

ISSN 1999-9127

Государственное научное учреждение
**«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 29**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2020

УДК [577.21+575] (082)

Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2020. — Т. 29. — 110 с. — ISSN 1999-9127.

В сборнике научных трудов публикуются обзорные и экспериментальные статьи в области молекулярной и прикладной генетики растений, микроорганизмов, животных, человека, отражающие исследования генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется наиболее актуальным проблемам геномики, генетической и клеточной инженерии. Публикуются результаты изучения генетических основ селекции растений, животных и микроорганизмов, разработки эффективных биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, охраны окружающей среды, биобезопасности.

Сборник предназначен для специалистов, работающих в области генетики, преподавателей, аспирантов и студентов ВУЗов биологического, сельскохозяйственного и медицинского профиля.

Редакционная коллегия:

А. В. Кильчевский — главный редактор, Л. В. Хотылёва — зам. главного редактора;
К. У. Вильчук, С. И. Гриб, О. Г. Давыденко, А. Н. Евтушенков, А. П. Ермишин,
А. И. Ковалевич, Ф. И. Привалов, А. В. Сукало, В. А. Лемеш, С. А. Лихачёв,
Н. П. Максимова, С. Б. Мельнов, М. Е. Михайлова, И. Б. Моссэ, М. Е. Никифоров,
В. Е. Падутов, В. Н. Решетников, Е. А. Сычёва, Н. И. Дубовец, В. В. Титок, И. П. Шейко,
О. Н. Харкевич — члены редколлегии;
А. Л. Богданова — ответственный секретарь.

УДК [577.21+575] (082)

ISSN 1999-9127

Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

О. Г. Бабак, Н. А. Некрашевич, Н. В. Анисимова, К. К. Яцевич, Т. В. Никитинская, Н. Ю. Лещина, И. Г. Пугачева, Т. В. Никонович, М. М. Добродькин, А. В. Кильчевский Создание гибридов F ₁ томата черри на стерильной основе с использованием методов классической и маркер-сопутствующей селекции	5
Н. И. Дубовец, Е. А. Сычёва, А. В. Соколюк, Е. Б. Бондаревич, Л. А. Соловей Оценка генетического разнообразия сортов овса посевного <i>Avena sativa</i> L. с помощью SSR-анализа	18
Н. В. Савина, С. В. Кубрак, Л. В. Милько, А. В. Кильчевский, Е. В. Никитина, К. Ш. Тожибаев ДНК-штрихкодирование как инструмент экологического мониторинга и оценки видового разнообразия редких видов растений	25
А. С. Бабенко, К. А. Моссэ, Н. Г. Седляр, Р. С. Шулинский, И. Б. Моссэ Разработка панели для анализа профиля метилирования целевых эпигенетических локусов, ассоциированных с психоэмоциональным статусом человека	37
Е. В. Кобец, В. Алекна, Э. В. Руденко, М. Тамулайтене, Е. В. Руденко, М. Д. Амелянович, О. Ю. Самоховец, П. М. Морозик Фармакогенетические аспекты антирезорбтивной терапии постменопаузального остеопороза бисфосфонатами	49
А. В. Шпак, Е. Э. Хейдорова, А. И. Ларченко, М. Е. Никифоров, А. Казарян, Г. Папов, В. В. Демянчик Криптический видовой комплекс рукокрылых <i>Plecotus auritus/austriacus</i> в Беларуси: видовая идентификация и филогеографические паттерны	59
Е. В. Снытков, В. Н. Кипень, А. А. Александров, С. Б. Мельнов Роль генетического полиморфизма и межгенных взаимодействий в формировании наркотической зависимости у человека	70
С. Ю. Смирнов, Е. А. Гутковская, В. М. Ходасевич, О. В. Чекур, Е. И. Субоч, А. С. Портянко, С. А. Красный Молекулярно-генетические маркеры чувствительности к терапии при колоректальном раке	86
Ю. М. Капустина, Л. В. Рубаник Значение генетической рекомбинации в изменчивости <i>Chlamydia trachomatis</i>	97

CONTENTS

<i>O. G. Babak, N. A. Nekrashevich, N. V. Anisimova, K. K. Yatsevich, T. V. Nikitinskaya, N. Y. Leshchina, T. V. Nikonovich, I. G. Pugachova, M. M. Dobrodkin, A. V. Kilchevsky</i> Development of cherry tomato F ₁ hybrids with functional sterility using classical and marker-assisted breeding methods	5
<i>N. I. Dubovets, E. A. Sycheva, A. V. Sokoluk, E. B. Bondarevich, L. A. Solovey</i> Evaluation of genetic diversity of oat <i>Avena sativa</i> L. varieties using SSR analysis	18
<i>N. V. Savina, S. V. Kubrak, L. V. Milko, A. V. Kilchevsky, E. V. Nikitina, K. Sh. Tojibaev</i> DNA barcoding as a tool for ecological monitoring and assessing the species diversity of rare plant species.....	25
<i>A. S. Babenko, K. A. Mosse, N. G. Sedlyar, R. S. Shulinsky, I. B. Mosse</i> Panel development for the methylation profile analysis of target epigenetic loci associated with human psychoemotional status	37
<i>E. V. Kobets, V. Alekna, E. V. Rudenko, M. Tamulaitiene, A. V. Rudenko, M. D. Ameliyanovich, V. Yu. Samokhovec, P. M. Marozik</i> Pharmacogenetic aspects of antiresorptive therapy of postmenopausal osteoporosis with bisphosphonates	49
<i>A. V. Shpak, E. E. Kheidorova, A. I. Larchanka, M. E. Nikiforov, A. Ghazaryan, G. Papov, V. V. Demianchyk</i> Cryptic chiroptera species complex <i>Plecotus auritus/austriacus</i> in Belarus: species identification and phylogeographic patterns	59
<i>E. V. Snytkov, V. N. Kipen, A. A. Alexandrov, S. B. Melnov</i> Role of genetic polymorphism and intergenic interactions in the formation of drug addiction in human	70
<i>S. Y. Smirnov, K. A. Hutkouskaya, V. M. Khadasevich, A. V. Chakun, A. I. Subach, A. S. Portyanko, S. A. Krasny</i> Molecular-genetic markers of colorectal cancer chemosensitivity	86
<i>Y. M. Kapustina, L. V. Rubanik</i> Role of genetic recombination in variability of <i>Chlamydia trachomatis</i>	97

О. Г. Бабак¹, Н. А. Некрашевич¹, Н. В. Анисимова¹, К. К. Яцевич¹, Т. В. Никитинская¹,
Н. Ю. Лещина², И. Г. Пугачева², Т. В. Никонович², М. М. Добродькин², А. В. Кильчевский¹

СОЗДАНИЕ ГИБРИДОВ F₁ ТОМАТА ЧЕРРИ НА СТЕРИЛЬНОЙ ОСНОВЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ КЛАССИЧЕСКОЙ И МАРКЕР-СОПУТСТВУЮЩЕЙ СЕЛЕКЦИИ

¹Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: O.Babak@igc.by

²Учреждение образования
«Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»
Республика Беларусь, 213407, г. Горки, ул. Мичурина, 5

В результате апробации известных маркеров к аллелю *positional sterility-2* (*ps-2*), детерминирующему функциональную мужскую стерильность (ФМС) установлена наибольшая эффективность выявления гомозиготных аллелей с помощью маркера *ps-2_TaiI*. Для повышения эффективности идентификации гетерозиготных аллелей *ps-2/Ps-2* разработан Tetra-primer ARSM-PCR. Созданы 28 гибридов F₁ между крупноплодными формами с ФМС и линиями томата черри, проведены их двухлетние испытания. Выделены лучшие гибридные комбинации с высокими значениями урожайности в сочетании с оптимальным размером (16–26 г) плода для томатов черри, превосходящие стандарт Алекша по ранней урожайности на 0,70–1,26 кг/м², по общей урожайности — на 0,49–1,96 кг/м², с целью дальнейшей передачи в Государственную инспекцию по испытанию и охране сортов растений. По результатам ДНК-типирования и фенотипической оценки из популяций F₂–F₅ выделены линии томата черри на стерильной основе (с аллелем *ps-2*) с комплексом генов качества (*B* из *S. pennellii*, *b* из *S. lycopersicum*, *nor*, *u*) и устойчивости (*I-2*, *I-2C*, *Mi 1.2*, *Cf-4*, *Cf-4A*; *Cf-5 Cf-9*, *Tm2²*). Созданные линии томата черри на основе ФМС могут служить материнскими линиями для создания новых гибридов с упрощенной системой семеноводства.

Ключевые слова: томат черри, ДНК-типирование, маркеры гена *ps-2*, функциональная мужская стерильность, признаки урожайности.

Введение

Одним из актуальных направлений селекции томата является создание мелкоплодных сортов типа черри или вишневидного томата. Как правило, это высокорослые и скороспелые формы с длинными кистями, на которых сформировано большое количество мелких плодов. Широкое разнообразие по окраске и форме плодов способствует повышенному спросу среди потребителей, а также формированию высокой цены на продукцию данного вида.

Томаты разновидностей черри, в отличие от крупноплодных форм, имеют ряд специфических особенностей. Во-первых, это высокая концентрация биологически активных веществ, основными из которых являются каротиноиды (ликопин, каротин, лютеин и др.) и

флавоноиды (антоцианы, халкон), что делает их важными продуктами для здорового питания. Во-вторых, вовлечение в селекцию томата черри диких и полудиких форм, обладающих уникальными аллелями устойчивости к вирусным и грибным патогенам. Близкородственность с дикорастущими видами также определяет их высокий адаптивный потенциал к условиям окружающей среды. Таким образом, возделываемые сорта типа черри отличаются более высокой комплексной стрессоустойчивостью к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам.

Вместе с тем следует отметить меньший выход семян у томатов черри по сравнению с крупноплодными формами, что обуславливает более высокие трудовые затраты на получение

семян при организации оригинального семеноводства. Данная особенность способствует созданию и выращиванию большего количества сортов, чем гибридов томата черри, или существенному повышению стоимости гибридных семян. Одним из способов, облегчающих гибридизацию, является получение исходного материала на основе функциональной мужской стерильности — нерастрескиваемость пыльников, что позволяет избежать процесса их удаления у материнских растений [1]. Такой подход широко используется в селекции крупноплодных форм. Успешность классической селекции в данном направлении связана с получением материнских форм с маркерным признаком «картофельный лист», который четко проявляется на этапе развития 2–3 настоящих листьев и позволяет идентифицировать самоопыленные растения. Значительных успехов в создании линий томата с функциональной мужской стерильностью достигли селекционеры Болгарии [2]. В Белорусской государственной сельскохозяйственной академии (БГСХА) и Институте генетики и цитологии НАН Беларуси с использованием линий на стерильной основе создано 9 гибридов томата для пленочных теплиц и открытого грунта: Даша, Александр, Агеньчик, Азарт, Рубин, Витязь, Тайник, Ирбис, Ритм [3]. С развитием методов молекулярной генетики для перевода форм на стерильную основу стали использоваться ДНК-маркеры к аллелям *ps* и *ps-2*, позволяющие идентифицировать гомозиготное и гетерозиготное состояние аллелей, а также отбирать растения, не дожидаясь оценки на стадии формирования плодов.

Staniaszek M. с соавторами предложили для выявления у томата форм с ФМС использовать два CAPS маркера C4-30_(HinfI) и C2-21 (MboI), связанных с генами *ps* (хромосома 2) и *ps-2* (хромосома 4) соответственно [4].

Голландские авторы (Gorguet V. и др.) описали мутацию томата в гене полигалактуроназы, тесно связанной с фенотипом *ps-2* (ФМС) и впервые картировали локус *ps-2* с на коротком плече хромосомы 4. Данная мутация — это SNP (G/C) в конце пятого экзона в сайте узнавания для интронного сплайсинга при созревании мРНК. У мутанта из-за данного SNP меняется сайт узнавания, и из зрелой мРНК вырезается пятый экзон, что приводит к синтезу нефункционального белка [5].

Кроме того, группой исследователей (Sha Z., Atanassova V. и др.) показано тесное сцепление с геном *ps-2* двух кодоминантных маркеров: микросателлитного SSR450 и CAPS маркера TG123, находящихся на расстоянии от гена *ps-2* около 4,9 и 11,6 сМ соответственно [6].

В рамках ранее проведенных исследований в Институте генетики цитологии НАН Беларуси разработаны методики ДНК-типирования аллелей качества плодов (*B*, *og*, *og^c*, *hp-1*, *hp-2^{dg}*, *t*, *nor*, *nor^A*, *rin*) и устойчивости к болезням и вредителям (*Cf2*, *Cf4*, *Cf5*, *Cf9*, *I-2*, *I-3*, *Mi-1.2*, *Tm2*, *Sw-5b*) [7, 8]; совместно с БГСХА в результате применения разработанных методов создан ряд линий томата черри с генами качества плодов и устойчивости [9].

В связи с вышеуказанной целью данного исследования являлся перевод ранее созданных линий томата черри с комплексом генов качества и устойчивости на стерильную основу, а также создание гибридов томата черри на основе ФМС. Для достижения данной цели последовательно решались следующие задачи: апробация известных ДНК-маркеров аллелей ФМС, а также их усовершенствование; гибридизация крупноплодных форм с ФМС и линий томата черри; испытание созданных гибридов F₁ и передача лучшего в Государственную инспекцию по испытанию и охране сортов растений; отбор методами маркер-сопутствующей селекции (МАС) из поколений F₂–F₃ стерильных образцов томата черри с комплексом генов качества и устойчивости к болезням; создание гибридов F₁ томата черри с использованием новых линий на стерильной основе.

Материалы и методы

Для оценки эффективности ДНК маркеров использовались сорта и гибриды крупноплодных томатов черри с признаками функциональной мужской стерильности.

На этапе переноса гена *ps-2* в линии томата черри для исследований использовался совместно наработанный селекционный материал: созданные коллекции форм томата черри с комплексом ценных аллелей (табл. 1) и крупноплодных форм с комплексом хозяйственно-ценных признаков, в том числе признаком функциональной мужской стерильности, обусловленным аллелем *ps-2*.

Гибридизация проводилась в 2 этапа: в 2015 году были получены гибриды F₀ между крупноплодной стерильной Линией С9464 и Линиями черри 08, 024, 029. В 2017 году проведены скрещивания по схеме топкросса с использованием четырех стерильных крупноплодных форм в качестве материнских: линии с генами функциональной мужской стерильности и маркерного признака «картофельный лист», устойчивости к кладоспориозу Cf-5 (С 9464, Линия 83); с генами функциональной мужской стерильности и партенокарпии (Линия № 4); с генами функциональной мужской стерильности и лежкости (nor) плодов (Линия № 7). Линия 83 также характеризуется наличием аллеля I-2 устойчивости к фузариозу. В качестве отцовских форм по результатам ДНК-анализа (МАС по признакам качества плодов и устойчивости к болезням и вредителям) и оценки хозяйственно-ценных признаков в ранее проведенных испытаниях отобраны 7 линий томата черри: Линии 08, 09, 010, 020, 022, 046, 049 (табл. 1). На основе ДНК типирования индивидуальных растений образцов коллекции с помощью маркеров к аллелям Cf-2, Cf-4, Cf-5 и Cf-9 (устойчивость к кладоспориозу), I-2, I-3 (устойчивость к фузариозу), Tm-2, Tm-2² (устойчивость к вирусу мозаики томата), Mi-1.2 (устойчивость к нематоду), nor, rin, nor^A (лежкость пло-

дов), B, b (аллели ликопин-β-циклазы), hp-1, hp-2^{dg} (повышенное содержание пигментов), gf-3 (неразрушение хлорофилла в начале созревания плодов), u (равномерная белесая окраска плодов) выполнен с отбор форм для включения в гибридизацию [7, 8]. Наряду с отбором по результатам ДНК-типирования выполнен анализ форм по комплексу хозяйственно-ценных признаков урожайности и биохимического состава (табл. 1).

В 2018–2019 гг. в условиях защищенного грунта проведено испытание 28 гибридов F₁. Растения высаживали в трехкратной повторности по три растения на делянке. Схема посадки 70x30 см. Доза удобрений N₆₀(P₂O₅)₁₂₀(K₂O)₁₂₀. Агротехника — общепринятая для томата защищенного грунта. В качестве стандартов использовались районированные в Беларуси индетерминантные сорта томата черри для защищенного грунта Черри Коралл и Алекша. Биометрические измерения проводились во время массового плодоношения. Фенологические наблюдения фиксировались на протяжении всего вегетационного периода. Сборы урожая осуществлялись с интервалом семь дней, на основании полученных данных рассчитаны основные элементы урожайности. Оценка достоверности полученных результатов проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа.

Таблица 1

Формы томата типа черри, отобранные для гибридизации по результатам ДНК-типирования генов качества плодов и устойчивости к болезням, 2015 г.

№ линии	Типируемые аллели	Товарная урожайность, кг/м ²	Масса плода, г	Завязываемость, %	Сахара, %	Каротин, мг/кг	Витамин С, мг/100 г
08	<i>b*</i> ; Cf4A, Cf9	6,42	10,90	95,10	3,51	3,44	28,10
09	<i>b*</i> ; I-2C; Mi1.2; Tm2 ² ; Cf4A, Cf5, Cf9	4,49	10,80	91,00	4,13	1,76	22,00
010	<i>b*</i> ; nor; I-2; I2C; Mi1.2; Tm2 ² ; Cf4A, Cf5, Cf9	5,74	12,10	64,40	5,08	3,06	19,00
020	<i>B**</i> ; nor; I-2; Mi1.2; Cf5; Cf4; Cf9;	7,02	10,90	95,00	2,75	3,96	27,00
022	<i>B**</i> ; I2; I-2C; Cf4; Cf9	5,19	9,50	87,00	3,56	2,42	33,40
024	<i>B**</i> ; I-2; Mi1.2; Tm2 ² ; Cf5; Cf4; Cf9	3,28	13,00	94,30	2,75	4,32	27,00
029	<i>B**</i> ; I-2; Mi1.2; Tm2 ² ; Cf4A; Cf9	3,07	16,70	87,00	3,66	0,68	29,30
046	<i>b*</i> ; u; I-2; Mi1.2; Cf4A; Cf9	6,33	10,80	93,20	3,04	2,92	37,90
049	<i>b*</i> ; u; I-2C; Tm2 ² ; Cf4A; Cf9	6,74	13,30	87,60	3,04	4,29	25,80

Примечание. *b** — аллель CYCB из *S. lycopersicum*; *B*** — аллель CYCB из *S. pennellii*

Параллельно с испытаниями гибридов F₁ проводился фенотипический анализ и отбор в 2017–2018 годах из расщепляющихся поколений F₂–F₃ для первой схемы и в 2019–2020 годах — отбор методами МАС и по фенотипу из поколений F₂–F₃ для второй схемы и F₄–F₅ для первой схемы скрещивания.

В 2019 году стерильные линии черри (F₅), отобранные методами МАС и по результатам полевой оценки и лучшие по комплексу признаков ранее созданные линии, были скрещены по схеме топкросса для создания новых гибридов томата черри на стерильной основе с комплексом генов качества и устойчивости к болезням и вредителям. Данные гибриды будут оценены в дальнейших исследованиях.

Результаты и обсуждение

Оценка эффективности используемых маркеров и создание стерильных форм томата черри

На начальном этапе оценки эффективности представленных в литературе маркеров к аллелям, детерминирующим ФМС у томата, нами были апробированы два CAPS маркера C2-21_MboI и C4-30_HinfI, тесно сцепленных с генами *ps* (хромосома 2) и *ps-2* (хромосома 4) согласно данным группы польских исследователей [4]. При тестировании CAPS маркера C2-21_MboI для выявления гена *ps* на геномной ДНК из наших коллекционных линий томата были использованы праймеры FMS C2-21f (TGTGGTGCATTCAGAGTTTAGAC) и FMS C2-21r (GAGGCCACGTATGTTGATGT), предложенные польскими авторами [27]. Однако даже после оптимизации условий ПЦР (диапазон температуры отжига праймеров — 50–68 °C) не удалось достичь синтеза ожидаемого целевого продукта размером около 1800 п. о. При амплификации с данной парой праймеров на коллекции исследуемых нами форм синтезировался ПЦР-фрагмент около 330 п. о. (рис. 1). Поиск в базе GenBank на основании выложенных геномных последовательностей томата показал, что предложенные праймеры должны «отжигаться» на хромосоме 2 на ожидаемом расстоянии друг от друга около 1800 п. о., однако на наших коллекционных линиях такого не наблюдалось.

При апробации CAPS маркера C4-30_HinfI для выявления гена *ps-2* на геномной ДНК из наших коллекционных линий томата для

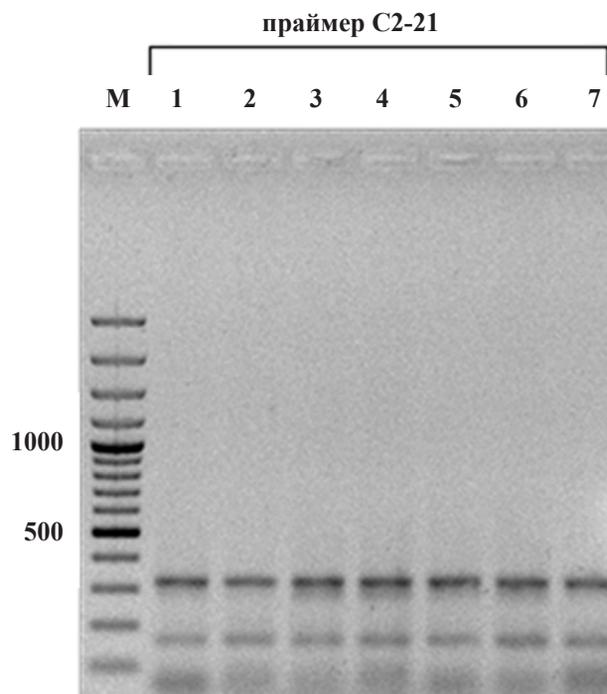


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации на геномной ДНК коллекционных линий томата с использованием праймеров FMS C2-21f/ FMS C2-21r. Дорожки: М — маркер молекулярного веса; 1 — Линия C9464x19/0 (F₂); 2 — Линия C9464x Линия 024-2 (F₂); 3 — Линия B3-1-8; 4 — Линия C9464x Линия 08 (F₂); 5 — Линия C9464; 6 — Розалетта (F₃); 7 — Линия T-34 (F₃)

амплификации были использованы праймеры, предлагаемые авторами [4]: FMS C4-30f (ATGTTACAACCAACAGACGGCGG) и FMSC4-30r (TGAAGTTTTGATGCTGAAAAATTGC) с рестриктазой HinfI. После получения ДНК-фрагмента указанной авторами длины (около 1000 п. н.) и рестрикции ожидался следующий ряд фрагментов ≈100, 150, 180, 400 п. о. у всех образцов, 80 п. о. — у гомозиготных по аллелю *ps-2* форм, 190 п. о. — у гомозиготных фертильных форм. Четкая разгонка большого количество близкорасположенных фрагментов оказалась возможной лишь на Metaphor агарозе. Представленные результаты показаны на рисунке 2. Видно, что фрагмент 80 п. о., указывающий на сцепление с геном *ps-2*, у коллекционных форм с фенотипическим проявлением ФМС не был подтвержден с помощью данной пары праймеров.

Таким образом, в наших исследованиях не удалось подтвердить эффективность использования маркеров C2-21_MboI и C4-30_HinfI для выявления аллелей, детерминирующих функциональную мужскую стерильность.

На следующем этапе работы нами был апробирован CAPS маркер ps-2_TaiI, предложенный голландскими исследователями для выявления аллеля ps-2 [5]. Авторами было установлено, что мутация в гене полигалактуроназы тесно связана с фенотипом ФМС, предложено использовать CAPS маркер для ДНК-типирования данной мутации [5].

Данный маркер был апробирован успешно. С этой целью использовались праймеры: ps-2_TaiI F (CAAATGGATGAGAGTTTTGAA) и ps-2_TaiI R (CATTTTACAAGTGTAACAACCTTG), а также рестриктаза TaiI (*Hpy*CH4IV, *Mae*II). До рестрикции у всех образцов томата с применением данных праймеров синтезировался единичный фрагмент в 696 п. о. После рестрикции у растений с аллелем Ps-2 (без ФМС) образовывались фрагменты 397, 223, 76 п. о., а у растений гомозиготных по мутантному аллелю ps-2 (наличие ФМС) наблюдались рестрикты длиной 223, 200, 197 и 76 п. о. Гетерозиготные формы будут содержать фрагменты всех размеров. Как видно из представленного рисунка 3, применение CAPS маркера ps-2_TaiI позволяет четко выявлять гомозиготы по мутантному аллелю ps-2 (отсутствие фрагмента размером 397 п. о.) или говорить о присутствии в геноме растений томата нормального аллеля. Однозначно различить гетерозиготы

Ps-2/ps-2 и гомозиготы по аллелю Ps-2 (фертильная пыльца) с использованием данного маркера в обычном агарозном геле затруднительно (рис. 3) из-за близкого размера получаемых продуктов. Более четко они будут видны при применении метода разгонки продуктов в геле на Metaphor агарозе или полиакриламидном геле. Последние варианты увеличивают стоимость и усложняют анализ.

Таким образом, нам удалось подтвердить эффективность использования маркера ps-2_TaiI, который при электрофорезе продуктов амплификации на обычном агарозном геле четко выделяет гомозиготные образцы с аллелем ps-2 функциональной мужской стерильности.

В целях повышения эффективности разделения гомозиготных и гетерозиготных форм на основании сведений о локализации SNP (G/C) (мутация ps-2) в изучаемой последовательности томата (EU111748) с использованием программы BatchPrimer3 нами разработан Tetra-primer ARMS-PCR маркер. Последовательности разработанных праймеров следующие: ps-2 out F — TTTGCTAATTGAGAAGTGTG, ps-2 out R — CTACGTCAAAGACCAAGTG, ps-2 inn F — ATTCCACCATTGCCAGAC (С-специфический, для мутантного аллеля), ps-2 inn R — CGTTAATTTATCGATTCC (G-специфический, для нормального аллеля). В результате проведения амплификации у всех образцов синтезируется фрагмент размером 338 п. о.; у гомозиготных и гетерозиготных форм с аллелем ps-2 присутствует дополнительный фрагмент размером 219 п. о.; у гомозиготных по аллелю Ps-2 — 154 пар оснований. Наряду с возможностью выявлять как гомозиготные, так и гетерозиготные формы, апробация тетра-праймера показала и недостаток данного метода — неодинаковый синтез продуктов внешних и внутренних праймеров, что затрудняет интерпретацию результатов. В связи с этим мы предлагаем для ДНК-типирования селекционного материала на наличие аллеля ps-2 использовать два маркера. Сначала применять CAPS маркер ps-2_TaiI для выявления стерильных гомозиготных форм с ps-2. В случае необходимости разделить оставшиеся образцы с аллелем Ps-2 на гомо- и гетерозиготные, далее использовать Tetra-primer ARMS-PCR

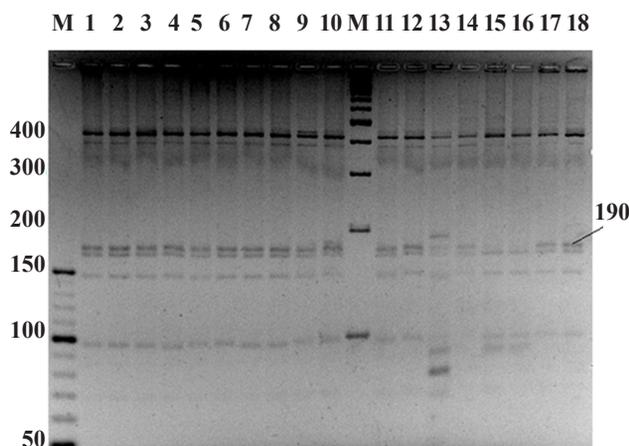


Рис. 2. Электрофорез продуктов рестрикции после использования CAPS маркера С4-30_NinI на геномной ДНК коллекционных линий. Дорожки: М — маркер молекулярного веса; 1–2 — Линия С9464х19/0 (F₅); 3–4 — Линия С9464х Линия 024 (F₂); 5–6 — Линия БЗ-1-8; 7–8 — Линия С9464х Линия 08 (F₂); 9–10 — Линия С9464; 11–12 — Розалетта (F₃); 13–14 — Линия Т-34 (F₃); 15–16 — Крупный розовый; 17–18 — Малиновые пикули

маркер. При этом гетерозиготы по аллелю *ps-2* будут характеризоваться наличием фрагмента 219 пар оснований.

На рисунке 4 приведен пример ДНК-типирования расщепляющегося материала популяций F₃ с использованием двух маркеров. С использованием CAPS маркера *ps-2*_T*ai*I выбираем гомозиготы по аллелю *ps-2* (рис. 4а), далее с помощью Tetra-primer ARMS-PCR

маркера разделяем гетерозиготы *ps-2*/*Ps-2* и гомозиготы *Ps-2* (рис. 4б).

С использованием данных методов типирования аллеля *ps-2*, а также ранее разработанных методов типирования аллелей качества плодов и устойчивости к болезням из гибридных популяций создан линейный материал (F₃). Наряду с данными формами создан материал F₃ из гибридов, полученных в 2017 году (табл. 2).

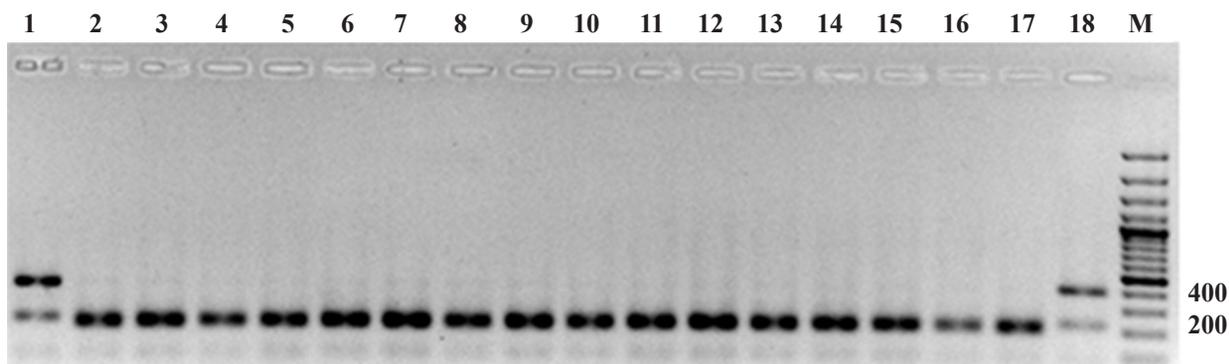


Рис. 3. Электрофорез продуктов амплификации, полученных после использования CAPS маркера *ps-2*_T*ai*I. Дорожки: 1, 18 — фертильный образец Старт; 2–5 — Линия С 9464; 6–9 — Линия 83; 10–13 — Линия 4; 14–17 — Линия 7; М — маркер молекулярного веса

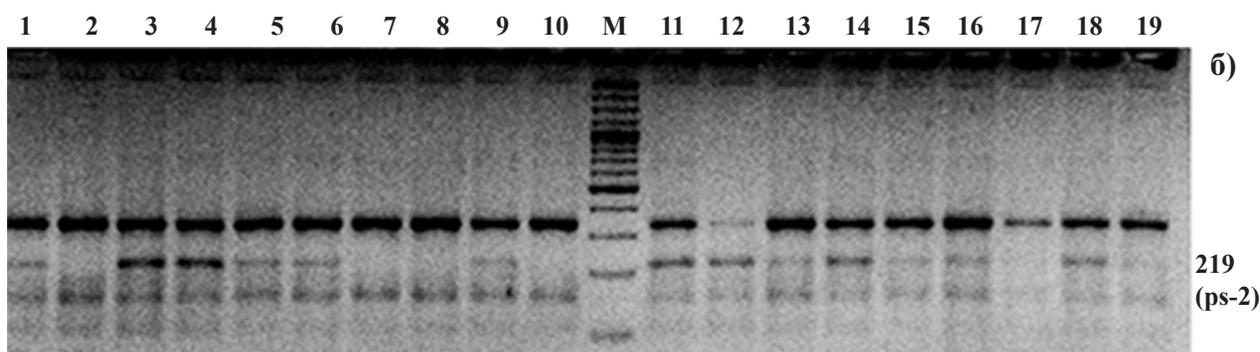
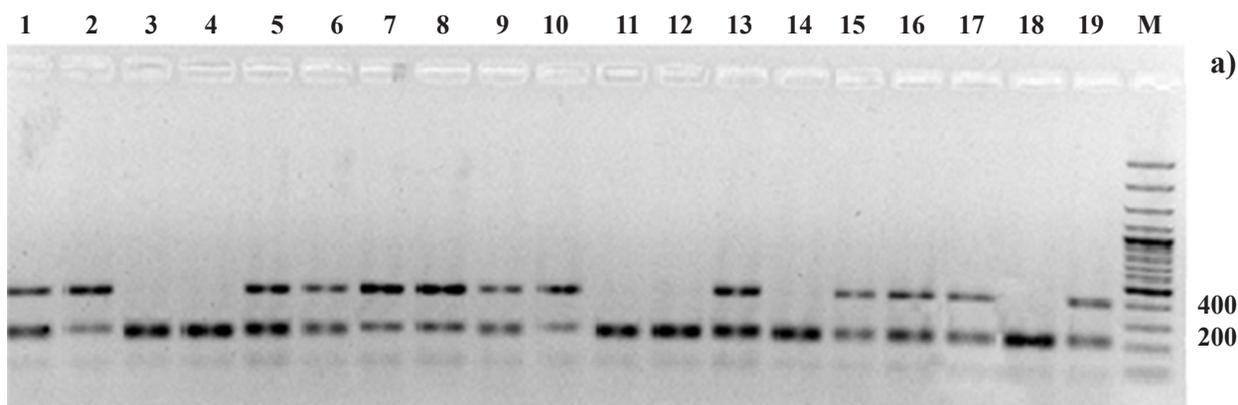


Рис. 4. Электрофорез продуктов амплификации, полученных при использовании CAPS маркера *ps-2*_T*ai*I (а) и Tetra-primer ARMS-PCR маркера (б). Дорожки: 1–10 — F₃ Линия С9464хЛиния 08; 11–19 — F₃ Линия С9464хЛиния 024; М — маркер молекулярного веса. Гомозиготы по аллелю *ps-2*: дорожки 3, 4, 11, 12, 14, 18; гетерозиготы *ps-2*/*Ps-2*: дорожки 1, 5, 6, 9, 13, 15, 16, 19; гомозиготы по аллелю *Ps-2*/*Ps-2*: дорожки 2, 7, 8, 10, 17

Таблица 2

Сводные результаты ДНК-типирования созданных форм томата черри F₅ и F₃ на стерильной основе

Популяции F ₅ , F ₃	Аллельный состав целевых генов
С 9464 x Линия 08 (F ₅)	<i>b</i> (из <i>S. lycopersicum</i>); <i>Cf4A</i> ; <i>Cf9</i>
	<i>b</i> (из <i>S. lycopersicum</i>); <i>Cf4A</i> ; <i>Cf-5</i> ; <i>Cf9</i>
С 9464 x Линия 024 (F ₅)	<i>b</i> (из <i>S. lycopersicum</i>); <i>I2-C</i> ; <i>Cf4A</i> ; <i>Cf5</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>ps-2</i>
	<i>B</i> (<i>S. pennellii</i>); <i>I-2</i> ; <i>Cf4A</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>ps-2</i>
	<i>B</i> (из <i>S. pennellii</i>); <i>I-2</i> ; <i>Mi1.2</i> ; <i>Cf4A</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>ps-2</i>
С 9464 x Линия 029 (F ₅)	<i>I-2</i> ; <i>Mi1.2</i> ; <i>Cf4A</i> ; <i>Cf5</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>B</i> (из <i>S. pennellii</i>); <i>ps-2</i>
	<i>I-2</i> ; <i>Mi1.2</i> ; <i>Tm2²</i> ; <i>Cf4A</i> ; <i>Cf9</i> <i>b</i> (из <i>S. lycopersicum</i>); <i>ps-2</i>
Линия 83 x Линия 020 (F ₃)	<i>b</i> (из <i>S. lycopersicum</i>); <i>nor</i> ; <i>I-2</i> ; <i>Mi1.2</i> ; <i>Cf4</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>B</i> ; <i>ps-2</i>
	<i>B</i> (<i>S. pennellii</i>); <i>nor</i> ; <i>I-2</i> ; <i>Mi1.2</i> ; <i>Cf4</i> ; <i>Cf5</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>B</i> (из <i>S. pennellii</i>); <i>ps-2</i>
	<i>B</i> (<i>S. pennellii</i>); <i>I-2</i> ; <i>Mi1.2</i> ; <i>Cf5</i> ; <i>Cf4</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>ps-2</i>
Линия 83 x Линия 029 (F ₃)	<i>B</i> (<i>S. pennellii</i>); <i>I-2</i> ; <i>Mi1.2</i> ; <i>Tm2²</i> ; <i>Cf4A</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>ps-2</i>
	<i>B</i> (<i>S. pennellii</i>); <i>I-2C</i> ; <i>Tm2²</i> ; <i>Cf4A</i> ; <i>Cf5</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>ps-2</i>
	<i>b</i> (из <i>S. lycopersicum</i>); <i>I-2</i> ; <i>Mi1.2</i> ; <i>Tm2²</i> ; <i>Cf4A</i> ; <i>Cf-5</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>ps-2</i>
Линия Б-3-1-8 x Линия 046 (F ₃)	<i>b</i> (из <i>S. lycopersicum</i>); <i>u</i> ; <i>I-2C</i> ; <i>Tm2²</i> ; <i>Cf4A</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>ps-2</i>
	<i>b</i> (из <i>S. lycopersicum</i>); <i>u</i> ; <i>Tm2²</i> ; <i>Cf4A</i> ; <i>Cf9</i> ; <i>ps-2</i>

Испытание созданных гибридов F₁

С целью испытания и отбора лучшего гибрида для передачи в Государственную инспекцию по испытанию и охране сортов растений, а также дальнейшего использования материала для создания форм черри на основе ФМС четыре стерильные линии с крупным размером плода использовались в качестве материнских. Указанные образцы обладают значительным потенциалом формирования урожайности в качестве материнского компонента скрещивания, высокой общей и специфической комбинационной способностью. При этом по типу роста индетерминантной является Линия 83, полудетерминантными — Линия С9464 и Линия №7, детерминантной — Линия 4 [9]. Для получения гетерозисных гибридов проведено скрещивание с семью индетерминантными линиями разновидности черри, имеющими плоды массой 10–15 г, а также, по результатам ДНК-анализа, аллели, определяющие качество плодов и устойчивость к болезням.

