Martes zibellina* L., 1943) // Генетика. 2011. Т. 47. № 12. С. 1622–1628.
20. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.
21. *Jombart T.* Adegenet: An R package for the multivariate analysis of genetic markers // Bioinformatics. 2008. V. 24(11). P. 1403–1405.
22. *Adamack A.T., Gruber B.* PopGenReport: Simplifying basic population genetic analyses in R // Methods Ecol. Evol. 2014. V. 5. Is. 4. P. 384–387.
23. *Keenan K., McGinnity Ph., Cross T.F. et al.* DiveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors // Methods Ecol. Evol. 2013. V. 4. Is. 8. P. 782–788.
24. *Botstein D., White R.L., Skolnick M.H., Davis R.W.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. P. 314–331.
25. *Gruber B., Adamack A.T.* Landgenreport: A new R function to simplify landscape genetic analysis using resistance surface layers // Mol. Ecol. Resour. 2015. V. 15(5). P. 1172–1178.

26. *Nei M.* Genetic distance between populations // Am. Nat. 1972. V. 106. P. 283–292.
27. *Kamvar Z.N., Tabima J.F., Grünwald N.J.* Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction // Peer J. 2014. V. 2. P. e281. https://doi.org/10.7717/peerj.281
28. *Rannala B., Mountain J.L.* Detecting immigration by using multilocus genotypes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94(17). P. 9197–9201.
29. *Piry S., Alapetite A., Cornuet J.-M. et al.* GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection // J. Hered. 2004. V. 95. Is. 6. P. 536–539.
30. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinform. 2005. № 1. P. 47–50.
31. *Wahlund S.* Zusammensetzung von populationen und korrelationserscheinungen vom standpunkt der verbungslehre aus betrachtet // Hereditas. 1928. V. 11. Is. 1. P. 65–106.
32. *Wright S.* The genetical structure of populations // Ann. Eugen. 1951. V. 15. P. 323–354.
33. *Wright S.* The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating // Evolution. 1965. V. 19. P. 395–420.
34. *Jost L.* GST and its relatives do not measure differentiation // Mol. Ecol. 2008. V. 17. P. 4015–4026.
35. *Hedrick P.W.* A standardized genetic differentiation measure // Evolution. 2005. V. 59. P. 1633–1638.
36. *Jost L.* Reply: D vs G'ST: response to Heller and Siegismund (2009) and Ryman and Leimar (2009) // Mol. Ecol. 2009. V. 18. P. 2088–2091.
37. *Kronholm I., Loudet O., de Meaux J.* Influence of mutation rate on estimators of genetic differentiation–lessons from *Arabidopsis thaliana* // BMC Genetics. 2010. V. 11. P. 33. https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-33

Identification of the Sable (*Martes zibellina* L.) Populations in the Southern Part of the Species' Range

S. N. Kashtanov[a, *], M. V. Shitova[a], M. M. Somova[d], P. A. Filimonov[a], O. Yu. Tyutenkov[e], A. A. Khodireva[a], G. R. Svishcheva[a, c], I. G. Meshchersky[b], Yu. A. Stolpovsky[a], and V. V. Rozhnov[b]

[a] *Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
[b] *Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*
[c] *Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*
[d] *Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moscow oblast, Podolsk, Dubrovitsy, 142132 Russia*
[e] *National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*
**e-mail: snkashtanov@mail.ru*

A panel consisting of 15 microsatellite loci was employed to study the modern structure of the sable gene pool. In the southern part of its range, the high level of differentiation among the species' populations was revealed. Several population clusters of the sable samples were found in a vast territory from Western Siberia to Transbaikalia. This part of the species range is distinguished by the sable's high abundance as well as by the fact that controlled hunting areas alternate with numerous reserves. Possibilities of identification of individuals by population and regional affiliations were determined. The study assessed the reliability of the prediction of population belonging (SCOR-coefficient) of individuals in the pooled sample, which showed that with an increase in the number of loci from 8 to 15, the accuracy of identification (the number of correctly identified individuals) and the reliability of identification on average for each individual increase significantly. The results allow one to expand the reference database of genetic data, contribute to the preservation of the intraspecific diversity of the sable and solve a number of problems associated with hunting in the territories bordering with nature conservation areas.

Keywords: geographic populations of sable, introduction, hunting, microsatellite analysis, phylogenetic analysis, genetic structure, DNA identification.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1185–1193

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

УДК 575.16:599.9

ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ С РАЗВИТИЕМ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ У НАСЕЛЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОГО ЧЕРНОЗЕМЬЯ РОССИИ

© 2021 г. О. Н. Миняйло[1], И. В. Пономаренко[1], М. И. Чурносов[1, *]

[1]*Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия*

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

Поступила в редакцию 17.12.2020 г.
После доработки 23.01.2021 г.
Принята к публикации 11.02.2021 г.

Изучены гендерные особенности ассоциаций функционально значимых полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ с развитием язвенной болезни (ЯБ) у населения европейской части России. В исследование включены 305 мужчин (больные ЯБ – 188, контрольная группа – 117) и 441 женщина (больные ЯБ – 211, контрольная группа – 230). Проведено генотипирование десяти функционально значимых полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ: rs1799750 *MMP1,* rs243865 *MMP2,* rs679620 *MMP3,* rs1940475 *MMP8,* rs3918242, rs3918249, rs17576, rs3787268, rs2250889, rs17577 гена *MMP9.* Ассоциации полиморфных локусов генов *MMP* с ЯБ изучались методом логистической регрессии (оценивались доминантная, рецессивная и аддитивная генетические модели взаимодействия аллелей). Установлено, что факторами риска возникновения ЯБ у мужчин были аллели *C* rs3918249 (ОШ = 1.61, $p_{perm} = 0.048$) и *G* rs17576 (ОШ = 1.48–2.08, $p_{perm} \leq 0.042$) гена *MMP9.* У женщин протективное значение для развития заболевания имел аллель *2G* rs1799750 гена *MMP1* (ОШ = 0.74, $p_{perm} = 0.047$). Полиморфные локусы, ассоциированные с ЯБ у мужчин и женщин, проявляют выраженные эпигенетические эффекты (влияют на афинность мотивов ДНК к различным транскрипционным факторам, расположены в регионе промоторов и энхансеров в желудке и двенадцатиперстной кишке, связаны с экспрессией генов в различных отделах пищеварительной системы). Выявлены гендерные особенности ассоциаций полиморфизма генов *MMP* с развитием ЯБ: rs3918249 и rs17576 гена *MMP9* определяют подверженность к развитию ЯБ у мужчин, а rs1799750 гена *MMP1* – у женщин.

Ключевые слова: язвенная болезнь, матриксные металлопротеиназы, полиморфизм, ассоциации, пол.

DOI: 10.31857/S0016675821100088

Язвенная болезнь (**ЯБ**) желудка и двенадцатиперстной кишки продолжает оставаться одним из наиболее часто встречающихся заболеваний пищеварительной системы в различных странах мира [1]. В Соединенных Штатах Америки ежегодно регистрируется до 500 тыс. новых случаев заболеваемости ЯБ [2]. Согласно официальным статистическим материалам Росстата за 2018 г. язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки была зарегистрирована у 834.8 на 100000 жителей России. При этом в последние годы в РФ наблюдается тенденция некоторого снижения заболеваемости язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки с 95.6 случаев с впервые установленным диагнозом на 100000 населения в 2010 г. до 71.9 на 100000 населения в 2018 г. [3]. Имеются гендерные особенности встречаемости ЯБ: считается, что среди пациентов с дуоденальными язвами преобладают мужчины, а среди больных с язвами желудка соотношение женщин и мужчин оказывается примерно одинаковым [4].

В соответствии с современными представлениями об этиопатогенезе ЯБ при развитии заболевания происходит нарушение в равновесии между факторами агрессии (кислотно-пептическое содержимое желудка) и защитными механизмами слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки [4]. В настоящее время ключевое значение в развитии ЯБ отводится бактериям *H. pylori* [5]. Эти микроорганизмы продуцируют различные ферменты – уреазы, протеазы, фосфолипазы, повреждающие защитный барьер слизистой оболочки. Также *H. pylori* вырабатывает цитотоксины, индуцирующие высвобождение в слизистой оболочке желудка различных цитокинов (факторов некроза опухолей, интерлейкинов

и др.), вызывающих развитие в ней воспалительного процесса [4, 5]. Согласно литературным данным с *H. pylori* ассоциировано около 80% язвенных поражений двенадцатиперстной кишки и 60% язв желудка [6].

Следует отметить, что возникновение воспалительного процесса в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки обусловливает вовлечение в патогенез ЯБ матриксных металлопротеиназ (ММР), которые играют ключевую роль в деградации и ремоделировании внеклеточного матрикса во время процессов воспаления и ранозаживления, и в том числе при *H. pylori* инфекции [7, 8]. В ряде работ показаны более высокие уровни матриксных металлопротеиназ (ММР3, ММР9 и др.) в месте локализации язвенного дефекта и их корреляция с уровнями IL1β, IL6 и IL8, а также снижение содержания ММР при эффективном лечении ЯБ [9–13]. Важно подчеркнуть, что одну из ключевых ролей в индукции синтеза ММР играет *H. pylori* инфекция [11, 12]. Продемонстрирована значимая связь полиморфизма генов *MMP* с восприимчивостью к язвенной болезни [13, 14]. При этом следует отметить, что в Российской Федерации выполнена лишь одна работа по изучению ассоциаций полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с развитием ЯБ у жителей Республики Башкортостан [14], что является недостаточным и диктует необходимость проведения дальнейших молекулярно-генетических исследований ЯБ в различных этно-территориальных популяциях РФ и в том числе направленных на выявление гендерных особенностей вовлеченности полиморфизма генов *MMP* в развитие ЯБ.

Цель настоящей работы – анализ гендерных особенностей ассоциаций полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ с формированием язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у населения Центрального Черноземья России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выборка для данного исследования включала 746 человек. Среди них мужчины составляли 305 человек (больные ЯБ – 188, контрольная группа – 117), а женщины – 441 человек (больные ЯБ – 211, контрольная группа – 230). Среди женщин, больных ЯБ, 149 индивидуумов имели язвенную болезнь желудка (70.61%) и 62 пациента – язвенную болезнь двенадцатиперстной кишки (29.39%). Среди мужчин, больных ЯБ, данные показатели составили 68 (36.17%) и 120 (63.83%) человек соответственно. Выборка для исследования формировалась из индивидуумов русской национальности, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье РФ [15, 16], не состоящих в родстве между собой. Пациенты включались в исследование только после установления диагноза, подтвержденного с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования [1]. Диагностика язвенной болезни проводилась на базе отделения гастроэнтерологии Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. Всем пациентам было выполнено эндоскопическое исследование желудка и двенадцатиперстной кишки (гастродуоденоскопия) с последующей биопсией. Для определения *H. pylori* проводилось морфологическое исследование биоптатов слизистой оболочки. *H. pylori* была выявлена у 202 больных ЯБ (50.62% от всех больных), в том числе у 100 мужчин с ЯБ (53.19% от всех мужчин, больных ЯБ) и у 102 женщин с ЯБ (48.34% от всех женщин, больных ЯБ). В контрольную группу включались индивидуумы соответствующего группе больных пола, без клинических и эндоскопических признаков язвенной болезни, сопоставимые с больными по возрасту. Средний возраст изучаемой группы мужчин, больных ЯБ, и контрольной группы составил 48.24 ± 13.63 и 48.64 ± 13.52 лет соответственно ($p > 0.05$), среди женщин средний возраст был равен 49.04 ± 12.53 лет (больные ЯБ) и 49.23 ± ± 12.75 лет (контрольная группа) ($p > 0.05$). Исследование проводилось под контролем этического комитета медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета с информированного согласия всех обследуемых индивидуумов.

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК, выделенные из периферической венозной крови фенольно-хлороформным методом. Для исследования были отобраны десять полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ: rs1799750 *MMP1*, rs243865 *MMP2*, rs679620 *MMP3*, rs1940475 *MMP8*, rs3918242, rs3918249, rs17576, rs3787268, rs2250889, rs17577 гена *MMP9*. Включенные в исследование локусы являются регуляторными полиморфными вариантами (rSNP) [17, 18], согласно базе данных HaploReg (v4.1.) (http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php) они имеют значимый регуляторный потенциал. Амплификацию полиморфных локусов проводили с помощью полимеразной цепной реакции на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) методом TaqMan зондов (использовались наборы, синтезированные ООО “Тест-Ген” (Ульяновск)).

Ассоциации полиморфных локусов генов *MMP* с ЯБ изучались методом логистической регрессии (оценивались доминантная, рецессивная и аддитивная генетические модели взаимодействия аллелей) с использованием программы PLINK v 2.050 (http://pngu.mgh.harvard.edu/Èpurcell/plink). Характер ассоциаций оценивался на основе показателя отношения шансов (ОШ) и его 95%-ного доверительного интервала (95% ОШ). Коррекцию на множественные сравнения проводили с использованием адаптивного пермутацион-

ного теста (p_{perm}). Статистически значимым считали уровень $p_{perm} < 0.05$.

Для полиморфных локусов генов *MMP*, показавших значимые ассоциации с ЯБ, рассмотрены их эпигенетические эффекты (использовались базы данных HaploReg (http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php) и GTEx-portal (http://www.gtexportal.org/) по ранее представленной методике [19–22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по распределению частот генотипов и аллелей в исследуемых группах мужчин и женщин с ЯБ и контроля, а также в рассматриваемой выборке в целом представлены в табл. 1. По всем изученным десяти локусам генов *MMP* наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому распределению согласно закону Харди–Вайнберга ($p_{bonf} > 0.05$).

Выявлены особенности ассоциации полиморфных локусов генов *MMP* с развитием ЯБ у мужчин и женщин (табл. 2). Так, у мужчин с формированием заболевания были ассоциированы два полиморфных локуса гена *MMP9* – rs3918249, rs17576, тогда как у женщин с развитием заболевания связан полиморфный локус rs1799750 гена *MMP1*. При этом факторами риска возникновения ЯБ у мужчин были аллели *C* rs3918249 (согласно доминантной модели ОШ = 1.61, 95% ОШ 1.01–2.59, $p = 0.047$, $p_{perm} = 0.048$) и *G* rs17576 (согласно аддитивной модели ОШ = 1.48, 95% ОШ 1.06–2.07, $p = 0.023$, $p_{perm} = 0.024$ и рецессивной модели ОШ = 2.08, 95% ОШ 1.03–4.19, $p = 0.040$, $p_{perm} = 0.042$). У женщин аллель *2G* rs1799750 гена *MMP1* в соответствии с аддитивной моделью имеет протективное значение при развитии заболевания (ОШ = 0.74, 95% ОШ 0.57–0.96, $p = 0.021$, $p_{perm} = 0.047$). Таким образом, согласно полученным нами данным полиморфизм rs3918249 и rs17576 гена *MMP9* определяет подверженность к развитию ЯБ у мужчин, а rs1799750 гена *MMP1* – у женщин.

Проведенный анализ эпигенетической роли полиморфных локусов, вовлеченных в формирование ЯБ у мужчин и женщин, показал следующее. Во-первых, локусы rs3918249 и rs17576 гена *MMP9* влияют на афинность мотивов ДНК к четырем и одному факторам транскрипции соответственно (Hmx, Hoxb8, Arid3a, Pax-5 и Pax-4 соответственно). Причем аллельные варианты этих локусов, ассоциированные с повышенным риском развития ЯБ у мужчин (аллели *C* rs3918249 и *G* rs17576), определяют более высокое сродство к транскрипционным факторам Hmx (ΔLOD scores для аллелей *C* и *T* rs3918249 равен 1.9), Hoxb8 (ΔLOD = 2.9) и низкую афинность мотивов ДНК к Arid3a (ΔLOD = –0.7), Pax-5 (ΔLOD = –3.9) и Pax-4 (ΔLOD scores для аллелей *G* и *A* rs3918249 равен –2.1).

Во-вторых, полиморфный локус rs3918249 находится в регионе белков-гистонов, которые маркируют регуляторные области (промоторы, энхансеры) гена *MMP9* в слизистой оболочке желудка (H3K4me1_Enh) и двенадцтиперстной кишки (H3K4me3_Pro), гладкой мускулатуре желудка (H3K4me3_Pro) и двенадцатиперстной кишки (H3K4me1_Enh и H3K4me3_Pro) взрослого организма. Выраженный регуляторный потенциал имеет и rs17576, локализованный в области промоторных и энхансерных участков гена *MMP9* в различных отделах пищеварительной системы как плода (желудок – H3K4me1_Enh), так и взрослого организма: слизистая оболочка желудка (H3K4me1_Enh) и двенадцатиперстной кишки (H3K4me1_Enh и H3K4me3_Pro), гладкая мускулатура желудка (H3K4me1_Enh и H3K4me3_Pro) и двенадцатиперстной кишки (H3K4me1_Enh и H3K4me3_Pro).

В-третьих, однонуклеотидный полиморфизм rs3918249 гена *MMP9* ассоциирован с экспрессией ряда генов (*PLTP*, *NEURL2*, *RP3-337O18.9*) в различных отделах пищеварительной системы: желудке (*PLTP*, $\beta = -0.25$, $p = 1.7 \times 10^{-5}$, $p_{FDR} \leq 0.05$), пищеводе (*PLTP*, $\beta = -0.13$, $p = 6.2 \times 10^{-5}$, $p_{FDR} \leq 0.05$), толстом кишечнике (*PLTP*, $\beta = -0.25$, $p = 1.7 \times 10^{-5}$, $p_{FDR} \leq 0.05$; *NEURL2*, $\beta = -0.22$, $p = 4.9 \times 10^{-5}$, $p_{FDR} \leq 0.05$; *RP3-337O18.9*, $\beta = -0.28$, $p = 3.5 \times 10^{-6}$, $p_{FDR} \leq 0.05$). Важное eQTL значение для разных отделов пищеварительной системы имеет и полиморфизм rs17576 гена *MMP9* – он связан с экспрессией трех генов *PLTP*, *NEURL2*, *RP3-337O18.9* в пищеводе (*PLTP*, $\beta = -0.15$, $p = 2.7 \times 10^{-6}$, $p_{FDR} \leq 0.05$; *NEURL2*, $\beta = -0.25$, $p = 1.8 \times 10^{-5}$, $p_{FDR} \leq 0.05$; *RP3-337O18.9*, $\beta = -0.23$, $p = 7.4 \times 10^{-5}$, $p_{FDR} \leq 0.05$) и толстом кишечнике (*PLTP*, $\beta = -0.18$, $p = 5.6 \times 10^{-7}$, $p_{FDR} \leq 0.05$; *NEURL2*, $\beta = -0.23$, $p = 1.3 \times 10^{-5}$, $p_{FDR} \leq 0.05$; *RP3-337O18.9*, $\beta = -0.28$, $p = 1.9 \times 10^{-10}$, $p_{FDR} \leq 0.05$). При этом обращает на себя внимание факт того, что аллельные варианты этих локусов, ассоциированные с повышенным риском развития ЯБ у мужчин (аллели *C* rs3918249 и *G* rs17576), связаны с более низкой экспрессией ($\beta < 0$) всех трех вышерассмотренных генов (*PLTP*, *NEURL2*, *RP3-337O18.9*) в разных отделах пищеварительного тракта.

