

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 7, 2022

Обзорные и теоретические статьи

- Транскриптомные исследования лососевых рыб рода *Oncorhynchus*
А. Д. Золотаренко, М. В. Шитова 737

Генетика растений

- Идентификация генов монодегидроаскорбатредуктаз (MDHAR) чеснока (*Allium sativum* L.) и их участие в ответе на заражение *Fusarium proliferatum*
О. К. Анисимова, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева, М. А. Филошин 754
- Роль *DOG1* и *FT* – ключевых регуляторов покоя семян в адаптации *Arabidopsis thaliana* северных природных популяций
М. В. Зарецкая, О. Н. Лебедева, О. М. Федоренко 765

Генетика животных

- Генетический контроль поведения крыс НИСАГ в тесте открытого поля
О. Е. Редина, С. Э. Смоленская, А. Л. Маркель 773
- Полногеномные исследования структуры популяций российских локальных пород черно-пестрого корня
А. С. Абдельманова, А. А. Сермягин, А. В. Доцев, А. Н. Родионов, Ю. А. Столповский, Н. А. Зиновьева 786

Генетика человека

- Микроматричный анализ транскриптома мононуклеаров периферической крови у больных раком легкого
В. И. Минина, В. Г. Дружинин, А. В. Ларионов, Е. Д. Баранова, В. Ю. Буслаев, Л. В. Мацкова, М. Л. Баканова 798
- Полиморфизм генов интерлейкинов IL-17A G197A и IL-17F A7488G у больных раком желудка в Западно-Сибирском регионе
М. А. Губина, И. Г. Соловьева, В. Н. Бабенко, А. В. Соколов, Е. Ю. Губина 808
- Мутационный анализ гена *F11* у пациентов с дефицитом FXI в России
О. С. Пшеничникова, В. Л. Сурин, Н. В. Сац, Е. В. Яковлева, О. С. Димитриева, Н. И. Зозуля 815
- Дизайн панелей предиктивных маркеров эффективности неоадьювантной химиотерапии трижды негативного рака молочной железы по результатам широкогеномного скрининга метилирования ДНК
А. И. Калинин, В. О. Сигин, Е. О. Игнатова, М. А. Фролова, Е. Б. Кузнецова, И. Ю. Виноградов, М. И. Виноградов, И. И. Виноградов, М. В. Немцова, Д. В. Залетаев, А. С. Танас, В. В. Стрельников 822
- Роль полиморфных вариантов генов-компонентов сигнального пути PTEN/PI3K/AKT в развитии рака предстательной железы
И. Р. Гилязова, Е. А. Иванова, М. А. Бермишева, М. В. Логинова, Д. Д. Асадуллина, Р. Р. Ишемгулов, А. Т. Мустафин, В. Н. Павлов, Э. К. Хуснутдинова 831
- Делеции *AZFc* региона Y-хромосомы у российских фертильных мужчин
В. Б. Черных, О. П. Рыжкова, И. А. Кузнецова, М. С. Казарян, Т. М. Сорокина, Л. Ф. Курило, О. А. Щагина, А. В. Поляков 838

Краткие сообщения

ДНК-технология и оценка дрейфа мутантных аллелей в популяциях голштинской породы и ее помесей

С. Н. Марзанова, Д. А. Девришов, И. С. Турбина, Н. С. Марзанов

846

Генетическая структура популяции *Apis mellifera* L. Алтайского края

М. Д. Каскинова, Л. Р. Гайфуллина, А. К. Кинзикеев,

А. Н. Гладких, М. П. Соколянская, Е. С. Салтыкова

851

Contents

Vol. 58, No. 7, 2022

Reviews and Theoretical Articles

Transcriptome Studies of Salmonid Fish of the Genus *Oncorhynchus*

A. D. Zolotareno and M. V. Shitova

737

Plant Genetics

Identification of Monodehydroascorbate Reductase Genes (MDHAR) in Garlic (*Allium sativum* L.) and Their Role in the Response to *Fusarium proliferatum* Infection

O. K. Anisimova, A. V. Shchennikova, E. Z. Kochieva, and M. A. Filyushin

754

Role of *DOG1* and *FT*, Key Regulators of Seed Dormancy, in Adaptation of *Arabidopsis thaliana* from Northern Natural Populations

M. V. Zaretskaya, O. N. Lebedeva, and O. M. Fedorenko

765

Animal Genetics

Genetic Control of the Behavior of ISIAH Rats in the Open Field Test

O. E. Redina, S. E. Smolenskaya, and A. L. Markel

773

Whole-Genomic Studies of the Populations' Structure in the Russian Local Black-Pied Breeds

A. S. Abdelmanova, A. A. Sermyagin, A. V. Dotsev,

A. N. Rodionov, Yu. A. Stolpovsky, and N. A. Zinovieva

786

Human Genetics

Transcriptome Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Lung Cancer Patients

V. I. Minina, V. G. Druzhinin, A. V. Larionov, E. D. Baranova,

V. Yu. Buslaev, L. V. Matskova, and M. L. Bakanova

798

Polymorphism of the Interleukin Genes IL-17A *G197A* and IL-17F *A7488G* in Patients with Gastric Cancer in the West Siberian Region

M. A. Gubina, I. G. Solovieva, V. N. Babenko, A. V. Sokolov, and E. Yu. Gubina

808

Mutation Analysis of *F11* Gene in Patients with FXI Deficiency in Russia

O. S. Pshenichnikova, V. L. Surin, N. V. Sats, E. V. Yakovleva,

O. S. Dimitrieva, and N. I. Zozulya

815

Design of Marker Panels for Prediction of Neoadjuvant Chemotherapy Response of Triple-Negative Breast Tumors Based on the Results of Genome-Wide DNA Methylation Screening

A. I. Kalinkin, V. O. Sigin, E. O. Ignatova, M. A. Frolova, E. B. Kuznetsova,

I. Y. Vinogradov, M. I. Vinogradov, I. I. Vinogradov, M. V. Nemtsova,

D. V. Zaletaev, A. S. Tanas, and V. V. Strelnikov

822

The Role of Polymorphic Variants of Genes-Components of the PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway in the Development of Prostate Cancer

I. R. Gilyazova, E. A. Ivanova, M. A. Bermisheva, M. V. Loginova, D. D. Asadullina,

R. R. Ishemgulov, A. T. Mustafin, V. N. Pavlov, and E. K. Khusnutdinova

831

Deletions in *AZFc* Region of Y Chromosome in Russian Fertile Men

V. B. Chernykh, O. P. Ryzhkova, I. A. Kuznetsova, M. S. Kazaryan,

T. M. Sorokina, L. F. Kurilo, O. A. Schagina, and A. V. Polyakov

838

Short Communications

DNA Technology and Estimation of Mutant Alleles Drift in Populations of the Holstein Breed and Its Crosses

S. N. Marzanova, D. A. Devrishov, I. S. Turbina, and N. S. Marzanov

846

Genetic Structure of the *Apis mellifera* L. Population from Altay Kray

*M. D. Kaskinova, L. R. Gaifullina, A. K. Kinzikeev,
A. N. Gladkih, M. P. Sokolyanskaya, and E. S. Saltykova*

851

**ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ**

УДК 577.21+574.24:597.553.2

**ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ЛОСОСЕВЫХ РЫБ РОДА *Oncorhynchus***© 2022 г. А. Д. Золотаренко¹, М. В. Шитова¹, *¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: shitova-m@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.11.2021 г.

После доработки 24.01.2022 г.

Принята к публикации 15.02.2022 г.

Данный обзор посвящен современному состоянию научных исследований лососевых в природных популяциях и в аквакультуре, выполненных при помощи высокопроизводительных методов анализа транскриптома. В нем описаны исследования, посвященные описанию молекулярных основ роста и развития рыб, а также работы, изучающие генетическую изменчивость, лежащую в основе экологических и эволюционных адаптаций рода *Oncorhynchus*. Охарактеризованы системные изменения профилей малых, длинных и кольцевых некодирующих РНК, возникающие в транскриптомах рыб в ответ на различные воздействия. Выявленные сигнальные каскады, играющие ключевые роли в развитии хозяйственно ценных признаков, могут быть использованы в качестве мишеней для селекции рыб в рамках целевых товарных характеристик.

Ключевые слова: транскриптомные исследования, род *Oncorhynchus*, микрочип, RNA-seq.

DOI: 10.31857/S0016675822070165

Высокопроизводительные методы анализа генома появились в молекулярно-генетической практике в середине 1990-х. В сотни раз увеличилась скорость накопления информации о последовательности, структуре и свойствах ДНК, РНК и белков. Использование транскриптомных подходов позволяет характеризовать не экспрессию отдельных генов, а изменения активности сигнальных каскадов в целом, что может быть использовано для определения молекулярных основ наблюдаемых фенотипических проявлений, например устойчивости и механизмов физиологической адаптации к неоптимальным условиям окружающей среды, таким как антропогенное загрязнение, гипоксия, колебания солености и экстремальные температуры. Затем кандидатные локусы могут быть дополнительно исследованы для лучшего понимания процессов микроэволюции, происходящих в популяциях.

На сегодняшний день наиболее распространенными высокопроизводительными методами оценки экспрессии генов являются микрочипы (microarray) и полногеномное секвенирование транскриптома (RNA-seq) [1]. Экспрессионные микрочипы – достаточно недорогой и высокопроизводительный метод анализа, однако он характеризуется низким динамическим диапазоном ($\sim 10^2$), низкой разрешающей способностью и плохой воспроизводимостью. Кроме того, этот метод не подходит для проведения *de novo* анализа

для тех организмов, геном которых еще не секвенирован. Полногеномное секвенирование транскриптома характеризуется достаточно широким динамическим диапазоном ($\sim 10^4$ – 10^5) и воспроизводимостью, возможностью оценки абсолютного уровня экспрессии, кроме того с его помощью можно проводить анализ *de novo* для тех организмов, геном которых еще не секвенирован, аннотировать новые гены, сплайс-варианты и некодирующие транскрипты. К недостаткам данного метода можно отнести высокую стоимость и сложность биоинформатического анализа.

В целом благодаря преимуществам метода полногеномного секвенирования транскриптома и постепенному снижению его стоимости в последние годы увеличивается количество работ, посвященных секвенированию геномов различных видов рыб, имеющих важное аквакультурное значение. Также увеличивается количество транскриптомных исследований, посвященных изучению сигнальных каскадов и поиска молекулярных основ различных биологических и товарных характеристик рыб рода *Oncorhynchus*.

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИИ
И ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ЛОСОСЕЙ**

Анализ транскриптома дает возможность понять какие каскады генов задействованы при переходе от одного жизненного этапа к другому,

охарактеризовать молекулярные основы важных жизненных процессов, таких как смолтификация, покатная миграция (миграция из пресной воды в соленую), анадромная миграция (миграция из соленой воды в пресную, на нерест), процесс хоминга (возврат в родные реки). Поиск генов-кандидатов, ответственных за формирование адаптаций на протяжении жизни рыб, дает понимание и представление о границах адаптаций лососевых, о разнообразии адаптивных стратегий, о масштабах генетического разнообразия внутри вида.

Транскриптомные исследования раннего периода жизни и смолтификации

Важный процесс в жизни лососевых — смолтификация — подготовка организма для перехода из пресной воды в соленую. У разных видов лососевых этот процесс наступает в разном возрасте, более того внутри одного вида существует широкий возрастной спектр. У горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*) и кеты (*Oncorhynchus keta*) мальки скатываются в море в тот же год, когда появились на свет. Но у кеты существует сильный возрастной разброс этого процесса — от нескольких месяцев до года малек может жить в пресной воде. У микижи (*Oncorhynchus mykiss*, она же радужная форель) существуют разные формы в пределах одной реки — мигрирующая (проходит стадию смолтификации и мигрирует в море) и резидентная (стадию смолтификации не проходит и постоянно живет в пресной воде). У нерки (*Oncorhynchus nerka*), кижуча (*Oncorhynchus kisutch*), сима (*Oncorhynchus masou*) и чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha*) малек до нескольких лет проводит в пресной воде, после чего скатывается в море.

Кульминацией процесса смолтификации является физиологическая адаптация к морской воде. Физиологически это проявляется в повышении продукции гормона роста, гормонов щитовидной железы и кортизола и увеличении длины тела относительно веса, из за чего смолты по сравнению с резидентами становятся более уязвимы [2–8].

У кеты уже на поздней эмбриональной стадии начинает формироваться механизм гипоосморегуляции. У мальков кеты еще до попадания в морскую воду начинает формироваться адаптация к соленой воде, чего не наблюдается у мальков других лососевых. Кета на стадии личинки (с желточным мешком) начинает активировать в жабрах богатые митохондриями клетки и проявляет высокую устойчивость к солености. В работе [9] проводили анализ транскриптома в период акклиматизации к солености: от пресной (0 промилле) до солоноватой (17.5 промилле) и морской воды (35 промилле). При переводе молоди из пресной в солоноватую воду увеличивалось число

экспрессируемых генов, участвующих в связывании ионов железа (в 1.56 раза), в активности калиевых каналов (в 1.12 раза) и в образовании комплекса калиевых каналов (в 1.15 раза) по сравнению с переводом из солоноватой в морскую. Изменение солености от солоноватой к морской увеличивало экспрессию генов, участвующих в адаптивном иммунитете. По-видимому, основные перестройки у кеты происходят в период до перехода в солоноватую воду и к моменту выхода в море процесс смолтификации уже завершен.

От того насколько успешно мальки пройдут уязвимые этапы жизненного цикла зависит их успех выживания и возврат на нерест. В работе [10] показано, что наиболее уязвимым периодом скатывающейся молоди кижуча является ранний морской период — это первая весна после ската и первая осень после ската. В данной работе анализировались изменения в экспрессии генов (микрочип cGRASP 44K) в четырех тканях (головной мозг, жабры, мышцы и печень) молоди кижуча на разных жизненных стадиях. Наибольшие изменения в транскриптоме мозга, жабр и мышц произошли между летним и осенним периодами в океане, возможно вследствие подготовки к миграции в районы кормления. Летняя, осенняя и зимняя молодь демонстрировала повышенный метаболизм, быстрый рост и отложение жира, тогда как весенняя молодь имела противоположные профили экспрессии. У весенних смолтов вскоре после входа в океан профили экспрессии генов отражали ограничения питания или недавнее голодание.

Не менее важным условием успешного выхода в море является способность малька противостоять патогенам пресной воды. В работе [11] было показано, что около 15% мальков гибло после выхода из питомника вследствие вирусных патогенов и повышенного уровня стресса. В данной работе смолтов нерки метили с помощью акустической телеметрии и прижизненно у каждой особи брали образцы ткани жабр в период, когда смолты покидали озеро Чилко (Британская Колумбия, Канада). Сравнивали профили экспрессии генов и анализировали связь между нагрузкой пресноводных патогенов и успешностью миграции в течение первых ~1150 км в северную часть Тихого океана. 15% смолтов не были обнаружены после выпуска и транскриптом их жабр соответствовал иммунному ответу на один или несколько вирусных патогенов. Среди значительно активированных генов у таких рыб были гены *MX* и *STAT1*, которые характерны для интерферонного ответа I типа, возникающего к вирусным возбудителям.

Важными биотическими факторами, влияющими на физиологические процессы молоди лососей, являются годовые ритмы. Например, сезонные изменения, регулирующие рост. Повышение темпе-

ратуры воды увеличивает скорость роста рыб, но удлинение фотопериода может иметь аналогичные последствия даже при постоянной температуре. В работе [12] изучали влияние короткого (зимний период) и длинного (летний период) светового дня на транскриптомные мышцы у быстро и медленно растущей радужной форели. Как оказалось, условия окружающей среды, обеспечивающие повышенные темпы роста, активируют профили экспрессии генов, сходные с наблюдаемыми у быстрорастущих рыб, в то время как сезонные периоды снижения роста по профилям экспрессии генов сходны с наблюдаемыми у медленно растущих рыб.

Молекулярные основы покатной и анадромной миграции

Как было сказано выше, у лососевых существует широкий спектр внутривидового разнообразия форм, что позволяет им адаптироваться к разным и непостоянным условиям обитания. У микижи, к примеру, внутри одной реки могут существовать несколько экологических форм, например мигрирующая и резидентная. В работе Хейла с соавт. [13] изучали транскриптом головного мозга микижи у особей, прошедших процесс смолтификации, и у резидентной микижи из Сашин-Крик, Аляска. Образцы собирали в двух временных точках: непосредственно перед (в возрасте 20 мес.) и во время (в возрасте двух лет) предполагаемого пика смолтификации. Было обнаружено 533 гена, которые дифференциально экспрессировались между смолтами и резидентными особями. Были выявлены гены-кандидаты, предположительно влияющие на выбор типа жизненной стратегии (например, *Pomc*). Было показано, что между мигрирующей и резидентной формами существуют различия в экспрессии генов фототрансдукции, что свидетельствует о различиях в процессах обработки световых сигналов в мозге. Также были выявлены различия между смолтами и резидентами в регуляции аппетита. Обнаружено, что нейропептид Y, участвующий в контроле аппетита, у смолтов был активирован по сравнению с резидентами. А у резидентов наблюдался более высокий уровень липидов. Все эти изменения вероятнее всего связаны с периодом голодания, который проходят смолты непосредственно перед смолтификацией [14–16].

Наряду со смолтификацией и покатной миграцией (выход из пресных водоемов в море) одним из важнейших жизненных этапов у лососей являются анадромные миграции (возврат в пресную воду из моря на нерест). Процесс поиска родной реки до сегодняшнего дня остается не до конца изученным. Считается, что в процессе поиска родной реки в разные периоды жизни у рыб задействованы разные органы. В период морской

миграции лососевые предположительно используют магнитные линии земли для “глобальной” ориентации в пространстве и поиска своего региона, а уже на подходах к рекам включаются обонятельные механизмы поиска запаха своей реки. Специфические пахучие факторы родной реки, которые были запечатлены в определенных областях нервной системы молоди лосося во время покатной миграции (выхода из рек в океан), используются взрослыми лососями для распознавания родной реки во время анадромной миграции (возврат на нерест из океана в реки). Существуют указания на то, что обонятельное восприятие пахучих сигналов родной реки одновременно запускает окончательное созревание гонад. В работе [17] была изучена функциональная связь между обонятельным восприятием нерестилища и окончательным половым созреванием. Анализировалась экспрессия обонятельных генов с помощью секвенирования РНК в ткани обонятельных розеток возвращающейся на нерест кеты в двух группах: из (1) прибрежного морского района (залив Ишикари, Ishikari Bay, Япония) и (2) из р. Читоси (Chitose River, Япония), около 75 км вверх по течению. Была детектирована экспрессия 75 известных и 27 неизвестных обонятельных генов лососевых, из которых 13 по-разному экспрессировались между рыбами из первой и второй групп, что свидетельствует о роли этих генов в процессе хоминга. Была выявлена связь между обонятельным восприятием нерестилища и половым созреванием через гонадотропин-рилизинг-гормон лососевых рыб (salmon gonadotropin-releasing hormone – sGnRH). Максимальный уровень sGnRH в мозге и максимальный уровень тестостерона в крови наблюдались у самок и самцов кеты в месте ответвления нерестового притока. Эти результаты подтверждают идею о том, что sGnRH помимо предполагаемой обонятельной роли играет роль в секреции гонадотропина в гипофизе кеты. Это указывает на функциональную связь между обонянием и репродуктивной регуляцией, с sGnRH в качестве прямого эффектора.

У лососей наблюдается разнообразие по возрасту возврата на нерест, и даже в пределах вида существуют несколько экологических форм, различающихся по времени возврата на нерест (ранняя и поздняя, летняя и осенняя, весенняя и летняя и т.д.). В работе [18] геномными методами исследовались эволюционные основы ранней миграции тихоокеанских лососей. Ранний возврат на нерест наблюдается в прибрежных популяциях микижи и чавычи. В этих популяциях рано мигрирующие особи (летние у микижи и весенние у чавычи) используют весенний паводок для того чтобы достичь нерестилищ выше по течению до наступления неблагоприятных условий в нижнем водоразделе, далее держатся в течение нескольких месяцев в глубоких прохладных ямах, достигают половой зрелости, а

затем нерестятся в то же время, что и поздние мигрирующие особи, только что вошедшие в пресную воду. Парные оценки F_{ST} показывают выраженную генетическую дифференциацию между локальностями (местами сбора выборок), но слабую дифференциацию между фенотипами миграции (ранние и поздние) из одной и той же локальности. Показано, что различия между местами нереста вносят больший вклад в генетические структуры популяций микижи и чавычи, чем различия между мигрирующими фенотипами в одной локальности. В данной работе [18] было обнаружено, что как у микижи, так и у чавычи ранняя миграция связана с одним и тем же локусом в области гена *GREBIL*, несмотря на то что с момента расхождения видов прошло от 10 до 15 млн лет [19, 20]. Изменчивость по этому локусу дает основания предположить, что аллели возникли отдельно у каждого вида и впоследствии распространились на отдаленные популяции через случайный положительный отбор. Результаты исследования [18] показывают, что сложная адаптивная изменчивость может зависеть от редких мутационных событий в одном локусе.

У рыб фенотипические вариации многочисленны и считаются отражением эволюционной адаптации к сильно изменчивой среде обитания. В последнее время были предприняты попытки выяснить геномную основу фенотипических признаков в диких популяциях. Изучение геномной изменчивости, лежащей в основе экологической и эволюционной адаптации, может значительно расширить наше понимание фенотипической изменчивости в природе. Например, у чавычи существует большое фенотипическое разнообразие форм, связанных с местными адаптациями. В центре ареала этого вида в Северной Америке обнаруживаются четко выраженные филогенетические линии: прибрежная, внутренняя океаническая и внутренняя ручьевая [21]. Прибрежная линия существует в двух экоформах: весенняя — входит в пресную воду незрелой и осенняя — входит в пресную воду зрелой. Линия внутреннего океанического типа наиболее генетически сходна с прибрежной линией, существует также в двух экоформах: летняя незрелая и осенняя зрелая. Внутренняя ручьевая линия сильно отличается от других — нерестовую миграцию осуществляют летние незрелые особи. Для поиска генетических основ такой вариативности в работе [22] было проведено ассоциативное картирование вариаций жизненного цикла и фенотипических признаков. Было обнаружено более 19 млн SNP (19627832 вариантных сайта во всех проанализированных популяциях). Полногеномный анализ полиморфизма показал, что у этого вида существует широкое фенотипическое разнообразие как внутри, так и между филогенетическими линиями. В работе подтвердилась роль гена-кандидата *GREBIL* в дифференцировании сроков ми-

грации (раннее или позднее прибытие на нерестилище) [18]. Недавние исследования на различных видах тихоокеанских лососей показывают, что *GREBIL* влияет на сроки полового созревания, что определяет время сезонной миграции взрослых особей, возвращающихся на нерест в прибрежных водотоках. В дополнение к *GREBIL* было обнаружено несколько генов на хромосоме 28, связанных со сроками полового созревания, в том числе ген-кандидат *ROCK1* и межгенные SNP. В предыдущих исследованиях *GREBIL* и *ROCK1* были охарактеризованы как рецепторы эстрогенов, участвующих в развитии эмбрионов у рыбок данио (*Danio rerio* [23]).

Существует множество абиотических факторов, которые могут повлиять на физиологию и биохимию рыб в период анадромных миграций и в конечном счете повлиять на успешный нерест лососей. Было показано, что температура воды в реке является стрессовым фактором для лососей в период анадромных миграций. Зачастую пики нерестового хода приходится на период до или после максимального подъема температуры воды в реке. В работе [24] сравнивали профили экспрессии в тканях жабр и печени между океанским и речным периодами миграции нерки, возвращающейся на нерест в р. Фрейзер (Британская Колумбия, Канада). Профили экспрессии показали, что транскриптом в процессе миграции сильно зависит от изменений абиотических и биотических условий на маршрутах миграции. Заметные сдвиги в экспрессии генов, связанные с изменением солености, температуры, воздействия патогенов и растворенного кислорода, указывают на то, что эти переменные окружающей среды наиболее сильно влияют на физиологию во время нерестовых миграций. Примечательно, что изменения транскрипции, связанные с осморегуляцией, в основном происходили заранее, задолго до того, как нерка столкнулась с пресной водой. Объединение методов транскриптомики и телеметрии позволило выявить экспрессионные различия между особями, дошедшими до нерестилища и принявшими участие в нересте (успешные мигранты), и особями, погибшими в период хода по реке (преждевременная смертность). Поиск биомаркеров показал, что оценки экспрессии всего 5–10 генов достаточно для прогнозирования выживаемости с высокой вероятностью. Параметрический анализ выживаемости продемонстрировал, что активность фактора транскрипции *CRSP* в значительной степени предсказывает выживаемость особей, что позволило определить его как потенциальный биомаркер выживаемости особей нерки.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ

Аквакультура – самый быстроразвивающийся агробизнес на сегодняшний день. В частности, форелеводство является высокоинтенсивной отраслью рыбоводства, позволяющей получать большое количество рыбы с единицы площади. Хозяйства по выращиванию и разведению лососей должны удовлетворять растущий потребительский спрос. Дополнительные усилия сосредотачиваются на разработке генетически улучшенных линий и пород для достижения быстрого и эффективного производства рыбы с высоким выходом филе высокого товарного качества. Важное значение в аквакультуре придается улучшению технологических процессов воспроизводства и выращивания лососей, а также снижению затрат на корма и повышению кормового коэффициента. Транскриптомные исследования могут помочь в выявлении молекулярных основ хозяйственно ценных фенотипов, таких как ускоренный рост, потребление и усваивание кормов с пониженным содержанием животного белка, высокое качество филе (насыщенный цвет, содержание жира), икра с высокой степенью оплодотворяемости, мальки с высоким процентом выживаемости.

Филе рыбы – самая питательная и экономически важная часть рыбы. В нем много белка и в зависимости от вида относительно мало жира. Товарный выход филе и качество мяса сильно влияют на потребительский спрос. На товарный выход филе лососевых влияют несколько переменных, таких как вес и конечный возраст вылова, питание, половой статус и генетические факторы. Характеристики качества филе, такие как жирность, цвет и текстура, являются основными определяющими факторами для потребителей. Недавно для улучшения качества мяса радужной форели был введен генетический отбор. Отбор по содержанию жира повлиял на цвет и текстуру филе, также этот подход улучшил коэффициент усвояемости корма и эффективность усвояемости белка у радужной форели.

В работе [25] изучали молекулярные основы красной и белой окраски филе у рыб, выращенных в одних и тех же экспериментальных условиях, для лучшего понимания механизма поглощения астаксантина (Ах) у чавычи. Пилорические придатки, печень и мышцы были выбраны в качестве наиболее вероятных органов, которые участвуют в поглощении, метаболизме и удержании Ах соответственно. Анализ показал, что в мышцах и в печени было относительно мало дифференциально экспрессированных генов (31 и 43 гена соответственно) по сравнению с 1125 генами, по-разному экспрессированными в пилорических придатках у рыб с белым и красным цветом филе. Была выявлена повышенная экспрессия гена *SCARBI* у красной чавычи, в то время как у белой чавычи были более высокие уровни экспрессии генов *NPC1L1*, коллагена альфа-1, а также *BCO2*, что

может указывать на роль последнего в деградации астаксантина у белой чавычи.

Избыточное накопление жира у сельскохозяйственных животных, в том числе у рыбы, существенно влияет на качество мяса и стоимость корма. Повышенное накопление жира является наследственным количественным признаком радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*). В работе [26] было проведено секвенирование транскриптома печени радужной форели с высоким и низким содержанием жира в туше. Всего было идентифицировано 1694 дифференциально экспрессированных транскрипта, включая большое количество генов, участвующих в метаболизме липидов. Было выявлено, что активность процессов метаболизма липидов в печени может обуславливать разницу в содержании жира в тушах. Были выявлены гены-кандидаты, которые могут выступать в качестве маркеров разных уровней накопления жира – *PPAR-α* и *PPAR-β*, которые можно использовать для геномного отбора.

Одной из потребностей аквакультуры является улучшение скорости роста и качества мускулатуры лососевых. До сих пор не было достигнуто большого прогресса в этой области, поскольку на эти признаки влияет совокупность генетических и негенетических факторов, что усложняет геномный отбор. Геномные технологии могут быть полезны для выявления подходящих генетических маркеров для направленной селекции. В серии работ [27, 28] изучались полигенные признаки, являющиеся результатом многофакторных взаимодействий. Были использованы такие показатели роста и качества мышц как (1) масса тела, (2) мышечная масса, (3) содержание жира в мышцах, (4) количество мышечных волокон на единицу площади и (5) цвет филе.

В работе [28] исследовали экспрессию микроРНК и генетический полиморфизм в сайтах связывания микроРНК в генах-мишенях, ассоциированных с фенотипическими вариациями роста и качества мышц. У рыб из 22 семейств, показывающих разные фенотипы, анализировали транскриптомы мышц. Было идентифицировано 78 SNP, ассоциированных с различиями в мышечных характеристиках. Большинство связанных с фенотипом SNP присутствовало в сайтах связывания микроРНК в генах, участвующих в энергетическом метаболизме и структуре мышц. Эти данные свидетельствуют о том, что вариации в экспрессии микроРНК и/или вариации последовательности в сайтах связывания микроРНК в генах-мишенях играют важную роль в различиях в фенотипах роста рыб и качества мышц. В работе [27] использовали два биоинформатических алгоритма, GATK и SAMtools для обнаружения кодирующих и функциональных SNP с аллельным дисбалансом для перечисленных выше признаков. Оценка распределения SNP с аллельным дисбалансом показала высокую плотность по всем пяти признакам в нескольких хромосомах, особенно в хромо-

сомах 9, 20 и 28. Большинство генов, содержащих SNP, были отнесены к важным метаболическим путям, связанным с ростом. SNP, идентифицированные в этом исследовании, были включены в новый дизайн SNP-Chip (от Affymetrix) для геномного и генетического анализа радужной форели.

В работе [29] предприняли попытку идентифицировать гены, связанные с генетической изменчивостью роста. Был проведен анализ транскриптома мышц и поиск полиморфизмов в популяции радужной форели с высокими показателями роста. 22 SNP и один митохондриальный гаплотип были ассоциированы с показателями роста. Полиморфизм 48 маркеров был подтвержден на других коммерчески важных аквакультурных линиях. Исследование показало, что даже при низком покрытии RNA-Seq в дивергентных популяциях является быстрым и эффективным методом для идентификации SNP с аллельным дисбалансом между фенотипами. Этот метод подходит для разработки маркеров у немодельных видов, у которых отсутствуют полные и хорошо аннотированные референсные последовательности генома.

Оптимизация условий выращивания для максимального увеличения роста рыбы является одним из важнейших аспектов коммерческой аквакультуры, поскольку на рост рыбы сильно влияют условия окружающей среды и питание [30–32]. В работе [33] оценили влияние плавания умеренной интенсивности на транскриптомы красных и белых типов мышц радужной форели, получавшей богатую углеводами диету. Анализ транскриптомов мышц у отдохавших или плававших в течение 30 дней рыб выявил значительные изменения в экспрессии 218 генов. Плавание вызывало ряд физиологических изменений: гипертрофию волокон, увеличение поглощения и использования углеводов в качестве топлива, увеличение накопления белка и результирующий эффект экономии белка. Кроме того, плавание увеличивало использование углеводов из пищи не только за счет увеличения экспрессии *GLUT4*, но и за счет активации гликолиза как в белых, так и в красных мышцах форели. Кроме того, увеличивалась аэробная выработка АТФ из глюкозы, особенно в красных мышцах. Таким образом, плавание может применяться в качестве “стимулятора метаболизма”, увеличивающего расход энергии и тем самым стимулирующего темпы роста форели. Кроме того, результаты этой работы впервые подтверждают потенциальные иммуномодулирующие эффекты физических упражнений у рыб.

Быстрое увеличение спроса на рыбную продукцию и объемов выращивания рыб в последние годы привело к росту потребности в кормах. Для интенсификации производства и снижения издержек зачастую большая часть рыбной муки и рыбьего жира в корме заменяется растительными ингредиентами. Однако широкое использование растительных продуктов имеет ряд известных не-

достатков, особенно в отношении различий в составе аминокислот, холестерина и жирных кислот, а также наличия антипитательных веществ, обнаруженных в растительных кормах. В работе [34] оценивалось влияние растительных кормов на мальков (10 г) и на нагуливающую молодь (250–350 г) микижи. Через 13 мес. растительного питания в размерах молоди различий не наблюдалось, а подростые особи отставали по массе (234 против 330–337 г). Процент содержания жира у молоди на растительном питании был выше (13.2 против 9.4–9.9%), а жирнокислотный состав соответствовал составу питания. Анализ транскриптомов кишечника показал, что у молоди на растительном питании наблюдалось снижение активности каскадов белкового катаболизма, метаболизма и траффика углеводов. Чтобы исследовать молекулярные основы адаптивности микижи, были проанализированы транскриптомы трех изогенных линий мальков микижи (R23h, AB1h и A22h), различающихся по реакциям на растительное питание [35]. Через пять недель проанализированные линии имели более низкую массу, чем на полном рационе, а также различались между собой, отражая более или менее успешную адаптацию к растительному питанию. Авторы предположили, что общее для всех линий снижение массы возникало из-за того, что повышенное содержание глутаминовой кислоты в растительном питании приводило к изменениям в двигательной активности и в поведении рыб при кормлении. Анализ транскриптомных данных выявил различия между линиями в экспрессии генов, связанных с аппетитом и сенсорным восприятием пищи, в экспрессии генов, участвующих в метаболизме серосодержащих аминокислот, что могло приводить к наблюдаемым различиям в массе рыб. В дальнейшей работе той же группы авторов [36] попытались более детально охарактеризовать различия между изученными генотипами. Те же изогенные линии радужной форели сравнивали через 5 мес. кормления растительным (V-диета) или морским рационом (M-диета). Были описаны характеристики рыб и проанализированы печеночные транскриптомы. Рыбы R23h и AB1h, которые меньше всего пострадали от V-диеты, показали самый высокий рост. Они были способны поддерживать высокий уровень выработки энергии и синтеза белка на растительном питании, а их транскриптомы отличались активностью каскадов, связанных с метаболизмом липидов и холестерина [37, 38]. По-видимому, лососевые обладают большим разнообразием стратегий, которые могут быть реализованы генотипами для выживания и роста при выращивании на растительном рационе.

В исследовании [39] оценивали потенциальное влияние селенсодержащих добавок Sel-Plex на противовирусную защиту рыб. Микижу подвергали воздействию poly(I:C), синтетического аналога двуспиральной РНК (лиганда *TILR3*), на фоне обогащенного селеном питания и проводили анализ транскриптома печени и пронефроса при помощи

микроципов. В целом обогащение питания селеном активировало в пронефросе экспрессию генов, связанных с кровотообразованием и иммунитетом. В печени наблюдалась менее интенсивная реакция, и добавки селена приводили лишь к активации липидного обмена. При стимуляции *roly(I:C)* подкормка селеном увеличивала экспрессию основных медиаторов противовирусной защиты, особенно *IFN γ* , и активировала клеточный иммунный ответ.

Качество икры, используемой в разведении, – важный признак в товарном рыбоводстве. От него зависит конечный выход рыбы и затраты рыбного хозяйства. В настоящее время ведутся исследования по созданию биомаркеров для прогнозирования качества икры, используемой в разведении.

В работе [40] идентифицировали miRNA, которые связаны с качеством икры радужной форели, используя икру постовуляторного возраста. Анализировалась икра, полученная от самок на 1-й, 7-й и 14-й день после овуляции с коэффициентами оплодотворения 91.8, 73.4 и менее 50%. Четыре известные (*omy-miR-193b-3p*, *omy-miR-203c-3p*, *omy-miR-499-5p* и *omy-miR-7550-3p*) и две новые miRNA (*omy-miR-nov-95-5p* и *omy-miR-nov-112-5p*) показали более высокую экспрессию в 1-й день по сравнению с 14-м днем после овуляции. Их гены-мишени были связаны со стрессовой реакцией, гибелью клеток, повреждением ДНК, генерацией АТФ, трансдукцией сигнала и регуляцией транскрипции. Дальнейшее изучение этих miRNA может помочь при разработке биомаркеров для прогнозирования качества икры радужной форели.

Материнские мРНК в яйцеклетках имеют короткие поли(А) хвосты после посттранскрипционного процессинга, необходимого для их стабилизации. Транскрипция в ооците на поздней стадии отсутствует, поэтому материнский транскриптом, хранящийся в ооците, обеспечивает почти всю мРНК, необходимую для созревания ооцита, оплодотворения и раннего развития эмбриона. Транскриптом неоплодотворенного яйца может предоставить маркеры для прогнозирования качества яйцеклеток и диагностики проблем при получении эмбрионов, с которыми сталкиваются рыбные хозяйства. В работе [41] проводился анализ транскриптома, сравнивали содержание общей мРНК и мРНК с поли(А) среди неоплодотворенных яйцеклеток разного качества. Секвенирование общей мРНК позволило идентифицировать два дифференциально экспрессируемых транскрипта. Секвенирование мРНК с поли(А) выявило 945 дифференциально экспрессируемых транскриптов между яйцеклетками низкого и высокого качества, 1012 между яйцеклетками низкого и среднего качества и только 2 между яйцами среднего и высокого качества. В яйцеклетках низкого качества было значительно меньше транскриптов митохондриальных генов и самой мтДНК. Многие из выявленных дифференциально экспрессируемых транскриптов между яйцеклетками низкого

и высокого качества были связаны с рибосомными и митохондриальными функциями. Данные результаты показывают, что различия в качестве яйцеклеток могут возникать из-за различий в активности материнских ядерных транскриптов и цитоплазматического полиаденилирования перед овуляцией. Сравнение транскриптомов позволяет предположить, что в яйцеклетках низкого качества нарушены окислительное фосфорилирование и трансляция.

Не менее важный признак в товарном рыбоводстве – качество эмбрионов и скорость эмбрионального развития. У радужной форели и других рыб скорость эмбрионального развития является важной характеристикой, которая тесно связана с выживаемостью и физиологическими показателями в дальнейшей жизни. В работе [42] исследовали экспрессию генов на разных этапах развития у эмбрионов радужной форели с быстрой или медленной скоростью развития. Эмбрионы собирали через 15, 19 и 28 дней после оплодотворения. Всего было идентифицировано 183 локуса со значительными различиями между типами скорости эмбрионального развития. У быстро развивающихся эмбрионов по сравнению с медленно растущими были значительно выше экспрессированы гены, связанные с ростом, клеточным циклом, сокращением мышц и синтезом белка, что может объяснять их быстрый рост и раннее эмбриональное развитие.

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ТРАНСКРИПТОМЫ РЫБ РОДА *Oncorhynchus*

К стрессовым воздействиям в аквакультуре относятся широкий спектр абиотических и биотических факторов: неоптимальная температура, сниженное содержание кислорода, избыточная соленость воды, патогены, межвидовая и внутривидовая конкуренция, хищники. Все эти факторы оказывают различные по интенсивности воздействия: начиная от умеренных изменений на молекулярном уровне и заканчивая повышенной восприимчивостью к болезням, иммуносупрессией, расстройствами поведения и повышением смертности [43]. Транскриптомные подходы позволяют не только идентифицировать гены, дифференциально экспрессированные в ответ на стрессовые воздействия, но и выявить обогащенные генные онтологии, пути и сигнальные каскады. Это позволяет идентифицировать молекулярные основы наблюдаемых изменений и их ключевые регуляторные элементы, а также разработать молекулярные биомаркеры, которые могут быть использованы для мониторинга стрессовых условий.

Тепловой стресс

Экологически и экономически важные виды тихоокеанских лососей могут подвергаться воз-

действию повышенной температуры воды на решающем этапе в онтогенезе — во время их миграции вверх по течению на нерест. Миграция в пути до нереста в теплой воде связана с увеличением случаев преждевременной смертности, особенно для популяций на южной периферии их распространения [44]. Патологический эффект от температурных воздействий является накопительным, увеличиваясь с повышением температуры и продолжительности воздействия. На начальных этапах клеточного стресс-ответа активируется защита макромолекул при помощи белков-шаперонов, перераспределения метаболических ресурсов от гомеостатических функций в сторону стрессовых реакций, обратимой остановки клеточного цикла. В случаях более сильного стресса активируется запрограммированная гибель клеток по пути апоптоза [45].

Микижа относится к холодноводным рыбам, оптимальная температура воды для нее — 15–18°C и ниже. Температуры в диапазоне 18–23°C являются неоптимальными, рыбы начинают испытывать стресс, в их печени наблюдаются патологические изменения, постепенно активируются воспалительные процессы и снижается активность иммунной системы, а при 25–28°C ткани критически повреждаются и наблюдается гибель рыб [43]. Растущие при тепловом стрессе рыбы имеют пониженные длину, массу и скорость роста [46]. Сравнение транскриптома пронефроса микижи при тепловом стрессе (24°C) и в контроле (18°C) показало, что наиболее активированной группой генов при тепловом стрессе являлись гены белков теплового шока, кофакторов и кошаперонов [47], были затронуты каскады фолдинга и деградации белков, посттранскрипционной регуляции сплайсосом, а также иммунные профили рыб. В тканях жабр отмечались сходные изменения профилей экспрессии, а также активация каскадов врожденного иммунитета (системы комплемента и коагуляции), приобретенного иммунитета и метаболизма липидов. Экстремально высокая температура (25°C) приводила к обширным изменениям сигнальных профилей — от каскадов репликации ДНК, процессинга белков в эндоплазматическом ретикулуме и гликолиза до гемолиза, тромбоза и гипертензии [48].

Для горбуши и нерки оптимум температур находится чуть ниже, чем для микижи, 13–14°C, а температуры выше 19°C уже приводят к физиологическому стрессу [49]. В исследовании горбуши и нерки, которых в течение 5–7 дней выдерживали при температуре 19°C, наблюдались активация клеточных стресс-реакций и преждевременная смертность [49]. Среди генов с наиболее измененной экспрессией были *SERPINH1* и гены белков теплового шока *HSP90AB1* и *HSP90AA1*, а наиболее ингибированными были гены *FKBP10* и *CIRBP*. Наибольшее влияние тепловой стресс оказал на каскады окислительно-восстановительного, кальциевого и ионного гомеостаза клеток, а также на

биосинтез, фолдинг и метаболизм белков. В другом исследовании, где нерку держали при температуре 19°C, наблюдались также изменения в экспрессии генов иммунного ответа. Кроме того, у рыб в плазме обнаруживались повышенные уровни лактата и хлоридов, что свидетельствует о нарушении осмотического гомеостаза в результате теплового стресса [50].

Чавыча, как и другие рыбы рода, является холодноводной и имеет оптимальную температуру ниже 18°C. При выдерживании чавычи при температурах 18–21°C запускалась активация клеточных стресс-реакций на повышенную температуру: наблюдалось постепенное повышение экспрессии белков теплового шока *HSP70*, *HSP90*, изменение профилей экспрессии генов с постепенным увеличением количества затронутых каскадов, а продолжение стресса приводило к инактивации белков, осуществляющих нормальные клеточные функции, и заканчивалось клеточным арестом и апоптозом клеток [45]. Исследователи отметили, что транскриптомные изменения являлись тканеспецифичными.

Инфекции

Одним из основных биогенных стрессорных факторов, воздействию которых подвергается рыба как в диких условиях, так и в условиях искусственного воспроизводства, являются инфекционные заболевания, вызываемые простейшими, бактериями, вирусами и другими патогенами. Транскриптомный анализ особей, являющихся носителями тех или иных инфекционных заболеваний, позволяет выявить гены и сигнальные каскады, задействованные в патогенезе инфекции, описать динамику патологии, найти генетические основы предрасположенности к заболеванию. Так, например, восприимчивость сальмонид к эктопаразиту *Lepeophtheirus salmonis* связана с развитием воспалительной реакции в области прикрепления паразитов. Атлантический лосось, или семга (*Salmo salar*), а также кета являются восприимчивыми видами, в то время как горбуша — относительно устойчивый вид. Исследования показали, что устойчивость горбуши развивается постепенно с ростом размеров мальков [51], а молекулярными основами устойчивости являются развитие острой фазы воспаления в области прикрепления паразита, повышенная экспрессия генов, участвующих в воспалении — *MHC class II*, *IL-6*, *CRP*, *MMP13*, *IL-1β* и *COX-2* [52], активация Th17-опосредованной иммунной реакции и системы врожденного иммунитета, чего не наблюдается у кеты и семги. Кроме того, исследователи предположили, что особенности поведения или химические аттракторы также могут играть роль в “привлекательности” рыб для паразитов [53]. Последствиями повышенной инфекционной нагрузки у кеты и семги стали повышенные уровни кортизола, снижение набора веса и сниженный

гематокрит, что могло провоцировать угнетение роста и дальнейшее снижение иммунитета.

Еще один вид паразитических копепод, заражающий лососевых рыб, — *Caligus rogercresseyi*. Сравнительный анализ транскриптомов семги и кижуча показал, что у кижуча, вида более устойчивого к данному патогену, в ответ на заражение развивался Th1-иммунный ответ, сопровождавшийся повышенной экспрессией генов *STAT5*, *IL1R*, *IFN γ* , *CD83*, *T-BET*, *TLR13* и *TLR19*, в то время как у семги наблюдалась повышенная экспрессия *MMP13*, *COX2*, *IL10*, *CCR3*, *TLR22A2* и *TLR21*. Таким образом была показана роль активации Th1 и Толл-подобных рецепторов в развитии устойчивости к *C. rogercresseyi* [54].

Заболевания, вызванные паразитами класса Мухозоа, представляют значительную угрозу для здоровья лососевых рыб как в дикой природе, так и в аквакультуре, поскольку на сегодняшний день отсутствуют эффективные препараты для лечения таких патологий. Однако существуют популяции рыб, устойчивые к патогенам данной группы. Для того, чтобы выяснить основы такой устойчивости, в работе [55] был проведен анализ транскриптома жабр и кишечника микижи на ранних стадиях заражения *Ceratonova shasta*, патогеном, вызывающим кератомикоз. Исследование показало, что при заражении в жабрах обеих популяций был ингибирован интерфероновый сигналинг, что может свидетельствовать о подавлении иммунитета хозяина патогеном на ранней стадии инвазии. Более устойчивая популяция быстро сдерживала распространение инфекции, и на 7-й день после заражения профили экспрессии показывали активацию Т-клеток как в жабрах, так и в кишечнике, в то же время у восприимчивой популяции лишь на 14-й и 21-й день наблюдалась дифференциальная экспрессия генов иммунного ответа, что свидетельствует о замедленной иммунной реакции восприимчивых популяций. Исследователи предположили, что чувствительные популяции рыб, вероятно, не могут распознать патогена, либо не активируют должной иммунной защиты в отличие от более устойчивых популяций. Секвенирование транскриптома кишечника устойчивой популяции рыб показало активацию интерферонового сигналинга, а также клеточной адгезии и миграции. В ответ на инфекцию наблюдались выраженное отвердение тканей кишечника и сильная воспалительная реакция в подслизистых слоях. Был сделан вывод, что устойчивость к кератомикозу зависит от скорости индукции ключевых иммунных факторов и от тканевого ответа, который за счет остро локализованного воспаления ограничивает распространение патогена и повреждение тканей [56].

Длительное время фурункулез в аквакультуре лечили применением антибиотиков, что привело к развитию антибиотикоустойчивой водной микрофлоры. Это подчеркнуло необходимость поиска других подходов, например поиска иммуномо-

дуляторов, стимулирующих развитие устойчивости к заболеванию. β -Глюкан является одним из иммуномодуляторов, для которого была показана эффективность в защите рыб от бактериальных инфекций [57]. Для изучения механизма участия β -глюкана в развитии иммунной защиты у микижи провели полногеномное секвенирование транскриптома рыб, которых в течение 42 дней кормили кормом с 0.2% β -глюкана, а затем заражали *A. salmonicida*. Анализ показал, что у рыб, получавших β -глюкан, были активированы сигнальные каскады иммунного ответа — системы компонента, Толл-подобных рецепторов, процессинга и презентации антигена, рецепторов Т-клеток, а также каскады активации тромбоцитов и коагуляции. Таким образом исследование выявило молекулярные основы иммуностимулирующего действия β -глюкана [58].

Бактерии рода *Flavobacterium* вызывают бактериальную холодноводную болезнь, или RTSF (rainbow trout fry syndrome). В исследовании [59] оценивали профили экспрессии скелетной мускулатуры микижи при экспериментальном заражении *F. psychrophilum*. Среди 233 генов с повышенной экспрессией большая часть была связана с убиквитин-опосредованным протеолизом и апоптозом. Среди 189 генов с пониженной экспрессией большинство участвовало в процессах сокращения скелетной мускулатуры. Кроме того, наблюдаемое повышение активности каспаз позволило авторам выдвинуть предположение об атрофии скелетной мускулатуры, вызванной *F. psychrophilum*.

Yersinia ruckeri является патогеном, вызывающим у микижи йерсиниоз, септическое заболевание рыб. Анализ транскриптома селезенки рыб через 24 ч после заражения показал, что среди дифференциально экспрессированных генов были гены, ассоциированные с функционированием иммунной системы, такие как *CCR9*, *CXCL11*, *IL-1B*, *CARD9*, *IFN*, *TNF*, *CASP8*, *NF-KB*, *NOD1*, *TLR8A2*, *HSP90* и *MAPK11*. Эти гены участвуют в сигнальных каскадах взаимодействия цитокинов и их рецепторов, Толл-подобном сигналинге, каскадах Rig-I-подобных и NOD-подобных рецепторов, а также в *Mapk*-путях. Исследование дало предварительное представление о молекулярных основах иммунного ответа на заражение *Y. ruckeri* [60].

Ichthyophthirius multifiliis поражает жабры, плавники и кожу различных пресноводных рыб. Для анализа иммунного ответа в коже было проведено экспериментальное заражение микижи данным патогеном [61]. Анализ транскриптома показал, что инфекция *I. multifiliis* вызывала активацию как врожденного, так и адаптивного иммунитета, например путей хемокинового сигналинга, активации тромбоцитов, Толл-подобного сигналинга, NOD-подобного сигналинга, трансэндотелиальной миграции лейкоцитов. Наблюдалась повышенная экспрессия *TLR8* и различных хемокинов (*CCL4*, *CCL19*, *CCL28*, *CXCL8*, *CXCL11*, *CXCL13*,

CXCL14), что подчеркивает их роль в распознавании данного патогена и развитии воспалительной реакции. Анализ микробного разнообразия кожи показал, что в микробиоме наблюдалось снижение разнообразия комменциальной микрофлоры (в первую очередь протеобактерий) и увеличение представленности оппортунистической флоры (флавобактерий) [62].

Транскриптомный анализ ответа рыб на различные инфекции показал, что несмотря на общие каскады воспаления, активирующиеся при заражении, различные инфекции характеризуются специфичными паттернами изменений транскриптома, что во многих случаях позволяет выявить ключевые элементы патогенеза.

Токсичность

Загрязнение воды является одним из основных антропогенных факторов нагрузки на пресноводные экосистемы, что ставит под угрозу их стабильность и устойчивость и приводит к сокращению численности видов. Промышленные, бытовые и сельскохозяйственные сточные воды являются наиболее значимыми источниками загрязнения водных экосистем. Для оценки токсического воздействия на различные системы и органы рыб широко применяются транскриптомные исследования, позволяющие идентифицировать группы генов и сигнальных каскадов, являющихся мишенями токсического воздействия.

В работах [63–65] проводилась оценка токсичности различных концентраций бифентрина, пиретроидного инсектицида, применяемого на возделываемых культурах – картофеле, плодовых, овощных, зерновых, хлопчатнике, сое и других. Бифентрин часто обнаруживается в бассейнах рек, протекающих по сельхозугодьям, и его концентрации в верхних слоях воды зачастую превышают пороговые уровни хронической токсичности для различных видов беспозвоночных и рыб. Одна из основных мишеней его токсичности – нервная ткань. Исследования показали, что в мозге чавычи и микижи бифентрин может влиять на жизнеспособность нейронов, вызывая воспаление, избыточное производство активных форм кислорода, апоптоз и некроз клеток. Помимо этого он влияет и на передачу сигналов, вероятно через изменения сигнальных каскадов, опосредуемых жирными кислотами.

Другой группой токсических агентов являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), широко распространенные загрязняющие вещества, попадающие в водную среду из атмосферных осадков, муниципальных и промышленных стоков, выходов и разливов нефти. ПАУ оказывают сильное эмбриотоксическое воздействие на рыб, вызывают окислительный стресс и повреждение ДНК, нарушение функций щитовидной железы и эндокринной системы. Некоторые ПАУ способны воздействовать с арил-гидрокарбо-

новым рецептором и проявлять диоксиноподобную токсичность, например ретен, пирен и фенантрен, которые проявляют кардиотоксический эффект. Для исследования механизма кардиотоксичности оценивали изменения транскриптома сердечной мышцы у микижи [66, 67]. При обработке мальков на ранних стадиях развития не появлялось практически никаких значимых пороков развития и задержек роста, однако наблюдались изменения в экспрессии ключевых сигнальных каскадов, связанных с развитием и функционированием сердца. Ретен в первую очередь влиял на ионные каналы в клетках, гомеостаз кальция и сокращение сердечной мышцы. Пирен и в меньшей степени фенантрен влияли на дыхательную цепь переноса электронов, метаболизм кислорода и железа.

Бисфенол А (БФА) широко используется в производстве пластмасс и эпоксидных смол и является часто встречающимся загрязнителем водной среды. БФА вызывает нарушения развития, метаболизма и репродукции у рыб, а накопление БФА в икре влияет на рост и устойчивость к стрессовым воздействиям у появляющихся мальков. Анализ показал, что при выведении мальков из икры, содержащей БФА, у двух поколений потомков наблюдались снижение массы тела, измененная динамика роста, нарушения метаболизма белков и жиров [68].

Гормоны

Помимо токсических агентов, попадающих в пресноводные экосистемы, патологическое воздействие на их обитателей могут оказывать гормоны и гормоноподобные вещества, попадающие в воду с сельскохозяйственных угодий (например, вымываемые из вносимого навоза). Так, эстрон (E1), природный эстроген, обнаруженный в сточных и поверхностных водах, вызывает у рыб нарушения функционирования эндокринной системы. Для оценки наблюдаемого патологического эффекта в исследовании [69] проводили обработку мальков микижи эстрогеном в концентрации 0.1 нМ в течение семи дней и затем анализировали изменения транскриптома рыб. Было показано, что уже через четыре дня воздействия наблюдались изменения в сигнальных каскадах иммунного ответа, апоптоза, свертываемости крови, метаболических каскадах и в функционировании эндокринной системы. Значительно изменялась экспрессия генов, обеспечивающих вителлогенез, что свидетельствует о влиянии ксеноэстрогенов на половую функцию рыб.

В исследовании [70] оценивали влияние этилэстрадиола (EE2) на гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось. Было показано, что в ответ на EE2 наиболее значимыми изменениями экспрессии характеризовались гены лютеинизирующего и фолликул-стимулирующего гормона, а также гены синтеза гонадотропина. Кроме ожидаемых изменений эндокринного профиля, наблюдались

изменения циркадных ритмов, кальциевого сигналинга, PPAR-опосредованного сигналинга и нетринового сигналинга. Анализ показал потенциальные взаимодействия между генами, участвующими в регуляции циркадных ритмов и гонадолиберина, что позволило авторам выдвинуть предположение о влиянии ЕЕ2 на регуляцию циклов репродукции рыб.

Плотность посадки

Избыточная плотность посадки может оказывать стрессовое влияние на рыб, нарушая их гомеостаз и влияя на иммунокомпетентность. Для того чтобы охарактеризовать гомеостатические реакции кишечника на избыточную плотность посадки и оценить потенциальное благотворное влияние функциональной диеты на рыб, было проведено транскриптомное исследование влияния выращивания при субоптимальной плотности на нейро-иммунную и эндокринную системы микижи [71]. Через месяц содержания при избыточной плотности посадки наблюдались снижение экспрессии 67% генов, связанных с поддержанием гомеостаза, а также пониженная экспрессия генов апоптотического сигналинга (*FADD*, *FAS*, *BCL-2*, *BAX*) и каспаз (*CASP8*, *CASP3*) (Fold change < -7). В группе рыб, питание которых было обогащено пробиотиками, лишь менее 1% этих генов характеризовались пониженной экспрессией, т.е. функциональная диета компенсировала негативный эффект от избыточной плотности посадки.

Для оценки кумулятивного влияния плотности посадки и повышенной температуры на микижу было проведено исследование [43], в котором рыб держали при температуре 27°C либо при плотности посадки 100 кг/м³ и температуре 27°C. Именно такие условия стрессовых воздействий были выбраны потому, что данная температура наблюдалась в последние годы в летние месяцы в Балтийском море, где занимаются разведением микижи, а такая плотность посадки является верхней границей в рекомендациях Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН. Анализ транскриптома селезенки показал, что в ответ на содержание при повышенной температуре 831 ген изменил свою экспрессию, а при совокупности повышенной температуры и плотности посадки дифференциально экспрессированы были 1343 гена. Наиболее подверженными воздействию повышенной температуры оказались сигнальные каскады ответа на стресс и каскады иммунного ответа. Близкая картина наблюдалась и при совокупном воздействии температуры и плотности посадки. Кроме того, совокупное воздействие влияло на процессы репликации ДНК и пути экспрессии генов.

ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК И ИХ УЧАСТИЯ В ОТВЕТЕ НА СТРЕССОВЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

Особенности технологии полногеномного секвенирования транскриптома сделали исследование различных некодирующих РНК гораздо более доступным, чем ранее. До применения высокопроизводительного секвенирования микроРНК в основном анализировали путем клонирования и секвенирования по Сэнгеру, что делало анализ довольно трудоемким, при этом их число сильно недооценивали, предсказывая существование около 100 микроРНК на геном [72]. Аналогичным образом дело обстояло и с другими некодирующими РНК: до начала 2000-х было охарактеризовано всего несколько длинных некодирующих РНК (днкРНК), например *H19* и *XIST* у человека. Однако развитие геномных технологий привело к тому, что для многих видов был идентифицирован и описан широкий спектр регуляторных РНК, как малых (микроРНК, малые ядерные мяРНК, малые ядрышковые мяРНК, взаимодействующие с рiwi-белком пиРНК), так и длинных (днкРНК и длинные межгенные некодирующие дмнкРНК) и кольцевых (кРНК) [73]. Не стал исключением род *Oncorhynchus*: исследователи активно изучают разнообразие и функции различных некодирующих РНК из транскриптомов рыб этого рода.

МикроРНК

МикроРНК – это однонитевые молекулы РНК в среднем 22 пн длиной, которые регулируют экспрессию генов-мишеней путем подавления трансляции и/или разрезания транскриптов-мишеней. У животных пост-транскрипционная регуляция, осуществляемая микроРНК, в большинстве случаев происходит при ее неполной комплементарности мРНК мишени в области 3'UTR, что приводит к привлечению комплекса RISC и последующему подавлению экспрессии гена-мишени [74].

Для того, чтобы охарактеризовать разнообразие микроРНК микижи, исследователи проанализировали 38 различных образцов, относившихся к 16 органам и тканям [72]. В результате в геноме микижи были идентифицированы 2946 локусов, кодирующих микроРНК, из которых 445 были известны ранее и относились к 111 эволюционно консервативным семействам. Затем проводили анализ дифференциальной экспрессии между тканями, показавший, что большинство микроРНК экспрессировались тканеспецифично, хотя три микроРНК – *miR-21*, *miR-146*, *miR-143* были представлены во всех тканях. *miR-21* участвовала в регуляции пролиферации и онкогенеза, *miR-146* была задействована в сигнальных каскадах воспаления, а *miR-143* участвовала в морфогенезе сердца и также была ассоциирована с различными видами опухолей. Помимо эволю-

ционно консервативных были выявлены микроРНК, впервые предсказанные у микижи и ранее не идентифицированные у других видов. Исследование стало отправной точкой для дальнейшего анализа функциональных ролей идентифицированных микроРНК.

Икра рыб содержит материнские мРНК и белки, необходимые для раннего эмбрионального развития после оплодотворения. На примере *Danio rerio* было показано, что микроРНК регулируют циркуляцию материнских мРНК и поддерживают раннее эмбриональное развитие [75]. В исследовании микроРНК икры микижи было идентифицировано 266 известных и предсказано 230 предположительно новых микроРНК [76]. Наиболее предсказанными оказались микроРНК *let-7* и *miR-21*; кроме того, в икре оказались широко представлены *miR-24*, *miR-202*, *miR-148*, *miR-30*, *miR-10*, *miR-146*, *miR-25* и *miR-143*. Для выявленных микроРНК провели поиск мРНК мишеней при помощи приложений miRanda и PITA. Затем оценили представленность предполагаемых транскриптов-мишеней микроРНК, важных для созревания икры и овуляции у микижи, в икре, мышце и печени. Анализ не выявил достоверных различий в уровнях экспрессии, однако большинство мишеней характеризовались сниженной экспрессией в икре, что может косвенно свидетельствовать о регуляторной активности микроРНК в икре.

Профили экспрессии микроРНК могут служить маркерами различных состояний и патологий. Для того, чтобы выявить возможное участие микроРНК в развитии индуцированной диетой гипергликемии, сравнили печеночный транскриптом микижи трех групп: первую группу рыб кормили высокоуглеводной пищей, вызывая у них гипергликемию, вторую кормили безуглеводной пищей, а третью группу держали натощак (“голодная” группа) [77]. По сравнению с “голодной” группой в группе гипергликемических рыб наблюдалась дифференциальная экспрессия микроРНК в печени. Для некоторых из дифференциально экспрессированных микроРНК, например *miRNA-27b-3p* и *miRNA-200a-3p*, известно их участие в процессах метаболизма глюкозы и развития гипергликемии у других рыб и млекопитающих, что позволило предположить существование эволюционно консервативной регуляции этих процессов. Были предсказаны мРНК мишени дифференциально экспрессированных микроРНК, и проведен анализ генных онтологий, который показал, что мишени микроРНК участвовали в процессах промежуточного обмена углеводов, метаболизма липидов и инсулинового сигналинга. Таким образом, были выявлены специфические микроРНК печени, которые регулируют метаболизм глюкозы у микижи.

МикроРНК могут участвовать в ответе на различные стрессовые воздействия. Так, в исследовании [78] охарактеризовали микроРНК, участвующие в ответе микижи на тепловой стресс. Организм может адаптироваться к тепловому стрессу, ис-

пользуя различные уровни регуляции — на уровне транскрипции и пост-транскрипционно, например через малые РНК [79]. В работе были проанализированы транскриптомы пронефроса двух групп рыб: первых держали при нормальной температуре (18°C), а вторых — при повышенной (24°C). В результате анализа транскриптома было идентифицировано 392 консервативных микроРНК, относившихся к 114 семействам, и выявлено 455 новых микроРНК, для которых были предсказаны мРНК мишени. Всего было выявлено 393 пары микроРНК–мРНК, участвовавших в ответе на тепловой стресс, и 80 обогащенных путей сигнальной трансдукции в базе KEGG.

При заражении рыб микроРНК также могут играть функциональные роли, участвуя в развитии защитного ответа. Для того, чтобы оценить изменения профилей микроРНК в ответ на заражение *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, были проанализированы образцы печени микижи [80]. Всего в результате секвенирования в экспериментальной и контрольной группах были идентифицированы 381 консервативные микроРНК и 926 предположительно новых микроРНК, из них 11 консервативных и 16 новых были дифференциально экспрессированы в результате заражения *A. salmonicida*. Анализ генных онтологий и обогащенный сигнальных каскадов базы KEGG показал, что мишени 11 консервативных микроРНК участвовали в сигнальных каскадах иммунного ответа и путях сигнальных молекул и взаимодействий.

Длинные некодирующие РНК

Длинные некодирующие РНК (днкРНК) являются большим классом некодирующих РНК длиной от 200 пн до 100 тпн, которые могут взаимодействовать как с ДНК, так и с РНК и с белками, что обуславливает широкий спектр их активности. В зависимости от транскрипции днкРНК может активироваться или подавляться экспрессия соседних генов; днкРНК могут опосредовать межхромосомные взаимодействия и образования ядерных структур; направлять или удалять транскрипционные факторы и хроматин-модифицирующие комплексы; функционировать как губки для микроРНК и конкурировать с ними за связывание с мишенями; регулировать пост-транскрипционный распад мРНК; регулировать клеточную локализацию РНК-связывающих или ДНК-связывающих белков [81].

Длинные межгенные некодирующие РНК — это днкРНК, транскрибируемые с межгенных областей генома. Они могут иметь такую же функциональную активность, как и другие днкРНК. В исследовании [82] был охарактеризован транскриптом днкРНК широкого спектра тканей микижи — мозга, жировой ткани, жабр, пронефроса, кишечника, почки, печени, семеника, красных и белых мышц, кожи, селезенки, желудка, яйцеклетки и шишковидной железы. Были

идентифицированы 9674 дмнкРНК микижи, по своим характеристикам имевшие много общего с дмнкРНК различных видов млекопитающих: они короче и меньше по числу экзонов и уровню экспрессии, чем белок-кодирующие гены; демонстрируют тканеспецифичные паттерны экспрессии и, как правило, коэкспрессируются вместе с соседними генами. Анализ сетей коэкспрессии показал, что многие дмнкРНК связаны с иммунным ответом, дифференцировкой мышц и развитием нервной системы. В результате исследования был сделан вывод о том, что совместная активность некодирующих и белок-кодирующих РНК обеспечивает уникальность характеристик и функциональность различных типов тканей.