Результаты биометрических учетов по всем образцам представлены в таблице 3. В таблице 4 представлены значения признаков по группам родительских форм для сравнения влия-

ния на проявления признака каждого родителя. Согласно анализу высоты растений (табл. 3), изучаемые гибриды имели индетерминантный тип роста с высотой от 252,6 до 364,9 см, несмотря на различный тип роста материнских форм. Гибриды, проходившие испытание, образовали по 10–12 кистей на главном стебле. Максимальное значение данного признака (12,0–12,9 шт.) отмечено у гибридных комбинаций Линия С9464 x Линия 09, Линия С9464 x Линия 020, Линия №4 x Линия 08, Линия №4 x Линия 09, Линия 83 x Линия 020 и Линия №7 x Линия 09. Отмечается снижение количества кистей на главном стебле до 9,2–10,6 шт. в комбинациях скрещивания с Линией 046.

Количество плодов на кисти у гибридов изменялось от 6,2 до 19,0 и было меньше, чем у отцовских компонентов скрещивания (9,5–26,5). Максимальное число плодов на кисти у гибридов обеспечивало включение в скрещивания Линий 08, 020, 022 и Линии С 9464.

Анализ завязываемости плодов показал высокий процент (90,0–91,8%) у трех гибридных комбинаций: Линия С 9464 x Линия 08, Линия 83 x Линия 08 и Линия №7 x Линия 09.

Таблица 3

Результаты биометрических измерений растений томата черри, среднее за 2018–2019 гг.

Линии (гибриды)	Высота растения, см ± S \bar{x}	Количество кистей на главном стебле, шт. ± S \bar{x}	Среднее количество плодов на кисти, шт. ± S \bar{x}	Завязываемость плодов, % ± S \bar{x}	Всходы-начало созревания, дни ± S \bar{x}
Черри Коралл (стандарт)	270,4 ± 9,6	10,3 ± 0,3	5,1 ± 0,8	69,2 ± 0,6	101,0 ± 1,5
Линия 08	333,9 ± 23,9	12,2 ± 1,8	15,5 ± 5,5	75,8 ± 11,6	98,0 ± 4,5
Линия 09	280,5 ± 19,5	11,4 ± 1,6	9,6 ± 0,1	84,3 ± 10,7	94,0 ± 1,0
Линия 010	259,1 ± 30,9	11,0 ± 2,1	14,6 ± 2,1	56,3 ± 16,7	94,0 ± 1,0
Линия 020	277,9 ± 7,8	9,9 ± 0,1	25,3 ± 0,3	55,4 ± 13,2	122,0 ± 5,0
Линия 022 (Алекша)	252,0 ± 22,0	11,0 ± 1,0	26,5 ± 6,8	69,4 ± 5,8	94,0 ± 1,0
Линия 046	200,0 ± 50,0	10,8 ± 2,3	9,5 ± 0,3	69,5 ± 5,5	94,0 ± 1,0
Линия 049	200,1 ± 10,1	8,3 ± 1,3	13,6 ± 5,8	63,8 ± 9,5	94,0 ± 1,0
Линия С 9464 (ФМС)	151,0 ± 2,5	7,8 ± 0,2	0	0	–
Линия № 4 (ФМС + парт.)	91,3 ± 3,8	5,5 ± 0,2	4,4 ± 0,3	77,5 ± 0,5	94,0 ± 1,0
Линия 83 (ФМС)	262,5 ± 7,5	10,1 ± 0,3	0	0	–
Линия №7 (ФМС + nor)	170,8 ± 5,8	5,3 ± 0,5	1,4 ± 0,1	19,0 ± 1,0	–
Линия С 9464 х Линия 08	330,7 ± 2,7	10,4 ± 0,7	14,7 ± 2,0	90,7 ± 2,4	95,0 ± 1,5
Линия С 9464 х Линия 09	324,3 ± 4,3	12,0 ± 1,0	8,3 ± 1,4	80,9 ± 9,8	95,0 ± 1,5
Линия С 9464 х Линия 010	280,4 ± 17,1	11,0 ± 0,1	17,7 ± 8,0	88,4 ± 4,0	95,0 ± 1,5
Линия С 9464 х Линия 020	363,3 ± 5,8	12,5 ± 0,5	18,8 ± 2,7	85,8 ± 8,4	103,0 ± 3,0
Линия С 9464 х Линия 022	280,0 ± 15,0	10,7 ± 0,7	15,5 ± 3,0	80,9 ± 11,0	95,0 ± 1,5
Линия С 9464 х Линия 046	265,2 ± 2,7	10,6 ± 0,4	8,5 ± 0,8	69,5 ± 4,5	95,0 ± 1,5
Линия С 9464 х Линия 049	272,4 ± 28,3	9,9 ± 0,9	19,0 ± 8,3	71,7 ± 11,9	98,0 ± 1,5
Линия №4 х Линия 08	306,9 ± 43,1	12,9 ± 3,1	9,0 ± 0,3	87,5 ± 2,2	95,0 ± 1,5
Линия №4 х Линия 09	330,4 ± 53,6	12,3 ± 1,8	7,6 ± 0,1	88,1 ± 2,4	95,0 ± 1,5
Линия №4 х Линия 010	314,6 ± 32,9	11,1 ± 0,1	8,3 ± 1,2	87,1 ± 6,3	98,0 ± 1,5
Линия №4 х Линия 020	254,5 ± 40,5	10,9 ± 1,1	10,2 ± 2,0	88,8 ± 1,3	116,0 ± 11,0
Линия №4 х Линия 022	276,9 ± 36,9	11,3 ± 0,3	14,0 ± 0,2	81,9 ± 6,9	95,0 ± 1,5
Линия №4 х Линия 046	252,6 ± 22,6	9,7 ± 0,7	6,2 ± 2,7	61,0 ± 18,5	98,0 ± 1,5
Линия №4 х Линия 049	310,9 ± 29,1	11,6 ± 1,4	6,7 ± 0,4	81,1 ± 0,5	95,0 ± 1,5
Линия 83 х Линия 08	358,5 ± 21,5	11,4 ± 0,4	15,0 ± 1,5	91,8 ± 2,6	95,0 ± 1,5
Линия 83 х Линия 09	332,9 ± 34,6	11,9 ± 1,1	8,8 ± 0,5	87,6 ± 1,6	95,0 ± 1,5
Линия – 83 х Линия 010	279,4 ± 9,3	10,4 ± 0,4	9,8 ± 1,3	77,6 ± 12,8	95,0 ± 1,5
Линия 83 х Линия 020	291,6 ± 40,9	12,1 ± 0,9	12,8 ± 2,3	73,8 ± 4,0	98,0 ± 1,5
Линия 83 х Линия 022	347,4 ± 22,7	11,4 ± 0,6	11,9 ± 1,3	79,3 ± 3,5	106,0 ± 7,0
Линия 83 х Линия 046	297,9 ± 48,8	9,4 ± 2,4	7,5 ± 4,2	84,4 ± 6,3	101,0 ± 5,0
Линия 83 х Линия 049	289,4 ± 25,7	10,2 ± 0,9	8,8 ± 0,8	66,4 ± 11,3	98,0 ± 1,5
Линия №7 х Линия 08	315,0 ± 36,1	10,8 ± 0,3	9,4 ± 0,1	82,9 ± 5,9	101,0 ± 1,5
Линия №7 х Линия 09	364,9 ± 35,1	12,4 ± 1,7	7,6 ± 0,6	90,0 ± 7,6	101,0 ± 1,5
Линия №7 х Линия 010	282,3 ± 7,3	10,7 ± 0,4	11,1 ± 3,5	86,1 ± 3,3	104,0 ± 2,0

Продолжение таблицы 3

Линии (гибриды)	Высота растения, см ± S _х	Количество кистей на главном стебле, шт. ± S _х	Среднее количество плодов на кисти, шт. ± S _х	Завязываемость плодов, % ± S _х	Всходы-начало созревания, дни ± S _х
Линия №7 x Линия 020	322,9 ± 7,9	10,8 ± 0,3	9,8 ± 1,3	79,7 ± 14,3	116,0 ± 4,0
Линия №7 x Линия 022	293,5 ± 6,0	10,7 ± 0,4	12,3 ± 1,7	89,2 ± 3,0	104,0 ± 2,0
Линия №7 x Линия 046	279,6 ± 25,4	9,2 ± 0,2	9,2 ± 0,2	85,4 ± 1,6	104,0 ± 2,0
Линия №7 x Линия 049	298,2 ± 6,8	11,0 ± 0,1	9,7 ± 0,6	79,9 ± 9,3	101,0 ± 1,5

Таблица 4

Средние значения биометрических признаков в группах гибридов с материнскими и отцовскими линиями

Группы гибридов с линиями	Высота растения, см	Количество кистей на главном стебле, шт.	Среднее количество плодов на кисти, шт.	Завязываемость плодов, %	Всходы-начало созревания, дни	Общая урожайность, кг/м ²	Масса плода, г
♂ Линия 08	327,80	11,4	12,00	88,20	97	7,08	21,82
♂ Линия 09	338,10	12,20	8,10	86,70	97	4,85	19,39
♂ Линия 010	289,20	10,80	11,70	84,80	98	6,93	25,19
♂ Линия 020	308,10	11,60	12,90	82,00	108	6,94	25,55
♂ Линия 022	299,50	11,00	13,40	82,80	100	7,32	23,96
♂ Линия 046	273,80	9,70	7,90	75,10	100	6,24	23,83
♂ Линия 049	292,70	10,70	11,10	74,80	98	6,94	26,90
♀ Линия С9464	302,30	11,00	14,60	81,10	97	6,69	19,65
♀ Линия № 4	292,40	11,40	8,90	82,20	99	6,40	27,57
♀ Линия 83	313,90	11,00	10,70	80,10	98	5,52	19,18
♀ Линия №7	308,10	10,80	9,90	84,70	104	7,84	28,82

У остальных гибридов значения этого признака были на уровне 61,0–89,2%. Не сформировали плоды стерильные Линия С 9464 и Линия 83. У Линии №7 отмечена завязываемость 19%, что свидетельствует о вероятности самоопыления и неустойчивой (незакрепленной) функциональной мужской стерильности. Продолжительность периода от всходов до начала созревания плодов у исследуемых гибридов находилась в пределах 95–116 дней. Скороспелыми оказались отцовские линии разновидности черри, включая Линию 022, районированную в 2018 году под названием Алекша. Более ста дней для формирования зрелых плодов потребовалось стандарту Черри Коралл, Линии 020 (122 дня), несущей ген лежкости *nor* и большинству гибридов с ее участием, а также гибридам с Линией №7, которая также обладает геном леж-

кости *nor*. Завязываемость плодов в группах гибридов составляла 80,1–88,2%, за исключением комбинаций скрещивания с Линией 046 и Линией 049, в которых завязываемость снижалась до 74,8–75,1%. Более раннее получение зрелых плодов (в среднем через 97 дней после появления всходов) обеспечивает выращивание гибридов, полученных при вовлечении в скрещивание Линии 08, Линии 09 и Линии С 9464.

Значения основных признаков урожайности (товарная, общая урожайность и масса плода) изучаемых образцов томата черри представлены в таблице 5.

Анализ данных по товарной урожайности за 2018–2019 годы показал максимальные значения признака у гибридных комбинаций с Линией №4 и Линией №7, формирующих более крупные плоды массой 24,46–33,40 г, которые

Таблица 5

Признаки урожайности томатов разновидности черри, среднее за 2018–2019 гг.

Линии (гибриды)	Товарная урожайность, кг/м ² ± S _{x̄}	Общая урожайность, кг/м ² ± S _{x̄}	Масса плода, г ± S _{x̄}
Черри Коралл (стандарт)	3,82 ± 0,10	4,34 ± 0,30	15,67 ± 0,10
Линия 08	2,95 ± 1,20	3,47 ± 1,60	9,17 ± 2,20
Линия 09	1,91 ± 0,60	2,17 ± 0,70	8,20 ± 0,80
Линия 010	4,91 ± 1,50	5,61 ± 2,10	9,06 ± 1,40
Линия 020	5,99 ± 1,30	6,63 ± 1,70	14,69 ± 0,90
Линия 022 (Алекша)	5,36 ± 1,80	5,61 ± 1,80	7,42 ± 0,10
Линия 046	3,06 ± 0,50	3,92 ± 1,20	9,73 ± 1,90
Линия 049	4,55 ± 1,00	4,83 ± 1,20	9,35 ± 0,20
Линия С 9464 (ФМС)	0	0	0
Линия № 4 (ФМС + парт.)	5,90 ± 1,50	6,63 ± 1,40	64,59 ± 1,90
Линия 83 (ФМС)	0	0	0
Линия №7 (ФМС + парт.)	0	4,20 ± 0,30	70,33 ± 4,80
Линия С 9464 х Линия 08	7,01 ± 1,60	7,50 ± 1,80	16,26 ± 4,00
Линия С 9464 х Линия 09	3,45 ± 1,10	3,92 ± 1,50	13,73 ± 0,50
Линия С 9464 х Линия 010	5,91 ± 2,40	6,55 ± 2,90	22,31 ± 0,20
Линия С 9464 х Линия 020	6,68 ± 1,30	7,41 ± 1,90	19,53 ± 1,40
Линия С 9464 х Линия 022	6,9 ± 1,30	7,26 ± 1,50	22,14 ± 0,70
Линия С 9464 х Линия 046	6,77 ± 0,80	7,04 ± 0,90	21,35 ± 1,80
Линия С 9464 х Линия 049	6,47 ± 1,50	7,16 ± 2,00	22,23 ± 1,40
Линия №4 х Линия 08	6,82 ± 1,90	7,28 ± 2,20	24,69 ± 0,90
Линия №4 х Линия 09	5,53 ± 1,20	5,91 ± 1,50	24,46 ± 0,50
Линия №4 х Линия 010	7,20 ± 2,80	7,84 ± 3,40	29,1 ± 0,80
Линия №4 х Линия 020	5,76 ± 0,90	6,07 ± 1,20	33,4 ± 1,70
Линия №4 х Линия 022	7,16 ± 1,10	7,57 ± 1,40	26,34 ± 2,00
Линия №4 х Линия 046	4,96 ± 0,60	5,3 ± 0,70	27,61 ± 9,10
Линия №4 х Линия 049	4,56 ± 0,40	4,81 ± 0,50	27,4 ± 0,90
Линия 83 х Линия 08	5,06 ± 0,30	5,80 ± 0,80	16,98 ± 0,90
Линия 83 х Линия 09	3,15 ± 0,40	3,85 ± 0,90	14,41 ± 1,50
Линия 83 х Линия 010	5,1 ± 1,30	5,58 ± 1,70	19,92 ± 4,10
Линия 83 х Линия 020	4,97 ± 0,80	5,70 ± 1,40	23,2 ± 5,60
Линия 83 х Линия 022	5,57 ± 1,80	6,10 ± 2,20	17,77 ± 0,20
Линия 83 х Линия 046	5,21 ± 1,00	5,40 ± 1,10	17,33 ± 1,90
Линия 83 х Линия 049	5,80 ± 1,20	6,20 ± 1,60	24,68 ± 4,20
Линия №7 х Линия 08	7,32 ± 2,70	7,73 ± 2,80	29,34 ± 4,00
Линия №7 х Линия 09	5,07 ± 0,40	5,71 ± 0,90	24,94 ± 0,20
Линия №7 х Линия 010	7,13 ± 3,00	7,76 ± 3,60	29,43 ± 6,00

Продолжение таблицы 5

Линии (гибриды)	Товарная урожайность, кг/м ² ± S _{x̄}	Общая урожайность, кг/м ² ± S _{x̄}	Масса плода, г ± S _{x̄}
Линия №7 x Линия 020	7,66 ± 0,10	8,57 ± 0,50	26,08 ± 11,80
Линия №7 x Линия 022	7,87 ± 2,60	8,34 ± 3,00	29,6 ± 2,40
Линия №7 x Линия 046	6,89 ± 0,60	7,20 ± 0,70	29,04 ± 2,50
Линия №7 x Линия 049	8,83 ± 2,20	9,58 ± 2,70	33,28 ± 2,20
НСР ₀₅ для фактора генотипы	1,633	1,865	4,202

можно отнести к коктейльным формам. Достоверное превышение стандарта Черри Коралл по товарной урожайности на 44,76–131,2% отмечено у большинства гибридов с Линией С 9464, Линией №4 и Линией №7, а также в комбинациях скрещивания Линия 83 x Линия 022 и Линия 83 x Линия 049. Восемь гибридов продемонстрировали достоверное превосходство над районированным с 2018 года стандартом Алекша на 30,78–64,74%.

Общая урожайность, включающая как товарную, так и нетоварную часть продукции, является мерой оценки потенциальной возможности образцов накапливать ассимиляты в плодах томата. Высокой товарностью плодов (более 95%) отличались четыре гибрида. Общей урожайностью на уровне 6,55–9,58 кг/м² характеризовалось большинство гибридов с Линией С 9464 и Линией №7, а также три гибрида с Линией №4. Достоверное превышение лучшего стандарта Алекша по общей урожайности отмечено у семи гибридных комбинаций.

Признак «средняя масса товарного плода» имеет определяющую роль в селекции томата черри. Оптимальной средней массой товарного плода считается от 10 до 25 граммов. В наших исследованиях был подобран отцовский компонент скрещивания с массой плода 10–15 граммов с целью снижения массы плода у гибридов, так как в качестве материнского компонента использовались достаточно крупноплодные стерильные линии. Плоды с оптимальной массой для томата черри сформированы в гибридных комбинациях с линиями С 9464 и 83 (в среднем 13–23 г). Растения гибридных комбинаций с линиями №4 и №7 образовали плоды массой более 25 граммов и относились в большинстве случаев к коктейльным.

По результатам изучения хозяйственно ценных признаков выявлены 10 гибридных комбинаций, сочетающих высокие значения урожайности с оптимальной массой плода для томата черри: Линия С 9464 x Линия 08; Линия С 9464 x Линия 010; Линия С 9464 x Линия 020; Линия С 9464 x Линия 022; Линия С 9464 x Линия 046; Линия С 9464 x Линия 049; Линия №4 x Линия 08; Линия 83 x Линия 08; Линия 83 x Линия 022 и Линия 83 x Линия 049. После сопоставления полученных данных с результатами 2020 года лучшая форма будет передана для оценки в Государственную инспекцию по испытанию и охране сортов растений.

Заключение

В результате апробации известных маркеров к аллелю *ps-2*, детерминирующему функциональную мужскую стерильность (нерастрескиваемость пыльцы), установлена наибольшая эффективность выявления гомозиготных аллелей с помощью маркера *ps-2_TaiI* (Gorguet В. и др., 2009). Для повышения эффективности идентификации гетерозиготных аллелей *ps-2/Ps-2* разработан и успешно апробирован Tetra-*primer ARSM-PCR*.

Созданы 28 гибридов F₁ между крупноплодными формами с ФМС и линиями томата черри, проведены их двухлетние испытания. Выделены лучшие гибридные комбинации с высокими значениями урожайности в сочетании с оптимальным размером (16,26–26,34 г) плода для томатов черри, превосходящие стандарт Алекша по ранней урожайности на 0,70–1,26 кг/м², по общей урожайности — на 0,49–1,96 кг/м² с целью дальнейшей передачи в Государственную инспекцию по испытанию и охране сортов растений.

По результатам ДНК-типирования и фенотипической оценки из расщепляющихся популяций F₂–F₃ полученных гибридов, а также F₄–F₅ ранее созданных выделены линии томата черри на стерильной основе (с аллелем *ps-2*) с комплексом генов качества (*B* из *S. pennellii*, *b* из *S. lycopersicum*, *nor*, *u*) и устойчивости (*I-2*, *I-2C*, *Mi 1.2*, *Cf-4*, *Cf-4A*; *Cf-5* *Cf-9*, *Tm2²*). Созданные линии томата черри на основе ФМС могут служить материнскими линиями для создания новых гибридов с упрощенной системой семеноводства. Выполнены скрещивания по двум схемам топкросса с участием пятнадцати материнских форм на основе ФМС и шести отцовских форм томата черри для дальнейшего изучения. Полученные результаты позволяют повысить эффективность селекционного процесса томата черри путем сочетания в новых образцах одновременно признаков урожайности, качества плодов, устойчивости к болезням в результате использования методов молекулярного маркирования, а также классических методов гибридизации и отбора.

Список использованных источников

1. Агапов, А. С. Использование стерильных линий в селекции тепличных томатов // Генотип и среда в селекции тепличных томатов: Материалы совещ. рабочей группы по томатам (Ленинград, 16–20 мая 1978 г.) / А. С. Агапов // ЕУКАРПИА, Селекция овощных культур. – Л.: ВИР, 1978. – С. 36–40
2. Георгиев, Х. Функциональная стерильность у томатов и ее использование в гибридном семеноводстве / Х. Георгиев, Б. Атанасова // Исслед. по генетике и селекции. – София, 1983. – С. 127–129.
3. Кильчевский, А. В. Изучение партенокарпических гетерозисных гибридов F₁ томата на основе функциональной мужской стерильности в пленочных необогреваемых теплицах / А. В. Кильчевский, М. М. Добродькин // Сб. науч. тр. / Бел. с.-х. акад. – Горки, 1998. – Состояние и перспективы развития плодоводства и овощеводства в современных условиях. – С. 23–28.
4. Staniaszek, M. The Novel *ps* and *ps-2* Specific Markers for Selection of Functional Male Sterile Tomato Lines in Breeding Programs and Hybrids Seed Production / M. Staniaszek [et al.] // Journal of Agricultural Science. – 2012 – Vol. 4, № 10. – P. 61–67.
5. Gorguet, B. *Ps-2*, the gene responsible for functional sterility in tomato, due to non-dehiscent anthers, is the result of a mutation in a novel polygalacturonase gene / B. Gorguet [et al.] // Theor Appl Genet. – 2009. – Vol. 118. – P. 1199–1209.
6. Sha, Z. Development of SSR and CAPS molecular markers linked with *ps-2* gene in tomato / Z. Sha [et al.] // Acta Horticulturae Sinica. – 2010. – Vol. 37, № 2. – P. 235–240.
7. Кильчевский, А. В. ДНК-типирование генов качества плодов и устойчивости к болезням томата: методические рекомендации / А. В. Кильчевский [и др.]. – Минск: Право и экономика. – 2016. – 41 с.
8. Babak, O. G. Genetic bases of tomato marker-assisted selection in Belarus / O. G. Babak [et al.] // Eurobiotech. J. – 2018. – Vol. 2, № 2. – P. 128–135. doi: 10.2478/ebtj-2018-0017.
9. Кильчевский, А. В. Изучение хозяйственно ценных признаков томата типа черри в защищенном грунте А. В. Кильчевский [и др.] // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – № 1. – 2017. – С. 71–76.

O. G. Babak¹, N. A. Nekrashevich¹, N. V. Anisimova¹, K. K. Yatsevich¹, T. V. Nikitinskaya¹,
N. Y. Leshchina², T. V. Nikonovich², I. G. Pugachova², M. M. Dobrodkin², A. V. Kilchevsky¹

DEVELOPMENT OF CHERRY TOMATO F₁ HYBRIDS WITH FUNCTIONAL STERILITY USING CLASSICAL AND MARKER-ASSISTED BREEDING METHODS

¹State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27, Akademicheskaya Str., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: O.Babak@igc.by

²Belarusian State Agricultural Academy

5, Michurin St., 213407 Gorki, the Republic of Belarus

As a result of testing of known markers to the *positional sterility-2* (*ps-2*) allele, which determines functional male sterility (FMS), the highest efficiency in detecting of homozygous alleles using the *ps-2*_TaiI marker was achieved. In order to increase efficiency in the identification of heterozygous *ps-2/PS-2* alleles, the Tetra-primer ARSM-PCR was developed and successfully tested. Twenty eight F₁ hybrids between large-fruited forms with FMS and cherry tomato lines were developed, and their two-year testing was conducted. Best hybrid combinations with high yielding values in combination with the optimal fruit size (16–26 g) for cherry tomatoes were chosen exceeding the Aleksha standard in an early yield by 0.70–1.26 kg/m² and in the total yield by 0.49–1.96 kg/m² for their further transfer to the State Seed Inspectorate. Based on the results of DNA typing and phenotypic evaluation, cherry tomato lines on a sterile basis (with the *ps-2* allele) with a complex of quality (*B* from *S. pennellii*, *b* from *S. lycopersicum*, *nor*, and *u*) and resistance (*I-2*, *I-2C*, *Mi 1.2*, *Cf-4*, *Cf-4A*; *Cf-5* *Cf-9*, *Tm2²*) genes were distinguished in F₂–F₅ populations. Cherry tomato lines developed on the basis of FMS may serve as maternal lines for developing new hybrids with a simplified seed production system.

Keywords: cherry tomato, DNA typing, *ps-2* gene markers, functional male sterility, yield traits.

Дата поступления статьи: 16 сентября 2020 г.

Н. И. Дубовец, Е. А. Сычѐва, А. В. Соколюк, Е. Б. Бондаревич, Л. А. Соловей

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ ОВСА ПОСЕВНОГО *AVENA SATIVA* L. С ПОМОЩЬЮ SSR-АНАЛИЗА

Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: N.I.Dubovets@igc.by

Проведен анализ полиморфизма 13 SSR-локусов у 22 сортов овса посевного, разделенных в зависимости от происхождения на 4 группы: белорусские, европейские, прибалтийские и российские сорта. В общей сложности в исследованном материале идентифицировано 114 аллелей, из которых в белорусских сортах присутствовало 83, в европейских — 54, в прибалтийских — 67 и в российских — 51 аллель. Выявлены наиболее полиморфные локусы *AM4*, *AM14* и *AM7*, в которых в общей выборке сортов определено наличие 27, 17 и 16 аллелей соответственно. Эти же локусы характеризовались высоким уровнем гетерозиготности в пределах каждой отдельно взятой группы сортов, на основании чего можно сделать вывод, что анализ аллельного состава данных локусов может быть использован для дифференциации генетически близких генотипов. В сортах белорусской и европейской селекции высокополиморфным был также локус *AM11*. Показано, что по уровню генетической изменчивости белорусские сорта не отличаются от зарубежных.

Ключевые слова: овес посевной, молекулярные маркеры, полиморфизм SSR-локусов, генетическая изменчивость.

Введение

Овес посевной (*Avena sativa* L.) по сумме посевных площадей в мире занимает пятое место после пшеницы, риса, кукурузы и ячменя и является одной из самых значимых зернофуражных культур. Столь высокая популярность культуры в животноводстве объясняется повышенным содержанием и наилучшим соотношением в белке ряда незаменимых аминокислот, особенно лизина и триптофана, богатым составом витаминов (B1, B2) и минеральных веществ, а также хорошими энергетическими свойствами благодаря высокому содержанию жира [1].

Широкое применение нашел овес и в пищевой промышленности (овсяная крупа, хлопья, мука, толокно и др.), что связано с хорошей усвояемостью содержащихся в нем питательных веществ.

С давних времен используют овес и в медицине, как народной, так и традиционной, причем в последние десятилетия несомненная польза овса для здоровья человека получила научное обоснование. Так, было установлено, что содержащиеся в зерне и растворимой клетчатке овса β -глюканы снижают уровень холестерина

с низкой плотностью (ЛПНП) в крови, способствуя тем самым уменьшению риска сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Высокое содержание в овсе растворимой клетчатки способствует замедлению пищеварения и, следовательно, профилактике и лечению ожирения. Кроме того, овес содержит много соединений, проявляющих антиоксидантную активность [3]. В связи с этим ожидается, что спрос на овес во всем мире будет постоянно расти.

В Беларуси под посевами овса в 2019 году было занято 153,8 тысячи гектаров, что на 8 тысяч гектаров больше, чем в 2018, причем 99% посевной площади было засеяно высокоурожайными сортами отечественной селекции, созданными в НПЦ НАН Беларуси по земледелию. Средняя урожайность этих сортов в государственном сортоиспытании составляет 60–65 ц/га, а максимальная — 95–101 ц/га, однако в полевых условиях она значительно ниже (25,4 ц/га в 2019 году), что главным образом связано с негативным влиянием абиотических и биотических факторов среды [4]. Из этого следует, что для полного раскрытия достигнутого потенциала продуктивности не-

обходимо сосредоточить усилия на повышении устойчивости сортов к стрессовым факторам. Для решения этой задачи целесообразно использовать широкий пул генетических ресурсов из других регионов мира, оценив при этом уровень генетического разнообразия отечественных сортов в сравнении с сортами из других селекционных программ с привлечением современных методов ДНК-маркирования селекционного материала. Исходя из этого мы поставили перед собой цель провести анализ генетической изменчивости сортового генофонда *Avena sativa* L. различного эколого-географического происхождения путем изучения полиморфизма SSR локусов. В данной статье представлены результаты исследования возделываемых в Республике Беларусь сортов овса, а также ряда сортов из близлежащих стран.

Материалы и методы

В исследование были включены 22 сорта овса посевного, из которых половину составляли сорта белорусской селекции (Полонез, Стралец, Багач, Вандруник, Юбиляр, Крепыш, Золлак, Гоша, Факс, Дебют и Королек), остальные 11 сортов были условно сгруппированы по регионам следующим образом: 3 сорта (Каньон, Скорпион и Чакал) — европейской селекции, 4 сорта (Villu, Jaak, Ka lie и Stendes Darta) — при-

балтийской селекции и 4 сорта (Буцефал, Дербби, Факир и Конкур) — российской селекции.

Выделение ДНК из зерновок осуществляли с помощью готовых наборов реактивов «Genomic DNA Purification Kit» K0512 («Fermentas», Литва) согласно рекомендованному протоколу. Анализ генетического разнообразия сортов овса проводился с использованием 13 SSR-маркеров из серии AM, разработанной Ли с коллегами [5]. Перечень маркеров и нуклеотидные последовательности праймеров к ним представлены в таблице 1.

Для проведения ПЦР была использована следующая программа: 5 мин при 94 °С; 34 цикла с параметрами: денатурация в течение 30 с при температуре 94 °С; отжиг праймеров в течение 45 с при температуре 47,5 °С для маркера AM42, при 55 °С для маркеров AM14, AM22, AM 25, AM38, AM53, AM83, при 60 °С для маркеров AM1, AM7, AM4, AM11, AM15, AM30, элонгация при 72 °С в течение 90 с; конечная элонгация при 72 °С 7 мин.

Общий уровень качества прохождения реакции оценивали разделением продуктов ПЦР электрофорезом в 1,5% агарозном геле в 1×TAE буфере в течение 60 мин при напряжении в 80 В. Для точного определения размера амплифицируемых фрагментов был проведен стандартный фрагментный анализ с использованием

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров к исследованным микросателлитным локусам овса посевного

SSR-маркер	F - прямой праймер (5' → 3')	R - обратный праймер (5' → 3')
AM1	F: GGATCCTCCACGCTGTTGA	R: CTCATCCGTATGGGCTTTA
AM4	F:GGTAAGGTTTCGAAGAGCAAAG	R: GGGCTATATCCATCCCTCAC
AM7	F: GTGAGCGCCGAATACATA	R: TTGGCTAGCTGCTTGAAACT
AM11	F: CGTGGCAGAGAATCAAAGACAC	R: TGGGTGGAGGCAAAAACAAAAC
AM14	F: GTGGTGGGCACGGTATCA	R:TGGGTGGCGAAGCGAATC
AM15	F: GTGACCGTAAACGATAACAAC	R: AAGCAAGACGCGAGAGTAGG
AM22	F: ATTGTATTGTAGCCCCAGTTC	R: AAGAGCGACCCAGTTGTATG
AM25	F: AGCCTGGACATGTAATCTGGT	R: AGCCCTGGTCTTCTTCAACA
AM30	F: TGAAGATAGCCATGAGGAAC	R: GTGCAAATTGAGTTTACAG
AM38	F: TGATGACCTCTTGAGTAAGCA	R: TGCCTTTCGTGGACTTACTA
AM42	F: GCTTCCCACAAATCATCAT	R: GAGTAAGCAAAGGCCAAAAAGT
AM53	F: TCGCCATTAATAAGAGGGAAGG	R: GCTGCTGTTGGGTGGTTAGTG
AM83	F: CACTGCCATACATTCTGTCTG	R:CCTCTACCGCAAAGGAAGAA

автоматического секвенатора Genetic Analyzer 3500 Applied Biosystems (США). Размер продуктов амплификации определяли с применением размерного стандарта молекулярного веса S450 «Синтол» (Россия). Полученные данные анализировали с помощью пакета прикладных программ GeneMapper Software Version 4.1.

Для оценки уровня генетической изменчивости сортов использовался такой показатель, как ожидаемая гетерозиготность, или генетическое разнообразие по Неи (H_e) [6], вычисляемый по формуле:

$$H_e = 1 - \sum x_i^2$$

где x_i — частота i -того аллеля.

Результаты и обсуждение

В общей выборке сортов в исследованных 13 SSR-локусах было выявлено 114 аллелей, из которых в белорусских сортах присутствовало 83, в европейских — 54, в прибалтийских — 67 и в российских — 51 аллель. При этом 13 из 83 выявленных в белорусских сортах аллелей не встречались в сортах остальных групп, для которых, в свою очередь, отличными от белорусских были 23 аллеля.

Как видно из данных таблицы 2, не все проанализированные локусы оказались полиморфными. Так, в локусе *AM15* у всех исследован-

ных сортов выявлялся только один фрагмент длиной 229 п. н. Также один аллель размером 151 п. н. был отмечен в локусе *AM38*.