В-четвертых, выраженные эпигенетические эффекты характерны и для полиморфного локуса rs1799750 гена *MMP1*, определяющего подверженность к развитию ЯБ у женщин: он влияет на сродство мотивов ДНК к 21 фактору транскрипции (AP-1, CHX10, DMRT2, Hoxb4, PLZF и др.), расположен в области модифицированных гистоновых белков, которые маркируют энхансеры

Таблица 1. Частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *MMP* в исследуемых группах мужчин и женщин с язвенной болезнью и в контроле

Локус	Генотип, минорный аллель, соответствие HWE	Женщины (n = 441)		Мужчины (n = 305)		Итого (n = 746) % (n)
		контроль (n = 230) % (n)	больные (n = 211) % (n)	контроль (n = 117) % (n)	больные (n = 188) % (n)	
rs1940475 *MMP8*	*CC*	26.52 (61)	32.23 (68)	30.17 (35)	25.00 (46)	28.34 (210)
	CT	45.65 (105)	41.71 (88)	45.69 (53)	49.46 (91)	45.48 (337)
	TT	27.83 (64)	26.06 (55)	24.14 (28)	25.54 (47)	26.18 (194)
	T	50.65	46.92	46.98	50.27	48.92
	p_{HWE}	0.19	0.02	0.36	0.88	0.02
rs1799750 *MMP1*	*1G1G*	28.89 (65)	37.62 (76)	29.82 (34)	24.72 (45)	30.43 (220)
	1G2G	44.44 (100)	43.56 (88)	48.25 (55)	50.56 (92)	46.33 (335)
	2G2G	26.67 (60)	18.81 (38)	21.93 (25)	24.72 (45)	23.24 (168)
	2G	48.89	40.59	46.05	50.00	46.40
	p_{HWE}	0.11	0.19	0.85	1.00	0.07
rs679620 *MMP3*	*TT*	26.52 (61)	29.81 (62)	24.35 (28)	19.89 (37)	25.71 (190)
	TC	48.69 (112)	47.11 (98)	50.43 (58)	50.00 (93)	48.85 (361)
	CC	24.78 (57)	23.08 (48)	25.22 (29)	30.11 (56)	25.44 (188)
	C	49.13	46.63	50.43	55.11	49.86
	p_{HWE}	0.69	0.46	1.00	1.00	0.55
rs243865 *MMP2*	*CC*	61.40 (140)	57.77 (119)	48.69 (56)	55.92 (104)	57.24 (419)
	CT	31.58 (72)	35.44 (73)	44.35 (51)	34.95 (65)	35.66 (261)
	TT	7.02 (16)	6.79 (14)	6.96 (8)	7.53 (14)	7.10 (52)
	T	22.81	24.51	29.13	25.41	24.93
	p_{HWE}	0.13	0.57	0.50	0.43	0.20
rs3918242 *MMP9*	*CC*	68.72 (156)	69.71 (145)	70.69 (82)	67.94 (125)	69.12 (508)
	CT	28.19 (64)	27.40 (57)	25.86 (30)	31.52 (58)	28.43 (209)
	TT	3.08 (7)	2.89 (6)	3.45 (4)	0.54 (1)	2.45 (18)
	T	17.18	16.59	16.38	16.30	16.67
	p_{HWE}	0.82	0.81	0.50	0.06	0.59
rs3918249 *MMP9*	*TT*	37.83 (87)	32.68 (67)	47.83 (55)	36.22 (67)	37.55 (276)
	TC	43.48 (100)	53.66 (110)	40.00 (46)	48.65 (90)	47.07 (346)
	CC	18.69 (43)	13.66 (28)	12.17 (14)	15.13 (28)	15.38 (113)
	C	40.43	40.49	32.17	39.46	38.91
	p_{HWE}	0.13	0.15	0.39	0.88	0.82
rs17576 *MMP9*	*AA*	37.83 (87)	34.60 (73)	47.41 (55)	37.10 (69)	38.22 (284)
	AG	47.39 (109)	47.87 (101)	42.24 (49)	43.55 (81)	45.76 (340)
	GG	14.78 (34)	17.53 (37)	10.35 (12)	19.35 (36)	16.02 (119)
	G	38.48	41.47	31.47	41.13	38.90
	p_{HWE}	1.00	0.89	0.83	0.17	0.32

Таблица 1. Окончание

Локус	Генотип, минорный аллель, соответствие HWE	Женщины (n = 441)		Мужчины (n = 305)		Итого (n = 746) % (n)
		контроль (n = 230) % (n)	больные (n = 211) % (n)	контроль (n = 117) % (n)	больные (n = 188) % (n)	
rs3787268 *MMP9*	*GG*	59.65 (136)	58.57 (123)	68.38 (80)	60.87 (112)	61.03 (451)
	GA	35.96 (82)	37.62 (79)	28.20 (33)	34.78 (64)	34.91 (258)
	AA	4.39 (10)	3.81 (8)	3.42 (4)	4.35 (8)	4.06 (30)
	A	22.37	22.62	17.52	21.74	21.52
	p_{HWE}	0.70	0.33	0.75	1.00	0.39
rs2250889 *MMP9*	*CC*	76.55 (173)	80.86 (169)	81.03 (94)	83.16 (153)	80.14 (589)
	CG	20.80 (47)	16.75 (35)	16.38 (19)	16.30 (30)	17.82 (131)
	GG	2.65 (6)	2.39 (5)	2.59 (3)	0.54 (1)	2.04 (15)
	G	13.05	10.77	10.78	8.70	10.95
	p_{HWE}	0.23	0.07	0.12	1.00	0.02
rs17577 *MMP9*	*GG*	68.75 (154)	69.42 (143)	70.69 (82)	66.67 (120)	68.73 (499)
	AG	27.23 (61)	28.15 (58)	25.86 (30)	32.22 (58)	28.51 (207)
	AA	4.02 (9)	2.43 (5)	3.45 (4)	1.11 (2)	2.76 (20)
	A	17.63	16.50	16.38	17.22	17.01
	p_{HWE}	0.36	1.00	0.50	0.11	0.89

(H3K4me1_Enh) и “активные” энхансеры (H3K27ac_Enh) в желудке и тонком кишечнике плода, слизистой оболочке желудка (H3K4me1_Enh) и двенадцатиперстной кишки (H3K4me1_Enh), гладкой мускулатуре желудка (H3K27ac_Enh) и двенадцатиперстной кишки (H3K27ac_Enh) взрослого организма, находится в регионе взаимодействия с двумя регуляторными белками – CFOS и GATA2. При этом следует отметить, что лишь для шести факторов транскрипции (AP-1, Dbx1, En-1, Evi-1, HMG-IY, Pou3f2) аллель *2G* rs1799750 гена *MMP1*, связанный с низким риском развития ЯБ у женщин, повышает афинность ДНК (ΔLOD > 0), тогда как для подавляющего числа транскрипционных факторов – 16 (CHX10, DMRT2, Hoxb4, PLZF, Pax-4, Pax-6 и др.) данный полиморфизм снижает сродство регуляторных мотивов ДНК (ΔLOD < 0).

В-пятых, с транскрипционной активностью гена *MMP1* в пищеварительной системе (пищевод) ассоциирован и rs1799750 гена *MMP1* ($\beta = -0.30$, $p = 2.8 \times 10^{-7}$, $p_{FDR} \leq 0.05$). При этом аллель *2G* rs1799750, имеющий протективное значение при развитии ЯБ у женщин, связан с более высоким уровнем экспрессии гена *MMP1* (для референсного ему аллеля *1G* $\beta < 0$).

Итак, полученные нами данные указывают на выраженные эпигенетические эффекты полиморфных локусов rs3918249 и rs17576 гена *MMP9*, и rs1799750 гена *MMP1*, которые они проявляют в различных отделах пищеварительной системы и в том числе органах-мишенях, поражаемых при язвенной болезни, – желудке и двенадцатиперстной кишке. Следует отметить, что полиморфные локусы rs3918249 и rs17576 гена *MMP9* находятся на расстоянии 2.1 тыс. пн друг от друга и сильно сцеплены между собой ($r^2 = 0.99$, $D' = 0.99$), поэтому их функциональные эффекты могут перекрываться.

Следует отметить, что в доступной нам литературе представлены лишь единичные работы, посвященные изучению роли полиморфизма генов *MMP* в формировании язвенной болезни [13, 14, 23, 24], среди которых на модели российской популяции выполнено лишь одно исследование. Так, в работе Шаймардановой и др. [14] были изучены ассоциации с развитием ЯБ в популяции Республики Башкортостан трех из десяти изученных в нашей работе полиморфных локусов генов *MMP*: rs1799750 гена *MMP1*, rs3918242 и rs17576 гена *MMP9*. Для двух из этих трех полиморфных локусов авторы установили ассоциации с заболеванием: генотип *1G/2G* rs1799750 гена *MMP1* являлся фактором риска развития ЯБ у татар (OR = 1.94, $p = 0.02$), а rs17576 гена *MMP9* ассоциирован с развитием ЯБ у татар (для генотипа *A/A* OR = 0.49, $p = 0.007$ и

Таблица 2. Сравнительные данные по ассоциациям полиморфизма генов *MMP* с развитием язвенной болезни у мужчин и женщин

Полиморфизм	Ген	Редкий аллель	*n*	Аддитивная модель				Доминантная модель				Рецессивная модель			
				ОШ	95% ОШ		*p*	ОШ	95% ОШ		*p*	ОШ	95% ОШ		*p*
					L95	U95			L95	U95			L95	U95	
Мужчины															
rs1940475	*MMP-8*	*T*	300	1.14	0.82	1.57	0.442	1.30	0.77	2.18	0.326	1.08	0.63	1.85	0.784
rs1799750	*MMP-1*	*2G*	296	1.17	0.84	1.63	0.352	1.29	0.77	2.19	0.335	1.17	0.67	2.04	0.582
rs679620	*MMP-3*	*T*	301	0.83	0.59	1.15	0.263	0.78	0.46	1.32	0.360	0.77	0.44	1.35	0.362
rs243865	*MMP-2*	*T*	298	0.83	0.57	1.02	0.321	0.72	0.45	1.15	0.171	1.11	0.45	2.73	0.824
rs3918242	*MMP-9*	*T*	300	0.99	0.63	1.58	0.980	1.14	0.69	1.89	0.616	0.15	0.02	1.39	0.095
rs3918249	*MMP-9*	*C*	300	1.37	0.97	1.93	0.076	**1.61**	**1.01**	**2.59**	**0.047**	1.29	0.65	2.56	0.473
rs17576	*MMP-9*	*G*	302	**1.48**	**1.06**	**2.07**	**0.023**	1.53	0.96	2.45	0.077	**2.08**	**1.03**	**4.19**	**0.040**
rs3787268	*MMP-9*	*A*	301	1.31	0.86	1.99	0.209	1.39	0.85	2.27	0.187	1.28	0.38	4.36	0.689
rs2250889	*MMP-9*	*G*	300	0.80	0.47	1.37	0.410	0.87	0.47	1.58	0.640	0.21	0.02	2.00	0.173
rs17577	*MMP-9*	*A*	296	1.07	0.68	1.68	0.783	1.21	0.73	2.00	0.468	0.31	0.06	1.75	0.186
Женщины															
rs1940475	*MMP-8*	*T*	441	0.88	0.68	1.12	0.297	0.76	0.50	1.15	0.189	0.91	0.60	1.39	0.678
rs1799750	*MMP-1*	*2G*	427	**0.74**	**0.57**	**0.96**	**0.021**	0.67	0.45	1.01	0.056	0.64	0.40	1.01	0.055
rs679620	*MMP-3*	*T*	438	0.91	0.70	1.18	0.469	0.85	0.56	1.29	0.445	0.91	0.59	1.41	0.676
rs243865	*MMP-2*	*T*	434	1.09	0.81	1.48	0.568	1.16	0.79	1.71	0.441	0.97	0.46	2.03	0.928
rs3918242	*MMP-9*	*T*	435	0.96	0.67	1.37	0.816	0.95	0.64	1.44	0.823	0.93	0.31	2.82	0.903
rs3918249	*MMP-9*	*C*	435	1.00	0.76	1.32	0.987	1.25	0.84	1.86	0.263	0.69	0.41	1.16	0.157
rs17576	*MMP-9*	*G*	441	1.13	0.86	1.48	0.367	1.15	0.78	1.70	0.481	1.23	0.74	2.04	0.433
rs3787268	*MMP-9*	*A*	438	1.02	0.73	1.41	0.927	1.05	0.71	1.53	0.819	0.86	0.33	2.23	0.762
rs2250889	*MMP-9*	*G*	435	0.82	0.55	1.22	0.324	0.77	0.49	1.23	0.274	0.90	0.27	2.99	0.862
rs17577	*MMP-9*	*A*	430	0.93	0.65	1.32	0.664	0.97	0.64	1.46	0.881	0.59	0.20	1.80	0.358

Примечание. ОШ – отношение шансов, 95% ОШ – доверительный интервал отношения шансов (L95 – нижний предел и U95 – верхний предел доверительного интервала), *p* – уровень значимости, полужирным шрифтом выделены статистически значимые показатели с учетом результатов проведенного пермутационного теста (выполнено 1000 пермутаций).

для генотипа *A/G* OR = 2.19, $p = 0.003$), формированием язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (для генотипа *A/G* OR = 1.57, $p = 0.009$) и развитием ЯБ у татар на фоне *H. pylori* инфекции (для генотипа *A/A* OR = 0.54, $p = 0.03$ и для генотипа *A/G* OR = 2.23, $p = 0.009$).

Полученные нами данные о рисковом значении для развития ЯБ у мужчин аллеля *G* rs17576 и соответственно протективной роли в формировании заболевания референсного для него аллеля *A* полностью согласуются с результатами работы Шаймардановой и др. [14], но отличаются от материалов, полученных в исследованиях Yeh et al. [13] и Hellmig et al. [23]. В работе Yeh et al. [13] не выявлено значимых ассоциаций rs17576 *MMP9* с развитием *H. pylori*-позитивной язвенной болезни желудка и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки в тайваньской популяции, а в исследовании Hellmig et al. [23], проведенном в популяции Германии, наоборот, обнаружено рисковое значение для возникновения *H. pylori*-позитивной язвенной болезни желудка аллеля *A* rs17576. В работе Shan et al. [24], так же как и в нашем исследовании, не установлено статистически значимых связей rs3918242 гена *MMP9* с формированием язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у детей в китайской популяции.

Имеются многочисленные исследования, указывающие на связь рассматриваемых в настоящей работе полиморфных локусов генов *MMP1* и *MMP9* с онкологическими заболеваниями пищеварительной системы [25–33]. Наибольшее количество данных, подтверждающих вовлеченность в формирование злокачественных заболеваний пищеварительного тракта, получено для rs1799750 гена *MMP1*: выявлена связь данного полиморфизма с раком пищевода (аденокарцинома пищевода) [25–28] и раком желудка [29–32]. В работе Okada et al. [33] показаны ассоциации rs17576 *MMP9* с раком желудка как самостоятельно, так и в составе гаплотипа CAA rs3918242–rs17576–rs17577 *MMP-9*. Таким образом, можно сделать заключение о наличии общих генетических механизмов (в виде функционально значимых полиморфных локусов генов *MMP1* и *MMP9*), определяющих предрасположенность как к язвенной болезни, так и к онкологическим заболеваниям пищеварительной системы.

Установлены гендерные особенности ассоциаций полиморфизма генов *MMP* с развитием ЯБ: rs3918249 и rs17576 гена *MMP9* определяют подверженность к развитию ЯБ у мужчин, а rs1799750 гена *MMP1* – у женщин. Факторами риска возникновения ЯБ у мужчин являются аллели *C* rs3918249 (ОШ = 1.61, $p_{perm} = 0.048$) и *G* rs17576 (ОШ = 1.48–2.08, $p_{perm} \leq 0.042$) гена *MMP9*. У женщин протективное значение для развития заболевания имеет аллель *2G* rs1799750 гена *MMP1* (ОШ = 0.74, $p_{perm} = 0.047$). Полиморфные локусы, ассоциированные с ЯБ у мужчин и женщин, проявляют выраженные эпигенетические эффекты (влияют на афинность мотивов ДНК к различным транскрипционным факторам, расположены в регионе промоторов и энхансеров в желудке и двенадцатиперстной кишке, связаны с экспрессией генов в различных отделах пищеварительной системы).

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

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 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. *Milivojevic V., Milosavljevic T.* Burden of gastroduodenal diseases from the global perspective // Curr. Treat. Options Gastro. 2020. V. 18. P. 148–157. https://doi.org/10.1007/s11938-020-00277-z
2. *Ramakrishnan K., Salinas R.C.* Peptic ulcer disease // Am. Fam. Physician. 2007. V. 76. P. 1005–1012.
3. Здравоохранение в России. 2019: Стат. сб. М.: Росстат., 2019. 170 с.
4. *Ивашкин В.Т., Маев И.В., Царьков П.В. и др.* Диагностика и лечение язвенной болезни у взрослых (клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации, Российского общества колоректальных хирургов и Российского эндоскопического общества) // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2020. Т. 30. № 1. С. 49–70. https://doi.org/10.22416/1382-4376-2020-30-1-49-70
5. *Narayanan M., Reddy K.M., Marsicano E.* Peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection // Missouri Med. 2018. V. 115(3). P. 219–224.
6. *Lanas A., Chan F.* Peptic ulcer disease // Lancet. 2017. V. 390(10094). P. 613–624. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32404-7
7. *Saarialho-Kere U.K., Vaalamo M., Puolakkainen P. et al.* Enhanced expression of matrilysin, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers // Am. J. Pathol. 1996. V. 148(2). P. 519–526.
8. *Elkington P.T., O'Kane C.M., Friedland J.S.* The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease // Clin. Exp. Immunol. 2005. V. 142(1). P. 12–20. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02840.x
9. *Tomita M., Ando T., Minami M. et al.* Potential role for matrix metalloproteinase-3 in gastric ulcer healing //

Digestion. 2009. V. 79(1). P. 23–29.
https://doi.org/10.1159/000203637

10. *Kubben F.J., Sier C.F., Schram M.T. et al.* Eradication of *Helicobacter pylori* infection favourably affects altered gastric mucosal MMP-9 levels // Helicobacter. 2007. V. 12(5). P. 498–504.
https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00527.x
11. *Li S.L., Zhao J.R., Ren X.Y. et al.* Increased expression of matrix metalloproteinase-9 associated with gastric ulcer recurrence // World J. Gastroenterol. 2013. V. 19(28). P. 4590–4595.
https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i28.4590
12. *Cheng H.C., Yang H.B., Chang W.L. et al.* Expressions of MMPs and TIMP-1 in gastric ulcers may differentiate *H. pylori*-infected from NSAID-related ulcers // Sci. World J. 2012. V. 2012. P. 539316.
https://doi.org/10.1100/2012/539316
13. *Yeh Y.C., Cheng H.C., Chang W.L. et al.* Matrix metalloproteinase-3 promoter polymorphisms but not dupA-*H. pylori* correlate to duodenal ulcers in *H. pylori*-infected females // BMC Microbiol. 2010. V. 10. P. 218.
https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-218
14. *Шаймарданова Э.Х., Нургалиева А.Х., Хидиятова И.М. и др.* Роль аллельных генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в развитии язвенной болезни // Генетика. 2016. Т. 52. № 3. С. 364–375.
https://doi.org/10.7868/S0016675816020119
15. *Litovkina O., Nekipelova E., Dvornyk V. et al.* Genes involved in the regulation of vascular homeostasis determine renal survival rate in patients with chronic glomerulonephritis // Gene. 2014. V. 546(1). P. 112–116.
https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.020
16. *Reshetnikov E.A., Akulova L.Y., Dobrodomova I.S. et al.* The insertion-deletion polymorphism of the ACE gene is associated with increased blood pressure in women at the end of pregnancy // J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2015. V. 16(3). P. 623–632.
https://doi.org/10.1177/1470320313501217
17. *Миняйло О.Н.* Распределение аллелей и гаплоблочная структура полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ у больных *H. pylori*-негативной язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // Науч. результаты биомед. исследований. 2020. Т. 6. № 4. С. 488–502.
https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-6-4-0-5
18. *Moskalenko M., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* Polymorphisms of the matrix metalloproteinase genes are associated with essential hypertension in a Caucasian population of Central Russia // Sci. Rep. 2021. V. 11(1). P. 5224.
https://doi.org/10.1038/s41598-021-84645-4
19. *Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al.* Candidate genes for age at menarche are associated with endometrial hyperplasia // Gene. 2020. V. 757. P. 144933.
https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144933
20. *Ponomarenko I., Reshetnikov E., Altuchova O. et al.* Association of genetic polymorphisms with age at menarche in Russian women // Gene. 2019. V. 686. P. 228–236.
https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.042
21. *Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al.* Candidate genes for age at menarche are associated with endometriosis // Reprod. Biomed. Online. 2020. V. 41(5). P. 943–956.
https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.04.016
22. *Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al.* Candidate genes for age at menarche are associated with uterine leiomyoma // Front. Genet. 2021. V. 11. P. 512940.
https://doi.org/10.3389/fgene.2020.512940
23. *Hellmig S., Ott S., Rosenstiel P. et al.* Genetic variants in matrix metalloproteinase genes are associated with development of gastric ulcer in *H. pylori* infection // Am. J. Gastroenterol. 2006. V. 101. P. 29–35.
24. *Shan Q.W, Jing C.X., Wang L.L. et al.* Relationship between gene polymorphisms in MMP-9 and *Helicobacter pylori*-related upper gastrointestinal disease in children // Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2010. V. 12(4). P. 262–266. Chinese.
25. *Bradbury P.A., Zhai R., Hopkins J. et al.* Matrix metalloproteinase 1, 3 and 12 polymorphisms and esophageal adenocarcinoma risk and prognosis // Carcinogenesis. 2009. V. 30(5). P. 793–798.
https://doi.org/10.1093/carcin/bgp065
26. *Cheung W.Y., Zhai R., Bradbury P. et al.* Single nucleotide polymorphisms in the matrix metalloproteinase gene family and the frequency and duration of gastroesophageal reflux disease influence the risk of esophageal adenocarcinoma // Int. J. Cancer. 2012. V. 131(11). P. 2478–2486.
https://doi.org/10.1002/ijc.27541
27. *Guan X., Wang X., Luo H. et al.* Matrix metalloproteinase 1, 3, and 9 polymorphisms and esophageal squamous cell carcinoma risk // Med. Sci. Monit. 2014. V. 20. P. 2269–2274.
https://doi.org/10.12659/MSM.892413
28. *Tian J., Liu C., Liu G. et al.* Cumulative evidence for association between genetic polymorphisms and esophageal cancer susceptibility: A review with evidence from meta-analysis and genome-wide association studies // Cancer Med. 2019. V. 8(3). P. 1289–1305.
https://doi.org/10.1002/cam4.1972
29. *Tian J., Liu G., Zuo C. et al.* Genetic polymorphisms and gastric cancer risk: A comprehensive review synopsis from meta-analysis and genome-wide association studies // Cancer Biol. Med. 2019. V. 16(2). P. 361–389.
https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0290
30. *Yang M.D., Lin K.C., Lu M.C. et al.* Contribution of matrix metalloproteinases-1 genotypes to gastric cancer susceptibility in Taiwan // Biomedicine (Taipei). 2017. V. 7(2). P. 10.
https://doi.org/10.1051/bmdcn/2017070203
31. *Peng Q., Xu Y.* Association between promoter polymorphisms of matrix metalloproteinase-1 and risk of gastric cancer // Onco. Targets Ther. 2015. V. 8. P. 2519–2526.
https://doi.org/10.2147/OTT.S83004
32. *Devulapalli K., Bhayal A.C., Porike S.K.* Role of interstitial collagenase gene promoter polymorphism in the etiology of gastric cancer // Saudi J. Gastroenterol. 2014. V. 20(5). P. 309–314.
https://doi.org/10.4103/1319-3767.141693
33. *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