Кижуч характеризуется природной устойчивостью к ряду патогенов сальмонид. Первым шагом в изучении возможной роли некодирующих РНК в этой устойчивости стало описание транскриптома малых и длинных некодирующих РНК иммунных органов кижуча — печени, селезенки и пронефроса [74]. Всего выявлены 4975 днкРНК, около 80% из которых были внегенными, и 2064 из выявленных днкРНК не имели ортологов у других сальмонид. Кроме того, в анализе были идентифицированы 146 консервативных и 20 новых микроРНК. Были идентифицированы предполагаемые мишени днкРНК и микроРНК. Для мишеней днкРНК наиболее обогащенными были каскады эндоцитоза, онкогенеза, регуляции актинового цитоскелета, *PI3K-Akt* сигналинга и пути инфицирования HTLV. Для мишеней микроРНК — каскады взаимодействия цитокинов и их рецепторов и каскады эндоцитоза. Таким образом, были охарактеризованы профили некодирующих РНК иммунных органов кижуча.

Длинные некодирующие РНК также могут участвовать и в ответе на тепловой стресс. В исследовании микижи, которую содержали при нормальной температуре (18°C) либо при тепловом стрессе (24°C) [83], были выявлены 5916 днкРНК, 927 из них были новыми, а 428 — дифференциально экспрессированными в ответ на тепловой стресс. Анализ показал, что 2261 днкРНК участвовали в цис-регуляции, их гены-мишени участвовали в каскадах клеточного метаболизма, ответа на воздействия и модификации клеточных белков и обогащали сигнальные каскады *MAPK*, *PI3K-AKT*, *NOD*-подобного рецептора и эстрогенового сигналинга. 3483 днкРНК участвовали в транс-регуляции, их гены-мишени также обогащали пути регуляции аутофагии и эндоцитоза. Таким образом, анализ обогащений показал, что днкРНК регулируют экспрессию различных групп генов, участвующих в адаптации микижи к тепловому стрессу.

Другим стрессовым воздействием, которое изменяет профили экспрессии как кодирующих, так и некодирующих РНК, является повышенная плотность посадки рыб. В исследовании [84] микижу выращивали в течение месяца при повы-

шенной плотности посадки (40 кг/м³) и затем оценивали профили кодирующих и некодирующих транскриптов в тканях кишечника, поскольку этот орган содержит сложное сообщество микроорганизмов и играет активную роль в функционировании иммунной системы и поддержании гомеостаза. Исследование показало, что повышенная плотность посадки в целом подавляла экспрессию генов: у рыб из группы высокой плотности посадки в кишечнике экспрессировалось всего 64.3% от всех идентифицированных транскриптов, в то время как при низкой посадке детектировались 93.7% от всех транскриптов. Высокая плотность посадки подавляла активность каскадов метаболизма и иммунитета, а также снижала целостность и стабильность эпителиального слоя. Исследователи сделали вывод, что между кодирующими и некодирующими РНК кишечника наблюдается тонкое динамическое равновесие, изменяющееся при стрессовых воздействиях, например при повышенной плотности посадки.

Кольцевые РНК

Кольцевые РНК (кРНК) представляют собой ковалентно замкнутые эндогенные некодирующие РНК, которые участвуют во многих клеточных процессах и обладают высокой стабильностью [14]. кРНК могут функционировать как “губки” для микроРНК и тем самым снижать уровень микроРНК-опосредованного сайленсинга генов, либо конкурировать с мРНК за связывание с микроРНК, образуя “сети конкурентной регуляции”. Другой механизм их действия — образование рибонуклеопротеиновых комплексов, например с факторами транскрипции и с РНК-связывающими белками, и модификация их сродства к мишеням или локализации. На сегодняшний день они изучены недостаточно подробно, однако учитывая их стабильность, высокую представленность в клетке и разнообразие профилей экспрессии вполне вероятно, что они играют важные роли в различных биологических процессах и регуляторных путях. В работе [79] провели анализ изменений транскриптома микижи, возникающих в ответ на тепловой стресс (24°C). Были выявлены 324 дифференциально экспрессированных кРНК, 105 микроРНК и 1885 мРНК. Была построена сеть конкурентной регуляции ответа на тепловой стресс, которая включала в себя 301 пару кРНК—микроРНК и 51 пару микроРНК—мРНК, и корреляционный анализ выявил пары микроРНК—мРНК с отрицательной корреляцией. Тепловой стресс активировал экспрессию генов, участвовавших в метаболизме и ответе на стресс, каскады процессинга белков в ЭПС, эстрогеновый и *Hif-1*-опосредованный сигналинг.

Подытоживая данный раздел, можно отметить, что разнообразие некодирующих РНК очень велико, и высокопроизводительные транскриптомные

методы анализа значительно ускорили и упростили их изучение. Вероятно, в ближайшее время будут более подробно и полно охарактеризованы сети взаимодействий нкРНК, мРНК и белков, которые участвуют в ответе на стресс, а также в регуляции роста и развития рыб рода *Oncorhynchus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре проанализированы работы по изучению динамики транскриптома рыб рода *Oncorhynchus* на разных этапах жизненного цикла и его изменений в ответ на различные воздействия окружающей среды. Целью обзора состояла в анализе современного состояния исследований транскриптома лососевых. Расширение применения данного метода в аквакультурных исследованиях открыло возможности для генетического анализа индивидуальной особи на разных жизненных этапах. Большое количество работ в настоящее время посвящено исследованию транскриптомного ответа на внешние воздействия, такие как тепловой стресс, инфекции, лекарства, вредные вещества, гормоны. Исследования некодирующих РНК показали, что данная группа транскриптов участвует в функционировании сетей сигнальной трансдукции наряду с кодирующими генами и белками, и дальнейший анализ сетей коэкспрессии и конкурентной регуляции позволит более подробно охарактеризовать взаимное влияние кодирующих и некодирующих транскриптов.

Исследование выполнено на средства гранта Российского научного фонда (проект РНФ № 19-16-00101, руководитель – Л.А. Животовский).

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. Rao M.S., Van Vleet T.R., Ciurlionis R. et al. Comparison of RNA-seq and microarray gene expression platforms for the toxicogenomic evaluation of liver from short-term rat toxicity studies // *Front Genet.* 2019. V. 9. 636. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00636>
2. Thorpe J.E., Metcalfe N.B. Is smolting a positive or a negative developmental decision? // *Aquaculture.* 1998. V. 168. P. 95–103.
3. Hoar W.S. Smolt transformation – evolution, behavior, and physiology // *J. Fish. Res. Can.* 1976. V. 33. P. 1233–1252.
4. Dickhoff W.W., Beckman B.R., Larsen D.A. et al. The role of growth in endocrine regulation of salmon smoltification // *Fish Physiol. Biochem.* 1997. V. 17. P. 231–236. <https://doi.org/10.1023/A:1007710308765>
5. Dodson J.J., Aubin-Horth N., Theriault V., Paez D.J. The evolutionary ecology of alternative migratory tactics in salmonid fishes // *Biol. Reviews.* 2013. V. 88. P. 602–625. <https://doi.org/10.1111/brv.12019>
6. Folmar L.C., Dickhoff W.W. The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids – a review of selected literature // *Aquaculture.* 1980. V. 21. P. 1–37. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(80\)90123-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(80)90123-4)
7. Stefansson S.O., Bjornsson B.T., Ebbesson L.O.E., McCormick S.D. Smoltification // *Fish Larval Physiology.* Enfield NH: Science Publ., 2008. P. 639–681.
8. McCormick S.D. Smolt physiology and endocrinology // *Euryhaline Fishes.* Oxford, 2013. P. 199–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396951-4.00005-0>
9. Lee S.Y., Lee H.J., Kim Y.K. Comparative transcriptome profiling of selected osmotic regulatory proteins in the gill during seawater acclimation of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. I. 1. 1987. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58915-6>
10. Houde L.A.S., Schulze A.D., Kaukinen K.H. et al. Transcriptional shifts during juvenile Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) life stage changes in freshwater and early marine environments // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics.* 2019. V. 29. P. 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2018.10.002>
11. Jeffries K.M., Hinch S.G., Gale M.K. et al. Immune response genes and pathogen presence predict migration survival in wild salmon smolts // *Mol. Ecol.* 2014. V. 23. I. 23. P. 5803–5815. <https://doi.org/10.1111/mec.12980>
12. Danzmann R.G., Kocmarek A.L., Norman J.D. et al. Transcriptome profiling in fast versus slow-growing rainbow trout across seasonal gradients // *BMC Genomics.* 2016. V. 17. 60. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2363-5>
13. Hale M.C., McKinney G.J., Thrower F.P., Nichols K.M. RNA-seq reveals differential gene expression in the brains of juvenile resident and migratory smolt rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics.* 2016. V. 20. P. 136–150. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.07.006>
14. Pankhurst N.W., Ludke S.L., King H.R., Peter R.E. The relationship between acute stress, food intake, endocrine status and life history stage in juvenile farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* // *Aquaculture.* 2008. V. 275. P. 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.001>
15. McCormick S.D., Hansen L.P., Quinn T.P., Saunders R.L. Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 1998. V. 55. P. 77–92. <https://doi.org/10.1139/d98-011>
16. Jørgensen E.H., Martinsen M., Strom V. et al. Long-term fasting in the anadromous Arctic charr is associated with downregulation of metabolic enzyme activity and upregulation of leptin A1 and SOCS expression in the liver // *J. Exp. Biol.* 2013. V. 216. P. 3222–3230. <https://doi.org/10.1242/jeb.088344>
17. Palstra A.P., Fukaya K., Chiba H. et al. The olfactory transcriptome and progression of sexual maturation in homing chum salmon *Oncorhynchus keta* // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 9. e0137404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137404>
18. Prince D.J., O'Rourke S.M., Thompson T.Q. et al. The evolutionary basis of premature migration in Pacific salmon highlights the utility of genomics for informing

- conservation // *Sci. Adv.* 2017. V. 3. e1603198. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1603198>
19. Crête-Lafrenière A., Weir L.K., Bernatchez L. Framing the Salmonidae family phylogenetic portrait: A more complete picture from increased taxon sampling // *PLoS One*. 2012. V. 7. e46662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046662>
 20. Zhivotovsky L.A. Genetic history of salmonid fishes of the genus *Oncorhynchus* // *Rus. J. Genet.* 2015. V. 51. № 5. P. 491–505.
 21. Hecht B.C., Matala A.P., Hess J.E., Narum S.R. Environmental adaptation in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) throughout their North American range // *Mol. Ecol.* 2015. V. 24. P. 5573–5595. <https://doi.org/10.1111/mec.13409>
 22. Narum S.R., Genova A.Di., Micheletti S.J., Maass A. Genomic variation underlying complex life-history traits revealed by genome sequencing in Chinook salmon // *Proc. Biol. Sci.* 2018. 285(1883). 20180935. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0935>
 23. Mi H., Huang X., Muruganujan A. et al. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and reactome pathways, and data analysis tool enhancements // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 45. D183–D189. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1138>
 24. Evans T.G., Hammill E., Kaukinen K. et al. Transcriptomics of environmental acclimatization and survival in wild adult Pacific sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during spawning migration // *Mol. Ecol.* 2011. V. 20. I. 21. P. 4472–4489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05276.x>
 25. Madaro A., Torrisen O., Whatmore P. et al. Red and White Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): Differences in the transcriptome profile of muscle, liver, and pylorus // *Mar. Biotechnol. (N.Y.)*. 2020. V. 22. I. 4. P. 581–593. <https://doi.org/10.1007/s10126-020-09980-5>
 26. Hu G., Gu W., Sun P. et al. Transcriptome analyses reveal lipid metabolic process in liver related to the difference of carcass fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Int. J. Genomics*. 2016. 7281585. <https://doi.org/10.1155/2016/7281585>
 27. Al-Tobasei R., Ali A., Leeds T.D. et al. Identification of SNPs associated with muscle yield and quality traits using allelic-imbalance analyses of pooled RNA-Seq samples in rainbow trout // *BMC Genomics*. 2017. V. 18. I. 1. P. 582. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3992-z>
 28. Paneru B.D., Tobasei R.A., Kenney B. et al. RNA-Seq reveals microRNA expression signature and genetic polymorphism associated with growth and muscle quality traits in rainbow trout // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. I. 1. 9078. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09515-4>
 29. Salem M., Vallejo R.L., Leeds T.D. et al. RNA-seq identifies SNP markers for growth traits in rainbow trout // *PLoS One*. 2012. V. 7. I. 5. e36264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036264>
 30. Haard N.F. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish // *Food Res.* 1992. I. 25. P. 289–307. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90126-P](https://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90126-P)
 31. Lie Ø. Flesh quality – the role of nutrition // *Aquaculture*. 2001. V. 32. P. 341–348. <https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00026.x>
 32. Palstra A.P., Planas J.V. Fish under exercise // *Fish Physiol. Biochem.* 2011. V. 37. P. 259–272. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9505-0>
 33. Magnoni L.J., Crespo D., Ibarz A. et al. Effects of sustained swimming on the red and white muscle transcriptome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a carbohydrate-rich diet // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2013. V. 166. I. 3. P. 510–521. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.08.005>
 34. Lazzarotto V., Médale F., Larroquet L., Corraze G. Long-term dietary replacement of fishmeal and fish oil in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth, whole body fatty acids and intestinal and hepatic gene expression // *PLoS One*. 2018. V. 13. I. 1. e0190730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190730>
 35. Callet T., Dupont-Nivet M., Cluzeaud M. et al. Detection of new pathways involved in the acceptance and the utilisation of a plant-based diet in isogenic lines of rainbow trout fry // *PLoS One*. 2018. V. 13. I. 7. e0201462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201462>
 36. Callet T., Dupont-Nivet M., Danion M. et al. Why do some rainbow trout genotypes grow better with a complete plant-based diet? Transcriptomic and physiological analyses on three isogenic lines // *Front Physiol.* 2021. V. 12. 732321. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732321>
 37. Le Boucher R., Dupont-Nivet M., Vandeputte M. et al. Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish // *PLoS One*. 2012. V. 7. e44898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044898>
 38. Callet T., Médale F., Larroquet L. et al. Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits // *PLoS One*. 2017. V. 12. e0186705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705>
 39. Pacitti D., Lawan M.M., Feldmann J. et al. Impact of selenium supplementation on fish antiviral responses: A whole transcriptomic analysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed supranutritional levels of Sel-Plex® // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. 116. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2418-7>
 40. Ma H., Weber G.M., Hostuttler M.A. et al. MicroRNA expression profiles from eggs of different qualities associated with post-ovulatory ageing in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *BMC Genomics*. 2015. V. 16. I. 1. 201. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1400-0>
 41. Ma H., Martin K., Dixon 2nd D. et al. Transcriptome analysis of egg viability in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. I. 1. 319. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5690-5>
 42. Xu P., McIntyre L.M., Scardina J. et al. Transcriptome profiling of embryonic development rate in rainbow trout advanced backcross introgression lines // *Mar. Biotechnol. (N.Y.)*. 2011. V. 13. I. 2. P. 215–231. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9283-1>
 43. Rebl A., Korytář T., Borchel A. et al. The synergistic interaction of thermal stress coupled with overstocking strongly modulates the transcriptomic activity and immune capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. e14913. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71852-8>
 44. Jeffries K.M., Hinch S.G., Sierocinski T. et al. Transcriptomic responses to high water temperature in two species of Pacific salmon // *Evol. Appl.* 2014. V. 7. № 2.

- P. 286–300.
<https://doi.org/10.1111/eva.12119>
45. Bowen L., von Biela V.R., McCormick S.D. et al. Transcriptomic response to elevated water temperatures in adult migrating Yukon River Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) // *Conserv. Physiol.* 2020. V. 8. № 1. coaa084.
<https://doi.org/10.1093/conphys/coaa084>
 46. Defo M.A., Gendron A.D., Head J. et al. Cumulative effects of cadmium and natural stressors (temperature and parasite infection) on molecular and biochemical responses of juvenile rainbow trout // *Aquat Toxicol.* 2019. V. 217. 105347.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105347>
 47. Huang J., Li Y., Liu Z. et al. Transcriptomic responses to heat stress in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* head kidney // *Fish Shellfish Immunol.* 2018. V. 82. P. 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.002>
 48. Rebl A., Verleih M., Köbis J.M. et al. Transcriptome profiling of gill tissue in regionally bred and globally farmed rainbow trout strains reveals different strategies for coping with thermal stress // *Mar. Biotechnol.* (N.Y.). 2013. V. 15. № 4. P. 445–460.
<https://doi.org/10.1007/s10126-013-9501-8>
 49. Roh H., Kim A., Kim N. et al. Multi-omics analysis provides novel insight into immuno-physiological pathways and development of thermal resistance in rainbow trout exposed to acute thermal stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 23. 9198.
<https://doi.org/10.3390/ijms21239198>
 50. Jeffries K.M., Hinch S.G., Sierocinski T. et al. Consequences of high temperatures and premature mortality on the transcriptome and blood physiology of wild adult sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) // *Ecol. Evol.* 2012. V. 2. № 7. P. 1747–1764.
<https://doi.org/10.1002/ece3.274>
 51. Sutherland B.J., Jantzen S.G., Sanderson D.S. et al. Differentiating size-dependent responses of juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) to sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infections // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics.* 2011. V. 6. № 2. P. 213–223.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2011.04.001>
 52. Braden L.M., Barker D.E., Koop B.F., Jones S.R. Comparative defense-associated responses in salmon skin elicited by the ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis* // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics.* 2012. V. 7. № 2. P. 100–109.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2011.12.002v>
 53. Sutherland B.J., Koczka K.W., Yasuike M. et al. Comparative transcriptomics of Atlantic *Salmo salar*, chum *Oncorhynchus keta* and pink salmon *O. gorbuscha* during infections with salmon lice *Lepeophtheirus salmonis* // *BMC Genomics.* 2014. V. 15. № 1. 200.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-200>
 54. Valenzuela-Muñoz V., Boltaña S., Gallardo-Escárate C. Comparative immunity of *Salmo salar* and *Oncorhynchus kisutch* during infestation with the sea louse *Caligus rogercresseyi*: An enrichment transcriptome analysis // *Fish Shellfish Immunol.* 2016. V. 59. P. 276–287.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.046>
 55. Barrett D.E., Bartholomew J.L. A tale of two fish: Comparative transcriptomics of resistant and susceptible steelhead following exposure to *Ceratonova shasta* highlights differences in parasite recognition // *PLoS One.* 2021. V. 16. № 2. e0234837.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234837>
 56. Barrett D.E., Estensoro I., Sitjà-Bobadilla A., Bartholomew J.L. Intestinal transcriptomic and histologic profiling reveals tissue repair mechanisms underlying resistance to the parasite *Ceratonova shasta* // *Pathogens.* 2021. V. 10. № 9. 1179.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10091179>
 57. Rebl A., Korytář T., Köbis J.M. et al. Transcriptome profiling reveals insight into distinct immune responses to *Aeromonas salmonicida* in gill of two rainbow trout strains // *Mar. Biotechnol.* (N.Y.). 2014. V. 16. № 3. P. 333–348.
<https://doi.org/10.1007/s10126-013-9552-x>
 58. Ji L., Sun G., Li X., Liu Y. Comparative transcriptome analysis reveals the mechanism of β -glucan in protecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from *Aeromonas salmonicida* infection // *Fish Shellfish Immunol.* 2020. V. 98. P. 87–99.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.022>
 59. Rivas-Aravena A., Fuentes-Valenzuela M., Escobar-Aguirre S. et al. Transcriptomic response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skeletal muscle to *Flavobacterium psychrophilum* // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics.* 2019. V. 31. 100596.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.100596>
 60. Wang D., Sun S., Li S. et al. Transcriptome profiling of immune response to *Yersinia ruckeri* in spleen of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *BMC Genomics.* 2021. V. 22. № 1. 292.
<https://doi.org/10.1186/s12864-021-07611-4>
 61. Syahputra K., Kania P.W., Al-Jubury A. et al. Transcriptomic analysis of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills infected by *Ichthyophthirius multifiliis* // *Fish Shellfish Immunol.* 2019. V. 86. P. 486–496.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.075>
 62. Zhang X., Ding L., Yu Y. et al. The change of teleost skin commensal microbiota is associated with skin mucosal transcriptomic responses during parasitic infection by *Ichthyophthirius multifiliis* // *Front Immunol.* 2018. V. 9. 2972.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02972>
 63. Magnuson J.T., Cryder Z., Andrzejczyk N.E. et al. Metabolomic profiles in the brains of juvenile steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) following bifenthrin treatment // *Environ Sci. Technol.* 2020. V. 54. № 19. P. 12245–12253.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04847>
 64. Magnuson J.T., Giroux M., Cryder Z. et al. The use of non-targeted metabolomics to assess the toxicity of bifenthrin to juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) // *Aquat Toxicol.* 2020. V. 224. 105518.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105518>
 65. Magnuson J.T., Huff Hartz K.E., Fulton C.A. et al. Transcriptomic and histopathological effects of bifenthrin to the brain of juvenile rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Toxics.* 2021. V. 9. № 3. 48.
<https://doi.org/10.3390/toxics9030048>
 66. Vehniäinen E.R., Bremer K., Scott J.A. et al. Retene causes multifunctional transcriptomic changes in the heart of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2016. V. 41. P. 95–102.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.11.015>
 67. Rigaud C., Eriksson A., Krasnov A. et al. Retene, pyrene and phenanthrene cause distinct molecular-level changes in the cardiac tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae, part 1 – Transcriptomics //

- Sci. Total Environ. 2020. V. 745. 141031.
https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141031
68. *Sadoul B., Birceanu O., Aluru N. et al.* Bisphenol A in eggs causes development-specific liver molecular reprogramming in two generations of rainbow trout // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. 14131.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-13301-7
69. *Osachoff H.L., Brown L.L.Y., Tirrul L. et al.* Time course of hepatic gene expression and plasma vitellogenin protein concentrations in estrone-exposed juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics.* 2016. V. 19. P. 112–119.
https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.02.002
70. *Harding L.B., Schultz I.R., Goetz G.W. et al.* High-throughput sequencing and pathway analysis reveal alteration of the pituitary transcriptome by 17 α -ethynyl-estradiol (EE2) in female coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* // *Aquat Toxicol.* 2013. V. 142–143. P. 146–163.
https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.07.020
71. *Détrée C., Gonçalves A.T.* Transcriptome mining of apoptotic mechanisms in response to density and functional diets in *Oncorhynchus mykiss* and role in homeostatic regulation // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics.* 2019. V. 31. 100595.
https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.100595
72. *Juanchich A., Bardou P., Rué O. et al.* Characterization of an extensive rainbow trout miRNA transcriptome by next generation sequencing // *BMC Genomics.* 2016. V. 17. № 164.
https://doi.org/10.1186/s12864-016-2505-9
73. *Jarroux J., Morillon A., Pinskaya M.* History, discovery, and classification of lncRNAs // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 1008. P. 1–46.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-5203-3_1
74. *Leiva F., Rojas-Herrera M., Reyes D. et al.* Identification and characterization of miRNAs and lncRNAs of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in normal immune organs // *Genomics.* 2020. V. 112. № 1. P. 45–54.
https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.07.015
75. *Giraldez A.J., Mishima Y., Rihel J. et al.* Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs // *Science.* 2006. V. 312. № 5770. P. 75–79.
https://doi.org/10.1126/science.1122689
76. *Ma H., Hostuttler M., Wei H. et al.* Characterization of the rainbow trout egg microRNA transcriptome // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 6. e39649.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039649
77. *Kostyniuk D.J., Marandel L., Jubouri M. et al.* Profiling the rainbow trout hepatic miRNAome under diet-induced hyperglycemia // *Physiol. Genomics.* 2019. V. 51. № 9. P. 411–431.
https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00032.2019
78. *Ma F., Liu Z., Huang J. et al.* High-throughput sequencing reveals microRNAs in response to heat stress in the head kidney of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Funct. Integr. Genomics.* 2019. V. 19. № 5. P. 775–786.
https://doi.org/10.1007/s10142-019-00682-3
79. *Quan J., Kang Y., Luo Z. et al.* Integrated analysis of the responses of a circRNA-miRNA-mRNA ceRNA network to heat stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver // *BMC Genomics.* 2021. V. 22. № 1. P. 48.
https://doi.org/10.1186/s12864-020-07335-x
80. *Cao Y., Wang D., Li S. et al.* A transcriptome analysis focusing on splenic immune-related microRNAs of rainbow trout upon *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* infection // *Fish Shellfish Immunol.* 2019. V. 91. P. 350–357.
https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.048
81. *Marchese F.P., Raimondi I., Huarte M.* The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function // *Genome Biol.* 2017. V. 18. № 206.
https://doi.org/10.1186/s13059-017-1348-2
82. *Wang J., Fu L., Koganti P.P. et al.* Identification and functional prediction of large intergenic noncoding RNAs (lincRNAs) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Mar. Biotechnol. (N.Y.).* 2016. V. 18. № 2. P. 271–282.
https://doi.org/10.1007/s10126-016-9689-5
83. *Quan J., Kang Y., Luo Z. et al.* Identification and characterization of long noncoding RNAs provide insight into the regulation of gene expression in response to heat stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics.* 2020. V. 36. P. 100707.
https://doi.org/10.1016/j.cbd.2020.100707
84. *Gonçalves A.T., Núñez-Acuña G., Détrée C., Gallardo-Escárate C.* Coding/non-coding cross-talk in intestinal epithelium transcriptome gives insights on how fish respond to stocking density // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics.* 2019. V. 29. P. 14–23.
https://doi.org/10.1016/j.cbd.2018.10.005

Transcriptome Studies of Salmonid Fish of the Genus *Oncorhynchus*

A. D. Zolotareno^a and M. V. Shitova^{a, *}

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

*e-mail: shitova-m@rambler.ru

This review covers the current state of high-throughput transcriptome analysis in aquaculture. It describes the research on the molecular basis of growth and development of fish, as well as the genetic variability underlying the ecological and evolutionary adaptations of the genus *Oncorhynchus*. Systemic alterations in the profiles of small, long and circular non-coding RNAs that occur in fish transcriptomes in response to various stimuli are characterized. The identified signal transduction pathways playing key roles in the development of economically valuable traits can be used as targets for fish breeding within the target commodity characteristics.

Keywords: transcriptome studies, genus *Oncorhynchus*, microarrays, RNA-seq.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ МОНОДЕГИДРОАСКОРБАТРЕДУКТАЗ (MDHAR) ЧЕСНОКА (*Allium sativum* L.) И ИХ УЧАСТИЕ В ОТВЕТЕ НА ЗАРАЖЕНИЕ *Fusarium proliferatum*

© 2022 г. О. К. Анисимова¹, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹, М. А. Филюшин¹, *

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 26.11.2021 г.

После доработки 22.12.2021 г.

Принята к публикации 03.02.2022 г.

Монодегидроаскорбатредуктазы (MDHAR) восстанавливают образующуюся в результате нейтрализации активных форм кислорода монодегидроаскорбиновую кислоту до аскорбиновой кислоты, что является одним из основных механизмов поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного статуса. В геноме чеснока (*Allium sativum* L.) идентифицированы последовательно три гена *MDHAR*, кодирующих монодегидроаскорбатредуктазы различной клеточной локализации. В аминокислотных последовательностях *AsMDHAR1*, *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5* были идентифицированы домен Prg_gedox_2, домены связывания с кофакторами FAD и NAD(P)H и мотив уникальной длинной петли, необходимый для формирования активного сайта фермента. Определены профили экспрессии генов *MDHAR1*, *MDHAR4* и *MDHAR5* в различных органах растения чеснока, а также исследовано изменение уровней транскрипции генов *AsMDHARs* в ответ на заражение патогеном *Fusarium proliferatum*. Показано, что максимальные уровни транскрипции генов *AsMDHARs* характерны для листьев, ложного стебля и в случае *AsMDHAR1* – корней. В ответ на заражение *F. proliferatum* выявлено увеличение транскрипции всех трех генов *AsMDHAR* в корнях растений чеснока, при этом активация генов была сходной и не зависела от степени устойчивости сорта к фузариозной гнили.

Ключевые слова: чеснок, *Allium sativum*, рециклинг аскорбиновой кислоты, монодегидроаскорбатредуктаза, *Fusarium proliferatum*.

DOI: 10.31857/S0016675822070037

Образующиеся в процессе метаболизма в клетках растений активные формы кислорода (АФК) вызывают окисление компонентов клеточных мембран и деградацию нуклеиновых кислот, белков и пигментов, что в конечном итоге может приводить к гибели клеток [1]. Важным компонентом антиоксидантной системы растений является L-аскорбиновая кислота (АК, аскорбат, витамин С), которая нивелирует действие некоторых АФК, напрямую связываясь с ними [2, 3]. Также АК является субстратом для аскорбатпероксидаз (АРХ; ЕС 1.11.1.11) и аскорбатоксидаз (АО; ЕС 1.10.3.3), ключевых ферментов окислительно-восстановительной системы растений [3, 4].

В результате реакций нейтрализации АФК и деятельности ферментов АРХ и АО образуется окисленная форма АК – монодегидроаскорбиновая кислота (МДНА), которая затем может самопроизвольно диспропорционировать с образованием дегидроаскорбиновой кислоты (ДНА) и молекулы аскорбата [3]. Образующиеся окисленные

формы АК (МДНА и ДНА) способны восстанавливаться до аскорбата специфичными ферментами – монодегидроаскорбатредуктазой (MDHAR; ЕС 1.6.5.4) и дегидроаскорбатредуктазой (DHAR; ЕС 1.8.5.1) соответственно [3].

Монодегидроаскорбатредуктазы в клетках растений локализируются в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и цитозоле [5, 6]. К настоящему времени гены *MDHAR* идентифицированы у многих видов растений [5–10]. Показано существенное изменение уровней транскрипции генов *MDHAR* и активности кодируемых ферментов в ответ на различные абиотические стрессы [1, 5, 9–12]. Так, сверхэкспрессия *MDHAR* повышает устойчивость к солевому стрессу у растений табака [13] и риса [14]. У лука репчатого *Allium cepa* в ответ на солевой стресс выявлено увеличение активности MDHAR в симпласте корня и листа [15]. Исследований изменения экспрессии/активности MDHAR в ответ на биотические стрессы крайне мало. Например, у пшеницы *Triticum aestivum*

tivum в ответ на заражение различными расами грибного патогена *Puccinia striiformis* выявлено увеличение транскрипции гена *TaMDHAR4* через 48 ч после заражения, при этом замалчивание гена *TaMDHAR4* повышает устойчивость пшеницы к *P. striiformis* [9]. В зерне кукурузы *Zea mays* после инокуляции грибами *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans* и *Aspergillus flavus* наблюдается значительное снижение активности MDHAR [10]. Для некоторых видов растений была изучена роль MDHAR в росте и развитии растений, а также в регуляции накопления сахаров и аскорбата в плодах и листьях. Например, у томата снижение активности MDHAR подавляет рост растений, а также снижает содержание сахарозы в плодах и урожайность [16], однако специфичное отсутствие экспрессии MDHAR только в плодах томата на продуктивность не влияет [17]. Сверхэкспрессия MDHAR значительно снижает содержание АК в спелых плодах томата [18]. У лука-порея *Allium porrum* были определены профили экспрессии трех генов MDHAR, выявлена положительная корреляция транскрипции гена *MDHAR4* с содержанием АК в белой части и зеленых листьях растений [19]. Таким образом, на различных видах растений показаны участие MDHAR в определении стрессоустойчивости, а также взаимосвязь активности MDHAR и содержания АК.

Чеснок (*Allium sativum* L.) является экономически значимой мировой овощной культурой с ежегодным производством более 50 млн т (из них более 200 тыс. т в РФ) (FAO 2019; <http://www.fao.org>). В процессе роста и хранения чеснок подвержен воздействию различных абиотических и биотических стрессов. Значительные потери урожая чеснока связаны с грибными патогенами, наиболее вредоносными из которых являются грибы рода *Fusarium* Link, вызывающие гниль лукович и/или увядание листьев чеснока [20–23]. Гены метаболизма АК у чеснока к настоящему времени не охарактеризованы, их участие в ответе на стрессы ранее не исследовалось. В настоящей работе были проведены идентификация и характеристика генов монодегидроаскорбатредуктаз в геноме чеснока *A. sativum*, определен профиль их экспрессии в различных органах растения, в том числе в ответ на заражение патогеном *Fusarium proliferatum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификация и структурная характеристика генов MDHARs. Поиск последовательностей генов монодегидроаскорбатредуктаз проводили в геноме и транскриптоме чеснока *A. sativum* cv. Ershuizao, доступных в базе данных NCBI (PRJNA606385, сборка Garlic.V2.fa; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [24]. В качестве референса использовали последовательности мРНК трех генов MDHAR спаржи

Asparagus officinalis (*AoMDHAR1* (XP_020260315.1), *AoMDHAR4* (XP_020251572.1), *AoMDHAR5* (XP_020241046.1)).

Выравнивание и анализ последовательностей MDHARs проводили в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Консервативные домены и мотивы белков MDHARs определяли с помощью программ NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и MEME 5.1.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) в сопоставлении с литературными данными. Молекулярный вес, изоэлектрическую точку (pI) и значение индекса гидропатичности (GRAVY) рассчитывали с помощью ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>). Прогнозирование образования дисульфидных связей выполняли с помощью сервиса DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>). Для поиска трансмембранных спиралей использовали сервис TMHMM server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), для поиска доменов связывания с кофакторами – Cofactory-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?Cofactory-1.0>), для поиска транспортных и сигнальных пептидов – TargetP-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Внутриклеточную локализацию белков MDHARs предсказывали с помощью WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>).

Растительный материал. В работе были использованы растения чеснока сортов Сармат и Стрелец. Луковицы сортов Сармат и Стрелец были предоставлены Федеральным научным центром овощеводства (ФНЦО, Московская обл.).

Растения чеснока сорта Сармат были выращены в 2021 г. в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16/8 ч, 22/16°C; освещенность 190 мкМ/(м²/с)). Через 90 дней различные органы (корни, донце, луковича, листья, цветонос, цветоложе и воздушные луковичы) растений были собраны и использованы для анализа тканеспецифичной экспрессии генов MDHARs.

Зубки чеснока сортов Сармат и Стрелец были использованы для исследования изменения уровня транскрипции генов MDHARs в ответ на инфицирование патогеном *F. proliferatum*. По данным полевых наблюдений ФНЦО (2015–2020 гг.) сорт Сармат устойчив к фузариозной гнили, а сорт Стрелец – восприимчив (в отдельные годы наблюдается гибель 70–90% растений). По 12 зубков каждого сорта чеснока стерилизовали в 70%-ном этаноле (3 мин), промывали стерильной дистиллированной водой, помещали на чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой и инкубировали при 25°C в темноте. Через 72 ч, когда наблюдался активный рост корней, половину зубков каждого сорта заражали грибом *F. proliferatum* изоллят Стрелец [23] путем вымачивания в суспензии

Таблица 1. Последовательности праймеров для проведения РВ-ПЦР

Ген	Последовательности праймеров (5'–3')
<i>MDHAR1</i>	TTTGAACCCCTGGCGAGCTTG CTGGCAGTAAGCGTTCTCCA
<i>MDHAR4</i>	CGCAGGTTATGCAGCTCTTG CGCCTACGCAAGTATGAAATGC
<i>MDHAR5</i>	GGGGCTCGCATAGATAAGTTGA TCCCACGGACTTATTTCAGCC
<i>GAPDH</i>	CCATGTTTGTGTTGTTGGTGTGAATGAG TGGTGCAGCTAGCGTTGGAGAC
<i>UBQ</i>	AAGCCAAGATACAGGACAAG GCATACCACCTCTCAATCTC

конидий ($\sim 10^6$ конидий/мл) в течение 5 мин. После этого зубки помещали на чашки Петри и инкубировали при 25°C в темноте. Оставшиеся зубки использовали в качестве контроля: вымачивали в дистиллированной воде в течение 5 мин, помещали на чашки Петри и далее инкубировали при 25°C в темноте. Через 24 и 96 ч после заражения визуально оценивали состояние зараженных и контрольных зубков чеснока и отбирали корни (по два биологических повтора для каждого сорта) для анализа экспрессии генов *MDHARs*.

Выделение РНК, синтез кДНК. Собранный растительный материал растирали в жидком азоте и использовали для выделения РНК с последующей очисткой от примесей ДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasy set; QIAGEN, Германия). На основе полученных препаратов РНК синтезировали кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США).

Определение профиля экспрессии генов *MDHARs*. Профиль экспрессии генов *MDHARs* определяли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Для этого на основе идентифицированных кодирующих последовательностей генов *MDHARs* были разработаны специфичные праймеры (табл. 1). Относительный уровень экспрессии исследуемых генов *MDHAR* оценивали, используя референсные гены *GAPDH* [25] и *UBQ* [26]. Для РВ-ПЦР использовали набор “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах в следующих условиях: 95°C – 5 мин; 40 циклов (95°C – 15 с, 62°C – 50 с). Для визуализации данных и статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism v 8 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и анализ последовательностей *MDHARs* чеснока

В результате проведенного поиска в геноме чеснока *Allium sativum* cv. Ershuizao (PRJNA606385) [24] были идентифицированы три последовательности, гомологичные генам *AoMDHAR1*, *AoMDHAR4* и *AoMDHAR5* спаржи *As. officinalis* (табл. 2). Найденные гены были обозначены как *AsMDHAR1*, *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5*. В версии 01 генома чеснока (сборка ASM1415589v1) ген *AsMDHAR1* локализован на хромосоме 5, ген *AsMDHAR4* – на хромосоме 8, ген *AsMDHAR5* – на хромосоме 6. Однако в версии 02 генома чеснока (сборка Garlic.V2.fa) ген *AsMDHAR1* локализован на хромосоме 7, а хромосомная локализация генов *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5* не выяснена (табл. 2), что можно объяснить тем, что взаимосвязь между хромосомами версии 01 (ASM1415589v1) и версии 02 (Garlic.V2.fa) окончательно не определена.

Проведенный структурный анализ полногеномных последовательностей *AsMDHARs* позволил определить размеры и экзон-интронную структуру генов (табл. 2). Экзон-интронная структура полностью соответствовала структуре гомологов *AsMDHARs* у спаржи *As. officinalis* (*AoMDHAR1*, *AoMDHAR4* и *AoMDHAR5*) и *Arabidopsis thaliana* (*AtMDHAR1*, *AtMDHAR4* и *AtMDHAR6*).

Аминокислотные последовательности, кодируемые идентифицированными генами монодегидроаскорбатредуктаз чеснока, были высоко гомологичны последовательностям *MDHARs* *As. officinalis* (сходство 83% (*MDHAR5*), 84% (*MDHAR4*) и 86% (*MDHAR1*)). Сходство последовательностей *AsMDHARs* и *AtMDHARs* составило 70–72%.

С помощью ресурса NCBI-CDD в аминокислотных последовательностях *AsMDHARs* был идентифицирован консервативный домен Puf_redox_2 (pfam07992) (рис. 1). Домен Puf_redox_2 специфичен для семейства пиридиннуклеотиддисульфидоксидоредуктаз (PNDR) и содержит

Таблица 2. Характеристики генов *AsMDHARs* и кодируемых ими монодегидроаскорбатредуктаз *Allium sativum* cv. Ershuizao (PRJNA606385)

Ген	Ген ID [19]	Локализация в геноме	Длина гена, пн	Число экзонов	Размер кДНК, пн	Белок, ао	MW, кДа	pI
<i>AsMDHAR1</i>	Asa7G02482.1	chr5:1670600630–1670609439*; chr7:671746557–671755367**	8810	10	1308	435	47.1	5.81
<i>AsMDHAR4</i>	Asa0G05211.1	chr8:228808527–228829319*; scaffold6471:143589–164381**	20793	7	1425	474	52.1	9.03
<i>AsMDHAR5</i>	Asa5G00445.1	chr6:153009626–153033684*; —	24059	17	1458	485	52.9	6.54

* Сборка ASM1415589v1.

** Сборка Garlic.V2.fa.

консервативные мотивы связывания с кофакторами FAD/NAD(P)H [11]. С помощью программы Cofactory-1.0 данные мотивы были идентифицированы в белках *AsMDHARs* (рис. 1). Было показано, что *AsMDHAR1* и *AsMDHAR4* имеют в своем составе по два мотива (в положениях 5–47 и 163–203 ао (*AsMDHAR1*), 4–47 и 161–200 ао (*AsMDHAR4*)), а *AsMDHAR5* – три мотива (48–89, 204–243 и 272–310 ао). Характерный для FAD/NAD(P)H-связывающих доменов консенсус GxGxxG [27] был выявлен в обоих FAD/NAD(P)H-связывающих мотивах белков *AsMDHAR1* и *AsMDHAR4* и в первых двух мотивах белков *AsMDHAR5* (рис. 1). Также у всех трех *AsMDHARs* была обнаружена последовательность уникальной длинной петли (unique long loop; *AsMDHAR1* – RLPGFHVCVGSGGERLLP, *AsMDHAR4* – RLPAFHNTCVGANEDRLTP, *AsMDHAR5* – RLPGFHNTCVGSGGERQTP), необходимой для формирования активного сайта фермента [11, 28].

Важную роль в определении функций и поддержании пространственной структуры белка, а также устойчивости к действию денатурирующих агентов и протеолитических ферментов играют дисульфидные связи, формируемые остатками цистеина [11, 29]. Образование дисульфидной связи защищает молекулу фермента от окислительного повреждения, что продемонстрировано на примере глутатионтрансферазы *A. thaliana* [30]. Нами было обнаружено, что последовательность белка *AsMDHAR1* содержит три остатка цистеина в положениях 70, 179 и 199, при этом два из них, Cys179 и Cys199, согласно предсказанию сервиса DiANNA 1.1, могут формировать дисульфидную связь Cys179–Cys199 (YIGLECAAALK–YPERWCMPRLF). Для шести остатков цистеина *AsMDHAR4* (положения 34, 68, 142, 160, 177 и 197) самая высокая вероятность (score 0.99) образования дисульфидной связи была предсказана для Cys68–Cys160 (PAFHNTCVGANE–DVMKSCNGGNA), Cys68–Cys197 (PAFHNTCVGANE–FPEAHNC-

MARLF) и Cys142–Cys197 (DAENVCYLRNL–FPEAHNCMARLF). В последовательности *AsMDHAR5* было выявлено пять остатков цистеина в положениях 34, 79, 115, 170 и 368, из которых дисульфидную связь могут образовывать Cys34–Cys170 (MQRVPCRRSFV–IVSTGCESARL) и Cys79–Cys115 (ADGKLCIVTKE–PGFHNTCVGSGG). Предсказанные дисульфидные мостики у *AsMDHARs* могут оказывать стабилизирующее влияние на структуру данных белков в процессе их функционирования в окислительно-восстановительной системе растения чеснока.

Внутриклеточная локализация ферментов связана с той функцией, которую выполняет конкретный компартмент клетки. Растения могут генерировать большое количество АФК через хлоропластные, пероксисомные или митохондриальные пути [31]. При этом ответственными за улавливание АФК посредством ферментативных процессов являются, прежде всего, цитоплазма и хлоропласты [32]. Мы использовали программу WoLF PSORT для предсказания возможной внутриклеточной локализации белков *AsMDHAR*. Было показано, что активность анализируемых ферментов может быть ассоциирована с АФК-связанными процессами в цитоплазме и органеллах: *AsMDHAR1* – в цитоплазме, *AsMDHAR5* – в митохондриях и хлоропластах, а *AsMDHAR4* – в пероксисомах. Дополнительным свидетельством локализации *AsMDHAR4* явилось присутствие на его С-конце мотива WYGRRRRRW (рис. 1), характерного для пероксисомных монодегидроаскорбатредуктаз [11]. Наличие трансмембранной спирали (VYNWHAAGIAVSVSIAAFAYWY) в положении 445–467 ао, предсказанное с помощью TMHMM server 2.0, определило *AsMDHAR4* как интегральный мембранный белок. Подтверждением локализации *AsMDHAR5* в митохондриях и хлоропластах стал предсказанный с помощью TargetP-2.0 N-концевой митохондриальный транспортный пептид (1–39 ао).

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей AsMDHARs и их гомологов у *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana* и *Aporagus officinalis* показал четкое разделение на три группы, соответствующие предполагаемой внутриклеточной локализации белков (рис. 2,а). В проводимых ранее исследованиях также наблюдалось разделение MDHARs высших растений на три группы [6, 33]. В этой связи интересно, что все три изоформы фермента, обнаруженные у мха *Physcomitrella patens*, PpMDHAR1, PpMDHAR2 и PpMDHAR3, напоминали исключительно цитозольную форму монодегидроаскорбатредуктазы, сохранившуюся у всех наземных растений [33]. Это может свидетельствовать о цитозольной форме MDHAR как основной, в результате эволюции которой возникли сначала пероксисомная, а затем хлоропластная/митохондриальная изоформы фермента (рис. 2,а).

В дополнение к результатам филогенетического анализа была проведена сравнительная характеристика консервативных мотивов (MEME 5.1.1) в последовательностях белков MDHARs *A. sativum*, *A. cepa*, *As. officinalis* и *A. thaliana*. Всего был идентифицирован 21 консервативный мотив, 12 из которых были общими для всех трех изоформ фермента (рис. 2,б). Цитозольные и пероксисомные MDHARs отличались только консенсусом коротких N-концевых мотивов 18 и 21 и присутствием у пероксисомной формы C-концевого мотива 11 (рис. 2,б), который включал консенсус WYGRRRRRW, специфичный для данного типа монодегидроаскорбатредуктаз [11]. Цитозольные MDHARs (кроме AoMDHAR1) выделялись также наличием мотива 20 (NNPESP) (рис. 2,б). Хлоропластные/митохондриальные MDHARs отличались от остальных изоформ присутствием C-концевого мотива 15, мотива 19, а также N-концевого мотива 13, соответствующего транспортному митохондриальному пептиду, предсказанному в последовательности AsMDHAR5 и AoMDHAR5 (рис. 2,б). Таким образом, пероксисомная изоформа могла произойти в результате дупликации и модификации гена цитозольной изоформы, сопровождающейся изменением N-области и увеличением размера кодирующей последовательности на C-конце, что предполагает участие данных консенсусов в обеспечении пероксисомной локализации белка. Дальнейшие модификации N- и C-концевых участков (мотивы 13, 15, 19), по всей вероятности, способствовали возникновению хлоропластной/митохондриальной изоформы MDHAR.

Профиль экспрессии генов AsMDHARs в различных органах растения чеснока

Транскриптомные данные *A. sativum* cv. Ershuizao (PRJNA607255, GSE145455) [24] были использованы для *in silico* оценки уровней экспрес-

сии генов AsMDHARs в различных тканях растения чеснока (рис. 3). Наибольшая транскрипция гена AsMDHAR1 была обнаружена в корнях, листьях, ложном стебле и на некоторых стадиях развития луковицы. Максимальная экспрессия гена AsMDHAR4 наблюдалась в зеленых фотосинтезирующих тканях – листьях, ложном стебле и проростках. Высокие уровни транскрипции AsMDHAR5 выявлены в процессе формирования луковицы (стадии 1–5), листьях, бутонах и проростках.

Методом РВ-ПЦР был определен профиль экспрессии генов AsMDHAR1, AsMDHAR4 и AsMDHAR5 в корне, луковице, донце, псевдостебле, листе, цветоносе, цветоложе и воздушной луковице растения чеснока сорта Сармат (рис. 4,а). В целом было показано, что уровень транскрипции AsMDHAR1 значительно превышает экспрессию двух других генов. К примеру, экспрессия в корнях AsMDHAR1 была выше таковой AsMDHAR5 и AsMDHAR4 почти в 6 и 60 раз соответственно (рис. 4,а). Транскрипты всех трех генов были выявлены во всех анализируемых тканях. Уровни транскрипции AsMDHAR1 в корнях, ложном стебле и листьях были сопоставимо высокими. В донце, цветоносе, цветоложе и воздушных луковицах уровень экспрессии AsMDHAR1 был одинаков и минимален. Максимальный уровень экспрессии гена AsMDHAR4 наблюдался в листьях, а минимальный – в корнях и донце. В луковице и воздушных луковицах уровни транскрипции AsMDHAR4 были сходными. Максимальные уровни экспрессии гена AsMDHAR5 выявлены в ложном стебле и листьях, тогда как в корнях, цветоносе, цветоложе и воздушных луковицах уровни транскрипции гена были в 2 раза ниже (рис. 4,а). Полученные результаты в целом согласуются с данными экспрессионного *in silico* анализа *A. sativum* cv. Ershuizao (рис. 3) – максимальные уровни транскрипции генов AsMDHARs характерны для листьев, ложного стебля и, в случае AsMDHAR1 – корней (рис. 4,а).

С целью определить, участвуют ли гены AsMDHARs в ответе на стрессы, нами было исследовано изменение уровней транскрипции генов AsMDHARs в корнях чеснока в ответ на заражение патогеном *F. proliferatum* (рис. 4,б) через 24 и 96 ч после заражения зубков сортов Сармат (устойчив к фузариозной гнили) и Стрелец (восприимчив к фузариозной гнили). Признаки фузариозной гнили (развитие белого пушистого мицелия на корнях и неровных светло-коричневых пятен на зубках) появились через 96 ч после заражения только у растений восприимчивого сорта Стрелец.

В целом у анализируемых образцов чеснока, контрастных по устойчивости к фузариозной гнили, наблюдалась сходная динамика экспрессии генов AsMDHARs в ответ на заражение *F. proliferatum*. В результате анализа у обоих сортов чес-

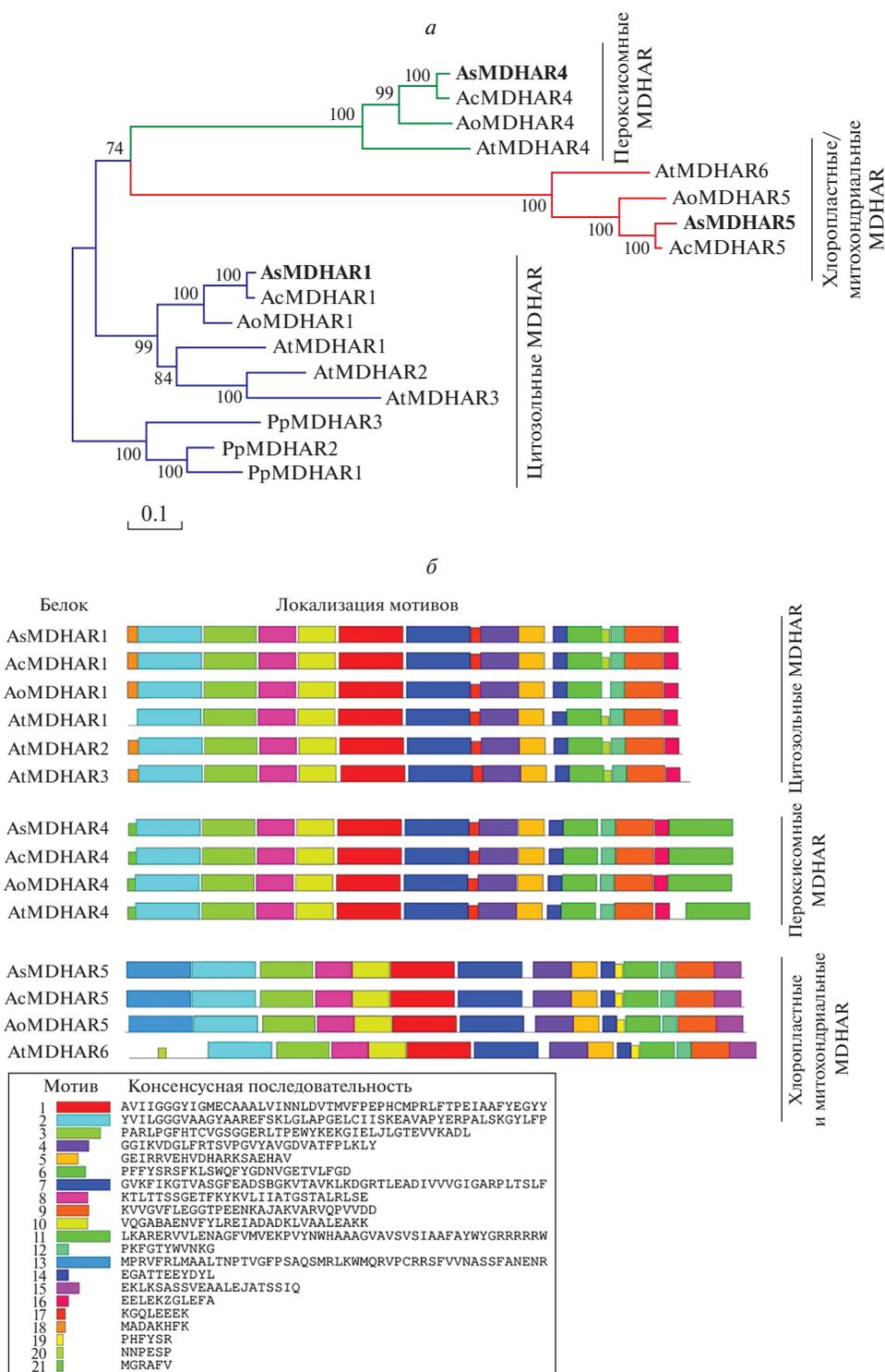


Рис. 2. *a* – филогенетическое дерево на основе последовательностей белков MDHARs чеснока *A. sativum* (AsMDHARs, полужирным шрифтом), лука репчатого *A. cepa* (AcMDHAR1 (GEOY01092914.1), AcMDHAR4 (GFAK01049639.1), AcMDHAR5 (GFAK01071117.1)), спаржи *As. officinalis* (AoMDHAR1 (XP_020260315.1), AoMDHAR4 (XP_020251572.1), AoMDHAR5 (XP_020241046.1)), *A. thaliana* (AtMDHAR1 (At3g52880, NP_190856), AtMDHAR2 (At5g03630, NP_568125.1), AtMDHAR3 (At3g09940, NP_566361.1), AtMDHAR4 (At3g27820, NP_189420.1), AtMDHAR6 (At1g63940, NP_849839.1)) и *P. patens* (PpMDHAR1 (ABA47446.1), PpMDHAR2 (ABA47447.1) и PpMDHAR3 (ABA47448.1)). Дендрограмма построена с помощью программы MEGA 7.0 (метод Maximum Likelihood, 1000 бутстреп-реplik). Предсказание локализации белков сделано с помощью программы WoLF PSORT, а также UniProtKB (для AtMDHARs); *b* – идентифицированные с помощью MEME 5.1.1 консервативные мотивы в белках MDHARs *A. sativum* (As), *A. cepa* (Ac), *As. officinalis* (Ao) и *A. thaliana* (At).

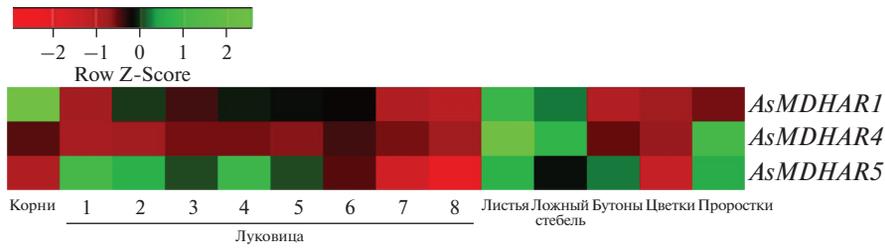


Рис. 3. Тепловая карта экспрессии генов *AsMDHAR1*, *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5* у *A. sativum* cv. Ershuizao в корнях, луковицах (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 соответствуют 192, 197, 202, 207, 212, 217, 222 и 227 дням развития луковицы), листьях, ложном стебле, бутонах, цветках и проростках. Цвета от красного к зеленому показывают градиент экспрессии гена от низкого к высокому.

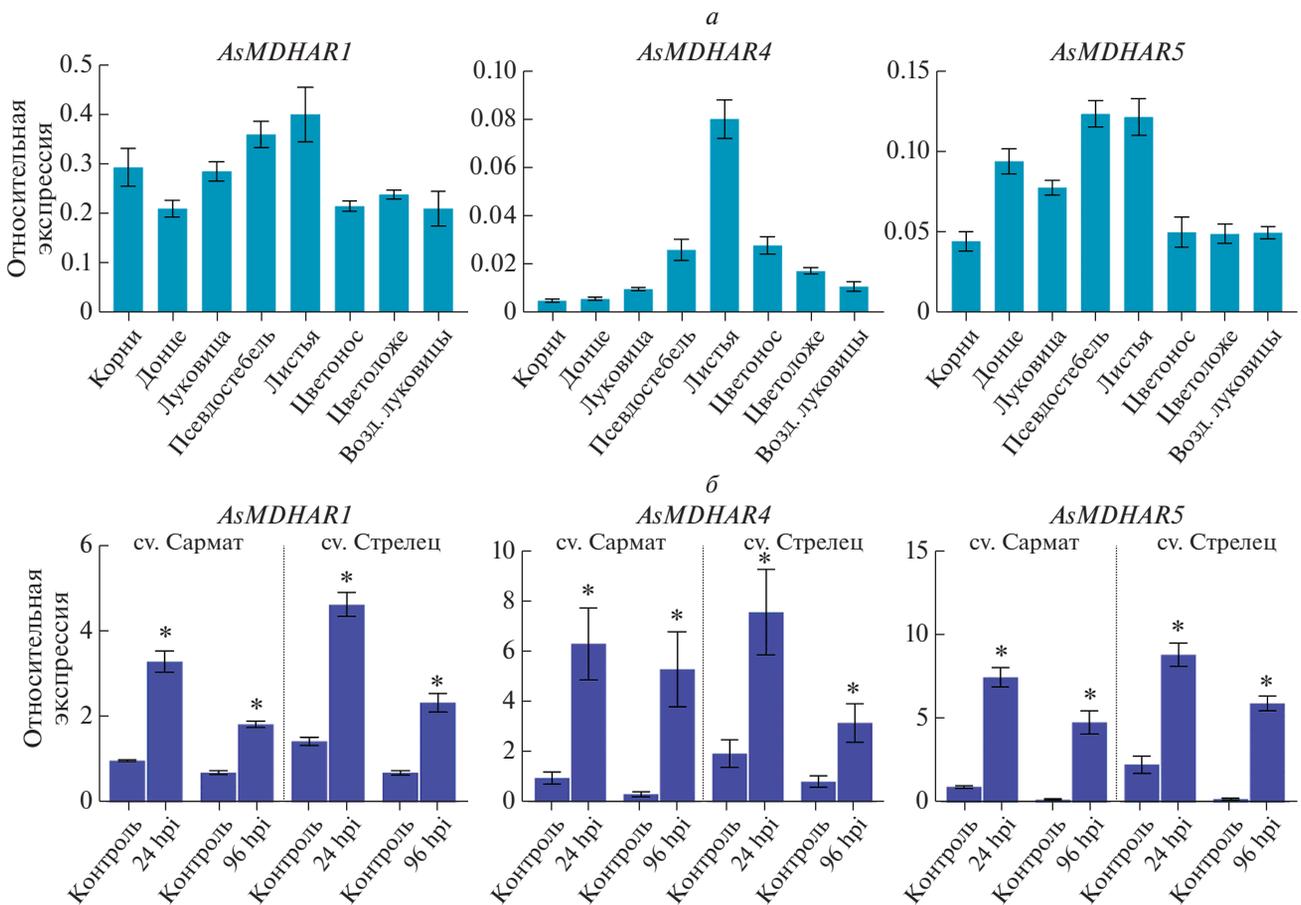


Рис. 4. а – профиль экспрессии генов *AsMDHAR1*, *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5* в различных органах чеснока (сорт Сармат); б – изменение уровней транскрипции генов *AsMDHARs* в корнях чеснока сортов Сармат (устойчивый) и Стрелец (восприимчивый) через 24 и 96 ч после заражения *F. proliferatum*. Данные нормализовали по уровням транскрипции генов *GAPDH* и *UBQ* и представляли как кратное изменение (среднее ± стандартная ошибка) от контроля (24 ч) сорта Сармат, принятого за 1; * $p < 0.01$ по сравнению с неинфицированным контролем. hpi – часов после заражения.

нока была выявлена значительная активация транскрипции всех трех генов *AsMDHAR1*, *AsMDHAR4* и *AsMDHAR5* в ответ на заражение *F. proliferatum*, при этом пик увеличения экспрессии приходился на 24 ч после заражения (рис. 4,б). В случае незараженного контроля, в точке (24 ч)

уровни транскрипции генов *AsMDHARs* были в 1.4–2.3 раза выше у восприимчивого сорта Стрелец, чем у устойчивого сорта Сармат; в точке (96 ч) уровни экспрессии генов *AsMDHARs* у обоих сортов чеснока снизились в 1.3–2.7 раза по сравнению с точкой (24 ч) (рис. 4,б).

Известно, что при воздействии различных абиотических и биотических стрессов в тканях растений увеличивается производство АФК, вызывающих неконтролируемое окисление компонентов клеток [2, 34, 35]. Антиоксидантная система растений, важным компонентом которой является АК и аскорбат-зависимые ферменты, предотвращает накопление АФК и минимизирует негативные последствия их перепроизводства [1, 36].

Ранее сообщалось об увеличении активности *MDHAR* у растений в ответ на различные абиотические стрессы, такие как засоление, повышенная освещенность, УФ-излучение, низкая температура, засуха, тяжелые металлы, гормоны и др. [12, 35, 37]. Исследования реакции генов *MDHAR* или активности кодируемых ими ферментов на биотические стрессы ограничиваются несколькими работами. У кукурузы *Z. mays* в ответ на заражение грибами *F. proliferatum*, *F. subglutinans* и *A. flavus* наблюдалось значительное снижение ферментативной активности *MDHAR* в зерне [10]. В листьях томата *S. lycopersicum*, начиная со второго дня грибной инфекции *Botrytis cinerea*, снижались антиоксидантные свойства митохондрий за счет снижения активности *MDHAR* [38]. В ответ на заражение тлей в листьях кукурузы было выявлено повышение транскрипции генов *MDHAR* [39].

С учетом вышесказанного можно предположить, что активация транскрипции генов *AsMDHARs* в корнях чеснока в ответ на заражение *F. proliferatum* связана с необходимостью восстановления образующихся при нейтрализации АФК окисленных форм АК для поддержания окислительно-восстановительного баланса. На это также указывает повышенная (в сравнении с другими тканями растения) экспрессия генов *MDHAR* в листьях и корнях растений — органах, первыми получающих стрессовые сигналы от окружающей среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 21-76-00007) и Министерства науки и высшего образования РФ.