Локус *AM83* был полиморфным (содержал 2 аллеля) только у белорусских и российских сортов (рис. 1), причем у первых явное преимущество по частоте встречаемости имел аллель размером 187 п. н. (73%), в то время как у вторых — 188 п. н. (75%). Европейские и прибалтийские сорта содержали одинаковый аллель размером 187 п. н.

Отсутствием полиморфизма характеризовались также локусы *AM25* у российских и *AM53* у прибалтийских сортов (рис. 1). Все остальные локусы у всех групп сортов были полиморфными и содержали в общей выборке растений от 2 до 27 аллелей.

Из четырех аллелей, выявленных в локусе *AM25*, лидирующее положение по частоте встречаемости занимал аллель 229 п. н. (59%), на втором месте оказался аллель 227 п. н. (22,7%), на третьем — аллель 230 п. н. (13,6%). Аллель 228 п. н., идентифицированный у единственного сорта Багач, является уникальным.

Уникальный аллель размером 346 п. н. обнаружен также в локусе *AM53*, обладателем которого является сорт европейской селекции Чакал. Что касается остальных трех выявленных в данном локусе аллелей, то два из них — 341 п. н. и 258 п. н. встречались со сходной

Таблица 2

Характеристика исследованных SSR-локусов сортового генофонда овса посевного

SSR-локус	Количество аллелей	Частота встречаемости	Фактический размер, п. н.	Теоретический размер, п. н.
<i>AM1</i>	9	0,029–0,600	154–210	157–240
<i>AM4</i>	27	0,010–0,152	118–190	166
<i>AM7</i>	16	0,008–0,164	146–191	156
<i>AM11</i>	12	0,020–0,300	138–226	130–250
<i>AM14</i>	17	0,022–0,121	106–128	133
<i>AM15</i>	1	1	229	229
<i>AM22</i>	11	0,016–0,300	168–309	160–320
<i>AM 25</i>	4	0,040–0,570	227–230	215–240
<i>AM30</i>	6	0,040–0,350	179–191	170–220
<i>AM38</i>	1	1	151	150–178
<i>AM42</i>	4	0,040–0,470	171–175	177–213
<i>AM53</i>	4	0,040–0,460	256–346	230–350
<i>AM83</i>	2	0,270–0,720	187–188	170–190

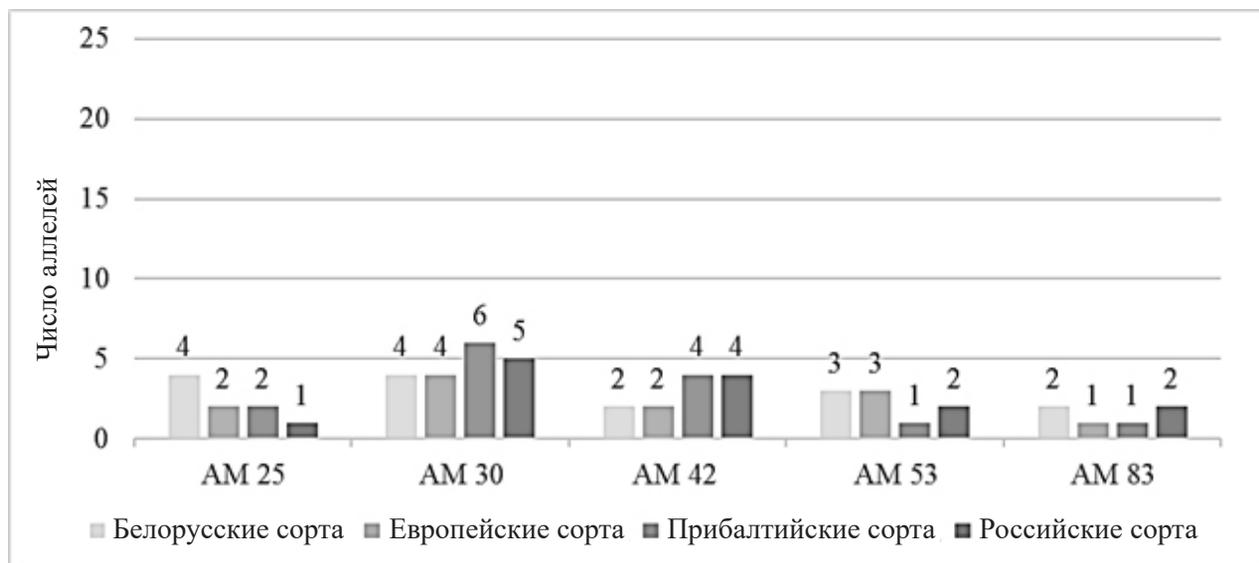


Рис. 1. Число выявленных аллелей в полиморфных локусах *AM25*, *AM30*, *AM42*, *AM53* и *AM83* сортов овса посевного из разных селекционных программ

частотой (50 и 42% соответственно), тогда как частота встречаемости третьего аллеля размером 256 п. н. была существенно ниже — 4%.

В локусе *AM42* численное преимущество имели аллели 171 п. н. (47,6%) и 174 п. н. (42,9%), которые встречались у всех групп сортов, в то время как аллели 172 и 175 п. н., были отмечены с одинаковой частотой 4,8% лишь в материале прибалтийской и российской селекции (рис. 1).

Среди шести аллелей, выявленных в локусе *AM30*, с практически одинаковой частотой присутствовали аллели 179 п. н. и 185 п. н. (35,4 и 33,3% соответственно). Третье место по частоте встречаемости занимал аллель 189 п. н. (14,6%). Для остальных трех аллелей данный показатель варьировал от 4,2 до 6,3%, причем аллели 180 п. н. и 186 п. н. были выявлены только в прибалтийских и российских сортах.

В локусе *AM1* с наибольшей частотой (60%) встречался аллель 156 п. н., который был идентифицирован у всех проанализированных сортов за исключением сорта *Jaak* эстонской селекции. Аллели 197 п. н., 199 п. н. и 154 п. н. занимали 2, 3 и 4 места с частотой встречаемости 11%, 8,5% и 5,7% соответственно. Остальные пять аллелей отмечены с одинаковой частотой, равной 2,8%.

В локусе *AM22* преобладал аллель 169 п. н. с частотой встречаемости 32%, за ним следовали аллели 286 п. н. (19%), 304 п. н. (11%), 224 п. н. и 229 п. н. (по 9,8%). Частота встречаемости остальных шести аллелей варьиро-

вала от 1,6 до 4,9%. Следует отметить, что по количеству выявленных в этом локусе аллелей белорусские сорта в 2,5 раза превосходили сорта из других групп (рис. 2).

В локусе *AM11* чаще других отмечены три аллеля: 216 п. н. (30%), 139 п. н. (22%) и 151 п. н. (12%). Частота встречаемости остальных девяти аллелей была существенно ниже с варьированием от 2 до 6%. Наиболее полиморфными по этому локусу были сорта белорусской и европейской селекции, причем каждая из этих групп содержала по три аллеля, не встречающиеся у сортов другой группы.

Из 16 аллелей локуса *AM7* три были уникальными, выявленными только у двух сортов европейской селекции: аллели 189 п. н. и 191 п. н. содержал сорт *Каньон*, а аллель 179 — *Скорпион*. Максимальной частотой в общей выборке сортов характеризовался аллель 151 п. н. (19,6%), затем следовал аллель 153 п. н. (14,1%), за ним — аллель 159 п. н. (12%). Довольно редким был аллель 150 п. н. (2,2%), частота встречаемости остальных шести аллелей варьировала от 6,5 до 9,8%.

Локус *AM14* был более полиморфным в сортах белорусской и прибалтийской селекции (рис. 2). Наиболее высокая частота встречаемости отмечена здесь для аллеля 108 п. н. (12,1%), незначительно уступили ему аллели 119 п. н. и 122 п. н. (по 11%). Одиннадцать аллелей встречались с частотой от 4,4 до 7,7%. Самую низкую частоту встречаемости 2,2% имели три аллеля.

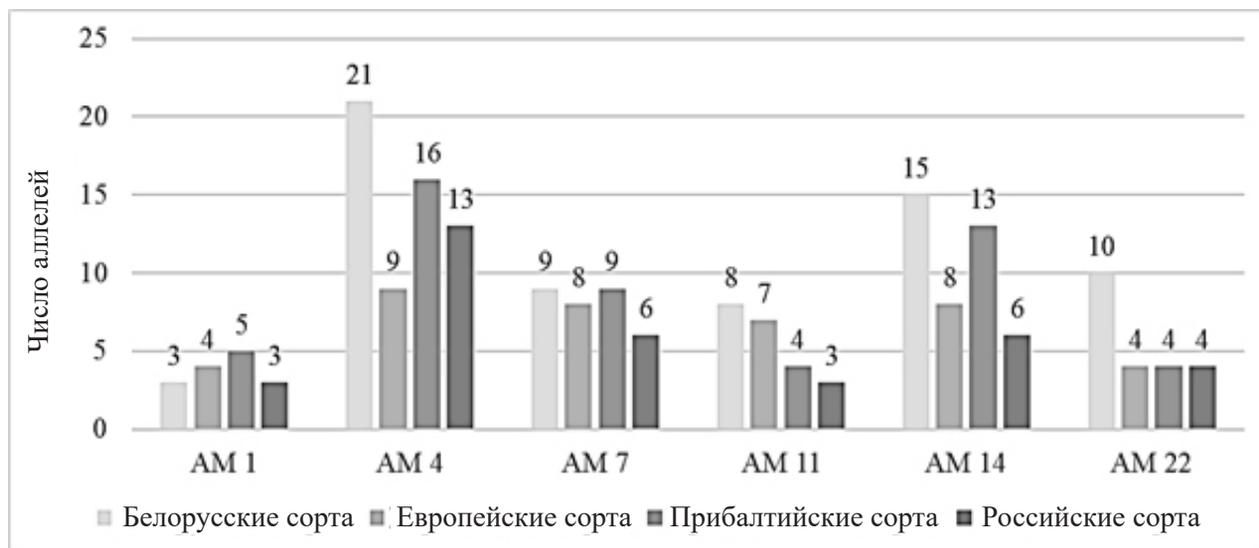


Рис. 2. Число выявленных аллелей в полиморфных локусах *AM1*, *AM4*, *AM7*, *AM11*, *AM14* и *AM22* сортов овса посевного из разных селекционных программ

В самом полиморфном локусе *AM4* чаще других выявлялись три аллеля: 125 п. н. (15,2%), 131 п. н. (13,3%) и 137 п. н. (12,4%). Среднюю частоту встречаемости от 4,8 до 6,7% имели шесть аллелей, для остальных восемнадцати аллелей показатель варьировал от 1 до 3,8%. Два аллеля были уникальными: 118 п. н. у белорусского сорта Гоша и 169 п. н. у прибалтийского сорта Vilu.

Для оценки уровня генетической изменчивости включенных в исследования сортов овса посевного использовался такой показатель, как ожидаемая гетерозиготность, или генетическое разнообразие по Неи (H_e), выбор которого был обусловлен тем, что он практически не зависит от размера выборки. Значения показателя по каждому полиморфному локусу в пределах сформированных по регионам групп сортов представлены в таблице 3.

Как видно из данных таблицы 3, у белорусских сортов наибольшей гетерозиготностью характеризуются локусы *AM4* и *AM14*, имеющие равные значения показателя, несмотря на существенные различия в количестве выявленных аллелей (табл. 1). Это объясняется тем, что значительное количество аллелей локуса *AM4* имели очень низкую частоту встречаемости.

Локус *AM4* стоит на первом месте по гетерозиготности и у европейских сортов, однако максимальное значение показателя имеют прибалтийские сорта. У этих же сортов гете-

розиготность локуса *AM14* идентична таковой у белорусских сортов, в то время как российские сорта по гетерозиготности упомянутых выше локусов несколько уступают остальным, а максимальное значение показателя у них имеет локус *AM7*.

Следует отметить, что *AM7* является единственным полиморфным локусом, имеющим сходные значения H_e для всех групп сортов. Так, в локусе *AM11* близкие значения гетерозиготности имеют с одной стороны белорусские и европейские сорта, с другой — прибалтийские и российские, однако во второй паре они существенно ниже. Аналогичная картина наблюдается для локуса *AM22*.

Прибалтийские и российские сорта имеют также равные значения показателя в локусах *AM22*, *AM30* и *AM42*, в то время как гетерозиготность локуса *AM1* несколько выше у прибалтийских сортов, а по локусам *AM25*, *AM53* и *AM83* различия между этими двумя группами сортов достигают крайних значений (табл. 3). По этим же локусам наиболее существенные различия наблюдаются и у европейских и российских сортов.

Отличием белорусских сортов от всех остальных групп является более высокая гетерозиготность локуса *AM25* и более низкие значения показателя для локуса *AM30* и в особенности для локуса *AM1*.

Среднее значение H_e для всех локусов, являющееся оценкой уровня генетической измен-

Таблица 3

Ожидаемая гетерозиготность SSR-локусов в пределах сформированных по регионам групп сортов овса посевного

Группы сортов	Ожидаемая гетерозиготность (H_c)										
	<i>AM1</i>	<i>AM4</i>	<i>AM7</i>	<i>AM11</i>	<i>AM14</i>	<i>AM22</i>	<i>AM25</i>	<i>AM30</i>	<i>AM42</i>	<i>AM53</i>	<i>AM83</i>
Белорусские	0,357	0,907	0,844	0,816	0,907	0,830	0,678	0,599	0,495	0,569	0,397
Европейские	0,667	0,871	0,847	0,847	0,847	0,694	0,444	0,716	0,500	0,625	0
Прибалтийские	0,750	0,910	0,875	0,694	0,907	0,694	0,480	0,793	0,688	0	0
Российские	0,571	0,765	0,810	0,640	0,791	0,694	0	0,780	0,688	0,375	0,375

чивости популяции, для белорусских сортов было равно 0,672, для европейских — 0,641, для прибалтийских — 0,617 и для российских — 0,589, то есть у первых трех групп различия наблюдались на уровне сотых долей единицы, несколько ниже была изменчивость российских сортов.

Для сравнения укажем, что в исследованиях Ашимовой с соавторами [7] значение показателя для сортов овса посевного из Восточной Европы составило 0,521, а для сортов казахской селекции — 0,525. Близкое значение H_c (0,526) было получено для всей изученной мировой коллекции овса (163 генотипа). Сходство данных показателей, по мнению авторов, свидетельствует о широком использовании зарубежных генетических ресурсов этой культуры в селекционных программах Казахстана. Аналогичный вывод можно сделать и по результатам наших исследований. Тем не менее выявленные различия по полиморфизму ряда локусов между белорусскими сортами и сортами из других регионов дают основания полагать, что заложенный в материале из ближнего зарубежья потенциал генетической изменчивости использован нашими селекционерами не в полной мере.

Заключение

В ходе исследования полиморфизма 13 SSR-локусов у 22 сортов овса посевного выявлено 114 аллелей, из которых в белорусских сортах присутствовало 83, в европейских — 54, в прибалтийских — 67 и в российских — 51 аллель. Наибольшее количество аллелей как в общей выборке сортов, так и по отдельным регионам идентифицировано в локусах *AM4*, *AM14* и *AM7* — 27, 17 и 16 аллелей

соответственно. Анализ аллельного состава данных локусов может быть использован для дифференциации генетически близких генотипов овса. Наличие уникальных аллелей определено в шести сортах овса. Установлено, что, несмотря на наличие существенных различий по гетерозиготности ряда SSR-локусов, по общему уровню генетической изменчивости белорусские сорта не отличаются от зарубежных.

Список использованных источников

1. Баталова, Г. А. Овес: технология возделывания и селекция / Г. А. Баталова. – Киров, 2000 – 206 с.
2. Oat beta-glucan lowers total and LDL cholesterol / S. Pomeroy [et al.] // Aust. J. Nutr. Diabet. – 2001. – Vol. 58, № 1. – P. 51–55.
3. Peterson, D. M. Oat antioxidants / D. M. Peterson // J. Cereal Sci. – 2001. – Vol. 33, № 2. – P. 115–129.
4. Куда с поля идет белорусский овес // Сельская газета, №119 от 12.10.2019.
5. Li, C. D. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena species* and oat cultivars / C. D. Li, B. G. Rosnagel, G. J. Scoles // Theor. Appl. Genet. – 2000. – Vol. 101, № 8. – P. 1259–1268.
6. Чесноков, Ю. В. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия / Ю. В. Чесноков, А. М. Артемьева // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50, № 5. – С. 571–572.
7. Генотипирование мировой коллекции овса с использованием микросателлитных маркеров / А. Н. Ашимова [и др.] // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2016. – № 1(66). – С. 134–143.

N. I. Dubovets, E. A. Sycheva, A. V. Sokoluk, E. B. Bondarevich, L. A. Solovey

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF OAT *AVENA SATIVA* L. VARIETIES USING SSR ANALYSIS

State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27, Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: N.I.Dubovets@igc.by

Analysis of 13 SSR-loci polymorphism in 22 common oat cultivars divided into 4 groups depending on their origin (Belarusian, European, Baltic and Russian cultivars) was carried out. In total, 114 alleles were identified in the studied material, and 83 were present in Belarusian cultivars, 54 in European, 67 in Baltic, and 51 in Russian cultivars. The most polymorphic loci *AM4*, *AM14*, and *AM7* were identified in which the presence of 27, 17 and 16 alleles was determined in the total sample of cultivars respectively. The same loci were characterized by a high level of heterozygosity within each individual group of cultivars allowing to conclude that the allelic composition analysis of these loci may be used to differentiate genetically close genotypes. The *AM11* locus was also highly polymorphic in the cultivars of the Belarusian and European breeding. It was demonstrated that Belarusian cultivars do not differ from the foreign ones in terms of a genetic variability level.

Keywords: cultivated oat, molecular markers, SSR-loci polymorphism, genetic variability.

Дата поступления статьи: 18 сентября 2020 г.

Н. В. Савина¹, С. В. Кубрак¹, Л. В. Милько¹, А. В. Кильчевский¹, Е. В. Никитина², К. Ш. Тожибаев²

ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ КАК ИНСТРУМЕНТ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА И ОЦЕНКИ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

¹Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: N.Savina@igc.by

²Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан
Республика Узбекистан, 100128, г. Ташкент, ул. Дурмон йули, 32
e-mail: botany@academy.uz

Объектами данного исследования стали редкие и исчезающие виды семейств Амариллисовые (*Amaryllidaceae*), Лилейные (*Liliaceae*), Ирисовые (*Iridaceae*) и Яснотковые (*Lamiaceae*), произрастающие на территории Беларуси и Узбекистана и занесенные в национальные Красные книги. Редкие виды требуют особого внимания, регулярного мониторинга их природных популяций и всестороннего изучения как методами классической систематики, так и методами молекулярно-генетического анализа. Эффективным инструментом инвентаризации видového разнообразия редких растений является метод ДНК-штрихкодирования. В данной работе с помощью комбинаций ДНК-маркеров (*ITS2*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *matK*) получено 39 консенсусных нуклеотидных последовательностей для 12 видов редких растений изучаемых семейств флоры Беларуси. Кроме того, проанализировано 18 видов редких растений изучаемых семейств, произрастающих на территории Узбекистана. Продемонстрирована возможность успешного использования ДНК-штрихкодирования при проведении экологического мониторинга на природоохранных территориях.

Ключевые слова: биоразнообразие, Красная книга, ДНК-штрихкодирование, ДНК-маркеры, *ITS2*, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*.

Введение

Концепция биоразнообразия занимает важное место в современной науке и экологической политике. С 1992 года — времени подписания многими государствами Конвенции о биологическом разнообразии — это понятие получило международное звучание. Одно из определений термина «биологическое разнообразие», данное Всемирным фондом дикой природы, звучит как «все многообразие форм жизни на земле, миллионов видов растений, животных, микроорганизмов с их наборами генов и сложных экосистем, образующих живую природу» [1]. Говорят о трех уровнях (ветвях) биоразнообразия: генетическом (разнообразии генов и их вариантов — аллелей), видовом (разнообразии видов в экосистемах) и экологическом (разнообразии сообществ и экосистем). Видовой уровень разнообразия обычно рассматривается как

базовый, а вид является опорной единицей учета биоразнообразия. Видовое разнообразие должно быть систематизировано и нести максимум информации о виде. Инвентаризация видов представляет собой чрезвычайно сложную задачу, учитывая их огромное количество. Несмотря на обширную работу, проведенную систематиками по изучению биологического разнообразия планеты, до сих пор существуют определенные сложности с точной и однозначной идентификацией представителей некоторых таксонов [1, 2].

Генетическое разнообразие — основа непрерывности эволюционного процесса. Генетическая вариабельность позволяет видам адаптироваться в условиях изменяющейся среды, успешно приспосабливаться и оставлять потомство, передавая гены по наследству. Генетическое разнообразие исследуют с применением современных молекулярно-

генетических методов с использованием технологий полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-чипирования и секвенирования. Известные методы RAPD (Random amplified polymorphic DNA), RFLP (Restriction fragment length polymorphism), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), ISSR (Inter simple sequence repeats), SSR (Simple sequence repeats), DNA-barcoding и др. на данный момент оказывают эффективную помощь систематикам как для оценки генетического разнообразия, так и в целях точной идентификации и систематизации генетических ресурсов [3, 4]. К настоящему времени угрозы биологическому биоразнообразию беспрецедентны: по расчетам, в мире ежедневно исчезает порядка 100–200 видов, а скорость их исчезновения на два порядка выше, чем во времена прошлых эпох массового вымирания видов, и на три порядка выше, чем естественный темп вымирания [5]. Редкие и исчезающие виды требуют особого внимания со стороны работников научных учреждений и природоохранных служб.

Объектами исследования данной работы являются представители семейств Амариллисовые (*Amaryllidaceae*), Лилейные (*Liliaceae*), Ирисовые (*Iridaceae*) и Яснотковые (*Lamiaceae*), произрастающие на территории Беларуси и Узбекистана и занесенные в национальные Красные книги. Большинство амариллисовых (*Amaryllidaceae*) является декоративными растениями, в то же время на основе биологически активных веществ, полученных из отдельных представителей рода *Allium*, производят препараты, оказывающие противомаларийное, фунгицидное, противопротозойное, противовирусное и противовоспалительное действие. Многие представители семейства Лилейных (*Liliaceae*) — популярные декоративные красивоцветущие растения (тюльпаны, лилии и т. д.). На территории Беларуси произрастает только один охраняемый вид рода *Tulipa* — тюльпан лесной. Ирисовые (*Iridaceae*) широко используются в садоводстве благодаря своей исключительной декоративности, некоторые виды нашли применение в парфюмерии и в пищевых целях. Дикорастущие виды Ирисовых являются лекарственными растениями благодаря уникальному набору биологически активных веществ, проявляющих антибиотическую, иммуностимулирующую,

противовирусную и др. активности. Многие Яснотковые (*Lamiaceae*) являются ценными эфиромасличными культурами, используются в медицине (пустырник, душица, мелисса, чабрец), парфюмерии (розмарин, лаванда, шалфей, мята), в качестве пряностей (базилик, майоран). Некоторые представители семейства медоносны и разводятся при пасаках. В декоративном садоводстве широко используется род *Salvia*, отдельные дикорастущие представители которого обладают биологически активными веществами инсектицидного действия, способными эффективно заменить химические препараты.

Цель проведенных исследований — оценить использование ДНК-штрихкодирования как инструмента экологического мониторинга и изучения видового разнообразия редких видов растений. Сопровождение образцов редких растений ДНК-штрихкодом даст возможность исключить случаи неверного определения вида, обеспечит контроль чистоты образца и будет служить подтверждением качества биологического материала. Поэтому ДНК-штрихкоды являются неотъемлемой частью информации о редких видах растений, находящихся в условиях длительного хранения в Республиканском банке ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов Института генетики и цитологии. Кроме того, определение маркерных ДНК последовательностей может быть полезным при уточнении таксономического статуса отдельных видов. В отличие от методов молекулярной филогенетики, ДНК-штрихкодирование может рассматриваться только как подход для определения места данного организма в уже существующей классификации, а не для установления новых филогенетических связей.

В данной работе в качестве ДНК-штрихкодов использована ядерная последовательность *ITS2* и три митохондриальные — *rbcL*, *psbA-trnH*, *matK*. Маркер *ITS2* представляет собой участок ядерной последовательности, который входит в состав рибосомального кластера и локализуется между структурными генами рибосомальной РНК 5.8S и 28S. Участок пластидной ДНК *rbcL* кодирует большую субъединицу рибулозобисфосфаткарбоксилазы, ключевого фермента фиксации CO₂ в темновой фазе

фотосинтеза. Некодирующий участок пластидной ДНК *psbA-trnH* представляет собой межгенный спейсер (IGS, Intergenic spacer regions) и расположен между геном, контролирующим синтез белка D1 фотосистемы II, и геном гистидиновой тРНК. Ген *matK* кодирует матуразу *K* — фермент сплайсинга интронов в хлоропластах, один из наиболее быстро эволюционирующих пластидных генов [6, 7].

При идентификации видов по ДНК-штрихам исследователь полагается на справочные библиотеки штрихкодов, однако они могут быть неполными или содержать ошибки, что в свою очередь ведет к неправильным выводам. Основным критерием эффективности использования нами ДНК-штрихкодов для подтверждения видовой принадлежности является 98–100% совпадение полученной маркерной последовательности с данными *NCBI* для известного биологического вида. Определение маркерных последовательностей для редких видов растений (в том числе и эндемиков) — представителей флоры Беларуси и Узбекистана — позволит создать собственные региональные референсные базы ДНК-штрихкодов. Решение подобных исследовательских задач в сфере экологии актуально для обеих стран, как для государств, сталкивающихся со сходными проблемами в области сохранения биологического и генетического разнообразия.

Материалы и методы

Исследования выполнены на биологическом материале представителей редких видов семейств *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Iridaceae*, *Lamiaceae*, произрастающих на территориях Республики Беларусь и Республики Узбекистан. Сбор биологического материала на территориях Республики Беларусь (Национальные парки «Нарочанский» и «Беловежская пушта», охраняемые территории Брестской, Гомельской и Минской областей) выполнен сотрудниками природоохранных учреждений и специалистами-ботаниками без изъятия растений из мест произрастания согласно рекомендациям, регламентирующим сбор, хранение и транспортировку растительного материала для последующего выделения высококачественной ДНК [8]. Для каждого вида собран биологический материал трех растений, произрастающих удаленно друг от друга. Узбекскими коллегами представлен и совместно проанализирован биологический материал 18 видов растений, в том числе и в виде гербарных образцов. В таблицах 1 и 2 представлены редкие и исчезающие виды растений, включенные в исследование (по данным Красной книги Республики Беларусь, 2015 г. [9] и Красной книги Республики Узбекистан, 2009 г. [10]).

Таблица 1

Редкие и исчезающие виды растений семейств *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Iridaceae*, *Lamiaceae*, произрастающие на территории Республики Беларусь

Название представителей семейств (русс. / лат.)			Категория охраны
Амариллисовые (<i>Amaryllidaceae</i>)			
1	Лук медвежий	<i>Allium ursinum</i>	III
2	Чемерица Лобеля	<i>Veratrum lobelianum</i>	III
3	Подснежник снежный	<i>Galanthus nivalis</i>	ПО*
Лилейные (<i>Liliaceae</i>)			
4	Лилия кудреватая	<i>Lilium martagon</i>	IV
5	Тюльпан лесной	<i>Tulipa sylvestris</i>	ПО
6	Безвременник осенний	<i>Colchicum autumnale</i>	ПО
Ирисовые (<i>Iridaceae</i>)			
7	Касатик безлистный	<i>Iris aphylla</i>	I
8	Касатик сибирский	<i>Iris sibirica</i>	IV
9	Шпажник черепитчатый	<i>Gladiolus imbricatus</i>	IV

Продолжение таблицы 1

Название представителей семейств (русск. / лат.)		Категория охраны	
Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)			
10	Змееголовник Руйша	<i>Dracocephalum ruyschiana</i>	II
11	Кадило сарматское	<i>Melittis sarmatica (melissophyllum)</i>	III
12	Шалфей луговой	<i>Salvia pratensis</i>	IV

Примечание. *ПО — растения из списка профилактической охраны

Таблица 2

Редкие и исчезающие виды растений семейств *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Iridaceae*, *Lamiaceae*, произрастающие на территории Республики Узбекистан

Название представителей семейств (русск. / лат.)		
Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)		
1	Шалфей Королькова	<i>Salvia korolkowii</i>
2	Шалфей бухарский	<i>Salvia bucharica</i>
3	Шалфей туповатый	<i>Salvia submutica</i>
4	Шалфей колючий	<i>Salvia spinosa</i>
5	Шалфей мускатный	<i>Salvia sclarea</i>
6	Шалфей тянь-шанский	<i>Salvia tianschanica</i>
7	Шалфей Маргариты	<i>Salvia margaritae</i>
8	Шалфей лиловосиний	<i>Salvia lilacinocoerulea</i>
9	Змееголовник продолговатолистный	<i>Dracocephalum oblongifolium</i>
10	Змееголовник цельнолистный	<i>Dracocephalum integrifolium</i>
11	Змееголовник нуратавикум	<i>Dracocephalum nuratavicum</i>
Лилейные (<i>Liliaceae</i>)		
12	Тюльпан Введенского	<i>Tulipa vvedenskyi</i>
13	Тюльпан Королькова	<i>Tulipa korolkowii</i>
14	Тюльпан родственный	<i>Tulipa affinis</i>
15	Тюльпан сомнительный	<i>Tulipa dubia</i>
16	Тюльпан двуцветковый	<i>Tulipa biflora</i>
Амариллисовые (<i>Amaryllidaceae</i>)		
17	Лук чашеносный	<i>Allium cupuliferum</i>
Ирисовые (<i>Iridaceae</i>)		
18	Касатик согдийский	<i>Iris sogdiana</i>

На рисунке 1 представлены последовательные этапы ДНК-штрихкодирования изучаемых видов растений.

На этапе 2 предлагается преимущественно двухлокусный алгоритм видоидентификации с помощью маркеров *ITS2* и *rbcL*, в случаях получения результатов с недостаточной

достоверностью (менее 98%) используется трех-, четырехлокусный алгоритм с подключением маркеров *psbA-trnH* и *matK*. Выбор пары *ITS2-rbcL* в качестве первоначальных маркеров обусловлен их успешной амплификацией для большинства растений и хорошим качеством сиквенсов.

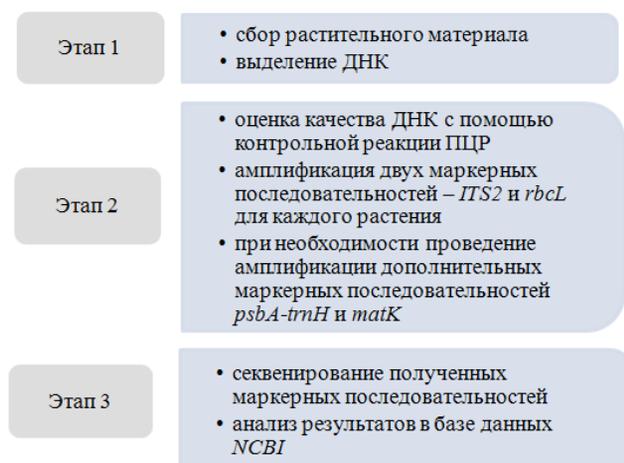


Рис. 1. Алгоритм ДНК-баркодинга растений

Для выделения тотальной ДНК из растительного материала использовали коммерческий набор DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). Оценка качества выделенной ДНК проводили как спектрофотометрически (по значениям коэффициента $OD_{260/280}$), так и проведением контрольной реакции ПЦР с праймерами к генам «домашнего хозяйства» (в данном случае к гену большой субъединицы рибосомы 26S рРНК). Для последующей работы концентрации проб ДНК были выровнены путем разведения матрицы до 10–12 нг/мкл.

Последовательности праймеров и необходимые рекомендации по условиям проведения амплификации ДНК-штрихкодов *ITS*, *rbcL*, *psbA-trnH* и *matK* приведены в работах Савиной Н. В. и соавт. (2018) [11]; Dunning L.T. et. Savolainen V. [12]. ПЦР проводили в конечном объеме 8–10 мкл; смесь для амплификации включала готовый буфер для проведения ПЦР Quick-load Taq 2X Master Mix (ОДО «Праймтех», Республика Беларусь) [13], прямой и обратный праймеры в конечной концентрации 0,3 пмоль/мкл и бидистиллированную воду. Вносили 1 мкл матрицы ДНК в концентрации 6–10 нг/мкл. Амплификацию проводили в термоциклере C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, США). Результаты амплификации проверяли в 1% агарозном геле, для маркера *psbA-trnH* использовали 2% гель из-за значительной вариабельности продуктов амплификации.

Продукты амплификации очищали с помощью ферментов Exonuclease I и Shrimp Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific,

США) согласно рекомендациям производителя. Терминирующую реакцию проводили с использованием коммерческого набора Brilliant Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Nimagen, Нидерланды) с последующей очисткой продукта реакции этанолом. Определение нуклеотидной последовательности проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США). Хроматограммы сиквентов анализировали в программе ChromasPro 13.3. Для одного вида анализировали по три индивидуальных растения, для каждого ДНК-штрихкода получено по четыре хроматограммы — три с прямым и одна с обратным праймером. С помощью модуля Contig Express Project (программа Vector NTI) и программы MEGA 4 проведено выравнивание индивидуальных последовательностей каждого растения для получения результирующей (консенсусной) маркерной последовательности. Консенсусные последовательности сравнивали с последовательностями ДНК аналогичных видов, хранящимися в международных базах данных NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [14] и BOLD (Barcode of Life Data Systems) [15]. Выявление в NCBI нуклеотидной последовательности известного биологического вида, на 98–100% совпадающей с анализируемой, являлось подтверждением видовой принадлежности изучаемого растения. Множественное выравнивание последовательностей и построение дендрограмм проводили с помощью программы MEGA 4, дендрограммы строили на основе матрицы попарных генетических расстояний методом ближайшего соседа Neighbour-Joining.

Результаты и обсуждение

Использование маркерных последовательностей ITS2, rbcL, psbA-trnH и matK для идентификации представителей редких и исчезающих видов растений Республики Беларусь

В таблице 3 представлены результаты идентификации редких растений семейств *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Iridaceae*, *Lamiaceae* по четырем маркерным последовательностям.

Как видно из таблицы, с целью максимальной эффективности видоидентификации и высокой достоверности результатов для всех видов выполнено трех-, четырехлокусное

Таблица 3

Результаты генетической идентификации редких растений семейств *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Iridaceae*, *Lamiaceae* с помощью ДНК штрихкодов (место произрастания — Республика Беларусь)

№ п/п	Вид	ДНК-штрихкод			
		<i>ITS2</i>	<i>rbcL</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>matK</i>
Амариллисовые (<i>Amaryllidaceae</i>)					
1	Лук медвежий	+	+	+	–
2	Подснежник снежный	+	+	N	+
3	Чемерица Лобеля	+	+	+	+
Ирисовые (<i>Iridaceae</i>)					
4	Касатик безлистный	N (есть у авторов)	N (есть у авторов)	N	+
5	Касатик сибирский	+	+	+	+
6	Шпажник черепитчатый	+	N есть у авторов	+	+
Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)					
7	Змееголовник Руйша	N (есть у авторов)	+	N (есть у авторов)	N (есть у авторов)
8	Шалфей луговой	+	+	–	+
9	Кадило сарматское	+	+	+	–
Лилейные (<i>Liliaceae</i>)					
10	Безвременник осенний	–	+	+	+
11	Лилия кудреватая	+	+	+	–
12	Тюльпан лесной	–	+	–	+

Примечание. «+» — эффективность видоидентификации 98–100%; «N» — последовательность получена авторами, но отсутствует в базе данных; «–» — данные секвенирования не получены

генотипирование. Для всех маркеров продемонстрирована хорошая воспроизводимость результатов амплификации. Размер маркерного участка *ITS2* у изучаемых нами растений составлял 246–469 п. н., что превышает общеизвестные значения о его размерах у покрытосеменных — 220–240 п. н. Этот факт объясняется выбором праймеров, рекомендованных *CCDB* [16], обеспечивающих амплификацию не только межгенного спейсера *ITS2*, но частично и участков генов *5.8S* и *28S*. В базах данных *NCBI*, как правило, приведены длины именно объединенного участка *ITS2*, что облегчало для нас поиск и выравнивание последовательностей. Размеры последовательностей *rbcL* находились в диапазоне 519–582 п. н., *psbA-trnH* — 218–569 п. н. и *matK* — 627–859 п. н. Маркеры *ITS2* и *rbcL* лучше отвечали требованию

«качество сиквенсов»: для них секвенированы последовательности с высокой длиной прочтения и незначительными ошибками с возможностью ручного исправления.