Gender-Specific Features of Associations of Polymorphism of Matrix Metalloproteinase Genes with the Development of Peptic Ulcer Disease in the Population of the Central Chernozem Region of Russia

O. N. Minyaylo[a], I. V. Ponomarenko[a], and M. I. Churnosov[a, *]

[a] *Belgorod State University, Belgorod, 308015 Russia*

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

Gender-specific features of associations of functionally significant polymorphic loci of matrix metalloproteinase genes with the development of peptic ulcer disease (PUD) in the population of the European part of Russia were studied. The study included 305 men (patients with PUD—188, control group—117) and 441 women (patients with PUD – 211, control group – 230). Ten functionally significant polymorphic loci of matrix metalloproteinase genes were genotyped: rs1799750 *MMP1*, rs243865 *MMP2*, rs679620 *MMP3*, rs1940475 *MMP8*, rs3918242, rs3918249, rs17576, rs3787268, rs2250889, rs17577 of the *MMP9* gene. Associations of polymorphic loci of *MMP* genes with PUD were studied by logistic regression (dominant, recessive and additive genetic models of allele interaction were evaluated). It was found that alleles *C* rs3918249 (OR = 1.61, $p_{perm} = 0.048$) and *G* rs17576 (OR = 1.48–2.08, $p_{perm} \leq 0.042$) of the *MMP9* gene were risk factors for the occurrence of PUD in men. In women, the *2G* rs1799750 allele of the *MMP1* gene had a protective value for the development of the disease (OR = 0.74, $p_{perm} = 0.047$). Polymorphic loci associated with PUD in men and women exhibit pronounced epigenetic effects (they affect the affinity of DNA motifs to various transcription factors, are located in the region of promoters and enhancers in the stomach and duodenum, and are associated with gene expression in various parts of the digestive system). Gender-specific features of associations of polymorphism of *MMP* genes with the development of PUD were revealed: rs3918249 and rs17576 of the *MMP9* gene determine the susceptibility to the development of PUD in men, and rs1799750 of the *MMP1* gene – in women.

Keywords: peptic ulcer disease, matrix metalloproteinases, polymorphism, associations, gender.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1194–1204

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

УДК 575.17:575.177:303.725.23

К АНАЛИЗУ СЛУЧАЙНЫХ ПРОЦЕССОВ ИЗОНИМИИ. I. СТРУКТУРА ИЗОНИМИИ

© 2021 г. В. П. Пасеков*

Вычислительный центр им. А.А. Дородницына Федерального исследовательского центра "Информатика и управление" Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

**e-mail: pass40@mail.ru*

Поступила в редакцию 03.02.2021 г.
После доработки 16.04.2021 г.
Принята к публикации 27.04.2021 г.

Анализируются закономерности случайной дивергенции фамильного состава популяции ограниченного размера, приближенно рассматриваемой в дискретном времени с неперекрывающимися поколениями. Предполагается, что фамилии передаются потомкам патрилинейно. На относительно малом промежутке времени $t/NE(t)$, где $NE(t)$ – средний гармонический эффективный размер популяции за t поколений, систематическими давлениями можно пренебречь. Фамильный состав очередного поколения τ формально является случайной выборкой размера $Ne(\tau)/2$ из фамилий мужской составляющей родительской популяции, размера в 4 раза меньшего, чем количество гамет $2Ne(\tau)$, формирующих новое поколение, $Ne(\tau)$ – эффективный размер популяции в поколении τ. В результате фамильная микроэволюция приближенно рассматривается как аналог процесса случайного генного дрейфа, одновременно протекающего в той же самой популяции с вчетверо меньшей, чем для фамилий, интенсивностью. Роль концентрации гомозигот при анализе фамильной структуры играет вероятность случайной встречи индивидуума с однофамильцем, а гетерозигот – вероятность встречи индивидуумов с разными фамилиями. Результаты не предполагают монофилии фамилий и описывают умозрительную теоретическую совокупность популяций-реплик, как бы прошедших заново микроэволюционную историю рассматриваемой популяции в тех же условиях. Введено понятие фамильного аналога коэффициента инбридинга. Он практически превышает в 4 раза традиционный показатель инбридинга С. Райта. Оценивание коэффициента инбридинга реальных подразделенных популяций дает представление о статистической корреляции гомологичных генов объединяющихся гамет и не дифференцирует ситуации механической смеси субпопуляций или их общего происхождения. Лишь когда микроэволюция реальных субпопуляций с общим корнем независима, коэффициент инбридинга прямо связан с идентичностью генов по происхождению.

Ключевые слова: теоретическая популяционная генетика, популяции с неперекрывающимися поколениями, коэффициент инбридинга, дрейф фамилий, случайный генный дрейф, математические модели.

DOI: 10.31857/S001667582110009X

Интерес к популяционным фамильным данным у человека связан с задачами истории, географии заселения и миграций, происхождения, генеалогии населения [1, 2] и обусловлен просто вниманием людей к своим корням. Особенно важен также генетический аспект изучения фамильной структуры популяций [3–7]. Обширная библиография применения фамилий в популяционно-генетических исследованиях представлена в [8], критические моменты использования данных по изонимным бракам подчеркиваются в [9]. Применению моделей популяционной генетики в анализе фамильной структуры посвящены работы [10, 11] и др.

Во многом направления фамильных исследований объединяет ожидание кровнородственной связи (патрилинейная передача фамилий соответствует передаче Y-хромосомы) между людьми с одной фамилией (*изонимными*) и возможность получения информации о внутри- и межпопуляционном родстве [12]. С формализацией родства в терминах идентичности генов по происхождению можно познакомиться в [13, 14].

При изучении фамилий особый интерес вызывает связь коэффициента родства и инбридинга популяции с распространенностью в ней однофамильцев. Как известно, между передачей потомкам фамилии и передачей родительских генов имеются параллели. В определенной степени фа-

милии являются аналогами множественных аллелей аутосомного локуса. Одним из показателей родства служит коэффициент инбридинга популяции, важный, например, для понимания структуры наследственной отягощенности населения [15]. Фамильные данные вносят свой вклад в оценивание инбридинга популяции и генетической структуры [4]. Здесь сделаем замечание относительно интерпретации коэффициента инбридинга. Данный показатель был введен С. Райтом в 1921, 1922 гг. для диаллельных локусов (см., например, [14]) как статистическая корреляция между гомологичными генами объединяющихся гамет в генотипе особи. Позднее широкое распространение получило определение коэффициента инбридинга как вероятности идентичности по происхождению аллелей (т.е. точных копий аллеля общего предка) индивидуума.

Понятно, что возникновению инбредности благоприятствует подбор родительских пар, связанных родством, например, при искусственном отборе. Может показаться неожиданным, но при случайном выборе супруги в популяции ограниченного размера вероятность идентичности аллелей по происхождению будет ненулевой. Объяснением возникающей инбредности в такой популяции служит *случайный генный дрейф*, приводящий к ненаправленным колебаниям концентраций аллелей от поколения к поколению. При относительно малом количестве поколений процесс дрейфа фамилий отличается от генного дрейфа тем, что для первого из них время течет приближенно в 4 раза быстрее. *В дальнейшем мы целиком фокусируемся на анализе возникновения инбредности популяции в результате случайного дрейфа как фактора увеличения вероятности идентичности аллелей по происхождению и дивергенции популяций.*

Цель настоящей серии работ в адаптации анализа генного дрейфа применительно к распределению фамилий в популяциях, в систематическом изложении соответствующих результатов относительно фамильной структуры и коэффициента инбридинга в статике, динамике и асимптотике на относительно малом времени дивергенции (*малых коэффициентах инбридинга*), *а также в выявлении связи между характеристиками фамильной и генетической структур*. Показано, что при относительно малом времени доминирующим фактором динамики является случайный выборочный дрейф, приводящий к дивергенции популяции от начального состояния и дивергенции друг от друга популяций с общим происхождением на начальным этапе их микроэволюции.

В последующих частях данной работы планируется анализ зависимости от времени характеристик дивергенции возможных фамильных состояний, получение точных в рамках модели зависимостей характеристик от времени и их аппроксимаций при относительно малой длительности дивергенции. Использование понятия относительного времени и его связи с фамильным аналогом коэффициента инбридинга показывает, что время для фамильного дрейфа течет в 4 раза быстрее, чем для одновременно протекающего в популяции дрейфа генов.

В дальнейших публикациях для анализа фамильного дрейфа будет применяться преобразование состояний для стабилизации темпа дивергенции. При использовании углового расстояния между начальным и текущим состояниями случайные изменения расстояний будут изотропны, и приближенно у квадрата расстояния будет распределение хи-квадрат, что позволяет оценивать коэффициент фамильного инбридинга (который вчетверо больше коэффициента инбридинга С. Райта, традиционного в популяционной генетике). Кроме того, детально анализируется связь вероятности случайной встречи двух изонимных индивидуумов с вероятностью идентичности по происхождению гомологичных аллелей объединяющихся гамет в диплоидных генотипах индивидуумов.

Кратко коснемся обозначений и терминологии. Под концентрациями фамилий в популяции подразумеваются концентрации однофамильцев. Если используется информация о фамилиях мужчин и женщин, то у женщин имеются в виду девичьи фамилии. Термины “вероятность наблюдения пары однофамильцев, вероятность случайной встречи двух однофамильцев, появление изонимной пары в результате случайного выбора двух индивидуумов” являются синонимами. Векторы набраны полужирным шрифтом, *к обозначениям фамильных аналогов популяционно-генетических характеристик добавлено окончание s*. Характеристики индивидуумов и их пар пишутся строчными буквами, а популяционные характеристики – заглавными (например, f и F), символ ◄ обозначет конец доказательства.

О СЛУЧАЙНОМ ВЫБОРОЧНОМ ДРЕЙФЕ ФАМИЛИЙ

Чтобы проанализировать связь динамики распределения фамилий в популяции с передачей потомкам наследственной информации, желательно хорошо представлять себе особенности этих процессов изолированно. В определенной степени фамилии являются аналогами множественных аллелей одного аутосомного локуса. Публикаций по однолокусной генетической структуре популяций конечного размера гораздо больше, чем по особенностям распределения фамилий. Поэтому обратимся к анализу фамильной структуры.

Проведем ее исследование в максимально простой ситуации с выполнением предположений, используемых в популяционной генетике. Пусть по-

коления не перекрываются. Конечно, у человека существует перекрывание, но использование результатов, полученных для модели с неперекрывающимися поколениями (например, закона Харди–Вайнберга), обычно не приводит к противоречиям и эффективно при анализе генетической структуры популяций человека.

Положим, что фамилии передаются патрилинейно от отца к сыну без изменений, в браке супруга принимает фамилию мужа. Очевидно, после заключения браков *фамильная структура у супругов как мужчин, так и женщин одинакова*, и учет фамилий женщин после брака (дублей фамилий супругов) неинформативен. Все это свидетельствует о том, что можно отказаться от использования данных по фамилиям женщин и изучать только фамильную структуру мужчин – ведь даже если бы фамильный состав женщин изменялся произвольно это не оказывало бы никакого влияния на фамилии у мужчин в последующем.

Однако в некоторых отношениях использование девичьих фамилий женщин целесообразно, например при анализе изонимных браков. Добавим к этому дополнительные соображения о роли женщин в анализе фамильного состава. Рассмотрим популяцию в произвольном поколении τ. В нем фамильный состав совместно мужчин и девичьих фамилий у женщин в популяции размера $N(\tau)$ является случайной выборкой с возвращением объема $N(\tau)$ (включающей выборки фамилий по каждому полу) из совокупности фамилий у родителей-мужчин предыдущего поколения. Если наша задача состоит в оценивании фамильного состояния *в предыдущем поколении* $\tau - 1$, то источником информации будут как фамилии мужчин, так и *девичьи* фамилии женщин общим количеством $N(\tau)$ – размером всей случайной выборки из фамилий у родителей-мужчин.

Если же задача состоит в предсказании свойств фамильного состояния *в следующем поколении*, то они определяются размером $N(\tau + 1)/2$ случайной выборки (дающей фамильный состав мужчин в очередном поколении $\tau + 1$) из фамилий мужчин в момент τ. Таким образом, оценивание предыдущего состояния точнее, чем предсказание следующего, если не принимать во внимание динамику численности.

Итак, при изучении динамики фамильной структуры можно ограничиться анализом данных *только по мужчинам*, численность которых при образовании семей обозначим как $N/2$. Именно к стадии заключения браков будем относить фамильное состояние, или фамильную структуру популяции – концентрации фамилий среди мужчин. *Хотя далее будем говорить об N как общем размере популяции с учетом обоих полов, эта интерпретация условна и базовой величиной является N/2.*

Динамика распределения фамилий обусловлена различиями в количестве детей, оставляемых родительскими парами, точнее различиями в числе сыновей. В этом отношении носителей фамилий полагаем равнозначными (нейтральными), а различия в размере семей чисто случайными. Каждый индивидуум следующего поколения с равной вероятностью $1\Big/\dfrac{N}{2}$ является потомком любого из $N/2$ родителей-отцов предыдущего поколения. Повторим, что при этом фамильный состав (фамильное состояние) мужчин следующего поколения удовлетворяет условиям случайной выборки с возвращением размера $N/2$ из совокупности фамилий родительского поколения. Понятно, что фамильный состав поколения потомков наследует родительский с выборочной ошибкой, накапливающейся в поколениях.

Эта схема известна в популяционной генетике как модель Райта–Фишера. В ней *генетический состав* нового поколения диплоидной популяции является результатом $2N$ случайных испытаний (N – размер популяции с учетом женщин и $2N$ – количество гамет, формирующих N диплоидных потомков). Вероятность при каждом из $2N$ испытаний получить i-ю гамету равна ее концентрации p_i в пуле гамет родителей. У нас аналогично новый *фамильный состав* мужской части популяции размера $N/2$ на следующем шагу является случайной выборкой $N/2$ фамилий родителей с присущими выборкам отклонениями от состояния родительского поколения.

Здесь имеется полное сходство с генетической моделью гаплоидной популяции (или диплоидной со случайным скрещиванием), рассматриваемой в отношении одного (аутосомного) локуса с множественными аллелями. Роль фамилий играют аллели. Аналогом пар индивидуумов с разными фамилиями (следовательно, с разными родоначальниками) являются гетерозиготы, а аналогом пар однофамильцев будут гомозиготы. Согласно свойствам независимых биномиальных испытаний с вероятностью успеха p_i дисперсия $V(x_i)$ возможных значений доли x_i успехов в выборке размера K, т.е. дисперсия концентрации i-й фамилии находится как $V(x_i) = p_i(1 - p_i)/K$.

Отсюда для одной и той же популяции при одинаковых фамильном и генетическом состояниях интенсивность выборочных колебаний при смене поколения (дисперсия) концентраций фамилий в 4 раза больше, чем у одновременно протекающего в попу-

ляции генного дрейфа (*выборка фамилий вчетверо меньше, чем выборка гамет*).

В дальнейшем мы воспользуемся следующим свойством [16] класса моделей стохастических процессов со случайными и систематическими изменениями состояния, которому принадлежит модель Райта–Фишера.

Замечание 1. *Пусть состояние популяции размера N с неперекрывающимися поколениями меняется за счет независимых случайных выборочных колебаний при смене поколений с дисперсией* σ^2 *порядка 1/N и неслучайного давления систематических факторов микроэволюции, также вызывающих изменения порядка 1/N за поколение.*

Тогда, при малой величине отношения t/N, где t обозначает длительность процесса динамики состояния популяции в поколениях, давлением систематических факторов (*отбора, миграций, мутаций*) *можно пренебречь.*

Доказательство. Для конкретности рассмотрим модель Райта–Фишера. У нее изменения состояния популяции за поколение (шаг) не направлены и случайны. Поэтому среднее значение выборочного отклонения состояния за шаг не характеризует темп динамики, так как оно равно нулю. Скорость можно охарактеризовать, например, средним абсолютным отклонением за поколение, которое для отдельной координаты состояния (концентрации отдельной фамилии) примерно равно 0.8 от среднего квадратического отклонения σ в случае нормального и близких к нему распределений. Скорость изменений *квадрата* отклонения ненаправленного случайного процесса можно измерять дисперсией σ^2 состояний за шаг.

В случае некоррелирующих случайных изменений состояний при сменах поколений дисперсия суммарного отклонения через небольшое количество t поколений увеличится примерно в t раз, как и величина систематического отклонения. Значит среднее абсолютное отклонение будет порядка $\sqrt{t\sigma^2} = \sqrt{t1/N}$, а порядок систематического $t1/N$. Для их отношения имеем

$$\sqrt{t\times 1/N}\big/(t\times 1/N) = \\ = \sqrt{N/t} \gg 1 \text{ при } N/t \gg 1 \text{ (при } t/N \ll 1).$$

Следовательно, когда t мало по сравнению с N, систематическим отклонением можно пренебречь как много меньшим по сравнению с абсолютным. ◄

ФИНАЛЬНЫЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ВЫБОРОЧНЫХ КОЛЕБАНИЙ ФАМИЛЬНОГО СОСТАВА ПОПУЛЯЦИИ

Рассмотрим гипотетическую исходную (родоначальную) популяцию (*без предположения о монофилии фамилий, но на промежутке времени, когда мутациями и миграциями фамилий можно пренебречь*). Пусть p_i обозначает концентрацию i-й фамилии среди родоначальников. Фамильный состав популяции в следующем поколении моделируется как состав случайной выборки с возвращением из фамилий родителей. Очевидно, что *вероятность выбрать i-ю фамилию из совокупности, где ее концентрация равна* p_i, *совпадает с* p_i. Изменчивость вклада родоначальников в концентрацию i-й фамилии в следующем поколении обусловлена случайностью результатов ряда биномиальных испытаний с вероятностью успеха p_i (появления потомка с i-й фамилией) и неудачи $1 - p_i$ (появления потомка с любой другой фамилией). Обозначим через x_i концентрацию i-й фамилии в следующем поколении. Напомним, что согласно свойствам биномиальных испытаний у выборки размера K будут следующие характеристики:

$$E\{x_i\} = E\{x_i|p_i\} = p_i, \\ V(x_i) \equiv E\{(x_i - E\{x_i\})^2\} = p_i(1 - p_i)\big/K, \tag{1}$$

где $E\{x_i\}$ обозначает теоретическую среднюю величину (*математическое ожидание*) для случайных значений x_i ($E\{x_i|p_i\}$ – математическое ожидание x_i при условии вероятности успеха p_i), а $V(x_i)$ – дисперсия случайной величины x_i (у нас дисперсия возможных концентраций i-й фамилии x_i в выборке, т.е. новом поколении).