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

- Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. P. 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. P. 405–410.
- Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals // *Free Radical Biology and Medicine.* 2018. V. 22. P. 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>
- De Tullio M.C., Guether M., Balestrini R. Ascorbate oxidase is the potential conductor of a symphony of signaling pathways // *Plant Signal. Behav.* 2013. V. 8. Article e23213. <https://doi.org/10.4161/psb.23213>
- Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B. et al. Peroxisomal monodehydroascorbate reductase, genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 2111–2123. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066225>
- Sano S., Tao S., Endo Y. et al. Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005. V. 69. P. 762–772.
- Chew O., Whelan J., Millar A.H. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 46869–46877.
- Zhou F., Zheng B., Wang F. et al. Genome-wide analysis of *MDHAR* gene family in four cotton species provides insights into fiber development via regulating AsA redox homeostasis // *Plants (Basel)*. 2021. V. 10(2). Article 227. <https://doi.org/10.3390/plants10020227>
- Feng H., Liu W., Zhang Q. et al. TaMDHAR4, a monodehydroascorbate reductase gene participates in the interactions between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. tritici // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 76. P. 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.015>
- Lanubile A., Maschietto V., De Leonardis S. et al. Defense responses to mycotoxin-producing fungi *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, and *Aspergillus flavus* in kernels of susceptible and resistant maize genotypes // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2015. V. 28(5). P. 546–557. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0269-R>
- Negi B., Salvi P., Bhatt D. et al. Molecular cloning, in-silico characterization and functional validation of monodehydroascorbate reductase gene in *Eleusine coracana* // *PLoS One.* 2017. V. 12. Article e0187793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187793>
- Zhang Y., Li Z., Peng Y. et al. Clones of *FeSOD*, *MDHAR*, *DHAR* genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments // *Molecules.* 2015. V. 20. P. 20939–20954. <https://doi.org/10.3390/molecules201119741>
- Qi Q., Yanyan D., Yuanlin L. et al. Overexpression of *SIMDHAR* in transgenic tobacco increased salt stress tolerance involving S-nitrosylation regulation // *Plant Sci.* 2020. V. 299. Article 110609. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110609>
- Sultana S., Khew C.Y., Morshed M.M. et al. Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (*AeMDHAR*) confers salt tolerance on rice // *J. Plant Physiol.* 2012. V. 169. P. 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.09.004>
- García G., Clemente-Moreno M.J., Díaz-Vivancos P. et al. The apoplastic and symplastic antioxidant system in onion: response to long-term salt stress // *Antioxi-*

- dants (Basel). 2020. V. 12. Article 67.
<https://doi.org/10.3390/antiox9010067>
16. Truffault V., Gest N., Garchery C. et al. Reduction of MDHAR activity in cherry tomato suppresses growth and yield and MDHAR activity is correlated with sugar levels under high light // *Plant Cell Environ.* 2016. V. 39. P. 1279–1292.
<https://doi.org/10.1111/pce.12663>
 17. Truffault V., Riqueau G., Garchery C. et al. Is monodehydroascorbate reductase activity in leaf tissue critical for the maintenance of yield in tomato? // *J. Plant Physiol.* 2018. V. 222. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.12.012>
 18. Haroldsen V.M., Chi-Ham C.L., Kulkarni S. et al. Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato // *Plant Physiol. Biochem.* 2011. V. 49. P. 1244–1249.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.08.003>
 19. Филюшин М.А., Анисимова О.К., Кочиева Е.З., Шченникова А.В. Корреляция содержания аскорбиновой кислоты и профиля экспрессии генов монодегидроаскорбатредуктаз (MDHARs) у лука-поррея (*Allium porrum* L.) // *Физиол. растений.* 2021. Т. 68(5). С. 501–508.
<https://doi.org/10.31857/S0015330321050031>
 20. Gálvez L., Urbaniak M., Waśkiewicz A. et al. *Fusarium proliferatum* – causal agent of garlic bulb rot in Spain: genetic variability and mycotoxin production // *Food Microbiology.* 2017. V. 67. P. 41–48.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.05.006>
 21. Filyushin M.A., Anisimova O.K., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Genome-wide identification and expression of chitinase class I genes in garlic (*Allium sativum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Fusarium proliferatum* // *Plants.* 2021. V. 10. Article 720.
<https://doi.org/10.3390/plants10040720>
 22. Anisimova O.K., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A. Pathogenesis-related genes of PR1, PR2, PR4 and PR5 families are involved in the response to *Fusarium* infection in garlic (*Allium sativum* L.) // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Article 6688.
<https://doi.org/10.3390/ijms22136688>
 23. Anisimova O.K., Seredin T.M., Danilova O.A., Filyushin M. First report of *Fusarium proliferatum* causing garlic clove rot in Russian Federation // *Plant Dis.* 2021.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2743-PDN>
 24. Sun X., Zhu S., Li N. et al. A chromosome-level genome assembly of garlic (*Allium sativum*) provides insights into genome evolution and allicin biosynthesis // *Mol. Plant.* 2020. V. 13. P. 1328–1339.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.07.019>
 25. Liu M., Wu Z., Jiang F. Selection and validation of garlic reference genes for quantitative real-time PCR normalization // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2015. V. 122. P. 435–444.
<https://doi.org/10.1007/s11240-015-0780-9>
 26. Schwinn K.E., Ngo H., Kenel F. et al. The onion (*Allium cepa* L.) R2R3-MYB gene *MYB1* regulates anthocyanin biosynthesis // *Front. Plant. Sci.* 2016. V. 7. Article 1865.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01865>
 27. Yoon H.S., Lee H., Lee I.A. et al. Molecular cloning of the monodehydroascorbate reductase gene from *Brassica campestris* and analysis of its mRNA level in response to oxidative stress // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1658. P. 181–186.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.05.013>
 28. Park A.K., Kim I.S., Do H. et al. Structure and catalytic mechanism of monodehydroascorbate reductase, MDHAR, from *Oryza sativa* L. japonica // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Article 33903.
<https://doi.org/10.1038/srep33903>
 29. Ferrè F., Clote P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 182–185.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl189>
 30. Tossounian M.A., Van Molle I., Wahni K. et al. Disulfide bond formation protects *Arabidopsis thaliana* glutathione transferase tau 23 from oxidative damage // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2018. V. 1862. P. 775–789.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.10.007>
 31. Mignolet-Spruyt L., Xu E., Idänheimo N. et al. Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signaling // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 3831–3844.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw080>
 32. Fan W.J., Feng Y.X., Li Y.H. et al. Unraveling genes promoting ROS metabolism in subcellular organelles of *Oryza sativa* in response to trivalent and hexavalent chromium // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 744. Article 140951.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140951>
 33. Lunde C., Baumann U., Shirley N.J. et al. Gene structure and expression pattern analysis of three monodehydroascorbate reductase (MdhAR) genes in *Physcomitrella patens*: implications for the evolution of the MDHAR family in plants // *Plant Mol. Biol.* 2006. V. 60. P. 259–275.
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-3881-8>
 34. García-Limones C., Hervás A., Navas-Cortés J.A. et al. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2002. V. 61. P. 325–337.
 35. Pandey P., Singh J., Achary V.M.M., Reddy M.K. Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway // *Front. Environ. Sci.* 2015. V. 3. Article 25.
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00025>
 36. Anjum N.A., Gill S.S., Gill R. et al. Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes // *Protoplasma.* 2014. V. 251. P. 1265–1283.
<https://doi.org/10.1007/s00709-014-0636-x>
 37. Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii* // *Plant Cell Environ.* 2003. V. 26. P. 845–856.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01016.x>
 38. Kuzniak E., Skłodowska M. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. P. 605–612.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erh076>
 39. Sytykiewicz H. Expression patterns of genes involved in ascorbate-glutathione cycle in aphid-infested maize (*Zea mays* L.) seedlings // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. Article 268.
<https://doi.org/10.3390/ijms17030268>

Identification of Monodehydroascorbate Reductase Genes (MDHAR) in Garlic (*Allium sativum* L.) and Their Role in the Response to *Fusarium proliferatum* Infection

O. K. Anisimova^a, A. V. Shchennikova^a, E. Z. Kochieva^a, and M. A. Filyushin^{a, *}

^aFederal Research Center Fundamentals of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: michel7753@mail.ru

Monodehydroascorbate (MDHA) reductase catalyzes the reduction of monodehydroascorbic acid, formed as a result of reactive oxygen species neutralization to ascorbic acid, which is one of the main mechanisms for maintaining the intracellular redox status. In the garlic genome (*Allium sativum* L.) three *MDHAR* genes encoding monodehydroascorbate reductases of different cellular localization were identified. In the amino acid sequences AsMDHAR1, AsMDHAR4, and AsMDHAR5, the Pyr_redox_2 domain, FAD and NAD(P)H cofactors binding domains and a unique long loop motif required for the enzyme active site formation were identified. The expression profiles of *MDHAR1*, *MDHAR4*, and *MDHAR5* genes in various organs of garlic plant were determined, and the alteration in the transcription levels of *AsMDHARs* in response to infection with the pathogen *Fusarium proliferatum* was studied. The maximum transcription levels of *AsMDHARs* was shown in leaves, pseudostem, and, in the case of *AsMDHAR1*, in roots. In response to *F. proliferatum* infection, in the roots of garlic plants an increase in the transcription levels of all three *AsMDHAR* genes was revealed, and expression patterns of the genes were similar and did not depend on the cultivar level of resistance to *Fusarium* rot.

Keywords: garlic, *Allium sativum*, ascorbic acid recycling, monodehydroascorbate, *Fusarium proliferatum*.

УДК 575.826:577.21:582.683.2

РОЛЬ *DOG1* И *FT* – КЛЮЧЕВЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ПОКОЯ СЕМЯН В АДАПТАЦИИ *Arabidopsis thaliana* СЕВЕРНЫХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

© 2022 г. М. В. Зарецкая¹, О. Н. Лебедева¹, О. М. Федоренко¹, *¹Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: fedorenko_om@mail.ru

Поступила в редакцию 03.12.2021 г.

После доработки 16.12.2021 г.

Принята к публикации 24.01.2022 г.

Представлены результаты оценки первичного покоя семян растений *A. thaliana* северных природных популяций, имеющего решающее значение для адаптации. Установлено, что температурный опыт материнского растения в период созревания семян используется для контроля прорастания семенного потомства. Выявлена зависимость транскрипционной активности гена *FT* в стручках растений от температуры выращивания материнского растения: она оказалась выше при прохладной температуре (16°C) по сравнению с более теплыми условиями. Для *DOG1* подобная зависимость верна лишь для некоторых популяций, имеющих в своем составе не только позднецветущие, но и относительно раннецветущие растения. Вероятно, это связано с тем, что самые поздние экотипы *A. thaliana* имеют особые механизмы регуляции физиологических функций *DOG1*. Показано, что в условиях холодного климата у большинства растений *A. thaliana* семена имеют более глубокий покой при высокой температуре (22°C), что обеспечивает их прорастание осенью и цветение весной, после окончания яровизации. Тем не менее выявленная способность определенного количества семян прорасти при 22°C позволяет выдвинуть предположение о наличии смещения альтернативных стратегий жизненного цикла растений *A. thaliana* в карельских популяциях. В некоторых популяциях присутствуют как зимние, так и летние однолетники, что создает адаптивный потенциал для выживания вида в жестких и нестабильных условиях на северной периферии ареала.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, природные популяции, покой семян, экспрессия генов *DOG1* и *FT*, жизненные циклы растений.

DOI: 10.31857/S0016675822070153

Проблема адаптации живых организмов к условиям окружающей среды продолжает оставаться наиболее актуальной в современной биологии. Высшие растения по сравнению с животными ведут прикрепленный образ жизни, поэтому они в значительной степени зависят от климатических условий окружающей среды и имеют принципиально иную жизненную стратегию, связанную с адаптацией. В частности, установлено, что в развитии растений задействовано значительно большее количество регуляторных генов, чем у животных. Растения координируют свой жизненный цикл в соответствии с сезонами года. Центральное место в этом процессе занимает способность растений воспринимать и интегрировать информацию об окружающей среде [1].

Сезонные сроки прорастания семян имеют решающее значение для адаптации растений к различным климатическим условиям. Они непосредственно связаны с периодом покоя семян и определяют в каких условиях окружающей среды

будут формироваться последующие жизненные признаки растений (такие, как потребность в яровизации, время начала цветения и т.д.) [2, 3]. Эти признаки могут быть скоррелированы в результате естественного отбора и могут формировать синдромы адаптивных форм жизненного цикла [4, 5]. У однолетних растений вариации в сроках сезонного прорастания семян создают альтернативные стратегии жизненных циклов. Индукция вторичного покоя семян в зимних условиях, который ограничивает прорастание до осени, положительно коррелирует со временем цветения, создавая зимние и весенние сезонные стратегии жизненного цикла [3]. Зимние однолетники прорастают осенью, перезимовывают, а затем цветут и рассеивают семена весной, тогда как летние однолетники зимуют в виде семян и прорастают, цветут и рассеивают семена весной или летом [6]. Также наблюдается смешение типов осеннего и весеннего прорастания внутри популяций [7–9]. Предполагается, что такая неоднород-

ность стратегий жизненного цикла растений является своеобразной формой защиты популяций от риска вымирания и увеличивает потенциал выживаемости [10].

На *Arabidopsis thaliana* – классическом модельном объекте показано, что ключевые гены, регулирующие цветение, – *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)* и *DELAY OF GERMINATION 1 (DOG1)* участвуют и в переходе от покоя семян к прорастанию, предполагая, что покой и цветение могут координированно регулироваться через перекрывающиеся молекулярные пути [1, 3, 11].

Известно, что материнское растение играет важную роль в контроле покоя семян: температурные условия, в которых оно находится перед цветением, заметно влияют на состояние покоя семян и соответственно на сроки их прорастания. Белок FT используется для модулирования периода покоя семян, интегрируя долгосрочную память о пережитой температуре в тканях плода [12]. В частности установлено, что воздействие температуры на материнское растение *A. thaliana* в течение его выращивания передается с помощью путей сигнальной трансдукции в FT-локус флоремы стручка [11].

DOG1 – наиболее важный регулятор первичного покоя у *A. thaliana*. Он участвует в программе созревания семян и времени прорастания [1, 3, 13]. Белок DOG1 в семенах приводит к глубокому покою и задержке прорастания у *A. thaliana* [14]. Известна природная аллельная изменчивость *DOG1*, ассоциированная с естественными вариациями в первичном покое [15, 16]. Установлено, что уровень экспрессии *DOG1* связан с вариабельностью покоя и проявляет клинальную изменчивость [17, 18]. Аллельные варианты *DOG1* также связаны с естественной изменчивостью времени цветения [19] и могут иметь плейотропные эффекты [20].

Одной из важных функций DOG1 является индукция температурно-зависимого покоя [6, 18, 21, 22]. Температура во время созревания семян обладает доминирующим эффектом на уровень транскриптов *DOG1* в зрелых семенах и определяет глубину покоя [8, 21, 23]. Известно, что чем ниже температура созревания семян (т.е. температура, которую испытывает материнское растение), тем выше экспрессия гена и степень покоя семян, по сравнению с более теплыми условиями (20°C). Следовательно, *DOG1*, вероятно, проявляет чувствительность к окружающей среде [21].

Ранее нами было показано [24, 25], что в некоторых карельских популяциях встречаются и раннецветущие формы *A. thaliana*, что не характерно для северных широт [26]. В то же время недавно обнаружено, что раннецветущая линия *Ler* с очень слабым покоем семян имеет инсерцию 285 пар

нуклеотидов (пн) в промоторе *DOG1*, что обуславливает низкую экспрессию этого гена [27].

Таким образом, с целью изучения генетических механизмов адаптации растений *A. thaliana* северных природных популяций на одной из важнейших стадий жизненного цикла – стадии прорастания семян, а также для выявления адаптивных стратегий жизненного цикла растений проведено настоящее исследование. Здесь мы представляем результаты 1) оценки глубины покоя семян в зависимости от температуры выращивания растений и прорастания семян; 2) изучения транскрипционной активности генов *FT* и *DOG1* при различной температуре выращивания растений; 3) анализа размера фрагмента ДНК 5'-регуляторной области *DOG1* у растений карельских популяций (в сравнении с таковым у *Ler*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и условия выращивания растений

В работе использованы растения *A. thaliana* четырех популяций, находящихся на северной границе ареала вида, в Карелии: Шуйская (62°00' с.ш.), Царевичи (62°01' с.ш.), Кончезеро (62°08' с.ш.), Медвежьегорск (62°55' с.ш.). Названия популяций даны в соответствии с близлежащими населенными пунктами. В качестве контроля использована раннецветущая линия – *Ler*. Из семян, собранных во время экспедиции 2019 г., выращивали исходный материал в лабораторных условиях по общепринятым методикам культивирования арабидопсиса [28] или использовали растения, выросшие в природной среде (среднесуточная температура июня 2019 г. приблизительно 12–16°C). Семена высевали в чашки Петри и проращивали на простой среде по Гихнеру–Велеминскому, которая готовилась на основе 8%-ного агар-агара с добавлением растворов макро- и микроэлементов. 14-Дневные растения яровизировали в течение восьми недель при 2–4°C. Затем растения пересаживали в смесь почвы и песка (2 : 1) и выращивали в лабораторных условиях при 22°C и круглосуточном освещении (10000 лк) или в камере искусственного климата (Snijders Micro Clima, Snijders Labs, Нидерланды) при 16°C и 16-часовом фотопериоде. Для изучения глубины покоя свежесобранные семена в количестве 200 шт. (50 × 4 повторности) из каждой популяции высевали на второй день и выращивали в чашках Петри на агаризованной питательной среде, как описано выше, в камере искусственного климата при 10 или 22°C, 16-часовом фотопериоде и освещении 10000 лк. О глубине покоя семян судили по их всхожести на 10-й день. Анализ экспрессии генов *FT* и *DOG1* проводили на молодых стручках растений, выращенных при 16 или 22°C, как описано выше.

Анализ уровня транскриптов генов

Выделение суммарной РНК из стручков растений осуществлялось СТАБ-методом [29]. Качество и количество РНК определяли на спектрофотометре Smart Spec (Bio-Rad, США). Первую цепь кДНК синтезировали с помощью набора для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген). Содержание мРНК оценивали методом ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBR Green на приборе iCycler iQ5 (Bio-Rad) с набором для ПЦР-РВ (Евроген). Для определения уровня экспрессии гена каждую ПЦР проводили три раза, на трех независимых образцах кДНК. Последовательности праймеров для анализа экспрессии: *FT* F: 5'-CGC-CAGAACTTCAACACTCG-3', R: 5'-CTTCCTC-CGCAGCCACTC-3', *DOG1* F: 5'-GACGAAGAA-GAGAAGATGACCAAG-3', R: 5'-CGACCAATA-AACGAGCCATAGC-3'. Анализ относительного содержания транскриптов проводили с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [30], основанного на нормализации данных по экспрессии относительно двух референсных генов. Рассчитывалась разница значений C_t (ΔC_t) между целевым и референсными генами, затем сравнивались значения ΔC_t контрольного и опытного образцов. Для *FT* в качестве референсных использованы гены *18sRNA* и *UBQ10* [31], которые характеризуются конститутивной экспрессией; для *DOG1* – *ACTIN8* и *18sRNA*. Последовательности праймеров референсных генов: *18sRNA* F: 5'-TGCCCCGTTGCTCTGATGA-3', R: 5'-GGATGTGGTAGCCGTTTCT-3'; *UBQ10* F: 5'-TCTTCTTTATCATCGCTTTCG-3', R: 5'-GCT-CAACACTTTTCGCTACAT-3'; *ACTIN8* F: 5'-GCA-GACCGTATGAGCAAAGAG-3', R: 5'-TGAGG-GAAGCAAGGATAGAACC-3'. О специфичности фрагментов судили по кривым плавления.

Сравнительный анализ размера регуляторной 5'-области *DOG1*

Для определения размера регуляторной 5'-области *DOG1* у растений карельских популяций была выделена геномная ДНК СТАБ-методом [32] из листьев взрослых растений. Из каждой популяции проанализировано по 10 растений. Последовательности праймеров для ПЦР-амплификации участка регуляторной 5'-области *DOG1*: F: 5'-ACAACAACCTCGCACTCTC-3', R: 5'-AATATAG-GGAAACAATGACAAATG-3'. Продукты амплификации выявляли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле в ТВЕ буферном растворе с добавлением бромистого этидия и фотографияровали в проходящем УФ-свете. Анализ молекулярной массы фрагментов осуществляли относительно маркера молекулярной массы (100 bp–1 kb) (Силекс, Россия).

Статистическая обработка данных

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием статистических программ Microsoft Excel и Statgraphics 2.1 (ANOVA). Достоверность различий содержания мРНК генов *FLC* и *VIN3* в листьях растений разных популяций и между отдельными группами растений по длительности яровизации оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (*U*-тест).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение глубины покоя семян растений *A. thaliana* карельских популяций

Изучение глубины покоя свежесозревших семян в карельских популяциях проводилось на растениях, выросших в природной среде и в лабораторных условиях (при 16 или 22°C). Семена проращивали при 10°C или при 22°C (приблизительная среднесуточная температура осени и лета, соответственно). Такая температура была использована в экспериментах согласно литературным данным [3, 6, 33, 34] для возможности сопоставления полученных результатов.

Исследование показало, что у растений, выросших в природной среде, в популяциях Шуйская и Кончезеро, которые представлены позднецветущими формами растений, всхожесть семян выше при 10°C по сравнению с 22°C. Популяция Царевичи является смешанной по наличию раннецветущих и позднецветущих форм растений [26]. В этой популяции всхожесть семян при разных температурных условиях проращивания различается незначительно (табл. 1).

При выращивании растений в климатической камере (табл. 2) как при 16°C, так и при 22°C в двух популяциях, представленных позднецветущими формами растений, – Кончезеро и Медвежьегорск сохраняется закономерность, выявленная в природных условиях: всхожесть семян выше при 10°C по сравнению с 22°C. Также сохраняется природная закономерность прорастания семян в популяции Царевичи – примерно одинаковая, но только при выращивании растений при 16°C, а при 22°C – всхожесть семян выше при 10°C. По-видимому, в смешанной по времени цветения популяции (Царевичи) в условиях прохладного северного лета семена имеют равные шансы прорасти в разных температурных условиях, что способствует формированию альтернативных стратегий жизненного цикла: зимние однолетники (прорастают осенью) и летние однолетники (прорастают весной) [7–9]. В популяции Шуйская при выращивании растений и проращивании семян в разных температурных условиях всхожесть семян оказалась примерно одинаковой в отличие от природных условий.

Таблица 1. Всхожесть (%) свежесозревших семян *A. thaliana* карельских популяций при выращивании материнских растений в полевых условиях при 12–16°C

Популяция	Температура проращивания семян	
	10°C	22°C
Царевичи	23.5	27.0
Шуйская	40.5***	5.8
Кончезеро	9.0***	0

Примечание. Здесь и в табл. 2 достоверность различий всхожести семян при 10°C: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Таблица 2. Всхожесть (в %) свежесозревших семян *A. thaliana* карельских популяций при выращивании материнских растений в лабораторных условиях

Популяция	Материнское растение выращено при 22°C		Материнское растение выращено при 16°C	
	Температура проращивания семян			
	10°C	22°C	10°C	22°C
Царевичи	88.3**	28.8	95.0	95.3
Шуйская	72.2	72.8	98.6	89.6
Кончезеро	14.2**	0.5	79.5***	8.0
Медвежьегорск	2.0**	0	1.0*	0

Такое несоответствие полученных результатов в природе и в лаборатории объясняется, по-видимому, особенностями природных условий: перепадами температур в дневное и ночное время, световым периодом и некоторыми другими. Медвежьегорск – самая северная популяция, по-видимому это послужило причиной медленных темпов прорастания семян при всех условиях проращивания, однако всхожесть выше при 10°C (табл. 2).

Таким образом, в условиях невысоких летних температур в карельских популяциях *A. thaliana* преобладают озимые однолетние формы растений. По-видимому, растения, выросшие в прохладных условиях северного лета, формируют более глубокий покой семян, поэтому прорастают осенью, а не летом, и цветут после окончания яровизации. Тем не менее способность определенного количества семян прорасти в более теплых условиях (22°C) по сравнению с прохладными (10°C) свидетельствует о наличии смешанных жизненных форм растений (зимние и летние однолетники) в северных природных популяциях. Это, по-видимому, способствует их экологической пластичности и создает адаптивный потенциал для выживания вида в жестких и нестабильных условиях произрастания.

Анализ экспрессии генов FT и DOG1, контролирующих эпигенетический механизм покоя семян растений, в стручках A. thaliana карельских популяций

Анализ относительного уровня транскриптов *FT* и *DOG1* в стручках *A. thaliana* проводили на растениях, выращенных при 16 или 22°C. Результаты представлены на диаграммах (рис. 1, 2).

Оказалось, что уровень экспрессии *FT* выше при прохладной температуре выращивания мате-

ринских растений (16°C) по сравнению с более высокой температурой (22°C), что согласуется с данными литературы [11, 34] (рис. 1).

Сопоставление полученных данных с результатами проращивания семян в различных температурных условиях позволяет сделать вывод о зависимости глубины покоя семян от уровня экспрессии *FT*. В частности, высокий уровень экспрессии *FT* приводит к более высокой всхожести семян при прохладной температуре (10°C) по сравнению с 22°C в природных условиях (кроме популяции Царевичи – смешанной по времени цветения растений). Однако при выращивании материнских растений в лабораторных условиях указанная зависимость не всегда сохраняется.

Результаты анализа относительного уровня транскриптов *DOG1* в стручках растений оказались неоднозначными (рис. 2). Так, в двух популяциях (Царевичи и Кончезеро) экспрессия *DOG1* оказалась выше при выращивании растений при 16°C по сравнению с 22°C, что согласуется с данными литературы [18]. Одна из этих популяций – Царевичи имеет в своем составе раннецветущие растения. В двух популяциях (Шуйская и Медвежьегорск) различия в экспрессии *DOG1* при разной температуре выращивания материнских растений небольшие или отсутствуют. Медвежьегорск – самая северная популяция, где присутствуют самые позднецветущие растения с глубоким покоем семян (см. табл. 2). Растения популяции Шуйская, как было показано нами ранее [35], имеют потребность в более длительной яровизации (9 нед.) по сравнению с популяциями Кончезеро и Царевичи (6 нед.). Таким образом, возможно отсутствие различий в экспрессии *DOG1* в данном случае связано с генетическими особенностями растений северных популяций, а также с тем, что

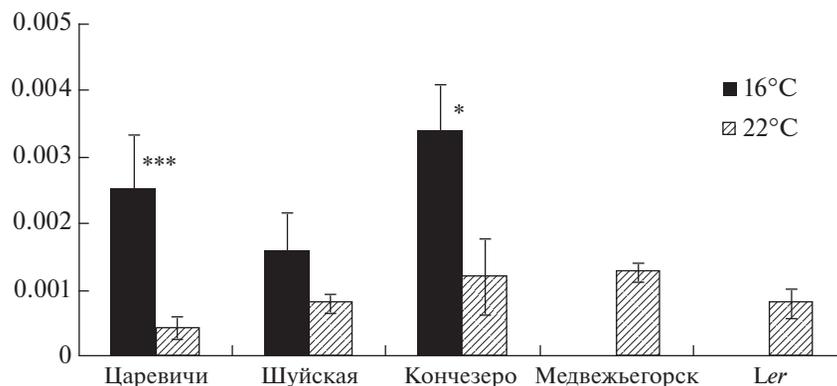


Рис. 1. Уровень транскрипционной активности локуса *FT* в стручках растений северных природных популяций *A. thaliana* при различной температуре их выращивания. По оси *X* – карельские популяции и линия *Ler*; по оси *Y* – относительный уровень транскриптов *FT*. Здесь и на рис. 2 звездочками отмечена значимость различий в экспрессии гена при разной температуре выращивания растений: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

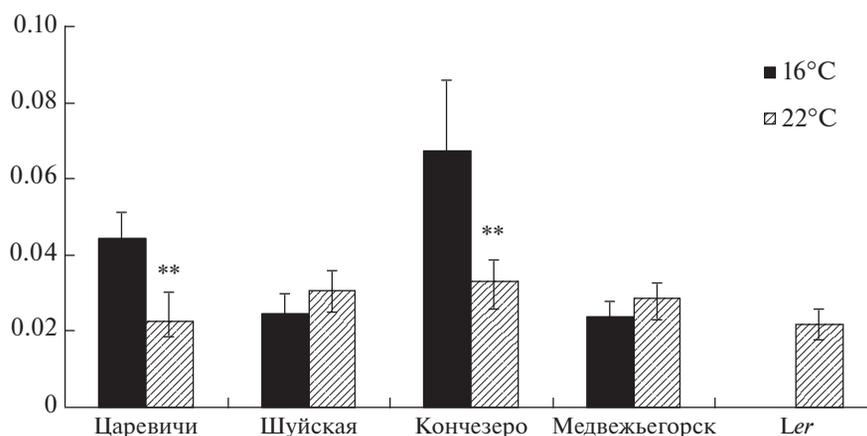


Рис. 2. Уровень транскрипционной активности гена *DOG1* в стручках растений северных природных популяций *A. thaliana* при различной температуре их выращивания – 16 и 22°C. По оси *X* – линия *Ler* и карельские популяции; по оси *Y* – относительный уровень транскриптов *DOG1*.

температура 16–22°C типична для карельского лета и не составляет большой разницы для позднецветущих экотипов с глубоким покоем семян.

Наши результаты несколько отличаются от результатов других исследователей. По-видимому, это связано с тем, что по их мнению [3, 6, 14, 34] все еще нет четкого понимания механизма действия и контроля экспрессии этого гена. Известно, что физиологическая функция *DOG1* широко регулируется с помощью сложного набора эпигенетических трансформаций, которые включают альтернативный сплайсинг, альтернативное полиаденилирование, модификации гистонов и антимысловую транскрипцию [22, 36]. Характеристика регуляторных сетей, выявленных между различными модификаторами хроматина с другими эпигенетическими эффекторами и регуляторами, только началась и представляет перспективу дальнейших исследований [14, 37].

Сравнительный анализ размера регуляторной 5'-области ДНК гена *DOG1* в карельских популяциях *A. thaliana*

Известно, что функциональные аллельные варианты *DOG1* широко распространены и имеют большое адаптивное значение [13, 18, 38, 39]. Недавно было показано, что для активации экспрессии *DOG1* необходим фактор транскрипции bZIP67. Он связывается с промотором *DOG1*, при этом низкая температура во время созревания семян и обилие белка bZIP67 увеличивают экспрессию гена, ведущую к усилению покоя семян. В промоторе *DOG1 Ler-0* – раннецветущей линии *A. thaliana* с очень слабой степенью покоя обнаружена вставка 285 пн, которая обуславливает низкую экспрессию *DOG1*. Изменение длины промотора, вызванное INDEL длиной 285 пн, влияет на bZIP67-зависимую активацию *DOG1* и приводит к фенотипическим различиям в покое семян [27].

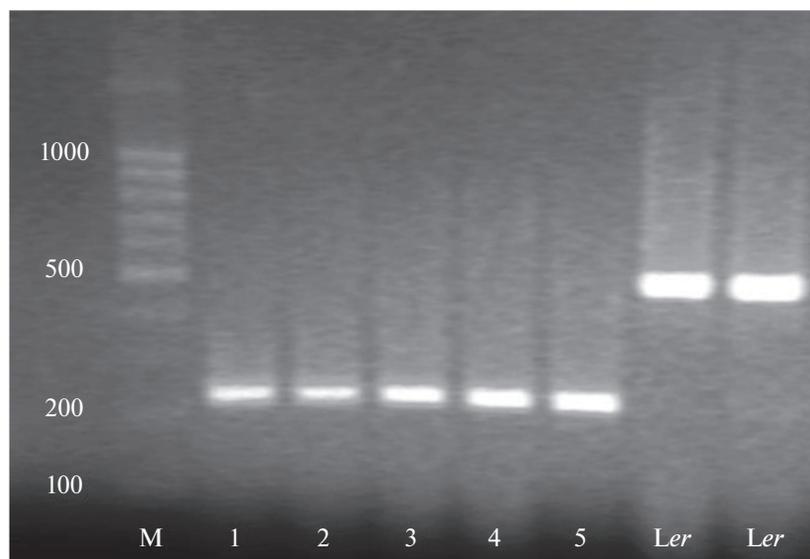


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов ДНК 5'-регуляторной области гена *DOG1* у растений карельских популяций *A. thaliana*. М – ДНК-маркер молекулярной массы (1500–100 пн); 1–5 – продукты амплификации образцов растений карельских популяций; *Ler* – линия *A. thaliana*.

Для выяснения связи особенностей экспрессии *DOG1* в карельских популяциях с возможными изменениями нуклеотидной последовательности гена был проведен анализ размера регуляторной 5'-области этого гена в сравнении с таковым у *Ler*. Результаты показали, что размер амплифицированного фрагмента ДНК регуляторной области *DOG1* в растениях всех исследованных популяций составляет 224 пн. У линии *Ler* обнаружена дополнительная протяженная инсерция 285 пн, что соответствует данным литературы [27] (рис. 3). Поэтому можно заключить, что раннее цветение растений некоторых популяций вероятно связано с другими генетическими причинами.

Таким образом, в результате проведенного исследования получены данные, позволяющие судить о своеобразии генетических механизмов, участвующих в регуляции глубины покоя и сезонных сроков прорастания семян *A. thaliana* в популяциях, расположенных на северной периферии ареала вида в нестабильных условиях произрастания растений. Установлено, что температурный опыт материнского растения в период созревания семян важен и используется для контроля прорастания семенного потомства. В частности, выявлена зависимость транскрипционной активности локуса *FT* в стручках растений от температуры выращивания материнского растения: она оказалась выше при прохладной температуре (16°C). Для *DOG1* подобная зависимость верна лишь для некоторых популяций, имеющих в своем составе не только позднецветущие, но и относительно раннецветущие растения. Вероятно, это связано с

тем, что самые поздние экотипы *A. thaliana* имеют особые механизмы регуляции физиологических функций *DOG1*. Как считают другие исследователи [3, 14, 37], функциональная активность этого гена сложна и механизм контроля его экспрессии недостаточно изучен.

Изучение глубины покоя свежесозревших семян, влияющего на сроки их прорастания, показало, что в условиях холодного климата на северной периферии ареала вида у большинства растений семена имеют более сильный покой при высокой температуре лета (22°C) по сравнению с прохладной температурой осени (10°C). Это обеспечивает их прорастание осенью и цветение весной, после окончания яровизации. Тем не менее выявлена способность определенного количества семян прорасти при 22°C. По-видимому, это свидетельствует о наличии смещения альтернативных стратегий жизненного цикла растений *A. thaliana* в карельских популяциях. В некоторых популяциях присутствуют как зимние, так и летние однолетники, что создает адаптивный потенциал для выживания вида в условиях нестабильного климата, выбирая осеннее или весеннее прорастание.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение Государственного задания КарНЦ РАН (№ темы FMEN-2022-0009).

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

- Huo H., Wei Sh., Bradford K.J. DELAY OF GERMINATION1 (*DOG1*) regulates both seed dormancy and flowering time through microRNA pathways // PNAS. 2016. V. 113(15). P. 2199–2206. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600558113>
- Donohue K. Germination timing influences natural selection on life-history characters in *Arabidopsis thaliana* // Ecology. 2002. V. 83. P. 1006–1016. <https://doi.org/10.2307/3071909>
- Martínez-Berdeja A., Stitzer M.C., Taylor M.A. et al. Functional variants of *DOG1* control seed chilling responses and variation in seasonal life-history strategies in *Arabidopsis thaliana* // PNAS. 2020. V. 117(5). P. 2526–2534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912451117>
- Donohue K., Dorn L., Griffith C. et al. Niche construction through germination cueing life-history responses to timing of germination in *Arabidopsis thaliana* // Evolution. 2005. V. 59(4). P. 771–785. <https://doi.org/10.1554/04-655>
- Auge G., Blair L.K., Kareddy A., Donohue K. The autonomous flowering-time pathway pleiotropically regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana* // Annals Botany. 2018. V. 121(1). P. 183–191. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx132>
- Kendall S.L., Hellwege A., Marriot P. et al. Induction of dormancy in *Arabidopsis* summer annuals requires parallel regulation of *DOG1* and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors // Plant Cell. 2011. V. 23(7). P. 2568–2580. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087643>
- Picó F.X. Demographic fate of *Arabidopsis thaliana* cohorts of autumn- and spring-germinated plants along an altitudinal gradient // J. Ecol. 2012. V. 100. № 4. P. 10091018.
- Footitt S., Huang Z., Clay H.A. et al. Temperature, light and nitrate sensing coordinate *Arabidopsis* seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes // Plant J. 2013. V. 74(6). P. 1003–1015. <https://doi.org/10.1111/tpj.12186>
- Baskin C.C., Baskin J.M. Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. San Diego, California: Acad. Press, 1998. 1573 p. <https://doi.org/10.2307/176683>
- Gremer J.R., Kimball S., Venable D.L. Within- and among-year germination in Sonoran Desert winter annuals: Bet hedging and predictive germination in a variable environment // Ecol. Lett. 2016. V. 19. P. 1209–1218. <https://doi.org/10.1111/ele.12655>
- Chen M., MacGregor D.R., Dave A. et al. Maternal temperature history activates Flowering Locus T in fruits to control progeny dormancy according to time of year // PNAS. 2014. V. 111(52). P. 18787–18792. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412274111>
- Chen M., Penfield St. Feedback regulation of COOLAIR expression controls seed dormancy and flowering time // Science. 2018. V. 360. P. 1014–1017. <https://doi.org/10.1126/science.aar7361>
- Bentsink L., Hanson J., Hanhart C.J. et al. Natural variation for seed dormancy in *Arabidopsis* is regulated by additive genetic and molecular pathways // PNAS. 2010. V. 107(9). P. 4264–4269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000410107>
- Chen N., Wang H., Abdelmageed H. et al. HSI2/VAL1 and HSL1/VAL2 function redundantly to repress *DOG1* expression in *Arabidopsis* seeds and seedlings // New Phytol. 2020. V. 227(3). P. 840–856. <https://doi.org/10.1111/nph.16559>
- Huang X., Schmitt J., Dorn L. et al. The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: strong selection on QTLs for seed dormancy // Mol. Ecol. 2010. V. 19(7). P. 1335–1351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04557.x>
- Postma F.M., Ågren J. Early life stages contribute strongly to local adaptation in *Arabidopsis thaliana* // PNAS. 2016. V. 113(27). P. 7590–7595. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606303113>
- Vigidal D.S., Marques A.C.S., Willems L.A. et al. Altitudinal and climatic associations of seed dormancy and flowering traits evidence adaptation of annual life cycle timing in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Environ. 2016. V. 39(8). P. 737–748. <https://doi.org/10.1111/pce.12734>
- Chiang G.C., Bartsch M., Barua D. *DOG1* expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Ecol. 2011. V. 20(16). P. 3336–3349. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05181.x>
- 1001 Genomes Consortium [Corporate Author]. 1,135 Genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana* // Cell. 2016. V. 166. P. 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.044>
- Chiang G.C., Barua D., Dittmar E. et al. Pleiotropy in the wild: The dormancy gene *DOG1* exerts cascading control on life cycles // Evolution. 2013. V. 67(3). P. 883–893. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01828.x>
- Murphey M., Kovach K., Elnaccash T. et al. *DOG1*-imposed dormancy mediates germination responses to temperature cues // Environ. Exp. Bot. 2015. V. 112. P. 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.11.013>
- Nonogaki H. Seed germination and dormancy: the classic story, new puzzles, and evolution // J. Integr. Plant Biol. 2019. V. 61(5). P. 541–563. <https://doi.org/10.1111/jipb.12762>
- Nakabayashi K., Bartsch M., Xiang Y. et al. The time required for dormancy release in *Arabidopsis* is determined by DELAY OF GERMINATION1 protein levels in freshly harvested seeds // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 2826–2838. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100214>
- Федоренко О.М., Савушкин А.И., Олимпиенко Г.С. Генетическое разнообразие природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн. в Карелии // Генетика. 2001. Т. 37. № 2. С. 223–229.
- Курбидаева А.С., Зарецкая М.В., Солтабаева А.Д. и др. Генетические механизмы адаптации растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн. к экстремальным условиям северной границы ареала // Генетика. 2013. Т. 49. № 8. С. 943–952. <https://doi.org/10.7868/S0016675813080092>
- Федоренко О.М., Грицких М.В., Николаевская Т.С. Полиморфизм по времени начала цветения у *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн. на северной границе

- его ареала // Труды КарНЦ РАН. Серия эксперим. биология. 2012. № 2. С. 139–146.
27. Bryant F.M., Hughes D., Hassani-Pak K., Eastmond P.J. Basic LEUCINE ZIPPER TRANSCRIPTION FACTOR67 transactivates DELAY OF GERMINATION1 to establish Primary seed dormancy in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2019. V. 31(6). P. 1276–1288. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00892>
 28. Иванов В.И., Касьяненко А.Г., Санина А.В., Тимофеева-Ресовская Е.А. Опыты по радиационной генетике *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Сообщение I // Генетика. 1966. № 8. С. 55–70.
 29. Су М., Цзан В., Яо Н., Хуан М. Выделение высококачественной РНК из различных тканей *Populus* // Физиол. растений. 2009. Т. 56. № 5. С. 791–795.
 30. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 31. Eickelberg G.J., Fisher A.J. Environmental regulation of plant gene expression: An RT-PCR laboratory project for an upper-level undergraduate biochemistry or molecular biology course // Biochemistry and Mol. Biology Education. 2013. V. 41. № 5. <https://doi.org/10.1002/bmb.20722>
 32. Möller E.M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 22. P. 6115–6116.
 33. Chiang G.C., Barua D., Kramer E.M. et al. Major flowering time gene, Flowering Locus C, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana* // PNAS. 2009. V. 106(28). P. 11661–1666. <https://doi.org/10.1073/pnas.090367106>
 34. Penfield St., MacGregor D.R. Effect of environmental variation during seed production on seed dormancy and germination // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. № 4. P. 819–825. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw436>
 35. Зарецкая М.В., Федоренко О.М., Лебедева О.Н. Генетические основы адаптации: время начала цветения и степень покоя семян у *Arabidopsis thaliana* северных природных популяций // Труды КарНЦ РАН. Серия эксперим. биология. 2020. № 11. С. 80–91. <https://doi.org/10.17076/eb1218>
 36. Cyrek M., Fedak H., Ciesielski A. et al. Seed dormancy in *Arabidopsis* is controlled by alternative polyadenylation of DOG1 // Plant Physiol. 2016. V. 170. P. 947–955. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01483>
 37. Carrillo-Barral N., Rodríguez-Gacio M., Matilla A.J. DELAY OF GERMINATION-1 (DOG1): a key to understanding seed dormancy // Plants. 2020. V. 9(4). P. 480–500. <https://doi.org/10.3390/plants9040480>
 38. Alonso-Blanco C., Bentsink L., Hanhart C.J. et al. Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana* // Genetics. 2003. V. 164. P. 711–729.
 39. Kerdaffrec E., Filiault D.L., Korte A. et al. Multiple alleles at a single locus control seed dormancy in Swedish *Arabidopsis* // eLife. 2016. 5:e22502 <https://doi.org/10.7554/eLife.22502>

Role of *DOG1* and *FT*, Key Regulators of Seed Dormancy, in Adaptation of *Arabidopsis thaliana* from Northern Natural Populations

M. V. Zaretskaya^a, O. N. Lebedeva^a, and O. M. Fedorenko^{a, *}

^aInstitute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia

*e-mail: fedorenko_om@mail.ru

The results of assessing the primary dormancy of seeds of *A. thaliana* plants from northern natural populations, which is of great importance for adaptation, are presented. It has been established that the temperature experience of the mother plant during the period of seed ripening is used to control the germination of seed progeny. The dependence of the transcriptional activity of the *FT* gene in plant pods from temperature experience of the mother plant was revealed: it turned out to be higher at cool temperature (16°C) compared to warmer conditions. For *DOG1*, a similar relationship is true only for some populations that include not only late flowering, but also relatively early flowering plants. This is probably due to the fact that the latest ecotypes of *A. thaliana* have special mechanisms for the regulation of the physiological functions of *DOG1*. It has been shown that in a cold climate, the seeds of most *A. thaliana* plants have a deeper dormancy at a high temperature (22°C), which ensures their germination in autumn and flowering in spring, after the end of vernalization. Nevertheless, the revealed ability of a certain number of seeds to germinate at 22°C makes it possible to suggest the presence of a mixture of alternative strategies of the life cycle of *A. thaliana* plants in the Karelian populations. In some populations, both winter and summer annuals are present, which creates an adaptive potential for the species to survive in harsh and unstable environment at the northern limits of the species range.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, natural populations, seed dormancy, gene expression of *FT* and *DOG1*, plant life cycles.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПОВЕДЕНИЯ КРЫС НИСАГ
В ТЕСТЕ ОТКРЫТОГО ПОЛЯ© 2022 г. О. Е. Редина¹, *, #, С. Э. Смоленская¹, #, А. Л. Маркель¹¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: oredina@ngs.ru

Поступила в редакцию 23.09.2021 г.

После доработки 18.01.2022 г.

Принята к публикации 20.01.2022 г.

Исследовали генетический контроль поведения крыс НИСАГ (ISIAN) с наследуемой индуцированной стрессом артериальной гипертензией в тесте открытого поля. Сканирование генома (QTL-анализ) проведено в группе самцов-гибридов F₂ (НИСАГ × WAG) в возрасте шести месяцев с помощью 149 микросателлитных полиморфных маркеров. Изучены признаки: латентный период начала движения, двигательная активность (ДА) в первую минуту первого теста открытого поля, ДА на периферии площадки открытого поля, вертикальные стойки (rearing) и “умывание” (grooming) на периферии площадки открытого поля, дефекация. Показан полигенный контроль всех изученных признаков. Показаны различные эффекты аллелей крыс НИСАГ в найденных QTLs: в некоторых локусах присутствие аллелей крыс НИСАГ приводит к увеличению значения признака, в других — к его снижению, а для ряда локусов эффекты на фенотип показаны в гетерозиготном варианте. Среди найденных локусов 11 были описаны впервые: три из них (на хромосомах 5, 11 и 18) ассоциированы с признаком двигательная активность в первую минуту первого теста открытого поля; один локус (на хромосоме 14) ассоциирован с двигательной активностью на периферии открытого поля; один локус (на хромосоме 17) ассоциирован с grooming на периферии открытого поля; два локуса (на хромосомах 17 и 18) ассоциированы с rearing на периферии открытого поля; четыре локуса (на хромосомах 11, 12, 14 и 19) ассоциированы с уровнем дефекации. Выявлены общие локусы, ассоциированные как с поведением, так и с ранее изученными признаками, которые могут оказывать влияние на поведение. На хромосоме 5 описан общий локус, ассоциированный с двумя признаками поведения и с базальной концентрацией кортикостерона в плазме крови. На хромосоме 8 найден общий локус, ассоциированный с двигательной активностью на периферии площадки открытого поля и с концентрацией дофамина в стволе мозга. На хромосоме 18 найден общий локус для четырех признаков поведения и уровня норадреналина в гипоталамусе. Полученные результаты вносят вклад в функциональную аннотацию генома крыс.

Ключевые слова: поведение, QTL-анализ, тест открытого поля, линия крыс НИСАГ.

DOI: 10.31857/S0016675822070141

Воздействие неблагоприятных эндогенных и внешних факторов приводит к изменению уровня гормонов и нейротрансмиттеров, вызывая тревогу и стрессовые состояния, что может сказываться на функции висцеральных органов, когнитивных способностях и поведении человека [1, 2]. Одной из адаптивных реакций организма в ответ на воздействие эмоционального стресса является повышение уровня артериального давления (АД). Показано, что тревога и депрессия являются частыми расстройствами у пациентов с артериальной гипертензией [3, 4]. Метаанализ связи между тревожными расстройствами и гипертензией показал, что тревога может предшествовать гипер-

тонии, что имеет клиническое значение для ранней диагностики и лечения как тревожности, так и гипертензии [5]. На модели крыс со спонтанной гипертензией (SHR) было показано изменение эндокринного статуса и поведения крыс при стрессе, и было сделано предположение о существовании общих механизмов контроля для данных признаков [6].

Признаки поведения являются количественными и, как правило, контролируются многими генами. Хорошо известно, что генетические факторы играют важную роль в проявлении поведенческих реакций, в том числе тревожности и стресс-реактивности. Кроме того, тревожность и расстройства, ассоциированные со стрессом, рассматриваются как сложные наследственные фено-

Авторы внесли равный вклад.

типы, демонстрирующие генетические корреляции с фенотипическими признаками других полигенных заболеваний [7]. Известно, что эмоциональный стресс активирует симпатическую нервную систему и гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальную ось, приводя к повышению уровня глюкокортикоидов и адреналина в плазме крови [8, 9]. В свою очередь, нейроэндокринные изменения, вызванные стрессом, могут влиять на уровень АД, вес тела, а также приводить к изменению морфометрических показателей ряда органов-мишеней [10–12] и поведения [13]. Несмотря на то что на изучение генетического контроля особенностей поведения, связанного с повышенной тревожностью, направлены усилия большого числа исследователей, генетические основы тревожных и связанных со стрессом расстройств изучены недостаточно.

Для изучения генетического контроля поведения было создано несколько линий мышей и крыс, различающихся по локомоторной активности, по уровню дефекации, по эмоциональности и тревожности (reviewed in [14]). Для изучения генетических основ полигенных признаков, в том числе тревожности и поведения, часто и успешно используют QTL (Quantitative Trait Locus) анализ, позволяющий находить ассоциации полиморфных маркеров в геномах сравниваемых линий с изучаемыми количественными признаками и выявлять генетические локусы, контролирующие эти признаки. QTL-анализ был использован для определения генетических локусов многих физиологических признаков, в том числе поведения у мышей [15, 16] и крыс [17, 18].

Одной из адекватных животных моделей для изучения молекулярно-генетических механизмов тревожности и ассоциированных с ней физиологических состояний является линия крыс НИСАГ (ISIAH). Селекция крыс НИСАГ проводилась на резкое повышение уровня артериального давления в условиях мягкого эмоционального стресса [19]. В результате была получена высокоинбредная [20] линия крыс с наследуемой индуцированной стрессом артериальной гипертензией, стресс-реактивность которой определяется особенностями функционирования ее гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпато-адреналовой систем [9]. Анализ поведения крыс НИСАГ показал, что двигательная и исследовательская активность крыс НИСАГ в незнакомой обстановке достоверно выше, чем у крыс контрольной линии. Однако спонтанная двигательная активность крыс НИСАГ, измеренная в домашней клетке, была понижена по сравнению с нормотензивными крысами линии WAG, что позволило сделать заключение о наличии гиперреактивности крыс НИСАГ в условиях незнакомой обстановки. Таким образом, крысы линии НИСАГ отличаются от нормотензивных крыс WAG как по величинам артери-

ального давления, так и по характеристикам поведения [21].

Ранее нами был проведен QTL-анализ для картирования генетических локусов, ассоциированных с проявлением нескольких ключевых признаков, характеризующих гипертензивный статус крыс НИСАГ. Работа была проведена на двух группах самцов гибридов F_2 (НИСАГ \times WAG) в возрасте 3–4-х и шести месяцев. Были определены генетические локусы, ассоциированные с артериальным давлением в покое и при эмоциональном (рестрикционном) стрессе, весом тела, массой органов мишеней (почки, надпочечники, сердце), концентрацией кортикостерона в плазме крови в покое и при эмоциональном (рестрикционном) стрессе [22, 23]. В группе крыс в возрасте шести месяцев были картированы также такие признаки как масса селезенки [24], концентрация дофамина в стволе мозга [25] и концентрация норадреналина в гипоталамусе [26]. Было показано, что генетический контроль и соответственно результаты картирования локусов зависят от возраста животных, что хорошо согласуется с результатами работ зарубежных исследователей [27, 28].

Ранее мы показали, что двигательная активность в тестах открытого поля у крыс НИСАГ в возрасте 3–4-х месяцев ассоциирована с локусами на хромосомах 2 и 16 [29]. Однако взросление крыс НИСАГ сопровождается процессом развития патологического состояния. При этом картина ассоциации генетических локусов с фенотипическими признаками, функционально связанными с гипертензивным состоянием, может изменяться, что было показано как в наших предыдущих публикациях [22, 23], так и в работах зарубежных коллег [27, 28, 30]. В настоящей работе было проведено картирование генетических локусов, контролирующее поведение в нескольких тестах открытого поля у крыс НИСАГ в возрасте шести месяцев. Кроме того, были описаны генетические локусы, ассоциированные как с признаками поведения, так и с признаками концентрация кортикостерона в плазме крови, концентрация дофамина в стволе мозга и концентрация норадреналина в гипоталамусе, которые ассоциированы с функциональным статусом симпатической нервной системы и могут участвовать в регуляции поведения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе использовали гипертензивных крыс линии НИСАГ/Icgn (с наследуемой индуцированной стрессом артериальной гипертензией) и нормотензивных крыс линии WAG/GSto-Icgn (Wistar Albino Glaxo). QTL (Quantitative Trait Locus) анализ проводили на самцах-гибридах F_2 (НИСАГ \times WAG) в возрасте шести месяцев ($n = 126$). Крыс содержали в стандартных условиях вивария ИЦиГ

Таблица 1. Сравнительная характеристика поведения самцов линий НИСАГ, WAG и самцов-гибридов F₂ (НИСАГ × WAG) при проведении теста открытого поля

№ п/п	Поведение	НИСАГ $M \pm m$ (n = 10)	WAG $M \pm m$ (n = 14)	F ₂ (6 мес.) $M \pm m$ (n = 126)
1	Двигательная активность в первую мин первого теста (число пересеченных квадратов), шт.	46 ± 3.7**	23 ± 4.6	47.3 ± 1.9
2	Двигательная активность на периферии (сумма пересеченных квадратов за 4 теста), шт.	552 ± 71***	207 ± 25.4	237.3 ± 9.8
3	Grooming на периферии (число актов груминга за 4 теста), шт.	12 ± 2.2*	5.6 ± 1.5	5.4 ± 0.5
4	Rearing на периферии (число вставаний за 4 теста), шт.	61 ± 11.7**	21 ± 3.94	18.7 ± 0.9
5	Дефекация (число болюсов за 4 теста), шт.	16 ± 2.3	15 ± 2.8	12.8 ± 0.6
6	Латентный период (время от помещения крысы на площадку до начала движения, сумма за 4 теста), с	20 ± 3.5**	65 ± 12	85.0 ± 5.9

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ у крыс НИСАГ по сравнению с крысами WAG.

СО РАН (Новосибирск, Россия) со свободным доступом животных к корму и воде. Эксперименты выполнены в соответствии с международными Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных и одобрены биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН по работе с экспериментальными животными (протокол № 69 заседания комиссии по Биоэтике от 20.01.2021 г.).

Тестирование поведения. За неделю до начала опытов крыс рассаживали в одиночные клетки. Тест открытого поля проводили на самцах как описано ранее [29]. Для этого использовали ярко освещенную огороженную прямоугольную площадку (140 × 70 см), расчерченную на квадраты 10 × 10 см (всего – 98 квадратов). 12 квадратов в центре площадки были очерчены темно-синим цветом. Освещалась площадка двумя электрическими лампами по 75 Вт каждая, которые располагались с двух коротких сторон площадки на высоте 75 см над ней и на равном удалении (по 30 см) от каждой из трех соответствующих сторон площадки.

Тест продолжался 6 мин. В анализе использовали следующие характеристики поведения крыс в тесте открытого поля: 1) двигательная активность в первую минуту первого теста открытого поля (число пересеченных квадратов, шт.); 2) двигательная активность на периферии площадки открытого поля (сумма пересеченных квадратов за четыре теста, шт.); 3) груминг (grooming) на периферии площадки открытого поля (число актов груминга за четыре теста, шт.); 4) вставание на задние лапы (rearing) на периферии площадки открытого поля (число вставаний за четыре теста, шт.); 5) величина дефекации (число болюсов за четыре теста, шт.); 6) латентный период (время от помещения на площадку до начала локомоции, сумма за четыре теста, с). Крысы тестировались на протяжении четырех последовательных дней. Взятые в анализ показатели поведения выбраны на основе предыдущих исследований [31] как наиболее информативные. Сумма значений за 4 дня дает интегральную оценку поведения, которая в значительной степени нивелирует влияние случайных

факторов на столь лабильный показатель, каковым является поведение. Двигательная активность в первую минуту первого теста анализировалась отдельно от общей двигательной активности, так как локомоторная активность крысы в первую минуту в основном соответствует реакции избегания незнакомой обстановки, в отличие от двигательной активности в конце первого и в последующих тестах, которая дает вклад главным образом в компоненту, ассоциированную с исследовательским поведением [31]. Учитывая то, что проявлений смещенной активности (grooming) в центре площадки открытого поля не наблюдалось, этот признак охарактеризован в работе как grooming на периферии площадки открытого поля. Межлинейные различия изучаемых параметров поведения крыс НИСАГ и WAG и их гибридов F₂ (НИСАГ × WAG) приведены в табл. 1 [29].

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (Stat Soft, Tulsa, USA). Достоверность различий между средними значениями оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для нормализации распределения признака – груминг на периферии, вставание на задние лапы (rearing) на периферии и латентное время были логарифмированы (ln).

QTL (Quantitative Trait Locus) анализ группы крыс F₂ (НИСАГ × WAG) проведен с использованием 149 полиморфных микросателлитных маркеров. Их список приведен на сайте ИЦиГ СО РАН (<http://icg.nsc.ru/isiah/en/category/ctl/>). Положение маркеров на хромосомах определялось по базе данных RGSC Genome Assembly v 5.0 и выражалось в миллионах нуклеотидов (мегабазах, Mb) от начала хромосомы.

Геномную ДНК выделяли из ткани печени с использованием протеиназы К и фенольной экстракции по стандартной методике [32]. Далее ДНК переосаждали и растворяли в деионизированной воде. Генотипирование с помощью ПЦР проводили по стандартной описанной ранее методике [23].

Анализ сцепления проводили с помощью программ MAPMAKER/EXP 3.0 и MAPMAKER/QTL 1.1 [33]. Границы локусов определялись в соответствии с изменением LOD-балла на единицу. Для расчета пороговых значений достоверности LOD-балла использовали программу QTL Cartographer Version 1.17, JZmapqtl (statgen.ncsu.edu) [34, 35]. Уровень статистической значимости рассчитывали методом случайных перестановок экспериментальных данных с репликацией 1000 раз (пермутационный тест) [36]. Сцепление считали достоверным, если экспериментально полученный LOD-балл превышал 5%-ное пороговое значение при анализе генома (experiment-wisethreshold) [37]; сцепление считали вероятным, если экспериментально полученный LOD-балл превышал 5%-ное пороговое значение при проведении пермутационного теста для отдельно взятой хромосомы (chromosome-wise threshold).

Для сравнения генетических локусов, найденных в настоящей работе, с результатами исследования других линий крыс использовали базу данных Rat Genome Database (RGD, <http://rgd.mcw.edu/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Хромосомная локализация QTL, ассоциированных с проанализированными признаками в возрасте шести месяцев, представлена на рис. 1. Найденные локусы расположены на 15 хромосомах, при этом на восьми из них находятся два и более QTL. Большинство локусов ассоциированы только с одним из изучаемых признаков, но несколько локусов являются общими для нескольких признаков поведения. Наибольшее число QTL найдено на хромосоме 18. Описание найденных QTLs дано в табл. 2.

Полученные результаты подтверждают участие многих локусов в генетическом контроле всех взятых в анализ признаков поведения. Для признака двигательная активность в первую минуту первого теста найдено шесть локусов. В двух локусах присутствие аллелей НИСАГ приводит к увеличению двигательной активности, а в двух — к снижению. Двигательная активность на периферии площадки открытого поля контролируется четырьмя локусами. Присутствие двух аллелей крыс НИСАГ в локусе на хромосоме 8 ассоциировано со снижением двигательной активности крыс, а в локусе на хромосоме 14 — с увеличением двигательной активности. Присутствие двух аллелей НИСАГ в локусах на хромосомах 4 и 17 увеличивает груминг на периферии, при этом присутствие аллелей НИСАГ в локусе маркера D17Mgh3 ассоциировано с увеличением не только груминга, но и rearing на периферии. Наибольшее число локусов (8 локусов) было выявлено при анализе признака дефекация. Присутствие двух аллелей НИСАГ в одном из них (на хромосоме 11) ассоциировано с увеличением значения признака, а в

трех локусах (на хромосомах 7, 14 и 18) — со снижением значения признака. Два локуса, ассоциированных с признаком дефекация (на хромосомах 2 и 14), были охарактеризованы наиболее высокими значениями LOD-балла среди всех локусов, представленных в табл. 2. Для каждого из изученных признаков были найдены локусы, в которых значение признака достоверно изменяется у гетерозиготных животных.

Большинство найденных в нашей работе локусов, ассоциированных с изучаемыми признаками, перекрывается с QTLs, описанными для признаков поведения при анализе других линий крыс, в том числе гипертензивных, однако ассоциация некоторых локусов с признаками поведения была описана нами впервые. Всего мы описали 11 новых локусов, ассоциированных с генетическим контролем фенотипического проявления пяти изучаемых нами признаков поведения крыс в тесте открытого поля (см. последний столбец в табл. 2).

Некоторые локусы, ассоциированные с признаками поведения, перекрываются с ранее описанными нами локусами, ассоциированными с базальной концентрацией кортикостерона в плазме крови на хромосоме 5 (рис. 2,а), с концентрацией дофамина в стволе мозга на хромосоме 8 (рис. 2,б) и с концентрацией норадреналина в гипоталамусе на хромосоме 18 (рис. 2,в). Характеристика локусов, ассоциированных с этими ранее изученными признаками, которые могут оказывать эффект на поведение, представлена в табл. 3.

В локусе на хромосоме 5 (рис. 2,а) все три признака достоверно увеличивают значение у гетерозиготных животных. В локусе на хромосоме 8 (рис. 2,б) значения обоих признаков достоверно снижены у животных, гомозиготных по аллелям крыс НИСАГ. Присутствие аллелей НИСАГ в локусе хромосомы 18 (рис. 2,в) ассоциировано с высокодостоверным увеличением концентрации норадреналина в гипоталамусе и со снижением двигательной активности крыс в первую минуту теста открытого поля. Остальные признаки поведения, ассоциированные с локусом на хромосоме 18, достоверно изменялись у гетерозиготных по данному локусу животных: двигательная активность и число вертикальных стоек на периферии открытого поля возрастали, а латентный период снижался (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты QTL-анализа, проведенного с целью определения генетических локусов, ассоциированных с проявлением шести признаков поведения крыс НИСАГ в тесте открытого поля: двигательная активность (ДА) в первую минуту первого теста открытого поля, ДА на периферии площадки открытого поля, rearing (число вертикальных стоек) и grooming на периферии площадки открытого поля, дефекация и латентный период. Работу проводили

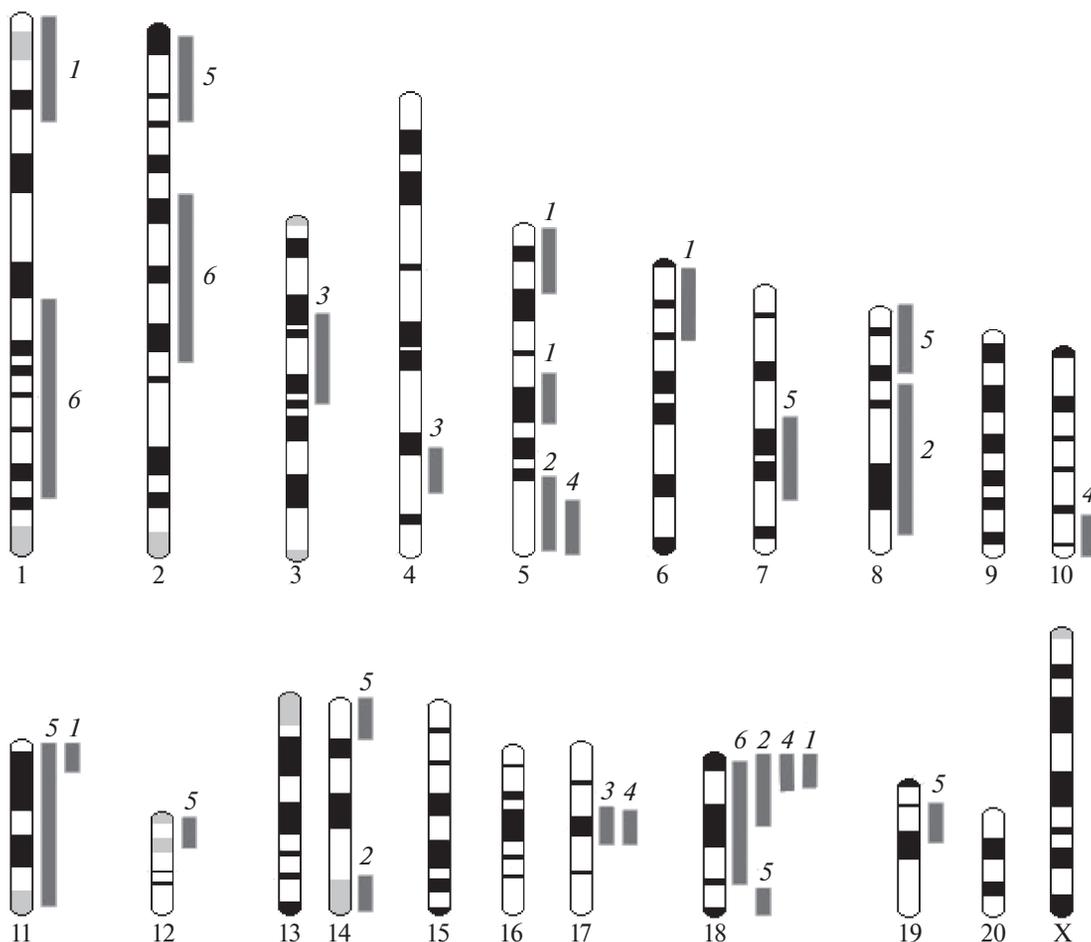


Рис. 1. Расположение локусов, ассоциированных с поведением самцов-гибридов F₂ (НИСАГ × WAG) в тесте открытого поля. Серые прямоугольники показывают протяженность локусов, цифры около них обозначают признаки, с которыми ассоциированы локусы: 1 – двигательная активность в первую минуту первого теста открытого поля; 2 – двигательная активность на периферии открытого поля; 3 – grooming на периферии открытого поля; 4 – rearing на периферии открытого поля; 5 – дефекация; 6 – латентный период. Схематическое изображение хромосом получено с сайта https://oct2014.archive.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Location/Genome.

в группе самцов гибридов F₂ (НИСАГ × WAG) в возрасте шести месяцев.

Поведение крыс в тестах открытого поля связывают в первую очередь с мотивациями тревожности, страха и исследования [31, 38–40]. Крысы НИСАГ характеризуются снижением реакции проявления страха и гиперреактивностью в незнакомой обстановке, а также наличием повышенной исследовательской активности по сравнению с контрольными крысами линии WAG [21, 29]. Имеющиеся межлинейные различия поведения позволили успешно применить QTL-анализ и выявить генетические локусы, ассоциированные с каждым из параметров поведения.

Ранее высокая эффективность метода QTL была показана и на других линиях крыс при изучении генетического контроля различных поведенческих признаков, таких как общая двигательная активность [41], тревожность [17], поведение, связанное с эмоциональностью [42].

Полученные в нашей работе результаты QTL-анализа указывают на полигенный генетический контроль проявления всех изученных признаков поведения. Ранее полигенный контроль проявления этих признаков поведения был нами показан и в группе более молодых самцов-гибридов F₂ (НИСАГ × WAG) в возрасте 3–4-х месяцев [29]. Эти результаты хорошо согласуются и с результатами других групп исследователей, изучающих генетику поведения, связанного с двигательной активностью, тревожностью и эмоциональностью [43, 44].

Большинство локусов, описанных в настоящей работе, ассоциированы только с одним из шести изучаемых признаков, но некоторые локусы являются общими для нескольких признаков поведения (рис. 1). Многие найденные нами в настоящей работе локусы, ассоциированные с поведением крыс НИСАГ, перекрываются с локусами, ранее описанными для других линий крыс.