Согласно данным таблицы 3, набор из трех ДНК-штрихкодов позволил провести успешную идентификацию видов с точностью 98–100% (за исключением № 4 и 7). Неинформативным оказалось применение штрихкода *matK* для видов № 1, 9 и 11; штрихкода *psbA-trnH* для видов № 8, 12 и маркера *ITS2* для видов № 10, 12. Наиболее успешным было применение маркера *rbcL*: во всех случаях консенсусные маркерные последовательности видов на 98–100% совпали с последовательностями *NCBI*. Как видно из таблицы 3, идентификация отдельных видов растений (№ 4, 7, 12) не укладывается в двух-, а иногда и четырехлокусный алгоритм. Во-первых, для ряда

изучаемых нами редких растений в международных базах отсутствуют интересующие нас маркерные последовательности, что не позволяет провести сравнительный анализ. Например, для Змееголовника Руйша (№ 7, категория охраны II) в базе данных *NCBI* приведены только два штрихкода *rbcL*, а в базе данных информационной платформы *BOLD* представлена только последовательность *matK*. Для Касатика безлистного (№ 4, категория охраны I) в *NCBI* есть информация только по маркеру *matK*. В связи с этим планируется депонировать полученные нами последовательности в международные базы данных. Во-вторых, из литературы известно, что в некоторых случаях полиморфизм используемых нами ДНК-штрихкодов оказывается недостаточным. Так, для многих семейств (Сложноцветные, Лилейные, Яснотковые и др.) в качестве ДНК-

штрихкода может использоваться варибельный участок между генами транспортных РНК лейцина и фенилаланина — *trnL-trnF* спейсер, включая интрон гена *trnL* [17]. В исследованиях по ДНК-баркодированию видов семейства Орхидные предлагаются комбинации хлоропластных маркеров *atpF-atpH* (спейсер между генами, кодирующими субъединицы АТФ синтазы) и *psbK-psbI* (спейсер генов, кодирующих компоненты фотосистемы II) [18]. Поиск и введение дополнительных маркеров необходимо и в случае, когда полученный в результате ДНК-баркодирования результат видоидентификации с имеющимися маркерами не совпадает с первоначальным ботаническим описанием.

В таблице 4 представлены результаты трехлокусной идентификации на примере вида Лук медвежий (*Allium ursinum*, семейство *Amaryllidaceae*).

Таблица 4

Результат идентификации вида Лук медвежий (*Allium ursinum*) с помощью трехлокусной панели

ДНК-штрихкод	Консенсусная нуклеотидная последовательность		Идентификационный номер базы данных
	Буквенная последовательность	QR-код	
<i>ITS2</i>	TGGGCTTCTCCAGTTTCGCTCGCCGTTACTATGGG AATCCTTGTAAGTTTCTTCTCCTCCGCTTATTGATA TGCTTAAACTCAGCGGGTGCCCCGCTGACCTG AGGTCATGGTCCGAGCCTGCAAAATGTGCAAACA TCGTCATCGGTTTTACTTCTTGTAAGTCGTGGCTA GGGGTCTTATGCACAACTGGAGGCTTGATGCGCA CAATCTATCCACCTTTCGTCGCATGCAAAACATAG CAACGACCATCACTCAAACCCGCCGACAACGA AAGCACAAGGGTCAATATCCACATCTACACACA CCAATACGCACGTAATGGTTTACACGTTTGGGA GTGACAAAGGCGTGACGCCAAGCAGACGTGCC CTTGACCTGATGGTCTCGGGCGCAAC (403 п. н.)		GenBank Sequence ID: KX167936.1 Identities: 100%
<i>rbcL</i>	TAGACATTCGTAAACTGCTCTACCGTAGTTTTTTG CGGATAATCCCAATTTTGGTTTAATAGTACATCCC AATAGGGGACGTCCATACTTGTTCAATTTATCTCT TTCAACTTGGATGCCGTGAGGCGGGCCTTGGA AGTTTTGGAATAAGCAGGGGAATTCGCAGATCC TCTAAACGTAGAGCTCGCAGGGCTTTGAAACCA AATACATTACCCACAATGGAAGTAAACATGTTAG TAACAGAACCTTCTTCAAAAAGGTCTAAAGGATA AGCTATAAAGCAATAAATTGATTTTCTTCCCCAA TAACGGCCTCAATGTGGTAGCATCGTCSTTTGTA ACGATCAAGACTGGTAAGTCCATCAGTCCACACA GTTGTCCAGGTACCAGTAGAAGATTCCGGCGGCTA CCGCAGCCCCTGCTTCTTCAGCGGGAACCTCCGG GTTGAGGAGTTACTCGGAATGCTGCTAAGATATC AGTATCTTTGGTTTCGTAATCAGGAGTATAATAAG TCAATCTGTAATCTTTAACACCAGCTTTAAATCCA ACACTTGCTTTA (559 п. н.)		GenBank Sequence ID: KM360624.1 Identities: 100%

противовоспалительных и антисептических средств при заболеваниях верхних дыхательных путей; трава шалфея эфиопского входит в состав сбора, применяемого при некоторых опухолевых заболеваниях, анацидном гастрите, язве; весьма перспективным является шалфей мускатный (*Salvia sclarea* L.), эфирное масло которого используется как ароматическое, антисептическое и противогрибковое средство [20].

Виды рода *Salvia*, изученные в данной работе, являются представителями трех подродов: подрод *Salvia* (*S. korolkowii* Regelet Schmalh., *S. submutica* Botsch. et Vved., *S. lilacinocoerulea* Nevski), подрод *Sclarea* (*S. spinosa* L., *S. sclarea* L.) и подрод *Macrosphace* (*S. margaritae* Botsch.). *S. submutica* — эндемик Памиро-Алтая (сбор — горы Нуратау), *S. lilacinocoerulea* — эндемик Западного Памиро-Алтая (сбор — горы Байсун), *S. korolkowii* — эндемик Тянь-Шаня (сбор — горы Чаткал), *S. margaritae* — эндемик Памиро-Алтая, *S. sclarea* и *S. spinosa* — распространены в Средней Азии и на Кавказе.

По результатам генотипирования вида *Salvia pratensis* (Республика Беларусь) сходство с последовательностями в базах данных по штрихкоду *ITS2* составляет 100% (код сходной последовательности KX166755.1), по штрихкоду *matK* — 99% (JN95092.1). Для ряда видов растений флоры Узбекистана, включенных в исследование, в базах данных *NCBI* и *BOLD* не представлены выбранные маркерные последовательности (для *S. submutica*, *S. lilacinocoerulea*, *S. tianschanica*, *D. oblongifolium*).

Анализ дендрограмм (рис. 2, 3), построенных на основании нуклеотидной варибельности в областях двух маркеров (ядерном *ITS2* и хлоропластном *matK*), выделил несколько кластеров для таксонов рода *Salvia*, по составу совпадающих с таксономической классификацией рода, основанной на морфологических признаках. По варибельности хлоропластного маркера *matK* виды с широким ареалом *S. sclarea* и *S. pratensis*, принадлежащие подроду *Sclarea*, составили отдельную группу (рис. 2). Виды подрода *Salvia*: *S. submutica*, *S. lilacinocoerulea*, *S. korolkowii* выделились в отдельные ветви. Вид *S. margaritae* (подрод *Macrosphace*) из флоры Узбекистана образовал самостоятельную ветвь, генетически обособленную от остальных видов.

Сравнение варибельности маркера *ITS2*, являющегося фрагментом ядерного генома, показало, что шалфей луговой (*Salvia pratensis*), единственный охраняемый вид шалфея, произрастающий на территории Беларуси, является сестринской группой по отношению к остальным видам подрода *Sclarea* — шалфеем колючему (*S. spinosa*) и шалфеем мускатному (*S. sclarea*), произрастающим на территории Узбекистана (рис. 3). Однако шалфей луговой генетически обособлен от этих видов (колючего и мускатного), что объясняется его биогеографической принадлежностью, подтверждая иной процесс видообразования и эволюцию морфологических признаков. Вместе виды с широким ареалом *S. sclarea*, *S. spinosa*, *S. pratensis*, принадлежащие подроду *Sclarea*, составили отдельную группу.

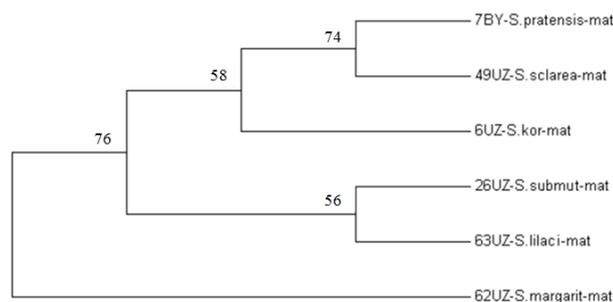


Рис. 2. Иерархическая кластеризация 6 таксонов рода *Salvia*, выполненная по данным сравнения последовательности участка *matK*

7BY — Шалфей луговой / *Salvia pratensis*; 49 UZ — Шалфей мускатный / *Salvia sclarea*; 62UZ — Шалфей Маргариты / *Salvia margaritae*; 6UZ — Шалфей Королькова / *Salvia korolkowii*; 26UZ — Шалфей туповатый / *Salvia submutica*; 63UZ — Шалфей лиловосиний / *Salvia lilacinocoerulea*; BY — Беларусь; UZ — Узбекистан

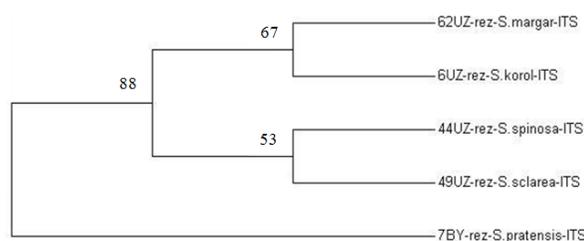


Рис. 3. Иерархическая кластеризация 5 таксонов рода *Salvia*, выполненная по данным сравнения последовательности участка *ITS2*

7BY — Шалфей луговой / *Salvia pratensis*; 44UZ — Шалфей колючий / *Salvia spinosa*; 49 UZ — Шалфей мускатный / *Salvia sclarea*; 62UZ — Шалфей Маргариты / *Salvia margaritae*; 6UZ — Шалфей Королькова / *Salvia korolkowii*; BY — Беларусь; UZ — Узбекистан

В мировой флоре встречаются более 70 видов рода *Dracocephalum*, во флоре Центральной Азии — 26 видов, во флоре Узбекистана род представлен 15 видами, которые в основном распространены в северо-восточной и юго-восточной частях страны, большинство из видов являются эндемичными, а три внесены в Красную Книгу Республики Узбекистан (2009) [21]. Центром распространения рода считаются горы Памиро-Алтая и Тянь-Шаня. *D. nuratavicum* — эндемик Узбекистана (сбор — горы Нуратау), *D. integrifolium* — эндемик Узбекистана (сбор — Западный Тянь-Шань, Угамский хребет), *D. oblongifolium* — ареал охватывает некоторые хребты Западного Тянь-Шаня и Памиро-Алтая (сбор Западный Тянь-Шань, Пскемский хребет). В фонде Национального гербария Узбекистана (TASH) хранится более 1700 гербарных образцов 22 видов рода Змееголовник (*Dracocephalum*, семейство *Lamiaceae*).

Так как в базах данных не представлены последовательности *ITS2* для белорусского вида *Dracocephalum ruyschiana*, аналогичное сравнение для видов рода *Dracocephalum*, произрастающих на территориях Беларуси и Узбекистана, выполнено только по последовательностям *matK* для Змееголовника Руйша (*D. ruyschiana*, флора Беларуси) и трех видов змееголовника флоры Узбекистана (*D. nuratavicum*, *D. oblongifolium*, *D. integrifolium*). На рисунке 4 представлена дендрограмма, отражающая взаимоотношения внутри рода *Dracocephalum* при сравнении участка *matK*.

Полученные результаты в представленной дендрограмме согласуются с секционным делением рода на два подрода. Так, рассматрива-

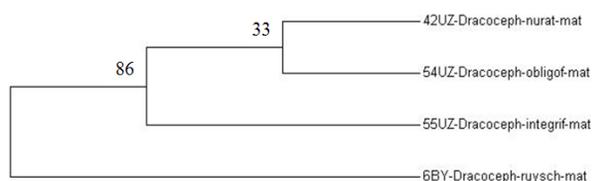


Рис. 4. Иерархическая кластеризация 4 видов рода *Dracocephalum*, выполненная по данным сравнения участка *matK*

6BY — Змееголовник Руйша / *Dracocephalum ruyschiana*;
 42UZ — Змееголовник нуратавикум / *Dracocephalum nuratavicum*;
 54UZ — Змееголовник продолговатолиственный / *Dracocephalum oblongifolium*;
 55UZ — Змееголовник цельнолистный / *Dracocephalum integrifolium*;
 BY — Беларусь; UZ — Узбекистан

емые таксоны *D. oblongifolium*, *D. integrifolium*, *D. nuratavicum* формируют отдельную группу, демонстрирующую принадлежность к одному подроду *Dracocephalum*. Исключительное положение вида *D. ruyschiana* объясняется принадлежностью данного таксона к подроду *Ruyschiana* и территориальной изолированностью, тем самым подтверждая морфологическую таксономию данного рода [22].

Заключение

На примере образцов редких видов растений, представителей четырех семейств *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Iridaceae*, *Lamiaceae*, продемонстрирована возможность успешного использования ДНК-штрихкодирования при проведении инвентаризации биологических ресурсов и экологического мониторинга природоохранных территорий. С помощью двухлокусных – четырехлокусных комбинаций ДНК-маркеров (*ITS2*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *matK*) получено 39 консенсусных нуклеотидных последовательностей для 12 видов редких растений изучаемых семейств, произрастающих на территории Республики Беларусь, что дает возможность создания собственной региональной референсной базы ДНК-штрихкодов. Маркеры *ITS2* и *rbcL* лучше отвечали требованиям, предъявляемым к штрихкодам по успешности амплификации и качеству сиквенсов.

Наряду со стандартным общепринятым буквенным форматом полученные видовые маркерные последовательности могут быть представлены в виде актуальных в настоящее время QR-кодов. Учитывая, что при создании QR-кода для каждого образца может быть включена дополнительная геоботаническая и таксономическая информация, подобный формат представления данных более предпочтителен.

Проведено сравнение результатов секвенирования последовательности *ITS2* и *matK* у представителей двух родов *Salvia* (Шалфей) и *Dracocephalum* (Змееголовник) семейства *Lamiaceae*, произрастающих на территории Беларуси и Узбекистана. Полученные результаты согласуются с морфологической таксономией родов *Salvia* и *Dracocephalum*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского Республиканского Фонда Фундаментальных Исследований (договор с БРФФИ № Б19УЗБГ-015 от 21.06.2019 г.).

Список использованных источников

1. Примак, Р. Основы сохранения биоразнообразия / Р. Примак ; пер. с англ. О. С. Якименко, О. А. Зиновьевой. – М.: Издательство Научного и учебно-методического центра, 2002. – 256 с.
2. Barcoding of life: Беларусь – участник глобальной инициативы по ДНК-штрихкодированию жизни / Н. В. Воронова [и др.] // Труды БГУ. – 2014. – Т. 9, ч. 1. – С. 167–171.
3. Нигматуллина, Н. В. Молекулярные маркеры, применяемые для определения генетического разнообразия и видоидентификации дикорастущих растений / Н. В. Нигматуллина, А. Р. Кулуев, Б. Р. Кулуев // Биомика. – 2018. – Т. 10, № 3. – С. 290–318. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-39.
4. Рябушкина, Н. А. Специфика выделения ДНК из растительных объектов / Н. А. Рябушкина, М. Е. Омашева, Н. Н. Галиакпаров // Биотехнология. Теория и практика. – № 2. – 2012. – С. 9–26.
5. Бродский, А. К. Глобальный экологический кризис: взгляд на проблему через призму биоразнообразия / А. К. Бродский, Д. В. Сафронова // Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 48–70. doi: 10.24855/biosfera.v9i1.323/www.21bs.ru.
6. Kress, W. J. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region / W. J. Kress, D. L. Erickson // PLoS One. – 2007. – Vol. 2, № 6. – P. 1–10.
7. Hollingsworth, P. M. Choosing and using a plant DNA barcode / P. M. Hollingsworth, S. W. Graham, D. P. Little // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, № 5. – P. 1–28.
8. Памятка по сбору биологического материала редких и находящихся под угрозой исчезновения на территории Республики Беларусь видов растений с целью молекулярно-генетических исследований / Н. В. Савина [и др.]; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2017. – 7 с.
9. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редкол.: И. М. Качановский [и др.]. – 4-е изд. – Минск: Беларус. Энцыкл. ім.П. Броўкі, 2015. – 448 с.
10. Красная книга Республики Узбекистан. Растения и грибы / редкол.: Н. М. Умаров [и др.]. Ташкент: Chinor ENK, 2009. – 356 с.
11. Подбор маркеров для ДНК-баркодинга диких видов семейства *Orchidaceae* на примере *Anacamptis morio* L. / Н. В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – 2018. – Т. 24. – С 5–11.
12. Dunning, L. T. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note / L. T. Dunning, V. Savolainen // Bot J Lin Soc. – 2010. – Vol. 164. – P. 1–9.
13. ОДО «Праймтех» – реагенты и материалы для молекулярной биологии [Интернет-сайт компании Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://primetech.by>. – Дата доступа 18.05.2020.
14. NCBI BLAST [Electronic resource] / National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool. – Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. – Date of access: 11.05.2020.
15. BOLD Systems [Electronic resource]: The Barcode of Life Data Systems / CCDB (The Canadian Centre for DNA Barcoding). – Mode of access: <http://ccdb.ca/http://boldsystems.org/index.php> / Public_Primer_PrimerSearch. – Date of access: 18.05.2020.
16. CCDB [Electronic resource] / Canadian Centre for DNA Barcoding. – Mode of access: <http://ccdb.ca/>. – Date of access: 17.01.2018.
17. Species identification using sequences of the *trnL* intron and the *trnL-trnF* IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan / Tsai Li-Chin [et al.] // Forensic Sci Int. – 2006. – Vol. 164 (2–3). – P. 193–200. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.01.007.
18. DNA barcoding of *Orchidaceae* in Korea / Kim H.M. [et al.] // Mol. Ecol. Resour. – 2014. – Vol. 14(3). – P. 499–507. doi: 10.1111/1755-0998.12207.
19. DNA Barcode Goes Two-Dimensions: DNA QR Code Web Server / Liu C. [et al.]. – PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 5. – e35146. doi: 10.1371/journal.pone.0035146.
20. Губанова, Е. А. Фармакогностическое изучение травы шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.): дис. ... канд. фарм. наук

14.04.02: 21.12.2010 / Е. А. Губанова. – летьеь Брянского отделения РБО. – 2016. – 2010. – 157 с. № 2(8). – С. 3–8.

21. Абдуллаева, Н. С. Род *Dracoscephalum* L. (*Lamiaceae*) во флоре Узбекистана / Н. С. Абдуллаева, О. К. Ходжиматов // Бюл- 22. Буданцев, А. Л. Система рода *Dracoscephalum* (*Lamiaceae*) / А. Л. Буданцев // Бот. журн. – 1987. – Т. 72, № 2. – С. 260–267.

N. V. Savina¹, S. V. Kubrak¹, L. V. Milko¹, A. V. Kilchevsky¹, E. V. Nikitina², K. Sh. Tojibaev²

DNA BARCODING AS A TOOL FOR ECOLOGICAL MONITORING AND ASSESSING OF SPECIES DIVERSITY OF RARE PLANT SPECIES

¹State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27, Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: N.Savina@igc.by

²Institute of Botany of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

32, Durmon Yuli St., 100125, Tashkent, the Republic of Uzbekistan

e-mail: botany@academy.uz

Objects of the study were rare and endangered species of the *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Iridaceae* and *Lamiaceae* families growing in the territories of Belarus and Uzbekistan and listed in National Red Books. Rare species require special attention, regular monitoring of their natural populations and comprehensive study, both by the methods of classical taxonomy and molecular-genetic analysis. DNA barcoding as a tool for inventorying the species diversity of rare plants was used in work. Using the combinations of DNA markers (*ITS2*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *matK*), 39 consensus nucleotide sequences were obtained for 12 rare plant species of the studied flora families of Belarus. The successful application of DNA barcoding during environmental monitoring in nature conservation areas was demonstrated as possible.

Keywords: biodiversity, Red Book, DNA barcoding, DNA markers, *ITS2*, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*.

Дата поступления статьи: 14 сентября 2020 г.

А. С. Бабенко¹, К. А. Моссэ², Н. Г. Седляр², Р. С. Шулинский², И. Б. Моссэ²

РАЗРАБОТКА ПАНЕЛИ ДЛЯ АНАЛИЗА ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ЦЕЛЕВЫХ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫМ СТАТУСОМ ЧЕЛОВЕКА

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83

e-mail: labmdbt@gmail.com

²Государственное научное учреждение

«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

e-mail: I.Mosse@igc.by

Разработана уникальная панель для анализа профиля метилирования целевых эпигенетических локусов, ассоциированных с психоэмоциональным статусом человека, методом NGS. Панель включает 17 пар олигонуклеотидных праймеров, для синтеза фрагментов 12 генов, содержащих целевые сайты метилирования. Приготовление NGS-библиотек выполняли с использованием набора реагентов QIAseq Methyl Library Kit (Qiagen, Германия). Тестирование панели проведено на 24 контрольных образцах ДНК. Показано, что сконструированная панель позволяет определять количественное соотношение метилированных и деметилированных целевых CpG сайтов. Преимуществом такого подхода является возможность исследования степени метилирования десятков и сотен локусов в ходе анализа одного образца, а также возможность тестирования сотен образцов в рамках одного запуска секвенатора. Разработанная панель может использоваться как в научных целях, так и в практике здравоохранения и криминалистики.

Ключевые слова: метилирование эпигенов, высокопроизводительное секвенирование, бисульфитная конверсия, психоэмоциональный статус.

Введение

Оценка статуса метилирования специфических локусов геномной ДНК является одним из самых эффективных способов изучения психоэмоциональной деятельности человека [1]. Достижения современной науки позволяют использовать данные о статусе метилирования в ряде областей не только биологической, но и биомедицинской направленности, где в настоящее время могут быть определены в том числе принадлежность клеток к определенной ткани и даже конкретному образцу биологического материала. Последний факт позволяет эффективно применять эти методики и для идентификации личности человека в криминалистике [2].

Бесспорно, благодаря достижениям в области молекулярной биологии, генетики, развитию молекулярно-генетических методов анализа удалось получить немало данных о психическом здоровье человека и некоторых особенностях его функционирования, формирования эмоций, реакций на различные ситуации,

раздражители. Например, исследователи M. Manchia и V. Fanos сообщили о том, что в развитии агрессивного поведения у людей, страдающих тяжелыми формами таких заболеваний, как шизофрения, биполярное расстройство, синдром дефицита внимания/гиперактивности, играют немалую роль генетические и эпигенетические маркеры [3]. Группа китайских исследователей под руководством J. Liu сравнительно недавно описала роль статуса метилирования гена моноаминоксидазы (*MAOA*) как маркера психического здоровья и психического состояния в непосредственно оцениваемый момент времени у китайских рабочих [4]. D. Van den Hove et. al. установили, что при депрессивном расстройстве состояние человека ассоциировано с уровнем метилирования некоторых генов, в частности *NR3C1*, *FKBP5*, *BDNF* [5].

В зависимости от поставленных задач, допустимого времени анализа и объема исследуемых локусов, методы оценки профиля метилирования могут в значительной степени варьировать,

однако на сегодняшний день наиболее удобными считаются пиросеквенирование, метил-специфическая ПЦР и высокопроизводительное секвенирование. При этом метил-специфическая ПЦР оптимальна при работе с небольшим количеством (1–3) известных локусов умеренной протяженности [6].

Пиросеквенирование идеально подходит для работы с 5–10 локусами. В этом случае важным преимуществом этого подхода является возможность полной автоматизации процесса и снижение влияния человеческого фактора [7]. Наконец, в случае изучения всего метилома или значительных объемов локусов (более 10) рекомендуется использование высокопроизводительного секвенирования, особенно в случаях значительного количества анализируемых образцов биологического материала. Основная проблема применения данной технологии связана с чрезмерным количеством получаемых данных при анализе метилома и даже таргетных панелей широкого спектра [8].

В связи с растущим интересом ученых к статусу метилирования генов, ответственных за поведение, эмоции и восприятие человека, появляется все больше практико-ориентированных работ. Анализ современного состояния проблемы показал, что опираться в подобного рода исследованиях на один или два маркера не удастся. Необходима оценка целого спектра генетических и эпигенетических локусов генома человека.

Для решения таких задач активно применяются технологии высокопроизводительного секвенирования и разработка небольших таргетных панелей. Преимуществом такого подхода является, с одной стороны, возможность исследования десятков и сотен локусов в ходе анализа одного образца, с другой — имеется возможность протестировать в рамках одного запуска секвенатора сотни образцов, что сильно снижает стоимость одного анализа для конечного потребителя, делая его более доступным в рутинной практике [9].

Цель работы — дизайн и оптимизации сборной панели для анализа профиля метилирования специфических локусов генов *TRKB*, *CRH*, *OXR*, *FKBP5*, *NR3C1*, *BDNF*, *MAOA*, *SLC6A4*, *SKA2*, *CACNA1C*, *COMT* и *HTR2A*, ассоциированных с психическим здоровьем человека и его психоэмоциональным статусом.

Панель может быть использована для анализа групп образцов с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования.

Совместима с коммерческими наборами для проведения бисульфитной конверсии и приготовления NGS-библиотек.

Материалы и методы

Обработку панели осуществляли на случайно взятой выборке из 24 образцов буккального эпителия здоровых добровольцев. Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора реагентов «Нуклеосорб» модификация А (ОДО Праймтех, Республика Беларусь). Для контроля качественных и количественных характеристик полученной ДНК использовали флуориметрический анализ на базе прибора GloMax Explorer (Promega, США) и набора реагентов QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega, США), а также прибора Qubit 2.0 (Invitrogen, США) и набора реагентов Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Степень фрагментирования ДНК после выделения оценивали для каждого образца с помощью гель электрофореза в 1% агарозном геле и 1xTBE буферном растворе. Выборочно проводили капиллярный гель-электрофорез образцов с использованием прибора Agilent 4200 TapeStation (Agilent, США) и набора DNA ScreenTape (Agilent, США).

Непосредственно после выделения ДНК и оценки ее качества и концентрации проводили бисульфитную конверсию с использованием набора реагентов EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя набора. Набор оптимизирован для получения после конверсии участков геномной ДНК длиной 300–500 пар оснований и в некотором количестве более 500 пар оснований. Для каждой конверсии использовали 1 мкг выделенной ДНК. Конверсию каждого образца проводили в дубле.

Приготовления NGS-библиотек выполняли с использованием набора реагентов QIAseq Methyl Library Kit (Qiagen, Германия), позволяющего работать с фрагментированными участками ДНК после бисульфитной конверсии. Для приготовления NGS-библиотек использовали ампликоны — продукты амплификации выбранных целевых участков геномной ДНК (табл. 1).

Целевые участки геномной ДНК содержали 24 специфических CpG сайтов-интереса.

Уникальная панель специфических олигонуклеотидных праймеров для создания NGS-библиотек, включающих выбранные локусы,

Таблица 1

Перечень локусов, выбранных для анализа

№	Символ гена / название гена / альтернативный символ гена	Позиция на хромосоме / позиция Illumina 450К*	Литературная ссылка
1	<i>TRKB</i> (Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 2) <i>GP145-TrkB, Trk-B, OBHD, BDNF/NT-3, EC 2.7.10</i>	9q21.33 *cg01009697 (GW)	[10]
2	<i>CRH</i> (Corticotropin Releasing Hormone) <i>CRF, CRHI</i>	8q13.1 *cg23409074 (GW)	[11]
3	<i>OXTR</i> (Oxytocin Receptor) <i>OT-R</i>	3p25.3 3: 8767638	[12, 13]
4		3p25.3 -934 promoter	
5	<i>FKBP5</i> (FK506 binding protein 5) <i>AIG61, FKBP54, P54, PPIase, Ptg-0</i>	6p21.31 6: 35590661-35590662 intron 7	[14–16]
6		6p21.31 6: 35590711-35590712 intron 7	
7		6p21.31 cg07061368 (5'-UTR)	
8	<i>NR3C1</i> (Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1) <i>GRL, GR, GCR, GCRST, GCCR</i>	5q31.3 Promoter 1F (site 35)	[17, 18]
9		5q31.3 Promoter 1F (site 36)	
10	<i>BDNF</i> (Brain Derived Neurotrophic Factor) <i>ANON2, BULN2</i>	11p14.1 11:27700244-27700245 promoter	[16, 19]
11		11p14.1 11:27700251-27700252 promoter	
12		11p14.1 11:27700254-27700255 promoter	
13		11p14.1 11:27700256-27700257 promoter	
14		11p14.1 cg01225698, Position 27742355 (TSS1500) chr11 27742307 27742407	
15	<i>MAOA</i> (Monoamine Oxidase A) <i>MAO-A, BRNRS</i>	Xp11.3 cg05443523 Position 43515213 (TSS200)	[16]
16	<i>SLC6A4</i> (Solute Carrier Family 6 Member 4) <i>5-HTT, 5-HTTLPR, 5HTT, hSERT, HTT, OCDI, SERT, SERT1</i>	17q11.2 17:30236120-30236121 promoter	[20, 21]
17		17q11.2 17:30236156-30236157 promoter	
18	<i>SKA2</i> (Spindle and Kinetochores Associated Complex Subunit 2) <i>FAM33A</i>	17q22 cg13989295 (rs7208505)	[22]
19	<i>CACNA1C</i> (Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C) <i>CACNL1A1, CCHL1A1, CACH2, CACN2, DHP, Alpha-1 Subunit, CaV1.2, LQT8, TS</i>	12p13.33 12: 2339515-2339516	[23, 24]
20		12p13.33 12: 2327967-2327968 intron 3	
21	<i>COMT</i> (Catechol-O-Methyltransferase) <i>HEL-S-98n</i>	22q11.21 rs4680	[25, 26]
22		22q11.21 cg04856117	

Продолжение таблицы 1

№	Символ гена / название гена / альтернативный символ гена	Позиция на хромосоме / позиция Illumina 450K*	Литературная ссылка
23		13q14.2 -1439 promoter	[27, 28]
24	<i>HTR2A</i> (5-hydroxytryptamine Receptor 2A)	13q14.2 -1420 promoter	
25	<i>HTR2, 5-HT2, 5-HT-2A, 5-HT2A, 5-HT-2</i>	13q14.2 cg02027079 promoter 13:47471705 с.-1536 (GRCh37 / hg19 build)	

Примечание. * — Позиция согласно Illumina 450K

разработана с учетом захвата всех целевых участков ДНК. В некоторых случаях использовали объединение нескольких близко расположенных локусов в один ампликон. Учитывая выбранный метод — высокопроизводительное секвенирование и особенности создания библиотек (случайная фрагментация) — размер ампликонов должен был составлять от 200 до 400 пар оснований. Проведен дизайн 17 наборов олигонуклеотидных праймеров для амплификации 17 целевых участков генов-мишеней, включающих анализируемые CpG сайты. Последовательности праймеров приведены в таблице 2.

Дизайн панели существенно затруднялся наличием протяженных GC богатых участков ДНК, в том числе несущих CpG сайты метилирования, отличные от целевых, выбранных для анализа, однако входящих в состав ампликонов и нередко в состав самих последовательностей олигонуклеотидных праймеров. Работу с последовательностями ДНК перед дизайном осуществляли с использованием бесплатного программного обеспечения Ugene v.1.31.1 (UniPro, Россия).

В качестве источника последовательностей геномной ДНК человека использовали сборку Homo sapiens assembly GRCh38.p13, предоставляемую в свободном доступе базой данных NCBI [29]. Для дизайна олигонуклеотидов также использовали бесплатные онлайн-программы, предназначенные для поиска и предсказания сайтов метилирования в исследуемой последовательности ДНК: SMS (Sequence Manipulation Suite, раздел CpG Islands) [30], iMETHYL (integrative DNA methylation database) [31].

Непосредственно после биоинформационного анализа последовательностей геномной ДНК дизайн специфических олигонуклеотидных праймеров осуществляли онлайн с помо-

щью бесплатного программного обеспечения Primer3 [32] и METHPrimer v. 2.0 [33].

Для моделирования эффективности ПЦР и условий ее проведения использовали бесплатные онлайн-приложения IDT Oligoanalyzer [34] и mfold/DNAfold [35].

Каждый набор специфических олигонуклеотидных праймеров после анализа и моделирования условий проходил этап оптимизации с помощью классической ПЦР с разделением ее продуктов в агарозном геле. Оптимизацию проводили с использованием реагентов «ОДО Праймтех — олигонуклеотидные праймеры» (Республика Беларусь) и «ООО АртБиоТех» (Республика Беларусь), реагенты для амплификации «ArtMix Форез ДНК-полимераза» и «ДНК-полимераза Flash». Для проведения амплификации использовали прибор T100 (BioRad, США).

Условия термоциклирования при оптимизации: +95 °C — 3 мин, далее 45 циклов амплификации: +95 °C 10 с, градиент +50–70 °C 10 с, +72 °C 2 мин, заключительный этап элонгации +72 °C 3 мин. Используемые температурные параметры в рамках градиента: +68,5/+65,9/+62,0/+57,5/+53,8 °C. После оптимизации отжиг осуществляли при +58 °C. Реакционная смесь содержала по 10 пикомоль каждого олигонуклеотидного праймера, что оказалось оптимальным количеством вещества на одну реакцию. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Каждая ПЦР оптимизировалась отдельно во избежание последующих неоднородностей секвенирования в силу различий в их эффективности. На одну реакцию расходовали 1,5 мкл ДНК после бисульфитной конверсии. Согласно данным производителя набора получаемая конвертированная ДНК находилась в одноцепочечном состоянии.