Ремарка 2. Термин "*ожидаемая величина* (*математическое ожидание*)" понимается следующим образом. Пусть в одних и тех же условиях из родительской популяции многократно и независимо производятся случайные выборки одного и того же размера. У каждой выборки может быть свой фамильный состав, т.е. у нас состав популяции нового поколения, отличающийся в общем случае от состава другой выборки. Такие популяции-реплики образуют умозрительную теоретическую совокупность. Ее характеризуют среднее (ожидаемое) значение x_i (или каких-либо характеристик популяции, выражающихся через $\mathbf{x} \equiv \{x_i\}$), а также дисперсия значений x_i. Точно так же наблюдаемые результаты *случайного процесса* микроэволюции популяции при его повторении в тех же условиях не совпадут друг с другом. Здесь теоретическую совокупность образует множество возможных результатов-реплик популяции, повторя-

ющей заново микроэволюцию. Среднее значение x_i в теоретической совокупности является математическим ожиданием x_i. Ее характеристики обычно находятся математически.

Ожидаемую величину x, обозначаемую как $E\{x_i\}$, следует отличать от выборочной средней величины $\bar{x}$ (это сумма наблюдаемых величин, деленная на число наблюдений). Значение $E\{x_i\}$ является *константой* (для биномиальных испытаний она равна вероятности успеха p), а $\bar{x}$ является *случайной величиной*, варьирующей от выборки к выборке (у нас $\bar{x}$ совпадает с концентрацией фамилии, равной суммарному количеству однофамильцев с данной фамилией, деленному на размер выборки, причем дисперсия $\bar{x}$ равна $p(1-p)/K$).

Теоретически выборочные колебания концентраций x_i приводят в конце концов к такому фамильному состоянию популяции, когда она будет целиком состоять из однофамильцев (см. далее). Разумеется, данный теоретический предел не достигается в реальности, хотя бы потому, что предпосылки модели не могут строго выполняться неограниченно долго. Промежуточные стадии процесса случайного дрейфа многократно наблюдались в малых деревнях России, где резко преобладала одна или несколько фамилий. Такая ситуация описывалась не раз в художественной литературе упоминаниями типа “у нас в деревне все Смирновы”. Меня поражала картина, когда большинство жителей деревни оказываются однофамильцами. Например, при изучении популяций европейского севера России [17] встретилась деревня с 91% однофамильцев при общем числе жителей 126 человек. Для городского человека такая ситуация парадоксальна. Так, когда я учился в школе в подмосковном городе с населением порядка 45 тыс. человек, в моем классе совсем не было однофамильцев.

Результат 3. *Пусть фамильные* (*генетические*) *состояния популяции с неперекрывающимися поколениями формируются как последовательности независимых случайных выборок с возвращением* (*вложенных выборок*) *фамилий* (*аллелей*) *из фамилий* (*аллелей*) *родительского поколения. Тогда*:

1) *закономерности случайного процесса изменений фамильного состава популяции определяются ее мужской составляющей и соответствуют процессу генного дрейфа по одному аутосомному локусу с множественными аллелями* (*аналогами фамилий*) *в той же самой популяции*;

2) *хотя закономерности дрейфа фамилий такие же, как для синхронно идущего в популяции генного дрейфа, интенсивность дрейфа фамилий, фигурально говоря, вчетверо выше, чем дрейфа генов, при одинаковых фамильном и генетическом состояниях.*

Доказательство. 1. Выборочная природа колебаний фамильного состава популяции воспроизводит свойства популяционно-генетической модели случайного генного дрейфа в популяции ограниченной численности при панмиксии. Это доказывает соответствие между процессами генного дрейфа и дрейфа фамилий, закономерности которых представляют собой закономерности последовательности вложенных выборок.

2. Как показано выше, в одной и той же популяции процесс генного дрейфа соответствует последовательности вложенных выборок в 4 раза большего размера (численности гамет), чем выборок в процессе дрейфа фамилий (численности мужчин). Тем самым интенсивность дрейфа фамилий, если измерять ее дисперсией возможных концентраций фамилии (аллеля) в выборке, будет вчетверо больше, чем для дрейфа генов при одинаковых фамильном и генетическом состояниях. ◄

Для вычисления математических ожиданий полезна следующая *формула полного математического ожидания* какой-либо числовой характеристики X:

$$E(X) = E\{E\{X|A\}\} = \sum E\{X|A_i\}Pr(A_i). \qquad (2)$$

Здесь A – объединение событий $\{A_i\}$, представляющих собой *полную систему* несовместимых случайных событий, реализующихся с вероятностями $\{Pr(A_i)\}$ и таких, что обязательно происходит одно из событий системы; $E\{X|A_i\}$ обозначает условное (условие пишем после вертикальной черты) математическое ожидание для X при условии реализации соответствующего случайного события A_i. Например, в искусственной ситуации, когда полная система состоит из городских и сельских жителей, средний рост населения $E\{рост\}$ равен $E\{рост|житель\ города\} \cdot Pr(житель\ города) + E\{рост|житель\ села\} \cdot Pr(житель\ села)$.

Результат 4. *Пусть в популяции с неперекрывающимися поколениями при заключении браков жена получает фамилию мужа. Положим, что фамилии наследуются патрилинейно, равноценны* (*нейтральны*) *в отношении их передачи потомкам, у каждого из которых с равной вероятностью отцом может быть любой из родительского поколения, а мутациями и миграциями фамилий можно пренебречь. Тогда*:

1) *в любом поколении* (*времени*) *вероятность случайно встретить индивидуума с i-й фамилией в наугад выбранной популяции из теоретической совокупности равна ее концентрации* p_i *в родоначальной популяции,* $i = 1, 2, \ldots$;

2) *в предположении, что с течением времени в конкретной популяции останутся только однофа-*

мильцы, вероятность фиксации i-й фамилии равна ее концентрации p_i среди родоначальников.

Доказательство. Разумеется, в конкретной популяции концентрация фамилии (вероятность встречи в ней индивидуума с данной фамилией) варьирует по поколениям, а постоянно лишь ее ожидаемое значение на возможных траекториях динамики. Динамика фамильного состава начинается с формирования первого поколения, состав которого соответствует результату независимых испытаний, в каждом из которых потомок с i-й фамилией появляется с вероятностью p_i (вероятностью успеха), равной концентрации данной фамилии среди родоначальников. Пусть x_i обозначает концентрацию i-й фамилии в новом поколении. Согласно свойствам биномиальных испытаний (1) среднее (ожидаемое) значение для доли успехов $E\{x_i\}$ в испытаниях равно вероятности успеха, т.е. у нас среди популяций-реплик ожидаемое значение концентрации i-й фамилии в новом поколении равно p_i. Значит у концентраций и фамилий нет определенного тренда в отклонениях от своих начальных значений.

Возможные реализации биномиальных испытаний можно интерпретировать как мыслимые (теоретически возможные) фамильные составы популяций-реплик, фамильное разнообразие которых получено в результате повторных случайных выборок из той же самой родительской популяции. Тогда $E\{x_i\}$ имеет смысл ожидаемой для популяций-реплик концентрации i-й фамилии и является функцией начального состояния $x_i(0) = p_i$: $E\{x_i(1)\} = E\{x_i(1)|x_i(0) = p_i\} = p_i$.

1. Очевидно, в поколении τ значение концентрации i-й фамилии в популяции является случайной величиной. В следующем поколении $\tau + 1$ при условии $x_i(\tau)$ для распределения очередного значения концентрации $x_i(\tau + 1)$ имеем $E\{x_i(\tau + 1)|x_i(\tau)\} = x_i(\tau)$ согласно свойствам (1) биномиальных испытаний. По формуле полного математического ожидания (2)

$$E\{x_i(\tau+1)\} = E\{E\{x_i(\tau+1|x_i(\tau))\}\} = E\{x_i(\tau)\},$$
$$E\{x_i(\tau)\} = E\{x_i(\tau-1)\} = \ldots = x_i(0) \equiv p_i.$$

2. Найдем вероятность фиксации i-й фамилии в предположении случайной утери со временем всех фамилий, кроме одной (см. далее). Поскольку $E(x_i(\tau)) = p_i$ в любом поколении, это равенство выполняется и когда в популяции осталась только одна из фамилий. Например, пусть i-я фамилия фиксировалась с неизвестной вероятностью U_i (тогда ее концентрация x_i в популяции равна единице) и утерялась с вероятностью $1 - U_i$ (тогда ее концентрация равна нулю). Отсюда согласно (2)

$$p_i = E\{x_i\} = E\{x_i|\textit{фиксация}\}U_i + E\{x_i|\textit{утеря}\}(1 - U_i) = 1U_i + 0(1 - U_i) = U_i. \blacktriangleleft$$

ОПИСАНИЕ ДИВЕРГЕНЦИИ ФАМИЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ ПОДРАЗДЕЛЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Напомним известные из биометрии свойства дисперсии случайных величин. Для любой случайной величины (например, для x с дисперсией $V(x)$) имеем

$$V(x) \equiv E\{(x - E\{x\})^2\} = E\{x^2\} - (E\{x\})^2,$$
$$E\{x^2\} = (E\{x\})^2 + V(x). \quad (3)$$

Перед анализом фамильной структуры обратимся к использованию концепции *идентичности по происхождению* (ИПП) *гомологичных генов* (т.е. точных копий гена некоторого общего предка) применительно к определению коэффициента инбридинга. *Коэффициентом инбридинга индивидуума $f \geq 0$ называется вероятность ИПП его гомологичных генов*. Понятно, что согласно данному определению коэффициент инбридинга f является случайной величиной, принимающей (как вероятность) значения от 0 до 1 и варьирующей от индивидуума к индивидууму. *Коэффициентом инбридинга популяции $F \geq 0$ называется ожидаемый коэффициент инбридинга у случайно выбранного из популяции индивидуума* ($F \equiv E\{f\} \geq 0$).

В инбредной популяции с концентрациями $\{p_i\}$ аллелей аутосомного локуса концентрации $\{p_{ii}\}$ гомозиготных генотипов имеют вид (см., например, [18]):

$$p_{ii}(F) = Fp_i + (1 - F)p_i^2 = p_i^2 + Fp_i(1 - p_i) \geq p_i^2,$$
$$i = 1, 2, \ldots k; \quad 1 \geq p_i, \quad F \geq 0.$$

Соответственно концентрация $\sum p_{ii}(F)$ всех гомозигот находится как

$$\sum p_{ii}(F) = \sum (Fp_i + (1 - F)p_i^2) = \sum p_i^2 + \sum Fp_i(1 - p_i) \geq \sum p_i^2.$$

Концентрацией $H(\mathbf{p}, F) \equiv 1 - \sum p_{ii}(F)$ всех гетерозигот будет

$$H(\mathbf{p}, F) = 1 - \sum p_{ii}(F) =$$
$$= 1 - \left(\sum p_i^2 + F\sum p_i(1 - p_i)\right) =$$
$$= 1 - \sum p_i^2 - F\left(\sum p_i - \sum p_i^2\right) = \left(1 - \sum p_i^2\right) -$$
$$- F\left(1 - \sum p_i^2\right) = (1 - F)\left(1 - \sum p_i^2\right) \equiv$$
$$\equiv (1 - F)H(\mathbf{p}, 0) \le H(\mathbf{p}, 0).$$

Таким образом, инбридинг проявляется в уменьшении концентрации гетерозигот и увеличении гомозиготности по сравнению со значениями, соответствующими соотношениям Харди–Вайнберга.

Коэффициент инбридинга можно выразить через дисперсии концентраций аллелей в популяциях-репликах или дисперсии по субпопуляциям в подразделенной популяции (см. далее).

Проиллюстрируем картину дивергенции фамилий в статике (в некоторый фиксированный момент) на примере умозрительного или реального множества из нескольких субпопуляций со своими фамильными составами из k фамилий. Такое множество часто называют *подразделенной популяцией*. Ее субпопуляции составляют теоретическую или реальную обследованную совокупность. Обозначим концентрации фамилий по всем субпопуляциям через $\mathbf{x}_i \equiv \left\{x_i^{(j)}\right\}$. Здесь верхний индекс у $x_i^{(j)}$ дает номер субпопуляции, а нижний – номер фамилии.

Положим, что у распределения концентрации i-й фамилии x_i по субпопуляциям среднее значение равно p_i, а дисперсия – $Vs(x_i)$. Статическую картину дивергенции фамильного состава в данном множестве субпопуляций будем описывать с помощью дисперсий $\{Vs(x_i)\}$ и вероятностей $\{Hs_i(\mathbf{x})\}$ встреч двух индивидуумов с i-й фамилией и с какой-либо другой, а также с использованием вероятности $Hs(\mathbf{x})$ случайной встречи двух индивидуумов с разными фамилиями. Повторим, что аналогом для $Hs_i(\mathbf{x})$ в популяционной генетике является концентрация гетерозигот с i-м аллелем, а для $Hs(\mathbf{x})$ – концентрация всех гетерозигот.

Сделаем небольшое отступление, касающееся смысла Hs и H. Hs является теоретической концепцией, относящейся к случайному событию (наблюдению разных фамилий у пары индивидуумов), которое могло произойти или нет, тогда как H относится к наблюдениям фактически реализовавшихся событий (и находится подсчетом гетерозигот). Вероятность Hs можно понимать двояко. С одной стороны, эту вероятность можно определить с учетом порядка фамилий как $x_i(1 - x_i)$, где x_i – концентрация i-й фамилии *во всей* совокупности популяций как едином целом. С другой стороны, ее можно понимать как вероятность случайно выбрать одну из (различающихся) популяций совокупности, скажем с концентрацией x_i, затем вычислить в ней значение $E\{Hs_i|\mathbf{x}\} = x_i(1 - x_i)$ согласно закону Харди–Вайнберга, а уже потом найти итоговую вероятность результата извлечений с учетом всевозможных выборов популяции по формуле (2) полного математического ожидания $E\{Hs_i\} = E\{E\{Hs_i|\mathbf{x}\}\}$.

Например, если представить себе, что у всех субпопуляций одна и та же независимая микроэволюционная история после отделения от общего корня, то состояние j-й субпопуляции соответствует состоянию на j-й из возможных траекторий динамики, играющих роль популяций-реплик. В фиксированный момент времени имеем как бы срез траекторий, и $E\{E\{Hs_i|\mathbf{x}\}\}$ дает ожидаемое значение Hs_i на траекториях в данный момент. В простейшем случае M субпопуляций и равновероятного выбора любой из них значение $E\{E\{Hs_i|\mathbf{x}\}\} = E\{x_i^{(j)}(1 - x_i^{(j)})\}$ находится как $\sum_{j=1}^{M} x_i^{(j)}\left(1 - x_i^{(j)}\right)/M$. Далее вероятности $Hs(\mathbf{x})$ и $Hs_i(\mathbf{x})$ случайных встреч двух индивидуумов с разными фамилиями, например Hs_i, определим как $E\{E\{Hs_i|\mathbf{x}\}\}$ и будем для этого использовать более прозрачное обозначение $E\{Hs_i(\mathbf{x})\}$.

Стимулом для предлагаемой формы записи, приложимой также к широко распространенному обозначению H для концентрации гетерозигот по аутосомному локусу в генетике популяций, служит многозначность данного символа. Так, в популяционной генетике H может относиться к концентрации гетерозигот в одной свободно скрещивающейся популяции, в подразделенной популяции, состоящей из таких субъединиц, наконец и в умозрительной совокупности популяций с возможными генетическими состояниями.

Теоретически выводимые свойства статики умозрительной совокупности популяций сходны со свойствами реально существующих подразделенных популяций, состоящих из отдельных свободно скрещивающихся единиц. При первоначальном знакомстве с генетикой популяций мне потребовались усилия, чтобы разобраться можно ли теоретическую формулу $H = 2p_i(1 - p_i)(1 - F)$ для концентрации гетерозигот в популяции со свободным скрещиванием при накопленной инбредности прилагать к одной реальной популяции. Ведь в последней согласно закону Харди–Вайнберга $H = 2p_i(1 - p_i)$. Суть противоречия в том, что в первом случае H фактически подразумевает $E\{H\}$, т.е. ха-

рактеристику распределения H по субпопуляциям, а не свойство одной из них.

В приведенных рассуждениях вероятности $Hs_i(\mathbf{x})$, $Hs(\mathbf{x})$ и $H_i(\mathbf{x})$, $H(\mathbf{x})$ рассматривались как случайные величины. Хотя в реальной подразделенной популяции состояния субпопуляций фиксированы, случайность вносит процедура выбора субпопуляций, например при вычислении математического ожидания, и можно говорить о вероятности $Hs_i(\mathbf{x})$ случайной встречи двух потомков разных родоначальников (с i-й фамилией и какой-либо иной). Вернемся к описанию фамильной дивергенции в заданном множестве субпопуляций с использованием вероятностного подхода. По формуле полного математического ожидания (2)

$$E\{Hs_i\} = E\{E\{Hs_i|\mathbf{x}\}\}, \quad E\{Hs_i|\mathbf{x}\} = x_i(1 - x_i),$$

где $E\{Hs_i|\mathbf{x}\}$ – условное математическое ожидание Hs_i. При условии концентрации x_i у i-й фамилии в популяции с учетом порядка фамилий в паре значение вероятности $Hs_i(\mathbf{x})$ находится однозначно как $x_i(1 - x_i)$ аналогично использованию закона Харди–Вайнберга в популяционной генетике. Отсюда согласно (3)

$$\begin{gathered}E\{Hs_i(\mathbf{x})\} = E\{E\{Hs_i|x_i\}\} = E\{x_i(1 - x_i)\} = \\ = E\{x_i\} - E\{x_i^2\} = p_i - p_i^2 - Vs(x_i) = \\ = p_i(1 - p_i)(1 - Vs(\mathbf{x}_i)/p_i(1 - p_i)) \equiv \\ \equiv p_i(1 - p_i)(1 - Fs), \\ Fs \equiv Vs(x_i)/p_i(1 - p_i),\end{gathered}$$

где Fs – фамильный аналог F. Когда концентрация i-й фамилии в j-й популяции равна $x_i^{(j)}$, то для нее рассматриваемая вероятность Hs_i равна $x_i^{(j)}(1 - x_i^{(j)})$. В то же время выбор популяции является случайным, и $Hs_i(\mathbf{x})$ находится с учетом выборов всевозможных популяций как $E\{x_i^{(j)}(1 - x_i^{(j)})\}$. Чтобы подчеркнуть, что подразумевается вычисление ожидаемого значения при случайном выборе популяции (при изменчивости по верхнему индексу, номеру популяции) этот индекс припишем к символу математического ожидания E как E_j.

Замечание 5. *Пусть дана совокупность субпопуляций с концентрациями фамилий* $\left\{x_i^{(j)}\right\}$, *где* i – *номер фамилии, а* j – *номер субпопуляции. Обозначим вектор средних концентраций фамилий для распределений концентраций по субпопуляциям во всей совокупности через* $\mathbf{p} = \{p_i\}$, *а вектор дисперсий как* $\{Vs(x_i)\}$.

Тогда в наугад выбранной субпопуляции вероятность случайной встречи пары индивидуумов с i-*й фамилией и с какой-либо другой* $E_j\{Hs_i(\mathbf{x})\}$, *вероятность встречи двух индивидуумов с любыми разными фамилиями* $E_j\{Hs(\mathbf{x})\}$, *вероятность встречи пары однофамильцев с* i-*й фамилией* $E_j\{\left(x_i^{(j)}\right)^2\}$ *и вероятность встречи пары однофамильцев независимо от их фамилий* $1 - E_j\{Hs(\mathbf{x})\}$ *выражаются как*

$$\begin{gathered}E_j\{Hs_i(\mathbf{x})\} = p_i(1 - p_i) - Vs(x_i) \le p_i(1 - p_i), \\ E_j\{Hs(\mathbf{x})\} = Hs(\mathbf{p}) - Vs(\mathbf{x}) \le Hs(\mathbf{p}),\end{gathered}$$

$$\begin{gathered}E_j\left\{\left(x_i^{(j)}\right)^2\right\} = p_i^2 + Vs(x_i) \ge p_i^2, \\ 1 - E_j\{Hs(\mathbf{x})\} = E_j\left\{\sum_{i=1}^{k}(x_i^{(j)})^2\right\} = \\ = \sum_{i=1}^{k} p_i^2 + Vs(\mathbf{x}) \ge \sum_{i=1}^{k} p_i^2.\end{gathered}$$

Здесь $Vs(\mathbf{x}) \equiv \sum_{i=1}^{k} Vs(x_i)$, *индекс* j *у* E_j *означает усреднение по субпопуляциям.*

Доказательство. По условию $E_j\{x_i^{(j)}\} = p_i$. Согласно (3)

$$\begin{gathered}E_j\{Hs_i(\mathbf{x})\} \equiv E_j\left\{x_i^{(j)}(1 - x_i^{(j)})\right\} = \\ = E_j\left\{x_i^{(j)}\right\} - E_j\left\{(x_i^{(j)})^2\right\} = \\ p_i - \left(Vs(x_i) + E_j\left\{(x_i^{(j)})^2\right\}\right) = \\ = p_i - Vs(x_i) - p_i^2 = p_i(1 - p_i) - Vs(x_i) \le p_i(1 - p_i) \\ \text{или } Vs(x_i) = p_i(1 - p_i) - E_j\left\{x_i^{(j)}(1 - x_i^{(j)})\right\}.\end{gathered}$$

Отсюда видно, что ожидаемая вероятность $Hs_i(\mathbf{x})$ встречи двух потомков разных родоначальников (с i-й фамилией и какой-либо другой) меньше соответствующего случайным встречам значения $p_i(1 - p_i)$ на величину межпопуляционной дисперсии $Vs(x_i)$ – аналог формулы Валунда для подразделенной популяции в популяционной генетике – см., например, [18, 19].