Таблица 2. Генетические локусы и эффекты аллелей для признаков поведения самцов гибридов F₂ (НИСАГ × WAG) в тесте открытого поля

Хромосома: маркер в пике локуса (Мб)	Протяженность локуса, Мб	LOD-балл	Генотип			Пересекается с QTLs, ассоциированными с поведением у других линий крыс. Название локуса; описание признака; линия крыс; ссылка
			<i>H/H</i> <i>M ± m</i> <i>n</i>	<i>H/W</i> <i>M ± m</i> <i>n</i>	<i>W/W</i> <i>M ± m</i> <i>n</i>	
Двигательная активность в первую минуту первого теста открытого поля						
1: D1Rat150 (17.5)	0–54	2.57	58.2 ± 3.2* ^{†††} 31	43.0 ± 2.8 61	45.7 ± 3.6 32	Despr8 (Despair related QTL 8); locomotor behavior trait; F344; [44]
5: D5Rat188 (22.8)	0–40	1.96	46.8 ± 3.3 31	43.0 ± 2.7 61	56.7 ± 4.0 ^{††} 32	novel
5: D5Rat85 (92.7)	72–104	2.29	38.0 ± 3.7 ^{††} 31	53.0 ± 2.3 59	46.6 ± 4.3 34	Anxrr21 (Anxiety related response QTL 21); fear/anxiety-related behavior trait; RHA; [17]
6: D6Rat80 (1.1)	0–34	1.58	37.3 ± 4.5* [†] 24	49.2 ± 2.7 65	51.4 ± 3.1 35	Despr12 (Despair related QTL 12); locomotor behavior trait; F344; [44] Stresp10 (Stress response QTL 10); stress-related behavior trait; F344; [18]
11: D11Rat87 (1.0)	0–26	2.28	51.3 ± 3.3** 32	50.7 ± 2.7 62	36.7 ± 4.0 ^{††} 30	novel
18: D18Rat106 (13.2)	0–24	2.44	37.3 ± 3.8* ^{††} 30	51.5 ± 2.6 56	49.6 ± 3.6 38	novel
Двигательная активность на периферии открытого поля						
5: D5Rat93 (157.4)	122–168	2.44	206.2 ± 17.6 [†] 28	256.2 ± 13.3 73	225.7 ± 23.9 23	Anxrr4 (Anxiety related response QTL 4); exploratory behavior trait; SHR; [43]
8: D8Rat21 (89.1)	40–108	2.55	218.9 ± 18.0** 33	222.1 ± 12.9 61	296.4 ± 22.3 ^{††} 30	Anxrr9 (Anxiety related response QTL 9); exploratory behavior trait; SHR; [43]
14: D14Rat18 (86.0)	72–115.1	1.69	252.7 ± 22.3* 31	258.1 ± 14.1 59	194.2 ± 15.4 ^{††} 34	novel
18: D18Rat106 (13.2)	0–44	1.60	205.6 ± 18.6 [†] 30	267.5 ± 15.0 56	224.2 ± 17.4 38	Anxrr11 (Anxiety related response QTL 11); exploratory behavior trait; SHR; [43]
Grooming на периферии открытого поля						
3: D3Rat130 (55.2)	38–86	1.96	4.0 ± 0.8 [†] 36	6.8 ± 0.8 60	4.5 ± 0.8 [†] 28	Despr11 (Despair related QTL 11); locomotor behavior trait; F344; [44] Anxrr10 (Anxiety related response QTL 10); exploratory behavior trait; SHR; [43]
4: D4Rat57 (196.6)	188–206	2.77	7.4 ± 1.1*** 37	5.5 ± 0.6 65	2.2 ± 0.5 ^{†††} 22	Anxrr51 (Anxiety related response QTL 51); exploratory behavior trait; SHR; [62]
17: D17Mgh3 (45.5)	40–50	2.64	7.2 ± 0.8* [†] 50	4.4 ± 0.7 60	4.1 ± 1.0 14	novel
Rearing на периферии открытого поля						
5: D5Rat93 (157.4)	148–177.2	1.71	16.1 ± 2.1 [†] 30	21.2 ± 1.2 66	16.9 ± 1.8 28	Anxrr4 (Anxiety related response QTL 4); exploratory behavior trait; SHR; [43]
10: D10Rat17 (93.6)	72–110.6	1.65	21.7 ± 1.4 ^{††} 57	16.1 ± 1.2 50	18.5 ± 3.0 16	Anxrr22 (Anxiety related response QTL 22); fear/anxiety-related behavior trait; RHA; [17]
17: D17Mgh3 (45.5)	34–50	1.87	22.1 ± 1.4* [†] 50	17.1 ± 1.4 60	16.2 ± 2.1 14	novel

Таблица 2. Окончание

Хромосома: маркер в пике локуса (Mb)	Протяженность локуса, Mb	LOD-балл	Генотип			Пересекается с QTLs, ассоциированными с поведением у других линий крыс. Название локуса; описание признака; линия крыс; ссылка
			<i>H/H</i> <i>M ± m</i> <i>n</i>	<i>H/W</i> <i>M ± m</i> <i>n</i>	<i>W/W</i> <i>M ± m</i> <i>n</i>	
18: D18Rat106 (13.2)	0–28	2.56	14.9 ± 1.6 ^{††} 30	22.0 ± 1.4 56	18.0 ± 1.7 38	novel
Дефекация						
2: D2Rat194 (47.8)	18–58	3.05 [§]	15.0 ± 1.0 ^{††} 33	10.8 ± 0.8 61	15.4 ± 1.3 ^{††} 30	Anxrr3 (Anxiety related response QTL 3); exploratory behavior trait; SHR; [43]
7: D7Rat42 (92.9)	76–114	2.19	11.7 ± 1.0 ^{**} 35	12.1 ± 0.9 56	16.2 ± 1.2 ^{††} 33	Anxrr8 (Anxiety related response QTL 8); exploratory behavior trait; SHR; [43]
8: D8Rat53 (21.9)	0–36	1.69	15.9 ± 1.2 [†] 24	12.1 ± 0.9 65	13.0 ± 1.1 35	Despr4 (Despair related QTL 4); locomotor behavior trait; F344; [44]
11: D11Rat38 (66.3)	0–88	1.77	14.4 ± 1.3 [*] 37	13.6 ± 0.8 59	10.0 ± 1.2 [†] 28	novel
12: D12Rat2 (13.8)	0–20	2.52	13.6 ± 1.2 34	11.3 ± 0.8 62	16.3 ± 1.1 ^{†††} 28	novel
14: D14Rat5 (11.9)	0–22	3.37 [§]	10.3 ± 0.9 ^{*†††} 51	15.0 ± 0.9 58	14.7 ± 1.5 15	novel
18: D18Rat1 (86.1)	68–86.3	2.20	10.3 ± 1.1 ^{**} 33	13.3 ± 0.9 59	15.5 ± 1.1 32	Anxrr11 (Anxiety related response QTL 11); exploratory behavior trait; SHR; [43]
19: D19Rat47 (24.4)	14–30	2.41	13.3 ± 1.1 27	11.3 ± 0.9 62	16.0 ± 1.1 ^{††} 34	novel
Латентный период						
1: D1Rat131 (159.2)	148–250	2.17	69.0 ± 9.6 [†] 30	101.4 ± 9.8 60	66.8 ± 9.8 [†] 33	Anxrr14 (Anxiety related response QTL 14); locomotor behavior trait; HEP; [63] Despr9 (Despair related QTL 9); locomotor behavior trait; F344; [44]
2: D2Rat75 (100.3)	88–176	2.32	91.1 ± 10.5 35	90.0 ± 8.0 60	65.9 ± 15.4 29	Despr10 (Despair related QTL 10); locomotor behavior trait; F344; [44] Anxrr7 (Anxiety related response QTL 7); exploratory behavior trait; SHR; [43]
18: D18Mgh1 (47.7)	8–60	2.30	102.3 ± 10.6 ^{††} 31	66.4 ± 6.7 54	96.0 ± 14.0 39	Anxrr11 (Anxiety related response QTL 11); exploratory behavior trait; SHR; [43]

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ у крыс с двумя аллелями НИСАГ по сравнению с крысами, имеющими два аллеля WAG.

[†] $p < 0.05$, ^{††} $p < 0.01$, ^{†††} $p < 0.001$ у крыс с двумя аллелями НИСАГ или WAG по сравнению с гетерозиготой.

[§] LOD-балл превышал 5%-ное пороговое значение при анализе генома (experiment-wise threshold).

Mb – мегабазы, т.е. положение маркера на хромосоме, выраженное в миллионах нуклеотидов от начала хромосомы.

H/H и *W/W* – гомозиготы по аллелям крыс НИСАГ и WAG, *H/W* – гетерозигота.

Ссылки на основные публикации представлены в табл. 2. Этот результат предполагает частичное сходство генетического контроля сходных поведенческих признаков у разных линий крыс, что хорошо согласуется с нашими ранее полученными результатами, которые продемонстрировали частичное сходство генотипа крыс НИСАГ с генотипом крыс SHR при сравнении SNPs у крыс НИСАГ и других гипертензивных линий крыс [45].

Наибольшее число перекрывающихся локусов было найдено для признаков, охарактеризованных как “locomotor behavior trait” при изучении поведения крыс линии F344 и как “exploratory behavior trait” при изучении поведения крыс SHR со спонтанно развивающейся гипертензией. В двух случаях найдены перекрывающиеся локусы с QTLs, охарактеризованными как “fear/anxiety-related behavior trait”, которые были описаны ранее

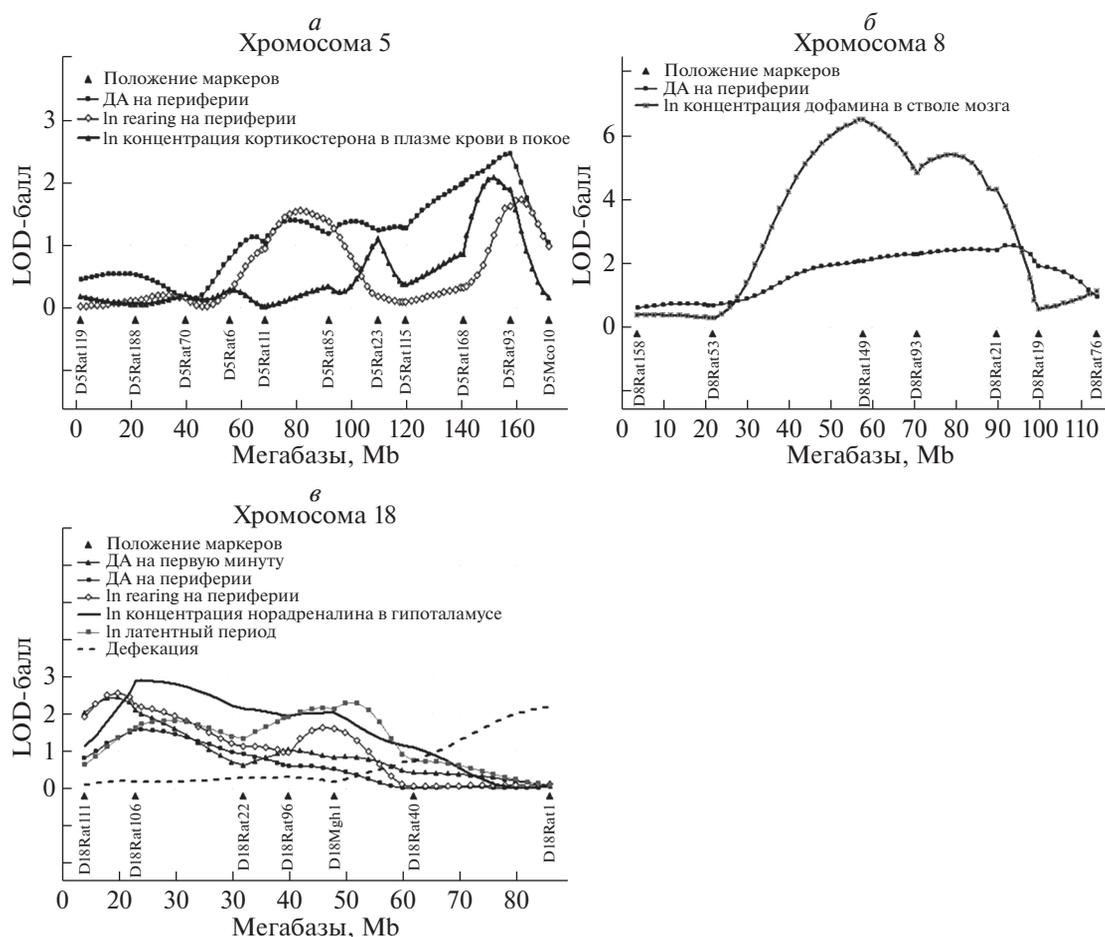


Рис. 2. Общие локусы, ассоциированные: *а* – с двумя признаками поведения и с концентрацией кортикостерона в плазме крови в покое; *б* – с двигательной активностью на периферии площадки открытого поля и с концентрацией дофамина в стволе мозга; *в* – с пятью признаками поведения и с концентрацией норадреналина в гипоталамусе.

при генетическом картировании поведения у крыс RHA и RLA (Roman high avoidance и Roman low avoidance), которые были селектированы по дифференциальной реакции на проявление страха [17]. Следует отметить, что большинство из локусов, связанных с поведением при анализе других линий крыс и перекрывающихся с локусами, описанными в данной работе, охарактеризованы как локусы, ассоциированные с тревогой и страхом (Anxiety related response QTL и Despair related QTL). Этот результат хорошо согласуется с представлениями о том, что поведенческие признаки в тесте открытого поля могут рассматриваться как интегральная характеристика проявления тревожности, страха и исследовательской активности, но с различным вкладом этих составляющих в каждый из изучаемых признаков [31]. Результат нашей работы позволил в масштабе генома определить локусы, специфически ассоциированные с каждым из взятых в анализ признаков поведения крыс НИСАГ, а также локусы, которые могут давать вклад в формирование интегрального фенотипического ответа.

Однако нами были выявлены и локусы, специфические для линии крыс НИСАГ. Они отмечены в табл. 2 как novel. Всего впервые были описаны 11 локусов для пяти из проанализированных признаков: три из них (на хромосомах 5, 11 и 18) ассоциированы с признаком двигательная активность в первую минуту первого теста открытого поля; один локус (на хромосоме 14) ассоциирован с двигательной активностью на периферии открытого поля; один локус (на хромосоме 17) ассоциирован с grooming на периферии открытого поля; два локуса (на хромосомах 17 и 18) ассоциированы с вертикальной активностью (rearing) на периферии открытого поля; и 4 локуса (на хромосомах 11, 12, 14 и 19) ассоциированы с уровнем дефекации. Новизна описанных локусов определялась по базе данных Rat Genome Database (RGD, <https://rgd.mcw.edu/>), в которой систематически собирается вся представленная в научной литературе информация о функциональной аннотации генома крысы с помощью QTL-метода. Наличие значительного числа впервые описанных локусов может

Таблица 3. Генетические локусы и эффекты аллелей для признаков концентрация кортикостерона в плазме крови в покое, концентрация дофамина в стволе мозга и концентрация норадреналина в гипоталамусе, которые перекрываются с локусами, ассоциированными с признаками поведения самцов-гибридов F₂ (НИСАГ × WAG) в тесте открытого поля

Маркер в пике локуса (Mb)	Протяженность локуса, Mb	LOD-балл	Генотип			Локусы подробно описаны нами в
			H/H M ± SEM n	H/W M ± SEM n	W/W M ± SEM n	
Концентрация кортикостерона в плазме крови в покое, мкг/100 мл						
D5Rat93 (157.4)	140–164	2.06	1.43 ± 0.20 ^{††} 30	2.53 ± 0.33 68	1.66 ± 0.33 28	[22]
Концентрация дофамина в стволе мозга, нг/мг ткани						
D8Rat149–D8Rat21 (58.3–89.1)	46–90	6.50	0.87 ± 0.05 ^{***†††} 36	1.33 ± 0.05 60	1.19 ± 0.07 30	[25]
Концентрация норадреналина в гипоталамусе, нг/мг ткани						
D18Rat106 (13.2)	0–50	2.91	2.21 ± 0.15 ^{**} 29	1.97 ± 0.10 56	1.65 ± 0.11 38	[26]

Примечание. H/H и W/W – гомозиготы по аллелям крыс НИСАГ и WAG, H/W – гетерозигота.

быть связано со специфичностью селекционного процесса при создании линии крыс НИСАГ.

Известно, что процесс адаптации организма к воздействию стрессовых факторов опосредуется согласованным действием гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпато-адреналовой систем, что обеспечивается сложной системой прямых и обратных связей между их функциональными центрами (паравентрикулярным ядром гипоталамуса и группами моноаминсинтезирующих клеток в стволе мозга) и периферическими органами и тканями. В ответ на воздействие стрессирующих факторов происходит активация норадренергических ядер ствола мозга, через нервные окончания которых значительное количество норадреналина поступает в ядра гипоталамуса, что является пусковым механизмом активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) и секреции кортикостерона в надпочечниках [46]. Секреция кортикостерона является важным звеном в организации защиты и поддержании гомеостаза, однако неадекватная регуляция его секреции может влиять на многочисленные физиологические процессы и поведение, связанное с эмоциональностью [47], а также приводить к физиологическим и психологическим патологиям [48]. Показано, что активация ГГНС приводит к активации поведения не только у крыс [49], но связана с повышенной тревожностью и депрессией у человека [50, 51].

Как мы уже упоминали выше, особенности селекции крыс НИСАГ привели к созданию линии, характеризующейся резким увеличением уровня артериального давления в условиях мягкого эмоционального стресса, а также гиперреактивностью при измерении характеристик поведения в незнакомой обстановке [19, 21]. Стресс-реактивность крыс НИСАГ определяется особенностями функционирования их гипоталамо-гипофизар-

но-надпочечниковой и симпато-адреналовой систем [9]. У крыс НИСАГ в гипоталамусе достоверно увеличена концентрация норадреналина [26], а в гипофизе увеличен синтез проопиомеланокортина [9]. Эти эндокринные изменения могут оказывать влияние на функционирование периферических органов-мишеней. Ранее при картировании с помощью QTL-анализа признаков артериального давления и весовых параметров органов-мишеней в нашей работе были найдены общие локусы, ассоциированные с базальной концентрацией кортикостерона в плазме крови и с массой надпочечников на хромосоме 11 [22] и с массой сердца на хромосоме 1 [23]. На хромосоме 18 нами был описан общий локус, ассоциированный с весом сердца и концентрацией норадреналина в гипоталамусе [26]. Общность локусов для разных признаков может указывать на то, что признаки находятся в тесной физиологической связи, могут либо контролироваться разными, но тесно сцепленными генами, либо геном с плейотропным влиянием на эти признаки.

В настоящей работе мы описали общие локусы, ассоциированные как с признаками, характеризующими функциональный статус гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпато-адреналовой систем, так и с признаками поведения.

На хромосоме 5 был выявлен общий локус, ассоциированный как с базальной концентрацией кортикостерона в плазме крови, так и с поведением крыс в двух тестах открытого поля (рис. 2,а). Ранее этот локус при изучении поведения крыс SHR был ассоциирован с исследовательским поведением и реакцией тревожности (exploratory behavior trait, Anxiety related response QTL 4) [43].

На хромосоме 8 были найдены перекрывающиеся локусы, ассоциированные с концентрацией дофамина в стволе мозга, а также с двигательной активностью крыс на периферии площадки от-

крытого поля (рис. 2,б). При изучении поведения крыс SHR этот локус был описан как локус исследовательского поведения и реакции тревожности (exploratory behavior trait, Anxiety related response QTL 9) [43].

Наиболее статистически высокодостоверный локус, ассоциированный с уровнем норадреналина в гипоталамусе, перекрывается с несколькими локусами, ассоциированными с признаками поведения крыс в тесте открытого поля (рис. 2,в). Существование связи между уровнем норадреналина в гипоталамусе и двигательной активностью животных отмечалось и ранее. Было показано, что при SART стрессе (specific alternation of rhythm in temperature), который получают в результате повторных воздействий на животных холодом, наблюдали как повышение уровня норадреналина в гипоталамусе [52], так и повышение двигательной активности крыс, а также увеличение числа стоек на задних лапах (rearing) в тесте открытого поля [53]. Наличие связи между концентрацией норадреналина в гипоталамусе и двигательной активностью отмечалось и в исследовании свободно бегающих крыс [54]. Результаты настоящей работы хорошо согласуются с этими данными и предполагают, что совместное проявление признака концентрация норадреналина в гипоталамусе и нескольких признаков поведения (двигательная активность в первую минуту первого теста, двигательная активность на периферии и rearing на периферии площадки открытого поля) может контролироваться генами (или геном), локализованными в описанном нами локусе на хромосоме 18.

Согласно данным базы RGD в разделах Neurological Disease Portal и Cardiovascular Disease Portal на 18-й хромосоме крысы в интервале 8–64 Mb находятся локусы *Anxrr11* (anxiety related response QTL 11) и *Anxrr20* (anxiety related response QTL 20), связанные с тревожностью. Локус *Anxrr11*, характеризующий исследовательское поведение крыс линии RI (BN.Lx × SHR), перекрывается со всеми, найденными нами на 18-й хромосоме локусами, ассоциированными с поведением в тестах открытого поля и концентрацией норадреналина в гипоталамусе [43]. Локус *Anxrr20* (*Rear3*), характеризующий координацию движения тела [55], частично перекрывается с локусом признака rearing на периферии, описанным в настоящей работе. У мышей в районе синтении с 18-й хромосомой крыс также описаны локусы, ассоциированные с изменением двигательной активности [56].

Локус, описанный нами ранее в центральной части хромосомы 18 в районе маркера D18Mgh1 [26] и ассоциированный с концентрацией норадреналина в гипоталамусе и массой сердца, по результатам, представленным в настоящей работе, перекрывается с локусом, ассоциированным с признаком латентный период (рис. 2,в). В этом же районе хромосомы 18 наблюдается и увеличе-

ние значения LOD-балла для признака rearing на периферии площадки открытого поля.

Полученные данные показали, что генетический контроль изучаемых признаков поведения в группе самцов-гибридов F₂ (НИСАГ × WAG) в возрасте шести месяцев значительно отличается от генетического контроля тех же признаков поведения в группе более молодых животных (в возрасте 3–4 месяцев) [29]. В группе более молодых животных наиболее высокодостоверные локусы, ассоциированные с двигательной активностью крыс в тесте открытого поля, были найдены для признака двигательная активность на периферии площадки открытого поля. Они были локализованы в дистальной части хромосомы 2 и в проксимальной части хромосомы 16. Эти локусы были также ассоциированы с признаками rearing на периферии и с концентрацией кортикостерона в плазме крови при воздействии рестрикционного стресса (ограничение подвижности крысы в течение 30 мин в тесной проволочной клетке). Кроме того, в дистальной части хромосомы 16 был описан локус, ассоциированный с двигательной активностью крыс в первую минуту первого теста открытого поля [29]. Как можно видеть из рис. 1, у крыс в возрасте шести месяцев на хромосоме 2 не было найдено локусов, ассоциированных с признаками двигательная активность на периферии площадки открытого поля и rearing на периферии площадки открытого поля, а на хромосоме 16 не было определено ни одного QTL.

Наличие разницы в генетическом картировании признаков поведения в двух группах самцов-гибридов F₂ (НИСАГ × WAG) разного возраста хорошо согласуется с полученными нами ранее результатами. Ранее при проведении картирования других полигенных признаков в этих же группах животных – уровень артериального давления в покое и при стрессе, вес тела, весовые параметры органов-мишеней (почки, надпочечники, сердце), уровень кортикостерона в плазме крови в покое и при стрессе – также были найдены специфические для каждого возраста QTLs, ассоциированные с каждым из признаков [22, 23]. Найденные различия могут отражать онтогенетические изменения в генетическом контроле физиологических признаков у крыс НИСАГ [22, 23] и, как показала настоящая работа, поведение не является исключением.

Эти результаты хорошо согласуются с представлениями о том, что фенотип, контролируемый многими генами, может находиться под влиянием разных генетических локусов в разных возрастных периодах, о чем сообщалось многими авторами при изучении крыс [27, 28, 30], цыплят [57], а также человека [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами данные по картированию признаков поведения хорошо совпа-

дают с результатами работ, проведенных на других модельных животных. Безусловно, следует понимать, что в связи с протяженностью локусов, ассоциированных с признаками, каждый QTL может содержать несколько тесно сцепленных генов [59], либо даже кластеры функционально связанных генов [60]. Тем не менее, учитывая результативность сочетания QTL-анализа и современных подходов анализа экспрессии генов [61], полученные нами данные могут быть полезны для определения в найденных локусах генов-кандидатов, в том числе и обладающих плейотропным действием на фенотипическое проявление изучаемых признаков, ассоциированных как с повышенной активностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпато-адреналовой систем, так и с особенностями поведения крыс гипертензивной линии НИСАГ.

Работа по генотипированию образцов поддержана бюджетным проектом FWNR-2022-0019. Математическая обработка полученных данных и подготовка результатов к публикации поддержана грантом РФФИ № 20-04-00119а.

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. *Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M.* Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. № 2. P. 535–606. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2006>
2. *Deshpande R.P., Babu P.P.* Anxiety, stress, and neurological dysfunction: from basic biology to present therapeutic interventions // *Application of Biomedical Engineering in Neuroscience*. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. P. 401–413.
3. *Bussotti M., Sommaruga M.* Anxiety and depression in patients with pulmonary hypertension: impact and management challenges // *Vasc. Health Risk Manag.* 2018. V. 14. P. 349–360. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S147173>
4. *Hamam M.S., Kunjummen E., Hussain M.S. et al.* Anxiety, depression, and pain: considerations in the treatment of patients with uncontrolled hypertension // *Curr. Hypertens. Rep.* 2020. V. 22. № 12. P. 106. <https://doi.org/10.1007/s11906-020-01117-2>
5. *Lim L.F., Solmi M., Cortese S.* Association between anxiety and hypertension in adults: A systematic review and meta-analysis // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2021. V. 131. P. 96–119. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.08.031>
6. *Roman O., Seres J., Pomelova M., Jurcovicova J.* Neuroendocrine or behavioral effects of acute or chronic emotional stress in Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats // *Endocr. Regul.* 2004. V. 38. № 4. P. 151–155.
7. *Meier S.M., Trontti K., Purves K.L. et al.* Genetic variants associated with anxiety and stress-related disorders: A genome-wide association study and mouse-model study // *JAMA Psychiatry.* 2019. V. 76. № 9. P. 924–932. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.1119>
8. *Lin W., Wang W., Shao F.* New animal model of emotional stress: Behavioral, neuroendocrine and immunological consequences // *Chinese Sci. Bulletin.* 2003. V. 48. № 15. P. 1565–1568. <https://doi.org/10.1007/BF03183962>
9. *Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A. et al.* Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension // *J. Endocrinol.* 2007. V. 195. № 3. P. 439–450. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0254>
10. *Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T. et al.* Developmental influences on blood pressure regulation in ISIAH rats // *Development of the Hypertensive Phenotype: Basic and Clinical Studies*. Amsterdam; Lausanne; N.Y.; Oxford; Shannon; Singapore; Tokyo: Elsevier, 1999. P. 493–526.
11. *Tamashiro K.L., Nguyen M.M., Ostrander M.M. et al.* Social stress and recovery: implications for body weight and body composition // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007. V. 293. № 5. P. R1864–R1874. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00371.2007>
12. *de Souza D.B., Silva D., Silva C.M.C. et al.* Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: A morphometrical and stereological analysis // *Kidney Blood Press Res.* 2011. V. 34. № 6. P. 424–429. <https://doi.org/10.1159/000328331>
13. *Bohus B., Benus R.F., Fokkema D.S. et al.* Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses // *Prog. Brain Res.* 1987. V. 72. P. 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)60196-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)60196-x)
14. *Mormede P., Courvoisier H., Ramos A. et al.* Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses // *Psychoneuroendocrinology.* 2002. V. 27. № 5. P. 563–583. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(01\)00093-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(01)00093-2)
15. *Flint J.* Animal models of anxiety and their molecular dissection // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2003. V. 14. № 1. P. 37–42. [https://doi.org/10.1016/s1084-9521\(02\)00170-2](https://doi.org/10.1016/s1084-9521(02)00170-2)
16. *Bailey J.S., Grabowski-Boase L., Steffy B.M. et al.* Identification of quantitative trait loci for locomotor activation and anxiety using closely related inbred strains // *Genes Brain Behav.* 2008. V. 7. № 7. P. 761–769. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2008.00415.x>
17. *Fernandez-Teruel A., Escorihuela R.M., Gray J.A. et al.* A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat // *Genome Res.* 2002. V. 12. № 4. P. 618–626. <https://doi.org/10.1101/gr.203402>
18. *Ahmadiyeh N., Churchill G.A., Solberg L.C. et al.* Lineage is an epigenetic modifier of QTL influencing behavioral coping with stress // *Behav. Genet.* 2005. V. 35. № 2. P. 189–198. <https://doi.org/10.1007/s10519-004-1018-5>
19. *Markel A.L.* Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension // *Genetic Hypertension*. Paris: Colloque INSERM, 1992. P. 405–407.
20. *Адарцнев В.А., Корохов Н.П., Остапчук В. и др.* Характеристика линий крыс с нормотензивным и гипертензивным статусом методом геномного фингерпринтинга // *Генетика.* 1996. V. 32. № 12. P. 1669–1677.
21. *Meshkov I.O., Alekhina T.A., Moreva T.A., Markel A.L.* Behavioral characteristics of ISIAH rat strain // *Zh.*

- Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova. 2012. V. 62. № 2. P. 233–242.
22. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Maslova L.N., Markel A.L. Genetic control of the corticosterone level at rest and under emotional stress in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension // Clin. Exp. Hypertens. 2010. V. 32. № 6. P. 364–371. <https://doi.org/10.3109/10641961003628502>
 23. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Maslova L.N., Markel A.L. The genetic control of blood pressure and body composition in rats with stress-sensitive hypertension // Clin. Exp. Hypertens. 2013. V. 35. № 7. P. 484–495. <https://doi.org/10.3109/10641963.2012.758274>
 24. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Abramova T.O., Markel A.L. Genetic loci for spleen weight and blood pressure in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension // Mol. Biol. 2014. V. 48. № 3. P. 351–358. <https://doi.org/10.1134/S0026893314030169>
 25. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Markel A.L. Dopamine level in the medulla oblongata is under the control of chromosome 8 locus in ISIAH rats // Dokl. Biol. Sci. 2010. V. 431. P. 100–102. <https://doi.org/10.1134/s0012496610020080>
 26. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Polityko Y.K. et al. Hypothalamic norepinephrine concentration and heart mass in hypertensive ISIAH rats are associated with a genetic locus on chromosome 18 // J. Pers. Med. 2021. V. 11. № 2. P. 67. <https://doi.org/10.3390/jpm11020067>
 27. Samani N.J., Gauguier D., Vincent M. et al. Analysis of quantitative trait loci for blood pressure on rat chromosomes 2 and 13. Age-related differences in effect // Hypertension. 1996. V. 28. № 6. P. 1118–1122. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.28.6.1118>
 28. Kovacs P., van den Brandt J., Kloting I. Effects of quantitative trait loci for lipid phenotypes in the rat are influenced by age // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1998. V. 25. № 12. P. 1004–1007. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1998.tb02174.x>
 29. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Maslova L.N. et al. The characteristics of motor activity in ISIAH rats in an open field test are controlled by genes on chromosomes 2 and 16 // Neurosci. Behav. Physiol. 2009. V. 39. № 1. P. 57–64. <https://doi.org/10.1007/s11055-008-9100-8>
 30. Garrett M.R., Dene H., Rapp J.P. Time-course genetic analysis of albuminuria in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet // J. Am. Soc. Nephrol. 2003. V. 14. № 5. P. 1175–1187. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000060572.13794.58>
 31. Markel A.L., Galaktionov Yu K., Efimov V.M. Factor analysis of rat behavior in an open field test // Neurosci. Behav. Physiol. 1989. V. 19. № 4. P. 279–286. <https://doi.org/10.1007/BF01236015>
 32. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 1989. 1659 p.
 33. Lander E.S., Green P., Abrahamson J. et al. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations // Genomics. 1987. V. 1. № 2. P. 174–181. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(87\)90010-3](https://doi.org/10.1016/0888-7543(87)90010-3)
 34. Basten C.J., Weir B.S., Zeng Z.-B. Zmap—a QTL cartographer // Proc. 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: Computing Strategies and Software. Guelph, Ontario, Canada: Organizing Committee, 1994. P. 65–66.
 35. Basten C.J., Weir B.S., Zeng Z.-B. QTL Cartographer. Version 1.17 // Department of Statistics, North Carolina State Univ. Raleigh, NC. 2004.
 36. Churchill G.A., Doerge R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping // Genetics. 1994. V. 138. P. 963–971. <https://doi.org/10.1093/genetics/138.3.963>
 37. Lander E., Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results // Nat. Genet. 1995. V. 11. № 3. P. 241–247. <https://doi.org/10.1038/ng1195-241>
 38. Gray J.A., Flint J., Dawson G.R., Fulker D.W. A strategy to home-in on polygenes influencing susceptibility to anxiety // Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp. 1999. V. 14. № S1. P. S3–S10. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1077\(199908\)14:1+<S3::AID-HUP111>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1077(199908)14:1+<S3::AID-HUP111>3.0.CO;2-8)
 39. Sousa N., Almeida O.F., Wotjak C.T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents // Genes Brain Behav. 2006. V. 5. Suppl. 2. P. 5–24. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00228.x>
 40. Nosek K., Dennis K., Andrus B.M. et al. Context and strain-dependent behavioral response to stress // Behav. Brain Funct. 2008. V. 4. P. 23. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-4-23>
 41. Moisan M.P., Courvoisier H., Bihoreau M.T. et al. A major quantitative trait locus influences hyperactivity in the WKHA rat // Nat. Genet. 1996. V. 14. № 4. P. 471–473. <https://doi.org/10.1038/ng1296-471>
 42. Ramos A., Moisan M.P., Chaouloff F. et al. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats // Mol. Psychiatry. 1999. V. 4. № 5. P. 453–462. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000546>
 43. Conti L.H., Jirout M., Breen L. et al. Identification of quantitative trait loci for anxiety and locomotion phenotypes in rat recombinant inbred strains // Behav. Genet. 2004. V. 34. № 1. P. 93–103. <https://doi.org/10.1023/B:BEGE.0000009479.02183.1f>
 44. Solberg L.C., Baum A.E., Ahmadiyah N. et al. Sex- and lineage-specific inheritance of depression-like behavior in the rat // Mamm. Genome. 2004. V. 15. № 8. P. 648–662. <https://doi.org/10.1007/s00335-004-2326-z>
 45. Редина О.Е., Девяткин В.А., Еришов Н.И., Маркель А.Л. Генетический полиморфизм экспериментально воспроизводимых форм артериальной гипертензии // Генетика. 2020. Т. 56. № 2. С. 211–224. <https://doi.org/10.31857/S0016675820020101>
 46. Coll A.P., Challis B.G., Yeo G.S. et al. The effects of proopiomelanocortin deficiency on murine adrenal development and responsiveness to adrenocorticotropic // Endocrinology. 2004 V. 145. № 10. P. 4721–4727. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0491>
 47. Mitra R., Sapolsky R.M. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 14. P. 5573–5578. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705615105>
 48. Burford N.G., Webster N.A., Cruz-Topete D. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of glucocorticoids in the cardiovascular system // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 10. P. pii: E2150. <https://doi.org/10.3390/ijms18102150>
 49. Sutton R.E., Koob G.F., Le Moal M. et al. Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats //

- Nature. 1982. V. 297. № 5864. P. 331–333.
<https://doi.org/10.1038/297331a0>
50. *Boyer P.* Do anxiety and depression have a common pathophysiological mechanism? // *Acta. Psychiatr. Scand. Suppl.* 2000. № 406. P. 24–29.
51. *Binder E.B., Nemeroff C.B.* The CRF system, stress, depression and anxiety—insights from human genetic studies // *Mol. Psychiatry.* 2010. V. 15. № 6. P. 574–588.
<https://doi.org/10.1038/mp.2009.141>
52. *Hata T., Kita T., Kamanaka Y. et al.* Catecholamine levels in the brain of SART (repeated cold)-stressed rats // *J. Auton. Pharmacol.* 1987. V. 7. № 3. P. 257–266.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.1987.tb00154.x>
53. *Hata T., Nishimura Y., Kita T. et al.* The abnormal open-field behavior of SART-stressed rats and effects of some drugs on it // *Jpn. J. Pharmacol.* 1988. V. 48. № 4. P. 479–490.
<https://doi.org/10.1254/jjp.48.479>
54. *Lambert G.W., Jonsdottir I.H.* Influence of voluntary exercise on hypothalamic norepinephrine // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1998. V. 85. № 3. P. 962–966.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.3.962>
55. *Baum A.E., Solberg L.C., Churchill G.A. et al.* Test- and behavior-specific genetic factors affect WKY hypoactivity in tests of emotionality // *Behav. Brain. Res.* 2006. V. 169. № 2. P. 220–230.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.007>
56. *Eisener-Dorman A.F., Grabowski-Boase L., Steffy B.M. et al.* Quantitative trait locus and haplotype mapping in closely related inbred strains identifies a locus for open field behavior // *Mamm. Genome.* 2010. V. 21. № 5–6. P. 231–246.
<https://doi.org/10.1007/s00335-010-9260-z>
57. *Carlborg O., Kerje S., Schütz K. et al.* A global search reveals epistatic interaction between QTL for early growth in the chicken // *Genome Res.* 2003. V. 13. № 3. P. 413–421.
<https://doi.org/10.1101/gr.528003>
58. *Beck S.R., Brown W.M., Williams A.H. et al.* Age-stratified QTL genome scan analyses for anthropometric measures // *BMC Genet.* 2003. V. 4. Suppl. 1. P. S31.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-4-S1-S31>
59. *Legare M.E., Bartlett F.S., Frankel W.N.* A major effect QTL determined by multiple genes in epileptic EL mice // *Genome Res.* 2000. V. 10. № 1. P. 42–48.
60. *Morel L., Blenman K.R., Croker B.P., Wakeland E.K.* The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 4. P. 1787–1792.
<https://doi.org/10.1073/pnas.031336098>
61. *Yagil C., Hubner N., Monti J. et al.* Identification of hypertension-related genes through an integrated genomic-transcriptomic approach // *Circ. Res.* 2005. V. 96. № 6. P. 617–625.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000160556.52369.61>
62. *Izídio G.S., Oliveira L.C., Oliveira L.F. et al.* The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption // *Mamm. Genome.* 2011. V. 22. № 5–6. P. 329–340.
<https://doi.org/10.1007/s00335-011-9327-5>
63. *Terenina-Rigaldie E., Moisan M.P., Colas A. et al.* Genetics of behaviour: phenotypic and molecular study of rats derived from high- and low-alcohol consuming lines // *Pharmacogenetics.* 2003. V. 13. № 9. P. 543–554.
<https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000054120.14659.8c>

Genetic Control of the Behavior of ISIAH Rats in the Open Field Test

O. E. Redina^{a, *}, S. E. Smolenskaya^a, and A. L. Markel^a

^aFRC Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: oredina@ngs.ru

Genetic control of behavior in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension in an open field test was investigated. Genome scanning (QTL analysis) was carried out in a group of male F₂ hybrids (ISIAH × WAG) at the age of 6 months using 149 microsatellite polymorphic markers. The following traits were studied: latent period of the onset of movement, locomotor activity (LA) in the 1st minute of the open field test, LA on the periphery of the open field area, vertical activity (rearing) and grooming on the periphery of the open field area, defecation. The polygenic control of all studied traits has been determined. Various effects of ISIAH rat alleles in the found QTLs are shown: in some loci the presence of ISIAH rat alleles leads to an increase in the trait value, in others – to its decrease, and for a number of loci the effects on the phenotype are shown in a heterozygous state. Among the found loci, 11 were described for the first time: three of them (on chromosomes 5, 11, and 18) are associated with the trait of motor activity in the 1st minute of the open field test; one locus (on chromosome 14) is associated with locomotor activity at the periphery of the open field; one locus (on chromosome 17) is associated with grooming at the periphery of the open field; two loci (on chromosomes 17 and 18) are associated with rearing at the periphery of the open field; and 4 loci (on chromosomes 11, 12, 14 and 19) are associated with the level of defecation. Common loci associated with both behavior and previously studied traits that can influence behavior have been identified. On chromosome 5, a common locus associated with two behavioral traits and with a basal plasma corticosterone concentration has been described. On chromosome 8, a common locus associated with locomotor activity at the periphery of the open field area and with the concentration of dopamine in the brain stem was found. On chromosome 18, a common locus for four traits of behavior and the level of norepinephrine in the hypothalamus was identified. The results obtained contribute to the functional annotation of the rat genome.

Keywords: behavior, QTL analysis, open field test, ISIAH rat strain.

ПОЛНОГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ
РОССИЙСКИХ ЛОКАЛЬНЫХ ПОРОД ЧЕРНО-ПЕСТРОГО КОРНЯ

© 2022 г. А. С. Абдельманова¹, *, А. А. Сермягин¹, А. В. Доцев¹,
А. Н. Родионов¹, Ю. А. Столповский², Н. А. Зиновьева¹, **

¹Федеральный исследовательский центр животноводства им. академика Л.К. Эрнста,
Московская область, Подольск, 142132 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: preevetic@mail.ru

**e-mail: n_zinovieva@mail.ru

Поступила в редакцию 28.11.2021 г.

После доработки 04.01.2022 г.

Принята к публикации 12.01.2022 г.

Дана генетическая характеристика пяти российских молочных пород крупного рогатого скота черно-пестрого корня, включая черно-пеструю, истобенскую, холмогорскую, тагильскую и ярославскую. Анализ проводился по 112526 однонуклеотидным заменам (SNP) с использованием ДНК-чипов высокой плотности BovineGGRHD (Illumina Inc., США). Установлено, что все изученные породы имеют собственную генетическую структуру, отличающую их от голштинской черно-пестрой породы и друг от друга. Во всех российских породах выявлены особи, сохранившие наибольшую долю геномных компонентов, характерных для исследуемой локальной породы, и не проявляющие видимой интрогрессии с голштинами, что делает их кандидатами для использования в программах сохранения отечественных генетических ресурсов.

Ключевые слова: локальные породы, крупный рогатый скот, SNP, черно-пестрый скот, сохранение биоразнообразия.

DOI: 10.31857/S0016675822070025

Разнообразие экологических зон на огромной территории России привело к появлению разнообразных популяций крупного рогатого скота, хорошо адаптированных к местным условиям различных регионов России [1]. Наиболее многочисленные массивы молочного скота представлены животными черно-пестрой масти, распространенными по всей территории центральных и северных областей России. Первые попытки систематического описания поголовья крупного рогатого скота этих регионов были предприняты в конце XIX в. [2], однако выделение пород среди черно-пестрого скота и их плановое разведение началось в 20–30-е годы XX в. [3]. В тот период были официально признаны несколько пород черно-пестрого скота, включая черно-пеструю (первая племенная книга вышла в 1925 г.), ярославскую (1925 г.), холмогорскую (1927 г.), тагильскую (1931 г.) и истобенскую (1935 г.). Происхождение российского черно-пестрого скота связывают с двумя различными предковыми популяциями. Малорослый северный великоросский скот, хорошо приспособленный к холодным зимам и способный выживать в условиях скудной кормовой базы, считается пер-

вым предполагаемым предком российского черно-пестрого скота. От этой группы произошли черно-пестрый, истобенский, тагильский и ярославский скот. Другая ветвь в структуре популяций российского черно-пестрого скота связана с холмогорским скотом, который с XVII в. был распространен на островах в верховьях Северной Двины на севере России [3]. Предполагают, что этот скот произошел от голландского крупного рогатого скота, известного с XVI в. Холмогорский скот использовался для улучшения истобенской [1] и тагильской [4] пород на разных этапах их развития. Некоторые авторы указывают на вклад голландского крупного рогатого скота в формирование русских пород черно-пестрого корня [4], однако другие исследователи полагают, что голландский крупный рогатый скот оказал лишь незначительное влияние на формирование генофонда вышеупомянутых пород [3, 5]. В 1990-е гг. черно-пестрый скот был самым многочисленным среди молочных пород крупного рогатого скота; его общая численность составляла 14277.8 тыс. голов.

Стремление использовать в животноводстве ограниченное число высокоудойных пород в по-

следние десятилетия привело к значительному сокращению разнообразия аборигенных пород домашнего скота во всем мире [6, 7], в том числе в России [8]. За последние 30 лет поголовье российского черно-пестрого скота значительно сократилось, в основном за счет замещения высокопродуктивной трансграничной голштинской породой. Если в 2010 г. общая численность поголовья указанных пород составляла 2394.7 тыс. голов, в том числе 1343.4 тыс. коров, то в 2020 г. она снизилась до 1419.0 и 898.1 тыс. голов соответственно. Поголовье истобенской и тагильской пород сократилось до 793 и 151 головы соответственно (включая 455 и 100 коров) [9], и сейчас эти породы крупного рогатого скота находятся на грани исчезновения. Поголовье черно-пестрого, холмогорского и ярославского скота сократилось не так резко, однако современные представители этих пород несут значительную долю генетических компонентов голштинской породы. Небольшая чистокровная популяция холмогорской породы (печорский тип), насчитывающая всего 473 головы, поддерживается в Республике Коми [9, 10]. С другой стороны, численность голштинского скота неуклонно возрастала; если в 1990 г. в России голштинский скот вообще не регистрировался, то в 2020 г. его численность достигла 692.6 тыс. голов [9, 10]. Наиболее существенным преимуществом крупного рогатого скота голштинской породы является его повышенная молочная продуктивность и адаптация к промышленной технологии производства молока. Удой российских пород черно-пестрого скота в 2020 г. варьировал от 3872 кг у чистопородных холмогорских животных до 7558 кг у представителей черно-пестрой породы по сравнению с 9334 кг у голштинской породы. Можно предположить дальнейшее сокращение численности российского черно-пестрого скота и его замену голштинскими или помесными животными с высокой кровностью по голштинской породе.

Для сохранения биоразнообразия российских пород скота черно-пестрого корня необходима разработка и реализация эффективных программ сохранения генетических ресурсов. Первым шагом в этом направлении должна стать оценка существующего генетического разнообразия и отбор животных для использования в качестве доноров генетического материала в программах сохранения. Другими словами, мы должны ответить на вопрос, присутствуют ли в современных популяциях черно-пестрого скота особи, сохранившие предковые геномные компоненты, отличающие их от голштинской и других родственных пород, которые могут рассматриваться в качестве кандидатов для использования в программах сохранения генетического материала?

Разработка высокопроизводительных методов полногеномного анализа значительно повысила информативность молекулярно-генетических ис-

следований, сделав возможным уточнение происхождения пород и их демографической истории, характеристику генетических взаимоотношений между различными популяциями крупного рогатого скота, включая российские породы черно-пестрого скота [11–15]. Проведенные ранее исследования на основе микросателлитных маркеров позволили предположить комбинированное происхождение холмогорской и ярославской пород крупного рогатого скота [11]. Недавние исследования с использованием SNP-чипов показали, что среди современных представителей этих пород встречаются особи незначительной интрогрессией других пород, в том числе голштинской [13, 14], в то время как у представителей черно-пестрого, истобенского и тагильского скота выявлена заметная доля геномных компонентов, специфичных для голштинской породы [14]. Сравнительные исследования современных и исторических (датируемых первой половиной XX в.) представителей ярославской и холмогорской пород подтвердили сохранение части исторических компонентов в современных популяциях обеих пород [16]. Из-за небольшого количества особей некоторых пород и относительно небольшого количества SNP, используемых для исследований (~40K SNP), авторы подчеркнули необходимость проведения дополнительных исследований для выяснения генетической структуры локальных российских пород крупного рогатого скота.

Цель настоящей работы – исследование генетического разнообразия и структуры современных популяций всех существующих в России пород крупного рогатого скота черно-пестрого корня с использованием Bovine GGP HD BeadChip (Illumina Inc., США), содержащего 150 тыс. SNP. Было установлено участие голштинского скота в формировании аллелофонда всех изученных пород за исключением ярославской. Вместе с тем во всех породах были выявлены особи, у которых отсутствовала видимая интрогрессия голштинов. По результатам исследований были начаты программы сохранения генетического материала, направленные на сохранение генетического разнообразия этих ценных национальных генетических ресурсов животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 169 животных, относящихся к пяти российским породам черно-пестрого корня, включая черно-пеструю ($n = 44$, BLWT), истобенскую ($n = 21$, ISTOB), холмогорскую ($n = 26$, KHLM), тагильскую ($n = 26$, TAGIL) и ярославскую ($n = 52$, YRSL). В исследуемую выборку была дополнительно включена голштинская черно-пестрая порода ($n = 49$, HLST) в связи с использованием ее для улучшения российских пород черно-пестрого корня. В качестве аутгруп-

пы для некоторых анализов была использована якутская порода ($n = 10$, YAKUT). Общая выборка пород черно-пестрого корня составляла 218 голов.

В качестве материала для исследований были использованы образцы крови, ткани (ушной выщип) и спермы, полученные в ходе рутинных ветеринарных процедур в соответствии с соглашениями о научном сотрудничестве или в рамках оценки достоверности происхождения племенных животных.

Геномную ДНК выделяли с помощью коммерческих наборов Nexttec (Nexttec Biotechnology GmbH, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Качество полученных экстрактов оценивали путем измерения концентрации двухцепочечной ДНК с помощью флуориметра Qubit™ (Invitrogen, Life Technologies, США) и определения отношения поглощения образцом света при длине волн 260 и 280 нм (соотношение OD260/280) с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Генотипирование образцов проводили с помощью SNP-чипа Bovine GGP BeadChip (Illumina, San Diego, CA, США), содержащего 150 тыс. однонуклеотидных замен. Фильтры для показателей GenCall (GC) и GenTrain (GT), характеризующих точность определения генотипа прибором в каждом конкретном SNP, были установлены на уровне 0.5 [17]. С использованием программы PLINK [18] из общего набора данных были удалены образцы, имевшие менее 90% успешно генотипированных SNP ($-mind$ 0.1), а также локусы, генотипированные менее чем у 90% животных ($-geno$ 0.1) или показавшие частоту минорного аллеля менее 5% ($-maf$ 0.05). Количество SNP, прошедших фильтрацию, составило 112526. Для некоторых типов анализа (оценка генетического разнообразия и структуры популяций) была проведена дополнительная фильтрация SNP по параметру неравновесия по сцеплению (linkage disequilibrium, LD). Были удалены SNP, для которых квадрат коэффициента корреляции (r^2) между двумя соседними SNP внутри скользящего окна из 50 SNP с шагом перекрытия в 5 SNP превышал 0.5 ($-indep-pairwise$ 50 5 0.5). После фильтрации по LD было удалено 35294 SNP. Кроме того, были исключены SNP, локализованные на половых хромосомах, а также с неизвестной локализацией в геноме (сборка генома крупного рогатого скота ARS-UCD1.2 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002263795.1/)). Итоговый набор данных, используемый для анализа, включал 77232 SNP.

Для оценки уровня генетического разнообразия в каждой породе были рассчитаны наблюдаемая (H_O) и несмещенная ожидаемая (${}_U H_E$) гетерозиготность [19], коэффициент инбридинга (${}_U F_{IS}$) [20], основанный на несмещенной ожидаемой гетерозиготности, и показатель аллельного разнообра-

зия, скорректированный на размер выборки (A_R) [21] с использованием R-пакета “diveRsity” [22].

Генетические различия между изученными породами оценивались в PLINK v1.90 с помощью анализа главных компонент (PCA), визуализированного с помощью R-пакета “ggplot2” [23]. Парные дистанции для идентичных по состоянию (identical-by-state, IBS) фрагментов были использованы для построения дендрограммы “сеть соседей” в программе SplitsTree 4.14.5 [24].

Попарные значения F_{ST} [20] были рассчитаны в R-пакете “diveRsity” [22] и использовались наряду с генетическими дистанциями, рассчитанными по Reynolds [25], для построения дендрограмм “сеть соседей” в программе SplitsTree 4.14.5 software [24].

Исследования кластерной структуры популяций было проведено в программе ADMIXTURE v1.23 [26]. Оптимальное число кластеров K было определено на основании наименьшей ошибки при процедуре перекрестной проверки, рассчитанной для значений K от 1 до 9. Визуализация результатов анализа была выполнена с использованием R-пакета “pophelper” [27].

Для оценки наличия общих предковых компонентов между исследованными породами были рассчитаны показатели D -статистики [28] и F_4 -статистики [29] с использованием R-пакета, “admixr” [30]. Для набора из трех популяций W , X и Y и аутгруппы Z , которая соответствует филогении $((W,X),Y).Z$, количество общих аллелей между W и Y ($BABA$) или X и Y ($ABBA$) рассчитывается исходя из предположения, что аллель A представляет собой предковый аллель, а аллель B — производный аллель. Значительный избыток $BABA$ или $ABBA$ указывает на наличие адмиксии между популяциями W и Y или X и Y соответственно. Мы использовали якутскую породу как аутгруппу Z . В первом анализе мы определили голштинскую породу как Y вследствие ее интенсивного использования при улучшении изучаемых пород. В альтернативном анализе в качестве Y был выбран холмогорский скот для проверки его возможного вклада в развитие изучаемых пород. Мы протестировали все остальные породы крупного рогатого скота как W и X . Достоверными считались значения D и F_4 , имеющие значения параметра $Z > 3$.

Для оценки доли предковых компонентов в адмиксированных популяциях было рассчитано соотношение F_4 [29] для каждой из изученных российских пород черно-пестрого скота, за исключением ярославской породы, в которой не было выявлено примесей других пород по результатам D -статистики. Мы попеременно определяли каждую из изучаемых российских пород черно-пестрого корня как интрогрессированную популяцию X . Истобенская порода была выбрана в качестве сестринской популяции S для черно-пестрой, тагильской и холмогорской пород, а тагильская

порода – в качестве сестринской популяции для истобенской породы. Основываясь на результатах D -статистики, мы выбрали голштинскую, черно-пеструю и холмогорскую породы в качестве возможного источника интрогрессий (популяция В). Их сестринские породы (А) были выбраны на основании результатов генетического родства между изучаемыми породами. Якутский скот использовался в качестве аутгруппы О. Доли предков В в Х (α) со значениями параметра $Z > 3$ считались достоверными.

Для понимания взаимосвязей между изученными породами была рассчитана $F3$ -статистика (А, В; С) [29]. Каждая из изучаемых российских пород крупного рогатого скота была попеременно определена как целевая популяция (С), а все остальные пары пород были протестированы как исходные популяции (А и В). Отрицательные значения $F3$ со значениями параметра $Z < -3$ указывают на наличие адмиксии между двумя исходными популяциями. Для проверки генетической близости изученных российских пород черно-пестрого корня по отношению друг к другу и к голштинской породе в качестве аутгруппы С был использован якутский скот, а все возможные пары изучаемых пород были использованы как тестируемые популяции А и В. Более высокие значения $F3$ указывают на большее генетическое сходство между А и В.

Для оценки степени дивергенции популяций и уровня обмена генами между изученными породами было использовано программное обеспечение TreeMix 1.12 [31]. В качестве аутгруппы при построении TreeMix дерева максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) была использована якутская порода. Было протестировано от 0 до 5 событий миграции по десять итераций на каждое событие. Оптимальное количество миграционных событий определялось с помощью пакета R “optM” [32] на основании выходных файлов TreeMix. Для определения информационного вклада каждого вектора миграции, добавляемого в дерево, был произведен расчет f -индекса.

Для оценки протяженных гомозиготных участков (пробеги гомозиготности, ROH) был использован метод последовательных прогонов [33], реализованный в R-пакете “detectRUNS” [34]. С целью исключения заниженной оценки ROH длиной 8 Mb и более в ходе анализа допускался один SNP с отсутствующим генотипом и один гетерозиготный SNP [35]. С целью исключения коротких и широко распространенных сегментов ROH порог минимальной длины ROH был установлен на уровне 1 Mb.

Минимальное число SNP (l) было рассчитано по методике, предложенной Lencz et al. [36] и модифицированной Purfield et al. [37]:

$$l = \frac{\lg_e \frac{\alpha}{n_s n_i}}{\lg_e (1 - \overline{het})},$$

где n_s – число SNP, генотипированных у индивида, n_i – число генотипированных индивидов, α – доля ложноположительных ROH (в настоящем исследовании принято 0.05) и \overline{het} – средняя гетерозиготность по всем SNP. В нашем случае минимальное число SNP составило 42.

На основании информации о количестве и протяженности гомозиготных участков в геноме был вычислен коэффициент геномного инбридинга (F_{ROH}), представляющий собой отношение суммы длин всех ROH у особи к общей длине генома (2.51 Gb). Сегменты гомозиготности в соответствии с длиной обнаруженных фрагментов были распределены между следующими классами длины: >1, >2, >4, >8 и >16 Mb. Кроме того, было рассчитано количество гомозиготных сегментов, попадавших в разные классы длины: 1–2, 2–4, 4–8, 8–16 и >16 Mb.

Эффективная численность популяции (N_E) оценивалась на основании неравновесия по сцеплению с помощью алгоритма, реализованного в программе SNeP v1.1 [38]. Для расчетов применялись параметры, заданные в программе по умолчанию, кроме минимального и максимального расстояния между принятыми в анализ SNP (0.95 и 18 Mb соответственно) и модификатора скорости рекомбинации, согласно Sved и Feldman [39].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наибольший уровень генетического разнообразия наблюдался у черно-пестрой и тагильской пород, о чем свидетельствовали значения несмещенной ожидаемой гетерозиготности (${}_U H_E = 0.393$ и 0.391 соответственно) и аллельного разнообразия ($A_R = 1.993$ и 1.991). Наименьшая генетическая изменчивость наблюдалась у ярославского крупного рогатого скота (${}_U H_E = 0.359$, $A_R = 1.961$). В черно-пестрой породе обнаружен недостаток гетерозигот (${}_U F_{IS} = 0.005$), в то время как в других российских породах наблюдалось отклонение ожидаемого числа гетерозигот от равновесия Харди–Вайнберга в сторону избытка (табл. 1).

Анализ главных компонент (principal component analysis, PCA) (рис. 1,а) показал, что уже первая компонента, отвечающая за 14.86% генетической изменчивости, четко отделяет истобенскую, холмогорскую и ярославскую породы от голштинской, при этом ярославская порода была наиболее удалена от общей группы пород. Черно-пестрая и тагильская породы образовали менее консолидированные кластеры, которые частично перекрывались с голштинами. Дендрограмма,

Таблица 1. Генетическое разнообразие изученных пород скота на основании данных SNP-генотипирования

Порода	<i>n</i>	H_O (M ± se)	$\cup H_E$ (M ± se)	A_R (M ± se)	$\cup F_{IS}$ [CI95%]
BLWT	44	0.391 ± 0	0.393 ± 0	1.993 ± 0	0.005 [0.004; 0.006]
ISTOB	21	0.377 ± 0.001	0.370 ± 0	1.975 ± 0.001	-0.016 [-0.017; -0.015]
KHLM	26	0.381 ± 0.001	0.373 ± 0.001	1.974 ± 0.001	-0.021 [-0.022; -0.020]
TAGIL	26	0.400 ± 0.001	0.391 ± 0	1.991 ± 0	-0.022 [-0.023; -0.021]
YRSL	52	0.362 ± 0.001	0.359 ± 0.001	1.961 ± 0.001	-0.009 [-0.010; -0.008]
HLST	49	0.372 ± 0.001	0.374 ± 0	1.982 ± 0	0.004 [0.003; 0.005]

Примечание. Породы (для табл. 1–3): BLWT – черно-пестрая, ISTOB – истобенская, KHLM – холмогорская, TAGIL – тагильская, YRSL – ярославская, HLST – голштинская; *n* – число голов; H_O – наблюдаемая гетерозиготность; $\cup H_E$ – несмещенная ожидаемая гетерозиготность; A_R – аллельное разнообразие; $\cup F_{IS}$ – несмещенный коэффициент инбридинга; M – среднее значение, se – стандартная ошибка; CI95% – вариации коэффициента $\cup F_{IS}$ при доверительном интервале 95%.

построенная по алгоритму “сеть соседей” на основании попарных генетических дистанций IBS, демонстрирует, что особи истобенской (за исключением одной головы), холмогорской и ярославской пород распределялись между тремя породоспецифическими ветвями. Только часть животных тагильской породы формировала обособленную ветвь, в то время как другая часть животных располагалась на общей ветви с черно-пестрой и голштинской породами (рис. 1,б). Расчет значений попарных генетических дистанций по F_{ST} и по Reynolds показал, что ярославская порода была наиболее удалена как от остальных российских пород, так и от голштинской, а российская черно-пестрая порода, напротив, менее всех отличалась от голштинской.

Анализ структуры популяций (рис. 1,в), выполненный для числа кластеров $K = 2$, четко разграничил ярославскую и голштинскую породы, в то время как другие российские породы проявляли различную степень адмиксии. При $K = 3$ собственный кластер сформировала холмогорская порода, в то время как другие породы, за исключением ярославской, проявляли видимое присутствие холмогорских геномных компонентов. При $K = 4$ истобенский скот отделялся от других пород, при этом компоненты, специфические для истобенской породы, наблюдались у черно-пестрой и тагильской пород. При $K = 5$, что соответствует наиболее вероятному числу кластеров, четыре из пяти изучаемых пород формировали свои собственные кластеры, за исключением черно-пестрой породы, несущей значительную часть предковых компонентов голштинской породы.

D-статистика и *F4*-статистика показали наличие потока генов между голштинской и всеми исследованными российскими породами черно-пестрого скота за исключением ярославской. Наибольшая доля генетических компонентов голштинской породы наблюдалась у российской черно-пестрой породы. Количество общих аллелей с голштинами уменьшалось от тагильской и истобенской до холмогорской пород. Тестирование холмогорской по-

роды как *Y* указывало на интрогрессию между холмогорским скотом и другими изученными породами за исключением ярославской. Наибольший уровень обмена генами наблюдался с черно-пестрой и голштинской породами, наименьший – с истобенской породой (табл. 2).

Расчет *F4*-соотношения показал, что современная популяция черно-пестрой породы несет 81.4% предковых компонентов голштинской породы, что, вероятно, связано с активным использованием быков голштинской породы для улучшения черно-пестрой породы. Наличие адмиксии голштинов было подтверждено результатами расчета *F3*-статистики, о чем свидетельствуют значимые отрицательные значения *F3* для российской черно-пестрой породы как целевой популяции, а также *F3*-статистики с использованием аутгруппы, которая показала наибольшие значения *F3* при попарном сравнении российской черно-пестрой и голштинской пород. Кроме того, мы обнаружили в тагильской породе предковые компоненты черно-пестрой и голштинской пород, доля которых составила 15.6 и 9.2% соответственно. Доля холмогорских предковых компонентов в истобенской породе достигала 49.8% (данные не показаны).

В структуре дерева TreeMix было выявлено наличие двух ветвей, одна из которых специфична для ярославской породы, а другая объединяла все остальные изученные породы. Это подтверждает происхождение ярославской и других российских пород черно-пестрого скота от двух разных предков (рис. 2,а). Наиболее оптимальное число миграций (событий потока генов) составило 2. Добавление двух событий миграции привело к наибольшему увеличению значимости модели, объясняемой *f*-статистикой (рис. 2,б), и анализом регрессионных остатков (рис. 2,в). Один из векторов миграции показывает поток генов от общей предковой популяции черно-пестрой и голштинской пород к черно-пестрой породе. Это можно рассматривать как указание на то, что современная популяция черно-пестрой породы все еще несет в себе наследственные компоненты, которые отличают

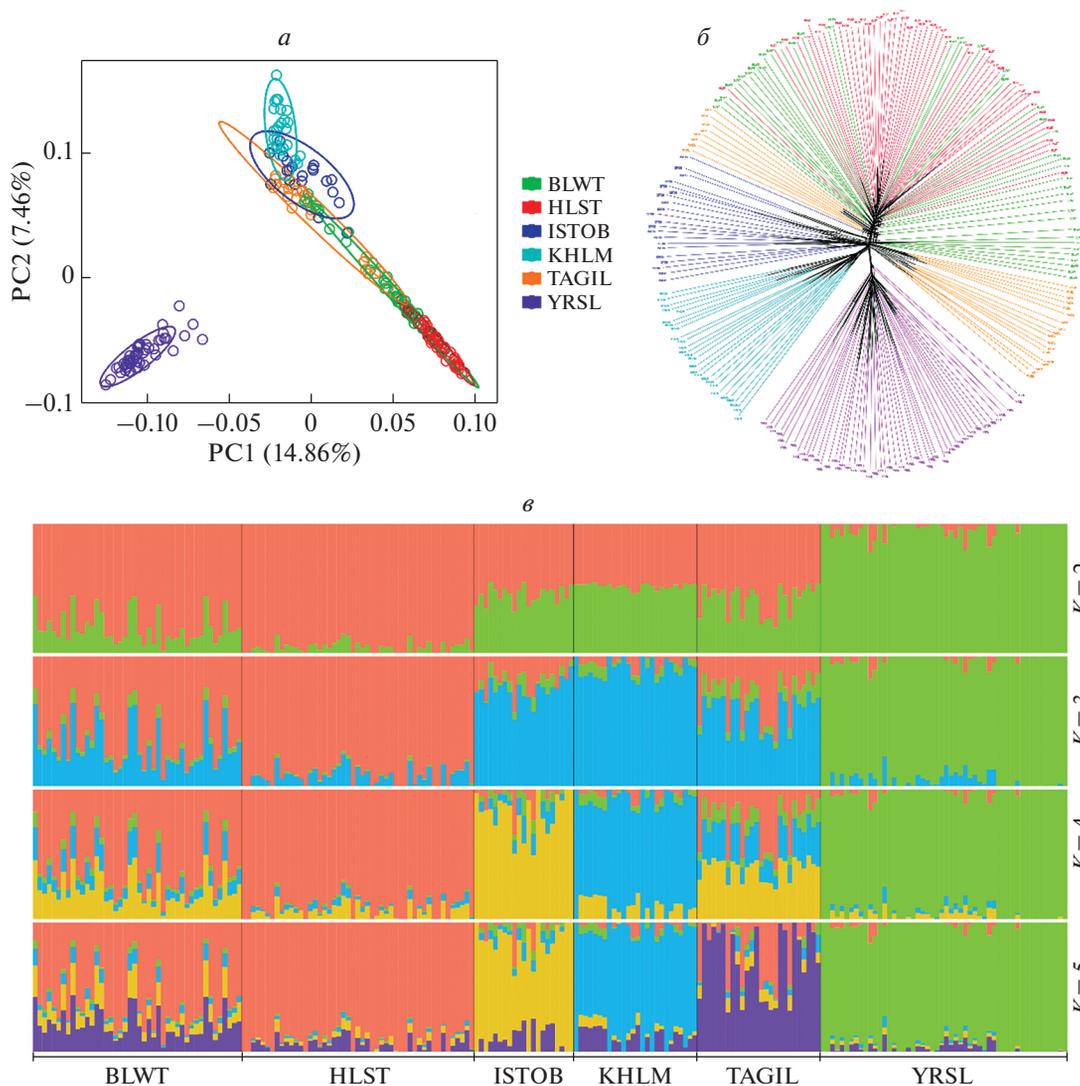


Рис. 1. Генетические связи между изученными породами. *a* – анализ главных компонент (PCA), показывающий распределение особей в пространстве двух измерений, т.е. первой (PC1, X-ось) и второй (PC2, Y-ось) главных компонент. Процент общей генетической изменчивости соответствующих компонентов указан в скобках; *б* – дендрограмма “сеть соседей” (Neighbor-Net tree) на основании попарных генетических дистанций между представителями изученных пород; *в* – анализ примесей в популяциях при числе кластеров (*K*) от 2 до 5. Породы (для рис. 1–4): BLWT – черно-пестрая, ISTOB – истобенская, KHLM – холмогорская, TAGIL – тагильская, YRSL – ярославская, HLST – голштинская.