Таблица 2

Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров для амплификации целевых областей генов-мишеней

№	Название	Последовательность
1	comt1_F	GGGGGTTTATTGTGGTTATTTAGTT
2	comt1_R	TACTAAAAAATCTTTCCTCAACCC
3	Comt2_F	TAGTTGGGAGATAATAGTTTGAGTT
4	Comt2_R	ACTCTATACTCCTCCTACAACACCC
5	CACNA1C_1F	GGTAGGTAGTGAGGGGTTGTTG
6	CACNA1C_1R	AAACACTCAAATCTACCCTCAACTT
7	CACNA1C_2F	TTTTGTGGTAATGTTGGGGAG
8	CACNA1C_2R	AAAACATAACTACTAAAACAAATCAAC
9	SKA2_F	TAGAGAATAATGTTAAGGGGGTTGT
10	SKA2_R	ATCAAATATTAATTTTCTTCAATATTCAAAC
11	SLC6A4_1+2F	TTGATTTTTTTGTTTTTTAATTTTG
12	SLC6A4_1+2R	AAACCAATTCTTCATTCCTTCATTATA
13	MAOA_F	TAGTGTTTAGTTTTTTTTGGGGTTT
14	MAOA_R	AAATTATTAATTTAAAATATCCTTATATC
15	Bdnf 1-4F	GGATTTTTTAGTTAATTTTTTTT
16	Bdnf 1-4R	AACTTTAATAAAAACACCCACC
17	NR3C1+2_F	TTTTAATTTTTTAGGAAAAGGGTG
18	NR3C1+2_R	CCTAAAACCTCCCCAAAAAAC
19	FKBP51+2F	GGAGTTTTTAGAGTGAAATTGAGATG
20	FKBP51+2R	AAAATACAACTTTTCAAACTAAAC
21	FKBP5_3F	TTATAATTAGTTTTTATGTTTTTTTTT
22	FKBP5_3R	ATCAATCTCCCTAATCCACTATTC
23	OXTR_1F	GTGATTTATGTGATGTAGGTTTTGG
24	OXTR_1R	CTACCTAACCATCTACCAACC
25	OXTR_2F	GGGGGAATTTTTGTTTTAAAGTTTA
26	OXTR_2R	CACTCCTTATCCTAAAAAACTC
27	CRH_F	TTTTTAATGGATTTGGTTTTTGAGT
28	CRH_R	TTAAAATAACAAAATCTACCCCTC
29	TRKB_F	GGTTATGGGTTGGTGTTT
30	TRKB_R	AAATCTCACTAAAAACAAATTAAC
31	HT_1F	GGTTATATAGGTTTAGGGTGG
32	HT_1R	TACCTCCTTTAAAAACCTACTTAAAAA
33	HT_2F	ATTAAGGTAGGTAAGTGGTATTG
34	HT_2R	AATTTATCAAAATTATCACCACAAA

Пробоподготовка и высокопроизводительное секвенирование выполнялись одновременно для 24 образцов согласно инструкции к набору для приготовления NGS-библиотек и рекомендациям производителя прибора Illumina MiSeq. Для запуска использован набор v3 2x300 (600 cycles) Illumina — MiSeq Reagent Kit v3.

Результаты и обсуждение

По результатам секвенирования выявлен достаточно высокий процент сформированных кластеров. Около 93% кластеров прошли фильтр. Q-Score запуска >30 соответствовал 88,4%. Финальный объем полученных данных соответствовал 8.3 Gb. Плотность кластеров — 654 000/мм квадратный ячейки. Для запуска использовали 10 pM конечной смеси библиотек, содержащей 24 ампликона целевых последовательностей. Вероятно, качество запуска может быть улучшено посредством последующего снижения вносимого количества NGS-библиотеки, а также при использовании более полной загрузки картриджа, например, 96 образцов или даже 384 образца при условии автоматизации работы.

Оценку качества прочтений проводили в программе FastQC с последующим триммингом некачественных оснований в Trimmomatic. Локальное картирование прочтений на референс (GRCh37 [GCF_000001405.13]) проводили по алгоритму Burrows-Wheeler Aligner при помощи программного модуля Bowtie2 в утилите Bismark.

Фильтрацию с последующим преобразованием карты выравнивания прочтений (SAM), сортировку и индексирование проводили в Samtools. Вызов сайтов метилирования на «изначально верхней цепи» (original top strand) в CpG островах проведено в пайплайне Bismark. Предварительно данные в карте выравнивания прочтений были дедулицированы, что рекомендуется проводить при ампликонном секвенировании. Подсчет отношения деметилированных сайтов к метилированным был произведен на языке программирования Python с использованием библиотеки pandas.

В результате анализа были получены соотношения для 24 метилированных и деметилированных целевых сайтов в 24 образцах ДНК. Данные представлены в таблицах 3–6.

Таблица 3

Данные о статусе метилирования выбранных CpG сайтов интереса генов *NR3C1_49*, *NR3C1_47*, *BDNF_04*, *BDNF_02*, *BDNF_99*, *BDNF_92*

№ образца ДНК	Сайты метилирования генов (метилирован/деметилирован)					
	<i>NR3C1_49</i>	<i>NR3C1_47</i>	<i>BDNF_04</i>	<i>BDNF_02</i>	<i>BDNF_99</i>	<i>BDNF_92</i>
1	12 / 948	11 / 958	114 / 7648	183 / 7590	152 / 7624	187 / 7612
2	1 / 425	5 / 423	388 / 23052	655 / 22798	541 / 22907	642 / 22816
3	1 / 67	0 / 68	11 / 3240	5 / 3247	6 / 3246	8 / 3248
4	9 / 1100	5 / 1106	92 / 5169	66 / 5196	74 / 5186	176 / 5092
5	4 / 782	7 / 781	100 / 7897	134 / 7862	83 / 7920	109 / 7899
6	5 / 699	4 / 703	104 / 9840	115 / 9835	107 / 9842	132 / 9826
7	22 / 1134	10 / 1155	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
8	11 / 1141	16 / 1140	139 / 7015	154 / 7004	132 / 7029	201 / 6961
9	1 / 491	2 / 490	124 / 6359	232 / 6255	278 / 6211	326 / 6186
10	8 / 719	6 / 722	218 / 7423	284 / 7362	352 / 7294	411 / 7243
11	5 / 375	2 / 384	65 / 2434	80 / 2426	78 / 2428	104 / 2407
12	5 / 551	4 / 555	48 / 2625	60 / 2613	99 / 2575	98 / 2586
13	9 / 861	3 / 871	113 / 5085	231 / 4975	222 / 4986	278 / 4936
14	3 / 737	9 / 732	131 / 6729	82 / 6782	108 / 6762	124 / 6746
15	14 / 1084	11 / 1089	76 / 3804	105 / 3779	94 / 3795	157 / 3732
16	10 / 1022	4 / 1033	192 / 7955	237 / 7921	222 / 7944	275 / 7903

Продолжение таблицы 3

№ образца ДНК	Сайты метилирования генов (метилирован/деметилован)					
	<i>NR3C1_49</i>	<i>NR3C1_47</i>	<i>BDNF_04</i>	<i>BDNF_02</i>	<i>BDNF_99</i>	<i>BDNF_92</i>
17	4 / 625	7 / 624	168 / 6962	144 / 6988	171 / 6966	215 / 6924
18	5 / 879	4 / 883	125 / 7972	151 / 7951	166 / 7935	226 / 7880
19	4 / 382	6 / 381	261 / 11158	239 / 11188	233 / 11202	279 / 11168
20	7 / 430	4 / 434	166 / 7146	238 / 7083	234 / 7087	302 / 7025
21	0 / 0	0 / 0	178 / 6387	172 / 6397	196 / 6378	261 / 6316
22	5 / 609	0 / 617	187 / 10029	286 / 9939	342 / 9885	404 / 9828
23	3 / 1100	3 / 1105	98 / 6954	83 / 6977	78 / 6983	153 / 6911
24	4 / 671	2 / 674	136 / 5084	208 / 5015	200 / 5023	271 / 4959

Таблица 4

Данные о статусе метилирования выбранных CpG сайтов интереса генов *SLC6A4_35*, *SLC6A4_79*, *HTR2A_06*, *OXTR_24*, *OXTR_07*, *FKBP5_38*

№ образца ДНК	Сайты метилирования генов (метилирован/деметилован)					
	<i>SLC6A4_35</i>	<i>SLC6A4_79</i>	<i>HTR2A_06</i>	<i>OXTR_24</i>	<i>OXTR_07</i>	<i>FKBP5_38</i>
1	16 / 1753	53 / 1736	10254 / 1799	931 / 9868	12850 / 19976	4706 / 2174
2	17 / 1817	62 / 1773	12581 / 2985	49 / 385	8501 / 9203	6090 / 1881
3	0 / 200	0 / 199	4699 / 988	247 / 2865	28832 / 44163	3835 / 1217
4	53 / 2321	83 / 2329	3131 / 496	282 / 5032	14965 / 21048	5503 / 2466
5	68 / 3037	97 / 3069	3592 / 811	525 / 6266	26746 / 35488	4192 / 1562
6	25 / 2847	74 / 2840	2837 / 588	598 / 7617	17838 / 22751	4250 / 5557
7	28 / 2062	99 / 2044	3310 / 607	954 / 5898	17628 / 19167	8032 / 3908
8	69 / 5667	247 / 5641	2486 / 488	846 / 6690	17330 / 28558	3298 / 1995
9	16 / 1513	87 / 1454	1729 / 326	1901 / 9866	20121 / 32078	1835 / 676
10	23 / 1431	61 / 1408	3311 / 543	1776 / 11188	11352 / 18686	4421 / 1559
11	5 / 370	17 / 365	2291 / 247	986 / 4492	11693 / 15156	3098 / 1680
12	23 / 1809	67 / 1816	2026 / 260	912 / 4432	27274 / 22530	1675 / 981
13	14 / 1019	89 / 960	1611 / 443	1516 / 7744	23287 / 24570	6198 / 1215
14	19 / 3134	81 / 3107	4817 / 1399	1710 / 10986	11833 / 18065	7686 / 3729
15	25 / 2084	76 / 2088	3391 / 649	859 / 6104	12038 / 13793	3386 / 1005
16	29 / 2364	81 / 2341	4950 / 835	962 / 7295	9242 / 15428	3563 / 1844
17	5 / 1811	59 / 1768	9389 / 1519	8 / 3854	22567 / 29169	2947 / 1142
18	23 / 3185	105 / 3175	4864 / 646	1050 / 13867	24130 / 42304	3179 / 1221
19	3 / 302	6 / 306	4936 / 787	840 / 8921	25904 / 23065	6345 / 2037
20	23 / 1838	61 / 1819	3780 / 924	1528 / 9130	20135 / 24296	1963 / 1060
21	25 / 3424	123 / 3382	2905 / 572	1767 / 9544	35096 / 31396	1840 / 577
22	34 / 3926	198 / 3828	3583 / 602	2060 / 11975	34422 / 44361	3301 / 743
23	41 / 3822	141 / 3763	3079 / 558	985 / 10750	13596 / 17865	6339 / 4027
24	23 / 3146	200 / 3007	2636 / 775	1432 / 7564	10784 / 30744	2396 / 1125

Таблица 5

Данные о статусе метилирования выбранных CpG сайтов интереса генов *FKBP5_88*,
FKBP5_36, *CRH*, *TRKB*, *SACNA1C_67*, *SACNA1C_15*

№ образца ДНК	Сайты метилирования генов (метилирован/деметилирован)					
	<i>FKBP5_88</i>	<i>FKBP5_36</i>	<i>CRH</i>	<i>TRKB</i>	<i>SACNA1C_67</i>	<i>SACNA1C_15</i>
1	6720 / 168	11802 / 1251	812 / 606	705 / 35959	2419 / 404	12046 / 11786
2	7826 / 167	12461 / 3473	37 / 10	294 / 24795	4537 / 749	89 / 63
3	4639 / 425	0 / 0	782 / 488	13 / 15555	547 / 98	10540 / 14027
4	7792 / 204	0 / 0	585 / 506	355 / 21965	3560 / 714	13635 / 10006
5	5661 / 116	0 / 0	392 / 344	365 / 36239	2547 / 445	17589 / 13463
6	8446 / 1393	0 / 0	1020 / 1024	107 / 20207	3820 / 618	7117 / 9984
7	11549 / 428	3101 / 595	455 / 462	946 / 38941	1920 / 495	12808 / 9047
8	5145 / 166	4984 / 870	926 / 583	316 / 22230	2883 / 506	7475 / 7751
9	2436 / 87	10233 / 1523	660 / 620	445 / 23848	1276 / 276	21709 / 14315
10	5846 / 147	10763 / 2489	832 / 517	398 / 15384	1562 / 320	15245 / 9745
11	4699 / 96	7685 / 957	259 / 210	500 / 27581	1058 / 216	15328 / 11750
12	2615 / 62	3567 / 663	334 / 314	665 / 40676	1339 / 295	14436 / 9982
13	7257 / 185	6976 / 1227	485 / 327	656 / 30013	2088 / 715	17748 / 6703
14	11181 / 266	11722 / 1351	886 / 800	623 / 36895	3433 / 413	11027 / 10425
15	4299 / 114	7692 / 1833	561 / 412	301 / 14458	2003 / 487	11086 / 7729
16	5239 / 179	9947 / 1709	824 / 825	221 / 17193	2289 / 568	12279 / 11815
17	4026 / 72	3448 / 601	910 / 810	500 / 30658	1900 / 319	18442 / 15415
18	4303 / 110	7086 / 1009	1070 / 772	597 / 35828	2381 / 473	13474 / 12034
19	8171 / 242	3463 / 492	660 / 535	772 / 55659	2475 / 334	14572 / 10610
20	2957 / 75	5269 / 922	706 / 606	612 / 29696	2425 / 457	20245 / 10072
21	2359 / 65	3819 / 808	814 / 467	827 / 53481	1940 / 490	13210 / 10257
22	3981 / 72	1263 / 184	615 / 510	986 / 42209	1859 / 363	17731 / 10656
23	10210 / 183	12179 / 1173	838 / 634	205 / 19668	3252 / 414	16464 / 11360
24	3425 / 109	5600 / 1134	632 / 1093	352 / 18273	1754 / 487	18116 / 13967

Таблица 6

Данные о статусе метилирования выбранных CpG сайтов интереса генов *HTR2A_60*,
HTR2A_78, *SKA2*, *COMT_01*, *COMT_70*, *MAOA*, *COMT_70*, *MAOA*

№ образца ДНК	Сайты метилирования генов (метилирован/деметилирован)					
	<i>HTR2A_60</i>	<i>HTR2A_78</i>	<i>SKA2</i>	<i>COMT_01</i>	<i>COMT_70</i>	<i>MAOA</i>
1	1007 / 127	1068 / 65	395 / 388	3496 / 1084	1190 / 1178	31 / 3215
2	21792 / 18067	97 / 39750	5 / 505	4488 / 2402	164 / 189	303 / 12120
3	971 / 281	975 / 276	374 / 396	1721 / 432	1 / 1116	67 / 6255
4	2894 / 553	3214 / 234	97 / 98	2802 / 1206	1593 / 1539	0 / 1
5	444 / 349	2 / 788	178 / 173	1927 / 591	1638 / 1459	46 / 4730
6	240 / 141	155 / 227	603 / 85	3513 / 1787	50 / 3339	29 / 4961

Продолжение таблицы 6

№ образца ДНК	Сайты метилирования генов (метилирован/деметилирован)					
	<i>HTR2A_60</i>	<i>HTR2A_78</i>	<i>SKA2</i>	<i>COMT_01</i>	<i>COMT_70</i>	<i>MAOA</i>
7	3819 / 1024	4584 / 253	1 / 147	2365 / 1007	1041 / 1202	0 / 0
8	262 / 167	0 / 429	297 / 321	3389 / 1246	1890 / 53	42 / 4706
9	822 / 763	9 / 1569	169 / 166	1735 / 777	855 / 985	52 / 2906
10	22481 / 5040	25798 / 1723	409 / 64	2915 / 1109	910 / 848	0 / 0
11	1143 / 166	1247 / 61	1 / 105	1964 / 617	19 / 1662	17 / 1531
12	4692 / 631	5060 / 256	44 / 47	1617 / 687	1325 / 45	33 / 2310
13	394 / 228	255 / 366	1 / 108	2646 / 1424	816 / 842	1232 / 5639
14	2497 / 1548	1539 / 2494	6 / 250	4009 / 953	1460 / 1372	43 / 4107
15	5826 / 2824	3630 / 4999	146 / 134	2078 / 959	2375 / 54	50 / 3730
16	323 / 145	217 / 246	479 / 341	2008 / 711	19 / 1208	98 / 5402
17	15907 / 7491	9427 / 13967	4 / 161	2876 / 693	1435 / 1627	0 / 0
18	1494 / 229	1617 / 105	266 / 201	2382 / 778	19 / 2392	0 / 0
19	13277 / 2091	14024 / 1318	131 / 152	3898 / 1548	1027 / 39	0 / 0
20	247 / 393	585 / 52	117 / 95	2834 / 1110	1389 / 1326	0 / 0
21	7792 / 1639	8872 / 554	0 / 118	1913 / 724	16 / 2299	0 / 0
22	16533 / 7320	10746 / 13098	164 / 178	3062 / 911	34 / 1728	0 / 0
23	12979 / 6204	8406 / 10762	1 / 432	3448 / 1103	1308 / 1229	0 / 0
24	623 / 1741	1034 / 1319	5 / 336	3414 / 2036	2519 / 82	0 / 0

Как видно из таблиц 3–6, в рамках разработанной панели и рабочего процесса анализа становятся доступны сведения о количественном соотношении метилированных и деметилированных целевых CpG сайтов выбранных локусов генов, рассматриваемых как потенциальные маркеры психоэмоционального статуса человека. При этом заметно облегчается анализ данных NGS, поскольку количество анализируемых сайтов ограничено. Также возрастает количество возможных образцов, которые могут быть проанализированы в рамках одного запуска. Таким образом, предлагаемый подход направлен на повышение эффективности работы и снижение ее стоимости для конечного потребителя при анализе профиля метилирования генов, отвечающих за психоэмоциональные характеристики человека.

Заключение

Сконструирована и оптимизирована уникальная панель для анализа методом NGS профиля метилирования эпигенетических локусов, ассоциированных с психоэмоциональным статусом

человека. Показано, что данная панель позволяет прицельно оценивать статус метилирования целевых CpG сайтов. Преимуществом такого подхода является возможность исследования степени метилирования десятков и сотен локусов в ходе анализа одного образца, а также возможность тестирования сотен образцов в рамках одного запуска секвенатора. Разработанная панель является уникальным инструментом для использования как в научных целях, так и в практике здравоохранения и криминалистики.

Список использованных источников

1. Cell Types in Environmental Epigenetic Studies: Biological and Epidemiological Frameworks / K. A. Campbell [et al.] // *Curr Envir Health Rpt.* – 2020. – Vol. 7, № 3. – P. 185–197.
2. Molecules of Silence: Effects of Meditation on Gene Expression and Epigenetics / S. Venditti [et al.] // *Front Psychol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1–9.
3. Manchia, M. Targeting aggression in severe mental illness: The predictive role of genetic,

- epigenetic, and metabolomic markers / M. Manchia, V. Fanos // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2017. – Vol. 77. – P. 32–41.
4. Cross-Sectional Survey of Mental Health Risk Factors and Comparison of the Monoamine oxidase A Gene DNA Methylation Level in Different Mental Health Conditions among Oil-field Workers in Xinjiang, China / T. Jiang [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2020. – Vol. 17, № 1. – P. 149.
5. Pishva, E. DNA Methylation in Major Depressive Disorder / E. Pishva, B. P. F. Rutten, D. van den Hove // *Neuroepigenomics in Aging and Disease : Advances in Experimental Medicine and Biology* / Springer International Publishing ; ed. R. Delgado-Morales. – Cham, 2017. – P. 185–196.
6. Lobo, J. Targeted Methylation Analyses: From Bisulfite Treatment to Quantification / J. Lobo, A. J. M. Gillis, L. H. J. Looijenga // *Testicular Germ Cell Tumors: Methods and Protocols : Methods in Molecular Biology* / Springer US ; eds. A. Bagrodia, J. F. Amatruda. – New York, NY, 2021. – P. 167–180.
7. Alghanim, H. Development of DNA methylation markers for sperm, saliva and blood identification using pyrosequencing and qPCR/HRM / H. Alghanim, K. Balamurugan, B. McCord // *Analytical Biochemistry*. – 2020. – Vol. 611. – P. 1–10.
8. Galvão, A. Profiling DNA Methylation DNA methylation Genome-Wide in Single Cells / A. Galvão, G. Kelsey // *Epigenetic Reprogramming During Mouse Embryogenesis: Methods and Protocols : Methods in Molecular Biology* / Springer US ; eds. K. Ancelin, M. Borensztein. – New York, NY, 2021. – P. 221–240.
9. Molecular Diagnosis of Mosaic Overgrowth Syndromes Using a Custom-Designed Next-Generation Sequencing Panel / F. Chang [et al.] // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2017. – Vol. 19, № 4. – P. 613–624.
10. DNA methylation and substance-use risk: a prospective, genome-wide study spanning gestation to adolescence / C. a. M. Cecil [et al.] // *Translational Psychiatry*. – 2016. – Vol. 6, № 12. – P. 976.
11. Methylation of HPA axis related genes in men with hypersexual disorder / J. Jokinen [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2017. – Vol. 80. – P. 67–73.
12. Oxytocin Receptor (OXTR) Methylation and Cognition in Psychotic Disorders / T. B. Grove [et al.] // *CXP*. – 2016. – Vol. 2, № 3. – P. 151–160.
13. Interaction between oxytocin receptor DNA methylation and genotype is associated with risk of postpartum depression in women without depression in pregnancy / A. F. Bell [et al.] // *Front. Genet*. – 2015. – Vol. 6. – P. 1–10.
14. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene–childhood trauma interactions / T. Klengel [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 2013. – Vol. 16, № 1. – P. 33–41.
15. Childhood maltreatment and methylation of FK506 binding protein 5 gene (FKBP5) / A. R. Tyrka [et al.] // *Development and Psychopathology*. – 2015. – Vol. 27, № 4 Pt 2. – P. 1637–1645.
16. Neonatal DNA methylation and early-onset conduct problems: A genome-wide, prospective study / C. A. Cecil [et al.] // *Dev Psychopathol*. – 2018. – Vol. 30, № 2. – P. 383–97.
17. A review of DNA methylation in depression / D. Chen [et al.] // *Journal of Clinical Neuroscience*. – 2017. – Vol. 43. – P. 39–46.
18. Childhood Adversity and Epigenetic Modulation of the Leukocyte Glucocorticoid Receptor: Preliminary Findings in Healthy Adults / A. R. Tyrka [et al.] // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. e30148.
19. Brain-derived neurotrophic factor promoter methylation and cortical thickness in recurrent major depressive disorder / K.-S. Na [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 1–10.
20. Prenatal Exposure to Maternal Depressed Mood and the MTHFR C677T Variant Affect SLC6A4 Methylation in Infants at Birth / A. M. Devlin [et al.] // *PLOS ONE*. – 2010. – Vol. 5, № 8. – P. 1–10.
21. Association of SLC6A4 methylation with early adversity, characteristics and outcomes in depression / H.-J. Kang [et al.] // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2013. – Vol. 44. – P. 23–28.
22. SKA2 methylation is associated with decreased prefrontal cortical thickness and greater PTSD severity among trauma-exposed veterans / N. Sadeh [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2016. – Vol. 21, № 3. – P. 357–363.

23. A pilot study of differential brain activation to suicidal means and DNA methylation of CACNA1C gene in suicidal attempt patients / Y. J. Kim [et al.] // *Psychiatry Research*. – 2017. – Vol. 255. – P. 42–48.
24. CACNA1C hypermethylation is associated with bipolar disorder / A. Starnawska [et al.] // *Translational Psychiatry*. – 2016. – Vol. 6, № 6. – P. e831.
25. Stress-Related Methylation of the Catechol-O-Methyltransferase Val158 Allele Predicts Human Prefrontal Cognition and Activity / G. Ursini [et al.] // *J. Neurosci*. – 2011. – Vol. 31, № 18. – P. 6692–6698.
26. Differential Genetic and Epigenetic Regulation of catechol-O-methyltransferase is Associated with Impaired Fear Inhibition in Post-traumatic Stress Disorder / S. D. Norrholm [et al.] // *Front. Behav. Neurosci*. – 2013. – Vol. 7. – P. 1–10.
27. Placental HTR2A methylation is associated with infant neurobehavioral outcomes / A. G. Paquette [et al.] // *Epigenetics*. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. 796–801.
28. mRNA Expression and DNA Methylation Analysis of Serotonin Receptor 2A (HTR2A) in the Human Schizophrenic Brain / S.-Y. Cheah [et al.] // *Genes*. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 14.
29. Homo sapiens (ID 51)-Genome-NCBI [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Homo+sapiens>. – Дата доступа: 08.10.2020.
30. Sequence Manipulation Suite [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.bioinformatics.org/sms2/cpg_islands.html. – Дата доступа: 30.09.2020.
31. iMETHYL Database [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://imethyl.iwate-megabank.org/index.html>. – Дата доступа: 30.09.2020.
32. Primer3 (version 0.4.0) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>. – Дата доступа: 30.09.2020.
33. MethPrimer [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer.cgi>. – Дата доступа: 30.09.2020.
34. OligoAnalyzer Tool - primer analysis [Electronic resource] / Integrated DNA Technologies. – Mode of access: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>. – Date of access: 30.09.2020.
35. DNA folding form [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/dna-folding-form>. – Дата доступа: 30.09.2020.

A. S. Babenko¹, K. A. Mosse², N. G. Sedlyar², R. S. Shulinsky², I. B. Mosse²

PANEL DEVELOPMENT FOR THE METHYLATION PROFILE ANALYSIS OF THE TARGET EPIGENETIC LOCI ASSOCIATED WITH HUMAN PSYCHOEMOTIONAL STATUS

¹Belarusian State Medical University
83, Dzerzhinsky Ave., 220116 Minsk, the Republic of Belarus
e-mail: labmdbt@gmail.com

²State Scientific Institution
“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”
27, Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus
e-mail: I.Mosse@igc.by

In order to analyze a methylation profile of target epigenetic loci associated with the psychoemotional status of a person using the NGS method, a unique panel has been developed. The panel includes 17 pairs of oligonucleotide primers for synthesizing 12 gene fragments containing target methylation sites. NGS libraries were prepared using the QIAseq Methyl Library Kit (Qiagen). The panel was tested on 24 control DNA samples. It was demonstrated that the designed panel allows determining the quantitative ratio of methylated and demethylated target CpG sites. This approach is advantageous as it allows studying a methylation degree of dozens and hundreds of loci during the analysis of one sample, as well as testing of hundreds of samples within a single sequencer run. The developed panel can be used for scientific purposes and translated into practice by healthcare and forensic science.

Keywords: methylation of epigenes, high-throughput sequencing, bisulfite conversion, psychoemotional status.

Дата поступления статьи: 23 сентября 2020 г.

Е. В. Кобец¹, В. Алекна², Э. В. Руденко³, М. Тамулайгене², Е. В. Руденко⁴, М. Д. Амелянович¹,
О. Ю. Самоховец⁴, П. М. Морозик¹

ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНТИРЕЗОРБТИВНОЙ ТЕРАПИИ ПОСТМЕНОПАУЗАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА БИСФОСФОНАТАМИ

¹Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

e-mail: P.Marozik@igc.by

²Вильнюсский университет
Литовская Республика, 01513, г. Вильнюс, ул. Университетская, 3

³Белорусский государственный медицинский университет
Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83

⁴Белорусская медицинская академия последипломного образования
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, к. 3

Остеопороз относится к системным метаболическим заболеваниям костной ткани, требующим долгосрочного лечения, направленного на повышение прочности костей и снижение риска переломов. Бисфосфонаты являются наиболее часто применяемыми препаратами для лечения остеопороза, однако у 30–50% пациентов лечение неэффективно, главным образом из-за индивидуальной устойчивости. В настоящей работе проведен анализ ассоциации полиморфных вариантов генов *SOST*, *PTH*, *FDPS*, *GGPS1*, *MTHFR* с эффективностью терапии бисфосфонатами пациентов с постменопаузальным остеопорозом. По результатам исследования выявлены генетические маркеры и их комбинации, оказывающие наибольший вклад в устойчивость к лечению. Показано, что сочетание неблагоприятных аллелей по вариантам генов *FDPS* rs2297480 и *GGPS1* rs10925503 многократно увеличивает риск неблагоприятного ответа на лечение (OR = 9,0; 95% CI 1,6–51,8; P = 0,015). Результаты исследования свидетельствуют о важной прогностической роли выявленных маркеров при назначении антирезорбтивной терапии остеопороза.

Ключевые слова: остеопороз, фармакогенетика, бисфосфонаты, генетическая предрасположенность, антирезорбтивная терапия.

Введение

Фармакогенетика играет все более важную роль в персонализированной медицине, целью которой в том числе является выявление генетических маркеров, лежащих в основе ответа на лекарственную терапию. Это позволяет повысить эффективность лечения, подобрать оптимальную дозу препарата и избежать побочных эффектов. За последние годы сделан существенный прорыв в этой области и выявлено более 200 лекарственных препаратов, перед назначением которых рекомендовано проводить генетические тесты [1]. На сегодняшний день в этом списке отсутствуют препараты для антирезорбтивной терапии остеопороза.

Остеопороз опасен низкотравматическими костными переломами, вызванными хрупкостью костей. Они часто приводят к инвалидизации и смерти пациентов, росту общей заболеваемости, огромным социальным и медицинским расходам во всем мире [2]. Лечение пациентов с остеопорозом требует длительных временных затрат, а оценка эффективности терапии, основанная на динамике минеральной плотности костной ткани (МПК), проводится не ранее, чем через год от начала приема препарата. Для лечения остеопороза применяется ряд эффективных медикаментозных препаратов, которые при длительном приеме обеспечивают увеличение костной массы и снижение риска

остеопоротических переломов. Одними из наиболее широко применяемых средств для лечения остеопороза во всем мире являются препараты, угнетающие костную резорбцию (антирезорбенты) — бисфосфонаты (БФ) и деносумаб. Все эти лекарственные средства эффективны для снижения риска остеопоротических переломов позвонков, в то время как алендронат, ризедронат, золедронат и деносумаб также снижают риск невертебральных переломов, включая переломы бедра [3].

Несмотря на то, что БФ являются наиболее часто используемыми препаратами для лечения остеопороза и ряда других костных заболеваний [4], у некоторых пациентов эта терапия неэффективна, вызывает различные побочные эффекты и осложнения. Длительное применение БФ может привести к таким нежелательным эффектам, как остеонекроз челюсти, атипичные переломы бедренной кости, фибрилляция предсердий и заболевания пищевода [5]. По разным данным, до 53% пациентов с остеопорозом плохо отвечают на лечение БФ [6]. Кроме низкой приверженности к лечению (особенно пероральными БФ), ответ на терапию БФ во многом обусловлен генетическими факторами. Выявление генов, которые могут служить предикторами эффективности терапии БФ, является сложной и многообещающей задачей при выборе индивидуальной терапии у пациентов с остеопорозом. В ряде исследований были выявлены варианты генов, которые могут иметь прогностическое значение при лечении остеопороза [7–10]. Однако эти результаты должны быть подтверждены дальнейшими исследованиями на более широкой популяции и в других этнических группах. Американское Общество по изучению костной ткани и минерального обмена (ASBMR) разработало специальный план по повышению эффективности терапии БФ и снижению риска осложнений, основным этапом которого является увеличение активности исследований в области фармакогенетики остеопороза для выявления информативных генетических факторов, лежащих в основе ответа на этот класс антирезорбентов [11].

Целью настоящего исследования является анализ ассоциации вариантов генов, участвующих в метаболизме аминокислотобисфосфонатов

и костном ремоделировании, с ответом на лечение. Однонуклеотидные варианты генов (single nucleotide variants, SNV) были отобраны исходя из их участия в регуляции процессов костного ремоделирования и метаболизме аминокислотобисфосфонатов. Ген *SOST* (склеростин) является модулятором пути передачи Wnt-сигналов, играющих важную роль в формировании кости. Склеростин подавляет активность остеобластов путем связывания с корцептором LRP5/6, и ранее было показано, что он связан с ответом на лечение алендронатом у китайских женщин [7]. Гены *FDPS* (фарнезил-дифосфат синтаза) и *GGPS* (геранилгеранил-дифосфат синтаза) являются важными регуляторами внутриклеточного мевалонатного пути, их эффекты ингибируются БФ [7, 8]. Гены *PTH* (паратгормон) и *MTHFR* (метилентетрагидрофолатредуктаза) были включены в исследование из-за их важной роли в костном ремоделировании [10, 12].

Материалы и методы

Характеристика исследуемой группы

В исследовании участвовали женщины с постменопаузальным остеопорозом, установленным в соответствии с диагностическими критериями ВОЗ [13], которым проводили лечение аминокислотобисфосфонатами (алендронат, ризедронат, ибандронат или золедронат) не менее 12 месяцев. Все пациенты также принимали препараты кальция и витамина D. Забор биологического материала осуществлялся в Минском городском центре профилактики остеопороза и костно-мышечных заболеваний (Минск, Беларусь) и в Национальном центре остеопороза (Вильнюс, Литва). Критериями исключения были: приверженность к лечению менее 80%, наличие метаболических заболеваний костей (болезни Педжета, остеомалация), заболеваний, влияющих на метаболизм костной ткани (таких как гипертиреоз, почечная недостаточность, болезнь Крона и ревматоидный артрит), злокачественных опухолей различной локализации, применение любых препаратов, влияющих на МПК (глюкокортикоидная терапия, антикоагулянты). Все пациенты подписали письменное информированное согласие на участие в исследовании после того, как были

полностью проинформированы о характере исследования в соответствии с Хельсинкской декларацией (в редакции 2013 г.). Протокол исследования был одобрен комитетом по этике исследований Белорусской медицинской академии последипломного образования, локальным этическим комитетом 1-й Минской городской больницы и Литовским региональным комитетом по этике биомедицинских исследований.

Инструментальные методы обследования МПК оценивали методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (аппарат GE Lunar, США). Калибровка оборудования выполнялась ежедневно с использованием стандартного фантома позвоночника, предоставленного производителем. МПК в 1–4 позвонках поясничного отдела позвоночника (LS, L1-L4) и шейки бедра (FN) измеряли на одном и том же аппарате в начале исследования и минимум через 12 месяцев лечения. Ответ на терапию БФ оценивали в соответствии с динамикой МПК в L1-L4. Увеличение уровня МПК, превышающее наименее значимое изменение (least significant change, LSC), рассчитанное с использованием стандартизованных методов и равное 3,1 [14], считалось приемлемым ответом на терапию, а снижение МПК рассматривалось как неэффективность лечения. В соответствии с этим группы были классифицированы как пациенты с благоприятным ответом на лечение (положительная динамика, БФ+) или неблагоприятным ответом (отрицательная динамика, БФ–). Пациенты с изменением МПК, не превышающим показатель LSC, из исследования были исключены.

Генетические исследования

В качестве биологического материала для генотипирования использовали тотальную геномную ДНК, выделенную из Buccal epithelial cells с помощью коммерческих наборов Нуклеосорб-А (ОДО «Праймтех», Беларусь) согласно инструкции производителя. Количество ДНК определяли на флуориметре Qubit 2 (Thermo Scientific, США), качество и чистоту — на спектрофотометре NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, США). Информация о полиморфных вариантах генов *SOST*, *PTH*, *FDPS*, *GGPS1* и *MTHFR* была получена из базы данных Entrez Gene (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene).

Полиморфные варианты генов для исследования были отобраны по следующим критериям: участие в костном или бисфосфонатном метаболизме, частота минорного аллеля выше 10% в европейской популяции. Отобранные маркеры (rs1234612, rs7125774, rs2297480, rs10925503, rs1801133 и rs1801131) анализировали с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с зондами TaqMan (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя [15, 16]. Для детекции флуоресценции, а также первичной обработки результатов использовали программное обеспечение CFX Manager 3.1 прибора CFX96 (BIO-RAD, США). Во время каждой постановки ПЦР применяли положительный и отрицательный контроли, в целях контроля качества некоторые образцы, отобранные в случайном порядке, анализировали повторно.

Статистический анализ

Результаты представлены в виде медианы (25%, 75% межквартильный размах) и сравнивались с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Динамика МПК (в %) рассчитывалась как (уровень МПК после лечения - исходная МПК) / исходная МПК × 100%. Динамика МПК (% в год) представляет собой среднегодовое процентное изменение по сравнению с исходным уровнем. На основе определенных частот генотипов и с помощью критерия хи-квадрат Пирсона (χ^2) было оценено равновесие Харди-Вайнберга для выявления ошибок генотипирования. Риск отсутствия ответа на лечение оценивался с использованием отношения шансов с 95% доверительным интервалом (ДИ) и рассчитывался по сравнению с референсным (наиболее распространенным гомозиготным) генотипом. Для анализа применяли общую модель наследования; в случае, когда частота минорного аллеля (MAF) была ниже 0,1%, использовали доминантную модель наследования. Модели логистической регрессии использовались для оценки разницы между группами БФ+ и БФ–. Аллельные комбинации были сконструированы и проанализированы на предмет связи с ответом на лечение с помощью модели GLM, теста отношения правдоподобия и алгоритма ожидания-максимизации (EM) в R-пакете

«SNPassoc» (v.1.9-2). Все статистические анализы проводились с использованием языка программирования R (в свободном доступе на <http://r-project.org>). Различия между группами считали статистически значимыми при $P < 0,05$, скорректированном с поправкой на множественное тестирование с использованием коэффициента ложного обнаружения (FDR) по методу Бенджамини-Хохберга ($n = 6$).