В *фиксированной* субпопуляции, скажем с номером j, вероятность встречи однофамильцев с i-й фамилией теоретически равна $\left(x_i^{(j)}\right)^2$, а в *случайно выбранной* как ожидаемое значение этой вероятности при всевозможных результатах выбора:

$$\begin{gathered}E_j\left\{(x_i^{(j)})^2\right\} = \left(E_j\left\{x_i^{(j)}\right\}\right)^2 + \\ + Vs(x_i) = p_j^2 + Vs(x_i) \ge p_i^2, \quad i = 1, 2, \ldots k,\end{gathered}$$

$$\begin{gathered}E_j\left\{\sum_{i=1}^{k}(x_i^{(j)})^2\right\} = \sum_{i=1}^{k} p_i^2 + Vs(\mathbf{x}) \ge \sum_{i=1}^{k} p_i^2, \\ Vs(\mathbf{x}) \equiv \sum_{i=1}^{k} Vs(x_i).\end{gathered}$$

Вероятность встречи двух индивидуумов с разными фамилиями равна дополнению до единицы вероятности встречи однофамильцев. Пусть $\mathbf{x}$ обозначает вектор концентраций всех фамилий во всех популяциях. Тогда вероятностью $Hs(\mathbf{x})$ случайной встречи в одной популяции двух индивидуумов с разными фамилиями с учетом формулы (3) будет

$$E_j\{Hs(\mathbf{x})\} \equiv 1 - E_j\left\{\sum_{i=1}^{k}(x_i^{(j)})^2\right\} =$$
$$= 1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2 - \sum_{i=1}^{k} Vs(x_i) =$$
$$= 1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2 - Vs(\mathbf{x}) = Hs(\mathbf{p}) - Vs(\mathbf{x}) \le Hs(\mathbf{p}). \blacktriangleleft$$

Здесь $E_j\{Hs(\mathbf{x})\}$ и $Vs(\mathbf{x})$ дают представление о картине дивергенции субпопуляций внутри всей реальной или умозрительной совокупности. В подразделенной популяции (или в умозрительной совокупности популяций-реплик) вероятность $E_j\{Hs_i(\mathbf{x})\}$ встречи индивидуумов с i-й фамилией и с какой-то другой меньше соответствующего случайным встречам значения $p_i(1 - p_i)$ на величину межпопуляционной дисперсии $Vs(x_i)$. Одновременно вероятность $E_j\{Hs(\mathbf{x})\}$ встречи потомков разных родоначальников *с учетом всех фамилий* меньше значения $1 - \sum_i p_i^2 = Hs(\mathbf{p})$, соответствующего случайным встречам, на величину $Vs(\mathbf{x})$. В то же время вероятность случайно встретить своего однофамильца с i-й фамилией, напротив, больше значения p_i^2, соответствующего случайным встречам во всем множестве как единой популяции, на величину межпопуляционной дисперсии $Vs(x_i)$.

ДИВЕРГЕНЦИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ И КОЭФФИЦИЕНТ ИНБРИДИНГА

Приведенные факты соответствуют эффектам инбридинга в генетике популяций. В генетическом контексте роль фамилий играют аллели, роль пар с разными фамилиями – гетерозиготы. При концентрации x_i у i-го аллеля по формуле С. Райта (см., например, [14, 18]) в инбредной популяции ожидаемой долей гетерозигот $E\{x_i(1 - x_i)\}$ будет $p_i(1 - p_i) \times (1 - F)$, где F – коэффициент инбридинга. Для фамилий $E\{x_i(1 - x_i)\}$ можно записать, как показано выше, в терминах $\left\{x_i^{(j)}\right\}$ в виде

$$E_j\left\{x_i^{(j)}\left(1 - x_i^{(j)}\right)\right\} =$$
$$= p_i(1 - p_i)(1 - Vs(x_i)/(p_i(1 - p_i)) \equiv$$
$$\equiv p_i(1 - p_i)(1 - Fs).$$

Здесь видны параллели с дефицитом гетерозигот (нарушением закона Харди–Вайнберга) в популяционной генетике, а $Fs \equiv Vs(x_i)/p_i(1 - p_i)$ является фамильным аналогом случайного коэффициента инбридинга F. Таким образом,

$$Fs \equiv Vs(x_i)/p_i(1 - p_i), \quad Vs(x_i) = p_i(1 - p_i)Fs.$$

Отсюда

$$Vs(\mathbf{x}) \equiv \sum_i Vs(x_i) =$$
$$= \left(\sum_i p_i(1 - p_i)\right)Fs = \left(1 - \sum_i p_i^2\right)Fs = Hs(\mathbf{p})Fs.$$

Значит Fs можно представить как $Fs = Vs(\mathbf{x})/(1 - \sum_i p_i^2) = Vs(\mathbf{x})/Hs(\mathbf{p})$. В итоге для фамильной и популяционно-генетической структур имеем

$$Fs = Vs(\mathbf{x})\Big/\left(1 - \sum_i p_i^2\right) = Vs(\mathbf{x})/Hs(\mathbf{p}),$$
$$F = V(\mathbf{x})\Big/\left(1 - \sum_i p_i^2\right) = V(\mathbf{x})/H(\mathbf{p}), \tag{4}$$

где $V(\mathbf{x}) \equiv \sum_i V(x_i)$ – сумма дисперсий концентраций аллелей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, существует значительное сходство между фамильной и генетической структурами, обязанное соответствию фамилий множественным аллелям аутосомного локуса и общей выборочной природе процессов случайного дрейфа фамилий и генов. Закономерности случайного дрейфа проявляются как свойства популяций-реплик, составляющих умозрительную теоретическую совокупность популяций с тождественной историей дивергенции от начального состояния и между собой. В каждый момент времени состояния реплик соответствуют срезу состояний на возможных траекториях динамики популяции, иначе говоря как бы множеству состояний подразделенной популяции, состоящей из таких реплик.

Для анализа реальных подразделенных популяций можно использовать приведенные в настоящей статье формулы, которые *в равной степени приложимы как к совокупности субпопуляций с общим происхождением, так и к произвольному механическому набору случайно скрещивающихся субпопуляций*. Например, популяционно-генетический аспект анализа подразделенной популяции (состоящей из удовлетворяющих соотношениям

Харди–Вайнберга субпопуляций) показывает нарушение этих соотношений в популяции как едином целом. В подразделенной популяции будет наблюдаться дефицит гетерозигот (эффект Валунда, хотя внутри каждой отдельной субпопуляции дефицита нет).

Ситуация аналогична дефициту встреч индивидуумов с разными фамилиями по сравнению с ожидаемым при всеобщих чисто случайных встречах в популяции как едином целом. В статике дефициту соответствует коэффициент инбридинга, т.е. дивергенция субпопуляций, а динамика генотипической структуры подразделенной популяции рассматривалась, например, в [20]. Свойства генетических процессов в подразделенных популяциях анализировались также в [21] и [22].

Обратим внимание, что интерпретация коэффициента инбридинга зависит от характера субпопуляций в подразделенной популяции. В общем случае коэффициент инбридинга F в (4) численно равен статистической корреляции между гомологичными генами объединяющихся гамет как для произвольной механической смеси случайно скрещивающихся субпопуляций, так и для совокупности субпопуляций с общим происхождением. *Получение оценки F не позволяет определить с какой ситуацией имеет дело исследователь.*

Лишь в случае общего происхождения коэффициент инбридинга свидетельствует об идентичных по происхождению генах у субпопуляций, а статистическая корреляция связана с вероятностью идентичности по происхождению пары аллелей, образующих генотип индивидуума по рассматриваемому локусу. В общем случае динамика родственных популяций не будет независимой, и процедура оценивания коэффициента инбридинга должна учитывать характер их происхождения и условия микроэволюции.

Подчеркнем, что в любом случае существование корреляции между гомологичными генами объединяющихся гамет влияет на концентрации генотипов и тем самым определяет, например, ответную реакцию генетической структуры на действие отбора.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бужилова А.П.* География русских фамилий // Восточные славяне. Антропология и этническая история. М.: Научный мир, 1999. С. 135–152.
2. *Балановская Е.В., Романов А.Г., Балановский О.П.* Однофамильцы или родственники. Подходы к изучению связи между гаплогруппами Y-хромосомы и фамилиями // Мол. биология. 2011. Т. 45. № 3. С. 473–485.
3. *Crow J.F., Mange A.P.* Measurement of inbreeding from the frequency of marriages between persons of the same surname // Soc. Biology. 1982. V. 29. № 1/2. P. 101–105.
4. *Lasker W.G.* Surnames and Genetic Structure. Cambridge: Cambr. University Press, 1985. 2005. 148 p.
5. *Ревазов А.А., Парадеева Г.М., Русакова Г.И.* Пригодность русских фамилий в качестве квазигенетического маркера // Генетика. 1986. Т. 22. № 4. С. 699–703.
6. *Tarskaia L., El'chinova G., Scapoli C. et al.* Surnames in Siberia: A study of the population of Yakutia through isonymy // Am. J. Phys. Anthropol. 2009. V. 138. P. 190–198.
7. *Сорокина И.Н., Чурносов М.И., Балтуцкая И.В. и др.* Антропогенетическое изучение населения центральной России. М.: Изд-во РАМН, 2014. 336 с.
8. *Сорокина И.Н., Рудых Н.А., Крикун Е.Н., Сокорев С.Н.* Применение фамилий в популяционно-генетических исследованиях (на примере зарубежных популяций) // Научные ведомости. БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. 2016. № 19(240). Вып. 35. С. 5–10.
9. *Rogers A.R.* Doubts about isonymy // Hum. Biol. 1991. V. 63. № 5. P. 663–668.
10. *Yasuda N., Cavalli-Sforza L.L., Skolnick M., Moroni A.* Evolution of surnames: An analysis of their distribution and extinction // Theor. Popul. Biol. 1974. V. 5. № 1. P. 123–142. https://doi.org/10.1016/ 0040-5809(74)90054-9
11. *Rossi P.* Self-similarity in population dynamics: surname distributions and genealogical trees // Entropy. 2015. V. 17. № 1. P. 425–437. https://doi.org/10.3390/e17010425
12. *Lasker G.W.* A coefficient of relationship by isonymy: A method for estimating the genetic relationship between populations // Hum. Biol. 1977. V. 49. № 3. P. 489–493.
13. *Malecot G.* The Mathematics of Heredity. San Francisco; California: Freeman and Company, 1969. 88 p.
14. *Crow J.F., Kimura M.* An Introduction to Population Genetics Theory. The Blackburn Press, 2009. 591 p.
15. *Гинтер Е.К., Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И. и др.* Роль факторов популяционной динамики в распространении наследственной патологии в российских популяциях // Мед. генетика. 2004. Т. 3. № 12. С. 548–555.
16. *Малютов М.Б., Пасеков В.П.* Об одной статистической задаче популяционной генетики // Теория вероятностей и ее применения. 1971. Т. 16. Вып. 3. С. 579–581.
17. *Пасеков В.П., Ревазов А.А.* К популяционной генетике населения европейского севера СССР. I. Данные по структуре шести деревень Архангельской области // Генетика. 1975. Т. 11. № 7. С. 145–155.
18. *Ли Ч.* Введение в популяционную генетику. М.: Мир, 1978. 555 с.

19. *Вейр Б.* Анализ генетических данных: дискретные генетические признаки. М.: Мир, 1995. 400 с.
20. *Пасеков В.П.* Влияние генного дрейфа на динамику генетической и фенотипической изменчивости в подразделенных популяциях // Матем. модели в экологии и генетике. М.: Наука, 1981. С. 148–173.
21. *Maruyama T.* Stochastic Problems in Population Genetics // Lecture Notes in Biomathematics. Berlin, N.Y.: Springer, 1977. V. 17. 245 p.
22. *Свирежев Ю.М., Пасеков В.П.* Основы математической генетики. М.: Наука, 1982. 511 с.

To Analysis of Random Processes of Isonymy. I. Isonymic Structure

V. P. Passekov*

Dorodnicyn Computing Centre, Federal Research Center "Computer Science and Control" of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

**e-mail: pass40@mail.ru*

The regularities of random dynamics of the surname composition in a population of limited size are analyzed. Population is approximately considered in discrete time with non-overlapping generations. Patrilinear surname inheritance is assumed. At a relatively small time interval $t/NE(t)$ where $NE(t)$ is an average harmonic effective population size over t generations, systematic pressures can be neglected. The surname composition of the next generation is a random sample of the size $Ne(\tau)/2$ from the surnames of the male component of the parent population, where $Ne(\tau)$ is effective size in the generation τ. As a result, surname microevolution is approximately considered to be an analogue of the process of random genetic drift which simultaneously proceeds in the same population with four times less intensity than for surnames. The role of homozygote concentrations in the analysis of surname structure is played by the probability of a random encounter of an individual with a namesake, heterozygote concentrations correspond to the probability of encounter of individuals with different surnames. The results do not suggest surname monophilia and refer to a speculative theoretical set of replica populations, as if having repeated the microevolutionary history of the population in question under the same conditions. The concept of a surname analogue of the inbreeding coefficient has been introduced. It is almost four times the traditional S. Wright's inbreeding coefficient. Estimating the inbreeding coefficient of real subdivided populations gives the statistical correlation of homologous genes of uniting gametes and does not differentiate situations of a mechanical mixture of subpopulations or their common origin. Only when the microevolution of real subpopulations with a common root is independent, the inbreeding coefficient is directly related to the identity of genes by descent.

Keywords: theoretical population genetics, populations with non-overlapping generations, inbreeding coefficient, random drift of surnames, random genetic drift, mathematical models.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1205–1210

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.22(470.67:479.25:477.75)

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ДРЕВОВИДНЫХ МОЖЖЕВЕЛЬНИКОВ СЕКЦИИ SABINA: ДАННЫЕ ИЗ ДАГЕСТАНА, АРМЕНИИ И КРЫМА

© 2021 г. Г. А. Садыкова[1], Е. В. Хантемирова[2], М. А. Полежаева[2, *], Х. У. Алиев[1]

[1]*Горный ботанический сад – обособленное подразделение Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Махачкала, 367000 Россия*

[2]*Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия*

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

Поступила в редакцию 03.11.2020 г.
После доработки 04.12.2020 г.
Принята к публикации 23.12.2020 г.

Проведен анализ изменчивости межгенных спейсеров *pet*N–*psb*M, *trn*D–*trn*T, *trn*L–*trn*F и *trn*S–*trn*G хлоропластной ДНК у охраняемых близкородственных видов можжевельников *Juniperus excelsa*, *J. polycarpos* и *J. foetidissima* на территории Кавказа и Крыма – северных пределах своего распространения. Анализ молекулярной дисперсии показал высокую степень дифференциации трех таксонов ($G_{CT} = 0.9905$, $P < 0.0001$). Всего выявлено семь гаплотипов. Высоким генетическим разнообразием характеризуется популяция *J. foetidissima* из Армении ($H = 0.442$), меньшим – *J. excelsa* ($H = 0.200$); популяции *J. polycarpos* оказались мономорфными. Изученные образцы, совместно с включенными в анализ образцами из Генбанка с основной части ареала, сформировали три клады, соответствующие трем таксонам с высокой статистической поддержкой.

Ключевые слова: *pet*N–*psb*M, *trn*D–*trn*T, *trn*L–*trn*F и *trn*S–*trn*G, популяционная структура, генетическая изменчивость.

DOI: 10.31857/S0016675821100106

Таксономическая идентификация вида сводится к его комплексной оценке по морфологии, анатомии, биологии развития, географии, экологии и др. признакам, на которых основывается фенотипическая систематика. В свою очередь дополнением к классической феносистематике служат данные геносистематики, позволяющие прояснить и упорядочить таксономическую структуру близкородственных видов.

Объекты исследования – можжевельник многоплодный *Juniperus polycarpos* C. Koch, можжевельник высокий *J. excelsa* Bieb. и можжевельник вонючий *J. foetidissima* Willd – виды со схожей морфологией, представители секции Sabina. Это редкие и охраняемые виды, реликты, занесенные в Красную книгу России [1] или региональные Красные книги [2–4]. Область их распространения – Черноморское побережье Кавказа (от Анапы до Геленджика), Крым, Дагестан; за пределами России встречаются на Балканах, в Юго-Западной Азии (Иран, Афганистан, Турция, Сирия, Ливан, Ирак).

Исследуемые виды – древовидные можжевельники, образующие разреженные леса и редколесья. Можжевеловые редколесья Кавказа и Крыма подразделяются на два географических варианта. Первый – восточносредиземноморский, распространен на Черноморском побережье Кавказа (в р-не г. Новороссийск) и в Южном Крыму и образован мезоксерофитами *J. excelsa* и *J. foetidissima*. Второй – западноиранский, распространен в Восточном и Южном Закавказье (Армения, Азербайджан) и в Дагестане; образован ксерофитом *J. polycarpos* [5]. Оба типа редколесий представляют собой уникальные растительные сообщества арчовников, включающие много редких и охраняемых видов, и, таким образом, выполняют важную экологическую функцию [6, 7].

В широком понимании *J. excelsa* s.l. включает *J. polycarpos* и *J. excelsa*, а также распространенные в Средней Азии *J. seravschanica* Kom и *J. turcomanica* B. Fedtsch., образуя комплекс морфологически сходных таксонов. Таксономический статус этих видов менялся неоднократно [8], но и сегодня систематическое положение *J. polycarpos* и *J. excelsa*, произрастающих на Кавказе, остается спорным. Так, например в “Конспекте флоры Кавказа” [9] *J. polycarpos* приводится в ранге подвида (*J. excelsa*

Таблица 1. Географические координаты мест сбора и показатели генетического разнообразия хпДНК в изученных выборках можжевельника

Популяции	Координаты, с.ш./в.д.	N	N_h	H
1. *J. excelsa* – Крым, Судак	44°52′/34°55′	7	h6:7	0
2. *J. excelsa* – Краснодарский край, Геленджик	44°39′/37°56′	10	h6:(9); h7:(1)	0.200
3. *J. polycarpos* – Дагестан, Талгинское ущелье	42°52′/47°24′	5	h5:(5)	0
4. *J. polycarpos* – Дагестан, Анцух	42°20′/46°27′	5	h5:(5)	0
5. *J. polycarpos* – Армения, Вайк	39°41′27″/45°32′31″	5	h5:5	0
6. *J. foetidissima* – Армения, Овк	40°47′/45°03′	16	h1:(12); h2:(1); h3:(1); h4:(2)	0.442

Примечание. N – размер выборки, N_h – число гаплотипов, H – показатель гаплотипического разнообразия.

subsp. *polycarpos*), но многими авторами рассматривается в качестве самостоятельного вида [10–13]. Видовой статус *J. foetidissima* не считается спорным, однако схожая экологическая приуроченность и совместное произрастание с *J. polycarpos* или *J. excelsa* (например в Краснодарском крае и Армении) часто затрудняет его видовую идентификацию по морфологическим признакам.

Молекулярно-генетические исследования всех трех видов и близкородственных им представлены в многочисленных работах [13–18] и наиболее подробно проанализированы в монографической сводке по роду *Juniperus* [19]. Анализ распространения видов проведен для территории Турции, Ливана, Греции, Болгарии, Азербайджана, Армении, Ирана, за рамками данных исследований оказались территории Западного и Восточного Кавказа (Краснодарский край, Дагестан), Крыма и Закавказья [12].