ее от голштинской породы. Второе миграционное событие связано с передачей генов от общего предка черно-пестрой и голштинской пород к современной популяции тагильской породы (рис. 2,*a*), что находится в соответствии с историей происхождения и развития породы.

Как следует из данных, представленных в табл. 3, среднее число фрагментов ROH и средняя длина гомозиготных участков у российских пород черно-пестрого скота были меньше, чем у голштинской породы ($p < 0.001$). Наименьшее число ROH (25.23 ± 1.65) и покрытие генома ROH (76.13 ± 6.87 Mb) были обнаружены у тагильской породы, что может отражать смешанное происхождение со-

временной популяции этой породы. Наибольшее число ROH и покрытие генома ROH наблюдались у ярославской породы (61.02 ± 3.23 и 213.6 ± 12.85 Mb соответственно). Возможным объяснением может быть отсутствие потока генов извне и небольшое число чистопородных быков, используемых для воспроизводства.

Наибольшее число коротких фрагментов ROH было обнаружено у голштинской породы (38.69 ± 2.30). Ярославская и черно-пестрая породы по этому показателю были близки (31.75 ± 3.64 и 31.66 ± 1.57 соответственно). Три наиболее распространенные молочные породы в России – холмогорская, ярославская и черно-пестрая – не

Таблица 2. Результаты *D*-статистики с использованием голштинской черно-пестрой породы и холмогорской породы в качестве тестовых популяций

W	X	Y	Z	D	Z-score
BLWT	YRSL	HLST	YAKUT	0.1106	44.029
BLWT	TAGIL	HLST	YAKUT	0.0679	38.812
BLWT	ISTOB	HLST	YAKUT	0.0805	37.229
BLWT	KHLM	HLST	YAKUT	0.087	36.544
TAGIL	YRSL	HLST	YAKUT	0.0449	21.080
ISTOB	YRSL	HLST	YAKUT	0.0325	14.094
KHLM	YRSL	HLST	YAKUT	0.0252	10.989
TAGIL	KHLM	HLST	YAKUT	0.02	9.795
TAGIL	ISTOB	HLST	YAKUT	0.0127	6.288
ISTOB	KHLM	HLST	YAKUT	0.0074	3.218
BLWT	YRSL	KHLM	YAKUT	0.0199	11.300
HLST	YRSL	KHLM	YAKUT	0.0205	10.422
TAGIL	YRSL	KHLM	YAKUT	0.0126	7.635
BLWT	ISTOB	KHLM	YAKUT	0.0097	6.817
BLWT	TAGIL	KHLM	YAKUT	0.0076	6.590
HLST	ISTOB	KHLM	YAKUT	0.0103	6.085
HLST	TAGIL	KHLM	YAKUT	0.0083	5.763
ISTOB	YRSL	KHLM	YAKUT	0.0106	5.669

Примечание. Переменные обозначения для тестируемых популяций описаны в Материалах и методах.

Таблица 3. Описательная статистика для числа и длины фрагментов ROH в российских породах по сравнению с голштинской

Порода	<i>n</i>	Количество ROHs (M ± se)	Длина ROH, Mb (M ± se)	F_{ROH} (M ± se)
BLWT	44	57.43 ± 2.16	174.11 ± 12.16	0.069 ± 0.005
ISTOB	21	35.52 ± 4.69	112.56 ± 16.14	0.045 ± 0.006
KHLM	26	53.08 ± 2.18	158.54 ± 8.11	0.063 ± 0.003
TAGIL	26	25.23 ± 1.65	76.13 ± 6.87	0.030 ± 0.003
YRSL	52	61.02 ± 3.23	213.6 ± 12.85	0.085 ± 0.005
HLST	49	83.08 ± 3.25	312.96 ± 16.83	0.125 ± 0.007

Примечание. *n* – число голов; M – среднее значение, se – стандартная ошибка; F_{ROH} – коэффициент геномного инбридинга, рассчитанный как отношение суммы длин всех ROH у особи к общей длине генома.

имели существенных отличий по количеству фрагментов ROH средней длины. Длинные фрагменты ROH длиной 8–16 и >16 Mb среди российских пород были наиболее распространены в ярославской породе: 4.60 ± 0.57 и 1.50 ± 0.27 соответственно. Наименьшее число ROH по всем классам длины было обнаружено в тагильской породе, что свидетельствует в пользу предположения о ее смешанном происхождении (рис. 3,а). С другой стороны, как следует из данных рис. 3,б, покрытие генома фрагментами максимальной длины, рассчитанное как отношение длины таких фрагментов к общей длине всех ROH у каж-

дой породы, было наибольшим в истобенской и тагильской породах (45.04 и 38.72% соответственно). Это может свидетельствовать о недавнем инбридинге в указанных породах в связи с их малочисленностью.

Наименьший эффективный размер популяции (N_E) выявлен у истобенской ($N_{E5} = 97$), тагильской ($N_{E5} = 138$) и холмогорской ($N_{E5} = 130$) пород. Такая тенденция наблюдалась как пять поколений назад, так и в настоящее время. Голштинская и черно-пестрая породы показали увеличение эффективной численности, которое началось пять поколений назад и продолжается до настоящего

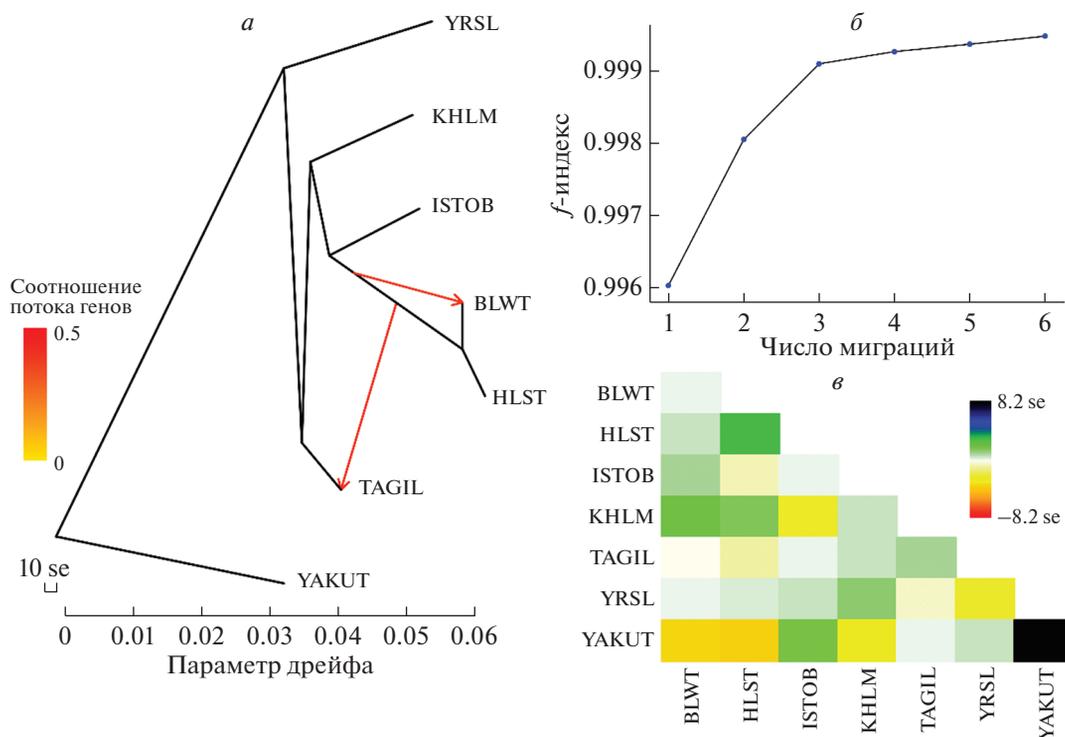


Рис. 2. Оценка степени дивергенции и уровня обмена генами между изученными породами. *a* – дерево TreeMix с двумя событиями миграции и якутской породой в качестве аутгруппы; длина отрезка 10 se соответствует десятикратной величине средней стандартной ошибки (standard error, se), оцененной исходя из ковариационной матрицы выборки. Предполагаемый поток генов показан стрелками, направленными от популяции-донора к популяции-реципиенту, и окрашен в красный цвет, пропорционально интенсивности потока генов; *б* – график, представляющий долю дисперсии (*f*-индекс) в ковариационной матрице выборки (∂W), учитываемой ковариационной матрицей модели (*W*) как функцию количества миграционных событий; *в* – остаточная матрица, построенная на основе анализа TreeMix для двух миграционных событий и выраженная как число стандартных ошибок отклонений для наблюдений в соответствующих породах.

времени ($N_{E5} = 119$ и $N_{E5} = 252$ соответственно). В ярославской породе выявлено некоторое увеличение эффективной численности популяции, начавшееся три поколения назад, хотя ранее эта порода, как и остальные российские породы черно-пестрого корня, демонстрировала устойчивый спад эффективной численности (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Предыдущие филогенетические исследования российских пород крупного рогатого скота черно-пестрого корня, выполненные с использованием ДНК-чипов средней плотности, показали, что большинство из них (черно-пестрая, истобенская, тагильская) имеют сложную генетическую структуру. В то же время ярославский и холмогорский скот были незначительно подвержены влиянию голштинов [13, 14]. Однако ввиду относительно низкого покрытия SNP (~40К SNP) и небольшого размера выборки некоторых пород (например, истобенская порода была представлена только пятью образцами [14]) потребовались дополнительные генетические исследования для

определения пород, которые могли бы стать приоритетными мишенями при разработке и внедрении программ сохранения генетического материала и отбора животных для таких программ.

Насколько нам известно, в настоящей работе впервые дано исследование всего спектра российских пород скота черно-пестрого корня, проведенное с использованием высокоплотных SNP генотипов по 112 526 SNP, полученных с применением Bovine GGP HD BeadChip (Illumina, США). Выборка, использованная для исследования, состояла из 218 животных, представляющих пять российских пород черно-пестрого скота (черно-пестрая, истобенская, холмогорская, тагильская и ярославская) и голштинскую породу как группу сравнения, размер выборки варьировал от 21 особи для истобенской до 52 для ярославской породы.

Мы наблюдали большой уровень генетического разнообразия у черно-пестрой и тагильской пород по сравнению с другими изученными породами (табл. 1), что, вероятно, связано с более высоким уровнем адмиксии голштинской породы, как показали результаты кластерного анализа (рис. 2, *в*),

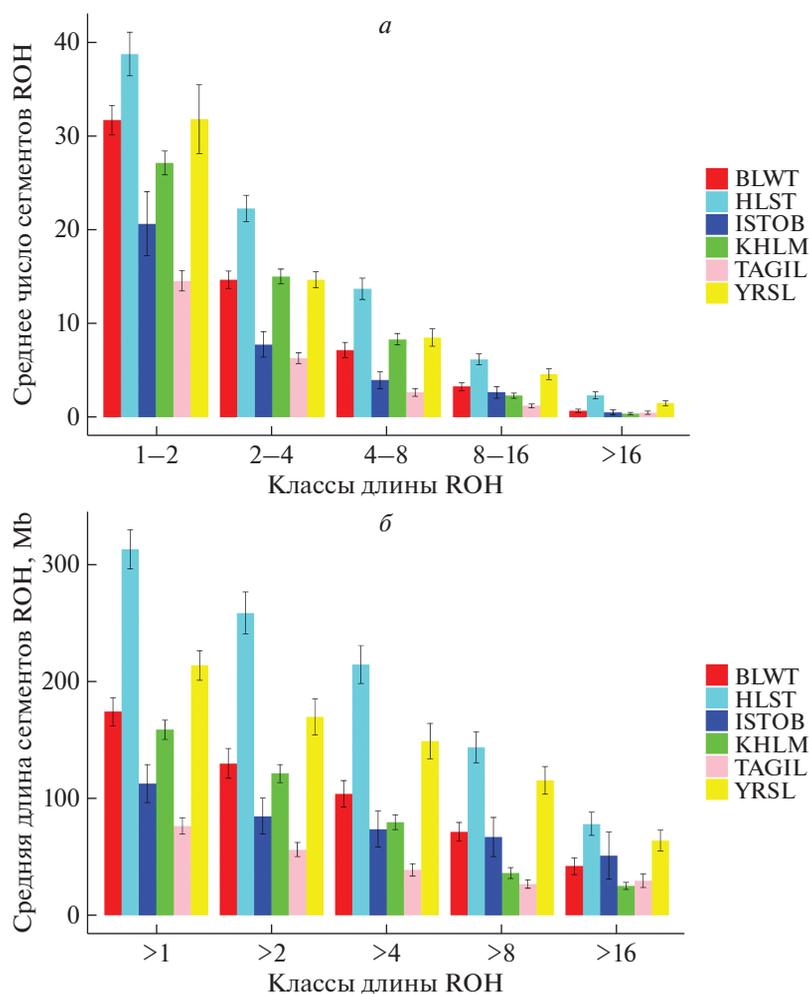


Рис. 3. Распределение сегментов гомозиготности по классам длины в исследованных породах. *а* – распределение числа ROH по классам длины: короткие фрагменты – класс длин 1–2 Mb, средние фрагменты – классы длин 2–4 и 4–8 Mb, длинные фрагменты – классы длин 8–16 и >16 Mb; *б* – средняя длина ROH разных классов длин, рассчитанная как сумма длин фрагментов соответствующего класса у каждой особи внутри породы.

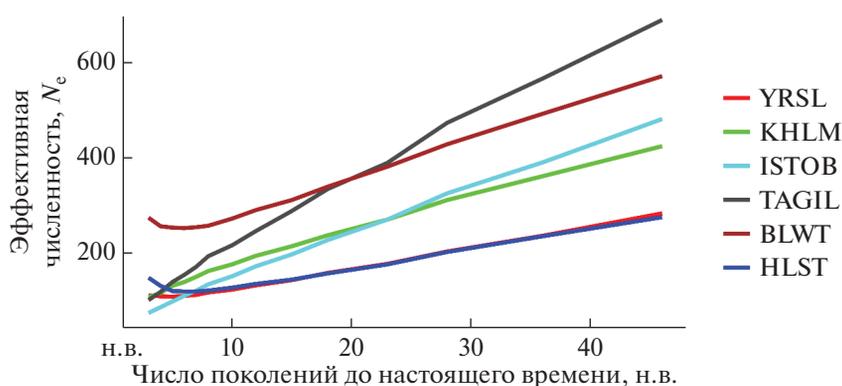


Рис. 4. Эффективный размер популяций изученных пород черно-пестрого корня.

D- и *F4*-статистики и теста *F4*-соотношения. Ярославская порода характеризовалась самым низким генетическим разнообразием по сравнению с другими изученными российскими породами чер-

но-пестрого корня, что в целом соответствует предыдущим исследованиям, выполненным с использованием ДНК-чипов средней плотности [14]. Более низкое генетическое разнообразие яро-

славской породы может быть результатом резкого сокращения численности популяции с 557.2 тыс. голов в 1990 г. до 38.2 тыс. голов в 2020 г. и отсутствия обмена генами с другими породами, как показали результаты Admixture-анализа (рис. 2, в), *D*-статистики (табл. 2), *F_{ST}*-статистики и анализа TreeMix (рис. 2).

Admixture анализ (рис. 1, в) показал, что все изученные породы проявляли собственную генетическую структуру, которая отличала их от голштинской породы и друг от друга. Наиболее удаленными от голштинов были ярославская, холмогорская и истобенская породы, о чем свидетельствовали самые низкие значения генетических дистанций *F_{ST}* и наиболее удаленная локализация их ветвей на дереве, построенном на основании значений *F_{ST}*. В ярославской и холмогорской породах сохранилась наибольшая доля генетических компонентов, свойственных животным, разводившимся на рубеже XIX–XX вв. [16], что объясняет их обособленность от других российских пород.

По исследованиям других авторов [40] крупный рогатый скот, разводимый на территории Урала, в том числе черно-пестрая и тагильская породы, имеет высокое генетическое сходство с голштинскими быками. Однако наши исследования показали, что, несмотря на наличие значительной доли голштинских предков у черно-пестрой и тагильской пород, в изученных популяциях обеих пород были обнаружены особи, несущие очень малую долю крови голштинской породы.

Таким образом, во всех российских локальных породах, кроме черно-пестрой, идентифицированы особи, у которых, вероятно, отсутствует видимая интрогрессия голштинов. По результатам исследований были инициированы программы криоконсервации генетического материала, направленные на сохранение биоразнообразия этих ценных национальных генетических ресурсов животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1037 (внутренний № 15.BRK.21.0001).

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. Эрнст Л.К., Дмитриев Н.Г., Паронян И.А. Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных в России и сопредельных странах. СПб.: ВНИИГРЖ, 1994. 469 с.
2. Миддендорф А.Ф. Исследование современного состояния скотоводства в России. Рогатый скот. Вып. I. М.: Типография М.Н. Лаврова и К., 1884. С. 226–260 (доступно на <https://elibrary.tambovlib.ru/?ebook=4383>, дата обращения 20.12.2021).
3. Диомидов А.М., Жиркович Е.Ф. Разведение и породы крупного рогатого скота. М.: ЮГИЗ-Сельхозгиз., 1934. 408 с.
4. Сабанеев Л.П. Очерки Зауралья и степное хозяйство на башкирских землях. М.: Типография В. Готье, 1873. 162 с. (доступно на <https://elibrary.orenlib.ru/index.php?dn=down&to=avtoropen&id=3546>, дата обращения 20.12.2021).
5. Felius M. Cattle breeds – an encyclopedia. Doetinchem, Netherlands: Misset, 1995. 800 p.
6. Marsoner T., Vigl L.V., Manck F. et al. Indigenous livestock breeds as indicators for cultural ecosystem services: A spatial analysis within the Alpine Space // Ecol. Indicators. 2018. V. 94. № 2. P. 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.046>
7. Zinovieva N.A., Sheiko I.P., Dotsev A.V. et al. Genome-wide SNP analysis clearly distinguished the Belarusian Red cattle from other European cattle breeds // Animal Genetics. 2021. V. 52. № 5. P. 720–724. <https://doi.org/10.1111/age.13102>
8. Zinovieva N.A., Sermyagin A.A., Dotsev A.V. et al. Animal genetic resources: developing the research of allele pool of Russian cattle breeds – minireview // Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]. 2019. V. 54. № 4. P. 631–641. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.4.631eng>
9. Ежегодник по племенной работе в молочном скотоводстве в хозяйствах Российской Федерации (2020 г.). М.: ВНИИплем, 2021. 265 с. ISBN 978-5-87958-404-2.
10. Матюков В.С., Жариков Я.А., Зиновьева Н.А. Генетическая история и ценность генофонда исчезающей холмогорской породы // Молочное и мясное скотоводство. 2018. № 2. С. 2–7. <https://doi.org/10.25632/MMS.2018.2.13747>
11. Li M.H., Kantanen J. Genetic structure of Eurasian cattle (*Bos taurus*) based on microsatellites: clarification for their breed classification // Anim. Genet. 2010. V. 41. № 2. P. 150–158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01980.x>
12. Dotsev A.V., Sermyagin A.A., Shakhin A.V. et al. Evaluation of current gene pool of Kholmogor and Black-and-white cattle breeds based on whole genome SNP analysis // Vavilov J. Genetics and Breeding. 2018. V. 22. № 6. P. 742–747. <https://doi.org/10.18699/VJ18.418>
13. Sermyagin A.A., Dotsev A.V., Gladyr E.A. et al. Whole-genome SNP analysis elucidates the genetic structure of Russian cattle and its relationship with Eurasian taurine breeds // Genet. Sel. Evol. 2018. V. 50. № 37. <https://doi.org/10.1186/s12711-018-0408-8>
14. Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R. et al. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds // Heredity (Edinb). 2018. № 120. P. 125–137. <https://doi.org/10.1038/s41437-017-0024-3>

15. *Zinovieva N.A., Dotsev A.V., Sermyagin A.A. et al.* Selection signatures in two oldest Russian native cattle breeds revealed using high-density single nucleotide polymorphism analysis // *PLoS One*. 2020. V. 15. № 11. e0242200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242200>
16. *Abdelmanova A.S., Kharzinova V.R., Volkova V.V. et al.* Genetic diversity of historical and modern populations of Russian cattle breeds revealed by microsatellite analysis // *Genes*. 2020. V. 11. № 8. P. 940. <https://doi.org/10.3390/genes11080940>
17. *Fan J.B., Oliphant A., Shen R. et al.* Highly parallel SNP genotyping // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2003. № 68. P. 69–78. <https://doi.org/10.1101/sqb.2003.68.69>
18. *Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al.* PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 3. P. 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
19. *Nei M.* Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals // *Genetics*. 1978. № 89. P. 583–590.
20. *Weir B.S., Cockerham C.C.* Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure // *Evolution*. 1984. V. 38. № 6. P. 1358–1370.
21. *Kalinowski S.T.* Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs // *Conserv. Genet.* 2004. № 5. P. 539–543. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000041021.91777.1a>
22. *Keenan K., McGinnity P., Cross T.F. et al.* diveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors // *Methods in Ecology and Evolution*. 2013. V. 4. № 8. P. 782–788. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
23. *Wickham H.* ggplot2: elegant graphics for data analysis. N.Y.: Springer, 2009. 268 p.
24. *Huson D.H., Bryant D.* Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // *Mol. Biol. Evol.* 2006. V. 23. № 2. P. 254–267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
25. *Reynolds J., Weir B.S., Cockerham C.C.* Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance // *Genetics*. 1983. № 105. P. 767–779.
26. *Alexander D.H., Novembre J., Lange K.* Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals // *Genome Res.* 2009. № 19. P. 1655–1664. <https://doi.org/10.1101/gr.094052.109>
27. *Francis R.M.* POPHELPER: An R package and web app to analyse and visualize population structure // *Mol. Ecol. Resour.* 2017. V. 17. № 1. P. 27–32. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12509>
28. *Green R.E., Krause J., Briggs A.W. et al.* A draft sequence of the Neandertal genome // *Science*. 2010. V. 328. № 5979. P. 710–722. <https://doi.org/10.1126/science.1188021>
29. *Patterson N., Moorjani P., Luo Y. et al.* Ancient admixture in human history // *Genetics*. 2012. V. 192. № 3. P. 1065–1093. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.145037>
30. *Petr M., Vernot B., Kelso J.* Admixr – R package for reproducible analyses using ADMIXTOOLS // *Bioinformatics*. 2019. V. 35. № 17. P. 3194–3195. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz030>
31. *Pickrell J.K., Pritchard J.K.* Inference of population splits and mixtures from genome-wide allele frequency data // *PLoS Genetics*. 2012. № 8. e1002967. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002967>
32. *Fitak R.R.* OptM: estimating the optimal number of migration edges on population trees using Treemix // *Biol. Methods Protoc.* 2021. V. 6. № 1. bpab017. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpab017>
33. *Marras G., Gaspa G., Sorbolini S. et al.* Analysis of runs of homozygosity and their relationship with inbreeding in five cattle breeds farmed in Italy // *Anim. Genet.* 2014. V. 46. № 2. P. 110–121. <https://doi.org/10.1111/age.12259>
34. *Biscarini F., Paolo Cozzi P., Gaspa G., Marras G.* detectRUNS: Detect runs of homozygosity and runs of heterozygosity in diploid genomes. R Package Version 0.9.5. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/detectRUNS/index.html> (accessed on 8 May 2021).
35. *Ferenčaković M., Sölkner J., Curik I.* Estimating autozygosity from high-throughput information: Effects of SNP density and genotyping errors // *Genet. Sel. Evol.* 2013. V. 45. № 1. P. 42. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-45-42>
36. *Lencz T., Lambert C., DeRosse P. et al.* Runs of homozygosity reveal highly penetrant recessive loci in schizophrenia // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 50. P. 19942–19947. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710021104>
37. *Purfield D.C., Berry D.P., McParland S., Bradley D.G.* Runs of homozygosity and population history in cattle // *BMC Genet.* 2012. V. 13. № 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-70>
38. *Barbato M., Orozco-terWengel P., Tapio M., Bruford M.W.* SNeP: A tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data // *Front. Genet.* 2015. V. 6. № 109. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00109>
39. *Sved J., Feldman M.* Correlation and probability methods for one and two loci // *Theor. Popul. Biol.* 1973. V. 4. P. 129–132. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(73\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0040-5809(73)90008-7)
40. *Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А. и др.* Генетическая структура популяции голштинизированного черно-пестрого скота на территории Урала // *Генетика*. 2021. Т. 57. № 4. С. 437–444. <https://doi.org/10.31857/S001667582104010X>

Whole-Genomic Studies of the Populations' Structure in the Russian Local Black-Pied Breeds

A. S. Abdelmanova^{a, *}, A. A. Sermyagin^a, A. V. Dotsev^a,
A. N. Rodionov^a, Yu. A. Stolpovsky^b, and N. A. Zinovieva^{a, **}

^a*Ernst Research Center for Animal Husbandry, Moscow oblast, Podolsk, 142132 Russia*

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

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

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

The genetic characteristics of five Russian dairy breeds of black-pied cattle, including Black-and-white, Istoben, Kholmogor, Tagil and Yaroslavl, are given in this study. Analysis was performed for 112526 single nucleotide polymorphisms (SNPs) using Bovine GGP HD DNA arrays (Illumina Inc., USA). It was found that all studied breeds have their own genetic structure, which distinguishes them from the Holstein breed and from each other. The individuals, retained the most proportion of genomic components that inherent to the studied local breeds, and did not exhibit visible introgression with Holstein are identified in all Russian breeds. It makes them candidates for use in the programs of conservation of genetic resources.

Keywords: local breeds, cattle, SNP, black-and-white cattle, biodiversity conservation.

УДК 577.215.3

МИКРОМАТРИЧНЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО¹© 2022 г. В. И. Минина^{1, 2, *}, В. Г. Дружинин¹, А. В. Ларионов¹, Е. Д. Баранова¹, В. Ю. Буслаев², Л. В. Мацкова³, М. Л. Баканова²¹Кемеровский государственный университет, Кемерово, 650065 Россия²Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, 650065 Россия³Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, 236000 Россия

*e-mail: vminina@mail.ru

Поступила в редакцию 25.11.2021 г.

После доработки 14.02.2022 г.

Принята к публикации 22.02.2022 г.

Рак легкого является наиболее распространенным онкологическим заболеванием у мужчин во всем мире. Для поиска новых биологических маркеров этой патологии с помощью технологии микроматричного анализа SurePrint G3 Human Gene Expression был исследован транскриптом мононуклеаров крови пациентов и здоровых доноров (жители Кемеровской обл., Россия). В результате было выявлено 288 дифференциально экспрессирующихся генов, 108 генов с повышенной и 180 с пониженной экспрессией. Функциональный анализ обогащения с использованием ресурса Web-Gestalt и различных баз (Gene Ontology, KEGG и Reactome) указал на изменение экспрессии генов, вовлеченных в процессы иммунологического ответа, синтеза белка, контроля клеточного цикла и апоптоза. Анализ белок-белковых взаимодействий с применением алгоритма STRING позволил выявить функциональные кластеры продуктов генов с разным уровнем их экспрессии.

Ключевые слова: рак легкого, транскриптом, микроматричный анализ, дифференциально экспрессирующиеся гены.

DOI: 10.31857/S0016675822070128

Рак легкого (РЛ) занимает лидирующие места по показателям заболеваемости и смертности населения от онкологических патологий во всем мире [1]. Ежегодно Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) регистрирует около 2.1 миллионов диагнозов и 1.75 миллионов летальных исходов. Выявление на поздних стадиях, активное метастазирование, многообразие гистологических форм — отличительная особенность данной патологии [2]. Курение, действие канцерогенов окружающей или производственной среды рассматривается в качестве ведущих факторов риска РЛ [3]. Действие полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), тяжелых металлов, ионизирующего излучения индуцирует окислительный стресс, приводящий к накоплению повреждений ДНК [4, 5] и росту заболеваемости.

Развитие постгеномных технологий ускорило возможности поиска новых биологических маркеров. Секвенирование РНК и микроматричный

анализ относятся к основным подходам для изучения экспрессии генов (и их продуктов), вовлеченных во множественные сигнальные пути. Предполагают, что секвенирование РНК позволяет выявить потенциальные генетические маркеры развития РЛ [6]. Технология микроматричного анализа SurePrint G3 Human Gene Expression недавно использовалась для изучения иммунного микроокружения немелкоклеточного РЛ и поиска новых молекулярных детерминант мелкоклеточного РЛ [7, 8]. Данная технология позволяет описать паттерны экспрессии, ассоциированные с опухолеобразованием для наилучшего понимания клеточных процессов, связанных с РЛ.

Аннотация транскриптома напрямую связана с использованием крупных репозиторий. К ним относятся Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) и Reactome. База данных GO представляет собой биоинформатический ресурс, который позволяет проводить анализ различных групп генов и их продуктов. В настоящее время были разработаны программы для работы с данными GO [9]. База данных GO

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675822070128 для авторизованных пользователей.

является ключевым ресурсом для исследований функциональной геномики при интерпретации результатов секвенирования РНК [10]. KEGG содержит данные о метаболизме, а также о геномных и протеомных последовательностях. Данный ресурс был эффективно использован в исследовании вклада экзосомальных РНК в развитие аденокарциномы легкого [11]. Reactome содержит информацию о важных биологических сигнальных путях у различных организмов, включая человека. Методы машинного обучения с использованием информации о генах, полученной в Reactome, позволили выявить новые молекулярные маркеры мелкоклеточного РЛ [12]. Таким образом, использование ресурсов нескольких биоинформатических баз данных способно дать ценную информацию и наиболее полно охарактеризовать результаты транскриптомных исследований.

Цель данного исследования – микроматричный анализ транскриптома мононуклеаров периферической крови у больных РЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Данное исследование было выполнено в лаборатории цитогенетики Кемеровского государственного университета (Кемерово, Россия) и в Томском национальном исследовательском медицинском центре (Томск, Россия). Материалом послужили образцы периферической крови пациентов Кемеровского областного онкологического диспансера, которые впервые обратились для постановки диагноза и лечения (диагноз выставлялся позднее после всех видов инструментальных обследований специалистами диспансера). Сбор материала был проведен в период январь–сентябрь 2019 г. (до начала пандемии covid-19). В качестве группы сравнения использовались образцы крови здоровых мужчин близкого возраста, проживающих в той же местности, работников Кемеровского государственного университета. Забор крови производился в стерильные вакутейнеры с ЭДТА в асептических условиях. Образцы немедленно доставлялись в лабораторию, где проводили выделение мононуклеаров крови (в градиенте плотности фикола) и выделение РНК. Все участники эксперимента (семь больных мелкоклеточным РЛ и восемь здоровых мужчин, жители Кемеровской обл., средний возраст 59 лет) были осведомлены о цели, методах исследования и оформляли информированное согласие.

Выделение РНК и пробоподготовка

Стабилизацию РНК в образцах проводили с помощью RNeasy/RNASTabilization Reagent (Qiagen, Германия). Выделение тотальной РНК из мононуклеаров периферической крови выпол-

няли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Для очистки РНК использовался коммерчески доступный набор “RNeasy Mini Kit” (Qiagen, Германия). Концентрация РНК и показатели стабильности РНК (RIN-values) верифицировалась с применением электрофоретической системы “Agilent 2100 Bioanalyzer” (Agilent Technologies, США). Реагент “RNA Spike-In” добавлялся для калибровки РНК. РНК далее транскрибировалась в кДНК с использованием набора “T7 Primer Mix” (Merck, Германия). Далее “Transcription Master Mix” использовался для транскрибирования кДНК в копии молекул кРНК.

Определение генной экспрессии

В данном исследовании экспрессия генов была изучена с помощью “SurePrint G3 Human Gene Expression 8 × 60K Microarray Kit” (Agilent Technologies, США). Микрочип содержит пробы для 26803 уникальных генов и 30606 длинных некодирующих РНК. Количественный анализ экспрессии выполнялся согласно протоколу производителя (One-color microarray-based gene expression analysis, v. 6.9.1, Agilent Technologies, США). Микрочипы были просканированы с использованием “SureScan Microarray Scanner” (Agilent Technologies, США). Программное обеспечение “Feature Extraction v. 12.0” (Agilent Technologies, США) использовалось для оценки интенсивности флуоресцентного сигнала.

Процессинг полученных данных и статистический анализ

Ресурсы Gene Ontology, KEGG и Reactome использовались для аннотации результатов транскриптомного анализа. Функциональный анализ обогащения выполнялся с помощью функций программы WebGestalt. Алгоритм STRING использовался для оценки белок-белковых взаимодействий продуктов дифференциально экспрессирующихся генов. Достоверный уровень белок-белковых взаимодействий принимался при условии коэффициента $score > 0.4$. Поправка FDR на множественные сравнения использовалась для установления значимости различий в экспрессии генов между двумя группами сравнения. В качестве пороговых значений были использованы $p < 0.05$ и отличия в экспрессии между группами более чем в 1.5 раза ($lgFC > |0.6|$) и более чем в 2 раза ($lgFC > |1.0|$). Выбор данных значений обусловлен тем, что наиболее часто используемым порогом отличий между группами образцов по уровням экспрессии генов являются отличия в 2 и более раз [13]. Более мягкий порог отличий в 1.5 раза используется для исследований, направленных на анализ обогащения отдельных функциональных

Таблица 1. Число дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) у больных раком легкого

		Гены с повышенной экспрессией	Гены со сниженной экспрессией	Все ДЭГ
LgFC > 0.6	Число проб на чипе	108	180	288
	Число уникальных транскриптов	108	180	288
	Число уникальных генов (Entrez)	87	175	262
LgFC > 1.0	Число проб на чипе	10	35	45
	Число уникальных транскриптов	10	35	45
	Число уникальных генов (Entrez)	9	50	59

Примечание. lgFC – \lg_2 -трансформированные значения кратности различий экспрессии генов между группами.

групп среди дифференциально экспрессирующихся генов [14, 15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате транскриптомного анализа было установлено, что больные РЛ и здоровые индивиды отличаются между собой по экспрессии большого числа генов (108 генов с повышенной и 180 с пониженной экспрессией). Несмотря на то, что при использовании поправки на множественность сравнений Бенджамини–Хохберга (false discovery rate – FDR) между группами индивидов не было обнаружено статистически значимых дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), возможно провести анализ наборов генов с наибольшими отличиями в экспрессии между группами. В опытной группе было выявлено повышение экспрессии более чем в 1.5 раза для 108 проб на микрочипе, а также снижение экспрессии более чем в 1.5 раза для 180 проб на микрочипе (табл. 1). Часть проб на микрочипе относится к различным некодирующим транскриптам, гипотетическим транскриптам, транскриптам псевдогенов и другим слабо аннотированным частям генома. Поэтому для дальнейшего анализа использовалась только информация, полученная с проб для транскриптов известных генов человека (на основе базы данных Entrez Gene – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Число таких ДЭГ с повышенной экспрессией в опытной группе составило 87 (более чем в 1.5 раза) и девять генов (более чем в 2 раза). Сниженную экспрессию в опытной группе демонстрировали 175 и 50 генов (более чем в 1.5 и 2 раза соответственно) (табл. 1).

Функциональный анализ экспрессии генов

Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов с использованием баз данных Gene Ontology (GO) указало на обогащение групп генов, вовлеченных в процессы иммунологического ответа, синтеза белка и контроля клеточного цикла. У пациентов с РЛ было отме-

чено понижение экспрессии генов врожденного и специфического иммунного ответа. Среди генов с пониженной экспрессией (в 61 раз) выявлены гены, кодирующие компоненты телец Кахала (GO:1904869: *CCT6A*, *TCP1*, *DKC1*), факторы инициации синтеза белка и транспорта молекул к эндоплазматическому ретикулуму (GO:0006614, GO:0006613, GO:0045047, GO:0072599, GO:0006413, GO:0070972) имели наибольшую степень обогащения в группе пациентов. Транскрипты с повышенной экспрессией были представлены факторами иммунного ответа (GO:0006955), хемокиновыми рецепторами, специфическими киназами и другими сигнальными молекулами, связанными с реакциями иммунитета. Исходя из полученных результатов, было также отмечено, что в группе больных РЛ факторы апоптоза характеризуются повышенным уровнем синтеза (GO:0042981). Гены, которые имели как повышенную, так и пониженную экспрессию, были задействованы в регуляции клеточного цикла и иммунологическом ответе (GO:0001775; GO:0006955).

Функциональный анализ на основе данных KEGG позволил определить понижение в группе больных РЛ экспрессии факторов, которые были ассоциированы с иммунологическим ответом, функциональной активностью фагосом и рибосом, а также дифференциацией остеокластов. Наибольшим уровнем обогащения характеризовались факторы резистентности к туберкулезу. Повышенная экспрессия была характерна для факторов, связанных с развитием острых иммунных заболеваний. Центральная роль была определена для компонентов сигнального пути Т-клеточных рецепторов (hsa04660). Компоненты, задействованные в иммунологическом ответе и синтезе белка, были также определены как низко экспрессирующиеся в результате функционального анализа с использованием базы данных Reactome. Данные гены кодируют факторы, которые задействованы во всех этапах синтеза белка, формировании рибосомального комплекса, а также активации компонентов иммунитета. В отличие от баз данных

GO и KEGG группы генов с повышенной экспрессией не были обнаружены в ходе анализа.

Белок-белковые взаимодействия

Группы дифференциально экспрессирующихся генов были проанализированы с помощью алгоритма STRING и репозитория GO [16]. Были построены сети, отражающие особенности взаимодействий между продуктами этих генов. Сильный и значимый уровень взаимодействий был определен при значении показателя score parameter > 0.4. В ходе анализа были идентифицированы кластеры генов с разным уровнем экспрессии. Используя ресурсы GO было установлено, что гены с пониженной экспрессией были представлены факторами синтеза белка (GO:0006412), иммунологического ответа (GO:0006955), регуляции клеточного цикла (GO:0051726) и клеточной смерти (апоптоза) (GO:0008219) (рис. 1). Функциональные кластеры продуктов генов с повышенной экспрессией были также задействованы в иммунологических реакциях (GO:0002376), локализации молекул в клетке (GO:0032879) и ответа клеток на стимулы (GO:0048583) (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

На основе проведенного транскриптомного анализа впервые в России были установлены изменения паттернов генной экспрессии в мононуклеарах периферической крови у больных РЛ. Группа генов иммунного ответа была определена как наиболее обогащенная среди ДЭГ. Рецептор к интерлейкину-6 *IL6R* (1q21.3) является компонентом сигнального пути IL-6/IL6R, который вносит существенный вклад в опухолеобразование. Особенности экспрессии данного цитокинового рецептора рассматриваются в контексте развития некоторых гистопатологических типов РЛ [22]. Экспрессия данного фактора негативно коррелирует с показателями выживаемости при развитии аденокарциномы легкого и положительно при плоскоклеточном раке. Хемокины, продуцируемые макрофагами, выполняют роль регуляторов реакций врожденного иммунитета. Ген *CXCL8* (14q13.3) кодирует цитокин ИЛ-8, участвующий в активации Т-лимфоцитов. У лабораторных мышей (линия Lewis) был отмечен противораковый эффект ингибирования *CXCL8-CXCR1/2* [23]. Однако повышение экспрессии *CXCL8* вносит вклад в повышение показателей выживаемости. Рецептор *CSAR1* г (CD88) (19q13.32) участвует в развитии провоспалительных реакций и их контроле. Повышение экспрессии мРНК *CSAR1* может быть ассоциировано с развитием метастаз при тяжелом течении немелкоклеточного РЛ [24]. Рецепторы семейства G-белков вовлечены в процессы развития врожденного и специфического иммунитета. Один из них

кодируется геном *GPER* (7p22.3), имеет способность к связыванию с эстрадиолом и может способствовать проявлению гормональных эффектов. Данный фактор имеет повышенную экспрессию в составе тканей легочных неоплазм. Роль *GPER* в развитии и РЛ может быть главным образом связана с регуляцией NOTCH1 [25].

Цитоплазматический белок NLRP12 (19q13.42) участвует в активации провоспалительных факторов. Уровень мРНК в легких лабораторных мышей может подавляться при воздействии взвешенных твердых частиц (PM_{2.5}) [26]. Белки, связанные с аденилатциклазой (CAP's), задействованы в циклическим сигнальном пути АМФ и в контроле иммунных реакций. При использовании клеточных линий РЛ обнаружили повышение экспрессии гена *CAP1* при развитии немелкоклеточного РЛ, что способствует усилению клеточной пролиферации. Повышенная экспрессия *CAP1* также может быть связана с развитием метастазов [27, 28].

Гены рибосомальных белков относятся к числу "генов домашнего хозяйства". В ходе данного исследования было выявлено изменение уровня их экспрессии в мононуклеарах периферической крови у больных РЛ. Фактор инициации синтеза белка *EIFA42* (3q27.3) обеспечивает присоединение мРНК к рибосомальному комплексу и является высококонсервативным геном. Влияние его экспрессии было определено для особенностей разных гистопатологических типов РЛ и определенной степени прогрессии опухолеобразования [29]. Отмечено, что потеря экспрессии *EIFA42* снижает выживаемость у пациентов с немелкоклеточным РЛ. Рибосомальный белок *RPL4* (15q22.31) выполняет важную функцию при развитии клеточного роста и пролиферации через участие в MDM-p53 [30]. Рибосомальный белок *RPL4* (15q22.31) выполняет важные функции при реализации сигнального пути RPL23-MDM-p53, обладающего противораковым потенциалом [31]. Фактор *eIF3a* (10q26.11) работает в составе мультипротеинового комплекса при инициации трансляции. Его экспрессия может быть связана с резистентностью к химиотерапии на основе платины при лечении РЛ [32]. Аналогичные особенности были отмечены при исследовании циркулирующих молекул РНК, ассоциированных с *eIF3a* [33].

Факторы, регулирующие клеточный цикл и апоптоз, играют важнейшую роль в инициации канцерогенеза. Некоторые из них были также идентифицированы в ходе транскриптомного анализа. *LRRK2* (12q12), относящийся к ферментам-киназам, имеет сильную ассоциацию с развитием нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваний, включая болезни Паркинсона и Крона. Однако последние исследования выявили ассоциацию гена *LRRK2* с РЛ [34]. Пациенты с низкой экспрессией фактора *LRRK2* имели сниженные

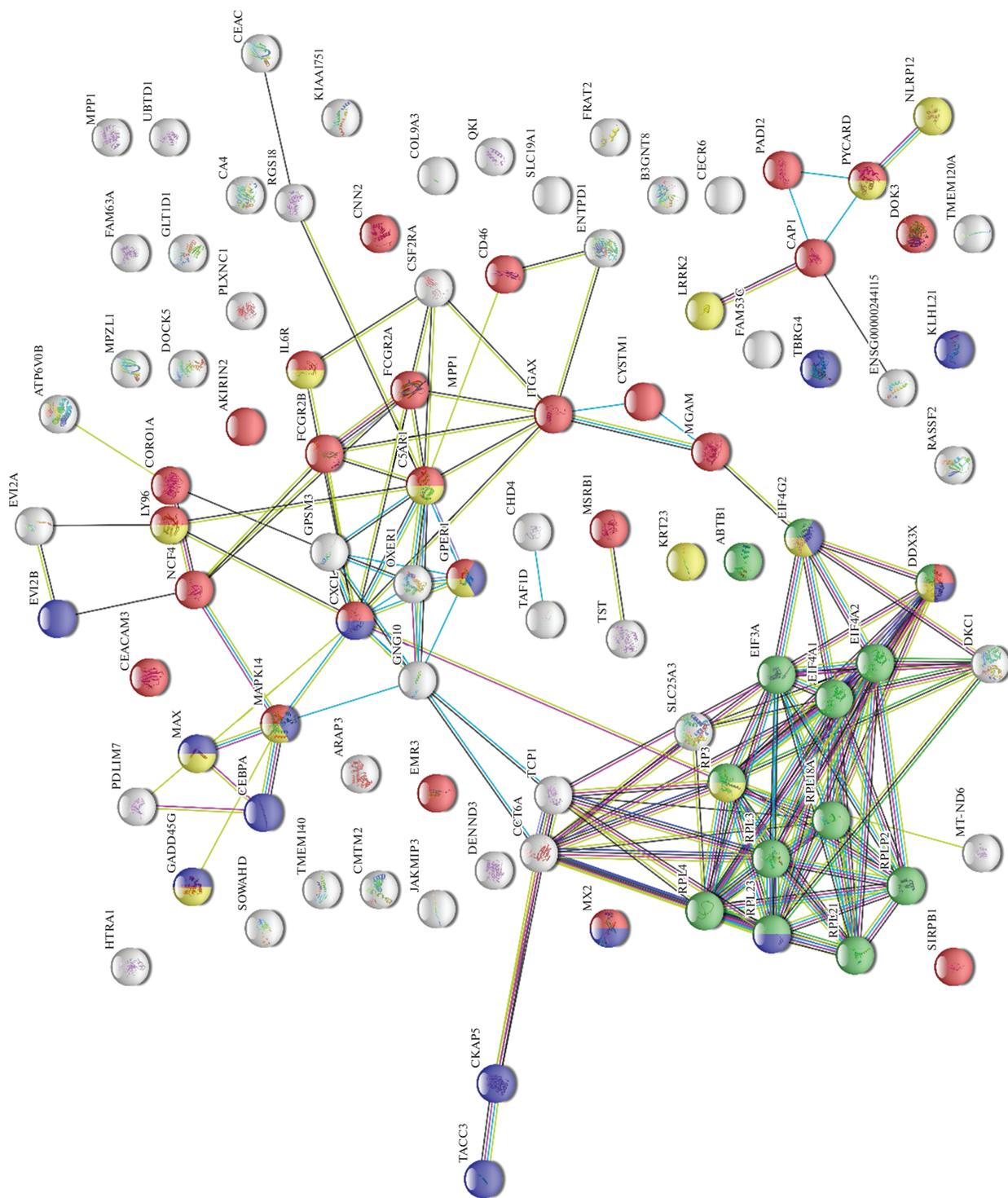


Рис. 1. Анализ взаимодействия продуктов генов со сниженной экспрессией у больных раком легкого с помощью инструмента STRING (string-db.org) (score > 0.4).

Транскрипционный фактор MAX (14q23.3) также может рассматриваться в качестве важного регулятора клеточного цикла. Уровень синтеза его мРНК (наряду с факторами MTURN и HLA-B) был определен как повышенный в составе тромбоцитов на ранних стадиях развития РЛ [36]. GADD45-подобные белки имеют множественную функциональную активность и участвуют во многих процессах (репарация ДНК, старение и генотоксический стресс), влияющих на онкогенез [37]. Данное суперсемейство включает GADD45G (9q22.2), который также проявляет множественную активность.

С применением ресурса STRING в ходе исследования были получены данные о взаимодействиях продуктов ДЭГ. В данном исследовании была построена белковая сеть из факторов с низким и повышенным уровнем синтеза. Был идентифицирован кластер, состоящий из факторов синтеза белка (RPL4, RPL23, PL21, RPLP2, EIF3A, EIF4A1, EIF4A2). Эти белки имели связь с факторами SLC25A3 и DOX3X, ассоциированными с такими важными процессами как митохондриальный транспорт и контроль клеточных сигнальных путей. Кластер факторов иммунологического ответа и клеточного апоптоза включал в себя: CXCL, GPSM3, FCGR2B, IL6R, GNG10, CXER1, GPER1, C5AR1, FCGR2A, C5F2RA, ITGAX, а также белки CAP1, PADI2, PYCARD, NLRP12. Белки GADD45G, СЕВРА, MAX, MAPK14, PDLM7 составили кластер клеточного цикла и апоптоза.

Результаты экспериментальных исследований профилей экспрессии генов при РЛ весьма разнообразны и представлены в таких базах как Gene Expression Omnibus (GEO), Genotype-Tissue Expression (GTEx) project, the Cancer Genome Atlas (TCGA), A molecular cell atlas of the human lung from single cell RNA sequencing и других. Так, был охарактеризован транскриптом опухолевых и нормальных тканей легкого [38]. С использованием TWAS-подхода (transcriptome-wide association study), объединившего результаты GWAS (genome-wide association studies) и eQTL (expression quantitative trait loci), выявлены гены: *IREB2* и *AQP3*, изменение экспрессии которых значительно увеличивает риск РЛ [39]. Китайскими авторами недавно были описаны пять новых генов (*DCAF16*, *CBL*, *ATR*, *GYPE* и *PARD3*), которые были значительно ассоциированы с риском РЛ в различных моделях (cross-tissue и lung tissue models) [40]. Fanlu Meng с коллегами, выполнили мета-анализ результатов изучения экспрессии генов, основываясь на данных, размещенных в базе GEO, результатах функционального анализа обогащения (на основе данных KEGG и GO), изучения белок-белковых взаимодействий и анализа связывания транскрипционных факторов при аденокарциноме легкого [41]. Было выявлено повышение экспрессии 207 и снижение экспрессии 367 генов в

опухолевых тканях легкого. Дальнейший анализ позволил выявить ряд таргетных генов, таких как *AURKA*, *CCNB1*, *KIF11*, *CCNA2*, *TOP2A*, *CENPF*, *KIF2C*, *TPX2*, *HMMR*, *MAD2L1* и генов транскрипционных факторов (*SPI1*, *CTNNB1*, *MYC*, *СЕВРА* и *NFKB1*), оказывающих наиболее значимое влияние на патогенез РЛ. Они вовлечены в управление такими биологическими процессами как пролиферация, иммунный ответ, миграция лейкоцитов, клеточная адгезия, ангиогенез функционирование микротрубочек, контроль топологии ДНК, клональный рост клеток, дифференцировка и апоптоз.

У пациентов с аденокарциномой легкого также проводилось секвенирование РНК одиночных клеток с помощью HiSeq 4000 (Illumina, San Diego, California, USA) для оценки клеточных популяций в составе микроокружения опухоли [42]. Было обнаружено, что гетерогенный клеточный состав микроокружения опухоли был ассоциирован со степенью дифференцировки клеток карциномы. Были выявлены два различных паттерна микроокружения опухоли (СР²Е и N³МС), отличающихся по составу клеток и прогнозу. Таким образом, профилирование РНК одиночных клеток предоставляет дополнительную прогностическую информацию, основанную на микроокружении, что может помочь предсказать ответ на терапию и выявить возможные популяции клеток-мишеней [42].

Полномасштабный анализ транскриптома цельной крови ранее выполнялся с помощью чипов WG6 (Illumina), которые сканировались на Illumina BeadStation 500× [43]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что профили экспрессии генов РНК-стабилизированных образцов цельной крови (использовались пробирки PAXgene) могут быть использованы для детекции рака легкого у курильщиков. Перечень генов, использовавшихся для построения классификации был обогащен генами, контролирующими иммунный ответ. Авторы постулируют, что классификатор основан на транскрипции генов, контролирующих иммунный ответ именно в клетках крови, а не под влиянием транскриптов редких опухолевых клеток, иногда обнаруживаемых в крови раковых пациентов (хотя эту возможность нельзя исключать) [43].

М. Rotunno с соавт. выполняли анализ транскриптома крови у больных раком легкого с помощью чипов Affymetrix GeneChip® HG-U133A v2.0 [44]. Авторы сфокусировались на анализе случаев больных аденокарциномой легкого на первой стадии и выявили гены, экспрессия которых в клетках крови статистически значительно отличается от здоровых индивидов. Было описано восемь ключевых генов (*RUNX3*, *TGFBR3*, *TRGC2*, *TRGV9*, *TARP*, *ACPI*, *VCAN* и *TSTA3*), вовлеченных в регуляцию процессов репарации ДНК,

пролиферации, миграции, адгезии клеток, ангиогенеза и функционирования иммунной системы. Интересно то, что данные особенности были описаны у пациентов с I-ой стадией развития РЛ. Поэтому, по мнению авторов, особенности экспрессии данных генов в клетках крови (при условии верификации) могут оказаться полезны в качестве ранних маркеров риска рака легкого [44].

Отдельные типы клеток крови, например мононуклеары широко используются для исследования патологий, связанных со злокачественной трансформацией. Например, линия таких клеток использовалась для поиска потенциальных биомаркеров гепатоцеллюлярного рака [45]. В настоящем исследовании впервые с помощью чипа SurePrint G3 Human Gene Expression (Agilent Technologies) было выполнено изучение транскриптома мононуклеаров крови у пациентов с РЛ и выявлено обогащение групп генов, вовлеченных в процессы иммунного ответа, синтеза белка и пролиферации. Это согласуется с выводами работ, выполненных ранее непосредственно на опухолевых клетках тканей легкого [46, 47], клетках эпителия дыхательных путей [48] и клетках цельной крови пациентов с РЛ [43, 44].

Масштабные изменения, которые наблюдаются в мононуклеарах крови, отражают глобальные перестройки экспрессии генов, происходящие в организме при формировании солидных опухолей. Результаты проведенных исследований указывают на то, что профиль экспрессии генов в клетках крови можно рассматривать как промежуточный молекулярный фенотип между генотипом и фенотипом пациента [48], потенциально значимый в качестве биомаркера РЛ. Безусловно полученные результаты нуждаются в верификации другими методами (например количественной ПЦР) на больших по объему выборках. Однако полученные данные могут быть полезны для выбора направлений будущих исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием технологии микроматричного анализа транскриптома и биоинформатического анализа была изучена экспрессия генов в мононуклеарах периферической крови больных РЛ и здоровых доноров. В опытной группе была изменена экспрессия генов иммунного ответа и генов, продукты которых участвуют в регуляции клеточного цикла. На фоне подобных изменений возможно накопление большого количества повреждений ДНК в клетках и инициация канцерогенеза. Кроме того, нарушенные реакции иммунного ответа могут способствовать прогрессированию злокачественной трансформации в тканях. Предстоит оценить перспективность применения выявленных молекулярных сигнатур в системе ранней диагностики и профилактики РЛ.

Исследование поддержано грантом РФФ № 18-14-00022.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray F, Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA: A Cancer J. for Clinicians*. 2018. V. 68. № 6. P. 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Zappa C., Mousa S.A. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances // *Translational Lung Cancer Res*. 2016. V. 5. № 3. P. 288–300. <https://doi.org/10.21037/tclr.2016.06.07>
3. Yang X., Man J., Chen H. et al. Temporal trends of the lung cancer mortality attributable to smoking from 1990 to 2017: A global, regional and national analysis // *Lung Cancer*. 2021. V. 152. P. 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.12.007>
4. Moorthy B., Chu C., Carlin D.J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer // *Toxicol Sci*. 2015. V. 145. № 1. P. 5–15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv040>
5. Ewa B., Danuta M.-Š. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts // *J. Applied Genetics*. 2017. V. 58. № 3. P. 321–330. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>
6. Han S.-S., Kim W.J., Hong Y. et al. RNA sequencing identifies novel markers of non-small cell lung cancer // *Lung Cancer*. 2014. V. 84. № 3. P. 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.03.018>
7. Öjlert Å.K., Halvorsen A.R., Nebdal D. et al. The immune microenvironment in non-small cell lung cancer is predictive of prognosis after surgery // *Mol. Oncology*. 2019. V. 13. № 5. P. 1166–1179. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12475>
8. Misono S., Mizuno K., Suetsugu T. et al. Molecular signature of small cell lung cancer after treatment failure: The MCM complex as therapeutic target // *Cancers*. 2021. V. 13. № 6. P. 187–203. <https://doi.org/10.3390/cancers13061187>
9. Pomaznoy M., Ha B., Peters B. GOnet: A tool for interactive gene ontology analysis // *BMC Bioinformatics*. 2019. V. 19. № 1. P. 470–478. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2533-3>
10. Zhu J., Zhao Q., Katsevich E., Sabatti C. Exploratory gene ontology analysis with interactive visualization // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. № 1. P. 7793–7801. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42178-x>
11. Liu X.-Q., Tufman A., Kiefl R. et al. Identification of lung adenocarcinoma-specific exosome RNAs in peripheral blood by RNA-Seq analysis // *European Re-*

- view for Med. and Pharmacol. Sci. 2020. V. 24. № 4. P. 1877–1886.
https://doi.org/10.26355/eurrev_202002_20366
12. *Juarez-Flores A., Zamudio G.S., José M.V.* Novel gene signatures for stage classification of the squamous cell carcinoma of the lung // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 4835–4845.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83668-1>
 13. *Gov E., Arga K.Y.* Differential co-expression analysis reveals a novel prognostic gene module in ovarian cancer // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 4996.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05298-w>
 14. *Fajarda O., Duarte-Pereira S., Silva R.M., Oliveira J.L.* Merging microarray studies to identify a common gene expression signature to several structural heart diseases // *BioData Min.* 2020. V. 13. № 8.
<https://doi.org/10.1186/s13040-020-00217-8>
 15. *Yosef N., Shalek A.K., Gaublotme J.T. et al.* Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation // *Nature.* 2013. V. 496. № 7446. P. 461–468.
<https://doi.org/10.1038/nature11981>
 16. *Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D. et al.* STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets // *Nucl. Ac. Res.* 2019. V. 47. № 1. P. 607–613.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
 17. *Chae Y.K., Arya A., Iams W. et al.* Immune checkpoint pathways in non-small cell lung cancer // *Ann. of Translational Med.* 2018. V. 6. № 5. P. 88–108.
<https://doi.org/10.21037/atm.2017.09.30>
 18. *Seidel J.A., Otsuka A., Kabashima K.* Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations // *Frontiers in Oncology.* 2018. V. 8. P. 86–100.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00086>
 19. *Paz-Elizur T., Leitner-Dagan Y., Meyer K.B. et al.* DNA repair biomarker for lung cancer risk and its correlation with airway cells gene expression // *JNCI Cancer Spectrum.* 2020. V. 4. № 1. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1093/jncics/pkz067>
 20. *Nan Y.-L., Hu Y.-L., Liu Z.-K. et al.* Relationships between cell cycle pathway gene polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma // *World J. of Gastroenterology.* 2016. V. 22. № 24. P. 5558–5567.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i24.5558>
 21. *McKay J.D., Hung R.J., Han Y. et al.* Large-scale association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci and heterogeneity in genetic susceptibility across histological subtypes // *Nature Genetics.* 2017. V. 49. № 7. P. 1126–1132.
<https://doi.org/10.1038/ng.3892>
 22. *Xu B., Chen Q., Yue C. et al.* Prognostic value of IL6R mRNA in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma // *Oncology Letters.* 2018. V. 16. № 3. P. 2935–2948.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.9044>
 23. *Hsu S.-Y., Yu H.-Y., Lee W.-C. et al.* A novel CXCL8 analog is effective in inhibiting the growth via cell cycle arrest and attenuating invasion of lewis lung carcinoma // *OncoTargets and Therapy.* 2019. V. 12. P. 7611–7621.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S215824>
 24. *Ajona D., Zanduetta C., Corrales L. et al.* Blockade of the complement C5a/C5aR1 axis impairs lung cancer bone metastasis by CXCL16-mediated effects // *Am. J. of Respiratory and Critical Care Med.* 2018. V. 197. № 9. P. 1164–1176.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201703-0660OC>
 25. *Shen Y., Li C., Zhou L., Huang J.* G protein-coupled oestrogen receptor promotes cell growth of non-small cell lung cancer cells via YAP1/QKI/circNOTCH1/m6A methylated NOTCH1 signalling // *J. Cellular and Molecular Medicine.* 2021. V. 25. № 1. P. 284–296.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.15997>
 26. *Jin Y., Wu W., Zhang W. et al.* Involvement of EGF receptor signaling and NLRP12 inflammasome in fine particulate matter-induced lung inflammation in mice: EGFR and NLRP12 Involved in PM_{2.5}-induced lung inflammation in mice // *Environmental Toxicology.* 2017. V. 32. № 4. P. 1121–1134.
<https://doi.org/10.1002/tox.22308>
 27. *Tan M., Song X., Zhang G. et al.* Overexpression of adenylate cyclase-associated protein 1 is associated with metastasis of lung cancer // *Oncol. Reports.* 2013. V. 30. № 4. P. 1639–1644.
<https://doi.org/10.3892/or.2013.2607>
 28. *Kolegova E.S., Kakurina G.V., Kondakova I.V. et al.* Adenylate cyclase-associated protein 1 and cofilin in progression of non-small cell lung cancer // *Bull. of Exp. Biol. and Med.* 2019. V. 167. № 3. P. 393–395.
<https://doi.org/10.1007/s10517-019-04534-9>
 29. *Shaoyan X., Juanjuan Y., Yalan T. et al.* Downregulation of EIF4A2 in non-small-cell lung cancer associates with poor prognosis // *Clin. Lung Cancer.* 2013. V. 14. № 6. P. 658–665.
<https://doi.org/10.1016/j.clcc.2013.04.011>
 30. *He X., Li Y., Dai M.-S., Sun X.-X.* Ribosomal protein L4 is a novel regulator of the MDM2-p53 loop // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 13. P. 16217–16226.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7479>
 31. *Wang J., Zhang Z., Li F. et al.* Triptolide interrupts rRNA synthesis and induces the RPL23-MDM2-p53 pathway to repress lung cancer cells // *Oncol. Reports.* 2020. V. 43. № 6. P. 1863–1874.
<https://doi.org/10.3892/or.2020.7569>
 32. *Yin J.-Y., Shen J., Dong Z.-Z. et al.* Effect of eIF3a on response of lung cancer patients to platinum-based chemotherapy by regulating DNA repair // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 13. P. 4600–4609.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2591>
 33. *Huang M., Yuan F., Gao Y. et al.* Circular RNA screening from EIF3a in lung cancer // *Cancer Med.* 2019. V. 8. № 9. P. 4159–4168.
<https://doi.org/10.1002/cam4.2338>
 34. *Lebovitz C., Wretham N., Osooly M. et al.* Loss of Parkinson's susceptibility gene LRRK2 promotes carcinogen-induced lung tumorigenesis // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 2097–3011.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-81639-0>
 35. *Sato A., Yamada N., Ogawa Y., Ikegami M.* CCAAT/enhancer-binding protein- α suppresses lung tumor development in mice through the p38 α MAP kinase pathway // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. e57013–e57022.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057013>
 36. *Liu L., Song X., Li X. et al.* A three-platelet mRNA set: MAX, MTURN and HLA-B as biomarker for lung cancer // *J. of Cancer Res. and Clin. Oncol.* 2019. V. 145. № 11. P. 2713–2723.
<https://doi.org/10.1007/s00432-019-03032-9>
 37. *Tamura R.E., de Vasconcellos J.F., Sarkar D. et al.* GADD45 proteins: Central players in tumorigenesis // *Curr. Mol. Med.* 2012. V. 12. № 5. P. 634–651.
<https://doi.org/10.2174/156652412800619978>

38. *Bang M.S., Kang K., Lee J. et al.* Transcriptome analysis of non-small cell lung cancer and genetically matched adjacent normal tissues identifies novel prognostic marker genes // *Genes & Genomics*. 2017. V. 39. № 3. P. 277–284.
https://doi.org/10.1007/s13258-016-0492-5
39. *Bossé Y., Li Z., Xia J. et al.* Transcriptome-wide association study reveals candidate causal genes for lung cancer // *Int. J. Cancer*. 2020. V. 146. № 7. P. 1862–1878.
https://doi.org/10.1002/ijc.32771
40. *Zhu M., Fan J., Zhang C. et al.* A cross-tissue transcriptome-wide association study identifies novel susceptibility genes for lung cancer in Chinese populations // *Hum. Mol. Genet.* 2021. V. 30. № 17. P. 1666–1676.
https://doi.org/10.1093/hmg/ddab119
41. *Meng F., Zhang L., Ren Y., Ma Q.* Transcriptome analysis reveals key signature genes involved in the oncogenesis of lung cancer // *Cancer Biomark.* 2020. V. 29. № 4. P. 475–482.
https://doi.org/10.3233/CBM-200110
42. *Bischoff P., Trinks A., Obermayer B. et al.* Single-cell RNA sequencing reveals distinct tumor microenvironmental patterns in lung adenocarcinoma // *Oncogene*. 2020. V. 40(50). P. 6748–6798.
https://doi.org/10.1038/s41388-021-02054-3
43. *Zander T., Hofmann A., Staratschek-Jox A. et al.* Blood-based gene expression signatures in non-small cell lung cancer // *Cancer Res.* 2011. V. 17. № 10. P. 3360–3367.
https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0533
44. *Rotunno M., Hu N., Su H.* A gene expression signature from peripheral whole blood for stage I lung adenocarcinoma // *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 2011. V. 4. № 10. P. 1599–1608.
https://doi.org/10.1158/1940-6207
45. *Kunadirek P., Ariyachet C., Sriphoosanap S. et al.* Identification of BHLHE40 expression in peripheral blood mononuclear cells as a novel biomarker for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 11201–11213.
https://doi.org/10.1038/s41598-021-90515-w
46. *Xiong Y., Feng Y., Qiao T., Han Y.* Identifying prognostic biomarkers of non-small cell lung cancer by transcriptome analysis // *Cancer Biomark.* 2020. V. 27. № 2. P. 243–250.
https://doi.org/10.3233/CBM-190222
47. *Billatos E., Vick J.L., Lenburg M.E., Spira A.E.* The airway transcriptome as a biomarker for early lung cancer detection // *Clin. Cancer Res.* 2018. V. 24. № 13. P. 2984–2992.
https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3187
48. *Lopatkina M.E., Lebedev I.N.* Transcriptome analysis as a tool for investigation of pathogenesis of chromosomal diseases // *Russian J. Genetics*. 2020. V. 56. Issue 5. P. 548–561.
https://doi.org/10.1134/S1022795420050099

Transcriptome Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Lung Cancer Patients

V. I. Minina^{a, b, *}, V. G. Druzhinin^a, A. V. Larionov^a, E. D. Baranova^a,
V. Yu. Buslaev^b, L. V. Matskova^c, and M. L. Bakanova^b

^a*Kemerovo State University, Kemerovo, 650065 Russia*

^b*Federal Research Center for Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, 650065 Russia*

^c*Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236000 Russia*

*e-mail: vminina@mail.ru

Lung cancer is the most common cancer in men worldwide. To search for new biological markers of this pathology using the SurePrint G3 Human Gene Expression microarray analysis technology, a transcript of blood mononuclear cells from patients and healthy donors (residents of the Kemerovo region, Russia) was examined. As a result, 288 differentially expressed genes were identified, 108 genes with increased and 180 with decreased expression were identified. A functional analysis of enrichment using the WebGestalt resource and various databases (Gene Ontology, KEGG, and Reactome) indicated changes in the expression of genes involved in the processes of immunological response, protein synthesis, cell cycle control, and apoptosis. Analysis of protein-protein interactions using the STRING algorithm made it possible to identify functional clusters of gene products with different levels of their expression.