Результаты и обсуждение

В ходе исследования было обследовано 357 женщин с постменопаузальным остеопорозом с лечением БФ, из них 156 человек были исключены, так как динамика МПК не превышала LSC, а приверженность составляла менее 80%; 201 человек (73 — белорусы, 128 — литовцы) были включены в исследование согласно критериям включения. Клинические характеристики пациентов представлены в таблице 1. Средний интервал между измерениями МПК составил 2,1 года (1–2 года — 56,7%; 2–3 года — 37,8%; более 3 лет — 5,5% женщин). Женщины, получавшие аминобисфосфонаты, использовали алендронат ($n = 47$), ризедронат ($n = 34$), ибандронат ($n = 103$) и золендронат ($n = 17$). Не было обнаружено статистически значимой разницы между группами

с благоприятным и неблагоприятным ответом в зависимости от типа используемых аминобисфосфонатов (табл. 1).

В исследуемой когорте из 201 пациентки с постменопаузальным остеопорозом, включенной в исследование, у 93 женщин в анамнезе встречались низкоэнергетические переломы. Средний возраст всех обследованных женщин составил 64,0 (60,0; 70,0) года, возраст наступления менопаузы — 50,0 (48,0; 52,0) лет, средние начальные значения МПК поясничного отдела позвоночника и шейки бедра составили 0,85 (0,79; 0,91) и 0,79 (0,71; 0,85) г/см² соответственно. Не было выявлено значимых различий в возрасте, возрасте наступления менопаузы, весе, росте, ИМТ и исходных уровнях МПК между исследуемыми группами ($P > 0,01$ во всех случаях).

По литературным данным, несмотря на высокую эффективность антирезорбтивной терапии бисфосфонатами, у 26–53% пациентов с остеопорозом эти препараты малоэффективны [6]. В нашем исследовании резистентность к БФ была выявлена у 79 женщин (39,3%).

Распределение частот генотипов по вариантам генов *SOST*, *PTH*, *FDPS*, *GGPS1* и *MTHFR* у пациентов с остеопорозом представлено в таблице 2.

Таблица 1

Клинические характеристики пациентов, включенных в исследование

Клинические характеристики исследуемых групп	Группа БФ+	Группа БФ–	<i>P</i>
<i>n</i> (%)	122 (60,7%)	79 (39,3%)	–
Возраст, лет	65,0 (60,0; 70,9)	64,0 (59,0; 68,0)	0,15
Возраст наступления менопаузы, лет	50,0 (48,0; 52,0)	50,0 (48,0; 53,0)	0,95
Вес, кг	65,0 (60,0; 72,8)	62,0 (58,0; 71,0)	0,41
Рост, см	160,0 (156,0; 164,0)	159,0 (155,0; 163,5)	0,80
Индекс массы тела (ИМТ)	25,6 (22,7; 28,7)	25,2 (22,5; 28,5)	0,83
Аминобисфосфонат, <i>n</i> (%)	Алендронат	15 (31,9)	0,23
	Ризедронат	21 (61,8)	0,89
	Ибандронат	57 (55,3)	0,11
	Золендронат	12 (70,6)	0,37
Базовая МПК, г/см ²	0,85 (0,76; 0,90)	0,86 (0,83; 0,92)	0,11
МПК после лечения, г/см ²	0,91 (0,82; 0,97)	0,82 (0,78; 0,86)	$8,6 \times 10^{-6}$
Динамика МПК, %	6,0 (4,4; 8,4)	-3,7 (-4,3; -3,4)	$2,2 \times 10^{-12}$
Динамика МПК, % в год	3,4 (2,7; 5,1)	-2,3 (-3,4; -1,8)	$2,2 \times 10^{-12}$

Таблица 2

Распределение частот генотипов вариантов генов *SOST*, *PTH*, *FDPS*, *GGPS1* и *MTHFR* в группах с различным ответом на бисфосфонатную терапию

Ген, вариант	Генотип	БФ(-), n = 79		БФ(+), n = 122		OR (95% CI)	P _{FDR}
		%	HWE	%	HWE		
<i>SOST</i> rs1234612	T/T	63,3	0,33	42,6	0,84	1	0,024
	C/T	30,4		46,7		0,4 (0,2–0,8)	
	C/C	6,3		10,7		0,4 (0,1–1,2)	
<i>PTH</i> rs7125774	T/T	50,6	0,78	27,1	0,28	1	0,0027
	C/T	43,0		54,9		0,4 (0,2–0,8)	
	C/C	6,4		18,0		0,2 (0,1–0,6)	
<i>FDPS</i> rs2297480	T/T	36,7	0,34	75,4	0,69	1	1,3×10 ⁻⁶
	T/G	52,2		23,7		4,5 (2,4–8,7)	
	G/G	11,1		0,8		29,3 (3,6–241,0)	
<i>GGPS1</i> rs10925503	C/C	69,6	0,69	86,9	0,12	1	0,006
	C/T+T/T	30,4		13,1		2,9 (1,4–5,9)	
<i>MTHFR</i> rs1801133	C/C	32,9	0,11	42,6	0,18	1	0,17
	C/T	40,5		41,0		1,3 (0,7–2,4)	
	T/T	26,6		16,4		2,1 (0,9–4,6)	
<i>MTHFR</i> rs1801131	A/A	31,6	0,26	48,4	0,21	1	0,024
	A/C	43,0		38,5		1,7 (0,9–3,3)	
	C/C	25,4		13,1		2,9 (1,3–6,6)	

Частоты генотипов всех проанализированных вариантов генов существенно не отличались от ожидаемого равновесия Харди-Вайнберга. Сравнивая частоты генотипов между исследуемыми группами, после коррекции FDR наблюдались статистически значимые различия (табл. 2).

Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что гетерозиготный генотип C/T варианта *SOST* rs1234612 предрасполагает к благоприятному ответу на терапию БФ (OR = 0,4; 95% CI 0,2–0,8; P = 0,024). Поскольку частота минорного C-аллеля *SOST* rs1234612 была низкой, распределение генотипов по этому локусу проанализировали с использованием доминантной модели наследования. Анализ показал, что в объединенной группе носителей генотипов C/C+C/T гена *SOST* гораздо больше чувствительных к БФ пациентов по сравнению с носителями генотипа T/T (OR = 0,4; 95% CI 0,2–0,8; P = 0,004).

Частота генотипа C/C *PTH* rs7125774 статистически значимо выше у пациентов с благо-

приятным ответом на лечение (OR = 0,2; 95% CI 0,1–0,6; P = 0,0027), в то время как для генотипа T/T наблюдалась обратная зависимость.

Генотип G/G *FDPS* rs2297480 гораздо чаще встречается в группе с неблагоприятным ответом на антирезорбтивную терапию (OR = 29,3; 95% CI 3,6–241,0; P = 1,3×10⁻⁶). Для этого маркера была выявлена наибольшая ассоциация с резистентностью к бисфосфонатной терапии.

Для маркера *GGPS1* rs10925503 использование общей модели наследования было неприменимо, так как частота минорного аллеля T была низкой. Поэтому в исследовании носители генотипов C/T и T/T гена *GGPS1* были объединены в одну группу и сравнивались с носителями генотипа C/C (доминантная модель наследования). Данные показывают, что частота генотипов C/T+T/T статистически значимо выше в группе пациентов, устойчивых к БФ (OR = 2,9; 95% CI 1,4–5,8; P = 0,003), что свидетельствует о возможном неблагоприятном вкладе аллеля T в ответ на антирезорбтивную терапию.

Варианты rs1801133 и rs1801131 гена *MTHFR* ассоциированы со сниженной активностью фермента метилентетрагидрофолатредуктазы и гипергомоцистеинемией. В результате исследований только для варианта rs1801131 была выявлена статистически значимая ассоциация генотипа C/C с неблагоприятным ответом на лечение остеопороза БФ (OR = 2,9; 95% CI 1,3–6,6; P = 0,024).

Таким образом, по результатам анализа ассоциации одиночных полиморфных вариантов генов с эффективностью БФ терапии было выявлено пять информативных генетических маркеров: *SOST* rs1234612, *PTH* rs7125774, *FDPS* rs2297480, *GGPS1* rs10925503, *MTHFR* rs1801131.

В дальнейшей работе была проанализирована ассоциация аллельных комбинаций вариантов генов *SOST*, *PTH*, *FDPS* и *GGPS1* с ответом на терапию БФ (рис. 1). Анализ аллельных комбинаций позволяет повысить статистическую мощность исследования и выявить потенциальные ген-генные взаимодействия. Варианты гена *MTHFR* как компоненты отдельной генной сети анализировались отдельно.

По результатам генотипирования было выявлено шесть аллельных комбинаций с общей частотой более 5% в обеих исследуемых группах, которые встречались у 85,2% всех пациентов. Выявленные статистически значимые различия между анализируемыми группами в глобальном распределении аллельных комбинаций (global P < 0,0001) позволяют предположить ассоциацию риска неблагоприятного ответа на лечение БФ с анализируемыми маркерами. Наиболее распространенной аллельной комбинацией являлась T-T-T-C (общая частота в обеих группах составила 32,5%), и она встречалась с практически одинаковой частотой в обеих группах пациентов (33,3% в группе БФ+ и 30,7% в группе БФ–; P = 0,63). Это можно объяснить тем, что данная комбинация аллелей состоит из двух аллелей, предрасполагающих к устойчивости, и стольких же аллелей, предрасполагающих к чувствительности к терапии БФ. Частота комбинации C-C-T-C, состоящей из трех аллелей, предрасполагающих к благоприятному ответу на лечение БФ (общая частота 12,2%), была значительно выше в группе БФ+ по сравнению с группой БФ– (15,4% и 4,1% соответственно;

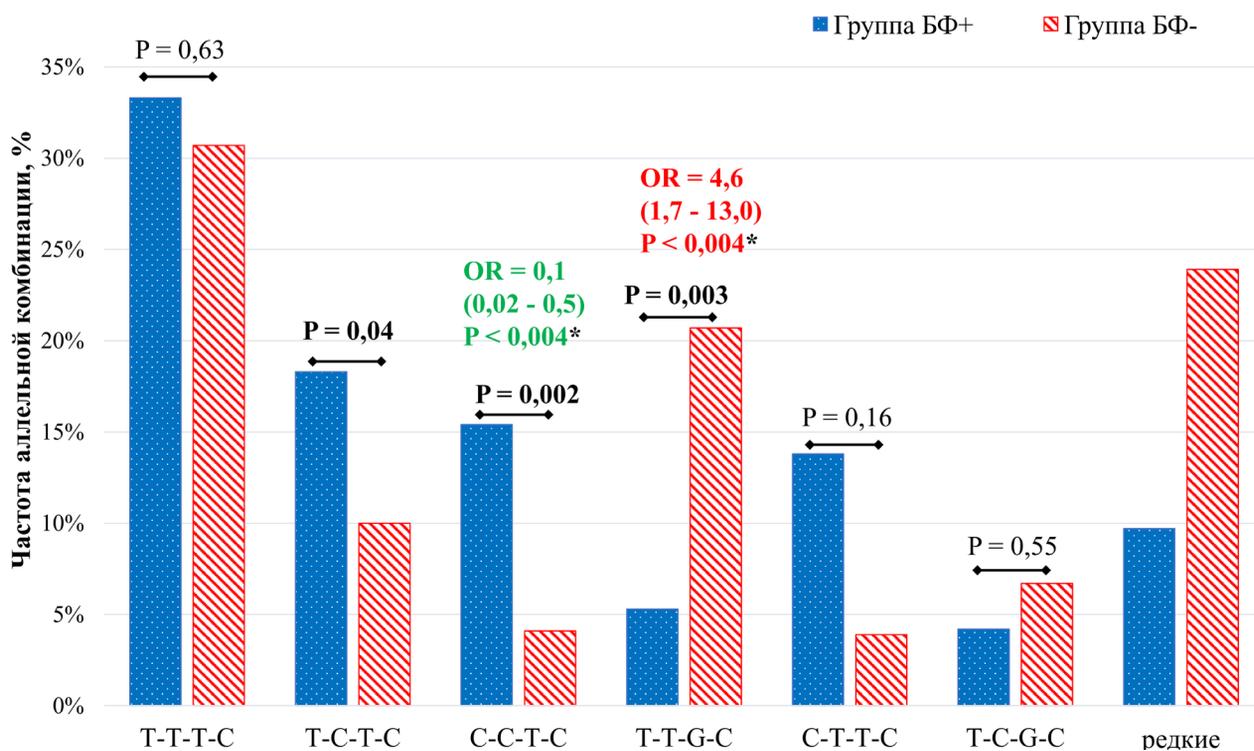


Рис. 1. Сравнение частот вероятных аллельных комбинаций, сгенерированных из вариантов генов *SOST*, *PTH*, *FDPS* и *GGPS1*, между исследуемыми группами
* — по сравнению с референсной комбинацией

$P = 0,004$). Для носителей этой комбинации аллелей вероятность благоприятного ответа на терапию БФ была статистически значимо выше по сравнению с контрольной комбинацией ($OR = 0,1$; 95% CI 0,02–0,5; $P = 0,004$). Напротив, для носителей комбинации Т-Т-С (всего 11,7%; 5,3% в группе БФ+; 20,7% в группе БФ–; $P = 0,004$), построенной на основе трех аллелей устойчивости к терапии БФ, риск неблагоприятного ответа на лечение был повышен по сравнению с референсной комбинацией ($OR = 4,6$; 95% CI 1,7–13,0; $P = 0,004$). Общая частота аллельной комбинации, состоящей из всех четырех неблагоприятных аллельных комбинаций, была ниже 0,05% в обеих группах.

Таким образом, отдельно варианты *SOST* rs1234612, *PTH* rs7125774, *FDPS* rs2297480, *GGPSI* rs10925503 в определенной степени ассоциированы с эффективностью антирезорбтивной терапии, однако более выраженная ассоциация была выявлена в ходе комплексного анализа аллельных комбинаций.

Отдельный интерес представляет анализ аллельных комбинаций по генам, участвующим в отдельных генных сетях. На рисунке 2 представлены результаты анализа аллельных комбинаций между вариантами *FDPS*

rs2297480, *GGPSI* rs10925503 и *MTHFR* rs1801133 и rs1801131.

Согласно результатам комплексного анализа полиморфных вариантов *FDPS* rs2297480 и *GGPSI* rs10925503, наиболее распространенной является аллельная комбинация Т-С (общая частота — 68,9%, принята за референсную), которая значительно преобладает у пациентов с благоприятным ответом на лечение БФ (80,6% в группе БФ+, 49,0% в группе БФ–; $P = 5,5 \times 10^{-6}$). Для носителей комбинаций аллелей G-С, Т-Т и G-Т риск неблагоприятного ответа на лечение БФ был значительно выше по сравнению с референсной комбинацией ($OR = 5,2$; 2,8 и 9,0 соответственно; $P < 0,015$ во всех случаях). Количество носителей таких аллельных комбинаций в группе БФ+ было гораздо меньше по сравнению с группой пациентов, устойчивых к терапии. Особый интерес представляют тот факт, что сочетание неблагоприятных аллелей многократно увеличивает риск неблагоприятного ответа на лечение БФ. В то же время при комплексном анализе вариантов rs1801133 и rs1801131 гена *MTHFR* у носителей аллельной комбинации Т-С риск устойчивости к лечению БФ существенно возрастал по сравнению с носителями референсной комбинации С-А ($OR = 3,6$; 95% CI 1,7–7,3; $P = 0,0008$, рис. 2).

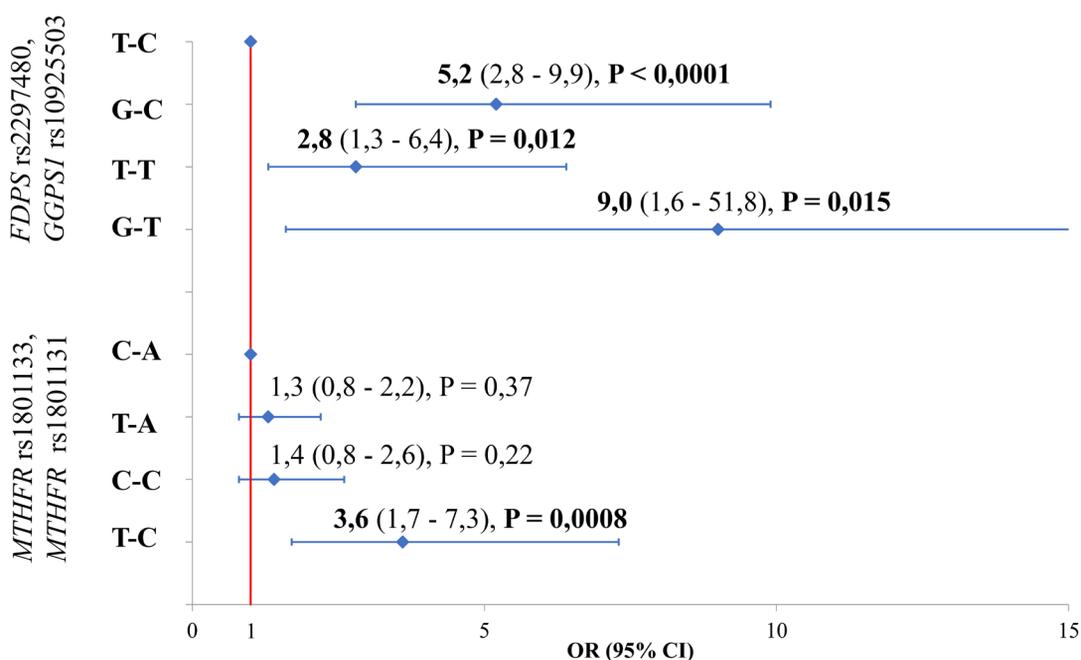


Рис. 2. Сравнение распространенности частот вероятных аллельных комбинаций, сгенерированных из вариантов генов *FDPS*, *GGPSI* и *MTHFR*, между исследуемыми группами чувствительных и устойчивых к терапии бисфосфонатами пациентов

Таким образом, результаты исследования позволили установить связь между генетическими вариантами *SOST* rs1234612, *PTH* rs7125774, *FDPS* rs2297480, *GGPSI* rs10925503, *MTHFR* rs1801131 и ответом на антирезорбтивное лечение постменопаузального остеопороза. Ген *SOST* кодирует белок склеростин, ингибитор Wnt-канонического пути передачи сигнала. Вариант *SOST* rs1234612 расположен в области сайта связывания фактора транскрипции и потенциально способен влиять на уровень экспрессии склеростина, а также на формирование кости и уровень МПК. Вариант rs7125774 гена *PTH* участвует в регуляции экспрессии паратгормона и, вероятно, за счет этого влияет на эффективность бисфосфонатной терапии, хотя фактические молекулярные механизмы полностью не установлены. Продукты генов *FDPS* и *GGPSI* являются важными ферментами биосинтеза изопреноидов и служат первичными мишенями для БФ. Аминобисфосфонаты ингибируют активность фарнезилпирофосфатсинтазы в мевалонатном пути, тем самым изменяя изопренилирование белков, связывающих гуанозинтрифосфат [17]. Предположительно, проанализированные локусы способны влиять на транскрипцию генов *FDPS* или *GGPSI*, что в свою очередь может приводить к изменению концентрации соответствующих ферментов в сыворотке крови и, как следствие, снизить эффективность лечения.

Результаты исследований могут быть использованы для прогнозирования вероятного ответа на лечение остеопороза БФ по результатам генетического исследования; в случае выявления большого числа неблагоприятных вариантов возможен выбор альтернативного метода лечения. Принимая во внимание, что вклад генетических факторов в эффективность антирезорбтивной терапии может составлять до 95% [18], полученные результаты подчеркивают важность фармакогенетического подхода при выборе лекарственных средств.

Заключение

В исследовании впервые показана роль идентифицированных вариантов генов *SOST* rs1234612, *PTH* rs7125774, *FDPS* rs2297480, *GGPSI* rs10925503, *MTHFR* rs1801131 и их аллельных комбинаций в оценке индивидуальной

резистентности или чувствительности к бисфосфонатной терапии постменопаузального остеопороза. Исследования в области фармакогенетики остеопороза очень важны для целей персонализированной медицины, так как позволяют заблаговременно прогнозировать эффективность антирезорбтивной терапии.

Исследование выполнено в рамках совместной программы белорусско-литовского научного сотрудничества (грант №Б17ЛИТГ-008 Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь), а также в рамках задания 6.3 «Молекулярно-генетические аспекты костно-мышечной патологии» научно-технической программы Союзного государства «ДНК-идентификация».

Список использованных источников

1. Varnai, R. Pharmacogenomic biomarker information differences between drug labels in the United States and Hungary: implementation from medical practitioner view / R. Varnai [et al.] // *Pharmacogenomics J.* – 2020. – Vol. 20. – P. 380–387.
2. Eisman, J. A. Making the first fracture the last fracture: ASBMR task force report on secondary fracture prevention / J. A. Eisman [et al.] // *Journal of bone and mineral research.* – 2012. – Vol. 10, № 27. – P. 2039–2046.
3. Reginster, J. Y. Antifracture efficacy of currently available therapies for postmenopausal osteoporosis / J. Y. Reginster // *Drugs.* – 2011. – Vol. 1, № 71. – P. 65–78.
4. Favus, M. J. Bisphosphonates for osteoporosis / M. J. Favus // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 363. – P. 2027–2035.
5. Kennel, K. A. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management / K. A. Kennel, M. T. Drake // *Mayo Clinic proceedings.* – 2009. – Vol. 7, № 84. – P. 632–637.
6. Diez-Perez, A. Treatment failure in osteoporosis / A. Diez-Perez [et al.] // *Osteoporosis international.* – 2012. – Vol. 12, № 23. – P. 2769–2774.
7. Chubachi, S. Polymorphism of LRP5 gene and emphysema severity are associated with osteoporosis in Japanese patients with or at risk for COPD / S. Chubachi [et al.] // *Respirology.* – 2015. – Vol. 2, № 20. — P. 286–295.

8. Han, L. W. Association Between Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase Gene Polymorphisms and Bone Phenotypes and Response to Alendronate Treatment in Chinese Osteoporotic Women / L. W. Han [et al.] // Chinese medical sciences journal. – 2016. – Vol. 1, № 31. – P. 8–16.
9. Olmos, J. M. Common allelic variants of the farnesyl diphosphate synthase gene influence the response of osteoporotic women to bisphosphonates / J. M Olmos [et al.] // Pharmacogenomics J. – 2012. – Vol. 12. – P. 227–232.
10. Lima, C. A., Polymorphisms in key bone modulator cytokines genes influence bisphosphonates therapy in postmenopausal women / C. A. Lima [et al.] // Inflammopharmacology. – 2017. – Vol. 2, № 25. – P. 191–201.
11. Khosla, J. A. Addressing the crisis in the treatment of osteoporosis: A path forward / J. A. Khosla [et al.] // J. Bone Miner. Res. – 2017. – Vol. 32. – P. 424–430.
12. Brambila-Tapia, A. J. MTHFR C677T, MTHFR A1298C, and OPG A163G polymorphisms in Mexican patients with rheumatoid arthritis and osteoporosis / A. J. Brambila-Tapia [et al.] // Dis. Markers. – 2012. – Vol. 2, № 32. – P. 109–114.
13. Cosman, F. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis / F. Cosman [et al.] // Osteoporosis international. – 2014. – Vol. 10, № 25. – P. 2359–2381.
14. Baim, S. Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Position Development Conference / S. Baim [et al.] // Journal of clinical densitometry. – 2008. – Vol. 1, № 11. – P. 75–91.
15. Морозик, П. М. Анализ генетической предрасположенности к костным переломам у спортсменов / П. М. Морозик [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. – 2016. – Т. 21. – С. 81–88.
16. Руденко, Е. В. Ассоциация полиморфных вариантов гена рецептора витамина D с показателями минеральной плотности костной ткани у женщин в менопаузе / Е. В. Руденко [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 192–201.
17. Marini, F. Modulatory effect of farnesyl pyrophosphate synthase (FDPS) rs2297480 polymorphism on the response to long-term amino-bisphosphonate treatment in postmenopausal osteoporosis / F. Marini [et al.] // Current medical research and opinion. – 2008. – Vol. 9, № 24. – P. 2609–2615.
18. Moayyeri, A. Genetic determinants of heel bone properties: genome-wide association meta-analysis and replication in the GEFOS/GENOMOS consortium / A. Moayyeri [et al.] // Human molecular genetics. – 2014. – Vol. 11, № 23. – P. 3054–3068.

E. V. Kobets¹, V. Alekna², E. V. Rudenko³, M. Tamulaitiene², A. V. Rudenko⁴, M. D. Ameliyanovich¹,
V. Yu. Samokhovec⁴, P. M. Marozik¹

PHARMACOGENETIC ASPECTS OF ANTIRESORPTIVE THERAPY OF POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS WITH BISPHOSPHONATES

¹State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27, Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: P.Marozik@igc.by

²Vilnius University

3, Universitetskaya St., 01513 Vilnius, Lithuania

³Belarusian State Medical University

83 Dzerzhinsky Ave., 220116 Minsk, the Republic of Belarus

⁴Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education

3/3 P. Brovki Ave., 220013 Minsk, the Republic of Belarus

Osteoporosis is a systemic metabolic disease of bone tissue that requires long-term treatment targeted at strengthening of bones and reducing the risk of fractures. Bisphosphonates are the most commonly prescribed medications for osteoporosis treatment. However, therapy turns out to be ineffective in 30-50% of patients, mostly due to individual resistance. This study aimed to analyze an association of polymorphic variants of *SOST*, *PTH*, *FDPS*, *GGPSI*, and *MTHFR* genes with bisphosphonate therapy efficacy in patients with postmenopausal osteoporosis. Based on the study results, genetic markers and their combinations that provide the greatest contribution to therapy resistance were identified. It was demonstrated that a combination of unfavorable alleles by *FDPS* rs2297480 and *GGPSI* rs10925503 gene variants significantly increases the risk of a negative response to therapy (OR = 9.0; 95% CI 1.6–51.8; P = 0.015). The study results suggest that a prognostic role of identified markers is essential when prescribing antiresorptive osteoporosis therapy.

Keywords: osteoporosis, pharmacogenetics, bisphosphonates, genetic predisposition, antiresorptive therapy.

Дата поступления статьи: 15 сентября 2020 г.

А. В. Шпак¹, Е. Э. Хейдорова¹, А. И. Ларченко¹, М. Е. Никифоров¹, А. Казарян², Г. Папов²,
В. В. Демянчик³

КРИПТИЧЕСКИЙ ВИДОВОЙ КОМПЛЕКС РУКОКРЫЛЫХ *PLECOTUS AURITUS/AUSTRIACUS* В БЕЛАРУСИ: ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКИЕ ПАТТЕРНЫ

¹Государственное научно-производственное объединение
«Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: shpak.dvergr@gmail.com

²Ереванский государственный университет
Армения, 0025, г. Ереван, ул. А. Манугяна, 1

³Полесский аграрно-экологический институт Национальной академии наук Беларуси
Республика Беларусь, 224020, г. Брест, ул. Московская, 204/1-1

В работе представлены результаты филогеографического анализа криптического видового комплекса *Pl. auritus/austriacus*. Парсимониальный анализ гаплотипов по трем митохондриальным маркерам (*D-loop*, *COI*, *ND1*) показал, что постгляциальная реколонизация Западной Европы бурым ушаном осуществлялась из двух рефугиумов — «иберийского» и «апеннинского», в составе представителей двух гаплотипических линий, различающихся по времени образования. Молекулярно-генетической верификацией видовой определения *Pl. austriacus* подтверждено обитание данного вида в Беларуси. Для серого ушана источником пост-гляциальной реколонизации Европы являлся только «иберийский» рефугиум, в то время как популяция из «балканского» рефугиума не проявила тенденции к широкой экспансии.

Ключевые слова: рукокрылые, бурый ушан, серый ушан, криптические виды, филогеография, митохондриальная ДНК.

Введение

Объективная оценка таксономической структуры, корректная идентификация в сложных видовых комплексах и знание филогеографической структуры исследуемого таксона являются неотъемлемой частью научного подхода к управлению популяциями редких видов животных. Особенную актуальность молекулярно-генетическая диагностика таксономической принадлежности и филогеографические исследования приобретают в отношении комплексов криптических видов, находящихся в статусе редких, уязвимых или угрожаемых под национальной или международной охраной. На территории Европы к таким криптическим комплексам относятся виды рода *Plecotus* Gray, 1821, или Ушаны, морфологическая идентификация которых в ряде случаев довольно сложна, в силу чего видовой либо подвидовой статус некоторых форм явля-

ется дискуссионным [1,2,3]. В Беларуси отмечено 2 вида данного рода: ушан бурый *Plecotus auritus* (Linnaeus, 1758) и ушан серый *Plecotus austriacus* (Fischer, 1829).

Бурый ушан — транспалеарктический вид, является обычным для Европы видом, где на севере его распространение ограничено 63–64° с. ш., а южная граница ареала пролегает по югу Пиренейского, Апеннинского и Балканского полуостровов, при этом распространение в средиземноморском регионе носит фрагментарный характер [4].

В Европе выделяют два подвида бурого ушана — *Pl. a. begognae*, распространение которого ограничено Иберийским полуостровом [6], и *Pl. a. auritus*, встречающийся на остальном пространстве ареала [5]. При этом последний представлен двумя линиями, «западной» (Австрия, Италия, Греция, Украина, Ладога и Пермская область Российской Федерации) и «восточной» (Краснодарский

край Российской Федерации, Кавказ), что некоторые ученые связывают с особенностями расселения вида в постгляциальный период [3].

Серый ушан — преимущественно средиземноморский вид, распространен в Западной, Центральной и Южной Европе, достигая на севере 53° с. ш. Восточная граница ареала пролегает по западным областям Турции, Украины и Беларуси [5].

В Беларуси бурый ушан отмечался практически с начала систематических зоологических исследований [7, 8] и при этом всегда рассматривался как широко распространенный, многочисленный дендрофильный вид [9]. Напротив, серый ушан был зарегистрирован только в начале 1990-х годов [10], причем его ареал ограничивается крайним юго-западом Беларуси, что соответствует северо-восточной границе европейского ареала. В 2015 г. он был внесен в 4-е издание Красной книги Беларуси (IV категория, NT). В Украине самые восточные находки серого ушана были отмечены в Полтавской и Черкасской областях, причем было высказано предположение о происходящей его экспансии в северо-восточном направлении [11]. Исходя из этого, возможно допустить либо обитание серого ушана, либо его скорое появление на всей территории Белорусского Полесья.

Следует отметить, что видовая идентификация бурых и серых ушанов в Беларуси проводилась исключительно на основании морфологических параметров, которые, в случае с криптическим видовым комплексом (*Pl. auritus/austriacus*), не всегда способны обеспечить достоверный уровень определения вследствие отсутствия резких, хорошо заметных отличий, широкого диапазона индивидуального проявления или наличия переходных форм признаков.

Таким образом, целью нашей работы — уточнить с помощью молекулярно-генетических методов видовой статус и распространение на территории Беларуси представителей комплекса *Pl. auritus/austriacus* и установить их внутривидовые филогеографические связи в пределах ареала для выяснения истории послеледникового расселения и выявления редких генетических линий, нуждающихся

в расставлении новых акцентов в природоохранной практике. В этом отношении крайний интерес представляет серый ушан, находящийся в Беларуси на краю ареала, но, вероятно, имеющий тенденцию к территориальной экспансии.

Материалы и методы

Отловы рукокрылых проводились по стандартной методике (при помощи паутинных сетей в ночное время суток) на территории Беларуси и Армении. Сети длиной от 6 до 12 м и шириной 2,5 м устанавливались в местах пролетной и охотничьей активности рукокрылых. Пробы тканей (диаметром около 1 мм) отбирались при помощи метода панч-биопсии из крыловой перепонки, после чего фиксировались 96% этанолом и депонировались в Генетический банк дикой фауны ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам» для долговременного хранения при –70 °С. Во избежание контаминации инструменты стерилизовались перед отбором каждой новой пробы. У всех отловленных особей сняты морфометрические параметры, определен их пол, возраст, проведена оценка репродуктивного статуса. После отбора генетической пробы животные отпускались на волю.

Для целей данного исследования был использован биоматериал от шести бурых ушанов, отловленных на территории Беларуси (в Минской, Гомельской и Брестской областях) и Армении, а также от двух серых ушанов из Брестской области.

Выделение тотальной ДНК из собранных проб тканей осуществлялось с использованием коммерческих наборов «АртДНК» согласно протоколам производителя («АртБиоТех», Республика Беларусь). В качестве генетических маркеров были использованы следующие участки митохондриальных генов:

– *D-loop* с использованием комплекса праймеров (P): L, 5'-TCCTACCATCAGCACCCAAAGC-3', (T): H, 5'-TTGACTGTATGGGGTATGTAC-3', рекомендованных в работе Wilkinson and Chapman [12];

– *COI* с использованием праймеров LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3') и HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAA AAAAT-3') [13];

– *ND1* с использованием праймеров ER65 (5'-CCTCGATGTTGGATCAGG-3') и ER66 (5'-GTATGGGCCCCGATAGCTT-3') [14].

ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1x Taq-буфер (Fermentas, Литва), 1x dNTPs, 3,0 mM MgCl₂, 0,4 pmol праймеров, 1U Taq-полимеразы (ОДО «Праймтех», Республика Беларусь) в амплификаторе модели CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США).

Для амплификации участка *D-loop* использовали следующий режим ПЦР: предварительная денатурация — 94 °C, 4 мин, затем 35 циклов денатурации (94 °C, 30 с), отжига (58 °C, 45 с) и удлинения цепи (72 °C, 1 мин) с последующей финальной достройкой цепи (72 °C, 20 мин).

ПЦР программа для амплификации участка *COI* содержала следующие стадии: предварительная денатурация — 95 °C, 1 мин, затем 35 циклов денатурации (95 °C, 30 с), отжига (52 °C, 30 с) и удлинения цепи (72 °C, 1,5 мин) с последующей финальной достройкой цепи (72 °C, 5 мин).

Участок гена *ND1* амплифицировали при использовании следующей программы ПЦР: предварительная денатурация — 94 °C, 3 мин, затем 40 циклов денатурации (94 °C, 30 с), отжига (50 °C, 30 с) и элонгации (72 °C, 1,5 мин) с последующей финальной достройкой цепи (72 °C, 5 мин).

Полученные ПЦР-продукты очищали с помощью набора NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Германия) и секвенировали с использованием GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (Beckman Coulter, Германия) и системы генетического анализа GenomeLAB GEXP (Beckman Coulter, Германия). Некоторые образцы были секвенированы на приборе Applied Biosystems в Институте биоорганической химии НАН Беларуси (г. Минск, Республика Беларусь). Выравнивание и анализ полученных последовательностей проводили с помощью пакета программ MEGA ver. 6 [15]. Построение парсимониальных сетей производилось в программе PopArt ver. 1.7. Для сравнительного анализа привлечены аналогичные участки мтДНК данных видов из базы Национального центра биотехнологической информации США (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Результаты и обсуждение

Филогеографические исследования в большинстве своем не требуют большого количества расшифрованных нуклеотидных последовательностей, так как гаплотипы мтДНК животных в отдельно взятых географических пунктах являются отражением истории всей популяции исследуемого региона в целом. Всего было получено 15 сиквенсов различных участков генов митохондриальной ДНК — *D-loop* (3 нуклеотидные последовательности), *COI* (2 последовательности) и *ND1* (10 последовательностей). Ввиду большого размера ген *ND1* анализировался нами только на своем начальном и конечном участке. Для сравнительного анализа было привлечено 47 нуклеотидных последовательностей из международной базы NCBI: по *ND1* — 26 последовательностей (AF401369, AF516276, AF401374, AF401370, AY131291, AF401368, KJ948318, AF401373, AF401371, AF401372, AF516273, KJ948310, DQ915072, KF218516, AY699874, AB079817, HM164052, NC015484, AF401363, AF401365, AF401364, AF516271, AF516270, DQ915065, DQ915066, AF401367), по *D-loop* — 15 (KJ150736.1, AF515171.1, AF515169.1, AF515170.1, AF515175.1, AF515172.1, AF515173.1, AF515176.1, AF515177.1, AF515174.1, AF515178.1, AF515166.1, AF515167.1, AF515168.1, AY030077.1), по *COI* — 13 (JF443101.1, JF443099.1, JF443097.1, FR856810.1, FR856803.1, FR856805.1, FR856806.1, FR856802.1, FR856809.1, JF443100.1, JF443098.1, KY754537.1, KY754535.1). Авторские последовательности вкпе с депонированными в Genbank последовательностями других ученых представляют собой срез установленного на сегодняшний день гаплотипического разнообразия, достаточно надежной основы для изучения филогеографической истории двух европейских видов *Plecotus*.