В настоящей работе проведена оценка параметров генетического разнообразия и структуры природных популяций *J. excelsa, J. polycarpos* и *J. foetidissima* на северных территориях (пределах) распространения, выявлены генетические связи с представителями из основной части ареала с использованием межгенных спейсеров хлоропластной ДНК (**хпДНК**). Данные о генетической изменчивости и уточнении таксономии этих видов дополнят информацию о видообразовании в секции Sabina, а также будут актуальны при разработке природоохранных мер.

Всего проанализировано 48 образцов можжевельника из шести природных популяций. *J. excelsa* – 17 особей, *J. polycarpos*– 15 особей, *J. foetidissima* – 16 (табл. 1). Тотальную ДНК выделяли CTAB-методом [20] из высушенных в силикагеле листьев. Амплификацию некодирующих регионов *pet*N–*psb*M, *trn*D–*trn*T, *trn*L–*trn*F и *trn*S–*trn*G проводили с использованием универсальных праймеров, температурных режимов и протоколов, рекомендованных для этих регионов в работе F. Hojjati с соавт. [13]. Нуклеотидные последовательности регионов хпДНК определяли на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, USA); выравнивание и объединение в единую матрицу проводили в программе BioEdit [21]. Расчет числа гаплотипов (***N*_h**), показателя гаплотипического разнообразия (***H***), уровней дифференциации и распределения генетической изменчивости внутри и между популяциями (анализ молекулярной дисперсии, AMOVA) проводили в программе Arlequin v. 3.5.1.2 [22]. Дерево отношений гаплотипов хпДНК построено в программе Network v. 4.6.1.2 [23]. Филогенетическое дерево для всех образцов построено с использованием байесовского анализа в программе MrBayes v. 3.1.2 [24] на основе модели нуклеотидных замен GTR + G + + I. Каждая мутация (мононуклеотидная замена или индел, независимо от размера), кодировалось как единичное мутационное событие. Для построения деревьев включены данные из Генбанка по образцам из основной части ареала. Эти дополнительные образцы выбраны из работы F. Hojjati с соавт. [13]. Для *J. polycarpos* образцы под номерами 8761, 14162, 14164, 14166, 14167, 141171; для *J. excelsa* – 8785, 8786, 9433, 13720, 13721, 14155, 14742; для *J. foetidissima* – 73845, 5645, 5646, 17035, 20431. Гаплотипы образцов составлены по последовательностям соответствующих фрагментов, взятых из Генбанка (по номерам, указанным в работе [13]). В качестве внешней группы выбран *Juniperus sabina* образец 14316 из Азербайджана [13], относящийся к той же секции Sabina (Mill.) Spach.

Длина объединенной последовательности по четырем фрагментам составила 2916 пн (*trn*D–*trn*T: 679 пн, *trn*S–*trn*G: 690 пн, *trn*L–*trn*F: 712 пн, *pet*N–*psb*M: 835 пн). Выявлено 45 вариабельных сайтов (табл. 2), из них во фрагменте *trn*D–*trn*T – семь мононуклеотидных замен и два индела; во фрагменте *trn*S–*trn*G – шесть монокуклеотидных замен; одна динуклеотидная замена и пять инделов; во фрагменте *trn*L–*trn*F – четыре мононуклеотидных замены и три индела; во фрагменте *pet*N–*psb*M – девять мононуклеотидных замен, одна тринуклеотидная и семь инделов. Изменчивость сгруппировалась в семь гаплотипов (h1–h7).

Таблица 2. Сегрегирующие сайты для семи гаплотипов хпДНК. Референсный гаплотип h1

| Гаплотип | Позиция нуклеотида | | |

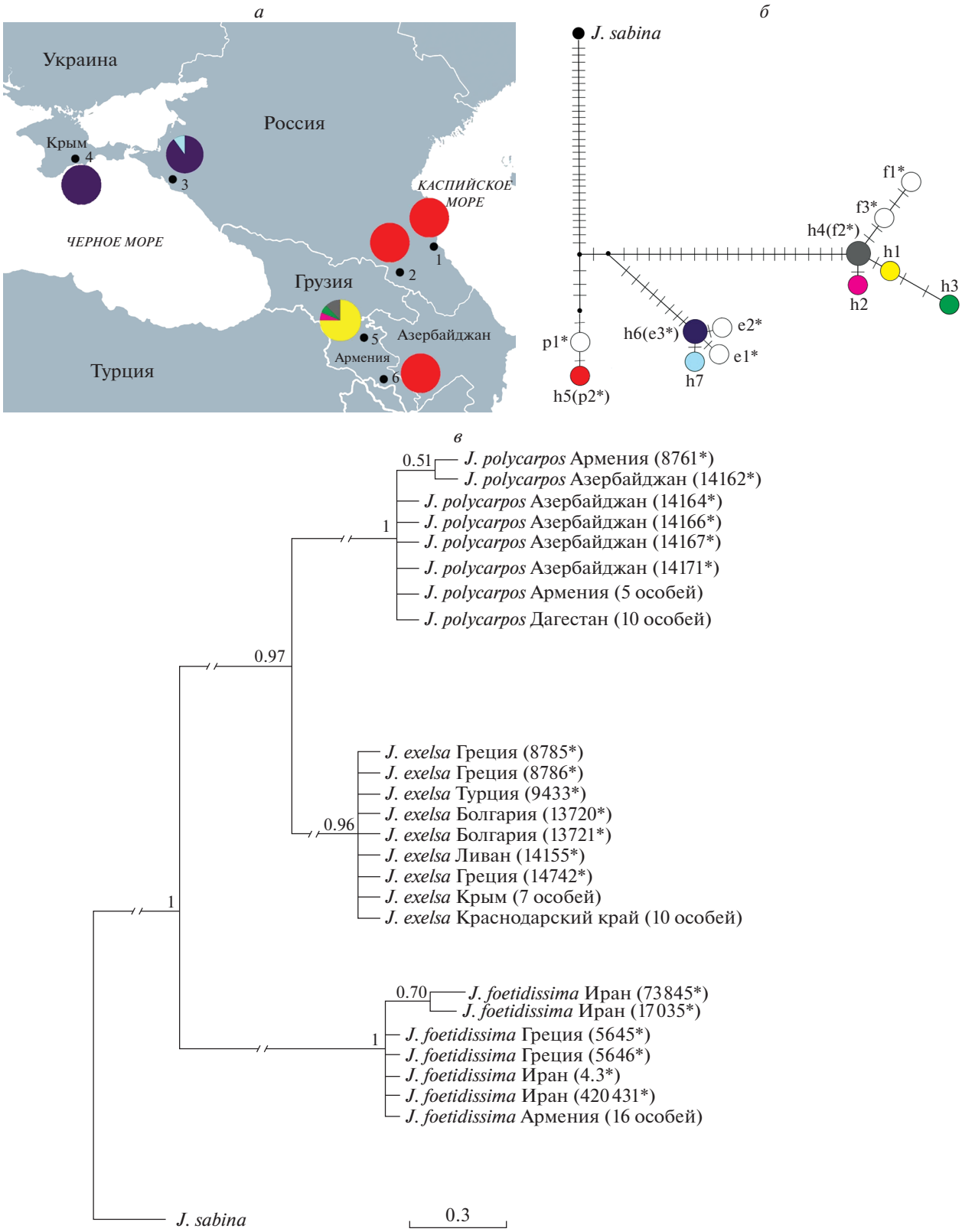

Рис. 1. *а* – местоположение изученных выборок, распределение обнаруженных гаплотипов хпДНК. *б* – дерево гаплотипов хпДНК (h1–h7). Поперечные тонкие штрихи на ветвях дерева – мутационные события. Дополнительные гаплотипы f1–f3, e1–e3, p1–p2 составлены по последовательностям соответствующих межгенных спейсеров, взятых из Генбанка. *в* – филогенетическое дерево изученных образцов *J. excelsa*, *J. polycarpos* и *J. foetidissima*. (*) отмечены образцы, последовательности для которых взяты из Генбанка.

различия в диаметре поперечного сечения нивелируются [29].

Juniperus foetidissima имеет более заметные морфологические отличия от *J. excelsa*. Конечные веточки у *J. foetidissima* толще (1.1 мм), чем у *J. excelsa* (0.75 мм). Побеги у растения толстые четырехгранные, листья чешуевидные, слабокилеватые, в отличие от *J. excelsa*, листья не очень плотно прилегают к побегу, их кончики как правило заостренные [33, 34]. Тем не менее, из-за варьирования признаков в зависимости от возраста особей, данные виды часто трудно отличить друг от друга, особенно при их совместном произрастании. Следует отметить, что согласно недавним исследованиям, для *J. seravschanica* (одного из видов комплекса *J. excelsa* s.l.) предполагается происхождение в результате древней интрогрессивной гибридизации между *J. foetidissima* и *J. polycarpos* [20], что указывает на их близкое родство и отсутствие репродуктивной изоляции в прошлом. Однако данные о современной гибридизации между этими видами отсутствуют.

Таким образом, полученные нами данные по изменчивости хпДНК образцов из Крыма и Кавказа поддерживают тезис о самостоятельности двух таксонов *J. excelsa* и *J. polycarpos*. Наблюдаемая дифференциация отражает существование двух генетических линий – западной и восточной – возникшей в некогда предковом виде в ходе истории формирования его ареала. Такой паттерн генетической структуры согласуется с принадлежностью к разным типам растительности с определенной экологической приуроченностью. В изученных нами популяциях наблюдается снижение генетической изменчивости (по сравнению с основным ареалом видов), что характерно для краевых популяций и объясняется расположением на северных пределах их распространения.

Полученные молекулярно-генетические данные могут быть использованы для разработки программ мониторинга и сохранения этих редких видов, а также для разработки мероприятий по рациональному природопользованию. Набор из четырех маркерных фрагментов подходит для идентификации видов, если это затруднительно сделать по морфологическим признакам.

Авторы выражают благодарность зав. лабораторией д. б. н. В.Л. Семерикову за возможность проведения исследований в лаборатории молекулярной экологии растений ИЭРИЖ УрО РАН, а также зам. директора по научной работе ФГБУ “Сочинский национальный парк” д. б. н. Б.С. Туниеву за помощь в организации сбора полевого материала.

Работа выполнена в рамках плановой темы Горного ботанического сада ДФИЦ РАН, в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН.

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. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 855 с.
2. Красная книга Республики Дагестан. Махачкала: Дагестанское книжное издательство, 2009. С. 53–250.
3. Красная книга Краснодарского края. Растения и грибы. III издание / Отв. ред. Литвинская С.А. Краснодар: Адм. Краснодар. края, 2017. 850 с.
4. Красная книга Республики Крым: растения, водоросли, грибы. Симферополь: ООО “ИТ АРИАЛ”, 2015. 480 с.
5. *Кецховели Н.Н.* Ксерофитные (аридные) редколесья // Растительность Европейской части СССР. Л.: Наука, 1980. С. 273–276.
6. *Литвинская С.А.* Созологическая значимость основных флороценокомплексов Западного Кавказа и Западного Предкавказья // Новости науки в АПК. 2019. № 1(12). С. 24–31. https://doi.org/10.25930/8ghb-qw97
7. *Нешатаева В.Ю., Садыкова Г.А.* Ботанико-географические особенности сообществ можжевеловых редколесий Кавказа и Крыма. Материалы международной конференции: Флора и заповедное дело на Кавказе: история и современное состояние изученности. Пятигорск: 2019. С. 66–67.
8. *Hojjati F., Zarre Sh., Assadi M.* Isoenzyme diversity and cryptic speciation in *Juniperus excelsa* (Cupressaceae) complex in Iran // Biochem. Syst. and Ecology. 2009. V. 37. P. 193–200.
9. Конспект флоры Кавказа. Т. 1 / Под ред. Тахтаджяна А.Л. СПб.: Наука, 2003. 204 с.
10. *Галушко А.И.* Флора Северного Кавказа. Определитель: в 3-х т. Ростов-на Дону: Изд-во Ростовского университета, 1978. Т. 1. 320 с.
11. *Муртазалиев Р.А.* Конспект флоры Дагестана. Т. 1. (Lycopodiaceae – Urticaceae). Махачкала: Эпоха, 2009. 252 с.
12. *Adams R.P., Armagan M., Douaihy B. et al.* Evidence of relictual introgression or incomplete lineage sorting in nrDNA of *Juniperus excelsa* and *J. polycarpos* in Asia Minor // Phytologia. 2016. V. 98(2). P. 146–155.
13. *Hojjati F., Kazempour-Osaloo S.H., Adams R.P., Assadi M.* Molecular phylogeny of *Juniperus* in Iran with special reference to the *J. excelsa* complex, focusing on *J. seravschanica* // Phytotaxa. 2018. V. 375(2). P. 135–157. https://doi.org/10.11646/phytotaxa.375.2.1
14. *Farjon A.* The taxonomy of multiseed junipers (*Juniperus* sect. Sabina) in Southwest Asia and East Africa (Taxonomic notes on Cupressaceae I) // Edinburgh J.

Botany. 1992. V. 49. P. 251–283.
https://doi.org/10.1017/S0960428600000524

15. *Mao K., Hao G., Liu J. et al.* Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): Variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals // New Phytologist. 2010. V. 188. 254–272.
16. *Kassian J., Behravan J., Hassani M. et al.* Molecular characterization and RAPD analysis of *Juniperus* species from Iran // Genet. and Mol. Res. 2011. V. 10(2). P. 1069–1074.
17. *Adams R.P., Hojjati F., Schwarzbach A.E.* Taxonomy of *Juniperus* in Iran: DNA sequences of nrDNA plus three cpDNAs reveal *Juniperus polycarpos* var. *turcomanica* and *J. seravschanica* in southern Iran // Phytologia. 2014. V. 96 (1). P. 19–25.
18. *Hojjati F., Adams R.P., Randall G.* Terry. Discovery of chloroplast capture in *Juniperus excelsa* complex by multi-locus phylogeny // Phytotaxa. 2019. V. 413(1). P. 11–26.
19. *Adams R.P. Juniperus* of the World: the genus *Juniperus*. 4th ed. Bloomington: Trafford Publishing Co., 2014. 415 p.
20. *Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92(6). P. 673–679.
https://doi.org/10.1007/BF00226088
21. *Hall T.A.* Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp. Ser. 1999. V. 41. P. 95–98.
https://doi.org/10.1111/jbi.12867
22. *Excoffier L., Lischer H.* Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Res. 2010. V. 10. P. 564–567.
https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847
23. *Bandelt H.J., Forster P., Ruhl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
https://doi.org/10.1093/oxfor/djournals.molbe.v.a026036
24. *Ronquist F., Huelsenbeck J.P.* MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. № 12. P. 1572–1574.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180
25. Флора СССР / Под ред. Комарова В.Л. Л.: Изд. АН СССР, 1934. Т. I. С. 173–191.
26. *Гроссгейм А.А.* Флора Кавказа. Баку: Азфан, 1939. Т. 1. 554 с.
27. Деревья и кустарники СССР. Голосеменные. Москва–Ленинград: Изд-во Академии наук СССР, 1949. Т. 1. 463 с.
28. *Гроссгейм А.А.* Определитель растений Кавказа. Москва: “Советская наука”, 1949. 747 с.
29. *Асадулаев З.М., Садыкова Г.А., Рамазанова З.Р.* Анатомическое строение побега *Juniperus excelsa* Bieb. subsp. *polycarpos* (C. Koch) Takht. в Предгорном Дагестане // Вестник Пермского унив. Сер. биология. 2020. Вып. 3. С. 157–164.
https://doi.org/10.17072/1994-9952-2020-3-157-164

Genetic Variability of Tree Junipers of Section Sabina: Data from Dagestan, Armenia and Crimea

G. A. Sadykova[a], E. V. Hantemirova[b], M. A. Polezhaeva[b, *], and Kh. U. Aliev[a]

[a] *Mountain Botanical Garden of the Daghestan Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Mahachkala, 367000 Russia*

[b] *Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Science, Ekaterinburg, 620144 Russia*

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

There was performed the analysis of the variability of intergenic spacers *pet*N–*psb*M, *trn*D–*trn*T, *trn*L–*trn*F and trnS–*trn*G chloroplast DNA in the endangered closely related species of junipers *Juniperus excelsa*, *J. polycarpos* and *J. foetidissima* in the Caucasus and Crimea – the northern limits of their distribution. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed a high degree of differentiation of three taxa (G_{CT} = 0.9905, $P < 0.0001$). Have been identified seven haplotypes, in total. The population of *J. foetidissima* from Armenia is characterized by high genetic diversity ($H = 0.442$); genetic diversity was smaller in *J. excelsa* ($H = 0.200$); the *J. polycarpos* populations were found to be monomorphic. The studied samples, together with those included to the analysis from the genebank from the main part of the range, formed three clades corresponding to three taxa, with high statistical support.

Keywords: *pet*N–*psb*M, *trn*D–*trn*T, *trn*L–*trn*F, *trn*S–*trn*G, population structure, genetic variability.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1211–1214

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.22:595.773.4

РОЛЬ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКА CLAMP В ПОДДЕРЖАНИИ ДИСТАНЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЯХ ДРОЗОФИЛЫ

© 2021 г. Е. А. Тихонова[1], В. А. Могила[1], П. Г. Георгиев[1], О. Г. Максименко[1, *]

[1]*Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия*

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

Поступила в редакцию 05.12.2020 г.
После доработки 21.01.2021 г.
Принята к публикации 15.02.2021 г.

Механизм специфичного привлечения комплекса дозовой компенсации (КДК) на Х-хромосому самцов дрозофилы остается нерешенной проблемой. Недавно в качестве фактора, участвующего в привлечении КДК, был описан ДНК-связывающий белок CLAMP, который связывается с сайтами первичной посадки (СПП) КДК. Показано, что СПП могут рекрутировать КДК на аутосомы. В представленной работе проведено исследование способности хорошо описанного СПП поддерживать дистанционные взаимодействия в модельных трансгенных линиях дрозофилы. В результате получены отрицательные результаты, показывающие, что СПП, с которым связывается белок CLAMP, не поддерживает дистанционные взаимодействия.

Ключевые слова: дозовая компенсация, CLAMP, дрозофила, ген *white*, дистанционные взаимодействия.

DOI: 10.31857/S001667582110012X

Механизм дозовой компенсации у дрозофилы осуществляется посредством увеличения уровня экспрессии генов Х-хромосомы самца (X/Y) в два раза по сравнению с самками (X/X). За увеличение уровня экспрессии генов Х-хромосомы самцов отвечает мультисубъединичный комплекс дозовой компенсации (**КДК**), который специфично связывается с Х-хромосомой самцов. В состав комплекса дозовой компенсации (КДК) входят пять белков (MSL1, MSL2, MSL3, MLE, MOF) и некодирующая РНК (roX1, roX2) [1]. Исходно КДК привлекается на специфичные последовательности, распределенные по Х-хромосоме – сайты первичного посадки (**СПП**), с которых происходит распространение КДК преимущественно на кодирующие части генов [2].

Наиболее вероятным механизмом привлечения КДК на Х-хромосому является присутствие в составе СПП сайтов для транскрипционных факторов (**ТФ**), которые участвуют в специфичном связывании с КДК. Однако сравнение последовательностей СПП друг с другом выявило только обогащение GA-повторами, которые также повсеместно распределены на аутосомах [3]. Недавно в скрининге ТФ, определяющих способность СПП-элемента стимулировать транскрипцию в культуре клеток дрозофилы S2, был найден белок CLAMP, который содержит семь доменов “цинковые пальцы” C2H2-типа [4]. *In vitro* было показано, что часть белка, содержащая C2H2-домены (с четвертого по седьмой), специфично связывается с GA-повторами [5], которые достаточно часто находятся в СПП.

Согласно одной из моделей [6], СПП взаимодействуют между собой и другими регуляторными элементами, что способствует специфическому распространению комплекса вдоль Х-хромосомы. Для проверки этого предположения в работе было исследовано взаимодействие между двумя копиями ранее охарактеризованного СПП [3] – с помощью модельной GAL4/*white*-системы [7] в трансгенных линиях дрозофилы. Для исследования был взят участок в 200 пн ранее описанного СПП, CES5C2 [3], который содержит GA-богатые мотивы (MRE – Msl Recognition Element), и искусственный ДНК-фрагмент, содержащий GA-повторы (рис. 1,*а*).