Keywords: lung cancer, transcriptome, microarray analysis, differentially expressed genes.

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ
IL-17A G197A И IL-17F A7488G У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА
В ЗАПАДНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ**© 2022 г. М. А. Губина¹, *, И. Г. Соловьева², В. Н. Бабенко¹, А. В. Соколов³, Е. Ю. Губина⁴¹Федеральный исследовательский центр, Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения наук, Новосибирск, 630090 Россия²Новосибирский государственный педагогический университет, Новосибирск, 630126 Россия³Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, 630091 Россия⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: marina@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 30.11.2021 г.

После доработки 25.01.2022 г.

Принята к публикации 08.02.2022 г.

Проведен анализ частоты встречаемости аллелей генов IL-17A G197A и IL-17F A7488G у 150 человек больных раком желудка (РЖ) и у 103 здоровых. Частоты генотипов IL-17F A7488G у больных (AA – 68.6, AG – 25.3 и GG – 6%) не отличались значительно от таковых в контроле (AA – 77.7, AG – 22.3 и GG – 0.0%). Носители генотипа GG выявлены только у больных. Достоверных различий между больными и здоровыми не выявлено ($\chi^2 = 4.80, p < 0.09$). Частоты генотипов IL-17A G197A у больных (GG – 10.6, AG – 48.7 и AA – 40.7%) отличались от контроля (GG – 11.7, AG – 70.8 и AA – 17.5%). Распределение генотипов IL-17A G197A “случай–контроль” показало, что частота встречаемости AA-генотипа в выборке больных раком желудка в 2 раза выше, чем в выборке здоровых. Выявлены достоверные различия между больными и здоровыми ($\chi^2 = 15.79, p < 0.0003$). Обнаружены достоверные различия между больными и здоровыми женщинами как по IL-17A G197A ($\chi^2 = 16.18, p < 0.0003$), так и по IL-17F A7488G ($\chi^2 = 7.176, p < 0.027$). Между выборками мужчин достоверных различий не выявлено. Результаты наших исследований показали, что только A-аллель и AA-генотип гена IL-17A G197A достоверно чаще встречаются у больных раком желудка, чем у здоровых, что может быть маркером риска развития рака желудка у лиц, проживающих в Западно-Сибирском регионе. Выявлены гаплотипы, характерные только для больных РЖ, из них один (AAGG) обнаружен с одинаковой частотой как у мужчин, так и у женщин, а второй (AGGG) наиболее характерен для женщин.

Ключевые слова: гены, генотипы, рак желудка, аллели, IL-17A, IL-17F.**DOI:** 10.31857/S0016675822070062

Рак желудка (РЖ) является одной из наиболее распространенных локализаций рака, которая ассоциируется с высокими показателями смертности во всем мире [1, 2]. Хотя генетические факторы и факторы окружающей среды, помимо инфекций *Helicobacter pylori*, определены как важные для развития рака желудка [3–5], точная этиология заболевания остается неясной. Многочисленные исследования показали, что связанные с воспалением генные маркеры могут быть вовлечены в развитие РЖ, включая TNF α и гены интерлейкинов [6–8].

Цитокины регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференциацию, функциональную активность и апоптоз, а также обеспечивают согла-

сованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия [9]. Обнаружена группа противовоспалительных цитокинов IL-17: IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E и IL-17F [10]. IL-17A и IL-17F, которые индуцируют экспрессию многочисленных хемокинов и цитокинов, что важно в привлечении и активации нейтрофилов [11]. Полиморфизм семейства интерлейкинов IL-17 был исследован в отношении восприимчивости к различным заболеваниям. Наиболее полно изучены IL-17A G197A (rs2275913) и IL-17F A7488G (rs763780): промотор гена IL-17A (rs2275913 G/A полиморфизм) расположен в положении –197 от стартового кодона, полиморфизм rs763780 A/G в гене IL-17F вызывает замену His-to-Arg в 161-м положении (H161R). Получены данные о том, что указанный полиморфизм связан с риском разви-

Таблица 1. Частота встречаемости генотипов и аллелей (%) генов интерлейкинов IL-17A G197A и IL-17F A7488G у больных раком желудка и здоровых

Генотипы, аллели	Больные РЖ N = 150	Здоровые N = 103
IL-17A G197A		
GG	16 (10.6)	12 (11.7)
AG	73 (48.7)	73 (70.8)
AA	61 (40.7)	18 (17.5)
G	105 (35)	97 (47.1)
A	195 (65)	109 (52.9)
$\chi^2 = 15.79$		
$p < 0.0003$		
IL-17F A7488G		
AA	103 (68.6)	80 (77.7)
AG	38 (25.3)	23 (22.3)
GG	9 (6)	0 (0.0)
A	244 (81)	185 (88.8)
G	56 (19)	21 (11.2)
$\chi^2 = 4.80$		
$p < 0.09$		

тия ревматоидного артрита [12], болезни “трансплантат против хозяина” (GVHD) [13], язвенного колита [9] и РЖ [14–19].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 150 больных европеоидного происхождения (жители г. Новосибирска). Из них мужчин – 88 (59%), женщин – 41 (42%). Среди обследуемых пациентов I–II стадии РЖ диагностированы у 71 пациента, III и IV стадии – у 79 человек (TNM-классификация, 1987). Гистологический тип опухоли: у 64.1% больных – кишечный, у 35.9% – диффузный. Группу контроля составили 103 чело-

века (мужчин – 30%, женщин – 70%) европеоидного происхождения, жители г. Новосибирска. Возрастной состав в обеих группах от 20 до 70 лет.

Тотальную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракцией с использованием протеиназы К [20].

Генотипирование IL-17A G-197A (rs2275913) и IL-17F A7488G (rs763780) проведено с помощью полимеразной цепной реакции и рестрикционного анализа. Генотипирование проводили с помощью следующих праймеров:

IL-17A G197A 5'-AACAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT-3'
5'-CCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC-3';

IL-17F A7488G 5'-ACCAAGGCTGCTCTGTTTCT-3'
5'-GGTAAGGAGTGGCATTTCTA-3'.

Реакционная смесь для ПЦР общим объемом 25 мл содержала 100 нг геномной ДНК, 1.0 мМ каждого праймера, 200 мМ каждого dNTP, 2.0 мМ MgCl₂ и 1.0 мг TaqDNA-полимеразы. Продукты ПЦР расщепляли в течение ночи при 65°C с помощью BstENI для IL-17A G197A и 37°C с помощью FaeI для IL-17F A7488G и затем разделяли с помощью

электрофореза в 5%-ном полиакриламидном геле с окрашиванием бромистым этидием [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами проведен анализ частоты встречаемости IL-17A G197A и IL-17F A7488G у 150 больных РЖ

Таблица 2. Частота встречаемости генотипов и аллелей (%) генов интерлейкинов IL-17A G197A и IL-17F A7488G у больных раком желудка и здоровых в зависимости от пола

Генотипы, аллели	Больные РЖ		Здоровые	
	мужчины	женщины	мужчины	женщины
IL-17A G197A	1	2	3	4
GG	6 (6.9)	10 (15.8)	2 (6.5)	10 (13.9)
AG	46 (52)	27 (42.9)	20 (64.6)	53 (73.6)
AA	35 (40.2)	26 (42.9)	9 (29)	9 (12.5)
A	116 (66.7)	79 (62.7)	38 (61.3)	71 (49.3)
G	58 (33.3)	47 (37.3)	24 (38.7)	73 (50.7)
1–2	$\chi^2 = 3.52$	$p < 0.17$		
3–4	$\chi^2 = 4.67$	$p < 0.09$		
1–3	$\chi^2 = 1.329$	$p < 0.514$		
2–4	$\chi^2 = 16.179$	$p < 0.0003$		
IL-17F A7488G				
AA	64 (73.6)	39 (61.9)	22 (70.9)	59 (81.9)
AG	19 (25.4)	19 (30.6)	9 (29.1)	13 (18.1)
GG	4 (4.5)	5 (8.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
A	147 (84.5)	97 (76.9)	53 (85.5)	131 (90.9)
G	27 (15.5)	29 (23.1)	9 (14.5)	13 (9.1)
1–2	$\chi^2 = 2.40$	$p < 0.30$		
3–4	$\chi^2 = 1.910$	$p < 0.384$		
1–3	$\chi^2 = 0.588$	$p < 0.745$		
2–4	$\chi^2 = 7.176$	$p < 0.027$		

и 103 здоровых индивидуумов. Частоты полиморфизма приведены в табл. 1. В группе обследованных больных РЖ и в группе здоровых распределение генотипов для IL-17A G197A находится в равновесии Харди–Вайнберга ($p > 0.05$).

Частоты генотипов IL-17F A7488G у больных РЖ отличались от таковых в контроле (табл. 1). Носители генотипа GG встречаются только у больных РЖ. Носители аллеля G (AG или GG) у больных выявлены в 2 раза чаще, чем у здоровых. Распределение IL-17A G197A “случай–контроль” показало, что частота встречаемости AA-генотипа в выборке больных РЖ в 2 раза выше, чем в выборке здоровых ($\chi^2 = 15.79$, $p < 0.0003$). Частота аллеля A (AA или AG) также достоверно различалась между выборками РЖ и здоровых ($\chi^2 = 7.44$, $p < 0.006$) (табл. 1).

В табл. 2 приведены данные о полиморфизме генов IL-17A G197A и IL-17F A7488G в выборках больных РЖ и здоровых в зависимости от пола.

Исходя из данных табл. 2, мы видим, что генотип AA IL-17A G197A у больных РЖ встречается с одинаковой частотой как у мужчин, так и у женщин. В выборке здоровых индивидуумов этот генотип встречался в 2.5 раза чаще у мужчин, чем у женщин. Совсем другой результат мы наблюдаем для IL-17F A7488G. Генотип GG был выявлен только у больных РЖ, частота выше у женщин, чем у мужчин. При статистической обработке нами выявлены достоверные различия по генотипам IL-17A G197A ($\chi^2 = 16.18$, $p < 0.0003$) и по IL-17F A7488G ($\chi^2 = 7.176$, $p < 0.027$) только у женщин. В выборках мужчин достоверных различий по встречаемости генотипов генов интерлейкинов не выявлено (табл. 2). Достоверные статистиче-

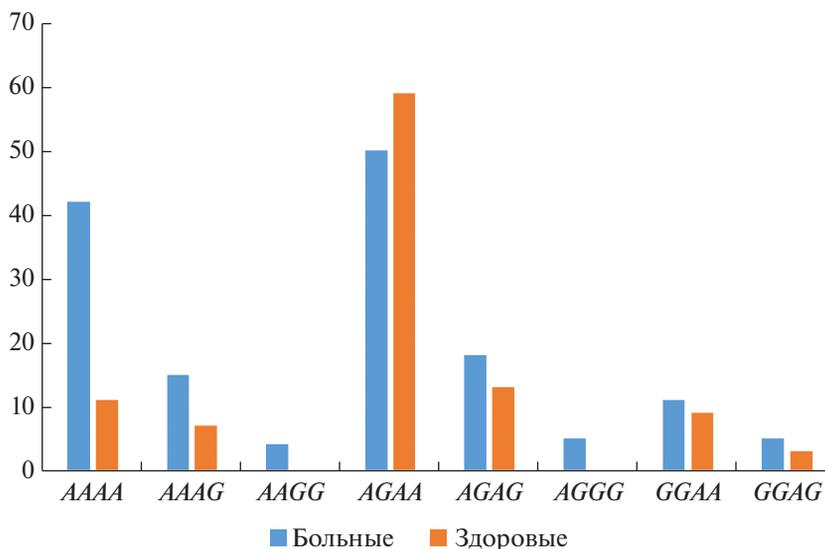


Рис. 1. Частота встречаемости гаплотипов у больных РЖ и здоровых.

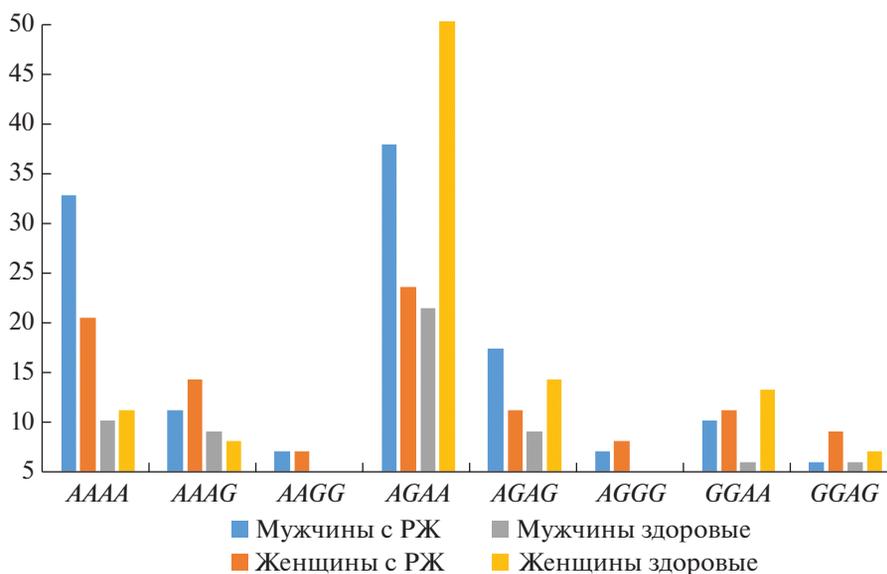


Рис. 2. Частота встречаемости гаплотипов у больных РЖ и здоровых мужчин и женщин.

ские различия между аллелями *A* и *G* IL-17A G197A ($\chi^2 = 4.88$, $p < 0.02$), а также *A* и *G* IL-17F A7488G ($\chi^2 = 10.009$, $p < 0.001$) выявлены между больными РЖ и здоровыми женщинами. У мужчин достоверные различия между аллелями *A* и *G* выявлены только по IL-17A G197A ($\chi^2 = 3.9005$, $p < 0.04$).

На рис. 1 представлена диаграмма гаплотипов у больных РЖ и здоровых. Из всех выявленных гаплотипов только один (AGAA) встречается чаще у здоровых, чем у больных. Два гаплотипа обнаружены только у больных РЖ, так как генотип GG IL-17F A7488G был выявлен только у больных

РЖ. На рис. 2 представлена диаграмма распределения гаплотипов у больных РЖ и здоровых мужчин и женщин. Обнаружено, что для больных РЖ женщин наиболее характерны гаплотипы AAAG и GGAG, а для мужчин AAAA и AGAG. Из двух выявленных гаплотипов у больных РЖ один гаплотип AAGG выявлен с одинаковой частотой как у мужчин, так и у женщин, а гаплотип AGGG наиболее характерен для женщин (рис. 2). Для здоровых наиболее характерны только два гаплотипа AGAA и GGAA и частота данных гаплотипов выше у женщин, чем у мужчин (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

РЖ является часто встречающимся злокачественным новообразованием. Патогенез данного заболевания связан с несколькими факторами: факторы окружающей среды, диета, генетические факторы, иммунные факторы. В ряде исследований получены данные о роли иммунных факторов и механизмов, регулирующих воспалительный ответ, в патогенезе РЖ. В последнее время больше внимания уделяется роли интерлейкина IL-17 в развитии злокачественных новообразований благодаря регулируемой транскрипции этого гена.

В настоящем исследовании нами получены данные о том, что только AA-генотип гена IL-17A G197A достоверно чаще встречается у больных РЖ, чем у здоровых.

Kutikhin et al. [21] исследовали частоту встречаемости полиморфизма IL-17A G197A в русской популяции у пациентов с различной локализацией рака (коллатеральный рак, рак желудка, яичников, прямой и толстой кишки). Авторы не выявили ассоциации IL-17A G197A с раком желудка.

В работе Liu et al. [22] описаны результаты метаанализа проведенных исследований, касающихся изучения ассоциации интерлейкинов IL-17A и IL-17F с предрасположенностью к РЖ. В ряде исследований получены данные об ассоциации полиморфизма IL-17A rs2275913 и IL-17F rs763780 с риском развития РЖ [22, 23]. Полученные нами данные согласуются только по IL-17A rs2275913.

Zhang et al. [16] пишут о том, что мутация IL-17F rs763780 вызывает замещение гистидина на аргинин, которое влияет на синтез пептида и приводит к изменению структуры и функции белка. Авторами показано, что полиморфизм IL-17F rs763780 является потенциальным фактором риска развития РЖ, а генотип GG значительно увеличивает риск развития данного заболевания. В ряде исследований получены данные о том, что мутация в этом генном локусе значительно увеличивает риск развития РЖ при наличии инфекции *H. pylori* [16, 24, 25].

В то же время в других исследованиях не выявлено ассоциации между полиморфизмами генов семейства IL-17 и развитием РЖ [16, 23, 26]. В связи с чем необходимо планирование и проведение дальнейших широкомасштабных исследований, в том числе касающихся выявления различий в разных этнических группах [22]. Аналогичные выводы сделаны в ходе проведения метаанализа полученных результатов при исследовании различных популяций Азии [23].

Нами получены данные более частой встречаемости AA-генотипа гена IL-17A G197A у больных РЖ в сравнении со здоровыми в группе женщин и отсутствие различий между выборками больных и здоровых мужчин европеоидного происхождения

из Западной Сибири. Следует отметить, что в доступных опубликованных исследованиях других авторов не выявлено значимой ассоциации различий по частоте встречаемости аллелей изучаемых генов интерлейкинов с полом [18, 26].

Ряд исследователей приводят данные о том, что полиморфизм IL-17A rs2275913 связан с гистологическим типом РЖ. Согласно классификации Lauren [27] существуют два гистологически различаемых типа РЖ: кишечный и диффузный. Кишечный тип развивается вследствие хронического воспаления, которое проходит через промежуточную стадию кишечной метаплазии [28]. Тяжесть воспаления слизистой желудка может быть связана с мутагенными событиями, которые в конечном итоге приводят к РЖ. Согласно литературным данным аллель интерлейкина IL-17A G197A, локализованный в промоторе, ассоциируется с прогрессированием воспаления слизистой желудка и развитием ее атрофии. По результатам Shibata et al. [19] A-аллель значимо повышает риск развития атрофии слизистой желудка и коррелирует с развитием РЖ. Гомозиготы по A-аллелю IL-17A G197A имеют статистически значимый риск развития РЖ диффузного типа [19].

Работа выполнена при финансовой поддержке Бюджетного проекта: FWNR 2022-0021.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hartgrink H.H., Jansen E.P., van Grieken N.C., van de Velde C.J. Gastric cancer // *Lancet*. 2009. V. 374. P. 477–490.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60617-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60617-6)
2. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics // *CA. Cancer. J. Clin.* 2012. V. 62. P. 10–29.
<https://doi.org/10.3322/caac.21166>
3. Houghton J., Wang T.C. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: A new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers // *Gastroenterology*. 2005. V. 128. P. 1567–1578.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.037>
4. Merchant J.L. Inflammation, atrophy, gastric cancer: connecting the molecular dots // *Gastroenterology*. 2005. V. 129. P. 1079–1082.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.07.038>

5. Dong L.M., Potter J.D., White E. et al. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes // *JAMA*. 2008. V. 299. P. 2423–2436. <https://doi.org/10.1001/jama.299.20.2423>
6. El-Omar E.M., Carrington M., Chow W.H. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer // *Nature*. 2000. V. 404. P. 398–402. <https://doi.org/10.1038/35006081>
7. Xue H., Lin B., An J. et al. Interleukin-10-819 promoter polymorphism in association with gastric cancer risk // *BMC Cancer*. 2012. V. 12. P. 102–111. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-102>
8. Zhu F., Zhao H., Tian X., Meng X. Association between tumor necrosis factor- α rs1800629 polymorphism and risk of gastric cancer: a meta-analysis // *Tumour Biol*. 2014. V. 35. P. 1799–1803. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1240-y>
9. Stanley A.C., Lacy P. Pathways for cytokine secretion // *Physiology* (Bethesda). 2010. V. 25. P. 218–229. <https://doi.org/10.1152/physiol.00017.2010>
10. Kawaguchi M., Adachi M., Oda N. et al. IL-17 cytokine family // *J. Allergy Clin. Immunol*. 2004. V. 114. P. 1265–1273. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.019>
11. Gaffen S.L., Kramer J.M., Yu J.J., Shen F. The IL-17 cytokine family // *Vitam. Horm.* 2006. V. 74. P. 255–282. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)74010-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74010-9)
12. Nordang G.B., Viken M.K., Hollis-Moffatt J.E. et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand // *Rheumatology* (Oxford). 2009. V. 48. P. 367–370. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken512>
13. Espinoza J.L., Takami A., Onizuka M. et al. A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT // *Bone Marrow Transplant*. 2011. V. 46. P. 1455–1463. <https://doi.org/10.1038/bmt.2010.325>
14. Arisawa T., Tahara T., Shibata T. et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis // *J. Clin. Immunol*. 2008. V. 28. P. 44–49. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9125-8>
15. Qinghai Z., Yanying W., Yunfang C. et al. Effect of interleukin-17A and interleukin-17F gene polymorphisms on the risk of gastric cancer in a Chinese population // *Gene*. 2014. V. 537. P. 328–332. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.007>
16. Zhang X., Zheng L., Sun Y., Zhang X. Analysis of the association of interleukin-17 gene polymorphisms with gastric cancer risk and interaction with *Helicobacter pylori* infection in a Chinese population // *Tumour Biol*. 2014. V. 35. P. 1575–1580. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1217-x>
17. Rafiei A., Hosseini V., Janbabai G. et al. Polymorphism in the interleukin-17A promoter contributes to gastric cancer // *World J. Gastroenterol*. 2013. V. 19. P. 5693–5699. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i34.5693>
18. Wu X., Zeng Z., Chen B. et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer // *Int. J. Cancer*. 2010. V. 127. P. 86–92. <https://doi.org/10.1002/ijc.25027>
19. Shibata T., Tahara T., Hirata I., Arisawa T. Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis // *Hum. Immunol*. 2009. V. 70. P. 547–551. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.04.030>
20. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1982.
21. Kutikhin A.G., Yuzhalin A.E., Volkov A.N. et al. Correlation between genetic polymorphisms within IL-1B and TLR4 genes and cancer risk in a Russian population: a case-control study // *Tumour Biol*. 2014. V. 35. P. 4821–4830. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1633-6>
22. Liu J., Xu Q., Yuan Q. et al. Association of IL-17A and IL-17F polymorphisms with gastric cancer risk in Asians: A meta-analysis // *Human Immunology*. 2015. V. 76. P. 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.12.011>
23. Wang H., Zhang Y., Liu Z. et al. The IL-17A G-197A and IL-17F 7488T/C polymorphisms are associated with increased risk of cancer in asians: a meta-analysis // *Drug Design, Development and Therapy*. 2015. V. 9. P. 5159–5168. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S84092>
24. Niu Y.M., Yuan H., Zhou Y. Interleukin-17 gene polymorphisms contribute to cancer risk // *Mediators Inflamm*. 2014. V. 2014. P. 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/128490>
25. Yangi L.-J., Gao W., Bai J.-Y. et al. Correlation between Interleukin-17 gene polymorphism and gastric cancer susceptibility in Han Chinese population // *Eur. Review for Medical and Pharmacological Sci*. 2016. V. 20. P. 1271–1282.
26. Tahara T., Shibata T., Nakamura M. et al. Association between IL-17A, -17F and MIF polymorphisms predispose to CpG island hyper-methylation in gastric cancer // *Int. J. Mol. Med*. 2010. V. 25. P. 471–477. https://doi.org/10.3892/ijmm_00000367
27. Lauren P. The two histologic main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification // *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 1965. V. 6. P. 31–49. <https://doi.org/10.1111/apm.1965.64.1.31>
28. Go M.F. Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection // *Aliment Pharmacol. Ther*. 2002. V. 16. P. 3–15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.0160s1003.x33>

Polymorphism of the Interleukin Genes IL-17A *G197A* and IL-17F *A7488G* in Patients with Gastric Cancer in the West Siberian Region

M. A. Gubina^{a, *}, I. G. Solovieva^b, V. N. Babenko^a, A. V. Sokolov^c, and E. Yu. Gubina^d

^a*Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

^b*Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, 630126 Russia*

^c*City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, 630091 Russia*

^d*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: marina@bionet.nsc.ru*

The frequency of occurrence of alleles of the IL-17A *G197A* and IL-17F *A7488G* genes in 150 people with gastric cancer and 103 healthy people was analyzed. The frequencies of genotypes IL-17F *A7488G* in patients (*AA* – 68.6, *AG* – 25.3 and *GG* – 6%) did not differ significantly from those in the control (*AA* – 77.7, *AG* – 22.3 and *GG* – 0.0%). Carriers of the *GG* genotype were found only in patients. There were no significant differences between patients and healthy people ($\chi^2 = 4.80$, $p < 0.09$). The frequencies of genotypes IL-17A *G197A* in patients (*GG* – 10.6, *AG* – 48.7, and *AA* – 40.7%) differed from the control (*GG* – 11.7, *AG* – 70.8, and *AA* – 17.5%). The distribution of genotypes IL-17A *G197A* “case–control” showed that the frequency of occurrence of the *AA* - genotype in a sample of patients with gastric cancer is two times higher than in a sample of healthy ones. Significant differences between sick and healthy people were revealed ($\chi^2 = 15.79$, $p < 0.0003$). Significant differences were found between sick and healthy women both in IL-17A *G197A* ($\chi^2 = 16.18$, $p < 0.0003$) and in IL-17F *A7488G* ($\chi^2 = 7.176$, $p < 0.027$). No significant differences were found between the male samples. The results of our studies showed that only the *A* allele and the *AA* genotype of the IL-17A *G197A* gene are significantly more common in patients with gastric cancer than in healthy people, which may be a marker of the risk of developing gastric cancer in people living in the West Siberian region. Identified haplotypes characteristic only for patients with gastric cancer.

Keywords: genes, genotypes, gastric cancer, alleles, IL-17A, IL-17F.

МУТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ГЕНА *F11* У ПАЦИЕНТОВ С ДЕФИЦИТОМ FXI В РОССИИ

© 2022 г. О. С. Пшеничникова¹, *, В. Л. Сури¹, Н. В. Сац¹, Е. В. Яковлева¹,
О. С. Димитриева¹, Н. И. Зозуля¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, 125167 Россия

*e-mail: pshenichnikovaolesya@gmail.com

Поступила в редакцию 01.12.2021 г.

После доработки 21.01.2022 г.

Принята к публикации 03.02.2022 г.

Фактор FXI является важным участником каскада свертывания крови и кодируется геном *F11*, мутации в котором приводят к крайне редкому (1 : 1000000 человек) аутосомному заболеванию – дефициту FXI, известному также как гемофилия С. Наиболее часто дефицит FXI диагностируется у евреев Ашкенази с тремя преобладающими мутациями. Целью данного исследования было первичное описание мутационного спектра гена *F11* в российской популяции. В ходе исследования секвенировали все функционально важные области гена *F11* для 11 неродственных пациентов с диагнозом гемофилия С. Всего было выявлено 10 различных генных нарушений, из них пять миссенс-мутаций, одна нонсенс-мутация, три frameshift-делеции одна inframe-делеция, все они достаточно равномерно распределялись по всему гену. В нашей выборке из распространенных в мире генетических нарушений встретились лишь мутация II типа p.Glu135Ter, характерная для евреев Ашкенази. Два ранее не описанных варианта (с.1768del и p.His53Tyr) были охарактеризованы нами как вероятно патогенные. По лабораторным показателям наблюдалась картина, характерная для неполного доминирования, – значительное снижение уровня активности FXI и удлинение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) в случае повреждения двух копий гена и небольшие отклонения от нормы при нарушении одной копии. Таким образом, мы описали нарушения, встречающиеся в гене *F11* в российской популяции у пациентов с дефицитом FXI. Полученные данные свидетельствуют о высокой степени гетерогенности спектра мутаций, вызывающих гемофилию С в России.

Ключевые слова: дефицит FXI, гемофилия С, ген *F11*, молекулярно-генетический анализ, мутационный спектр.

DOI: 10.31857/S001667582207013X

FXI представляет собой зимоген протеазы FXIa, играющей важную роль в активации FIX в каскаде свертывания крови. Этот гликопротеин синтезируется в гепатоцитах и находится в плазме крови в комплексе с высокомолекулярным кининогеном. FXI представляет собой гомодимер из двух соединенных бисульфидным мостиком субъединиц, имеющих массу 80 кДа и включающих четыре арле-домена и один каталитический домен (сериновая протеаза). Полноразмерную субъединицу (625 аминокислотных остатков) кодирует ген *F11*, который локализован на длинном плече 4-й хромосомы (4q35.2), имеет общую длину 24 тпн и состоит из 15 экзонов. Первый экзон является некодирующим, второй экзон кодирует сигнальный пептид (17 аминокислотных остатков) [1–3].

Мутации в гене *F11* приводят к крайне редкому аутосомному заболеванию с неполным доминированием – дефициту FXI, известному также

как гемофилия С, дефицит плазменного предшественника тромбопластина, или синдром Розенталя (OMIM 612416). В настоящее время в базах данных (<http://www.factorxi.org/>, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>) описано 272 патогенных варианта в гене *F11*, из которых значительную часть составляют миссенс-мутации (154) [3].

В отличие от гемофилии А и В дефицит FXI встречается с примерно равной частотой у мужчин и женщин и характеризуется более мягким течением, кровотечения чаще всего развиваются в результате травм или хирургического вмешательства, спонтанные кровотечения редки даже при тяжелой форме болезни. Клиническая картина может быть различной и зависит от того, сколько копий гена повреждено. Тяжелая форма (FXI < 20%) развивается у гомозиготных носителей мутации или у компаундов (носителей двух разных патогенных вариантов на разных хромо-

сомах). У гетерозиготных носителей одного генного дефекта болезнь носит более легкий характер, активность фактора при этом находится в пределах 20–70%. Предполагают дефицит FXI при продолжительных кровотечениях при увеличении активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) [4].

Принято оценивать частоту встречаемости этой болезни 1 : 1 000 000 человек, при этом недавние исследования, основанные на анализе большого массива данных полноэкзомного и полногеномного секвенирования, показали, что частота носительства мутаций в гене *F11* в мировой популяции примерно в 13 раз выше, чем считалось ранее [5]. Наиболее часто дефицит FXI диагностируется у евреев Ашкенази (частота встречаемости гомозигот и компаундов 1 : 450 человек, гетерозиготного носительства 1 : 11 человек) с тремя преобладающими патогенными вариантами, обусловленными эффектом основателя: мутация II типа (p.Glu135Ter), III типа (p.Phe301Leu) и более редкая мутация I типа (c.1716 + 1G>A) [6–9]. Среди других мажорных вариантов, для которых также показан эффект основателя, наиболее известны p.Gln106Ter, p.Cys56Arg и p.Cys146Ter, преобладающие среди французов Нанта и Баскских земель и британцев соответственно. Также были описаны варианты с эффектом основателя в Южной Корее – p.Gln281Ter и p.Gln244Ter [10]. Анализ данных полноэкзомного секвенирования позволил выявить еще несколько мажорных, характерных для определенных этносов, вариантов: p.Phe241Leu у африканцев, p.Gln281Ter и p.(Leu442Cysfs*8) в Восточной Азии и p.Ala430Thr у латиноамериканцев [5]. Однако в большей части популяций мутационный спектр гена *F11* значительно разнообразнее [10–17]. Целью данного исследования было первичное описание мутационного спектра гена *F11* в российской популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 11 неродственных пациентов с первичным диагнозом дефицит FXI разной степени тяжести, а также шесть близких родственников одного из них после получения информированного согласия. ДНК выделяли из ядерных клеток периферической крови после селективного лизиса эритроцитов 0.8%-ным раствором хлорида аммония по стандартной методике, включающей обработку додецилсульфатом натрия (0.5%) и протеиназой K (200 мкг/мл) с последующей фенол-хлороформной экстракцией.

Для проведения молекулярно-генетического анализа все функционально важные участки гена *F11* амплифицировали в виде девяти фрагментов длиной от 286 до 1047 пар нуклеотидов (пн). Исследуемые фрагменты включали кодирующие экзоны 2–15 и экзон-интронные сочленения. Ам-

плификацию проводили в системе PCR Master Mix (ThermoScientific, США) с праймерами, разработанными на основании нуклеотидной последовательности NC_000004.12 (табл. 1) и синтезированными в ЗАО “Синтол” (Москва, Россия) с 0.01–0.02 мкг геномной ДНК в условиях 94°C – 1 мин, 62°C – 1 мин, 72°C – 3 мин, 30 циклов. Визуализацию продуктов ПЦР проводили с помощью регистрации в УФ-свете после разделения электрофорезом в 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и прокрашивания бромистым этидием.

ПЦР-фрагменты для секвенирования очищали на колонках Wizard (Promega, США). Секвенирование по Сэнгеру проводили в ЦКП “Геном” ИМБ РАН с помощью набора реактивов BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100Avant (Applied Biosystems).

Патогенные варианты выявляли путем сравнения нуклеотидной последовательности гена *F11* пациента с референсными последовательностями ДНК и мРНК (NC_000004.12 и NM_000128.4 соответственно). Названия вариантам присваивали согласно рекомендациям HGVS (Human Genome Variation Society, <http://varnomen.hgvs.org/>). Выявленные варианты проверяли по базам данных (<http://www.factorxi.org/>, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), ранее не описанные варианты проверяли на патогенность с помощью калькулятора патогенности МГНЦ (<http://calc.genereasearch.ru/>) и алгоритмов, предсказывающих патогенность: MutationTaster [18], PolyPhen-2 v2.2.2 [19], PROVEAN v1.1.5 [20], SIFT v6.2.1 [21], FATHM (v2.3) [22].

Статистические расчеты проводили в программной среде R.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У всех исследованных пациентов с первичным диагнозом дефицит FXI были выявлены патогенные варианты (табл. 2, рис. 1). Всего выявлено 10 различных генных нарушений, из них пять миссенс-мутаций, одна нонсенс-мутация, три делеции со сдвигом рамки считывания (frameshift) и одна inframe-делеция. Один найденный вариант (делеция c.1768del) ранее описан не был, он представляет собой делецию нуклеотида G, приводящую к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона в следующей позиции (p.(Val590Ter)). Согласно калькулятору патогенности это вероятно патогенный вариант (критерии PM2, PVS3). Еще один вариант – миссенс-мутация p.His53Tyr (c.157 C>T) не была описана в базах данных по мутациям, а также в базе ClinVar, однако была отмечена в базе gnomAD как встреченная однажды в гете-

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Название	Нуклеотидная последовательность	Экзоны	Размер фрагмента, пн
F11D1	ctactcccctctctccctat	Экзон 2	286
F11R1	acctcaattcctacacctgct		
F11D2	tagagctactgccttgccct	Экзон 3	381
F11R2	tgcgtaaaccacatcacttct		
F11D3	tttggctttctgtgtgctgact	Экзон 4	322
F11R3	ggagggcaggcatgtatgta		
F11D4	agttgaaaggatgagtcagga	Экзон 5	294
F11R4	tctggcataaagttgatggca		
F11D5	catgccagccattcagcct	Экзоны 6–7	824
F11R5	gcaacttttacctatactgaca		
F11D6	catgagctgactttactttctc	Экзоны 8–10	722
F11R6	cctgaatgttctccccttctgt		
F11D7	gacagcctttagtagaccaca	Экзон 11	567
F11R7	tgtacctgcacctgttctga		
F11D8	gccacacacttcacaatgtc	Экзоны 12–13	989
F11R8	cttcagctacatgacttgaca		
F11D9	gtttatgtattgtgtatgggt	Экзоны 14–15	1047
F11R9	agcgtgttactgtggaggaa		

розиготной форме (1 : 251458 аллелей, частота 0.000004) и зарегистрирована в базе dbSNP как rs55956266. Компьютерными алгоритмами она определяется как вероятно патогенная (MutationTaster: disease causing $p = 0.89$; Polyphen2: HumDiv/HumVar probably damaging $p = 0.99$; SIFT: Damaging, score = 0.001; Provean: Deleterious, score = -2.57; fathmm: Damaging, score = -2.48).

Только у двух пациентов выявлено наиболее распространенное генное нарушение – мутация II типа p.Glu135Ter, характерная для евреев Ашкенази. У четырех пациентов патогенный вариант был в гомозиготной форме, у остальных в гетеро-

зиготной форме. У одного пациента было выявлено два патогенных варианта в гетерозиготной форме.

У пациентов с двумя поврежденными копиями гена *F11* (гомозиготные варианты и компаунд из двух гетерозиготных вариантов) активность FXI была статистически значимо меньше (среднее: 1.2%, min–max: 0.7–1.8%, t -test: $p = 0.0002$, Cohen’s $d = 1.377$ (large)), а АЧТВ – больше (среднее: 109.9 с, min–max: 86.8–165.6 с, t -test: $p = 0.0112$, Cohen’s $d = 2.62$ (large)) по сравнению с пациентами, у которых была нарушена лишь одна копия

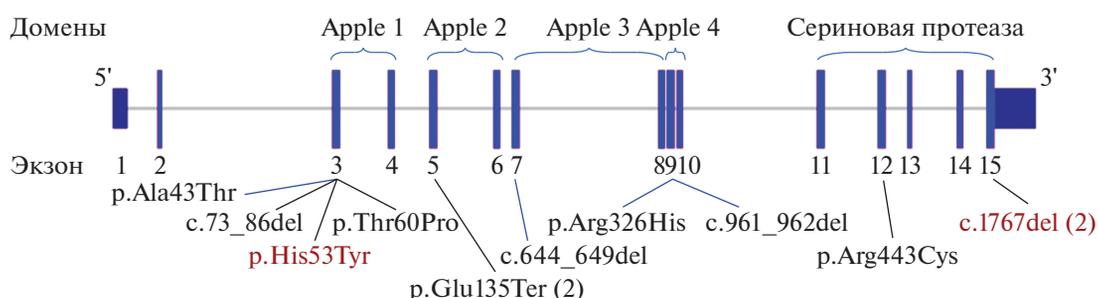


Рис. 1. Распределение выявленных патогенных вариантов в гене *F11* и их соотношение с белковой структурой. В скобках указано число пациентов с данным вариантом, красным обозначены ранее не описанные патогенные варианты.

Таблица 2. Список выявленных нарушений в гене *F11*, их статус и локализация, а также лабораторные характеристики пациентов

Пациент	Пол	FXI, % (норма 70–120)	АЧТВ, с (норма 29–38)	Патогенный вариант	Тип	Статус варианта	Экзон	Домен	Ссылка
C1-1	Ж	0.7	89.8	p.Glu135Ter (c.403G>T)	Нонсенс	Гомозигота	5	Apple 2	[6]
C2	М	62	39	p.Glu135Ter (c.403G>T)	Нонсенс	Гетерозигота	5	Apple 2	[6]
C3	Ж	1.1	165.6	c.1768del (p.(Val590Ter))	Делеция, frameshift	Гомозигота	15	Сериновая протеаза	New
C4	М	1.8	92.3	c.961_962del (p.(Cys321Hisfs*37))	Делеция, frameshift	Гомозигота	9	Apple 4	[10]
C5	М	49.9	48.2	c.73_86del (p.(Lys26Ter))	Делеция, frameshift	Гетерозигота	3	Apple 1	[11]
C6	М	44.3	47.5	c.644_649del (p.(Ile215_Asp216del))	Делеция, inframe	Гетерозигота	7	Apple 3	[23]
C7	Ж	35.2	42.5	p.Ala43Thr (c.127G>A)	Миссенс	Гетерозигота	3	Apple 1	[24]
HM25	Ж	32.4	60.4	p.Arg326His (c.977G>A)	Миссенс	Гетерозигота	9	Apple 4	[15]
C8	Ж	1.3	86.8	p.His53Tyr (c.157C>T)	Миссенс	Гетерозигота	3	Apple 1	New
C9	Ж	37.9	39.4	p.Thr60Pro (c.178A>C)	Миссенс	Гетерозигота	3	Apple 1	[25]
C10	Ж	1.1	114.8	p.Arg443Cys (c.1327C>T)	Миссенс	Гетерозигота	12	Сериновая протеаза	[10]
C10	Ж	1.1	114.8	c.1768del (p.(Val590Ter))	Делеция, frameshift	Гомозигота	15	Сериновая протеаза	New

Таблица 3. Мутационный статус семьи пациентки с патогенным вариантом р.Glu135Ter (с.403G>T) и его соответствие показателям активности FXI и АЧТВ

Пациент	Родство	FXI, % (норма 70–120%)	АЧТВ, с (норма 29–38 с)	Статус варианта
C1-1	Пробанд	0.7	89.8	Гомозигота
C1-2	Мать пробанда	95	31.9	Гетерозигота
C1-3	Сестра пробанда	147.1	30.1	Норма
C1-4	Дочь пробанда	60.8	43	Гетерозигота
C1-5	Дочь пробанда	49.1	40.2	Гетерозигота
C1-6	Сын пробанда	53.8	40.1	Гетерозигота
C1-7	Дочь пробанда	98.4	41.1	Гетерозигота

гена (FXI среднее: 43.6%, min–max: 39–62%, АЧТВ среднее: 46.1 с, min–max: 39–60.4 с).

Для одной пациентки с гомозиготной мутацией II типа р.Glu135Ter был доступен биологический материал и лабораторные данные от родственников – матери, сестры и четырех детей. В связи с этим для них было определено соотношение фенотипа и мутационного статуса (табл. 3). Только сестра пробанда не являлась носительницей патогенного варианта, остальные члены семьи были гетерозиготными носителями. При этом у двух дочерей и сына пациентки наблюдалось характерное для гетерозиготных носителей снижение активности FXI и удлинение АЧТВ. Интересно, что у матери пробанда и показатели активности фактора, и АЧТВ были в рамках нормы, а у одной из дочерей при нормальной активности фактора АЧТВ увеличено.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании мы выявили 10 различных патогенных вариантов гена *F11* у российских пациентов с дефицитом FXI. Это первая работа, посвященная изучению мутационного спектра гена *F11*, в нашей стране. В нашей выборке из распространенных в мире генетических нарушений встретилась лишь мутация II типа р.Glu135Ter, характерная для евреев Ашкенази [6], у нас она была выявлена только у двух пациентов. По типам генетических нарушений в спектре преобладали миссенс-мутации (50%), что характерно для данного гена [3, 5, 10–17]. Два ранее не описанных варианта (с.1768del и р.His53Tyr) были охарактеризованы нами как вероятно патогенные.

Для некоторых наследственных заболеваний системы свертывания крови характерно наличие мажорных мутаций, которые позволяют разработать более быстрый и дешевый алгоритм молекулярно-генетической диагностики. В одном молекулярно-генетическом исследовании гемофилии С, проведенном в Великобритании на представи-

тельной выборке пациентов, было предложено начинать диагностику с трех ампликонов, включающих в себя экзоны 5, 15, 8–10 с наиболее часто встречающимися мутациями [11], тем не менее в нашей популяции такой алгоритм выглядит нецелесообразным. Все выявленные нами нарушения достаточно равномерно распределялись по всему гену *F11* (рис. 1), затрагивая все белковые домены, и разнообразие встреченных вариантов было высоким. Единственным исключением может быть уникальная для нашей популяции микроделеция с.1767del, найденная дважды в гомозиготном состоянии, но ее реальная частота встречаемости может быть оценена только после существенного увеличения выборки обследованных пациентов. Этот вариант в обоих случаях был выявлен с полиморфизмом с.485+66T>C в гетерозиготном состоянии, что указывает на низкую вероятность того, что пробанды с данной микроделцией являются родственниками.

У пациентов наблюдалась картина, характерная для неполного доминирования заболевания, – значительные изменения лабораторных показателей коагулограммы (активность FXI и АЧТВ) в случае повреждения двух копий гена и небольшие отклонения от нормы при нарушении одной копии.

Таким образом, мы описали генетические нарушения, встречающиеся в гене *F11* в российской популяции у пациентов с дефицитом FXI. Полученные данные свидетельствуют о высокой степени гетерогенности спектра мутаций, вызывающих гемофилию С в России.

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. *Emsley J., McEwan P.A., Gailani D.* Structure and function of factor XI // *Blood*. 2010. V. 115. № 13. P. 2569–2577.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-199182>
2. *Calderara D.B., Zermatten M.G., Aliotta A., Alberio L.* How to capture the bleeding phenotype in FXI-deficient patients // *Hamostaseologie*. 2020. V. 40. № 4. P. 491–499.
<https://doi.org/10.1055/a-1227-8122>
3. *Harris V.A., Lin W., Perkins S.J.* Analysis of 272 genetic variants in the upgraded interactive FXI web database reveals new insights on FXI deficiency // *TH Open*. 2021.
<https://doi.org/10.1055/a-1683-8605>
4. *Seligsohn U.* Factor XI deficiency in humans // *J. Thromb. Haemost.* 2009. V. 7. Suppl. 1. P. 84–87.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03395>
5. *Asselta R., Paraboschi E.M., Rimoldi V. et al.* Exploring the global landscape of genetic variation in coagulation factor XI deficiency // *Blood*. 2017. V. 130. № 4. P. e1–e6.
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-780148>
6. *Asakai R., Chung D.W., Ratnoff O.D., Davie E.W.* Factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency in Ashkenazi Jews is a bleeding disorder that can result from three types of point mutations // *PNAS*. 1989. V. 86. № 20. P. 7667–7671.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.20.7667>
7. *Peretz H., Mulai A., Usher S. et al.* The two common mutations causing factor XI deficiency in Jews stem from distinct founders: one of ancient Middle Eastern origin and another of more recent European origin // *Blood*. 1997. V. 90. № 7. P. 2654–2659.
8. *Peretz H., Salomon O., Mor-Cohen R. et al.* Type I mutation in the F11 gene is a third ancestral mutation which causes factor XI deficiency in Ashkenazi Jews // *J. Thromb. Haemost.* 2013. V. 11. № 4. P. 724–730.
<https://doi.org/10.1111/jth.12137>
9. *Shpilberg O., Peretz H., Zivelin A. et al.* One of the two common mutations causing factor XI deficiency in Ashkenazi Jews (type II) is also prevalent in Iraqi Jews, who represent the ancient gene pool of Jews // *Blood*. 1995. V. 85. № 2. P. 429–432.
10. *Kim J., Song J., Lyu C.J. et al.* Population-specific spectrum of the F11 mutations in Koreans: evidence for a founder effect // *Clin. Genet.* 2012. V. 82. № 2. P. 180–186.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01732.x>
11. *Mitchell M., Mountford R., Butler R. et al.* Spectrum of factor XI (F11) mutations in the UK population—116 index cases and 140 mutations // *Hum. Mutat.* 2006. V. 27. № 8. P. 829.
<https://doi.org/10.1002/humu.9439>
12. *Zucker M., Zivelin A., Landau M. et al.* Characterization of seven novel mutations causing factor XI deficiency // *Haematologica*. 2007. V. 92. № 10. P. 1375–1380.
<https://doi.org/10.3324/haematol.11526>
13. *Gueguen P., Chauvin A., Quemener-Redon S. et al.* Revisiting the molecular epidemiology of factor XI deficiency: nine new mutations and an original large 4qTer deletion in western Brittany (France) // *Thromb. Haemost.* 2012. V. 107. № 1. P. 44–50.
<https://doi.org/10.1160/TH11-06-0415>
14. *Liu H., Wang H.F., Tang L. et al.* Genetic analysis in Factor XI deficient patients from central China: Identification of one novel and seven recurrent mutations // *Gene*. 2015. V. 561. № 1. P. 101–106.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.021>
15. *Shao Y., Cao Y., Lu Y. et al.* Clinical manifestations and mutation spectrum of 57 subjects with congenital factor XI deficiency in China // *Blood Cells, Mol. Dis.* 2016. V. 58. P. 29–34.
<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.01.004>
16. *Esteban J., de la Morena-Barrio M.E., Salloum-Asfar S. et al.* High incidence of FXI deficiency in a Spanish town caused by 11 different mutations and the first duplication of F11: Results from the Yecla study // *Haemophilia*. 2017. V. 23. № 6. P. e488–e496.
<https://doi.org/10.1111/hae.13356>
17. *Colakoglu S., Bayhan T., Tavil B. et al.* Molecular genetic analysis of the F11 gene in 14 Turkish patients with factor XI deficiency: identification of novel and recurrent mutations and their inheritance within families // *Blood Transfus.* 2018. V. 16. № 1. P. 105–113.
<https://doi.org/10.2450/2016.0098-16>
18. *Schwarz J.M., Cooper D.N., Schuelke M., Seelow D.* MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 4. P. 361–362.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
19. *Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L. et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 4. P. 248–249.
<https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
20. *Choi Y., Sims G.E., Murphy S. et al.* Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 10. P. e46688.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>
21. *Sim N.L., Kumar P., Hu J. et al.* SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. W452–W457.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks539>
22. *Shihab H.A., Gough J., Cooper D.N. et al.* Predicting the functional consequences of cancer-associated amino acid substitutions // *Bioinformatics*. 2013. V. 29. № 12. P. 1504–1510.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt182>
23. *Zadra G., Asselta R., Malcovati M. et al.* Molecular genetic analysis of severe coagulation factor XI deficiency in six Italian patients // *Haematologica*. 2004. V. 89. № 11. P. 1332–1340.
24. *Dai L., Rangarajan S., Mitchell M.* Three dominant-negative mutations in factor XI-deficient patients // *Haemophilia*. 2011. V. 17. № 5. P. e919–e922.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2011.02519.x>
25. *Mulder R., Wiewel-Verschueren S., Meijer K., Mulder A.B.* Identification of a novel factor XI gene mutational event in a Dutch Caucasian family with inherited factor XI deficiency // *Thromb. Haemost.* 2013. V. 109. № 6. P. 1183–1185.
<https://doi.org/10.1160/TH12-12-0933>

Mutation Analysis of *F11* Gene in Patients with FXI Deficiency in Russia**O. S. Pshenichnikova^{a, *}, V. L. Surin^a, N. V. Sats^a, E. V. Yakovleva^a,
O. S. Dimitrieva^a, and N. I. Zozulya^a**^a*National Research Center for Hematology, Moscow, 125167 Russia***e-mail: pshenichnikovaolesya@gmail.com*

Factor FXI is an essential participant of blood coagulation cascade and is coded by *F11* gene, mutations in which lead to an extremely rare (1 : 1000000) autosomal disease – FXI deficiency, also known as hemophilia C. The most frequently FXI deficiency is diagnosed in Ashkenazi Jews with three major mutations. The aim of this study was a primary description of *F11* gene mutational spectrum in Russian population. During the study we sequenced all functionally important regions of *F11* gene for 11 unrelated patients with hemophilia C. Totally 10 different gene defects were revealed: five missense mutations, a nonsense mutation, three frameshift and one inframe deletions. All of them were uniformly distributed across the gene. Among the most frequent in the world population genetic defects we found only common in Ashkenazi Jews II type mutation p.Glu135* in our sample. Two previously undescribed variants (c.1768del and p.His53Tyr) were evaluated as probably pathogenic. There was a typical picture of incomplete dominance by laboratory parameters – a significant decline of FXI activity level and an increase of APTT when both gene copies were damaged and slight deviations from the norm if only one of the copies was impaired. To sum up, we described *F11* defects in Russian patients with FXI deficiency. Our findings indicate a high level of heterogeneity of the mutational spectrum leading to hemophilia C in Russia.

Keywords: FXI deficiency, hemophilia C, *F11* gene, molecular genetic analysis, mutational spectrum.

УДК 575.113.1

ДИЗАЙН ПАНЕЛЕЙ ПРЕДИКТИВНЫХ МАРКЕРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ШИРОКОГЕНОМНОГО СКРИНИНГА МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

© 2022 г. А. И. Калинин¹, В. О. Сигин¹, Е. О. Игнатова², М. А. Фролова², Е. Б. Кузнецова^{1,3}, И. Ю. Виноградов⁴, М. И. Виноградов⁵, И. И. Виноградов^{4,5}, М. В. Немцова^{1,3}, Д. В. Залетаев¹, А. С. Танас¹, В. В. Стрельников¹. *

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

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

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991 Россия

⁴Областной клинический онкологический диспансер, Рязань, 390046 Россия

⁵Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Рязань, 390026 Россия

*e-mail: vstrel@list.ru

Поступила в редакцию 01.12.2021 г.

После доработки 10.02.2022 г.

Принята к публикации 22.02.2022 г.

Частота полного патоморфологического ответа на неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) при трижды негативном раке молочной железы невысока и колеблется от 30 до 40%. При этом на сегодняшний день практически отсутствуют предиктивные маркеры эффективности НАХТ для этого подтипа опухолей. В настоящей статье предлагается подход к идентификации прогностических эпигенетических маркеров чувствительности трижды негативных опухолей молочной железы к НАХТ, диагностика которых возможна с использованием метилчувствительной ПЦР. Отбор маркеров проводили из массива данных широкогеномного бисульфитного секвенирования ДНК XmaI-RRBS, проведенного для опухолевых биопсий, полученных от 34 пациенток до начала НАХТ, и для 6 образцов нормальных тканей молочной железы. Пациентки были разделены на группы ответивших (полный патоморфологический ответ) или не ответивших (наличие остаточной опухоли) на химиотерапию. Были определены CpG-динуклеотиды, дифференциальное метилирование которых позволяет различать образцы трижды негативных опухолей с различной чувствительностью к НАХТ, и разработана панель маркеров метилирования, включающая участки CpG-островков генов *RUSC1/RUSC1-AS1*, *MXRA5* и *ANKRD46*, дизайн которой соответствует требованиям, предъявляемым к тест-системам на основе метилчувствительной ПЦР. Расчетная диагностическая точность панели из этих трех маркеров метилирования составляет 0.79 (сvAUC = 0.80, 95%ДИ: 0.79–0.82).

Ключевые слова: трижды негативный рак молочной железы, метилирование ДНК, широкогеномное бисульфитное секвенирование, XmaI-RRBS, неоадьювантная химиотерапия, метилчувствительная ПЦР.

DOI: 10.31857/S0016675822070086

Трижды негативный подтип рака молочной железы (ТНРМЖ) составляет от 15 до 20% всех случаев рака молочной железы (РМЖ) и является агрессивным заболеванием с высоким уровнем метастазирования, частым возникновением рецидивов и низкой выживаемостью по сравнению с другими подтипами РМЖ [1]. Важным этапом лечения ТНРМЖ является неоадьювантная химиотерапия (НАХТ) [2]. В настоящее время наиболее распространены схемы НАХТ ТНРМЖ на основе антрациклинов и таксанов [3]. Полный патоморфологический ответ (pCR – pathologic complete re-

sponse) после НАХТ ассоциирован с лучшим прогнозом, тогда как остаточная опухоль – с более высоким риском рецидива и худшим прогнозом [4, 5].

Согласно крупным исследованиям, частота pCR после НАХТ ТНРМЖ невысока и колеблется от 30 до 40% [6–10], а “золотой стандарт” химиотерапии не выработан [6]. При значительном количестве доступных схем и химиотерапевтических средств одной из проблем НАХТ остается эмпирический выбор лечения. Учитывая, что цитостатические препараты снижают качество жизни пациентов, а при их использовании достигается

ограниченный терапевтический эффект, отказ от потенциально неэффективного лечения может служить лучшим терапевтическим решением. Задача состоит в том, чтобы идентифицировать маркеры, которые могли бы заранее предсказать ответ на химиотерапию и помочь снизить побочные эффекты и стоимость лечения, помогая определить терапевтическую стратегию. Изучение молекулярно-генетических профилей опухолей поможет индивидуализировать выбор химиотерапевтических препаратов и снизить риск побочных эффектов [11].

Существующие в настоящее время панели молекулярно-генетических маркеров, такие как Oncotype DX [12], Prosigna [13], MammaPrint [14], EndoPredict [15], BluePrint [16], позволяют прогнозировать ответ на адъювантную терапию. Что касается неоадъювантной терапии, все эти панели показали лучшие показатели прогностической ценности при люминальных подтипах РМЖ, чем при ТНРМЖ [13, 16–20]. Таким образом, задача уточнения прогноза ответа ТНРМЖ на НАХТ путем анализа биопсийного материала, полученного до лечения, по-прежнему остается актуальной в современной медицинской практике.

Все перечисленные выше прогностические панели включают в себя маркеры экспрессии генов. В качестве дополнительного и в некоторой степени альтернативного источника прогностических маркеров мы рассматриваем метилотипирование злокачественных опухолей. Профили метилирования ДНК опухолевых геномов уже использовались нами и другими авторами для создания классификаторов эпигенетических подтипов РМЖ [21, 22].

Эффективный и беспристрастный поиск эпигенетических маркеров, позволяющих различать группы сравниваемых клинических образцов, возможен только на основе широкогеномного скрининга дифференциального метилирования, прежде всего на основе секвенирования ДНК. Хотя полногеномное бисульфитное секвенирование (WGBS) теоретически предоставляет наибольшую информацию о метилировании ДНК-генома, в настоящее время вряд ли это метод выбора при разработке маркеров метилирования ДНК. Бисульфитное секвенирование ограниченных выборок локусов (RRBS), направленное преимущественно на регуляторные участки генома, такие как CpG-островки, позволяет гораздо более рентабельно проводить скрининг дифференциально метилированных участков, представляющих собой потенциальные диагностические маркеры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический материал

В исследование включены материалы биоптатов опухолей от 34 пациенток (табл. 1) с инвазивным ранним ($T_{1-2}N_{0-1}M_0$) и местнораспространенным ($T_{3-4}N_{0-3}M_0$ либо $T_{1-4}N_{2-3}M_0$) РМЖ трижды нега-

тивного подтипа, степени злокачественности 2 и 3, которые лечились в ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина” и в ГБУ Рязанской обл. “Областной клинический онкологический диспансер” в 2015–2018 гг., а также шесть аутопсийных непарных образцов нормальных тканей молочной железы со средним возрастом 30.5 лет. Средний возраст женщин с РМЖ составил 47.82 ± 10.07 года (табл. 1). От каждого участника исследования получено письменное информированное согласие. Все пациентки прошли 7–8 курсов НАХТ по схеме доксорубин + цисплатин + паклитаксел. Лечение проводилось в рамках протоколов, разработанных в ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина” и в ГБУ Рязанской обл. “Областной клинический онкологический диспансер”. Материалы биопсии, полученные от пациенток до начала НАХТ, помещали в раствор IntactRNA (Евроген, Россия) и хранили при -20°C (после 24 ч инкубации при 4°C) до выделения ДНК. Пациентки были разделены на две группы: ответившие на НАХТ (pCR) и не ответившие на НАХТ (остаточная опухоль).

Экстракция ДНК

Геномную ДНК из биопсийных образцов выделяли по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Широкогеномный анализ метилирования ДНК

Широкогеномное бисульфитное секвенирование ДНК проводили по ранее описанной нами технологии XmaI-RRBS [23] на секвенаторе Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, США).

ДНК обрабатывали эндонуклеазой рестрикции XmaI, затем проводили частичное тупление липких концов метилированными цитозинами с использованием 3'–5' экзофрагмента Кленова и лигирование с адаптерами, содержащими метилированные остатки цитозина. Полученные таким образом библиотеки фрагментов ДНК селектировали по длине для получения фракции фрагментов с размером вставки 100–200 пн и проводили бисульфитную конверсию с использованием набора Qiagen EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Германия). Чтобы избежать неспецифического праймирования 3'-концов фрагментов ДНК в дальнейшей полимеразной реакции, терминировали их с помощью набора SNaPshot Multiplex Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Затем использовали РНКазу А (Sigma-Aldrich, США) и щелочную фосфатазу (SibEnzyme, Россия) для удаления РНК-носителя, используемого в протоколе EpiTect

Таблица 1. Клинико-патологические характеристики исследованных опухолей

Клинико-патологические характеристики		Количество образцов (%)
Возраст пациентки	≤47.82	16 (47.06)
	>47.82	18 (52.94)
Размер опухоли	T0	3 (8.82)
	T1	1 (2.94)
	T2	18 (52.94)
	T3	2 (5.88)
	T4	10 (29.41)
Статус лимфатических узлов	N0	14 (41.17)
	N1	9 (26.47)
	N2	2 (5.88)
	N3	9 (26.47)
Степень злокачественности	G2	15 (44.12)
	G3	19 (55.88)
Подгруппа ТНРМЖ	Ранний (T ₁₋₂ N ₀₋₁ M ₀)	19 (55.88)
	Местнораспространенный (T ₃₋₄ N ₀₋₃ M ₀ либо T ₁₋₄ N ₂₋₃ M ₀)	15 (44.12)
Ответ на НАХТ	pCR	15 (44.12)
	Остаточная опухоль	19 (55.88)

Bisulfite Kit и дефосфорилирования остаточных ddNTP соответственно. Конечные библиотеки амплифицировали с помощью ПЦР, количество циклов которой определяли на основании предварительных измерений методом количественной ПЦР. Полученные библиотеки очищали и количественно оценивали на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты секвенирования обрабатывали с помощью стандартного программного обеспечения Ion Torrent Suite. Для выравнивания полученных прочтений на последовательности генома человека GRCh37/hg19 с помощью выравнивателя Bowtie 2 [24] использовали программное обеспечение Bismark [25].

Определение маркеров-кандидатов in silico для МЧ-ПЦР

Чтобы обеспечить возможность использования панелей маркеров метилирования ДНК в формате метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР), мы разработали алгоритм дизайна виртуальных ампликонов на основе данных широкогеномного бисульфитного секвенирования ДНК. Критерии отбора участков генома для включения в качестве маркеров в диагностическую панель на основе МЧ-ПЦР были следующими: количество сайтов узнавания чувствительных к метилированию эндонуклеаз BstHNI (GCG/C) и/или HpaII (C/CGG) в ампли-

коне должно быть больше двух, а длина вставки ампликона – не более 100 пн. Диагностическую ценность индивидуальных маркеров метилирования ДНК характеризовали с помощью ROC-анализа [26]. Были выбраны маркеры с площадью под кривой (сvAUC) ≥ 0.75. Рассматривали только такие потенциальные маркеры метилирования, которые расположены в пределах или на расстоянии не более 2 тпн от генов, экспрессирующихся в нормальных тканях молочной железы.

Попарное расстояние между двумя сайтами узнавания чувствительных к метилированию эндонуклеаз вычисляли по формуле

$$D = \begin{cases} 0, & \text{if } D_{\text{physical}} < 100 \text{ and } D_{\text{manhattan}} < 0.1 \\ 1000, & \end{cases}$$

где D – расстояние между двумя сайтами, D_{physical} – физическое расстояние в нуклеотидах между двумя сайтами, $D_{\text{manhattan}}$ – нормированное манхэттенское расстояние между сайтами по значениям уровня метилирования в образцах [27]. Использование метода агломерации “полной связи” позволяет ограничить размер вставки ампликона (максимальное расстояние между двумя сайтами узнавания в ампликоне) заданным ограничением 100 пн.