Анализ нуклеотидных последовательностей *D-loop* бурого ушана

Результаты проведенного парсимониального анализа нуклеотидных последовательностей *D-loop* бурого ушана показывают наличие двух гаплотипических линий — «иберийской» и «центрально-европейской». Первая объединяет два кластера, в одном из которых группируются гаплотипы из Испании и Великобритании, а в другом добавляются

гаплотипы из Швейцарии. Вторая линия включает гаплотипы из Германии, Дании, Австрии и Беларуси. Гаплотип из Армении занимает промежуточное положение, однако в структуре сети находится значительно ближе к «центрально-европейской» гаплотипической линии (рис. 1).

Из представленной картины можно полагать, что западная часть современного ареала бурого ушана сформирована потомками выходцев из «иберийского» (кластер 1 «иберийской» гаплотипической линии) и «аппенинского» (кластер 2 «иберийской» гаплотипической линии) ледниковых рефугиумов после завершения плейстоценовых оледенений. При том, что в настоящее время кластеры не имеют жесткого географического разделе-

ния, оно, очевидно, было в прошлом, возможно, в гляциальные пики плейстоцена. Об этом свидетельствует значительная генетическая удаленность гипотетических предковых форм обоих кластеров.

В постгляциальный период «иберийские» предки оказались менее экспансивными, так как гаплотип кластера 1 пока обнаружен только в Британии. В то же время из «аппенинского» рефугиума гаплотипы попали и на Иберийский полуостров, и на Британские острова.

Восточная часть популяции бурого ушана демонстрирует более сложно структурированную группу гаплотипов, которые тем не менее имеют один источник, давший эволюционную радиацию гаплотипического разнообразия на значительном пространстве умеренной зоны

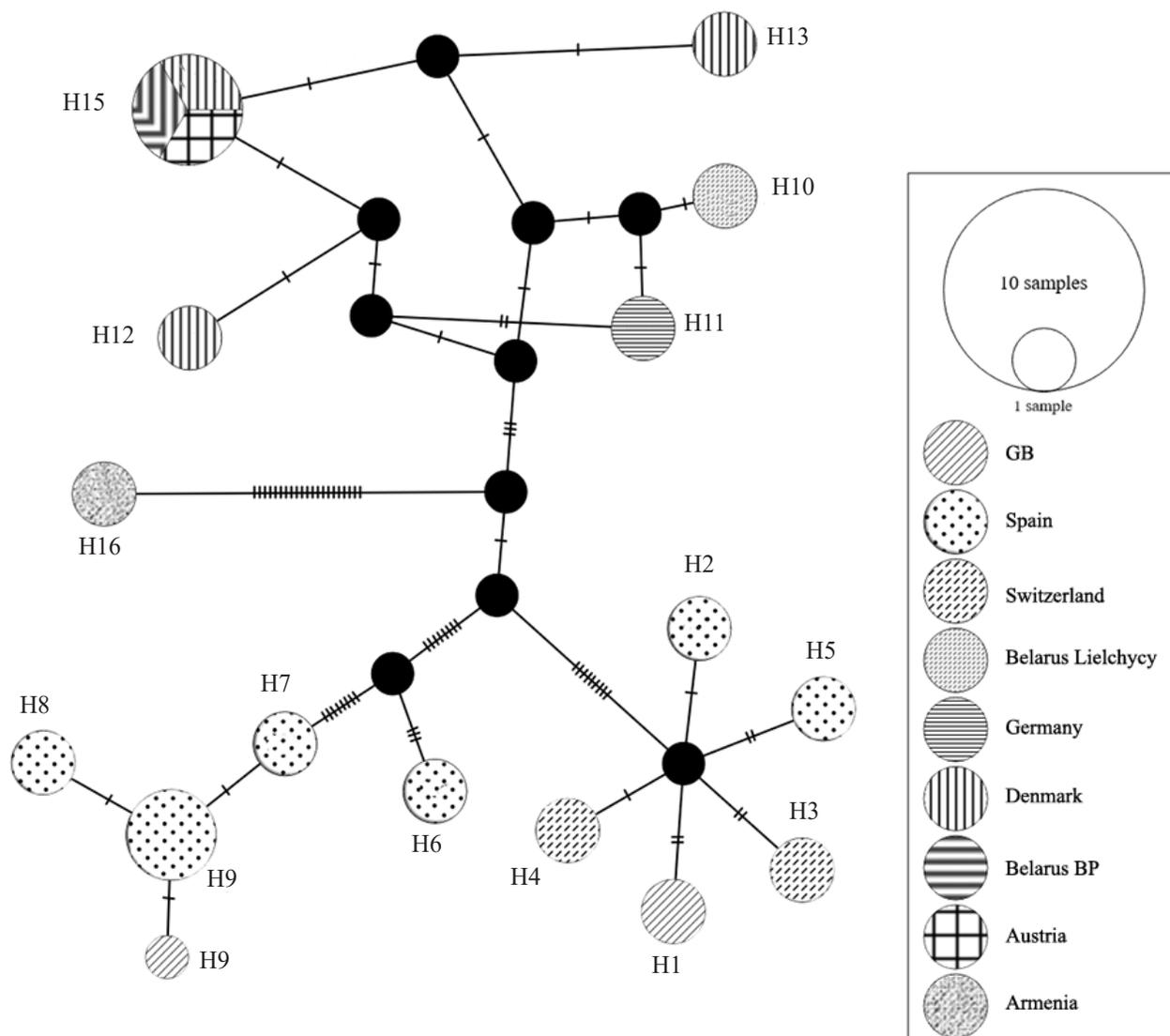


Рис. 1. Парсимониальная сеть гаплотипов контрольного региона *D-loop* бурого ушана

Европы, включая Данию на западе и Беларусь как минимум на востоке.

Анализ нуклеотидных последовательностей COI бурого ушана

Сравнительный анализ участка COI позволил выделить 7 гаплотипов. Гаплотип H1, представленный последовательностями из Беларуси, ряда регионов России (Домодедово, Звенигород, Брянский Лес) и Северной Италии отстоит на одну мутацию от гаплотипов из Австрии и Волгограда, формируя тем самым ядро гаплотипической группы звездообразной структуры, характерной в основном для таксонов, прошедших этап быстрого роста численности популяции. Другие гаплотипы H4, H5, H6, H7, представленные последовательностями из Италии и Краснодара, имеют общего предка, но при этом показывают значительную генетическую дистанцию между собой, что свидетельствует о длительном периоде их независимого формирования (рис. 2).

Представленные на рисунке 2 результаты парсимониального анализа могут быть интерпретированы следующим образом: северная часть восточноевропейского ареала бурого ушана образована формами, связанными происхождением с севером апеннинского региона — Северной Италией, в то время как популяция юга России (Предкавказье) имеет самостоятельную и, очевидно, более древнюю связь через общего предка с территорией в контексте плейстоценовых оледенений воспринимаемой в целом как «апеннинский рефугиум». Из этого следует, что постгляциальное расселение бурого ушана в центральной и северной части Восточной Европы имело своим исходным регионом как минимум северную часть «апеннинского» рефугиума, распространяясь на территорию Австрии, Беларуси и ряда центральных регионов России до Волгограда на юге. При этом популяция более южной части Восточной

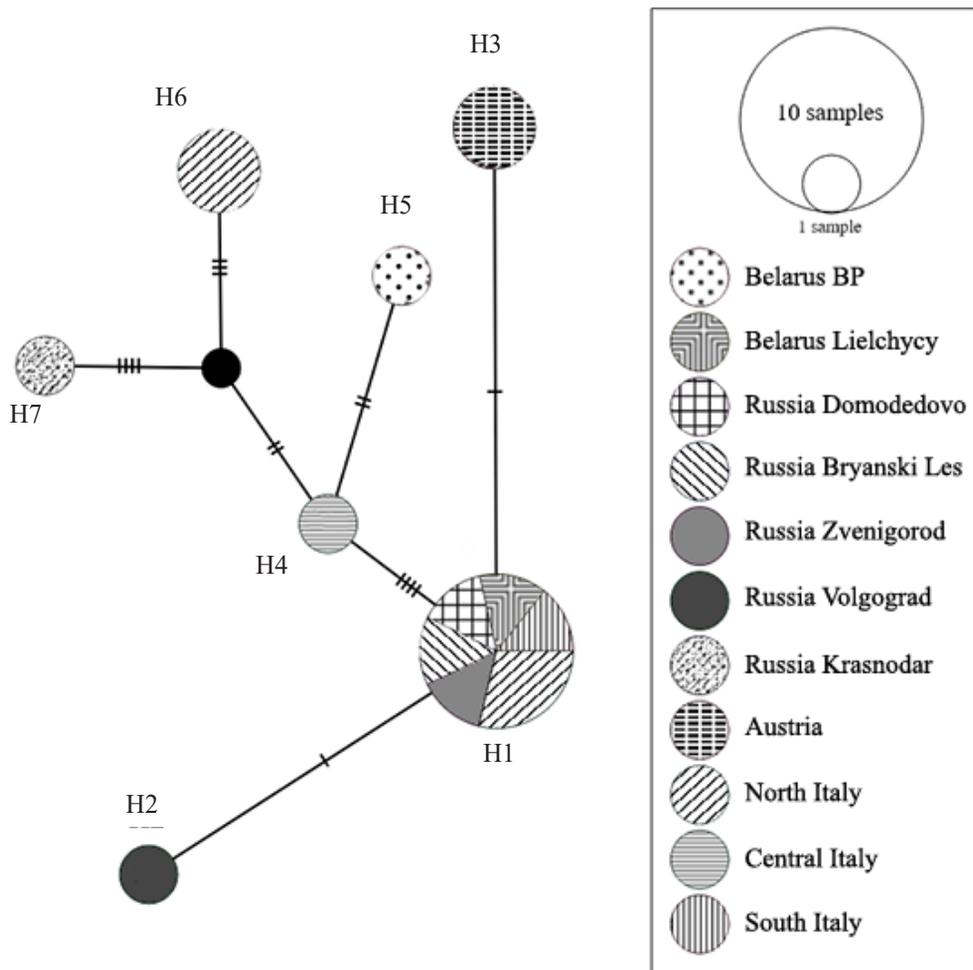


Рис. 2. Парсимониальная сеть гаплотипов COI бурого ушана

Европы (Краснодар), вероятнее всего, имела связь с популяцией исходного плейстоценового ареала вида в холодной фазе плейстоцена (либо представляла собой часть данной популяции). В нашем представлении этот ареал мог распространяться на достаточно пространную территорию, так называемую «рефугиальную зону» [16], охватывающую как большую часть Апеннинского полуострова, так и другие территории юга Восточной Европы, где влияние оледенения не сказывалось отрицательно на обитании многих видов фауны, впоследствии занявших умеренную зону Европы.

Анализ нуклеотидных последовательностей *ND1* бурого ушана

Парсимониальный анализ маркера *ND1* для бурого ушана показал схожую картину гаплотипического распределения для начальной и концевой частей гена. В случае с начальной частью показано наличие ряда близких гаплотипов: Н7 (Италия), Н8 (Беларусь), Н9 (Беларусь), Н10 (Италия и Австрия), Н11 (Австрия). Вторая группа представлена рядом далеких друг от друга гаплотипов: Н1 (Западная Палеарктика),

Н2 (Австрия), Н3 (Испания) и Н6 (Италия), которые, в свою очередь, значительно отдалены от гаплотипов Н4 (Корея) и Н5 (Япония) (рис. 3).

Во второй части гена также есть группа довольно близких гаплотипов: Н1 (Италия, Беларусь), Н2 (Австрия), Н3 (Австрия), Н4 (Италия); вторая группа гаплотипов: Н5 (Италия), Н6 (Западная Палеарктика). На значительном отдалении находятся гаплотипы Н9 (Корея) и Н10 (Япония) (рис. 4).

Анализ структуры парсимониальных сетей по гену *ND1* бурого ушана подтверждает географическое распространение выявленных по другим митохондриальным маркерам *D-loop* и *COI* гаплотипических линий, но более четко и наглядно демонстрирует более древнее происхождение одной из них. На рисунке 3 гаплотипы Н1-Н6 удалены друг от друга на значительную генетическую дистанцию, в то время как гаплотипы Н7-Н11 относительно ближе друг другу и составляют достаточно компактную группу, структура сети которой свидетельствует о недавних изменениях в последовательностях гена. Похожую картину можно проследить и на рисунке 4.

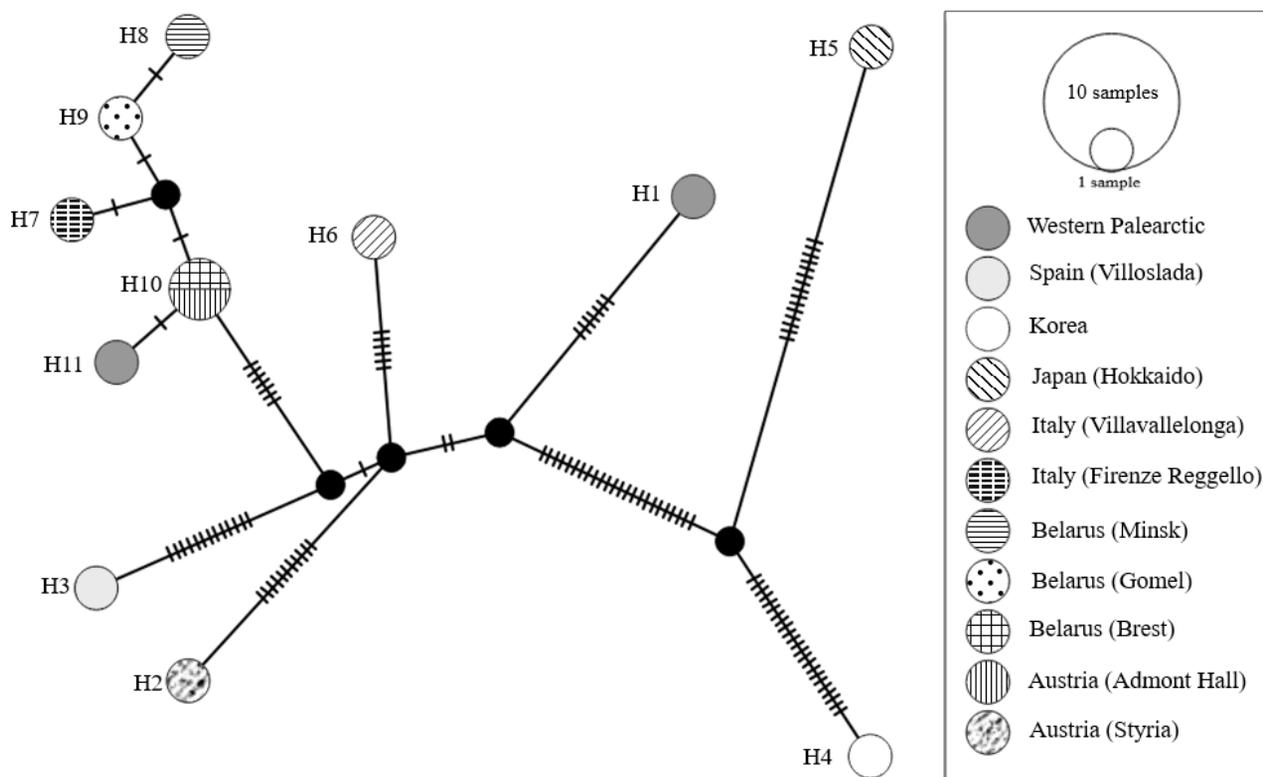


Рис. 3. Полиморфизм *ND1* у *P. auritus* (начальная часть гена)

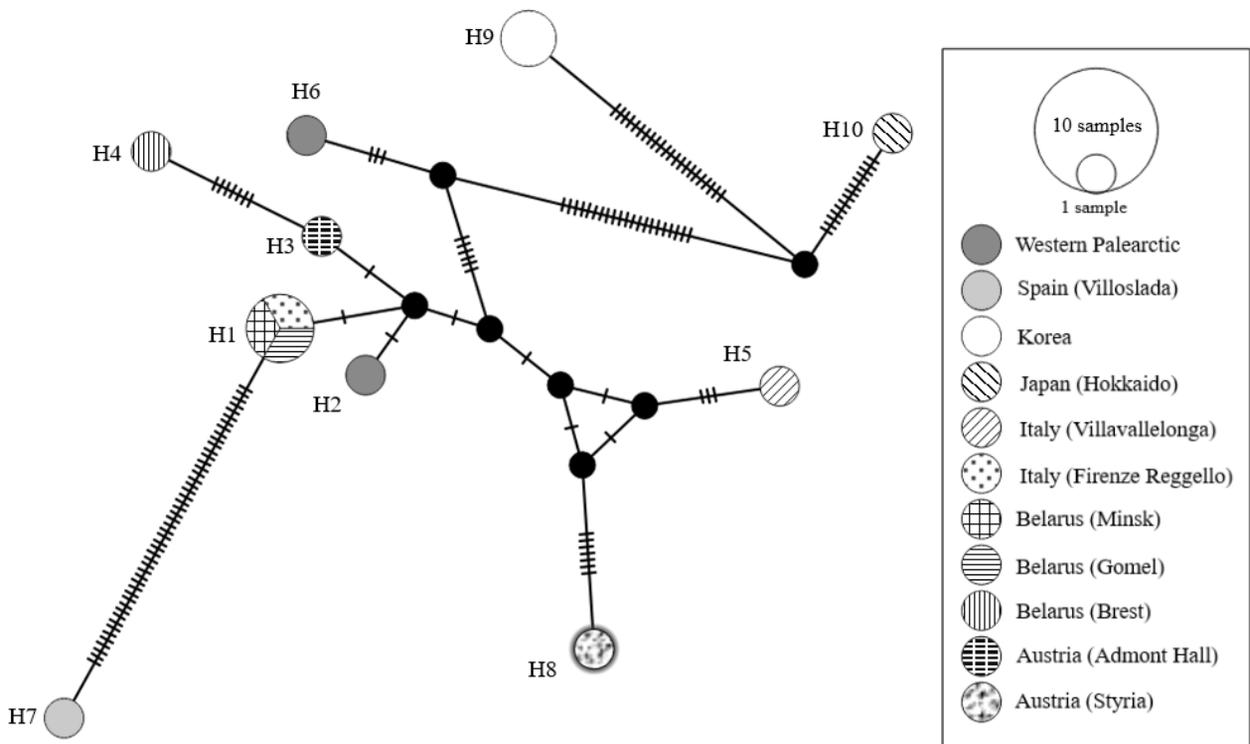


Рис. 4. Полиморфизм *NDI* у *P. auritus* (концевая часть гена)

Таким образом, на основании генетических дистанций, выраженных количеством нуклеотидных замен в варибельной части гена *NDI*, можно сделать вывод, что современная популяция бурого ушана на территории Европы образована потомками двух гаплотипических линий, формировавшихся независимо друг от друга. При этом юго-западная часть ареала населена представителями более древней гаплотипической линии, объединяющей гаплотипы, накопившие большое количество мутаций вследствие более длительной истории их формирования в условиях ледниковых изоляций плейстоцена. А северо-восточная часть ареала возникла уже после последнего оледенения, когда за относительно короткий промежуток времени расселяющаяся часть популяции на значительном пространстве современной умеренной зоны Европы, включая и территорию Беларуси, сформировала молодую гаплотипическую линию, о чем свидетельствует незначительная генетическая дистанция между гаплотипами достаточного варибельного митохондриального маркера *D-loop*. Следует отметить, что на территории современных Италии и Австрии присутствуют обе выяв-

ленные гаплотипические линии, а белорусская популяция бурых ушанов принадлежит только ко второй.

Анализ нуклеотидных последовательностей NDI серого ушана

Образцы биоматериала серого ушана были проанализированы по двум участкам митохондриального гена *NDI*. Достоверная кластеризация белорусских последовательностей гена *NDI* с аналогичными участками генома серых ушанов, имеющихся в международной базе NCBI, подтверждает корректность видовой идентификации *Pl. austriacus* и, таким образом, является первым молекулярно-генетическим доказательством присутствия данного вида в Беларуси.

Анализ парсимониальных сетей, построенных для первой и второй частей анализируемого участка *NDI* (рис. 5, 6), показывает для серого ушана довольно схожие картины: балканские гаплотипы из Хорватии и Греции (H1, H2, H3) достаточно схожи между собой, но значительно отличаются от таковых из других европейских регионов и Беларуси. Испанские гаплотипы (H4, H5) формируют группу, объединенную общим предком, хотя и значительно отдалены друг

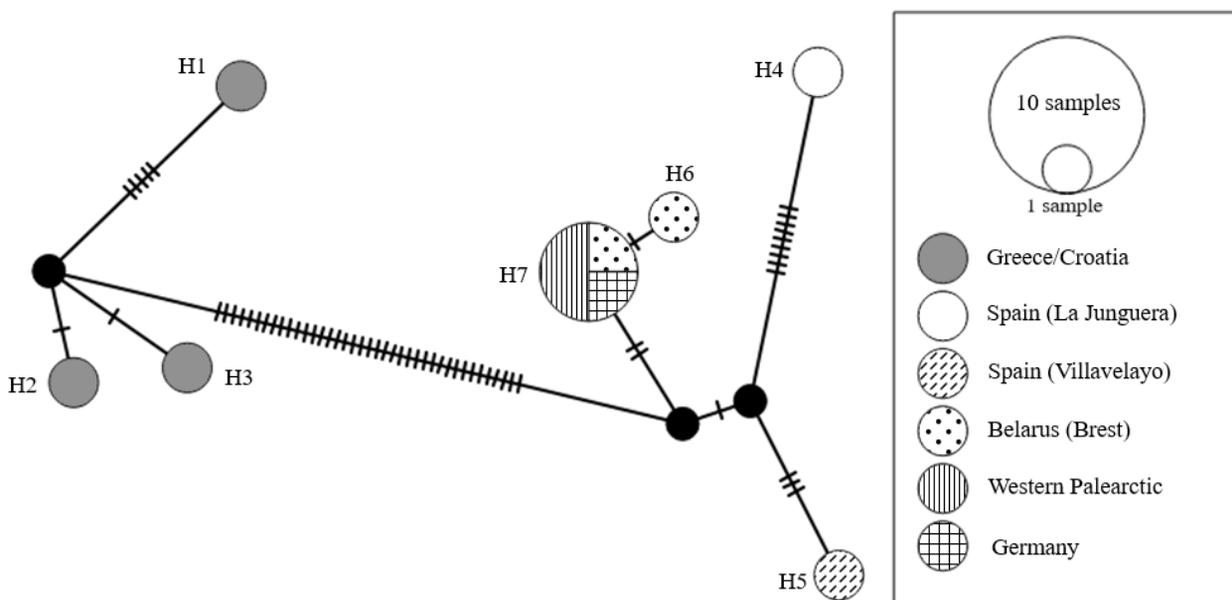


Рис. 5. Парсимониальная сеть, построенная на основе полиморфизма гена *ND1* у *P. austriacus* в пределах ареала (начальная часть)

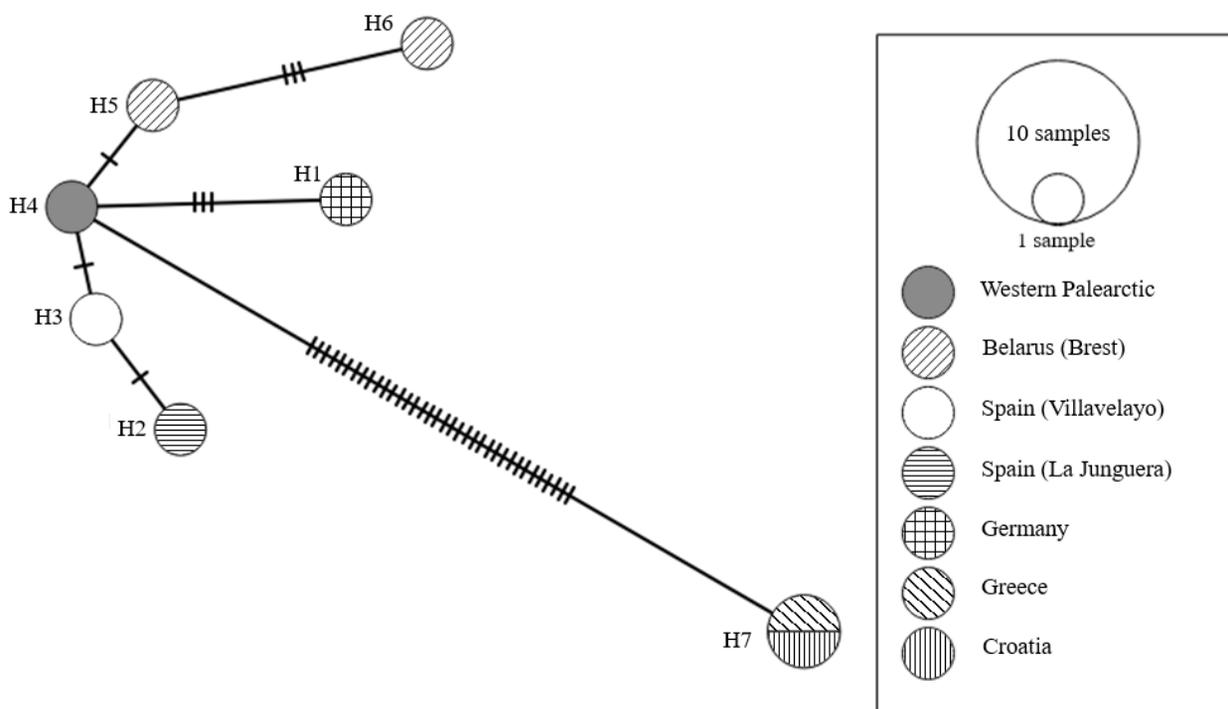


Рис. 6. Парсимониальная сеть, построенная на основе полиморфизма гена *ND1* у *P. austriacus* в пределах ареала (концевая часть)

от друга. Третья группа гаплотипов (H6, H7) объединяет последовательности из наиболее северных частей ареала (более конкретная локация гаплотипа «Западная Палеарктика неизвестна), гипотетический

предок которых связан с «испанской» группой гаплотипов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что источником постгляциальной реколонизации территории современной уме-

ренной зоны Европы серым ушаном являлся «иберийский» рефугиум. При этом популяция, локализованная в балканском рефугиуме, не проявила тенденции к расселению на постгляциальном пространстве Европы. В результате в настоящее время на территории Беларуси наблюдается расселение серого ушана, генетически родственного формам из географически удаленного Пиренейского региона, а не более близкого Балканского.

Заключение

Парсимониальный анализ гаплотипов по трем митохондриальным маркерам (*D-loop*, *COI*, *ND1*) показал вполне согласующиеся между собой результаты, позволяющие охарактеризовать особенности филогеографических паттернов видов криптического комплекса *Pl. auritus/austriacus*. В частности постгляциальная реколонизация Западной Европы бурым ушаном осуществлялась из двух рефугиумов – «иберийского» и «апеннинского». При этом юго-западная часть ареала населена представителями более древней гаплотипической линии, объединяющей гаплотипы, накопившие большое количество мутаций вследствие более длительной истории их формирования в условиях ледниковых изоляций плейстоцена. Расселение вида на постгляциальных пространствах современной умеренной зоны Европы, включая Центральную и Восточную Европу, в том числе и территорию Беларуси, имело своим исходным регионом как минимум северную часть «апеннинского» рефугиума. В целом восточная часть популяции бурого ушана демонстрирует более сложно структурированную группу гаплотипов. Северо-восточная часть ареала возникла уже после последнего оледенения, когда за относительно короткий промежуток времени расселяющаяся часть популяции на значительном пространстве сформировала молодую гаплотипическую линию. Популяция наиболее южной части Восточной Европы, вероятнее всего, сохраняла связь с популяцией исходного плейстоценового ареала вида в холодной фазе плейстоцена либо представляла собой часть данной популяции.

Молекулярно-генетической верификацией видового определения *Pl. austriacus* под-

тверждено обитание данного вида в Беларуси. Для серого ушана источником постгляциальной реколонизации Европы являлся только «иберийский» рефугиум, в то время как популяция из «балканского» рефугиума не проявила тенденции к широкой экспансии.

Работа выполнена в том числе при поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № Б17Арм-048 «Филогеографический анализ популяций рукокрылых Беларуси и Армении».

Список цитированных источников

1. EUROBATS MoP 8. Resolution 8.2 (2018) [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.eurobats.org/sites/default/files/documents/pdf/Meeting_of_Parties/MoP8.Resolution%208.2%20Amendment%20of%20the%20Annex%20to%20the%20Agreement_0.pdf. – Date of access: 25.08.2020.
2. Ancillotto, L. An African bat in Europe: *Plecotus gaisleri*: Biogeographic and ecological insights from molecular taxonomy and Species Distribution Models / L. Ancillotto [et al.] // *Ecology & Evolution*. – 2020. – Vol. 10. – P. 5785–5800. doi: 10.1002/ece3.6317.
3. Spitzenberger, F. A preliminary revision of the genus *Plecotus* (Chiroptera, Vespertilionidae) based on genetic and morphological results / F. Spitzenberger [et al.] // *Zoologica Scripta*. – 2006. – Vol. 35. – P. 187–230. doi: 10.1111/j.1463-6409.2006.00224.x.
4. Horáček, I. *Plecotus auritus* Linnaeus, 1758 – Braunes Langohr / I. Horáček, B. Dulic // *Handbuch der Säugetiere Europas*. – 2004. – Band 4: Fledertiere, Teil I: Chiroptera 2: Vespertilionidae 2, Molossidae, Nycteridae. – P. 953–999.
5. Dietz, C. Bats of Britain, Europe and Northwest Africa / C. Dietz, D. Nill, O. von Helvesen. – A&C Black, 2009. – 400 p.
6. Paz, O. De. Systematic position of *Plecotus* (Geoffroy, 1818) from the Iberian Peninsula (Mammalia: Chiroptera) / O. De Paz // *Mammalia*. – 1994. – Vol. 58, № 3. – P. 423–432. doi: 10.1515/mamm.1994.58.3.423.
7. Domaniewski, J. Tyzenhauza spis ptakow i ssakow ziem polskich / J. Domaniewski // *Fragmenta Faunistica Musei*

- Zoologici Polonici. – 1931. – Vol. 44, № 10. – P. 209–288.
8. Shpak, A. Bats of Belarus of the 19th century: a retrospective analysis / A. Shpak // *Vespertilio*. – 2011. – Vol. 15. – P. 79–86.
9. Курсков, А. Н. Рукокрылые Белоруссии / А. Н. Курсков. – Минск: «Наука и техника», 1981. – 136 с.
10. Демянчик, В. Т. Рукокрылые Беларуси: справочник-определитель / В. Т. Демянчик, М. Г. Демянчик. – Брест, 2000. – 216 с.
11. Годлевська, Л. Рукокрилі лівобережжя Дніпра в північній частині України / Л. Годлевська, С. Ребров // *Theriologia Ukrainica*. – 2018. – Vol. 16. – С. 25–50. doi: 10.15407/pts2018.16.025
12. Wilkinson, G. M. Length and Sequence Variation in Evening Bat D-Loop mtDNA / G. M. Wilkinson, A. Chapman // *Genetics*. – 1991. – Vol. 128, № 3. – P. 607–617.
13. Folmer, O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // *Molecular Marine Biology Biotechnology*. – 1994. – Vol. 3, № 5. – P. 294–299.
14. Petit, E. No Evidence of Bottleneck in the Postglacial Recolonization of Europe by the Noctule Bat (*Nyctalus noctula*) / E. Petit, L. Excoffier, F. Mayer // *Evolution*. – 1999. – Vol. 53, № 4. – P. 1247–1258. doi:10.2307/2640827.
15. Kumar, S. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences / S. Kumar [et al.] // *Brief Bioinform.* – 2008. – Vol. 9, № 4. – P. 299–306. doi:10.1093/bib/bbn017.
16. Никифоров, М. Е. Формирование и структура орнитофауны Беларуси / М. Е. Никифоров. – Минск: Белорусская наука, 2008. – 297 с.

A. V. Shpak¹, E. E. Kheidorova¹, A. I. Larchanka¹, M. E. Nikiforov¹, A. Ghazaryan², G. Papov²,
V. V. Demianchyk³

CRYPTIC CHIROPTERA SPECIES COMPLEX *PLECOTUS AURITUS/AUSTRIACUS* IN BELARUS: SPECIES IDENTIFICATION AND PHYLOGEOGRAPHIC PATTERNS

¹State Research and Production Association

“Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources”

27, Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: shpak.dvergr@gmail.com

²Yerevan State University

1, A. Manoogian St., 0025 Yerevan, Armenia

³Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus

204/1-1 Moskovskaya St., 224020 Brest, the Republic of Belarus

The Article demonstrates phylogeographic analysis results of the cryptic species complex *Pl. auritus/austriacus*. Parsimony analysis of haplotypes by three mitochondrial markers (*D-loop*, *COI*, *ND1*) showed that postglacial recolonization of Western Europe with a brown long-eared bat was carried out from two refugia — “Iberian” and “Apennine” consisting of representatives of two haplotype lineages differing by their formation period. Molecular genetic verification of the *Pl. austriacus* species identification confirmed that this species inhabits Belarus. For the grey long-eared bat, a source of the postglacial recolonization of Europe was only the “Iberian” refugium, while the population from the “Balkan” refugium did not show a tendency towards widespread expansion.

Keywords: bats, brown long-eared bat, gray big-eared bat, cryptic species, phylogeography, mitochondrial DNA.

Дата поступления статьи: 14 сентября 2020 г.

Е. В. Снытков¹, В. Н. Кипень², А. А. Александров³, С. Б. Мельнов¹

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА И МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ НАРКОТИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ У ЧЕЛОВЕКА

¹Учреждение образования

«Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова БГУ»
Республика Беларусь, 220070, г. Минск, ул. Долгобродская, 23/1
e-mail: evsnitkov@gmail.com

²Государственное научное учреждение

«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

³Учреждение здравоохранения «Минский областной клинический центр
«Психиатрия – наркология»
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, д.7

В данном исследовании представлены результаты молекулярно-генетического анализа 13 полиморфных вариантов генов, по результатам GWAS ассоциированных с развитием аддиктивных состояний, в группе лиц с наркотической зависимостью ($n = 121$) и в группе сравнения ($n = 211$). Основным методом генотипирования — ПЦР с последующим высокоразрешающим плавлением ампликона (High Resolution Melting) и кластеризацией профилей плавления, результаты плавления валидированы с использованием метода ПЦР-ПДРФ. В результате, однонуклеотидными полиморфизмами, ассоциированными с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости, являются: генотип AA по полиморфизму rs7085104 (*AS3MT*); аллель A по полиморфизму rs1109501 (*MUC7*); генотипы CC/CT по полиморфизму rs3735025 (*DGK1*); генотип GG по полиморфизму rs237238 (*HIP1*); генотипы AA/AG по полиморфизму rs2007044 (*CACNA1C*). При одновременном наличии генотипов: AA/AG (rs2007044, *CACNA1C*) // AA (rs7085104, *AS3MT*) // CC/CT (rs3735025, *DGK1*) // AA/AG (rs237238, *HIP1*) или AA (rs7085104, *AS3MT*) // AG (rs2007044, *CACNA1C*), – вероятность развития заболевания возрастает более чем в 4 раза.