Для исследования дистанционных взаимодействий между тестируемыми ДНК-фрагментами была использована ранее разработанная модельная система, основанная на неспособности дрожжевого транскрипционного фактора GAL4 активировать промотор гена *white*, когда между GAL4-сайтами и промотором находится ген *yellow* [7]. Ген *white* определяет окраску глаз дрозофилы. Уровень его экспрессии тестировали по степени пигментации

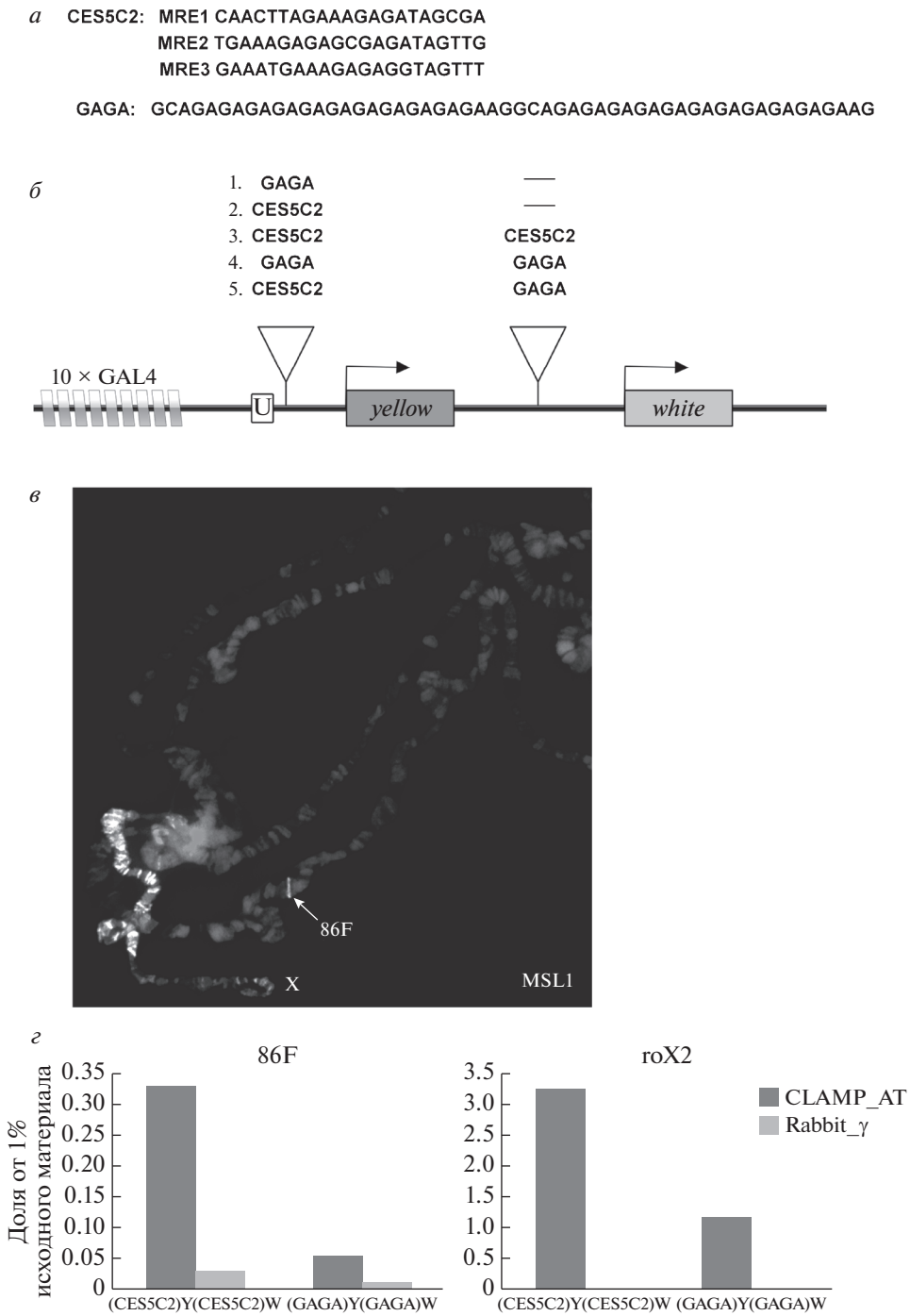

Рис. 1. *а* – используемые в работе ДНК-фрагменты: участок CES5C2, содержащий три GA-богатых мотива (MRE1, MRE2 и MRE3), и искусственно синтезированная последовательность, содержащая десять GAGA-повторов. *б* – модельная система для исследования дистанционных взаимодействий содержит два репортерных гена (*yellow*, *white*), десять сайтов посадки дрожжевого активатора GAL4 (10 × GAL4) и уникальную последовательность для количественного анализа при иммунопреципитации хроматина (U). Контрольные конструкции (1, 2) содержат один ДНК-фрагмент (GAGA или CES5C2) перед геном *yellow*, а конструкции для изучения дистанционных взаимодействий (3, 4, 5) – два фрагмента (два CES5C2-элемента, две GAGA-последовательности или их комбинацию) перед генами *yellow* и *white*. *в* – сборка КДК на аутосомном трансгене в цитогенетическом локусе 86F. Иммуноокрашивание политенных хромосом самцов трансгенной линии (CES5C2)Y(CES5C2)W проводилось антителами против MSL1. *г* – связывание белка CLAMP с CES5C2-элементом и GAGA-последовательностью в цитогенетическом локусе 86F на стадии куколки в трансгенных линиях (CES5C2)Y(CES5C2)W и (GAGA)Y(GAGA)W. В качестве положительного контроля использовался эндогенный СПП (roX2). Иммунопреципитация хроматина выполнялась с использованием антител к белку CLAMP (Clamp_AT) и преиммунной сыворотки (rabbit_γ).

Таблица 1. Экспрессия гена *white* в исследуемых трансгенных линиях. Степень экспрессии гена *white* определялась по интенсивности окраски глаз: Ж – желтый, ТЖ – темно-желтый, О – оранжевый

Трансгенные линии	Пигментация глаз	
	исходный фенотип	GAL4-активация
(GAGA)YW	Ж–ТЖ	Ж–ТЖ
(CES5C2)YW	Ж–ТЖ	ТЖ–О
(CES5C2)Y(CES5C2)W	Ж–ТЖ	Ж–О
(GAGA)Y(GAGA)W	Ж–ТЖ	ТЖ–О
(CES5C2)Y(GAGA)W	Ж–ТЖ	ТЖ–О

глаз с помощью визуального анализа. Тестируемые ДНК-фрагменты (CES5C2 и GAGA-повторы) встраивали перед генами *yellow* и *white* в конструкцию (рис. 1,*б*), в которой десять сайтов связывания дрожжевого активатора GAL4 были встроены в положении –893 пн относительно промотора гена *yellow*, и ген *white* находился с 3'-стороны от гена *yellow*. Для исследования взаимодействия между СПП-элементами и GA-повторами были созданы конструкции, содержащие два CES5C2-фрагмента ((CES5C2)Y(CES5C2)W), два ДНК-фрагмента с GAGA-повторами ((GAGA)Y(GAGA)W), а также комбинацию CES5C2 и GA-повтора ((CES5C2) Y(GAGA)W). В двух контрольных конструкциях CES5C2 ((CES5C2)YW) или GAGA-последовательность ((GAGA)YW) были встроены только рядом с GAL4-сайтами, перед промотором гена *yellow* (рис. 1,*б*).

Для интеграции конструкций в геном был использован метод, основанный на сайт-специфичной рекомбинации для интегразы фага ϕC31 [8]. Все конструкции были встроены в одно место генома на 3-й хромосоме в положение 86F. Трансгенная линия y[1] M{vas-int.Dm}ZH-2A w[*]; M{3xP3-RFP.attP}ZH-86Fb) (#24749), содержащая *attP*-сайт в цитогенетическом локусе 86F и трансген, экспрессирующий интегразу ϕC31, была получена из коллекции Блумингтона (США). Ранее было показано, что сайты связывания архитектурных белков в трансгене, встроенном в цитогенетический локус 86F, способны за счет дистанционных взаимодействий поддерживать стимуляцию промотора гена *white* за счет GAL4-активации [9].

Трансгенные линии были получены в результате микроинъекции ДНК, содержащей одну из конструкций, в эмбрионы дрозофилы. В полученных трансгенных линиях самки имели желтые глаза, а самцы – немного более интенсивную пигментацию – темно-желтую окраску. Для активации GAL4 проводили скрещивание трансгенной линии с линией, в которой белок GAL4 экспрессировался под контролем тубулинового промотора. При скрещивании с любой из двух трансгенных линий, содержащих контрольную конструкцию, активация GAL4 незначительно меняла пигментацию глаз до оранжевой окраски, но приводила к резкому усилению пигментации тела и крыльев, что связано со стимуляцией промотора гена *yellow*, расположенного рядом с GAL4-сайтами в трансгенных линиях. Таким образом, было подтверждено, что GAL4 может стимулировать только рядом расположенный промотор гена *yellow*. При индукции экспрессии GAL4 в трансгенных линиях, содержащих тестируемые на поддержание дистанционных взаимодействий сайты, происходила также только активация гена *yellow* (табл. 1).

Полученный отрицательный результат может объясняться неспособностью белка CLAMP связываться с ДНК-элементами, встроенными на аутосому, и привлекать к ним белки КДК. Поэтому для проверки такой возможности на аутосоме в трансгенных линиях было исследовано связывание белка MSL1 с политенными хромосомами, выделенными из слюнных желез (рис. 1,*в*). У самцов антитела к MSL1 окрашивают только Х-хромосому в политенных хромосомах. Однако в трансгенной линии (CES5C2)Y(CES5C2) наблюдается связывание MSL1 также с сайтом 86F. Таким образом, полученные данные подтверждают специфичное привлечение КДК на элемент CES5C2.

С помощью иммунопреципитации хроматина с последующей количественной ПЦР было также проанализировано связывание белка CLAMP с CES5C2 и GAGA-последовательностями в куколках трансгенных линий. В результате было обнаружено, что белок CLAMP связывается с последовательностью CES5C2 в составе трансгенной конструкции намного более эффективно, чем с GA-повторами (рис. 1,*г*). Вероятно, слабое связывание с GA-повторами объясняется конкуренцией между CLAMP и транскрипционным фактором GAF, для которого известно эффективное кооперативное связывание с GA-повторами.

Отсутствие активации репортерного гена *white* GAL4-активатором предполагает отсутствие взаимодействия между тестируемыми ДНК-фрагментами, расположенными на большом расстоянии

друг относительно друга. Таким образом, комплексы белков, которые связываются с элементами CES5C2, не взаимодействуют между собой. Также не найдено взаимодействий между комплексами белков, включающих GAF и CLAMP, которые взаимодействуют с GA-повторами. Таким образом, полученные нами результаты не подтверждают модель, согласно которой взаимодействие между СПП-элементами определяет архитектуру Х-хромосомы дрозофилы и распространение КДК. В поддержку данного результата недавно было показано, что белки КДК не участвуют в формировании архитектуры Х-хромосомы [10]. С другой стороны, СПП-элементы часто располагаются рядом с границами топологических ассоциированных доменов. Согласно доминирующей в настоящее время модели, внутри топологических доменов могут происходить множественные локальные взаимодействия между промоторами, энхансерами и сайленсерами, что определяет регуляцию экспрессии генов. Вероятно, границы топологических доменов могут участвовать в распространении КДК по Х-хромосоме. Поэтому необходимы дальнейшие исследования для выяснения механизмов, которые определяют распространение КДК с СПП-элементов по Х-хромосоме.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 17-74-20155).

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. *Kuroda M.I., Hilfiker A., Lucchesi J.C.* Dosage compensation in *Drosophila*–a model for the coordinate regulation of transcription // Genetics. 2016. V. 204. № 2. P. 435–450. https://doi.org/10.1534/genetics.115.185108
2. *Straub T., Grimaud C., Gilfillan G.D. et al.* The chromosomal high-affinity binding sites for the *Drosophila* dosage compensation complex // PLoS Genetics. 2008. V. 4. № 12. P. e1000302. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000302
3. *Alekseyenko A.A., Peng S., Larschan E. et al.* A sequence motif within chromatin entry sites directs MSL establishment on the *Drosophila* X chromosome // Cell. 2008. V. 134. № 4. P. 599–609. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.033
4. *Larschan E., Soruco M.M., Lee O.K. et al.* Identification of chromatin-associated regulators of MSL complex targeting in *Drosophila* dosage compensation // PLoS Genetics. 2012. V. 8. № 7. P. e1002830. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002830
5. *Marcela M., Soruco M.M., Chery J. et al.* The CLAMP protein links the MSL complex to the X chromosome during *Drosophila* dosage compensation // Genes & Development. 2013. V. 27. № 14. P. 1551–1556. https://doi.org/10.1101/gad.214585.113
6. *Alekseyenko A.A., Ho J.W., Peng S. et al.* Sequence-specific targeting of dosage compensation in *Drosophila* favors an active chromatin context // PLoS Genetics. 2012. V. 8. № 4. P. e1002646. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002646
7. *Kyrchanova O., Chetverina D., Maksimenko O. et al.* Orientation-dependent interaction between *Drosophila* insulators is a property of this class of regulatory elements // Nucl. Ac. Res. 2008. V. 36. № 22. P. 7019–7028. https://doi.org/10.1093/nar/gkn781
8. *Bischof J., Maeda R.K., Hediger M. et al.* An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific C31 integrases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317. https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104
9. *Zolotarev N., Fedotova A., Kyrchanova O. et al.* Architectural proteins Pita, Zw5, and ZIPIC contain homodimerization domain and support specific long-range interactions in *Drosophila* // Nucl. Ac. Res. 2016. V. 44. № 15. P. 7228–7241. https://doi.org/10.1093/nar/gkw371
10. *Ramírez F., Lingg T., Toscano S. et al.* High-affinity sites form an interaction network to facilitate spreading of the MSL complex across the X chromosome in *Drosophila* // Mol. Cell. 2015. V. 60. № 1. P. 146–162. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.024

The Role of CLAMP Binding Sites in Maintaining of Distant Interactions in *Drosophila* Transgenic Lines

E. A. Tikhonova[a], V. A. Mogila[a], P. G. Georgiev[a], and O. G. Maksimenko[a, *]

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

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

The mechanism of specific recruitment of the dosage compensation complex (DCC) to the X chromosome of male *Drosophila* remains an unresolved problem. Recently a DNA-binding protein CLAMP, which binds to the primary chromosome entry sites (CESs) of the DCC, has been described as a factor involved in X chromosome recruiting of DCC. It was shown that CES can recruit of DCC to autosomes. In the present work, we studied the ability of a well-described CES to support distant interactions in model transgenic *Drosophila* lines. As a result, negative results were obtained showing that the CES that bound by CLAMP protein does not support distance interactions.

Keywords: dosage compensation, CLAMP, *Drosophila*, gene *white*, distant interactions.

ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 10, с. 1215–1220

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.17:599.9

АССОЦИАЦИЯ VNTR-ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА 1 (*IL1RN*) И ИНТЕРЛЕЙКИНА 4 (*IL4*) С КАРИЕСОМ ЗУБОВ У ДЕТЕЙ

© 2021 г. И. Г. Удина[1, *], Ю. А. Васильев[2], В. В. Волобуев[2], А. С. Грачева[1, 3], О. В. Гуленко[2]

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

[2]*Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, 350063 Россия*

[3]*Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им. В.А. Неговского, Москва, 107031 Россия*

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

Поступила в редакцию 25.01.2021 г.
После доработки 29.04.2021 г.
Принята к публикации 11.05.2021 г.

Изучали ассоциации VNTR-полиморфизма двух генов цитокинов: гена антагониста рецептора интерлейкина 1 (*IL1RN*) – *rs2234663* и интерлейкина 4 (*IL4*) – *rs8179190* с кариесом зубов у детей в Краснодарском крае ($N = 159$). Проводили статистический анализ распределения генотипов в трех группах детей: с декомпенсированной формой кариеса (ДФК), с субкомпенсированной формой кариеса (СФК) и с компенсированной формой кариеса (КФК), а также у здоровых. Установлены достоверные различия между группами по присутствию в генотипе двух “длинных” аллелей *L/L* по *rs2234663.* К ним относятся аллели *A1* и *A4*, у детей с КФК (и здоровых) и с ДФК, а также с СФК и ДФК: OR = 0.33, $p = 0.014$; 95%CI 0.1–0.87 и OR = 0.35, $p = 0.035$; 95%CI 0.12–1.00 соответственно. Установлено, что генотипы с двумя “длинными” аллелями *L/L* в генотипе (500 или 410 пн) обусловливают устойчивость к высокоактивной форме кариеса, а составные двухлокусные генотипы по *rs8179190* и по *rs2234663* (*A1/A2 P2/P2* и *A2/A2 P2/P2*) и генотипы, содержащие хотя бы один аллель *P2* или один аллель *A2* (“короткий”) обусловливают чувствительность. Группа детей с СФК аналогично группе детей с КФК (и здоровых) достоверно отличается от ДФК по тому же спектру изученных VNTR-маркеров двух генов цитокинов, что предполагает особую роль изученных маркеров в развитии высокоактивной формы кариеса.

Ключевые слова: дети, кариес, Краснодарский край, *IL1RN* (*rs2234663*), *IL4* (*rs8179190*), VNTR, цитокины, ассоциация.

DOI: 10.31857/S0016675821100143

Кариес зубов является многофакторным заболеванием, которое ассоциируется с присутствием микроорганизмов, вызывающих кариозное поражение, и ферментируемых сахаров, а также обусловлено генетическими и средовыми факторами, индивидуальной устойчивостью зубов к факторам поражения и длительностью воздействия этих факторов [1, 2]. Установлена взаимосвязь между развитием поражения зубов кариесом и иммунным ответом иммунокомпетентных клеток [3]. Цитокины являются продуктами моноцитов-макрофагов, активированных для контроля воспалительного ответа на бактериальную инфекцию [4]. Показано, что цитокины ассоциируются с патогенезом воспаления не только мягких тканей [5], но и способствуют возникновению и развитию кариеса зубов [6]. Генетические и иммунные различия между индивидуумами обусловливают различия в рисках кариеса зубов [2, 3].

Streptococcus mutans – один из основных возбудителей кариеса [2]; было показано, что компоненты *S. mutans* стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов [3]. Интерлейкин 1 (IL-1) является провоспалительным цитокином, который кодируется геном *IL-1*, локализованным в области 2q13–21. Белок I/II, прикрепленный к клеточной стенке *S. mutans*, играет важную роль в колонизации поверхностей зубов и индуцирует синтез моноцитами провоспалительных цитокинов, таких, как IL-1β [5]. Установлено, что IL-1ra (IL1RN), напротив, ингибирует активность IL-1β [6].

Описано вариабельное количество тандемных повторов (**VNTR**) с субъединицей в 86 пн (*rs2234663*), присутствующих в интроне 2 гена *IL1RN*, выявлено шесть аллелей. Среди этих шести присутствуют “короткие” (*S*) аллели с одним (*VNTR/6*) и двумя повторами *(VNTR/2)* и “длинные” *L*-аллели (*VNTR/L*), содержащие от трех до

шести повторов [7]. Провоспалительный иммунный ответ индивидуумов (гомозиготных по аллелю *VNTR/2* гена *IL1RN*) более продолжительный и сильный в сравнении с носителями других VNTR-генотипов по гену *IL1RN* [8]. В этой связи влияние аллеля *VNTR/2* гена *IL1RN* изучали при различных заболеваниях, включая аутоиммунные [9–11]. В результате метаанализа проведенных исследований выявлена роль 86 пн VNTR-полиморфизма гена *IL1RN* в развитии сепсиса (комплексного заболевания с нарушенной регуляцией воспалительного ответа и высокой смертностью): в качестве аллеля риска установлен *VNTR/2* [10]. Изучение VNTR-полиморфизма в интроне 2 гена *IL1RN* включено в наше исследование по изучению развития кариеса у детей в Краснодарском крае, так как не исключена его роль в кариозном процессе с учетом ранее выявленной роли полиморфизмов этого гена с заболеваниями в ротовой полости и другими инфекционными заболеваниями.

IL-4 (интерлейкин 4) действует как антивоспалительный агент, ген интерлейкина 4 (*IL4*) локализуется на длинном плече хромосомы 5 (q23-31) вместе с другими генами цитокинов. Этот ген содержит тандемный повтор в 70 пн с вариабельным количеством тандемных повторов VNTR или минисателлитный повтор, который находится в интроне 3 и ассоциируется с продукцией IL-4 [12]. Обнаружены два основных аллеля, обусловленные VNTR-полиморфизмом *IL4*: один с делецией 70 пн (с двумя повторами), а другой с инсерцией 70 пн (с тремя повторами), которые обозначают как *P1* и *P2* соответственно [12, 13]. Генотипы *P2/P2* гена *IL4* ассоциированы с более низкими концентрациями IL-4; в этой связи предположили, что аллель *P1* индуцирует более высокую экспрессию гена *IL4* по сравнению с *P2*-аллелем [13]. Проведен целый ряд исследований по ассоциации VNTR-полиморфизма гена *IL4* с иммунными и аутоиммунными заболеваниями, в том числе с заболеваниями ротовой полости, включая рецидивирующий афтозный стоматит и периодонтит [13]. В нашем исследовании анализировали возможную ассоциацию этого полиморфизма с развитием кариеса зубов у детей в Краснодарском крае.