Классификаторы строили с использованием логистической регрессии с пороговым значением по умолчанию 0.5 для определения полного патоморфологического ответа или остаточной опухоли как результата НАХТ. Для характеристики от-

дельных маркеров и их возможных комбинаций проводили кросс-валидацию с использованием пакета CaretR [28]. Для оценки качества классификации проводили ROC-анализ и строили ROC-кривые с использованием пакета cvAUCR [29]. Наилучшие показатели чувствительности и специфичности классификаторов определяли с помощью индекса Юдена. Все расчеты и графики выполняли с использованием языка программирования для статистической обработки данных R [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Широкогеномное бисульфитное секвенирование образцов ДНК из биоптатов трижды негативных опухолей молочной железы

Для 34 биоптатов ТНРМЖ, взятых до начала НАХТ, методом XmaI-RRBS получено в среднем 118 млн пн последовательностей с 500000–2000000 прочтений на образец. Средняя эффективность картирования последовательностей ДНК, конвертированной бисульфитом, на референсный геном составила 68%. Измерены уровни метилирования для 187 547 CpG-динуклеотидов, из которых 40981 (21.85%) и 23822 (12.7%) принадлежат сайтам узнавания чувствительных к метилированию эндонуклеаз HpaII и BstHNI соответственно. Полученный массив данных размещен в базе данных GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), идентификатор GSE123712.

Дизайн панели из ограниченного количества маркеров для предсказания эффективности НАХТ ТНРМЖ

Полученные результаты широкогеномного анализа метилирования ДНК использовали для идентификации геномных локусов, которые были бы одновременно (1) высокоинформативными с точки зрения различения опухолей, отвечающих и не отвечающих на НАХТ; и (2) потенциально пригодными для оценки с помощью МЧ-ПЦР — наиболее простого метода анализа маркеров метилирования в условиях клинических диагностических лабораторий. Оценка пригодности локуса для анализа методом МЧ-ПЦР проводили по следующим критериям: (1) расстояние между двумя крайними сайтами узнавания чувствительных к метилированию эндонуклеаз рестрикции HpaII и/или BstHNI в пределах потенциальной вставки ампликона — не более 100 пн и (2) наличие в пределах ампликона по крайней мере двух сайтов HpaII и/или BstHNI. Применяв указанные условия, мы получили 64803 CpG-динуклеотида, входящих в 12905 потенциальных ампликонов для дальнейшей разработки диагностических панелей с ограниченным количеством маркеров метилирования ДНК.

Чтобы оценить дискриминативный потенциал отдельных маркеров, выбранных описанным выше способом, мы рассчитали индивидуальную чувствительность, специфичность и площадь под ROC-кривой (cvAUC) для каждого потенциального ампликона скросс-валидацией при 100 случайных разбиениях на обучающую и тестирующую выборки в соотношении 4 : 1. По результатам были отобраны ампликоны, демонстрирующие наилучшее качество классификации (cvAUC \geq 0.75). Кроме того, рассматривали только те ампликоны, которые картируются в пределах или на расстоянии не более 2 тпн от генов, экспрессирующихся в нормальных тканях молочной железы (согласно порталу GTEx: <https://www.gtexportal.org>, дата обращения 15.11.2021). Описанным условиям удовлетворяют семь кандидатных ампликонов (табл. 2), которые были выбраны для дальнейшей разработки диагностической панели на основе маркеров метилирования ДНК.

Для выбора сочетаний ампликонов, обеспечивающих максимально качественную классификацию опухолей, были оценены все возможные комбинации ампликонов, составляющих потенциальные панели маркеров метилирования ДНК. Было получено 120 панелей ампликонов, которые различают опухоли с хорошим и плохим ответом на НАХТ. Значения cvAUC, полученные с использованием кросс-валидации, для 25 панелей с наилучшими потенциальными показателями диагностической ценности показаны на рис. 1, а.

Учитывая малые количества ДНК, доступные для анализа в случае использования в диагностике материала биопсии ткани опухоли, предпочтительным методом анализа метилирования ДНК в клинической лаборатории является МЧ-ПЦР, не требующая бисульфитной конверсии ДНК-этапа, сопряженного со значительными потерями материала. Метод МЧ-ПЦР может быть реализован как в полуколичественном формате — с определением продуктов по конечной точке гель-электрофорезом, так и в количественном формате (МЧ-кПЦР). В первом случае необходимым условием возможности интерпретации результатов является отсутствие метилирования маркерного локуса в одной из двух групп сравнения (например, отсутствие метилирования в норме и наличие аномального метилирования в опухоли). Мы провели оценку уровней метилирования областей покрытия семи ампликонов, выбранных выше для формирования панелей диагностических маркеров, по результатам широкогеномного анализа метилирования XmaI-RRBS. Полученные результаты (рис. 2) показывают, что техническим требованиям для выполнения МЧ-ПЦР в полуколичественном формате соответствуют ампликоны *ANKRD46*, *MXRA5* и *RUSC1/RUSC1-AS1*: локусы *ANKRD46* и *RUSC1/RUSC1-AS1* неметилированы в нормальных тканях молочной железы и в группе pCR, и аномально метилированы в группе с остаточной опухолью; а локус *MXRA5* неметилирован в нормальных тканях молочной железы и в группе с остаточной опухолью и гиперметилирован

Таблица 2. Индивидуальные характеристики виртуальных ампликонов, показавших наилучшее качество классификации ($cvAUC \geq 0.75$) трижды негативных опухолей молочной железы по чувствительности к неоадьювантной химиотерапии

Расположение и границы ампликона		Количество образцов с данными XmaI-RRBS		Средние уровни метилирования		ROC-характеристики индивидуальных ампликонов			Кол-во сайтов HpaII и/или BstNHI	
ген	координаты, GRCh37/hg19	в группе с pCR	в группе с остаточной опухолью	в группе с pCR	в группе с остаточной опухолью	cvAUC	чувствительность, %	специфичность, %		точность, %
<i>APCDD1L</i>	chr20: 57042425–57042462	13	17	0.72	0.88	0.78	62.2	88.9	77.1	6
<i>RUSC1_RUSC1-AS1</i>	chr1: 155294112–155294133	13	14	0.01	0.06	0.78	84.2	73.1	78.0	3
<i>MYO15B</i>	chr17: 73584085–73584171	13	15	0.11	0.41	0.77	76.3	80.3	78.6	4
<i>EXOC2</i>	chr6: 694648–694740	12	16	0.91	0.97	0.77	89.7	58.9	72.5	4
<i>THBS2</i>	chr6: 169634923–169634948	13	16	0.98	0.92	0.75	60.8	84.9	74.3	4
<i>MXRA5</i>	chrX: 3263383–3263461	13	17	0.14	0.04	0.75	73.4	70.0	71.5	4
<i>ANKRD46</i>	chr8: 101571816–101571913	13	16	0.02	0.07	0.75	77.4	68.3	72.3	3

Таблица 3. Параметры логистической регрессии для панели маркеров метилирования *ANKRD46*, *MXRA5* и *RUSC1/RUSC1-AS1* с точки зрения предсказания эффективности неоадьювантной химиотерапии трижды негативных опухолей молочной железы

Фактор	Значение коэффициента в модели (SD)
B_0 (свободный коэффициент)	–1.66 (± 1.02)
<i>RUSC1/RUSC1-AS1</i>	60.83 (± 35.34)
<i>MXRA5</i>	–1.84 (± 5.87)
<i>ANKRD46</i>	27.51 (± 16.98)

в группе pCR. Значения $cvAUC$ панелей, составленных из этих ампликонов, показаны на рис. 1, б.

Результаты ROC-анализа и параметры логистической регрессии для панели, включающей одновременно маркеры метилирования *ANKRD46*, *MXRA5* и *RUSC1/RUSC1-AS1* представлены на рис. 3 и в табл. 3 соответственно.

Гены *APCDD1L*, *RUSC1/RUSC1-AS1*, *MYO15B*, *EXOC2*, *THBS2*, *MXRA5* и *ANKRD46*, уровни метилирования которых показали в нашем исследовании наилучшее качество классификации трижды негативных опухолей молочной железы по чувствительности к неоадьювантной химиотерапии, ранее изучались в контексте вовлеченности нарушений их экспрессии в этиопатогенез злокачественных новообразований и возможностей ис-

пользования в качестве диагностических маркеров в онкологии. Так, экспрессия *APCDD1L* рассматривается как высокоинформативный маркер выживаемости при 12 различных типах рака [31]. Для гена *RUSC1-AS1* была показана высокая экспрессия в тканях и клеточных линиях рака молочной железы, способствующая прогрессированию опухолей посредством взаимодействия с *CDKN1A* и *KLF2*. Уровень *RUSC1-AS1* положительно коррелировал с размером опухоли и клиническими стадиями и отрицательно коррелировал с выживаемостью пациенток с РМЖ [32]. *THBS2* представляет собой секретируемый гомотримерный гликопротеин, который принадлежит к семейству тромбоспондинов и опосредует взаимодействия клеток между собой и с межклеточным матриксом. По данным Cancer Genet-

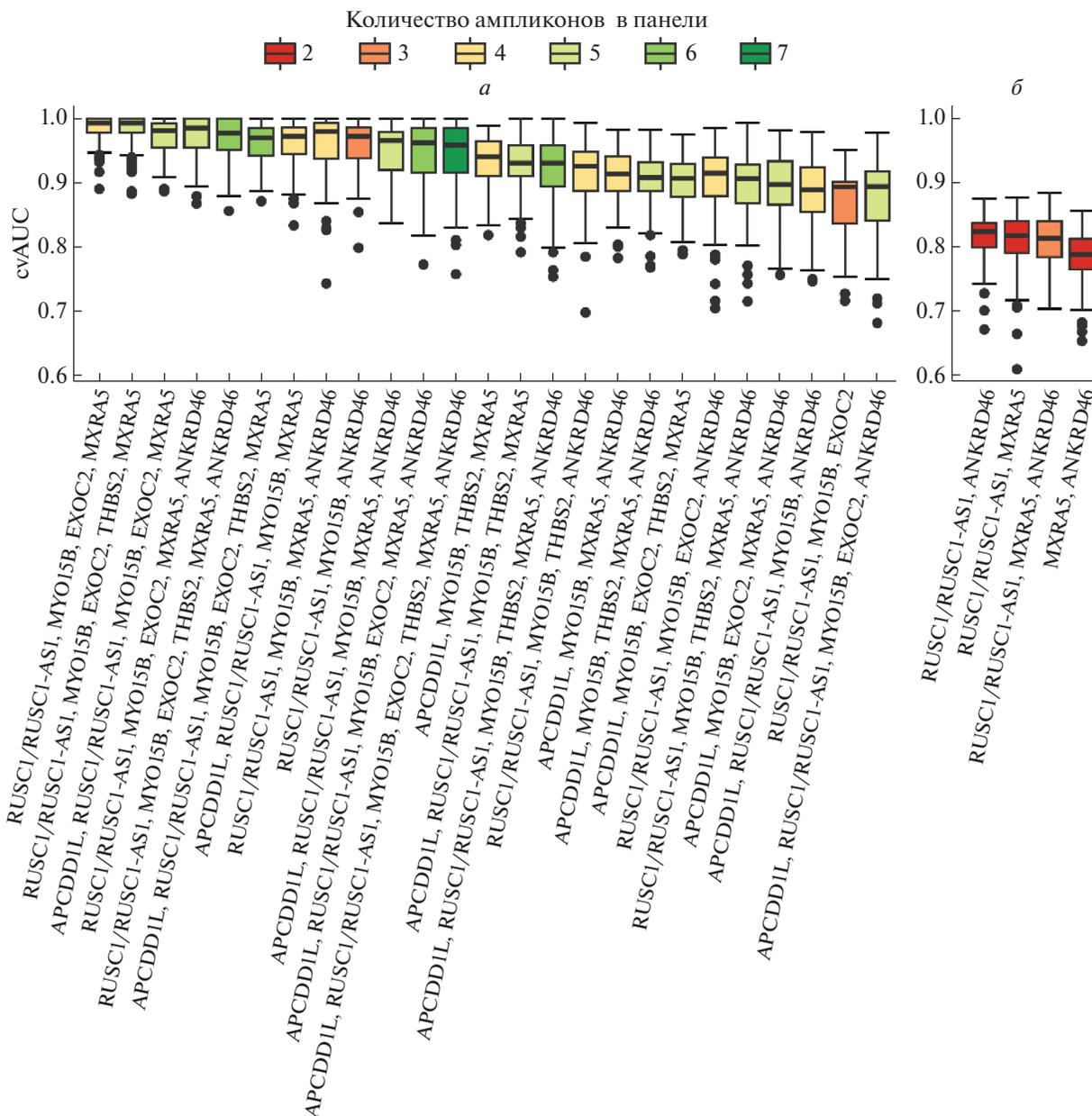


Рис. 1. *a* – значения cvAUC (AUC, полученные с использованием кросс-валидации) для 25 лучших комбинаций ампликонов в рамках панелей маркеров метилирования ДНК для предсказания чувствительности трижды негативного рака молочной железы к НАХТ. *б* – значения cvAUC для панелей, состоящих из маркеров, удовлетворяющих требованиям метилчувствительной ПЦР. По оси абсцисс – различные комбинации ампликонов. Медианные значения cvAUC обозначены горизонтальными черными линиями в прямоугольниках.

icsWeb, THBS2 – мощный ингибитор роста опухоли и ангиогенеза [33]. MXRA5 – один из белков, вовлеченных в ремоделирование матрикса. Для гена *MXRA5* выявлена высокая частота мутаций при ТНРМЖ – значимо выше, чем при раке молочной железы в целом (точный тест Фишера, $P = 0.04$) [34]. В одном из исследований были выявлены различия в метилировании гена *MXRA5* между пограничными и злокачественными филоидическими опухолями (редкими опухолями молочной железы) [35]. М. Reingold с соавт. об-

наружили снижение экспрессии гена *MXRA5* в метастазах РМЖ по сравнению с первичной опухолью [36].

ANKRD46 – однопроходный мембранный белок с неясной функцией. Было показано, что важным регулятором мРНК *ANKRD46* и уровня белка ANKRD46 в клетках РМЖ является miR-21. В свою очередь miR-21 подавляет рост и пролиферацию клеток РМЖ [37]. Таким образом, эпигенетическая регуляция гена *ANKRD46* может быть важным звеном в процессах канцерогенеза.

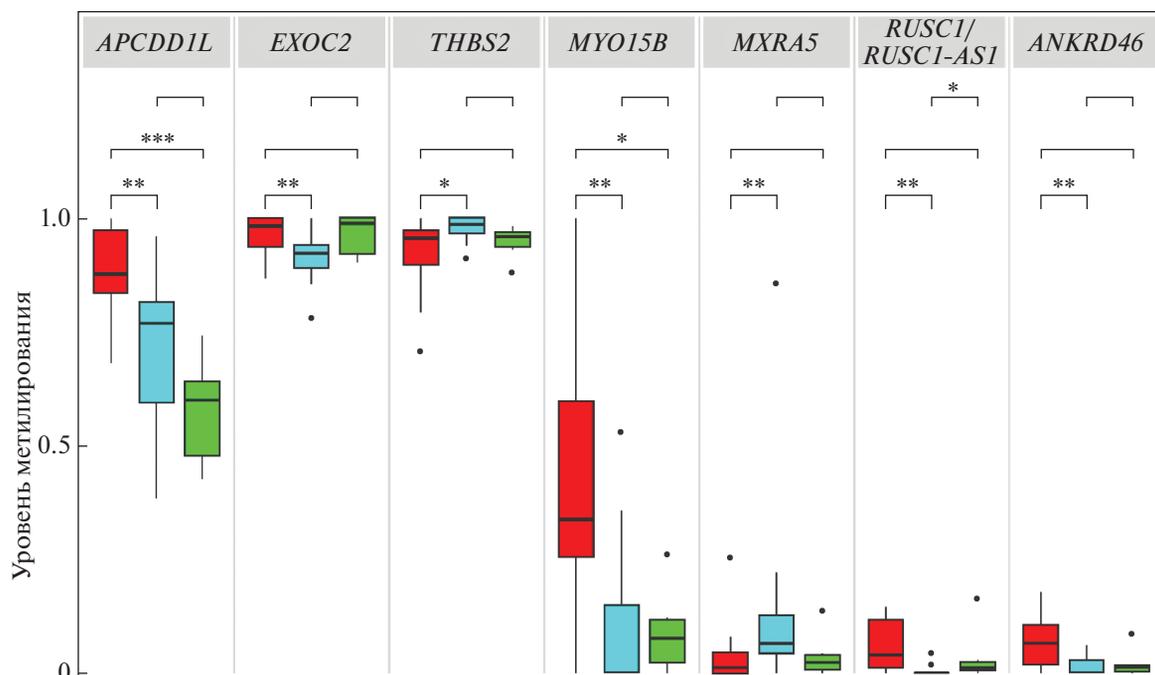


Рис. 2. Уровни метилирования (по ординате) семи ампликонов, выбранных в настоящей работе для формирования панелей маркеров метилирования ДНК, различающих ответ трижды негативных опухолей молочной железы на НАХТ. Красные, голубые и зеленые прямоугольники – группы образцов опухолей с остаточной опухолью, с pCR и образцов ткани нормальной молочной железы соответственно. Различия в уровне метилирования между группами (*U*-критерий Манна–Уитни): * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

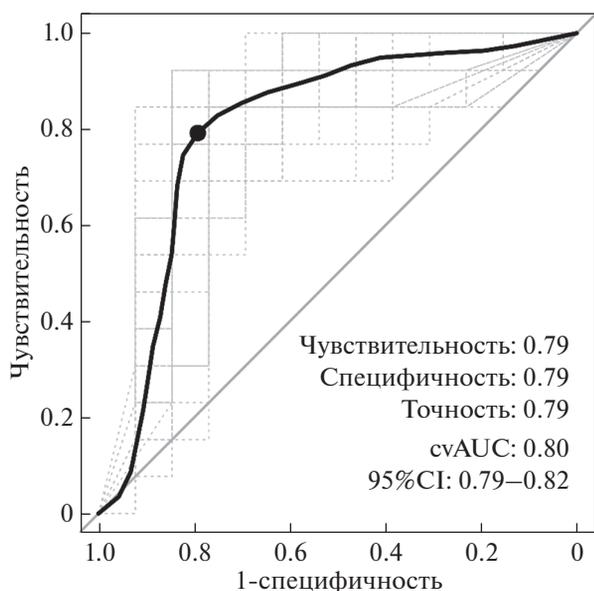


Рис. 3. ROC-характеристики панели, включающей маркеры метилирования *ANKRD46*, *MXRA5* и *RUSC1/RUSC1-AS1*.

Обращает на себя внимание тот факт, что анализ данных проекта TCGA-BRCA выявил связь между амплификацией *ANKRD46* и гистологической стадией инвазивной протоковой карциномы [38].

Таким образом, для ряда маркеров из нашего набора другими авторами также выявлены ассоциации с особенностями фенотипа опухоли и/или ее чувствительности к химиотерапии. Это наблюдается несмотря на непредвзятый отбор (на основании результатов широкогеномного анализа метилирования ДНК) маркеров чувствительности РМЖ к НАХТ, проведенный нами в рамках настоящего исследования. Данное наблюдение позволяет ожидать, что формируемые нами системы маркеров аномального метилирования ДНК для определения потенциальной чувствительности опухолей молочной железы к НАХТ покажут высокую диагностическую ценность в клинических испытаниях. Поскольку они не только базируются на наиболее информативных маркерах, непредвзято выявленных в разведочной выборке, но и ассоциированы с биологическими функциями, нарушения которых могут приводить к изменению ответа опухолей на химиотерапию.

Авторы благодарят Центр коллективного пользования (ЦКП) “Геном” ФГБНУ “МГНЦ” за помощь в выполнении высокопроизводительного секвенирования ДНК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-15-00430, <https://rscf.ru/project/18-15-00430>.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стан-

дартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Echeverria G.V., Ge Z., Seth S. et al.* Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state // *Sci. Translational Med.* 2019. V. 11. № 488. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav0936>
2. *Schmid P., Cortes J., Pusztai L. et al.* Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer // *New Engl. J. Med.* 2020. V. 382. № 9. P. 810–821. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910549>
3. *Pandy J.G.P., Balolong-Garcia J.C., Cruz-Ordinario M.V.B., Que F.V.F.* Triple negative breast cancer and platinum-based systemic treatment: a meta-analysis and systematic review // *BMC Cancer.* 2019. V. 19. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6253-5>
4. *Penault-Llorca F., Viale G.* Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: A clinical perspective // *Ann. Oncol.* 2012. V. 23. P. vi19–vi22. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds190>
5. *Carey L.A., Dees E.C., Sawyer L. et al.* The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. № 8. P. 2329–2334. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>
6. *Weiss A., Bashour S.I., Hess K. et al.* Effect of neoadjuvant chemotherapy regimen on relapse-free survival among patients with breast cancer achieving a pathologic complete response: An early step in the de-escalation of neoadjuvant chemotherapy // *Breast Cancer Res.* 2018. V. 20. № 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0945-7>
7. *Gamucci T., Pizzuti L., Sperduti I. et al.* Neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: A multicentric retrospective observational study in real-life setting // *J. Cell. Physiol.* 2018. V. 233. № 3. P. 2313–2323. <https://doi.org/10.1002/jcp.26103>
8. *Sikov W.M., Berry D.A., Perou C.M. et al.* Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance) // *J. clinical oncology.* 2015. V. 33. № 1. P. 13. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.0572>
9. *Lee H.J., Park I.A., Song I.H. et al.* Comparison of pathologic response evaluation systems after anthracycline with/without taxane-based neoadjuvant chemotherapy among different subtypes of breast cancers // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 9. P. e0137885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137885>
10. *Biswas T., Efirid J.T., Prasad S. et al.* The survival benefit of neoadjuvant chemotherapy and pCR among patients with advanced stage triple negative breast cancer // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 68. P. 112712. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22521>
11. *Fasching P.A., Gaß P., Hein A.* Neoadjuvant treatment of breast cancer—advances and limitations // *Breast Care.* 2016. V. 11. № 5. P. 313. <https://doi.org/10.1159/000452463>
12. *Paik S., Shak S., Tang G. et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer // *New Engl. J. Med.* 2004. V. 351. № 27. P. 2817–2826. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041588>
13. *Prat A., Galvan P., Jimenez B. et al.* Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy using core needle biopsy samples with the prosigna assay // *Clin. Cancer Res.* 2016. V. 22. № 3. P. 560–566. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0630>
14. *Van't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J. et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer // *Nature.* 2002. V. 415. № 6871. P. 530–536. <https://doi.org/10.1038/415530a>
15. *Filipits M., Rudas M., Jakesz R. et al.* A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 18. P. 6012–6020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0926>
16. *Whitworth P., Stork-Sloots L., de Snoo F.A. et al.* Chemosensitivity predicted by Blue Print 80-gene functional subtype and Mamma Print in the prospective Neoadjuvant breast registry symphony trial (NBRST) // *Ann. of Surgical Oncol.* 2014. V. 21. № 10. P. 3261–3267. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3908-y>
17. *Dubsky P.C., Fesl C., Singer C. et al.* The EndoPredict score predicts residual cancer burden after neoadjuvant chemotherapy and after neoadjuvant endocrine therapy in HR+/HER2-breast cancer patients from ABCSG 34 // *Proc. of the General Session Abstracts. Am. Association for Cancer Res.* 2018. V. 78. № 4. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS17-GS6-04>
18. *Nunes R., De Snoo F., Stork-Sloots L. et al.* Race and response to neoadjuvant chemotherapy according to MammaPrint risk // *J. Clin. Oncol.* 2019. V. 37. P. 578–578. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.578
19. *Pease A.M., Riba L.A., Gruner R.A. et al.* Oncotype DX® recurrence score as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy // *Ann. of Surgical Oncol.* 2019. V. 26. № 2. V. 366–371. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-07107-8>
20. *Bertucci F., Finetti P., Viens P., Birnbaum D.* EndoPredict predicts for the response to neoadjuvant chemotherapy in ER-positive, HER2-negative breast cancer // *Cancer Letters.* 2014. V. 355. № 1. P. 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.014>
21. *Tanas A.S., Sigin V.O., Kalinkin A.I. et al.* Genome-wide methylotyping resolves breast cancer epigenetic heterogeneity and suggests novel therapeutic perspectives // *Epigenomics.* 2019. V. 11. № 6. P. 605–617. <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0213>
22. *Stefansson O.A., Moran S., Gomez A. et al.* A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes // *Mol. Oncol.* 2015. V. 9. № 3. P. 555–568. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.10.012>
23. *Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B. et al.* Rapid and affordable genome-wide bisulfite DNA sequencing by XmaI-reduced representation bisulfite sequencing // *Epigenomics.* 2017. V. 9. № 6. P. 833–847. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0031>

24. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat. Methods* 2012. V. 9. P. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
25. Krueger F., Andrews S.R. Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. № 11. P. 1571–1572. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167>
26. Yang S., Berdine G. The receiver operating characteristic (ROC) curve // *Southwest Respir. Crit. Care Chronicles* 2017. V. 5. P. 34–36. <https://doi.org/10.12746/swrccc.v5i19.391>
27. Clifford H., Wessely F., Pendurthi S., Emes R.D. Comparison of clustering methods for investigation of genome-wide methylation array data // *Front. Genet.* 2011. V. 2. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00088>
28. Kuhn M. Building predictive models in R using the caret package // *J. Stat. Software*. 2008. V. 28. № 1. P. 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i05>
29. LeDell E., Petersen M., van der Laan M., LeDell M. Package ‘cvAUC’. January 17, 2022. <https://cran.r-project.org/web/packages/cvAUC/cvAUC.pdf>
30. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
31. Vasaikar S.V., Straub P., Wang J., Zhang B. LinkedOmics: Analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types // *Nucl. Ac. Res.* 2018. V. 46. № D1. P. D956–D963. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1090>
32. Hu C.C., Liang Y.-W., Hu J.-L. et al. LncRNA RUSC1-AS1 promotes the proliferation of breast cancer cells by epigenetic silencing of KLF2 and CDKN1A // *Eur. Rev. Med. and Pharmacol. Sci.* 2019. V. 23. № 15. P. 6602–6611. https://doi.org/10.26355/eurrev_201908_18548
33. Cotterill S. THBS2, Cancer Genetics Web. <http://www.cancer-genetics.org/THBS2.htm>
34. Wang X. Explore genomic profiles for triple-negative breast cancer to discover drug targets // *Oncogenomics*. 2019. P. 423–440. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004321>
35. Collins L.C. Contemporary classification of breast cancer // *Pathology*. 2018. V. 50. P. S8–S9. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.12.018>
36. Reyngold M., Turcan S., Giri D. et al. Remodeling of the methylation landscape in breast cancer metastasis // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 8. P. e103896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103896>
37. Yan L.X., Wu Q.N., Zhang Y. et al. Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth // *Breast Cancer Res.* 2011. V. 13. № 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.1186/bcr2803>
38. Ping Z., Xia Y., Shen T. et al. A microscopic landscape of the invasive breast cancer genome // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep27545>

Design of Marker Panels for Prediction of Neoadjuvant Chemotherapy Response of Triple-Negative Breast Tumors Based on the Results of Genome-Wide DNA Methylation Screening

A. I. Kalinkin^a, V. O. Sigin^a, E. O. Ignatova^b, M. A. Frolova^b, E. B. Kuznetsova^{a, c},
I. Y. Vinogradov^d, M. I. Vinogradov^e, I. I. Vinogradov^{d, e}, M. V. Nemtsova^{a, c},
D. V. Zaletaev^{a, c}, A. S. Tanas^a, and V. V. Strelnikov^{a, *}

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

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

^cSechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

^dRegional Clinical Oncology Dispensary, Ryazan, 390046 Russia

^eRyazan State Medical University, Ryazan, 390026 Russia

*e-mail: vstrel@list.ru

The rate of complete pathomorphological response to neoadjuvant chemotherapy (NACT) in triple-negative breast cancer is low and ranges from 30 to 40%. At the same time, to date, there are practically no predictive markers of the effectiveness of NACT for this subtype of tumors. We suggest an approach to the identification of prognostic epigenetic markers of the sensitivity of triple-negative breast tumors to NACT, which can be diagnosed using methylation sensitive PCR. We have selected markers from the XmaI-RRBS genome-wide bisulfite DNA sequencing dataset performed for tumor biopsies obtained from 34 patients before the initiation of NACT, and for 6 samples of normal breast tissue. The patients were divided into groups of responders (complete pathological response) or non-responders (presence of residual tumor). CpG dinucleotides were identified, the differential methylation of which distinguish samples of triple-negative tumors with different sensitivity to NACT, and a panel of methylation markers was developed, including regions of CpG islands of the *RUSC1/RUSC1-AS1*, *MXRA5*, and *ANKRD46* genes, the design of which meets the requirements for the test systems based on methylation sensitive PCR. The estimated diagnostic accuracy of a panel of these three methylation markers is 0.79 (cvAUC = 0.80, 95%CI: 0.79–0.82).

Keywords: triple-negative breast cancer, DNA methylation, genome-wide bisulfite sequencing, XmaI-RRBS, neoadjuvant chemotherapy, methylation sensitive PCR.

УДК 616-006.6

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ-КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ PTEN/PI3K/AKT В РАЗВИТИИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2022 г. И. Р. Гилязова¹, *, #, Е. А. Иванова¹, **, #, М. А. Бермишева¹, М. В. Логинова², Д. Д. Асадуллина¹, Р. Р. Ишемгулов², А. Т. Мустафин², В. Н. Павлов², Э. К. Хуснутдинова¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450008 Россия

*e-mail: gilyasova_irina@mail.ru

**e-mail: lissa987@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.12.2021 г.

После доработки 02.02.2022 г.

Принята к публикации 08.02.2022 г.

Цель настоящего исследования – поиск ассоциаций генотипов и аллелей полиморфных локусов генов PTEN/PI3K/AKT пути: rs2494750 гена AKT1, rs2735343, rs2299941, rs10490920 гена PTEN, rs17878362 гена TP53 и rs2699887 гена PIK3CA с риском развития рака предстательной железы. В результате сравнения частот аллелей и генотипов между общей выборкой больных РПЖ и контрольной группой здоровых индивидов было установлено, что генотип CG полиморфного локуса rs2735343 гена PTEN ассоциирован с повышением риска развития заболевания (OR = 1.38, 95% CI = 1.02–1.87, $p = 0.04$), тогда как генотип GG демонстрировал снижение частоты встречаемости в группе больных по сравнению с контролем (OR = 0.74, 95% CI = 0.55–0.99, $p = 0.05$). При стратификации группы пациентов с РПЖ в зависимости от гистопатологических характеристик было выявлено, что аллель rs2735343*С ассоциирован с повышением риска двустороннего поражения обеих долей простаты и инвазии семенных пузырьков. С учетом дальнейших валидирующих исследований результаты настоящей работы могут быть использованы при создании панели молекулярных маркеров прогноза заболевания и оценки опухолевых характеристик.

Ключевые слова: рак предстательной железы, полиморфные варианты генов, PTEN/PI3K/AKT путь.

DOI: 10.31857/S0016675822070050

Рак предстательной железы (РПЖ) – злокачественное новообразование, возникающее из эпителия альвеолярно-клеточных элементов предстательной железы. По частоте встречаемости злокачественных опухолей среди мужского населения РПЖ занимает второе место. Ежегодно в мире выявляется около одного миллиона новых случаев данного заболевания [1]. Основной причиной смерти при раке предстательной железы является метастазирование и формирование кастрат-резистентной формы заболевания, которая не поддается лечению с использованием существующих на сегодняшний день терапевтических тактик. Рак предстательной железы имеет широкий диапазон клинических проявлений, от локализованного и вялотекущего заболевания до агрессивных форм, сопровождающихся метастазированием. Наиболее часто используемыми маркерами для

диагностики и мониторинга РПЖ являются простат-специфичный антиген (ПСА), патологическая шкала Глисона, патологическая стадия и объем опухоли [2]. Тем не менее данные маркеры не всегда позволяют осуществить своевременную диагностику и спрогнозировать течение заболевания. Геномные маркеры в этом отношении имеют крайне высокие перспективы, позволяя оценить прогноз, стратифицировать опухоли по степени риска, контролировать клинический ответ на терапию и многое другое [3].

Одним из наиболее часто подвергающихся нарушению регуляции путей передачи клеточных сигналов при раке предстательной железы является путь фосфоинозитид-3-киназы/серин-треонинкиназы (PI3K/AKT). Известно, что PI3K способен активировать путь AKT/mTOR, основной функцией которого является ингибирование апоптоза и повышение выживаемости клеток, что, в свою очередь, может привести к стимуляции ро-

Авторы внесли равный вклад.

ста опухоли. Известно также, что путь PI3K/AKT выполняет центральную функцию в эпителиально-мезенхимальном переходе – ключевом процессе прогрессии и метастазирования опухоли [4]. Регуляцию PI3K/AKT осуществляет гомолог фосфатазы и тензина PTEN, проявляя свойства классического опухолевого супрессора [2]. В свою очередь, транскрипцию PTEN активирует p53, известный регулятор клеточного цикла. Напротив, индуцированное стимулами увеличение транскрипции PTEN и трансляции белка приводит к индукции p53 [5].

Однонуклеотидные полиморфные варианты (SNP) являются важными вариациями ДНК, создающими разнообразие среди индивидуумов и обуславливающими наличие различных фенотипов, признаков и заболеваний [6]. Многочисленные исследования показали, что существует связь между полиморфными вариантами генов, входящих в путь PI3K/PTEN/AKT, и развитием злокачественных опухолей, включая РПЖ [7–9]. На сегодняшний день среди генов пути PI3K/PTEN/AKT существует порядка тысячи SNP, расположенных в кодирующей области. Отмечено, что среди данных SNP существуют функциональные полиморфные варианты, способные влиять на канцерогенез, модулируя транскрипционную активность генов или изменяя сайты связывания микроРНК [10]. Так, например, при наличии аллеля *T* полиморфного варианта rs2295080 гена *mTOR* наблюдаются повышенные уровни мРНК *mTOR* по сравнению с аллелем *G* у пациентов с почечно-клеточной карциномой и колоректальным раком. Другой полиморфный вариант rs2536, расположенный в 3'-UTR области *mTOR*, способен влиять на связывание с микроРНК при наличии альтернативного аллеля [11]. В гене *PTEN* ранее обнаружен полиморфный вариант rs701848, расположенный в непосредственной близости к 3'-области, где сосредоточены сайты связывания микроРНК. В многочисленных исследованиях показано, что rs701848 ассоциирован с риском развития различных типов злокачественных опухолей, в том числе с раком почки и предстательной железы [12, 13]. В гене *AKT1* одним из хорошо изученных полиморфных вариантов является rs2494752, расположенный в 5'-UTR области. Предполагают, что данный полиморфный вариант может модулировать транскрипцию и трансляцию *AKT1*, поскольку расположен в области связывания фактора транскрипции [10]. Другой полиморфный вариант rs2494750 гена *AKT1* связывают с повышением РПЖ-специфичной смертности у носителей аллеля *G* [14]. Существуют сведения о корреляции некоторых полиморфных вариантов генов пути PI3K/PTEN/AKT с токсическими эффектами химиотерапии. Так, например, отмечена ассоциация гомозиготного генотипа rs2699887**GG* гена *PIK3CA* с повышением риска возникновения токсиче-

ских эффектов при терапии на основе препаратов платины у пациентов с раком легких, тогда как носительство аллеля rs2299939**C* в гене *PTEN*, напротив, снижает риск серьезных побочных эффектов [15].

Учитывая важную роль полиморфных вариантов генов-компонентов сигнального пути PTEN/PI3K/AKT в формировании предрасположенности к различным типам злокачественных опухолей, целью настоящего исследования являлся поиск ассоциаций генотипов и аллелей полиморфных локусов rs2494750 гена *AKT1*, rs2735343, rs2299941, rs10490920 гена *PTEN*, rs17878362 гена *TP53* и rs2699887 гена *PIK3CA* с риском развития рака предстательной железы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы образцы ДНК, выделенной из венозной крови пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом “рак предстательной железы” из Республики Башкортостан, находящихся на стационарном лечении в Клинике Башкирского государственного медицинского университета. Забор образцов проводился сотрудниками кафедры урологии с курсом ИПО в соответствии с этическими стандартами биоэтического комитета, разработанными Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека”. У всех обследуемых лиц образцы крови были получены с их информированного согласия. Диагноз был поставлен на основании данных клинического и гистологического обследования.

В исследование включены образцы ДНК 394 пациентов с РПЖ и 342 здоровых неродственных жителей Республики Башкортостан, не имеющих злокачественных новообразований, по возрасту, полу и этнической принадлежности и территориальному проживанию соответствующих группе пациентов. Средний возраст пациентов составил 66.7 лет (от 37 до 89 лет на момент постановки диагноза).

Геномную ДНК выделяли из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [16]. Концентрация и чистота выделенной ДНК оценивались путем измерения оптической плотности с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Определение генотипов полиморфных локусов осуществлялось с помощью метода дискриминации аллелей TaqMan. Анализ аллельной дискриминации проводили с использованием прибора CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad). Результаты каждой аллельной дискриминации были проанализированы с использованием программ-

Таблица 1. Клинико-патологическая характеристика пациентов с РПЖ и индивидов контрольной группы

Показатель	Больные (<i>n</i> = 394)	Контроль (<i>n</i> = 342)
Возраст (mean ± SD), годы	66.7 ± 0.37	58.7 ± 0.51
Стадия по TNM, <i>n</i> (%)		—
I–II	201 (51.0)	—
III–IV	193 (49.0)	—
Уровень ПСА, <i>n</i> (%)		—
0.0–4.0	48 (12.2)	342 (100.0)
4.1–10.0	177 (45.0)	0
>10	169 (42.8)	0
Индекс Глисона менее 8 баллов	287 (72.8)	—
Индекс Глисона более 8 баллов	107 (27.2)	—
Гистопатологическая характеристика опухоли, <i>n</i> (%)		—
Инвазия семенных пузырьков	49 (12.7)	—
Двустороннее поражение долей предстательной железы	33 (9.4)	—

ного обеспечения CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad).

Статистическая обработка данных

При попарном сравнении частот генотипов и аллелей в группах больных и здоровых лиц при изучении полиморфных вариантов использовался критерий χ^2 (*p*) для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йетса на непрерывность и программное обеспечение SNPStats. В случае статистически значимых различий силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов (Odds Ratio, OR), OR > 1 рассматривали как положительную ассоциацию с аллелем или генотипом (фактор повышенного риска) и OR < 1 – как отрицательную ассоциацию (фактор пониженного риска). Экспоненту отдельного коэффициента регрессии интерпретировали как OR для логистической модели с расчетом 95%-ного доверительного интервала (95%CI). Все статистические тесты выполнялись для двустороннего уровня значимости, статистически значимыми считали различия при *p*-value < 0.05, где *p*-value – уровень значимости критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На основании данных литературных источников в исследование были включены следующие полиморфные варианты генов-компонентов сигнального пути PTEN/PI3K/AKT: rs2494750 гена *AKT1*, rs2735343, rs2299941, rs10490920 гена *PTEN*, rs17878362 гена *TP53* и rs2699887 гена *PIK3CA*. Клинико-патологические характеристики включенных в исследование пациентов и индивидов контрольной группы представлены в табл. 1. В ре-

зультате сравнения частот аллелей и генотипов между общей выборкой больных РПЖ и контрольной группой здоровых индивидов было установлено, что генотип *CG* полиморфного локуса rs2735343 гена *PTEN* ассоциирован с повышением риска развития заболевания (OR = 1.38, 95%CI 1.02–1.87, *p* = 0.04), тогда как генотип *GG* демонстрировал снижение частоты встречаемости в группе больных по сравнению с контролем (OR = 0.74, 95%CI 0.55–0.99, *p* = 0.05) (табл. 2). При стратификации группы пациентов с РПЖ в зависимости от гистопатологических характеристик было выявлено, что аллель rs2735343**C* ассоциирован с повышением риска двустороннего поражения обеих долей простаты и инвазии семенных пузырьков (табл. 3 и 4).

В результате анализа моделей наследования с использованием программного обеспечения SNPStats различия были выявлены для доминантной и сверхдоминантной моделей полиморфного локуса rs2735343 гена *PTEN* (табл. 5). Однако только для сверхдоминантной модели различия достигали установленного порога статистической значимости *p*-value < 0.05. В обеих моделях отмечается ассоциация с повышением риска развития РПЖ для гетерозиготного генотипа *CG*, предполагая, что для модуляции риска развития заболевания необходимо присутствие обоих альтернативных аллелей.

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов rs2494750 гена *AKT1*, rs17878362 гена *TP53* и rs2699887 гена *PIK3CA* в группах пациентов и контроле с учетом этнической принадлежности и клинико-патологических характеристик опухоли статистически значимых различий не выявил.

Таблица 2. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs2735343 гена *PTEN* в группе пациентов с РПЖ и контроле

Генотипы, аллели	Больные		Контроль		χ^2	<i>p</i> -value	OR	95%CI
	<i>n</i>	$\pi \pm Sp$ (95%CI)	<i>n</i>	$\pi \pm Sp$ (95%CI)				
CC	37	9.64 ± 1.51 (6.88–13.04)	34	9.84 ± 1.61 (6.89–13.5)	0	0.9	0.96	0.59–1.57
CG	162	42.19 ± 2.52 (37.19–47.3)	118	34.43 ± 2.57 (29.39–39.73)	4.19	0.04	1.38	1.02–1.87
GG	185	48.18 ± 2.55 (43.08–53.3)	190	55.74 ± 2.69 (50.29–61.09)	3.65	0.05	0.74	0.55–0.99
C	236	31.68 ± 1.7 (28.35–35.15)	185	30.28 ± 1.86 (26.65–34.09)	0.25	0.59	1.06	0.84–1.34
G	509	68.32 ± 1.7 (64.85–71.65)	426	69.72 ± 1.86 (65.91–73.35)	0.25	0.59	0.93	0.74–1.18

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4 и 5: OR – отношение шансов, 95%CI – нижняя и верхняя границы 95%-ного доверительного интервала для OR, *p*-value – уровень значимости критерия.

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs2735343 гена *PTEN* у пациентов с РПЖ с учетом статуса поражения обеих долей предстательной железы

Генотипы, аллели	Есть двустороннее поражение обеих долей		Нет двустороннего поражения обеих долей		χ^2	<i>p</i> -value	OR	95%CI
	<i>n</i>	$\pi \pm Sp$ (95%CI)	<i>n</i>	$\pi \pm Sp$ (95%CI)				
CC	5	15.15 ± 6.24 (5.11–31.9)	32	9.12 ± 1.54 (6.32–12.63)	0.66	0.34	1.78	0.64–4.93
CG	18	54.55 ± 8.67 (36.35–71.89)	144	41.03 ± 2.63 (35.83–46.37)	1.74	0.14	1.72	0.84–3.53
GG	10	30.3 ± 8 (15.59–48.71)	175	49.86 ± 2.67 (44.5–55.21)	3.87	0.04	0.43	0.20–0.94
C	28	42.42 ± 6.08 (30.34–55.21)	208	29.63 ± 1.72 (26.27–33.16)	4.06	0.036	1.75	1.05–2.93
G	38	57.58 ± 6.08 (44.79–69.66)	494	70.37 ± 1.72 (66.84–73.73)	4.06	0.036	0.57	0.34–0.95

ОБСУЖДЕНИЕ

Рак предстательной железы – это гетерогенная патология, вероятность обнаружения которой в течение жизни составляет около 20% [17]. Несмотря на повышение эффективности диагностических мероприятий, по-прежнему остро стоит вопрос об идентификации маркеров ранней диагностики РПЖ, а также маркеров, которые можно использовать для классификации опухолей, оценки их агрессивности и стратификации пациентов для специфической терапии.

В настоящем исследовании были проанализированы полиморфные варианты, расположенные

в генах – компонентах сигнального пути PTEN/PI3K/AKT, и обнаружены ассоциации полиморфного варианта rs2735343 гена *PTEN* с риском развития рака предстательной железы.

Полиморфный вариант гена *PTEN* rs2735343 расположен в интронной области и способен повлиять на сплайсинг, экспрессию белка и следовательно на регуляцию клеточного цикла. Ранее было показано, что носители гомозиготного генотипа *GG* имеют больший риск развития злокачественных опухолей, в том числе рака предстательной железы. Гетерозиготный генотип (*CG*) в этих случаях может создавать нефункциональный

Таблица 4. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs2735343 гена *PTEN* у пациентов с РПЖ с учетом инвазии семенных пузырьков

Генотипы, аллели	Есть инвазия		Нет инвазии		χ^2	<i>p</i> -value	OR	95%CI
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm Sp$ (95%CI)	<i>n</i>	$\bar{x} \pm Sp$ (95%CI)				
CC	6	12.24 ± 4.68 (4.63–27.77)	31	9.25 ± 1.58 (6.37–12.88)	0.16	0.45	1.36	0.54–3.47
CG	27	55.1 ± 7.11 (40.23–69.33)	135	40.3 ± 2.68 (35–45.77)	3.25	0.06	1.81	0.99–3.32
GG	16	32.65 ± 6.7 (19.95–47.54)	169	50.45 ± 2.73 (44.96–55.93)	4.72	0.02	0.47	0.25–0.89
C	39	39.8 ± 4.94 (30.04–50.18)	197	29.4 ± 1.76 (25.98–33.01)	3.86	0.046	1.58	1.03–2.46
G	59	60.2 ± 4.94 (49.82–69.96)	473	70.6 ± 1.76 (66.99–74.02)	3.86	0.046	0.63	0.41–0.97

Таблица 5. Ассоциация генотипов полиморфного варианта rs2735343 гена *PTEN* с риском развития рака предстательной железы

Модель	Генотип	Контроль	Больные	OR (95%CI)	<i>p</i> -value	AIC	BIC
Кодоминантная	<i>G/G</i>	190 (55.6%)	185 (48.2%)	1.00	0.095	1005.3	1019.1
	<i>C/G</i>	118 (34.5%)	162 (42.2%)	1.41 (1.03–1.93)			
	<i>C/C</i>	34 (9.9%)	37 (9.6%)	1.12 (0.67–1.86)			
Доминантная	<i>G/G</i>	190 (55.6%)	185 (48.2%)	1.00	0.047	1004.1	1013.2
	<i>C/G-C/C</i>	152 (44.4%)	199 (51.8%)	1.34 (1.00–1.80)			
Рецессивная	<i>G/G-C/G</i>	308 (90.1%)	347 (90.4%)	1.00	0.89	1008	1017.2
	<i>C/C</i>	34 (9.9%)	37 (9.6%)	0.97 (0.59–1.58)			
Сверхдоминантная	<i>G/G-C/C</i>	224 (65.5%)	222 (57.8%)	1.00	0.034	1003.5	1012.7
	<i>C/G</i>	118 (34.5%)	162 (42.2%)	1.39 (1.02–1.87)			
Лог-аддитивная	—	—	—	1.18 (0.94–1.47)	0.15	1006	1015.1

Примечание. AIC – информационный критерий Акаике, BIC – байесовский информационный критерий.

белок, учитывая, что этот ген-супрессор опухолей обладает очень необычными характеристиками. В отличие от большинства генов-супрессоров опухолей потеря только одного аллеля приводит к аномальному фенотипу, т.е. он считается гаплонедостаточным супрессором и, как следствие, не следует классической генетической модели двуаллельной инактивации [17]. В нашем исследовании отмечена ассоциация гетерозиготного генотипа rs2735343*CG с повышением риска развития РПЖ, что может

быть связано с описанной выше характеристикой гена. Схожие результаты были получены в исследовании рака молочной железы – полиморфный вариант rs2735343 продемонстрировал ассоциацию с повышенным риском развития заболевания в кодоминантной модели [18]. Также было показано, что гетерозиготный генотип rs2735343*CG ассоциирован с повышением риска развития плоскоклеточной карциномы пищевода [19]. Результаты одного из исследований на основе метаанализа данных

продемонстрировали, что генотип *GG* полиморфного локуса rs2735343 ассоциирован с повышением риска развития рака в популяциях Азии [20]. Также ранее обнаружено, что присутствие аллеля rs2735343**G* повышает риск экстракапсулярного расширения – состояния, снижающего длительность безрецидивного периода после простатэктомии при РПЖ [17, 21]. В настоящем исследовании было показано, что аллель rs2735343**C* ассоциирован с повышением риска двустороннего поражения обеих долей простаты и инвазии семенных пузырьков, тогда как носительство гомозиготного генотипа rs2735343**GG* было ассоциировано со снижением риска развития данных патологических состояний.

Таким образом, несмотря на противоречивый характер полученных данных, можно сделать предположение, что полиморфный вариант rs2735343 гена *PTEN* может быть одним из молекулярных маркеров риска развития РПЖ и некоторых гистопатологических состояний этого заболевания. С учетом дальнейших валидирующих исследований результаты настоящей работы могут быть использованы при создании панели молекулярных маркеров прогноза заболевания и оценки опухолевых характеристик.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Биомика” и уникальной научной установке “КОДИНК”, с использованием образцов ДНК ЦКП “Коллекция биологических материалов человека” Института биохимии и генетики УФИЦ РАН и при частичной финансовой поддержке мегагранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2021-595.

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. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA. Cancer J. Clin.* 2018. V. 68. № 6. P. 394–424. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21492>
2. Al Bashir S., Alzoubi A., Alfaqih M.A. et al. PTEN loss in a prostate cancer cohort from Jordan // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2020. V. 28. № 5. P. 389–394. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000732>
3. Cucchiara V., Cooperberg M.R., Dall’Era M. et al. Genomic markers in prostate cancer decision making // *Eur. Urol. Elsevier.* 2018. V. 73. № 4. P. 572–582. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2017.10.036>
4. Fitzgerald L.M., Zhao S., Leonardson A. et al. Germline variants in IL4, MGMT and AKT1 are associated with prostate cancer-specific mortality: An analysis of 12,082 prostate cancer cases // *Prostate Cancer Prostatic Dis. Nature Publ. Group.* 2018. V. 21. № 2. P. 228. <https://doi.org/10.1038/S41391-017-0029-2>
5. Chun S.H., Jung C.K., Won H.S. et al. Divergence of P53, PTEN, PI3K, Akt and mTOR expression in tonsillar cancer // *Head Neck.* 2015. V. 37. № 5. P. 636–643. <https://doi.org/10.1002/HED.23643>
6. Shastry B.S. SNPs: Impact on gene function and phenotype // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 578. P. 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_1
7. Pérez-Tenorio G., Alkhorri L., Olsson B. et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. № 12. P. 3577–3584. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1609>
8. Lacey J.V., Yang H., Gaudet M.M. et al. Endometrial cancer and genetic variation in PTEN, PIK3CA, AKT1, MLH1, and MSH2 within a population-based case-control study // *Gynecol. Oncol.* 2011. V. 120. № 2. P. 167–173. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2010.10.016>
9. Slattery M.L., Herrick J.S., Lundgreen A. et al. Genetic variation in a metabolic signaling pathway and colon and rectal cancer risk: mTOR, PTEN, STK11, RPKAA1, PRKAG2, TSC1, TSC2, PI3K and Akt1 // *Carcinogenesis.* 2010. V. 31. № 9. P. 1604–1611. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGQ142>
10. Zhang Z., Chen Q., Zhang J. et al. Associations of genetic polymorphisms in pTEN/AKT/mTOR signaling pathway genes with cancer risk: A meta-analysis in Asian population // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 17844. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17250-z>
11. Li Q. Functional Genetic Variants in the mTORC1 Related Genes Contribute to Prostate Cancer Susceptibility and Clinical Outcomes (Doctoral Thesis). Fudan Univ., Shanghai, China, 2014. 261 p.
12. Chen J., Shao P., Cao Q. et al. Genetic variations in a PTEN/AKT/mTOR axis and prostate cancer risk in a Chinese population // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 7. P. e40817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040817>
13. Cao Q., Ju X., Li P. et al. A functional variant in the MTOR promoter modulates its expression and is associated with renal cell cancer risk // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 11. P. e50302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050302>
14. Karyadi D.M., Zhao S., He Q. et al. Confirmation of genetic variants associated with lethal prostate cancer in a cohort of men from hereditary prostate cancer families // *Int. J. Cancer.* 2015. V. 136. № 9. P. 2166. <https://doi.org/10.1002/IJC.29241>
15. Pu X., Hildebrandt M.A.T., Lu C. et al. PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway genetic variation

- predicts toxicity and distant progression in lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy // *Lung Cancer*. 2011. V. 71. № 1. P. 82.
<https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2010.04.008>
16. *Mathew C.G.P.* The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 2. P. 31–34.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-064-4:31>
 17. *de Nóbrega M., Cilião H.L., de Souza M.F. et al.* Association of polymorphisms of PTEN, AKT1, PI3K, AR, and AMACR genes in patients with prostatecancer // *Genet. Mol. Biol.* 2020. V. 43. № 3. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2018-0329>
 18. *Chen F.Y., Wang H., Li H. et al.* Association of single-nucleotide polymorphisms in monoubiquitinated FANCD2-DNA damage repair pathway genes with breast cancer in the Chinese population // *Technol. Cancer Res. Treat.* 2018. V. 17.
<https://doi.org/10.1177/1533033818819841>
 19. *Ma J., Zhang J., Ning T. et al.* Association of genetic polymorphisms in MDM2, PTEN and P53 with risk of esophageal squamous cell carcinoma // *J. Hum. Genet.* 2012. V. 57. № 4. P. 261–264.
<https://doi.org/10.1038/jhg.2012.15>
 20. *Song D.D., Zhang Q., Li J.H. et al.* Single nucleotide polymorphisms rs701848 and rs2735343 in PTEN increases cancer risks in an Asian population // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 56. P. 96290.
<https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.22019>
 21. *Петров С.Б., Ракул С.А., Новиков Р.В.* Экстракапсулярная экстензия как неблагоприятный фактор прогноза при раке предстательной железы // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2007. Т. 166. № 3. С. 93–98.

The Role of Polymorphic Variants of Genes-Components of the PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway in the Development of Prostate Cancer

I. R. Gilyazova^{a,*}, E. A. Ivanova^{a,**}, M. A. Bermisheva^a, M. V. Loginova^b, D. D. Asadullina^a, R. R. Ishemgulov^b, A. T. Mustafin^b, V. N. Pavlov^b, and E. K. Khusnutdinova^a

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

^b*Bashkir State Medical University, Ufa, 450008 Russia*

*e-mail: gilyazova_irina@mail.ru

**e-mail: lissa987@yandex.ru

The aim of this study was to search for associations of genotypes and alleles of polymorphic loci of the PTEN/PI3K/AKT pathway genes: rs2494750 of *AKT1*, rs2735343, rs2299941, rs10490920 of *PTEN*, rs17878362 of *TP53* and rs2699887 of *PIK3CA* with the risk of prostate cancer development. As a result of allele and genotype frequencies comparison between the general sample of prostate cancer patients and the control group of healthy individuals, it was found that the *CG* genotype of the polymorphic locus rs2735343 of *PTEN* is associated with an increased risk of developing the disease (OR = 1.38; 95%CI 1.02–1.87; $p = 0.04$), whereas the *GG* genotype showed a decrease in the frequency of occurrence in the group of patients compared with the control (OR = 0.74; 95%CI 0.55–0.99; $p = 0.05$). When stratifying the group of patients with prostate cancer, depending on histopathological characteristics, it was revealed that the rs2735343**C* allele is associated with an increased risk of bilateral lesions of both prostate lobes and invasion of seminal vesicles. Taking into account further validating studies, the results of this work can be used to create a panel of molecular markers for disease prognosis and assessment of tumor characteristics.

Keywords: prostate cancer, polymorphic variants of genes, PTEN/PI3K/AKT pathway.

ДЕЛЕЦИИ *AZFc* РЕГИОНА Y-ХРОМОСОМЫ У РОССИЙСКИХ ФЕРТИЛЬНЫХ МУЖЧИН

© 2022 г. В. Б. Черных^{1,2,*}, О. П. Рыжкова¹, И. А. Кузнецова¹, М. С. Казарян¹, Т. М. Сорокина¹, Л. Ф. Курило¹, О. А. Шагина¹, А. В. Поляков¹

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

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

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

Поступила в редакцию 22.12.2021 г.

После доработки 13.01.2022 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

Микроделеции Y-хромосомы являются одними из частых вариаций числа копий (CNV), связанных с нарушением фертильности и бесплодием у мужчин. Исследованы частота и спектр делеций в регионе *AZFc* (локус Yq11.223) у российских фертильных мужчин ($n = 436$). Полные делеции региона *AZFc* (b2/b4) не выявлены в исследованной выборке, частичные *AZFc*-делеции обнаружены у 77 (17.7%) индивидуумов. Наиболее частыми типами из них являлись делеции b2/b3 и gr/gr, которые детектированы у 64 (14.7%) и 10 (2.3%) пациентов и составили 72.8 и 23.3% всех выявленных микроделеций Y-хромосомы соответственно. Другие (редкие) типы частичных делеций *AZFc* детектированы у 3 (0.7%) мужчин. Полученные данные свидетельствуют, что у российских фертильных мужчин частичные делеции региона *AZFc* являются распространенными микроделеционными вариантами (CNV) Y-хромосомы, при этом делеция b2/b3, характерная для N1-гаплогруппы, является наиболее частым их типом.

Ключевые слова: Y-хромосома, локус *AZF*, микроделеции, сперматогенез, мужская фертильность.

DOI: 10.31857/S0016675822070049

Микроделеции Y-хромосомы являются одной из частых генетических причин нарушения репродуктивной функции у мужчин. Патогенные делеции эухроматиновой области длинного плеча Y-хромосомы (локусы Yq11.221-q11.223) приводят к нарушению сперматогенеза и мужской фертильности [1–6]. Данный участок региона MSY (the Male Specific region of the human Y chromosome) содержит ряд генов, имеющих тестис-специфичную экспрессию и контролирующих сперматогенез [7]. В нем картирован локус (регион) *AZF* (Azoospermia Factor, “фактор азооспермии”), в котором согласно локализации крупных повторяющихся микроделений выделены три (суб)региона: *AZFa*, *AZFb* и *AZFc* [1]. Цитогенетически идентифицируемые несбалансированные структурные перестройки с вовлечением Y-хромосомы (кольцевые и изодисцентрические хромосомы, транслокации, терминальные делеции и др.) и микроделеции ее длинного плеча (Yq) могут приводить к потере всего локуса *AZF* (Yq11.2) или каких-либо его частей [2–4].

Наиболее часто микроструктурные перестройки Y-хромосомы возникают в регионе *AZFc* (локус Yq11.223), что связано с присутствием в нем мно-

жества протяженных повторов (ампликонов), имеющих высокую степень гомологии (более 99.9%) (рис. 1) [7–10]. Межхроматидная и внутривхроматидная неаллельная гомологичная рекомбинация (NAHR) приводит к образованию несбалансированных микроструктурных перестроек – микроделений и дупликаций (вариаций числа копий – copy number variation, CNV) Y-хромосомы [6, 8–10]. Все полные *AZF*-делеции, т. е. удаляющие целиком один регион или более протяженные, являются патогенными мутациями *de novo* и вызывают выраженное нарушение сперматогенеза, приводя к мужскому бесплодию вследствие азооспермии или олигозооспермии тяжелой степени [1–6]. Крайне редко у некоторых пациентов с олигозооспермией, имеющих “нетяжелые” типы патогенных микроделений Y-хромосомы, например, делеции региона *AZFc*, отмечают сохранение фертильности, но бесплодие у их сыновей [1, 11, 12]. Полные делеции региона *AZFc* (делеции b2/b4) являются наиболее частым типом патогенных микроделений Y-хромосомы, составляющих 65–70% всех клинически значимых *AZF*-делений, и приводят к необструктивной азооспермии или выраженной олигозооспермии [1–6, 9, 13]. Про-

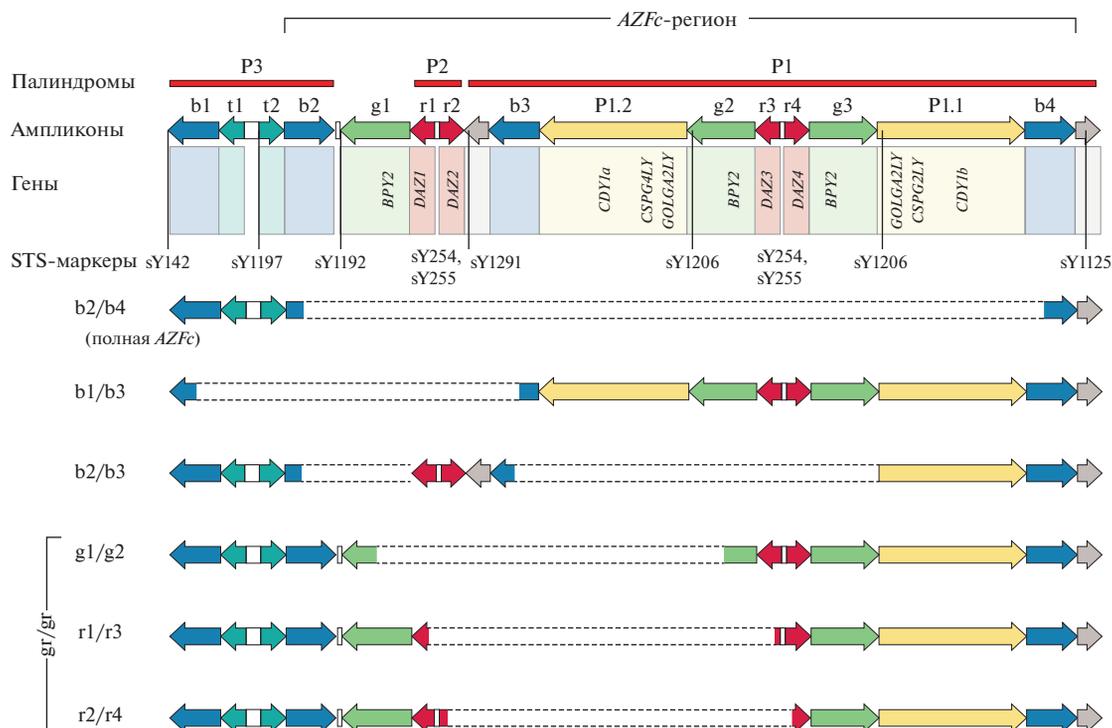


Рис. 1. Схематичное изображение *AZFc*-региона Y-хромосомы человека, располагающихся в нем палиндромов и ампликонов, а также частых типов его делеций. Сверху показана протяженность региона *AZFc*. Далее, сверху вниз: палиндромы (P1, P2 и P3), ампликоны (показаны стрелками различного цвета) гены данного региона Y-хромосомы и исследованные STS-маркеры (маркеры sY254 и sY255 присутствуют в каждой копии гена *DAZ*), ниже представлены основные типы делеций (полная *AZFc* – b2/b4, частичные – b1/b2, b2/b3, gr/gr делеции и подтипы gr/gr делеции g1/g2, r1/r3, r2/r4).

ведение процедуры экстракорпорального оплодотворения методом ИКСИ (от англ. ICSI – IntraCytoplasmic Sperm Injection, введение сперматозоида в цитоплазму, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) позволяет решить проблему мужского бесплодия у большинства пациентов с полными *AZFc* делециями [14].

В отличие от полных неполные (частичные) делеции региона *AZFc* или в его проксимальной границе – области, также относящемуся к региону *AZFb* (частично перекрывающемуся с ним) встречаются как у мужчин с бесплодием, так и у фертильных мужчин. При этом они часто являются микроструктурными полиморфизмами (непатогенными CNV) Y-хромосомы, которые наследуются по мужской линии [2, 4, 6–10]. Это обусловлено ди-/мультикопийностью генов данного региона (*DAZ*, *BPY2*, *CDY1*, *CSPG4LY*, *GOLG2ALY*) [7–10], поэтому при частичных делециях данного региона Y-хромосомы теряется только часть копий его генов, но сохраняется их функция, при этом размер делеций может достигать 1.6–2.2 млн пн [15–20]. Роль многих частичных делеций региона *AZFc* в нарушении сперматогенеза и мужской фертильности окончательно не установлена. По крайней мере для некоторых

их типов, например делеций gr/gr, показано, что они могут являться генетическими факторами нарушения мужской фертильности, предрасполагающими к снижению количества и качества сперматозоидов у мужчин различных национальностей [9, 19, 21]. Частота и спектр частичных *AZFc*-делеций варьируют в разных популяциях и клинических группах мужчин (фертильные, с нормозооспермией, бесплодием и различными формами патозооспермии), при этом данные исследований свидетельствуют об определенных этнических различиях по частоте и типам делеций, а также о связи многих микроструктурных перестроек Y-хромосомы с ее гаплотипом [2, 9, 10, 16–20].

Цель исследования – определение частоты и спектра делеционных нарушений *AZFc* региона Y-хромосомы у российских фертильных мужчин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованная выборка состояла из 436 неродственных российских мужчин с доказанной фертильностью, являющихся биологическими отцами не менее одного ребенка от беременностей, наступивших естественным путем. Факт биоло-

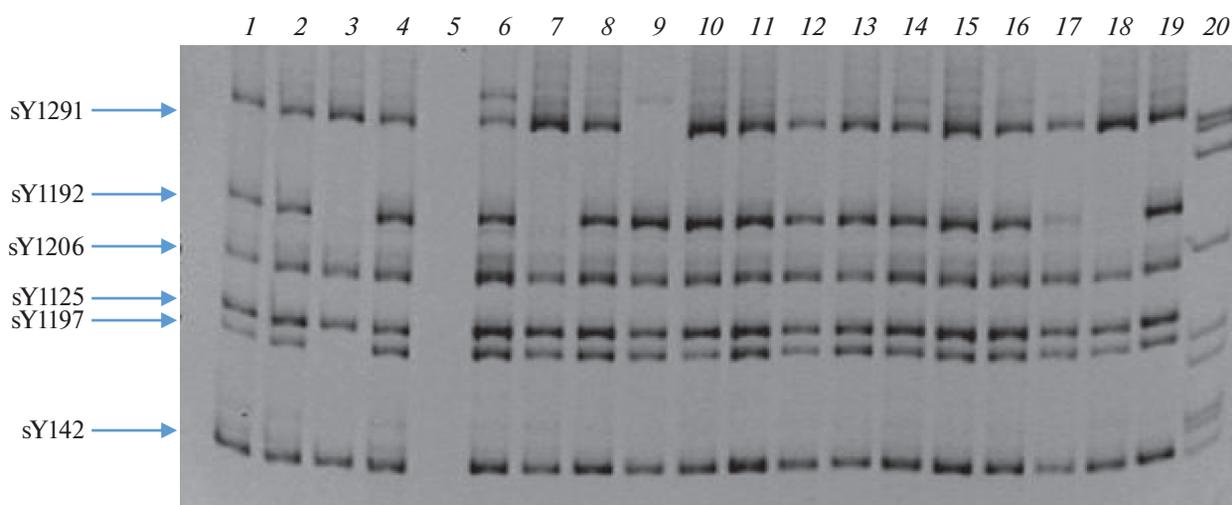


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов мультиплексной ПЦР в 7%-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Сверху указан номер дорожек (1–20), слева – STS-маркеры. Дорожки 1, 2, 6, 8, 10–17, 19 – норма (отсутствие делеций); дорожка 3 – делеция sY1192, sY1197 (делеция в пределах палиндрома P3); дорожка 4 – положительный контроль; дорожка 5 – отрицательный контроль (без ДНК); дорожка 7 – делеция маркера sY1192 (b2/b3), дорожки 9 и 18 – делеция маркера sY1291 (gr/gr), дорожка 20 – маркер молекулярного веса.

гического отцовства подтвержден результатами ДНК-исследования по поводу определения биологического родства.

Кровь получали методом венепункции в одноразовые пластиковые пробирки с консервантом (0.5 М раствор ЭДТА) в соотношении консервант/кровь – 1 : 10. Геномную ДНК выделяли с помощью наборов DNA prep 100 (“Diatom”, Россия) и Wizard genomic purification kit (“Promega”, США).

Для детекции микроделечий Y-хромосомы использовали метод мультиплексной полимеразной цепной реакции (мПЦР). Для выявления делеций региона *AZFc* анализировали наличие/отсутствие шести STS (sequence-tagged site)-локусов (ДНК-маркеров): sY1192, sY1291 и sY1206, а также его границ: проксимальная – sY142, sY1197 граница (палиндром P3) и дистальная – sY1125 (табл. 1). Для полных *AZFc*-делечий (делечий b2/b4) характерно отсутствие амплификации следующих STS-локусов Y-хромосомы: sY1192, sY1291, sY1206, для

Таблица 1. Характеристика различных типов делеций *AZFc*-региона Y-хромосомы по наличию STS-локусов, размеру делеции, числу утраченных и сохраненных генов

Делеция	Наличие STS-локусов						Всего утраченных генов	Число присутствующих копий генов и транскрипционных единиц	Размер делеции, млн пн
	sY142	sY1197	sY1192	sY1291	sY1206	sY1125			
P3a, P3b, P3c	+/-	-	+/-	+	+	+	6–9	23–26	1.0–1.3
P3d	+	-	+	+	+	+	1	31	0.03
b1/b3	+	-	-	-	+	+	12	20	1.6
b2/b3 (g1/g3)	+	+	-	+	+	+	12	20	1.8 (2.2)
gr/gr	+	+	+	-	+	+	9	23	1.6
b2/b4 (полная делеция <i>AZFc</i>)	+	+	-	-	-	+	21	11	3.5
Нет делеций (референсная Y-хромосома)	+	+	+	+	+	+	-	32	-

Таблица 2. Делеции *AZFc*-региона Y-хромосомы, обнаруженные у российских фертильных мужчин

Тип делеции <i>AZFc</i> -региона	Делетированные STS-маркеры	Число обнаруженных делеций, <i>n</i> (частота делеций, %)
Полная делеция региона <i>AZFc</i> (del 'b2/b4')	sY1192, sY1291, sY1206	0 (0.0)
del b1/b3	sY1192, sY1197, sY1291	0 (0.0)
del b2/b3	sY1192	64 (14.7)
del gr/gr	sY1291	10 (2.3)
del P3a/b/c	sY1192, sY1197	1 (0.2)
del P3d	sY1197	0 (0.0)
Другие типы частичных делеций региона <i>AZFc</i>	sY1192, sY1206	1 (0.2)
	sY1291, sY1206	1 (0.2)
	sY1206	0 (0.0)
Всего делеций:		77 (17.7)

делеций b2/b3 – отсутствие локуса sY1192, для делеций gr/gr – отсутствие локуса sY1291, для делеций b1/b3 – одновременное отсутствие локусов sY1192, sY1197 и sY1291.

Аmplификацию ДНК выполняли на программируемом термоциклере MC2 (“ДНК-технология”, Россия) с использованием Taq-полимеразы. Реакционная смесь включала: 3 мкл геномной ДНК, 2.5 мкл каждого dNTP в 2.5 мкл однократного буфера для ПЦР (67 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% Twin-20), добавляли 0.3 мкл термофильной ДНК-полимеразы с анти-телами, 20–30 мкл минерального масла. ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация $t = 95^{\circ}\text{C} - 2 \text{ мин}$, $t = 94^{\circ}\text{C} - 45 \text{ с}$, $t = 65^{\circ}\text{C} - 45 \text{ с}$, $t = 72^{\circ}\text{C} - 45 \text{ с}$, финальная достройка $t = 72^{\circ}\text{C} - 7 \text{ мин}$. Результаты амплификации оценивали методом электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия (0.1 мкг/мл в 1× TBE). Оценку полученных результатов и запись изображений полученных гелей проводили с использованием станции гель-документирования GEL DOC 2000 и пакета программ “QUANTITY ONE®” фирмы “BIORAD” (Италия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Микроделеции Y-хромосомы обнаружены у 77 (17.7%) из 436 фертильных мужчин (табл. 2, рис. 1). Среди обследованных индивидуумов не обнаружено делеций, целиком захватывающих *AZFc*-регион, т.е. полных делеций *AZFc* (b2/b4). Все детектированные микроделеции удаляли только часть региона *AZFc* или его проксимальной границы (палиндром P3), т.е. являлись неполными/частичными делециями данного региона. Наиболее частыми типами из них являлись делеции b2/b3 и gr/gr, детектированные у 64 (14.7%) и 10 (2.3%) мужчин

соответственно. Данные вариации числа копий составили 83.1 и 13.0% от всех выявленных микроделеций Y-хромосомы соответственно. Другие (редкие) типы частичных делеций *AZFc* детектированы у 3 (0.7%) индивидуумов. Среди них одна делеция (с утратой локусов sY1192 и sY1197) располагалась в проксимальной области региона *AZFc* и захватывала палиндром P3, а две другие делеции частично захватывали палиндромы P2 или P1 (sY1192, sY1206, $n = 1$; sY1291, sY1206, $n = 1$) (табл. 2).

Вероятно, что все обнаруженные микроделеции характеризовались потерей двух копий генов семейства *DAZ*, представленных на референсной Y-хромосоме в четырех копиях (*DAZI-4*). Среди мужчин исследованной выборки не обнаружена делеция b1/b3, при которой также утрачиваются две из четырех копий гена *DAZ*, а также отсутствуют локусы sY1192, sY1197 и sY1291. Также ни у одного пациента не отмечено делеций, захватывающих только локусы sY142 и sY1125, располагающиеся в проксимальной и дистальной границах региона *AZFc* соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Многими авторами показана выраженная вариабельность по частоте и спектру микроделеций длинного плеча Y-хромосомы в различных группах мужчин [2, 4, 5]. В значительной мере они зависят от критериев формирования исследуемой выборки. Основными факторами, влияющими на частоту и типы делеций в локусе *AZF* (Yq11.2), являются наличие фертильности, мужского бесплодия и его причин (в том числе не связанных с микроделециями Y-хромосомы), наличие и степень нарушения сперматогенеза и выраженность сперматологических изменений (форма патозооспермии). Наиболее высокую частоту (в среднем около 10%) клинически

значимых микроделечий в локусе Yq11.2 регистрируют среди мужчин с необструктивной (секреторной) азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени неясного генеза [4–6, 9]. При этом частота патогенных микроделечий Y-хромосомы (большинство из которых являются полными “классическими”) *AZF*-делечиями, у мужчин с нарушением фертильности существенно не зависит от региона мира/страны, т.е. от этнического состава исследуемой выборки [22].

Наиболее частым типом патогенных микроделечий Y-хромосомы является полная делеция региона *AZFc* (b2/b4), доля которой составляет 65–75% всех полных *AZF*-делечий [1–6, 9]. Ее частота у российских мужчин с бесплодием, связанным с азооспермией или олигозооспермией тяжелой степени, составляет 8.2% [3]. Данная делеция имеет размер 3.5 млн пн и возникает в результате несбалансированной рекомбинации между ампликонами b2 (blue2) и b4 (blue 4), располагающимися в дистальных областях палиндромов P3 и P1 соответственно (рис. 1) и приводит к потере 21 из 32 генов и транскрибирующихся последовательностей данного региона (табл. 1) [8]. В исследованной нами выборке фертильных мужчин не обнаружено полных делечий региона *AZFc* (делечий b2/b4 и других более протяженных делечий), все детектированные делечии являлись частичными.

В литературе сообщались единичные случаи сохранной фертильности у мужчин, имевших патогенные микроделечии Y-хромосомы, в том числе полные делечии региона *AZFc* [1, 11, 12]. Данные случаи, как правило, были выявлены при обследовании их сыновей, которые обращались для медицинской помощи в связи с бесплодием в браке. У мужчин с полными делечиями региона *AZFc* может встречаться не только азооспермия или олигозооспермия тяжелой степени (сниженное количество сперматозоидов в эякуляте, менее 1–2 млн/мл), но и менее тяжелые формы олигозооспермии, что может быть совместимо с сохранением фертильности при отсутствии тяжелой астено-/тератозооспермии помимо олигозооспермии [1, 4, 11–14].

У мужчин с частичными делечиями региона *AZFc* в отличие от полных *AZFc*-делечий, напротив, отмечается широкая вариабельность в показателях спермограммы (от нормозооспермии до различных по тяжести форм патозооспермии вплоть до азооспермии). У них отмечается выраженная гетерогенность по состоянию сперматогенеза, отсутствию или наличию и выраженности нарушений репродуктивной функции (от полностью сохранной фертильности, до субфертильности и бесплодия) [2, 4–6, 9, 13].

У мужчин исследованной нами выборки не выполнялось исследование эякулята, поэтому невозможно оценить их сперматологические диа-

гнозы. Наличие фертильности не равнозначно нормозооспермии (нормальным количественным и качественным показателям сперматозоидов) и наоборот. Частота нормозооспермии в супружеских парах с бесплодием в браке составляет 11–30% [23]. Вероятно, что только часть обследованных имели нормозооспермию, другая часть – патозооспермию. Кроме того, следует учитывать, что могут как количественные, так и качественные характеристики эякулята существенно изменяться со временем, и для их оценки у фертильных мужчин следует их анализировать на момент наступления беременности/родов, а не спустя длительного срока, поскольку это может не отражаться на показателях спермограммы. Сперматологические исследования, которые оценивали бы сперматологические показатели в динамике, у мужчин с микроделечиями Y-хромосомы не проводились.

Зависимость частоты и типов частичных микроделечий в локусе *AZF* от этнического происхождения и гаплотипа Y-хромосомы показана во многих исследованиях [16–20]. Так, у мужчин из западноевропейских популяций наиболее распространенным типом частичных делечий региона *AZFc* является делеция gr/gr [19, 21, 23]. Она заняла второе место по частоте *AZF*-делечий у российских фертильных мужчин (2.3%). Частота делечии gr/gr варьирует среди мужчин из различных регионов мира, так в США она составляет 2.1, в Польше – 2.5, Индии – 6.7, Тунисе – 7.1, Вьетнаме – 15% [19]. Делеция gr/gr приводит к потере 9 из 32 генов и транскрибирующихся последовательностей *AZFc*-региона, и имеет размер около 1.6 млн пн (табл. 1). Делеция gr/gr является наиболее частой микроделечией Y-хромосомы у мужчин различных этнических групп, при этом распространенность делечий gr/gr варьирует от 2.1 до 12.5% среди у индивидумов из общей популяции [24]. Исследование крупных выборок мужи от 0 до 10.2% среди мужчин с нормозооспермией из различных популяций и мета-анализ исследований позволили установить, что наличие gr/gr увеличивает вероятность сниженного количества сперматозоидов в эякуляте, т.е. является фактором риска снижения мужской фертильности в среднем в два раза [19, 21]. Однако тестирование на наличие частичных делечий региона *AZFc* не является обязательным для диагностики причин мужского бесплодия [22, 24].

Следует отметить, что некоторые распространенные частичные микроделечии Y-хромосомы, в частности делечии gr/gr представляют собой не одинаковые вариации числа копий (CNV). Они имеют различные подтипы (g1/g2, r1/r3, r2/r4 и другие) размер и генный состав, вследствие различий в механизме формирования [2, 9, 10, 20]. Определение подтипов (субтипирование) делечий, а также наличия микроинверсий и частич-

ных дупликаций *AZFc*-региона требует дополнительного молекулярно-генетического исследования. Их субтипирование так же как и Y-гаплотипирование не было выполнено в данном исследовании, так как это не входило в задачи исследования. Y-гаплотипирование и определение копий утраченных генов региона *AZFc* не используется широко в ДНК-диагностике мужского бесплодия [22].

В исследованной группе российских фертильных мужчин наиболее частой частичной *AZFc*-делецией является b2/b3 (g1/g3). Данный вариант числа копий (CNV) в локусе Yq11.223 приводит к потере 12 из 32 генов и транскрибирующихся последовательностей *AZFc*-региона, и имеет размер около 1.8 млн пн (табл. 1). Она является микроделеционным полиморфизмом, характерным для N1-гаплогруппы Y-хромосомы [17, 18]. Наибольшую частоту делеции b2/b3 отмечают у мужчин из Северной Евразии, а также в Прибалтийских регионах. Частота данной гаплогруппы Y-хромосомы у российских мужчин составляет в среднем около 15% [17, 25]. Ее влияние на сперматологические показатели и мужскую фертильность не доказана у мужчин разных этнических групп [19, 26]. Полученные данные свидетельствуют о том, что делеция 'b2/b3' не оказывает существенного влияния на сперматогенез и мужскую фертильность.

Делеция 'b1/b3', имеющая размер 1.6 млн пн (табл. 1), в исследованной выборке не обнаружена. Данная микроделеция Y-хромосомы является редкой, ее частота у мужчин из общей популяции составляет примерно 0.1% [19]. Поскольку другие типы частичных делеций региона *AZFc* (помимо делеций b2/b3, gr/gr) описаны в небольшом количестве случаев, их фенотипическое влияние на сперматогенез и мужскую фертильность изучено недостаточно. Очевидно, что их наличие не вызывает мужское бесплодие, поскольку не приводит к выраженным нарушениям сперматогенеза и оплодотворяющей способности сперматозоидов [19].

Помимо рассмотренных описанных выше вариантов числа копий в данном исследовании и другими авторами описаны другие типы микроделеций и микродупликаций, располагающихся в палиндромах 1, 2 и 3 [2, 9, 10, 15, 27, 28] Y-хромосомы. Некоторые из них обнаружены неоднократно, т.е. являются рекуррентными, например, делеции палиндрома P3 (P3a-d), другие – описаны в единичных публикациях. Наличие некоторых типов микроструктурных перестроек в палиндромной области Y-хромосомы, их высокая частота рекомбинаций/мутаций в регионе *AZFc* может оказывать влияние на "стабильность" хромосомы и предрасполагать к возникновению ее дополнительных микроструктурных вариантов и структурных аномалий Y-хромосомы, влияя на мужскую фертильность и эволюцию [9, 10, 20, 28].

Для некоторых вариаций числа копий (CNV), в частности частичных *AZF*-делеций, предполагают не снижение, а повышение концентрации сперматозоидов в эякуляте. Очевидно, что их микроструктурные варианты Y-хромосомы, связанные с ее гаплотипом, определяют количество (копийность и соотношение копий) Y-сцепленных (и других) генов, контролирующих сперматогенез. Это может быть как фактором, снижающим активность сперматогенеза, приводя к олигозооспермии, так и одним из факторов повышения его активности, предрасполагающим к полизооспермии [27, 28].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что частичные делеции региона *AZFc* Y-хромосомы являются распространенными микроделеционными полиморфизмами и часто встречаются у российских фертильных мужчин. Наиболее частая из них делеция 'b2/b3' характерна для N-гаплогруппы Y-хромосомы, часто встречающейся среди мужчин Северной Евразии. Очевидно, что данная микроделеция Y-хромосомы не является причиной мужского бесплодия и нарушения сперматогенеза. Вторая по частоте делеция – 'gr/gr', в настоящее время рассматривается как фактор снижения мужской фертильности. Влияние других редких типов делеции редких *AZF*-микроделеций на сперматогенез, и риск развития его нарушений и снижения мужской фертильности остается недостаточно изученным и требует дальнейшего исследования.

Работа выполнена в рамках проекта "Многоцентровая исследовательская биоресурсная коллекция "Репродуктивное здоровье человека" № 15.БРК.21.0008 Министерства науки и высшего образования РФ.

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. Vogt P.H., Edelmann A., Kirsch S. et al. Human Y chromosome azoospermia factors (*AZF*) mapped to different subregions in Yq11 // Hum. Mol. Genet. 1996. V. 5. № 7. P. 933–943. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.7.933>
2. Vogt P.H. *AZF* deletions and Y chromosomal haplogroups: History and update based on sequence // Hum. Reprod. Update. 2005. V. 11. № 4. P. 319–336. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi017>

3. Черных В.Б., Чухрова А.Л., Бескорвайная Т.С. и др. Типы делеций Y-хромосомы и их частота у мужчин с бесплодием // Генетика. 2006. Т. 42. № 8. Р. 1130–1136.
4. Черных В.Б. AZF-делеции — частая генетическая причина бесплодия у мужчин: современное состояние исследований // Проблемы репродукции. 2009. Т. 15. № 1. С. 10–15.
5. Krausz C., Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome // Hum. Genet. 2017. V. 136. № 5. P. 637–655.
<https://doi.org/10.1007/s00439-017-1793-8>
6. Черных В.Б. Гоносомные аномалии и CNV и их диагностика // Мед. генетика. 2018. Т. 17. № 10. С. 8–14.
<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2018.10.8-14>
7. Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J. et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes // Nature. 2003. V. 423. № 6942. P. 825–837.
<https://doi.org/10.1038/nature01722>
8. Kuroda-Kawaguchi T., Skaletsky H., Brown L.G. et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men // Nat. Genet. 2001. V. 29. № 3. P. 279–286.
<https://doi.org/10.1038/ng757>
9. Navarro-Costa P., Gonçalves J., Plancha C.E. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility // Hum. Reprod. Update. 2010. V. 16. № 5. P. 525–542.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmq005>
10. Repping S., van Daalen S.K., Brown L.G. et al. High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes // Nat. Genet. 2006. V. 38. № 4. P. 463–467.
<https://doi.org/10.1038/ng1754>
11. Chang P.L., Saver M.W., Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his infertile sons // Hum. Reprod. 1999. V. 14. № 11. P. 2689–2694.
<https://doi.org/10.1093/humrep/14.11.2689>
12. Calogero A.E., Garofalo M.R., Barone N. et al. Spontaneous transmission from a father to his son of a Y chromosome microdeletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) gene // J. Endocrinol. Invest. 2002. V. 25. № 7. P. 631–634.
<https://doi.org/10.1007/BF03345088>
13. Черных В.Б., Руднева С.А., Сорокина Т.М. и др. Характеристика состояния сперматогенеза у мужчин с бесплодием, имеющих различные типы делеций AZFc-региона // Андрология и генитальная хирургия. 2014. Т. 15. № 2. С. 48–57.
<https://doi.org/10.17650/2070-9781-2014-2-48-57>
14. Oates R.D., Silber S., Brown L.G., Page D.C. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI // Hum. Reprod. 2002. V. 17. № 11. P. 2813–2824.
<https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2813>
15. Jobling M.A., Samara V., Pandya A. et al. Recurrent duplication and deletion polymorphisms on the long arm of the Y chromosome in normal males // Hum. Mol. Genet. 1996. V. 5. № 11. P. 1767–1175.
<https://doi.org/10.1093/hmg/5.11.1767>
16. Repping S., Skaletsky H., Brown L. et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection // Nat. Genet. 2003. V. 35. № 3. P. 247–251.
<https://doi.org/10.1038/ng1250>
17. Repping S., van Daalen S.K., Korver C.M. et al. A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region // Genomics. 2004. V. 83. № 6. P. 1046–1052.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.12.018>
18. Fernandes S., Paracchini S., Meyer L.H. et al. A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N // Am. J. Hum. Genet. 2004. V. 74. № 1. P. 180–187.
<https://doi.org/10.1086/381132>
19. Rozen S.G., Marszalek J.D., Irenze K. et al. AZFc deletions and spermatogenic failure: A population-based survey of 20,000 Y chromosomes // Am. J. Hum. Genet. 2012. V. 91. № 5. P. 890–896.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.003>
20. Teitz L.S., Pyntikova T., Skaletsky H., Page D.C. Selection has countered high mutability to preserve the ancestral copy number of Y chromosome amplicons in diverse human lineages // Am. J. Hum. Genet. 2018. V. 103. № 2. P. 261–275.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.07.007>
21. Bansal S.K., Jaiswal D., Gupta N. et al. Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 19798. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1038/srep19798>
22. Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M., Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: State-of-the-art 2013 // Andrology. 2014. V. 2. № 1. P. 5–19.
<https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x>
23. Андреева М.В., Хаят С.Ш., Сорокина Т.М. и др. Формы патозооспермии у мужчин с бесплодием в браке и/или с нарушениями репродуктивной системы // Андрология и генитальная хирургия. 2017. Т. 18. № 2. С. 33–38.
<https://doi.org/10.17650/2070-9781-2017-18-2-33-38>
24. Stouffs K., Tournaye H., Van der Elst J. et al. Do we need to search for gr/gr deletions in infertile men in a clinical setting? // Hum. Reprod. 2008. V. 23. № 5. P. 1193–1199.
<https://doi.org/10.1093/humrep/den069>
25. Lumäe A.M., Reidla M., Chukhryaeva M. et al. Human Y chromosome haplogroup N: A non-trivial time-resolved phylogeography that cuts across language families // Am. J. Hum. Genet. 2016. V. 99. № 1. P. 163–173.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.025>
26. Eloualid A., Rhaissi H., Reguig A. et al. Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion // PLoS One. 2012. V. 7. № 4. e34902.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034902>
27. Noordam M.J., van Daalen S.K., Hovingh S.E. et al. A novel partial deletion of the Y chromosome azoospermia factor c region is caused by non-homologous recombination between palindromes and may be associated with increased sperm counts // Hum. Reprod.

2011. V. 26. № 3. P. 713–723.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deq386>
28. *Vaszkó T., Papp J., Krausz C. et al.* Discrimination of deletion and duplication subtypes of the deleted in azo-

ospermia gene family in the context of frequent interlo-
ci gene conversion // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 10.
e0163936.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163936>

Deletions in *AZFc* Region of Y Chromosome in Russian Fertile Men

V. B. Chernykh^{a, b, *}, O. P. Ryzhkova^a, I. A. Kuznetsova^a, M. S. Kazaryan^a,
T. M. Sorokina^a, L. F. Kurilo^a, O. A. Schagina^a, and A. V. Polyakov^a

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

^bPirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

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

Y chromosome microdeletions are one of common copy number variations (CNVs) associated with male (sub)infertility. The frequency and spectrum of *AZFc* region (locus Yq11.223) deletions in Russian fertile men ($n = 436$) were studied. Complete *AZFc* (b2/b4) deletions were not detected in the studied sample, partial *AZFc* deletions were detected in 77 (17.7%) individuals. The most frequent types of them were deletions b2/b3 and gr/gr, which were detected in 64 (14.7%) and 10 (2.3%) patients and which accounted for 72.8% and 23.3% of all detected Y chromosome microdeletions, respectively. Other (rare) types of partial *AZFc* deletions were detected in 3 (0.7%) men. Obtained data indicate that partial *AZFc* deletions in Russian fertile men are common microdeletion variants (CNVs) of the Y chromosome, while the b2/b3 deletion characteristic of the N1-haplogroup is their most frequent type.

Keywords: Y chromosome, *AZF* locus, microdeletions, spermatogenesis, male fertility.

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 636.2:575.224.22

ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ И ОЦЕНКА ДРЕЙФА МУТАНТНЫХ АЛЛЕЛЕЙ
В ПОПУЛЯЦИЯХ ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ И ЕЕ ПОМЕСЕЙ© 2022 г. С. Н. Марзанова¹, Д. А. Девришов¹, И. С. Турбина², Н. С. Марзанов³. *¹Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина,
Москва, 109472 Россия²Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных, Московская обл., пос. Быково, 142143 Россия³Федеральный исследовательский центр животноводства им. академика Л.К. Эрнста,
Московская обл., пос. Дубровицы, 142132 Россия

*e-mail: nmarzanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.12.2021 г.

После доработки 12.01.2022 г.

Принята к публикации 20.01.2022 г.

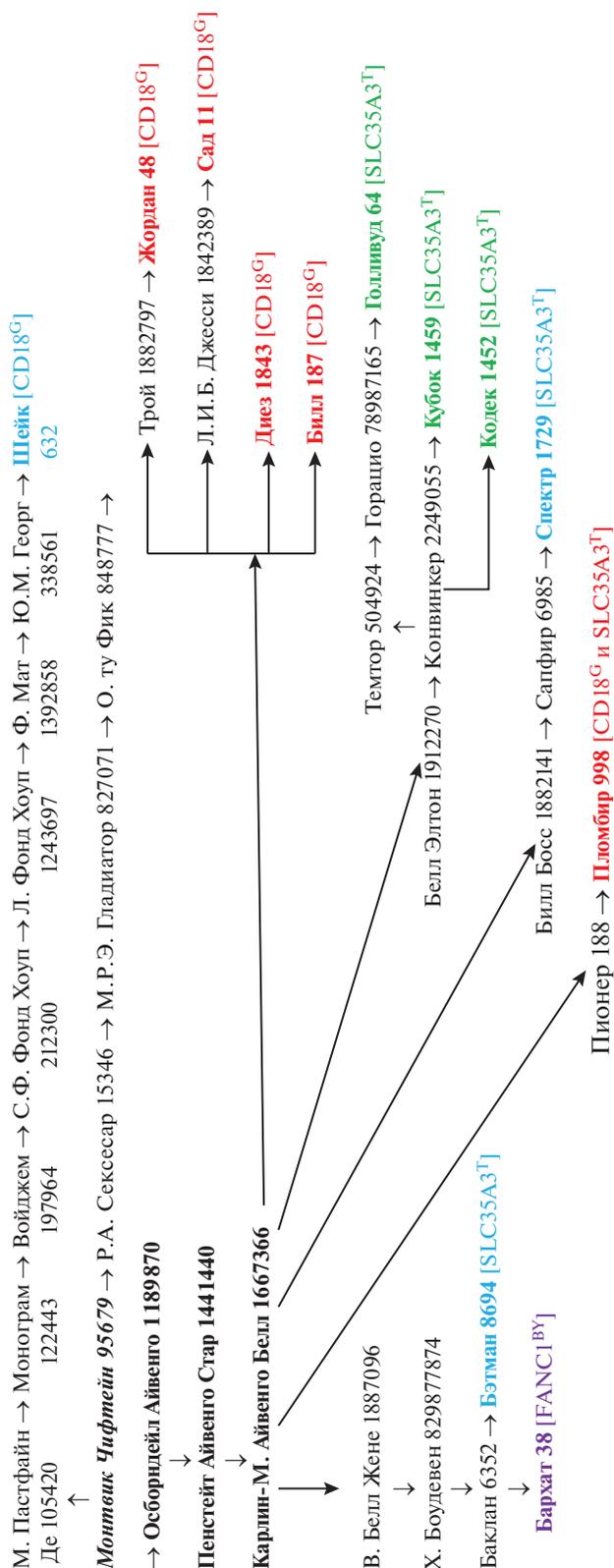
Статья посвящена ДНК-диагностике мутантных аллелей ($CD18^G$, $SLC35A3^T$ и $FANCI^{BY}$), вызывающих молекулярно-генетические болезни у крупного рогатого скота. Показана их геогеография у голштинской породы и ее помесей. Установлено, что наибольший вклад в эту проблематику внесли следующие близкородственные быки: Осборндейл Айвенго 1189870 (дед), Пенстейт Айвенго Стар 1441440 (сын) и Карлин-М. Айвенго Белл 1667366 (внук). Благодаря интенсивной “голштинизации”, от этих животных пошли три мутации и распространились по всему миру через многочисленных потомков, в том числе в Россию. Исследовали 2003 племенных быка и коровы. В работе обсуждаются проблемы купирования мутаций и методы очищения стад от рецессивных аллелей на основе комплексных мероприятий: подбора быков гомозиготных по нормальному аллелю, отбору коров-носителей функционально нежелательных мутаций при создании быковоспроизводящих групп, нуклеусов, линий, семейств.

Ключевые слова: голштинская порода, ДНК-технология, мутации, аллели $CD18^G$, $SLC35A3^T$, $FANCI^{BY}$, дрейф генов, эффект основателя.

DOI: 10.31857/S0016675822070116

Известно, что голштинская порода создавалась в США при интенсивной технологии выращивания, жесткой селекции, качественном кормлении и содержании отбираемых на племя животных. По прошествии длительного времени, с внедрением в селекцию животноводства молекулярно-генетических методов для оценки аллелофонда стало возможным проведение диагностики генетических аномалий в потомстве ряда быков-основателей высокопродуктивной молочной породы. Одним из таких быков оказался Осборндейл Айвенго 1189870, 1952 г. рождения, закупленного в Нидерландах для разведения черно-пестрого скота в США. Через 40 лет после его покупки и интенсивного использования, у него и его двух потомков (Пенстейт Айвенго Стар 1441440 (сын), Карлин-М. Айвенго Белл 1667366 (внук)) были выявлены рецессивные мутации $CD18^G$, $SLC35A3^T$ и $FANCI^{BY}$, вызывающие дефицит лейкоцитарной адгезии (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency, BLAD), комплекс аномалий позвоночника (Complex vertebral malformation, CVM) и синдром брахиспины (Bovine Brachyspina Syndrome, BYS) [1, 2]. Причем Пенстейт Айвенго

Старом 1441440 мутантные аллели $CD18^G$ и $FANCI^{BY}$ были получены от отца (Осборндейл Айвенго 1189870), а $SLC35A3^T$ -мутация — от матери. Позднее три мутации он передал своему знаменитому сыну — Карлин-М. Айвенго Беллу 1667366. В дальнейшем оказалось, что три известных быка передали своим многочисленным потомкам мутантные аллели, элиминация которых продолжается до сих пор у внуков, правнуков, праправнуков и т.д. Животные гетерозиготные по мутантному аллелю являются носителями генетического заболевания и могут передавать его 50% потомства. Гомозиготные по мутантному аллелю эмбрионы гибнут на ранних стадиях развития или рождаются мертвыми или погибают в первые месяцы жизни. Все три мутации исследователи отнесли к летальным аллелям, хотя в гомозиготе при BLAD рождаются живые телята, но они долго не живут несмотря на помощь ветеринарных специалистов [3–5]. Как показывает опыт разведения животных голштинской породы, рецессивные мутации в гетерозиготном состоянии могут длительное время сохраняться в популяциях и



при неконтролируемом разведении таких носителей возможно получение эмбрионов в гомозиготном состоянии и гибель потомства. Гибель гомо-

Рис. 1. Генеалогия близкородственных быков-производителей линии Монтвика Чифтейна 95679, носителей мутаций *CD18^G*, *SLC35A3^T*, *FANCI^{BY}*. Монтвик Чифтейн – основоположник линии 95679. Обычным жирным шрифтом обозначены три близкородственных быка, которые сыграли значительную роль в становлении голштинской породы и в распространении мутаций. Синим цветом выделены быки, унаследовавшие аллели *CD18^G*, *SLC35A3^T* с материнской стороны; красным – быки, *CD18^G*-носители, они получили его от своих отцов. Зеленый цвет – быки, носители *SLC35A3^T*; фиолетовый цвет – обладатель *FANCI^{BY}*-аллеля. Бык Плодбир 998 выделен бордовым цветом, он является носителем двух мутантных аллелей – *CD18^G* и *SLC35A3^T*.

зиготных особей наносит существенный экономический урон животноводству из-за абортос и болезней коров. Поэтому разработка методов по выявлению, отбору животных и элиминации из стада носителей рецессивных мутаций позволяет решить серьезную практическую задачу в разведении голштинской породы и ее помесей.

Исследования проводили в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных ФИЦ ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста и кафедре иммунологии и биотехнологии МГАВМиБ им. К.И. Скрябина. Всего исследованиями было охвачено 2003 племенных быков и коров. Выделение ДНК из семени быков и консервированной крови коров проводили с помощью наборов ДНК-сорба-В и S-сорб, руководствуясь инструкцией предприятия-изготовителя. Выделенную ДНК исследовали на наличие мутаций *CD18^G* ($n = 1013$), *SLC35A3^T* ($n = 716$) и *FANCI^{BY}* ($n = 274$) у представителей голштинской породы, и высококровных помесей (голштинская × черно-пестрая порода) ($n = 7$) с 87% кровностью по отцовской форме, вызывающие соответственно VLAD, CVM и BYS. Анализ ДНК проводили согласно предложенных нами Патентов [6–8]. Популяционно-генетический анализ полученных данных осуществлялся с помощью апробированных методов. Определяли число наблюдаемых и ожидаемых генотипов, частоту встречаемости аллелей, а также χ^2 , значение, которого отражает нарушение генетического равновесия в исследуемом локусе [9].

Диагностика трех мутантных аллелей *CD18^G*, *SLC35A3^T* и *FANCI^{BY}* и проведенный генетико-генеалогический анализ потомков линии Монтвика Чифтейна 95679 показали, что все три знаменитых быка-производителя и часть их потомков являются носителями мутаций, вызывающих серьезные наследственные заболевания. Существует мнение у специалистов, что сам Осборндейл Айвенго 1189870 получил мутации от матери. Кроме того, у линии Монтвика Чифтейна 95679 есть еще одна ветвь, которая дала другого быка-

носителя – Шейка 632. Таким образом, распространение данных трех мутаций внутри линии Монтвика Чифтейна 95679 имеет непростую историю. Тем не менее, в основной массе, три мутации, вызывающие серьезные наследственные болезни, распространились через трех родственных быков (рис. 1). Данное явление в биологии получило название “эффекта основателя” [10–12].

Все три знаменитых быка входят в ограниченное число элитных производителей, которые приняли активное участие в создании самой высокомоленной в мире голштинской породы. По материалам Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO) ее представителей широко используют в 163 странах мира в качестве племенного материала для повышения молочной продуктивности, у некоторых из них выявлены обсуждаемые три мутации. Следует отметить, подобные мутации выявлены у пород других генеалогических корней: бурой швицкой, палево-пестрой и красной. Недавно немецкими учеными обнаружена новая мутация, установлено, что она, наоборот, маркирует своим присутствием высокую жизнеспособность теленка голштинской породы [15].

Генетическое разнообразие в природной популяции того или иного вида зачастую формируется под воздействием внешних факторов (влияние природно-климатических условий). С развитием промышленного животноводства приоритетным стала целенаправленная селекция продуктивных животных. Она направлена на высокую целевую отдачу путем формирования изолированной популяции с отличным генетическим фондом, основанной на генетическом коде основателя. Выбор небольшой группы из популяции сопровождается дрейфом генов и нежелательными мутациями среди элитных животных. В молочном скотоводстве аналогичная ситуация отмечается у быков и коров голштинской породы. У этих групп животных были обнаружены такие генетические аномалии как дефицит лейкоцитарной адгезии, комплекс аномалий позвоночника, синдром брахиспины. Масштабные исследования с охватом многих стран мира показали, что эти аномалии стали даже породоспецифическими [8, 10–12].

Под “эффектом основателя” понимается явление, которое возникает, когда небольшая группа животных становится изолированной от крупной популяции или целой породы. В данном случае в качестве массива крупного рогатого скота выступила черно-пестрая порода. Из материала данной породы были образованы, сначала голштинская порода черно-пестрой масти, а затем и красно-пестрой масти, на основе отбора небольшого количества быков и коров от высокопродуктивных животных. Тем самым производилось закрепление и распространение в популяции характерных

морфофизиологических особенностей от одного или нескольких ее основателей. В результате действия “эффекта основателя” и дрейфа генов в популяции ряд элитных животных приобрели мутации, от которых до сих пор мировое молочное скотоводство не может избавиться. Кроме того у голштинской породы наблюдаются наследственные болезни: дефицит лейкоцитарной адгезии, комплекс аномалий позвоночника, синдром брахиспины, которые стали породоспецифическими, то есть ее неотъемлемой частью [8, 10–12]. Мутантные аллели *CD18^G* и *SLC35A3^T*, а сейчас также и *FANCI^{BY}*, распространились в те регионы, где интенсивно шла голштинизация [13–17].

Так, с 1994 г. в АО “Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных” (АО “ГЦВ”) совместно с лабораторией генетики сельскохозяйственных животных ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста была начата работа по аттестации быков-производителей на наличие *CD18^G*-мутации, вызывающей BLAD-синдром. Были выявлены первые быки-производители, носители мутации *CD18^G*, накоплен материал по данной проблематике [18]. Для проведения исследований на носительство *CD18^G*-мутации, Т.П. Усовой с соавт. [19], все племенное поголовье быков голштинской породы АО “ГЦВ” и ее помеси были поделены на две группы: животные импортной ($n = 642$) и российской селекции ($n = 377$). Цель работы заключалась в оценке уровня распространения *CD18^G*-миссенс-мутации среди быков-производителей разных селекций в АО “ГЦВ”. В итоге носителями дефектного аллеля *CD18^G* оказались восемь племенных быков импортной и 33 быка российской селекции.

Обычно, в процессе проведения селекционных мероприятий, на племя оставляют потомков высокопродуктивных животных. Естественно, наряду с высокой продуктивностью в стаде происходит закрепление сопутствующих мутантных аллелей. В результате наряду с приобретением хозяйственно полезных признаков (при использовании голштинских быков) происходило засорение мутантными аллелями. Вместе с тем, благодаря активной деятельности сотрудников АО “ГЦВ”, элитные быки-носители *CD18^G*, *SLC35A3^T* и *FANCI^{BY}* мутаций были удалены из племенной станции и заменены на неносителей.

Другое явление, с которым столкнулись селекционеры при разведении голштинской породы, – дрейф аллелей *CD18^G*, *SLC35A3^T* и *FANCI^{BY}*, обусловленный жесткой селекцией и широким использованием ограниченного числа элитных быков и их потомков, искусственного осеменения и множественной овуляции и эмбриотрансплантации (МОЭТ). Естественно это привело к сужению аллелофонда из-за гомозиготизации. Следствием явилось увеличение концентрации редких

мутаций, выявляемых в племенных хозяйствах России и за рубежом.

В данной ситуации также сыграл роль “эффект бутылочного горлышка”, т.е. голштины созданы от небольшой популяции высокомоломочных животных, случайно отобранных, являющихся потомками 20 элитных быков-производителей, основоположников породы.

До поры до времени рецессивные аллели не проявлялись, они начали появляться, когда пошло сужение биоразнообразия за счет гомозиготизации популяций молочного скота, использования близкородственных спариваний животных, сокращения продуктивного долголетия, скрещивания между известными голштинскими линиями, с развитием и диагностическими возможностями ДНК-технологии. Наступила эра диагностики рецессивных аллелей, а вместе с ней выявление новых источников наследственных пороков у сельскохозяйственных животных [20–24].

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить три серьезных источника (эффект основателя, дрейф генов, использование не аттестованного семени или животных), которые являются причиной поступления и появления носительства мутаций наследственных болезней в популяциях у высокомоломочной голштинской породы или ее помесей в Российской Федерации и за рубежом. На большом материале удалось показать такое явление, как породоспецифические мутантные аллели. Геннодиагностический подход позволил предложить генетико-генеалогический способ анализа дрейфа мутаций, как внутри одного государства, так и между странами. Причиной такого явления явился не естественный, а жесткий искусственный отбор человека на повышение молочной продуктивности.

В этой связи, для купирования мутаций и санации стад, считаем необходимым проведение генодиагностики аллелей *CD18^G*, *SLC35A3^T* и *FANCI^{BY}* у ремонтного молодняка, быковоспроизводящих коров, закупаемого семени и эмбрионов на основе предложенных методов диагностики и наборов. Искоренение мутантных аллелей возможно при проведении комплексных мероприятий. Они включают подбор быков к стаду, особей гомозиготных по нормальному аллелю (например *CD18^{A/A}*), отбор коров-носителей нежелательных мутаций, при создании быковоспроизводящих групп, нуклеусов, линий, семейств.

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. Kehrli M.E., Jr., Shuster D.E., Ackermann M.R. Leukocyte adhesion deficiency among Holstein cattle // *Cornell Vet.* 1992. V. 82. P. 103–109.
2. Agerholm J.S., McEvoy F., Arnbjerg J. Brachyspina syndrome in a Holstein calf // *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006. V. 18. P. 418–422. <https://doi.org/10.1177/104063870601800421>
3. Agerholm J.S., Bendixen C., Arnbjerg J., Anderson O. Complex vertebral malformation in Holstein calves // *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001. V. 13. P. 283–289. <https://doi.org/10.1177/104063870101300401>
4. Casas E., Kehrli M.E., Jr. A review of selected genes with known effects on performance and health of cattle // *Frontiers in Veter. Sci.* 2016. V. 3. Article 113. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00113>
5. Марзанов Н.С., Турбина И.С., Ескин Г.В. и др. Скрининг гена дефицита лейкоцитарной адгезии у черно-пестрого голштинизированного скота // *С.-хоз. биология.* 2003. № 6. С. 23–30.
6. Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Алексеев Я.И. и др. Набор последовательности праймеров и аллель-специфических зондов для одновременной генодиагностики двух мутантных аллелей, вызывающих CVM и BLAD у крупного рогатого скота. ООО “Агровет”. Патент на изобретение RU № 2577990 С1. Москва. ФИПС. Заявл. 11.02.2015. Опубл. 20.03.2016. Бюл. № 8.
7. Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Алексеев Я.И. и др. Способ одновременной генодиагностики двух мутантных аллелей, вызывающих CVM и BLAD у крупного рогатого скота, и тест-система для его осуществления. ООО “Агровет”. Патент на изобретение RU № 2601151 С2. Москва. ФИПС. Заявл. 11.02.15. Опубл. 27.10.2016. Бюл. № 30.
8. Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Алексеев Я.И. и др. Способ генодиагностики мутантного аллеля, вызывающего короткий позвоночник или брахиспину у крупного рогатого скота, и тест-система для его осуществления. ООО “Агровет”. Патент на изобретение RU № 2 664 454 С2. Москва. ФИПС. Заявл. 04.04.16. Опубл. 17.08.2018. Бюл. № 23.
9. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
10. Mayr E. Change of genetic environment and evolution // *Evolution as a Process.* London: George Allen and Unwin, 1954. 367 p.
11. Марзанова С.Н., Нагорный В.А., Девришов Д.А. и др. Эффект основателя и геогеография CV- и BL-мутаций у черно-пестрого скота // *Росс. с.-хоз. наука.* 2015. № 6. С. 44–47.
12. Marzanova S.N., Nagorniy V.A., Devrishov D.A. et al. Founder effect and genogeography of CV and BL mutations in black and white cattle // *Russ. Agric. Sci.* 2016. V. 42. № 1. P. 80–83. <https://doi.org/10.3103/S1068367416010134>
13. Kipp S., Segelke D., Schierenbeck S. et al. A new holstein haplotype affecting calf survival // *Int. Bull.* 2015. № 49. P. 49–53.
14. Турбина И.С. Характеристика быков-производителей по различным генетическим маркерам: Дис. ...

- канд. биол. наук. М.: Моск. гос. акад. ветер. мед. и биотехн. им. К.И. Скрябина, 2006. 112 с.
15. Марзанов Н.С., Ескин Г.В., Турбина И.С. и др. Генодиагностика и распространение аллеля иммунодефицита, или BLAD-синдрома, у черно-пестрой породы крупного рогатого скота. М.: Росинформагротех, 2013. 105 с.
 16. Дементьева Н.В., Митрофанова О.В., Тыщенко В.И. и др. Встречаемость и значение мутации CVM у племенных животных Ленинградской области // Молоч. и мясное скотоводство. 2014. № 6. С. 7–9.
 17. Трахимчик Р.В., Танана Л.А., Епишко О.А. Устойчивость крупного рогатого скота Гродненской области к генетически детерминированным заболеваниям (BLAD, CVM, DUMPS, citrullinaemia, brachyspina, factor XI) // Сельское хоз. Проблемы и перспективы. Сб. науч. тр. Гродно: 2017. С. 291–297.
 18. Игнатьев В.М. Скрининг гена лейкоцитарной адгезии (BLAD-синдром) у животных черно-пестрого корня крупного рогатого скота: Дис. ... канд. биол. наук. Москов. обл.: ВНИИЖ, 1998. 96 с.
 19. Усова Т.П., Усманова Н.Н., Литвина Н.И., Усов Н.В. Распространение BLAD-синдрома у быков-производителей голштинской породы отечественной и импортной селекции // Вестник Росс. гос. аграр. заоч. ун-та. 2017. № 25(30). С. 20–24.
 20. Agerholm J.S., DeLay J., Hicks B., Fredholm M. First confirmed case of the bovine brachyspina syndrome in Canada // Can. Vet. J. 2010. V. 51. P. 1349–1350.
 21. Марзанова С.Н. Разработка генодиагностики комплекса аномалий позвоночника [CVM] и иммунодефицита [BLAD] у животных черно-пестрого голштинизированного скота: Дис. ... канд. биол. наук. М.: Моск. гос. акад. ветерин. мед. и биотехнол. им. К.И. Скрябина, 2012. 142 с.
 22. Cole J.B. A simple strategy for managing many recessive disorders in a dairy cattle breeding program // Genet. Selection Evol. 2015. V. 47. P. 94. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0174-9>
 23. Cole J.B., Null D.J., Van Raden P.M. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility // J. Dairy Sci. 2016. V. 99(9). P. 7274–7288. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10777>
 24. Chun Hsuan Chao, Yi Ming Chen, Kuo Hua Lee. Genotype Screening of Bovine Brachyspina in Taiwan Holstein Cows // Am. J. Animal and Veterinary Sci. 2020. V. 15(3). P. 206–210. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2020.206.210>

DNA Technology and Estimation of Mutant Alleles Drift in Populations of the Holstein Breed and Its Crossis

S. N. Marzanova^a, D. A. Devrishov^a, I. S. Turbina^b, and N. S. Marzanov^c. *

^aSkryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109472 Russia

^bJoint-Stock Company “Head Center for the Reproduction of Farm Animals”, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Moscow oblast, Bykovo, 142143 Russia

^cErnst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moscow oblast, pos. Dubrovitsy, 142132 Russia

*e-mail: nmarzanov@yandex.ru

The article is devoted to the DNA diagnostics of mutant alleles (*CD18^G*, *SLC35A3^T* и *FANCI^{BY}*) that cause molecular genetic diseases in cattle. Their genogeography in the Holstein breed and its crossis shown. It is defined, that the following closely related bulls made the greatest contribution to this issue: Osborndale Ivanhoe 1189870 (grandfather), Penstate Ivanhoe Star 1441440 (son), Carlin-M. Ivanhoe Bell 1667366 (grandson). By virtue of intensive Holsteinization, three mutations went from them and spread throughout the world through numerous descendants, including to Russia. 2003 breeding bulls and cows were researched. The research discusses the problems of stopping mutations, and methods for clearing herds of recessive alleles based on complex measures: selection of bulls homozygous for the normal allele; selection of non-carrier cows of functionally undesirable mutations when creating bull-reproducing groups, nuclei, lines, families.

Keywords: Holstein breed, DNA technology, mutations, *CD18^G*, *SLC35A3^T* и *FANCI^{BY}* alleles, gene drift, founder effect.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ *Apis mellifera* L. АЛТАЙСКОГО КРАЯ

© 2022 г. М. Д. Каскинова¹*, Л. Р. Гайфуллина¹, А. К. Кинзикеев¹, А. Н. Гладких¹,
М. П. Соколянская¹, Е. С. Салтыкова¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2021 г.

После доработки 01.02.2022 г.

Принята к публикации 08.02.2022 г.

В данной работе представлены результаты анализа подвидовой принадлежности медоносной пчелы из Алтайского края при помощи микросателлитных локусов *Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28* и локуса *COI–COII* мтДНК. Установлено, что в исследуемой выборке из Алтайского края преобладает аллельный вариант RQQ *COI–COII* мтДНК, характерный для эволюционной ветви М. Анализ показал, что четверть семей имеют гибридное происхождение. Несмотря на то, что мы охватили лишь небольшую часть популяции, полученные результаты свидетельствуют о том, что в Алтайском крае сохранилась темная лесная пчела (было проанализировано 212 семей, из которых 159 группируются в общий кластер с *A. m. mellifera*).

Ключевые слова: *Apis mellifera* L., темная лесная пчела, SSR-полиморфизм, локус *COI–COII*, Алтайский край.

DOI: 10.31857/S0016675822070098

На территории Европы возникли 10 из 30 известных подвидов медоносной пчелы [1–3]. Эти десять подвидов входят в состав двух эволюционных ветвей – западноевропейскую М и восточно-европейскую С [1–3]. К последней относятся два наиболее распространенных в коммерческом пчеловодстве подвида – итальянская медоносная пчела *A. m. ligustica* и краинская *A. m. carnica*. В настоящее время происходит как естественная гибридизация в пограничных зонах распространения подвидов из ветвей М и С, так и антропогенная, вызванная импортом пчелиных пакетов и маток [4, 7, 13].

Для пчеловодства России (как и Северной Европы) наиболее значимым с точки зрения устойчивости является подвид *Apis mellifera mellifera* (темная лесная или среднерусская пчела) [4–7]. Большой интерес представляет алтайская популяция медоносной пчелы, которая наряду с башкирской и орловской (полесской) считалась наиболее известной и стабильной [8]. Вопрос подвидовой принадлежности данной популяции остается нерешенным. Впервые пчелы были завезены в Алтайский край в 1776 г. из Башкирии, но зимой 1778 г. пчелы погибли [9]. В 1786 г. пчелы были завезены повторно из Полесья Киевской губернии [10]. С тех пор в Алтайский край завозились раз-

ные подвиды пчел и предполагается, что современная популяция медоносных пчел Алтайского края представлена гибридами, о чем свидетельствуют их морфологические и поведенческие признаки [11].

Ранее [12] на основе анализа 74 семей из пяти районов Алтайского края нами уже было показано, что в данной выборке преобладает аллельный вариант RQQ, однако на уровне ядерной ДНК в некоторых семьях наблюдалась умеренная гибридизация. Опираясь на полученные нами данные, часть пчеловодов провели мероприятия по замене маток в гибридных семьях. В настоящей работе мы провели повторный анализ подвидовой принадлежности алтайской популяции медоносной пчелы, расширив ареал исследования.

В исследовании были использованы рабочие пчелы из Алтайского края, отобранные в период с 2017 по 2021 гг. из семи районов: Третьяковского (одна пасека, $N = 62$ семьи), Волчихинского (одна пасека, $N = 29$), Чарышского (три пасеки, $N = 61$), Змеиногорского (одна пасека, $N = 18$), Рубцовского (одна пасека, $N = 22$), Красногорского (одна пасека, $N = 4$) и г. Барнаул (две пасеки, $N = 20$). В качестве референсной группы эволюционной ветви М были использованы выборки *A. m. mellifera* из Бурзянского р-она Башкирии и Пермского

Таблица 1. Генетическая структура исследуемых семей из Алтайского края

Район	N	Доля М	Доля С	Число семей с долей М > 0.88	Аллельный вариант PQQ	Аллельный вариант Q
Третьяковский	62	0.840	0.160	42	54	8
Змеиногорский	18	0.970	0.030	16	18	0
Рубцовский	22	0.950	0.050	21	22	0
Чарышский	61	0.870	0.130	45	61	0
Волчихинский	29	0.880	0.120	21	29	0
Красногорский	4	0.100	0.900	0	0	4
г. Барнаул	16	0.890	0.110	14	16	0
Итого	212	0.786	0.214	159	200	12

края ($N = 136$). Выборки из Республики Адыгея и Закарпатской обл. Украины ($N = 120$) были использованы в качестве представителей эволюционной ветви С.

Выделение ДНК проводили набором реактивов ДНК-ЭКСТРАН-2 (Синтол, Москва). Исследование включало ПЦР-анализ локуса *COI-COII* мтДНК и микросателлитных локусов *Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28*. Смесь ПЦР включала 17 мкл дистиллированной воды, 2 мкл магниевого буфера, 0.4 мкл dNTP (10 мкМ), 0.6 мкл F- и R-праймера (2 ОЕ) и 0.3 мкл Taq-полимеразы. Режим ПЦР: 5 мин 94°C, затем 30 циклов с денатурацией 30 с при 94°C, отжигом 30 с при 54.5°C, элонгацией 60 с при 72°C и конечной элонгацией 7 мин при 72°C (термоциклер T100, Bio-Rad Laboratories). Для визуализации продуктов амплификации использовали электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле с последующей детекцией в фотосистеме Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories).

Для определения генетической структуры популяций медоносной пчелы была использована программа Structure 2.3.4 с заданным числом кластеров от 1 до 10. Количество предполагаемых групп (**K**) рассчитывали в Structure Harvester. Анализ был выполнен при помощи модели Admixture с указанием информации о географической локализации выборок (LocPrior) и с Burnin Period и MCMC равных 10000 и 100000 повторов соответственно. Результаты анализа обрабатывали в CLUMPP 1.1.2 с помощью алгоритма FullSearch.

В результате анализа локуса *COI-COII* мтДНК было показано, что аллельный вариант PQQ является преобладающим для алтайской популяции. Аллельный вариант Q был выявлен в Третьяковском и Красногорском р-нах, в семьях *A. m. carnica* (согласно данным пчеловодов), табл. 1. Аллельные варианты $P(Q)_{1-n}$ являются маркерами происхождения пчел от *A. m. mellifera*, вариант Q — от подвидов из эволюционной ветви С по материнской линии [13].

Согласно данным кластерного анализа во всех районах, за исключением Красногорского, преобладает генофонд *A. m. mellifera*. Уровень интрогрессии генофонда эволюционной ветви С в этих выборках варьируют от 5 до 16%. В Красногорском р-не исследуемые семьи принадлежат к эволюционной ветви С.

Уровень интрогрессии генофонда ветви С в алтайской популяции (рис. 1) составил в среднем 0.214. Для сравнения: в Польше, на территориях, где разрешается разводить разные породы пчел, уровень интрогрессии составляет 0.32, а на территориях где разрешено содержать только темную лесную пчелу он варьирует от 0.08 до 0.11 [14]. Среди выборок темной лесной пчелы Западной Европы максимальный уровень интрогрессии наблюдался в датском заказнике — 0.12 [4]. Учитывая эти данные, полученные на основе анализа микросателлитных локусов, уровень интрогрессии генофонда эволюционной ветви С равный 0.12 принят нами как максимальный уровень, при котором семью можно считать принадлежащей к подвиду *A. m. mellifera* (т. е. доля М должна быть больше 0.88).

Таким образом, в исследуемых выборках из Алтайского края преобладает аллельный вариант PQQ локуса *COI-COII* мтДНК, соответствующего эволюционной ветви М. Выборки из Змеиногорского, Рубцовского, Волчихинского районов и г. Барнаула принадлежат к подвиду *A. m. mellifera* (доля М на основе анализа полиморфизма девяти микросателлитных локусов >0.88). Незначительный уровень интрогрессии генофонда ветви С, по сравнению с Красногорским р-ном, выявлен в Третьяковском и Чарышском р-нах.

Подробное исследование популяции пчел Алтайского края было проведено в 80-е годы С.Е. Чернышовым [15]. На основе анализа 34 пасек в различных природно-климатических зонах он установил, что на территории края существуют две популяции алтайских пчел: горно-таежная и лесостепная, которые различаются между собой по экстрактерным признакам [15]. На основе оценки мор-

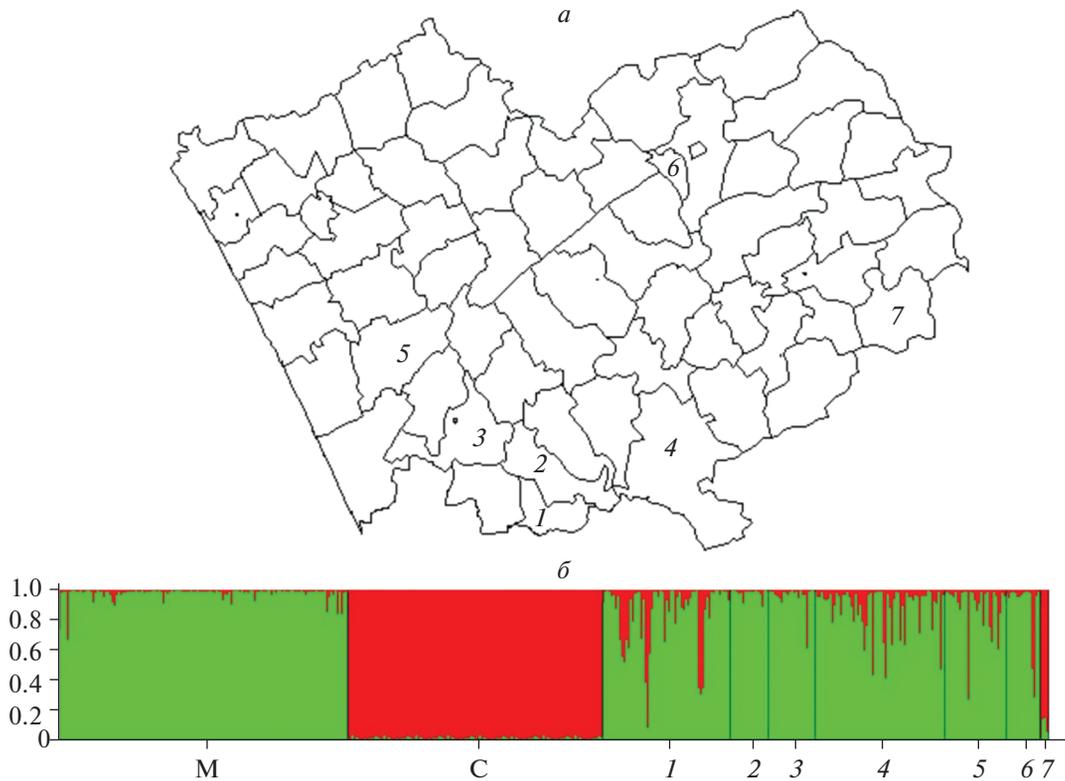


Рис. 1. *a* – географическое расположение исследуемых выборок. *б* – генетическая структура популяции исследуемых выборок при $K = 2$, где М – референсная выборка эволюционной ветви М из Бурзянского р-она Башкирии и Пермского края, С – референсная выборка эволюционной ветви С из Республики Адыгея и Закарпатской обл. Украины; 1 – Третьяковский, 2 – Змеиногорский, 3 – Рубцовский, 4 – Чарышский, 5 – Волчихинский районы, 6 – г. Барнаул, 7 – Красногорский р-он. Зеленым цветом обозначена доля эволюционной ветви М, красным – ветви С.

фометрических показателей, Чернышев предположил, что лесостепные пчелы являются гибридами, тогда как горно-таежные скорее всего относятся к группе “северных лесных пчел”. Современные исследования медоносных пчел в Алтайском крае ограничены анализом морфометрических показателей отдельных семей или 1–2 пасек [16, 17].

На основе анализа генетической структуры популяции Алтайского края мы установили, что в исследуемой выборке из семи районов преобладает аллельный вариант $PQQ\ COI-COII$ мтДНК, и при этом четверть семей имеют гибридное происхождение. По сравнению с данными за 2017 г., где доля гибридизации в некоторых семьях варьировала от 24 до 37%, в выборках за 2020 г. максимальная доля гибридизации в семьях, принадлежащих к эволюционной ветви М, составила 16% (данные для Красногорского р-на не учитываются, поскольку семьи из данного района принадлежат к эволюционной ветви С). Таким образом, результаты исследования обнадеживают и дают основания полагать, что в Алтайском крае есть перспектива для сохранения темной лесной пчелы.

Авторы выражают благодарность А.А. Шунку, И.Н. Чубарову, В.Р. Тягунову, Д.В. Настенко,

А.В. Жабину, А.С. Малик, Д.В. Осинovu за предоставленный материал и сотрудничество.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-54-70002, а также Госзадания АААА-А21-121011990120-7 с использованием оборудования ЦКП “Агидель” и УНУ “Кодинк” УФИЦ РАН.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ruttner F.* Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 288 p.
2. *Wallberg A., Han F., Wellhagen G. et al.* A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* // *Nat. Genet.* 2014. V. 6(10). P. 1081–1088.
3. *Momeni J., Parejo M., Nielsen R.O. et al.* Authoritative subspecies diagnosis tool for European honey bees based on ancestry informative SNPs // *BMC Genomics.* 2021. V. 22. P. 101. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07379-7>

4. Jensen A.B., Palmer K.A., Boomsma J.J., Pedersen B.V. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe // Mol. Ecol. 2005. V. 14. P. 93–106.
5. Ruottinen L., Berg P., Kantanen J. et al. Status and Conservation of the Nordic Brown Bee: Final Report. NordGen, 2014. 42 p.
6. Thompson C. The Health and Status of the Feral Honeybee (*Apis mellifera* sp.) and *Apis mellifera mellifera* Population of the UK: PhD thesis. Leeds, 2010. 173 p.
7. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николаенко А.Г. Молекулярно-генетический анализ пяти сохранившихся резерватов темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* Урала и Поволжья // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 931–942.
8. Билаш Г.Д., Кривцов Н.И. Селекция пчел. Москва: Агропромиздат, 1991. 304 с.
9. Миньков С.Г. Из истории пчеловодства на Алтае // Пчеловодство. 1954. № 3. С. 62–64.
10. Костенков П.П. Сибирскому пчеловоду. Барнаул: Веди, 1992. 80 с.
11. Шунк А.А. Ройливость местных пчел Алтая // Пчеловодство. 2008. № 4. С. 35–37.
12. Каскинова М.Д., Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р. и др. Генетическое состояние алтайской популяции темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. // Биомика. 2018. Т. 10(3). С. 281–285. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2018-37>
13. Bertrand B., Alburaki M., Legout H. et al. MtDNA *COI-COII* marker and drone congregation area: An efficient method to establish and monitor honeybee (*Apis mellifera* L.) conservation centers // Mol. Ecol. Resour. 2015. V. 15. P. 673–683. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12339>
14. Oleksa A., Chybicki I., Tofilski A., Burczyk J. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland // J. Apicult. Res. 2011. V. 50(2). P. 116–129.
15. Чернышов С.Е. Эколого-морфологические особенности и хозяйственная ценность медоносных пчел (на примере Алтайского края): Автореф. дис. ... канд. сельскохозяйств. наук. М.: Московская Ордена Ленина и Ордена Трудового Красного Знамени с.-хоз. академия им. К.А. Тимирязева, 1982. 129 с.
16. Попеляев А.С., Мещерякова Л.А. Биологические особенности пчел и пыльцевой состав меда Змеиногогорского района Алтайского края // Сб. матер. XIV Междунар. научно-практической конф. “Аграрная наука – сельскому хозяйству”. 2019. С. 199–200.
17. Мещерякова Л.А. Породные особенности пчел и флористический состав меда пасеки Калманского района Алтайского края // Вестник Алтайского гос. аграр. ун-та. 2018. № 6(164). С. 150–155.

Genetic Structure of the *Apis mellifera* L. Population from Altay Krai

M. D. Kaskinova^{a, *}, L. R. Gaifullina^a, A. K. Kinzikeev^a,
A. N. Gladkih^a, M. P. Sokolyanskaya^a, and E. S. Saltykova^a

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

*e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

This study presents the results of the analysis of subspecies of honeybee from Altai Krai using SSR loci *Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28*, and the mtDNA *COI-COII* locus. It was found that the allelic variant PQQ *COI-COII* of mtDNA, characteristic of the evolutionary lineage M, prevails in the studied sample of seven districts of the Altai Krai. Analysis of microsatellite loci showed that a quarter of colonies are of hybrid origin. Despite the fact that we covered only a small part of the population, the results obtained indicate that the dark forest bee has survived in the Altai Krai.

Keywords: *Apis mellifera* L., dark forest bee, SSR polymorphism, locus *COI-COII*, hybridization, Altai Krai.