На базе детской краевой клинической больницы и стоматологической поликлиники Кубанского государственного медицинского университета (КубГМУ) изучены дети ($N = 159$) школьного возраста, проживающие на территории Краснодарского края. Биологические образцы детей собраны преимущественно в виде соскобов буккального эпителия в ротовой полости, частично в виде образцов крови, из которых выделена ДНК с помощью наборов “Изоген” (Москва). У всех детей проведено стоматологическое обследование в амбулаторных условиях в ходе профилактического осмотра или при поступлении в лечебно-профилактическое учреждение. Исследование одобрено этическим комитетом КубГМУ, что отражено в протоколе № 63 от 21 мая 2018 г.

Стоматологический осмотр проводили согласно рекомендациям ВОЗ. Дети подразделялись по возрасту в соответствии с периодами развития прикуса: 0–6 лет – временный прикус, 7–12 лет – смешанный и 13–17 лет – постоянный прикус. У всех детей была определена степень кариозного процесса, выявлены здоровые дети – не более 15% от выборки. Интенсивность кариозного процесса оценивали с использованием суммарного индекса “кпу/КПУ” (кариес/пломба/удаленный не по смене зуб). В соответствии с полученными значениями “кпу/КПУ” дети в выборках подразделялись на следующие группы: с компенсированной формой кариеса (**КФК**) – значения индекса от 0 до 3, с субкомпенсированной формой кариеса (**СФК**) – значения от 4 до 5, и декомпенсированной формой кариеса (**ДФК**) при значениях от 6 и выше [14]. Средний возраст детей в группах: с КФК (и здоровых) составил 12.08 ± 0.38, с СФК – 11.66 ± 0.46 и с ДФК – 10.19 ± 0.54. Таким образом, средний возраст детей в трех изученных группах соответствует смешанному прикусу, что позволяет проводить сравнительные исследования.

Для исследования выбрали минисателлитный (VNTR – variable number of tandem repeats – вариабельное число тандемных повторов) маркер гена *IL1RN* (*rs2234663*) и VNTR-маркер гена *IL4* (*rs8179190*), который изучали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием наборов реагентов для фирмы “Изоген” (Москва), условия описаны в работах [11] и [13] соответственно. Выявленный спектр полиморфных вариантов гена *IL1RN* представлен следующими фрагментами: фрагмент длиной 410 пн соответствует аллелю *IL1RN1* (*A1*) (содержит четыре повтора субъединицы по 86 пн); фрагмент 240 пн – *IL1RN2* (*A2*) – (две копии повтора); фрагмент 500 пн – *IL1RN4* (*A4*) – (пять копий повтора) и фрагмент 155 пн – *IL1RN6* (*A6*) – (одну копию). В нашей выборке были представлены только аллели *IL1RN1*, *ILRN2* и *ILRN4*. Аллели *IL1RN3* и *IL1RN5* не обнаружены, а аллель *IL1RN6* обнаружен у одного, не вошедшего в исследование индивидуума. Аллели *A1* и *A2* наиболее распространены в различных популяциях [13]. Для аллеля *P1* гена *IL4* ПЦР-продукт был длиной 183 пн и для аллеля *P2* – длиной 253 пн. В изученной выборке выявлен также минорный аллель в 113 пн – *P3* с одной копией субъединицы в 70 пн (индивидуум с *P3* не вошел в рассматриваемые нами выборки). Для надежности типирования и воспроизводимости метода для каждого генотипа включали внутренние контроли.

Таблица 1. Распределение генотипов по VNTR *IL4 – rs8179190* – у детей в Краснодарском крае в зависимости от степени активности кариеса

Генотип	N_o	F_o	Частота аллеля	N_e	χ^2	Параметры гетерозиготности
Дети с ДФК						
P1/P1	2	0.0526	*P1* = 0.1711 ± 0.0432	1.11	1.0325, *d.f.* = 1, $p > 0.05$	$H_e = 0.2836 \pm 0.0563$, $H_o = 0.2868 \pm 0.0690$, $D = -0.1648 \pm 0.1688$, $t_d = 0.5249$, $p > 0.05$
P1/P2	9	0.2368		10.78		
P2/P2	27	0.7105	*P2* = 0.8289 ± 0.0432	26.11		
Σ	38	1.0000		$n_e = 1.3958 \pm 0.0563$		
Дети с СФК						
P1/P1	6	0.1224	*P1* = 0.2653 ± 0.0446	3.45	3.4956, *d.f.* = 1, $p > 0.05$	$H_e = 0.3898 \pm 0.0418$, $H_o = 0.2857 \pm 0.0645$, $D = -0.2671 \pm 0.1220$, $t_d = 1.3540$, $p > 0.05$
P1/P2	14	0.2857		19.10		
P2/P2	29	0.5919	*P2* = 0.7347 ± 0.0446	26.45		
Σ	49	1.0000		$n_e = 1.6389 \pm 0.0418$		
Дети с КФК (и здоровые)						
P1/P1	3	0.0417	*P1* = 0.2292 ± 0.0350	3.78	0.2717, *d.f.* = 1, $p > 0.05$	$H_e = 0.3593 \pm 0.0378$, $H_o = 0.3750 \pm 0.0571$, $D = 0.0614 \pm 0.1163$, $t_d = 0.3170$, $p > 0.05$
P1/P2	27	0.3750		25.44		
P2/P2	42	0.5833	*P2* = 0.7708 ± 0.0350	42.78		
Σ	72	1.0000		$n_e = 1.5463 \pm 0.0378$		
Сравнение детей с КФК (и здоровых) и ДФК: по генотипам $G = 1.7253$, *d.f.* = 2, $p > 0.05$						
Сравнение детей с КФК (и здоровых) и СФК: по генотипам $G = 0.0086$, *d.f.* = 2, $p > 0.05$						
Сравнение детей с СФК и ДФК (и здоровых): по генотипам $G = 1.3021$, *d.f.* = 2, $p > 0.05$						

Примечание. N_o – наблюдаемое число генотипов, N_e – теоретически ожидаемое число генотипов, F_o – наблюдаемая частота фенотипов, H_e – ожидаемая гетерозиготность, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, *d.f.* – число степеней свободы, $D = (H_o - H_e)/H_e$, n_e – эффективное число аллелей.

Для статистической обработки данных использовали алгоритмы программы Statistica 6.0 и алгоритм WinPepi (для определения OR (odds ratio)), определяли 95%-ный интервал разброса величины при вероятности $p < 0.05$ по точному тесту Фишера (two-tailed – для двух распределений). С помощью программы “Statistica” определяли частоты аллелей, равновесие Харди–Вайнберга, ожидаемую и наблюдаемую гетерозиготности, а также проводили сравнение выборок с использованием *G*-критерия.

Частоты аллелей для *IL4* (*rs8179190*) и *IL1RN* (*rs2234663*) в группах детей с различной степенью кариеса зубов (КФК, СФК и ДФК), а также оценки наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностей представлены соответственно в табл. 1 и 2. Для *IL4* (*rs8179190*) и *IL1RN* (*rs2234663*) во всех трех группах рассчитывали равновесие Харди–Вайнберга – не установлено достоверных различий по распределению генотипов при попарном сравнении групп. Тем не менее, установлены достоверные различия по присутствию генотипа *A1/A1* попарно между группами детей с КФК (и здоровых) и ДФК, а также с СФК и ДФК, причем генотип *A1/A1* выступает как генотип, обусловливающий устойчивость к декомпенсированной форме кариеса (табл. 2).

В трех изученных группах выявлено девять двухлокусных генотипов по *rs2234663* и *rs8179190*. Наиболее распространенными были: *A1/A1 P2/P2* и *A1/A1 P1/P2* – с частотами 43.1 и 30.6% в группе детей с КФК, 47.0 и 22.5% в группе детей с СФК, а также 39.5 и 13.2% в группе детей с ДФК. При проведении статистического анализа по особенностям распределения генотипов установлены следующие достоверные различия между группами по присутствию в генотипе двух “длинных” аллелей *L/L* по *rs2234663*, к которым относятся выявленные аллели *A1* и *A4*: детей с КФК (и здоровых) и с ДФК, а также с СФК и ДФК – OR = 0.33, $p = 0.01$, 95%CI 0.13–0.87 и OR = 0.35, $p = 0.035$, 95%CI 0.12–1.00 соответственно. Таким образом, *L/L* выступает как генотип устойчивости к декомпенсированной форме кариеса зубов.

По некоторым данным [3], уровень инфицированности *S. mutans* положительно коррелиро-

Таблица 2. Распределение генотипов по VNTR гена *IL1RN – rs2234663* – у детей в Краснодарском крае в зависимости от степени активности кариеса

Генотип	N_o	F_o	Частота аллеля	N_e	χ^2	Параметры гетерозиготности
Дети с ДФК						
A1/A1	21	0.5526	$P_{A1} = 0.7236 \pm 0.0513$	19.91	1.5702, *d.f.* = 3, $p > 0.05$	$H_e = 0.4069 \pm 0.0488$, $H_o = 0.3421 \pm 0.0270$, $D = -0.1591 \pm 0.1478$, $t_d = 0.7106$, $p > 0.05$
A1/A2	12	0.3158		14.47		
A2/A2	4	0.1053	$P_{A2} = 0.2632 \pm 0.0505$	2.63		
A1/A4	1	0.0263	$P_{A4} = 0.0132 \pm 0.0131$	0.72		
A2/A4	0	0		0.26		
A4/A4	0	0		0.01		
Σ	38	1.0000		$n_e = 1.6859 \pm 0.0488$		
Дети с СФК						
A1/A1	38	0.7755	$P_{A1} = 0.8878 \pm 0.0319$	38.62	0.7833, *d.f.* = 3, $p > 0.05$	$H_e = 0.2014 \pm 0.0502$, $H_o = 0.2245 \pm 0.0596$, $D = 0.1148 \pm 0.1667$, $t_d = 0.2966$, $p > 0.05$
A1/A2	10	0.2041		8.88		
A2/A2	0	0	$P_{A2} = 0.1020 \pm 0.0306$	0.51		
A1/A4	1	0.0204	$P_{A4} = 0.0102 \pm 0.0102$	0.89		
A2/A4	0	0		0.10		
A4/A4	0	0		0.01		
Σ	49	1.0000		$n_e = 1.2522 \pm 0.0502$		
Дети с КФК (и здоровые)						
A1/A1	55	0.7638	$P_{A1} = 0.8681 \pm 0.0282$	54.25	2.0808, *d.f.* = 3, $p > 0.05$	$H_e = 0.2337 \pm 0.0433$ $H_o = 0.2083 \pm 0.0479$ $D = -0.1085 \pm 0.1306$ $t_d = 0.3931$, $p > 0.05$
A1/A2	12	0.1667		13.89		
A2/A2	2	0.0278	$P_{A2} = 0.1111 \pm 0.0262$	0.89		
A1/A4	3	0.0417	$P_{A4} = 0.0208 \pm 0.0119$	2.60		
A2/A4	0	0		0.33		
A4/A4	0	0		0.04		
Σ	72	1.0000		$n_e = 1.3050 \pm 0.0433$		
Сравнение детей с КФК (и здоровых) и СФК: по генотипам $G = 0.6347$, *d.f.* = 3, $p > 0.05$; по доле генотипа *A1/A1* $G = 0.0219$, *d.f.* = 1, $p > 0.05$						
Сравнение детей с КФК (и здоровых) и ДФК: по генотипам $G = 6.2564$, *d.f.* = 3, $p > 0.05$; по доле генотипа *A1/A1* $G = 4.9851$, *d.f.* = 1, $p < 0.05$; OR = 0.38, $p = 0.030$, 95%CI = 0.15–0.96						
Сравнение детей с СФК и ДФК: по генотипам $G = 4.8181$, *d.f.* = 3, $p > 0.05$; по доле генотипа *A1/A1* $G = 4.7693$, *d.f.* = 1, $p < 0.05$; OR = 0.36, $p = 0.038$, 95%CI = 0.13–0.99						

вал с уровнем концентрации IL-1β в слюне и отрицательно коррелировал с концентрацией IL-1ra. Выявленные в настоящей работе ассоциации для *IL1RN L/L* с ДФК согласуются ранее полученным литературным данным [3], так как у носителей этого генотипа установлена более высокая концентрация IL1RN. Установлены также достоверные различия по присутствию суммарной группы генотипов, гомозиготных по *P2* и содержащих хотя бы один аллель *A2*: *A1/A2 P2/P2* и *A2/A2 P2/P2* – попарно между группами детей с ДФК и КФК (и здоровых) и с ДФК и СФК: OR = = 3.26, $p = 0.031$, 95%CI 1.05–10.36 и OR = 3.59, $p = 0.048$, 95%CI 1.00–14.44 соответственно. Следовательно эти генотипы выступают как факторы риска по наибольшей активности кариеса (декомпенсированной формы). Установлены достоверные различия по присутствию генотипов хотя бы с одним аллелем *P2* по *rs8179190* и с одним аллелем *A2* (“коротким”) по *rs2234663* между группами с ДФК и КФК (и здоровых) и с ДФК и СФК: OR = 2.96, $p = 0.021$; 95%CI 1.11–7.88 и OR = 3.34, $p = 0.026$; 95%CI 1.11–10.46 соответственно. Итак, генотипы, содержащие одновременно *P2* по *rs8179190* и *A2* по *rs2234663* являются генотипами риска по декомпенсированной форме кариеса.

Итак можно заключить, что генотипы с двумя “длинными” аллелями *L/L* в генотипе (500 или 410 пн) обусловливают устойчивость к ДФК, и что составные двухлокусные генотипы по *rs8179190* и по *rs2234663* (*A1/A2 P2/P2* и *A2/A2 P2/P2*) и генотипы, содержащие *P2* по *rs8179190* и *A2* (“короткий”) по *rs2234663*, обусловливают чувствительность к ДФК. Группа детей с СФК аналогично группе с КФК (и здоровых) достоверно отличается от группы с ДФК по тому же спектру маркеров изученных генов цитокинов. Выявленные особенности распространения полиморфных вариантов VNTR двух изученных генов цитокинов *IL1RN* и *IL4* в группах детей с ДФК, СФК и КФК (и здоровых) предполагают роль этих маркеров в развитии кариеса с максимальной степенью активности процесса (декомпенсированной формы кариеса). Ассоциации с кариесом по генотипам гена *IL-4* выявлены только для составных двухлокусных генотипов с участием аллелей *IL1RN*, что предполагает вероятную ассоциацию *IL-4* с высокой активностью кариозного поражения только в составе генотипов с геном *IL1RN*. При сравнении группы детей с СФК с группой КФК (и здоровых) не выявлено достоверных различий по распределению генотипов по *IL-4* и *IL1RN*. Группа СФК аналогично группе КФК (и здоровых) достоверно отличается от ДФК по тому же спектру маркеров изученных генов цитокинов. Это позволяет заключить, что изученные маркеры цитокинов вносят наибольший вклад в развитие кариозного процесса с высокой активностью поражения (ДФК) и не оказывают выраженного эффекта на кариозное поражение средней и низкой интенсивности (КФК и СФК), что предполагает возможные отличия в механизмах развития кариеса с разной активностью поражения. Полученные результаты могут служить доказательством о вовлеченности VNTR-локусов генов цитокинов *IL1RN* (*rs2234663*) и *IL4* (*rs8179190*) в ассоциацию с развитием высокоактивного поражения кариесом.

Работа выполнена в рамках Государственного задания “Геномные исследования и генетический полиморфизм клетки, организма и популяции” № 0112-2019-0001 и гранта РФФИ № р_а 16-44-230636.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ballantine J.L., Carlson J.C., Ferreira A.G. et al.* Exploring the genomic basis of early childhood caries: A pilot study // Int. J. Paediatric Dentistry. 2018. V. 28. P. 217–225. https://doi.org/10.1111/ipd.12344
2. *Удина И.Г., Гуленко О.В.* Молекулярно-генетические механизмы развития кариеса // Генетика. 2018. № 4. С. 426–434. https://doi.org/10.7868/S0016675818040045
3. *Cogulu D., Onay H., Ozdemir Y. et al.* Associations of interleukin (IL)-1β, IL-1 receptor antagonist,and IL-10 with dental caries // J. Oral Sci. 2015. V. 57. P. 31–36.
4. *Izumi T., Kobayashi I., Okamura K., Sakai H.* Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth // Arch. Oral Biol. 1995. V. 40. P. 609–614.
5. *Arend W.P., Palmer G., Gabay C. IL-1, IL-18*, and *IL-33* families of cytokines // Immunol. Rev. 2008. V. 223. P. 20–38.
6. *Kim C.H., Kang B.S., Lee T.K. et al.* IL-1β regulates cellular proliferation, prostaglandin E2 synthesis, plasminogen activator activity, osteocalcin production, and bone resorptive activity of the mouse calvarial bone cells // Immunopharmacol Immunotoxicol. 2002. V. 24. P. 395–407.
7. *Dinarello C.A.* Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism // Blood. 1991. V. 77. P. 1627–1652.
8. *Tarlow J.K., Blakemore A.I., Lennard A. et al.* Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat // Hum. Genet. 1993. V. 91. P. 403–404.
9. *Witkin S.S., Gerber S., Ledger W.J.* Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease // Clin. Infect. Dis. 2002. V. 15. № 34(2). P. 204–209.
10. *Fang F., Jian Pan J., Yiping Li Y. et al.* Association between interleukin 1 receptor antagonist gene 86-bp VNTR polymorphism and sepsis: A meta-analysis // Human Immunology. 2016. V. 76. P. 1–5.
11. *Nair R.R., Khanna A., Singh K.* Association of interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) gene polymorphism with recurrent pregnancy loss risk in the North Indian population and a meta-analysis // Mol. Biol. Rep. 2014. V. 41. P. 5719–5727. https://doi.org/10.1007/s11033-014-3443-8
12. *Konwar R., Bid H.K.* Location of the 70bp VNTR polymorphic site is in third intron of IL-4 gene // Indian J. Clin. Biochem. 2008. V. 23. P. 204–205.
13. *Kalkan G., Yigit S., Karakus N. et al.* Association between interleukin 4 gene intron 3 VNTR polymorphism and recurrent aphthous stomatitis in a cohort of Turkish patients // Gene. 2013. V. 527. P. 207–210.
14. *Виноградова Т.Ф.* Диспансеризация детей у стоматолога. М.: Медицина, 1988. 256 с.

Association of VNTR Polymorphims of the Genes Antagonist of Receptor of Interleikine 1 (*IL1RN*) and Interleikine 4 (*IL4*) with Dental Caries in Children

I. G. Udina[a, *], Yu. A. Vasiliev[b], V. V. Volobuyev[b], A. S. Gracheva[a, c], and O. V. Gulenko[b]

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

[b] *Kuban State Medical University, Krasnodar, 350063 Russia*

[c] *Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow, 107031 Russia*

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

In children of Krasnodar krai ($N = 159$), association of VNTR polymorphisms of two cytokine genes – antagonist of receptor of interleikine 1 (*IL1RN*) *rs2234663* and interleikine 4 (*IL4*) *rs8179190* with dental caries was studied in three groups of chidren with DFC (decompensated form of caries), with SFC (subcompensated form of caries) and with CFC (compensated form of caries), and healthy, statistically significant differencies were observed between groups by the presence of two "long" alleles *L/L* by *rs2234663*, including found alleles *A1* and *A4,* between groups of children with CFC and DFC and between SFC and DFC using ststistical analysis: OR = 0.33, $p = 0.014$; CI 95% 0.13–0.87 and OR = 0.35, $p = 0.035$; CI 95% 0.12–1.00 correspondingly. The genotypes with two "long" alleles *L/L* in genotype (500 or 410 bp) were demonstrated mediating resistance to highly active form of caries, and composed two loci genotypes by *rs8179190* and by *rs2234663*: *A1/A2 P2/P2* and *A2/A2 P2/P2* and genotypes, including at least one allele *P2* and one allele *A2* ("short") – susceptibility. Group of children with SFC analagous to the group of children with CFC (and healthy) statistically significantly differs from DFC by the same spectrum of the studied VNTR markers of two cytokine genes that suppose special role of the studied markers of twp cytokine genes in the development of highly active form of caries.

Keywords: children, caries, Krasnodar krai, *IL1RN* (*rs2234663*), *IL4* (*rs8179190*), VNTR, cytokine, association.