Ключевые слова: наркотическая зависимость, предрасположенность, однонуклеотидный полиморфизм, ПЦР, анализ кривых плавления, межгенное взаимодействие.

Введение

Наркотическая зависимость представляет собой хроническое заболевание, для которого характерны множественные рецидивы. В настоящее время немедицинское использование наркотических веществ представляет собой реальную угрозу для здоровья людей и создает множество проблем для органов правопорядка. По данным из всемирного Доклада United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC, <https://www.unodc.org/>) о наркотических веществах за 2018 г., количество летальных исходов, вызванных приемом опиоидных веществ, составило 76% от всех смертей, связанных с приемом наркотических веществ [1]. В 2016 г. каннабис (*Cannabis*)

стал самым распространенным наркотиком. Так, в 2017 г. как минимум однажды каннабиноиды употребляли 192 млн человек. За период 2006–2016 гг. число людей, которые употребляли каннабис, выросло на 16%, что соответствует приросту мирового населения за тот же период. По данным Доклада, количество людей, употребляющих наркотики минимум один раз в год, составляет более 275 млн человек (5,6% мирового населения в возрасте 15–65 лет), а риск употребления наркотических веществ с сопутствующими последствиями наиболее высок среди подростков. В Восточной Европе 70–90% всех людей, заражающихся ВИЧ-инфекцией, составляют люди, употре-

бляющие инъекционные наркотики, а в Европейском регионе в целом употребление инъекционных наркотиков приводит к большинству новых случаев гепатита С [2].

Согласно Докладу UNODC, каждый год от болезней, связанных с алкоголем, табаком и наркотиками умирает соответственно 2,3 млн, 5,1 млн и 250 тыс. человек. Среди населения мира в возрасте 15 лет и старше годовая распространенность употребления алкоголя составляет 42%, употребления табака — 25%, а незаконного употребления наркотиков — 5%. В результате негативное воздействие связанных с наркотическими веществами проблем для здоровья населения и растущее экономическое и социальное бремя стали важной проблемой для глобального здравоохранения [3].

Показано, что психические проблемы, возникающие в детском и подростковом возрасте, могут существенно повысить риск употребления психоактивных веществ или злоупотребления ими во взрослом возрасте [4]. Также известно, что повышенная тревожность и антисоциальные расстройства личности связаны в большей степени с зависимостью от наркотических веществ, чем со злоупотреблением самими наркотическими веществами [5]. Исследования, проводившиеся на усыновленных различными семьями одно- или разнояйцевых близнецах, продемонстрировали убедительные доказательства вклада генетического фактора в развитие предрасположенности к наркотической зависимости [6]. Результаты исследований свидетельствуют, что различия наблюдаемого признака между индивидами в различных семьях, обусловленные аддитивными генетическими эффектами, не столь значительны, как ожидалось. В зависимости от конкретного наркотического средства генетические факторы составляют 40–80% вероятности развития наркотической зависимости [7, 8].

Установлено, что более 10% населения генетически предрасположено к указанной патологии [9, 10]. В этой связи определение и оценка частоты распространенности риск-ассоциированных аллелей потенциальных генов-кандидатов, влияющих на формирование наркотической зависимости, представляется весьма актуальной задачей [11]. Таким образом, цель настоящего исследования — оценить частоту распространенности генотипов

и аллелей для ряда полиморфных вариантов генов, предположительно ассоциированных с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости, по данным GWAS, среди индивидов из Республики Беларусь.

Материалы и методы

Данное исследование проведено по принципу случай–контроль и включает 332 добровольца, постоянно проживающих на территории Республики Беларусь, для 121 из которых клинически установлена наркотическая зависимость (основная группа), в то время как 211 человек не имели пристрастия к наркотическим веществам (группа сравнения). Группа сравнения по основным демографическим критериям: пол, возраст, социальный статус и пр., — соответствовала основной группе.

После разъяснительной беседы и добровольного согласия в письменной форме у всех индивидов осуществлен забор биологического материала — буккального эпителия — на ватный тампон-зонд. ДНК выделяли стандартным двухэтапным методом фенольно-хлороформной экстракции [12]. Концентрация ДНК для всех образцов была стандартизирована до 30–50 нг/мкл. Идентификацию генотипа в исследуемых полиморфных сайтах проводили с использованием технологии плавления ампликона высокого разрешения (HRM — high resolution melting) на термоциклере в режиме реального времени CFX96 Touch (Bio-Rad). Генотипирование проводилось с использованием Precision Melt Supermix for High Resolution Melt (HRM) Analysis (Bio-Rad, США) в трехкратной повторности согласно рекомендации производителя. Результаты аллельной кластеризации были проанализированы с использованием Precision Melt Analysis™ Software v1.3 (Bio-Rad, США). Корректность определения генотипа контролировали с использованием метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Характеристика исследованных полиморфизмов представлена в таблице 1.

Для нахождения различий между номинальными показателями использовали метод χ^2 . Уровень статистической значимости при множественных сравнениях вычислялся экспериментально для каждого конкретного случая (сравнения) в процессе моделирования

Таблица 1

Структура праймеров для амплификации фрагментов в полиморфных сайтах генов

Полиморфизм (ген)	Последовательность олигонуклеотидов	Рестриктаза
rs6902771 (<i>ESR1</i>)	F: 5'-AGTGCCATGAAAAACAAGTATAGGG-3' R: 5'-CTCCCTCATCAAATCAAGTCCCC-3'	RsaI
rs7085104 (<i>AS3MT</i>)	F: 5'-TTGGTCTCCGTTTTGGTGATGTA-3' R: 5'-TCCATCTTTCTTCAGTGTGCAGTT-3'	MspI
rs7590720 (<i>PECR</i>)	F: 5'-ATCCAAAATAGCCTAGAGATTTGGC-3' R: 5'-ATGCTACGTCAAAACTAGCGA-3'	DdeI
rs11191580 (<i>NT5C2</i>)	F: 5'-TGTTTTTCCTTATGGGCTTGC-3' R: 5'-TTTGGCCCTCTCAAAAAGCAC-3'	TspRI
rs17504622	F: 5'-AGTAACATCCAACGGCTCACAG-3' R: 5'-GGGCATGGCAGCTCTAAGGAG-3'	AluI
rs56205728 (<i>BUB1B-PAK6</i>)	F: 5'-CAACAGGAAACATCTTCCAAGACA-3' R: 5'-TTATATGCTAATTTGGGGTTAGCG-3'	AciI
rs73229090 (<i>EPHX2</i>)	F: 5'-CTCCAGTCCCAGCCCTATTATG-3' R: 5'-TGCTAATCCCCCTCCCATCGC-3'	DpnI
rs237238 (<i>HIP1</i>)	F: 5'-AGCCACTTACAAGTTGTTTCACGTC-3' R: 5'-AGGCAACCTGCAGATGAGTGAC-3'	MspI
rs1109501 (<i>MUC7</i>)	F: 5'-TGGCTTTAACACCGTAAGAACA-3' R: 5'-AATGGTACCTTCTTGTGTGTCC-3'	AciI
rs2007044 (<i>CACNA1C</i>)	F: 5'-CAGGTAGGAGCAGTCCGGTG-3' R: 5'-GCAAAGTGGAAGTGAAAAATGGAAC-3'	AciI
rs2273500 (<i>CHRNA4</i>)	F: 5'-GGGTCTGATGGCGAAAAGCAC-3' R: 5'-GTCTTTGCCCCACCCTTGA-3'	AluI
rs3735025 (<i>DGKI</i>)	F: 5'-ACCTAAAATGGGGCTCCTCTCAC-3' R: 5'-TTGGAATGTTGCACAGAGGCTAAT-3'	AluI
rs4356203 (<i>PIK3C2A</i>)	F: 5'-TTTTCCCTCAGCCTAGAGGTGACA-3' R: 5'-CAACCCTACTCTAAGGGGTCC-3'	HhaI

Примечание. Рестриктазы производства New England Biolabs (NEB)

в пакете SPSS v.20.0. Использовали точный критерий Фишера, основанный на пермутации (англ. permutation), — уровень p вычисляется по формулам комбинаторной теории вероятностей. Анализ ассоциации генотипов с риском развития заболевания проводился путем вычисления показателя отношения шансов (ОШ) для генотипов и аллелей каждого анализируемого полиморфного сайта (с расчетом 95% ДИ). Статистическая обработка данных проводилась с использованием SPSS v.20.0 (IBM, США).

Анализ межгенных взаимодействий проводился биоинформатическим методом многофакторного сокращения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) с использованием размещенного в открытом доступе (англ. open-source software) ПО MDR v.3.0.2. ([http://](http://www.multifactor dimensionality reduction.org/)

www.multifactor dimensionality reduction.org/). В процессе моделирования были использованы высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов: количество атрибутов (attribute count range) — от 1 до n (где n — количество переменных в модели); воспроизводимость модели (cross-validation count) — 100; анализ топ-моделей (track top models) — 1000; поиск конфигурации модели (search method configuration) — всесторонний (exhaustive); метод сравнения (ambiguous cell analysis) — точный тест Фишера (Fisher's exact test); классификация ячеек (ambiguous cell assignment) — неклассифицированные (unclassified). Математической базой данной

программы является непараметрический кластерный анализ для обнаружения и описания нелинейного типа взаимодействия между дискретными генетическими атрибутами.

Результаты и обсуждение

Распределение генотипов и аллелей исследуемых полиморфных вариантов генов

Нами изучено распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов *ESR1*, *AS3MT*, *PECR*, *NT5C2*, *BUB1B-PAK6*, *EPHX2*, *HIP1*, *MUC7*, *CACNA1C*, *CHRNA4*, *DGKI* и *PIK3C2A* у лиц с наркотической зависимостью и среди индивидов из группы сравнения (табл. 2). Данные гены условно можно разделить на 3 группы в соответствии с выполняемыми ими функциями: группа генов, задействованных в метаболизме веществ (*AS3MT*, *PECR*, *EPHX2*, *MUC7*, *DGKI* и *NT5C2*), группа генов, выполняющая регуляторную функцию (*BUB1-PAK6*, *ESR1*, *CHRNA4* и *PIK3C2A*) и

группа генов, связанная с клеточным транспортом (*HIP1* и *CACNA1C*). Полиморфный локус rs17504622 не находится в пределах какого-либо гена, однако ближайшим геном к нему является ген ионотропного глутаматного рецептора *GRI1A1*, в связи с этим нами было принято решение отнести этот полиморфный локус в группу генов, выполняющих регуляторную функцию.

Все полиморфные локусы были выбраны на основании данных, представленных по результатам GWAS (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>): в работу вошли локусы, которые в таких исследованиях показали уровень значимости $p < 1 \times 10^{-6}$. Также в непосредственной близости от этих локусов отсутствуют другие полиморфизмы, что является необходимым условием для проведения HRM-анализа, а расчетная разница в температурах плавления для различных аллелей является наибольшей (на основании расчетов в Oligonucleotide Properties Calculator, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

Таблица 2

Результат генотипирования по исследуемым полиморфным вариантам: А — сравнение аллелей, Г — сравнение генотипов, Д — доминантная модель наследования, Р — рецессивная модель наследования

Полиморфизм	Модель	Генотип / аллель	Группа сравнения	Основная группа	p	ОШ (95% ДИ)
Гены метаболизма						
rs7085104 (<i>AS3MT</i>)	А	Аллель А	63%	76,4%	0,0004	1,9 (1,33–2,72)
		Аллель G	37%	23,65		0,53 (0,37–0,75)
	Г	A/A	86 (40,8%)	72 (59,5%)	0,0020	2,14 (1,35–3,37)
		A/G	94 (44,5%)	41 (33,9%)		0,64 (0,4–1,01)
		G/G	31 (14,7%)	8 (6,6%)		0,41 (0,18–0,93)
	Д	AA	86 (40,8%)	72 (59,5%)	0,0010	2,14 (1,35–3,37)
		AG/GG	125 (59,2%)	49 (40,5%)		0,47 (0,30–0,74)
	Р	AA/AG	180 (85,3%)	113 (93,4%)	0,0330	2,43 (1,08–5,48)
		GG	31 (14,7%)	8 (6,6%)		0,41 (0,18–0,93)
	rs7590720 (<i>PECR</i>)	А	Аллель А	72,3%	64%	0,0300
Аллель G			27,7%	36%	1,46 (1,04–2,05)	
Г		A/A	109 (51,7%)	50 (41,3%)	0,0790	0,66 (0,42–1,04)
		A/G	87 (41,2%)	55 (45,5%)		1,19 (0,76–1,86)
		G/G	15 (7,1%)	16 (13,2%)		1,99 (0,95–4,19)
Д		AA	109 (51,7%)	50 (41,3%)	0,0870	0,66 (0,42–1,04)
		AG/GG	102 (48,3%)	71 (58,7%)		1,52 (0,97–2,38)
Р		AA/AG	196 (92,9%)	105 (86,8%)	0,0780	0,5 (0,24–1,06)
		GG	15 (7,1%)	16 (13,2%)		1,99 (0,95–4,19)

Продолжение таблицы 2

Полиморфизм	Модель	Генотип / аллель	Группа сравнения	Основная группа	p	ОШ (95% ДИ)
rs73229090 (EPHX2)	А	Аллель А	9%	13,2%	0,0900	1,54 (0,93–2,54)
		Аллель С	91%	86,8%		0,65 (0,39–1,07)
	Г	А/А	0 (0,0%)	3 (2,5%)	0,0490	12,49 (0,64–243,96)
		А/С	38 (18,0%)	26 (21,5%)		1,25 (0,71–2,18)
		С/С	173 (82,0%)	92 (76,0%)		0,7 (0,40–1,20)
	Д	АА	0 (0,0%)	3 (2,5%)	0,0480	12,49 (0,64–243,96)
		АС/СС	211 (100,0%)	118 (97,5%)		0,08 (0,00–1,56)
	Р	АА/АС	38 (18,0%)	29 (24,0%)	0,2030	1,44 (0,83–2,48)
СС		173 (82,0%)	92 (76,0%)	0,7 (0,40–1,20)		
rs1109501 (MUC7)	А	Аллель А	25,4%	34,3%	0,0100	1,54 (1,03–2,17)
		Аллель G	74,6%	65,7%		0,65 (0,46–0,92)
	Г	А/А	13 (6,2%)	15 (12,4%)	0,0460	2,16 (0,99–4,70)
		А/G	81 (38,4%)	53 (43,8%)		1,25 (0,79–1,97)
		G/G	117 (55,5%)	53 (43,8%)		0,63 (0,40–0,98)
	Д	АА/AG	94 (44,5%)	68 (56,2%)	0,0520	1,6 (1,02–2,51)
		GG	117 (55,5%)	53 (43,8%)		0,63 (0,40–0,98)
	Р	АА	13 (6,2%)	15 (12,4%)	0,0640	2,16 (0,99–4,70)
AG/GG		198 (93,8%)	106 (87,6%)	0,46 (0,21–1,01)		
rs3735025 (DGKI)	А	Аллель С	37,7%	48,3%	0,0070	1,55 (1,12–2,13)
		Аллель Т	62,3%	51,7%		0,65 (0,47–0,89)
	Г	С/С	37 (17,5%)	27 (22,3%)	0,0100	1,35 (0,77–2,36)
		С/Т	85 (40,3%)	63 (52,1%)		1,61 (1,03–2,53)
		Т/Т	89 (42,2%)	31 (25,6%)		0,47 (0,29–0,77)
	Д	СС	37 (17,5%)	27 (22,3%)	0,3130	1,35 (0,77–2,36)
		СТ/ТТ	174 (82,5%)	94 (77,7%)		0,74 (0,42–1,29)
	Р	СС/СТ	122 (57,8%)	90 (74,4%)	0,0030	2,12 (1,30–3,46)
ТТ		89 (42,2%)	31 (25,6%)	0,47 (0,29–0,77)		
rs11191580 (NT5C2)	А	Аллель С	8,3%	8,3%	0,9900	1 (0,56–1,77)
		Аллель Т	91,7%	91,7%		1 (0,57–1,78)
	Г	С/С	0 (0,0%)	1 (0,8%)	0,4530	5,27 (0,21–130,28)
		С/Т	35 (16,6%)	18 (14,9%)		0,88 (0,47–1,63)
		Т/Т	176 (83,4%)	102 (84,3%)		1,07 (0,58–1,96)
	Д	СС	0 (0,0%)	1 (0,8%)	0,3640	5,27 (0,21–130,28)
		СТ/ТТ	211 (100,0%)	120 (99,2%)		0,19 (0,01–4,70)
	Р	СС/СТ	35 (16,6%)	19 (15,7%)	0,8780	0,94 (0,51–1,72)
ТТ		176 (83,4%)	102 (84,3%)	1,07 (0,58–1,96)		
Гены регуляции						
rs56205728 (BUB1B-PAK6)	А	Аллель А	31,3%	38,8%	0,1858	1,4 (1,01–1,94)
		Аллель G	68,7%	61,2%		0,72 (0,52–1,10)

Продолжение таблицы 2

Полиморфизм	Модель	Генотип / аллель	Группа сравнения	Основная группа	p	ОШ (95% ДИ)
	Г	A/A	30 (14,2%)	24 (19,8%)	0,1880	1,49 (0,83–2,69)
		A/G	72 (34,1%)	46 (38,0%)		1,18 (0,74–1,88)
		G/G	109 (51,7%)	51 (42,1%)		0,68 (0,43–1,07)
	Д	AA/AG	102 (48,3%)	70 (57,9%)	0,1100	1,47 (0,93–2,30)
		GG	109 (51,7%)	51 (42,1%)		0,68 (0,43–1,07)
	Р	AA	30 (14,2%)	24 (19,8%)	0,2160	1,49 (0,83–2,69)
AG/GG		181 (85,8%)	97 (80,2%)	0,67 (0,37–1,21)		
rs6902771 (ESR1)	А	Аллель С	53,1%	47,5%	0,1700	0,8 (0,58–1,10)
		Аллель Т	46,9%	52,5%		1,25 (0,91–1,71)
	Г	C/C	68 (32,2%)	34 (28,1%)	0,3920	0,82 (0,50–1,34)
		C/T	88 (41,7%)	47 (38,8%)		0,89 (0,56–1,40)
		T/T	55 (26,1%)	40 (33,1%)		1,4 (0,86–2,28)
	Д	CC	68 (32,2%)	34 (28,1%)	0,4600	0,82 (0,50–1,34)
		CT/TT	143 (67,8%)	87 (71,9%)		1,22 (0,75–1,99)
	Р	CC/CT	156 (73,9%)	81 (66,9%)	0,2070	0,71 (0,44–1,16)
		TT	55 (26,1%)	40 (33,1%)		1,4 (0,86–2,28)
	rs2273500 (CHRNA4)	А	Аллель С	20,1%	19,8%	0,9200
Аллель Т			79,9%	80,2%	1,02 (0,69–1,51)	
Г		C/C	4 (1,9%)	6 (5,0%)	0,1620	2,7 (0,75–9,76)
		C/T	77 (36,5%)	36 (29,8%)		0,74 (0,46–1,19)
		T/T	130 (61,6%)	79 (65,3%)		1,17 (0,74–1,87)
Д		CC	4 (1,9%)	6 (5,0%)	0,1790	2,7 (0,75–9,76)
		CT/TT	207 (98,1%)	115 (95,0%)		0,37 (0,10–1,34)
Р		CC/CT	81 (38,4%)	42 (34,7%)	0,5560	0,85 (0,54–1,36)
	TT	130 (61,6%)	79 (65,3%)	1,17 (0,74–1,87)		
rs4356203 (PIK3C2A)	А	Аллель А	54,3%	50,4%	0,3400	0,86 (0,62–1,18)
		Аллель G	45,7%	49,6%		1,17 (0,85–1,60)
	Г	A/A	65 (30,8%)	27 (22,3%)	0,1920	0,65 (0,38–1,08)
		A/G	99 (46,9%)	68 (56,2%)		1,45 (0,93–2,28)
		G/G	47 (22,3%)	26 (21,5%)		0,95 (0,56–1,64)
	Д	AA	65 (30,8%)	27 (22,3%)	0,1000	0,65 (0,38–1,08)
		AG/GG	146 (69,2%)	94 (77,7%)		1,55 (0,92–2,60)
	Р	AA/AG	164 (77,7%)	95 (78,5%)	0,8910	1,05 (0,61–1,80)
GG		47 (22,3%)	26 (21,5%)	0,95 (0,56–1,64)		
rs17504622	А	Аллель С	94,3%	92,1%	0,2800	0,71 (0,38–1,32)
		Аллель Т	5,7%	7,9%		1,41 (0,76–2,64)
	Г	C/C	191 (90,5%)	107 (88,4%)	0,4950	0,8 (0,39–1,65)
		C/T	16 (7,6%)	9 (7,4%)		0,98 (0,42–2,29)
		T/T	4 (1,9%)	5 (4,1%)		2,23 (0,59–8,47)

Окончание таблицы 2

Полиморфизм	Модель	Генотип / аллель	Группа сравнения	Основная группа	p	ОШ (95% ДИ)
	Д	СС	191 (90,5%)	107 (88,4%)	0,5750	0,8 (0,39–165)
		СТ/ТТ	20 (9,5%)	14 (11,6%)		1,25 (0,61–2,57)
	Р	СС/СТ	207 (98,1%)	116 (95,9%)	0,2950	0,45 (0,12–1,70)
		ТТ	4 (1,9%)	5 (4,1%)		2,23 (0,59–8,47)
Гены клеточного транспорта						
rs237238 (H1P1)	А	Аллель А	88,6%	81%	0,0070	0,55 (0,35–0,85)
		Аллель G	11,4%	19%		1,83 (1,18–2,84)
	Г	A/A	165 (78,2%)	85 (70,2%)	0,0030	0,66 (0,40–1,09)
		A/G	44 (20,9%)	26 (21,5%)		1,04 (0,60–1,79)
		G/G	2 (0,9%)	10 (8,3%)		9,41 (2,03–43,72)
	Д	AA	165 (78,2%)	85 (70,2%)	0,1140	0,66 (0,40–1,09)
		AG/GG	46 (21,8%)	36 (29,8%)		1,52 (0,91–2,53)
	Р	AA/AG	209 (99,1%)	111 (91,7%)	0,0010	0,11 (0,02–0,49)
		GG	2 (0,9%)	10 (8,3%)		9,41 (2,03–43,72)
	rs2007044 (CACNA1C)	А	Аллель А	57,8%	63,6%	0,1400
Аллель G			42,2%	36,4%	0,78 (0,57–1,08)	
Г		A/A	89 (42,2%)	52 (43,0%)	0,0430	1,03 (0,66–1,62)
		A/G	66 (31,3%)	50 (41,3%)		1,55 (0,97–2,46)
		G/G	56 (26,5%)	19 (15,7%)		0,52 (0,29–0,92)
Д		AA	89 (42,2%)	52 (43,0%)	0,9090	1,03 (0,66–1,62)
		AG/GG	122 (57,8%)	69 (57,0%)		0,97 (0,62–1,57)
Р		AA/AG	155 (73,5%)	102 (84,3%)	0,0290	1,94 (1,09–3,45)
		GG	56 (26,5%)	19 (15,7%)		0,52 (0,29–0,92)

Анализ полиморфизма rs7085104 (*AS3MT*) показал наличие статистически значимых различий в распределении частот генотипов между группами: генотипом, ассоциированным с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости, является AA — ОШ = 2,14 [95% ДИ = (1,35–3,37)], а генотип G/G ассоциирован с протективным эффектом — ОШ = 0,41 [95% ДИ = (0,18–0,93)]. Сравнение двух групп по распределению генотипов полиморфного варианта rs7590720 (*PECR*) не показало статистически значимых различий, однако были выявлены статистически значимые различия при сравнении этих групп по аллельному составу — аллель G является риск-ассоциированным аллелем — ОШ = 1,46 [95% ДИ = (1,04–2,05)]. Анализ полиморфизма rs73229090 (*EPHX2*) показал наличие статистически значимых

различий в распределении частот генотипов между группами, однако четко выделить риск-ассоциированный генотип не представляется возможным. Сравнение групп по распределению генотипов по полиморфизму rs1109501 (*MUC7*) показало наличие статистически значимых различий: аллелем, ассоциированным с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости, является А — ОШ = 1,54 [95% ДИ = (1,03–2,17)]. Статистически значимые различия были выявлены и при сравнении двух групп по полиморфизму rs3735025 (*DGKI*): генотип СТ оказался риск-ассоциированным — ОШ = 1,61 [95% ДИ = (1,03–2,52)]. При сравнении аллельного состава обеих групп было выявлено, что риск-ассоциированным аллелем является С — ОШ = 1,55 [95% ДИ = (1,12–2,13)]. При срав-

нении двух групп по распределению генотипов по полиморфизму rs237238 (*HIP1*) также выявлены статистически значимые различия: риск-ассоциированным генотипом является GG — ОШ = 9,41 [95% ДИ = (2,03–43,72)]; риск-ассоциированной аллелью является G — ОШ = 1,83 [95% ДИ = (1,18–2,84)]. Также при сравнении обеих групп по rs2007044 (*CACNA1C*) выявлены статистически значимые различия, риск-ассоциированные генотипы — AA/AG, — ОШ = 1,94 [95% ДИ = (1,09–3,45)].

Анализ полиморфных вариантов rs6902771 (*ESR1*), rs11191580 (*NT5C2*), rs17504622, rs2273500 (*CHRNA4*) и rs4356203 (*PIK3C2A*) не выявил статистически значимых различий в распределении генотипов и аллелей между основной группой и группой сравнения.

Взаимодействия исследуемых полиморфных вариантов генов у лиц с наркотической зависимостью

Моделирование взаимодействия исследуемых полиморфных вариантов генов было проведено с учетом всей полученной в процессе молекулярно-генетического анализа информации. Преимуществом использованного MDR-анализа является возможность оценить совокупные взаимодействия, ассоциированные с формированием мультифак-

ториального фенотипа. Дерево кластеризации, отражающее характер взаимодействия полиморфных вариантов при наркотической зависимости, представлено на рисунке 1. В результате моделирования сформированы два кластера, каждый из которых состоял из двух субкластеров: «Кластер 1» — «Субкластер 1.1» *BUB1B-PAK6* (rs56205728) и *DGKI* (rs3735025), «Субкластер 1.2» *NT5C2* (rs11191580), *HIP1* (rs237238), *EPHX2* (rs73229090), *ESR1* (rs6902771) и *CHRNA4* (rs2273500); «Кластер 2» — «Субкластер 2.1» *PIK3C2A* (rs4356203), *AS3MT* (rs7085104), «Субкластер 2.2» *CACNA1C* (rs2007044); 2.2. rs17504622, *PECR* (rs7590720) и *MUC7* (rs1109501).

Анализ дерева кластеризации позволяет сделать следующие заключения:

- для взаимодействия полиморфных локусов rs6902771 (*ESR1*) и rs2273500 (*CHRNA4*), а также rs7085104 (*AS3MT*) и rs2007044 (*CACNA1C*) характерен синергический эффект (линии темно-серого цвета);

- взаимодействия полиморфных локусов rs56205728 (*BUB1B-PAK6*) и rs3735025 (*DGKI*), а также rs7590720 (*PECR*) и rs1109501 (*MUC7*) обладают эффектом, близким к синергическому (линия серого цвета);

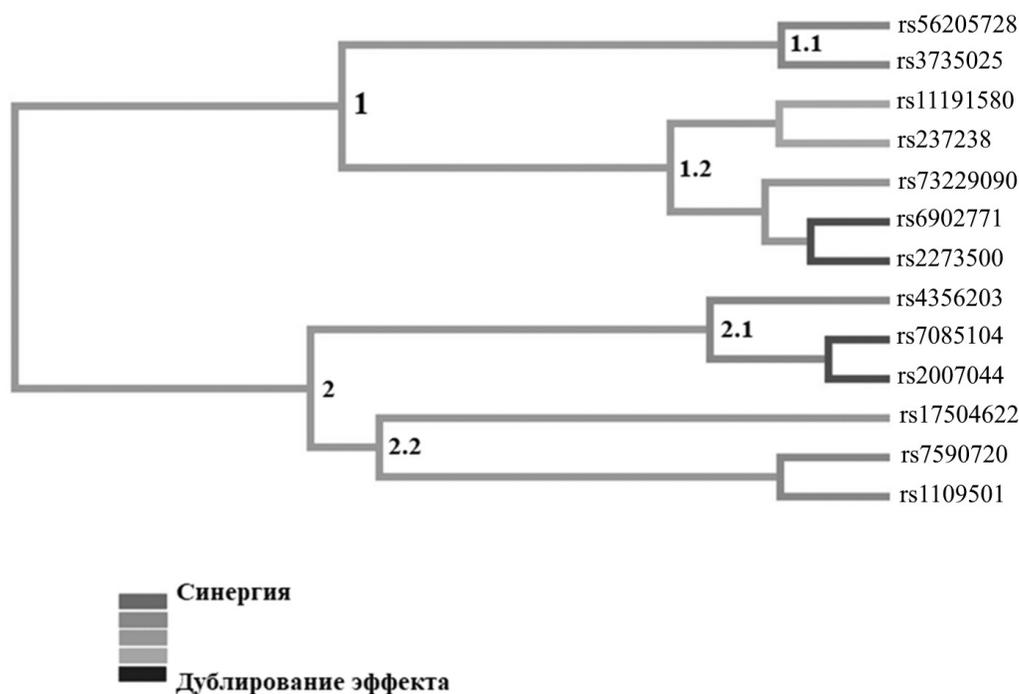


Рис. 1. Взаимодействия полиморфных вариантов генов в увеличении вероятности развития наркотической зависимости

– взаимодействие полиморфных локусов rs1191580 (*NT5C2*) и rs237238 (*HIP1*) имеет аддитивный эффект (линия светло-серого цвета);

– все остальные взаимодействия являются нейтральными.

Результаты моделирования межгенных взаимодействий позволили определить две статистически значимых модели, ассоциированные с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости. Модель № 1 включает четыре полиморфизма: rs2007044 (*CACNA1C*), генотипы AA/AG и GG // rs7085104 (*AS3MT*), генотипы AA и AG/GG // rs3735025 (*DGK1*), генотипы CC/CT и TT // rs237238 (*HIP1*), генотипы AA/AG и GG. Модель № 2 включает два полиморфизма: rs7085104 (*AS3MT*), генотипы AA, AG и GG // rs2007044 (*CACNA1C*), генотипы AA, AG и GG.

Сбалансированная точность предсказания для модели № 1 составила 70,24%, чувствительность — 65,93%, специфичность — 80,62%,

воспроизводимость — 100/100 (рис. 2); для Модели № 2 сбалансированная точность предсказания — 67,87%, чувствительность — 90,24%, специфичность — 72,73%, воспроизводимость — 100/100 (рис. 3).

В рамках Модели № 1 ассоциированным с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости генотипом является: AA/AG (rs2007044, *CACNA1C*) // AA (rs7085104, *AS3MT*) // CC/CT (rs3735025, *DGK1*) // AA/AG (rs237238, *HIP1*), — ОШ = 4,68 (95% ДИ = [2,77–7,90]), $p < 0,0001$. В то же время протективный эффект показан при наличии генотипов: AA/AG (rs2007044, *CACNA1C*) // AG/GG (rs7085104, *AS3MT*) // CC/CT (rs3735025, *DGK1*) // AA/AG (rs237238, *HIP1*) — ОШ = 0,41 (95% ДИ = [0,23–0,72]), $p = 0,0021$; GG (rs2007044, *CACNA1C*) // AA (rs7085104, *AS3MT*) // CC/CT (rs3735025, *DGK1*) // AA/AG (rs237238, *HIP1*) — ОШ = 0,27 (95% ДИ = [0,08–0,95]), $p = 0,0405$.

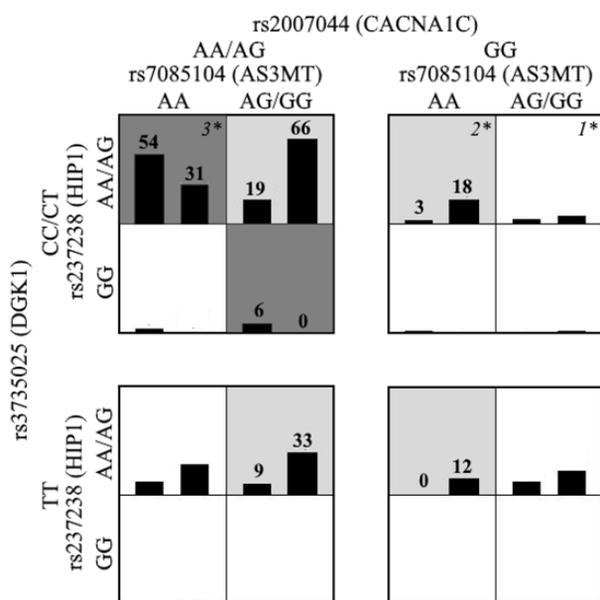


Рис. 2. Комбинации генотипов в рамках Модели № 1 для полиморфных вариантов rs2007044 (*CACNA1C*), rs7085104 (*AS3MT*), rs3735025 (*DGK1*) и rs237238 (*HIP1*) при наркотической зависимости 1* (белый цвет) — различия между частотой встречаемости генотипа в основной группе и группе сравнения статистически незначимы; 2* (светло-серый цвет) — сочетание генотипов, связанное с низкой вероятностью развития наркотической зависимости (протективный эффект); 3* (темно-серый цвет) — сочетание генотипов, связанное с высокой вероятностью развития наркотической зависимости (риск-ассоциированный эффект)

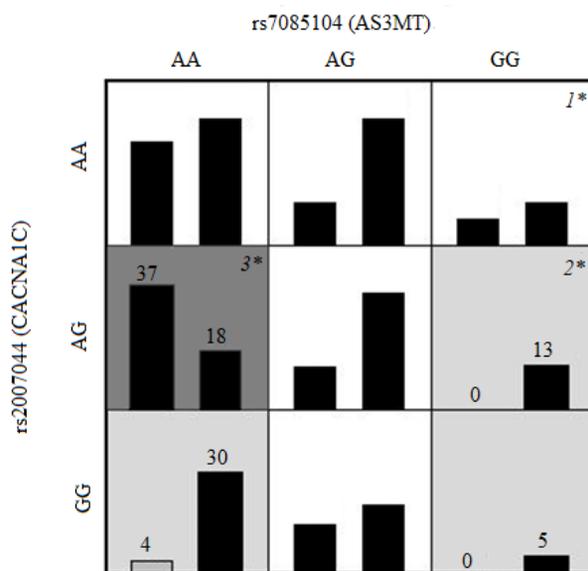


Рис. 3. Комбинации генотипов в рамках Модели № 2 для полиморфных вариантов rs7085104 (*AS3MT*) и rs2007044 (*CACNA1C*) при наркотической зависимости 1* (белый цвет) — различия между частотой встречаемости генотипа в основной группе и группе сравнения статистически незначимы; 2* (светло-серый цвет) — сочетание генотипов, связанное с низкой вероятностью развития наркотической зависимости (протективный эффект); 3* (темно-серый цвет) — сочетание генотипов, связанное с высокой вероятностью развития наркотической зависимости (риск-ассоциированный эффект)

В рамках Модели № 2 ассоциированным с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости генотипом является: AA (rs7085104, *AS3MT*) // AG (rs2007044, *CACNA1C*) — ОШ = 4,72 (95% ДИ = [2,54–8,77]), $p < 0,0001$. Выраженный протективный эффект показан при наличии генотипа: AA (rs7085104, *AS3MT*) // GG (rs2007044, *CACNA1C*) — ОШ = 0,19 (95% ДИ = [0,07–0,55]), $p = 0,0023$.

Роль полиморфизма анализируемых генов в контексте развития аддиктивных расстройств. Ген *AS3MT* (arsenite methyltransferase, NCBI GeneID: 57412) катализирует перенос метильной группы от S-аденозил-L-метионина в трехвалентный мышьяк и играет важную роль в метаболизме мышьяка [13]. Известно, что токсичность мышьяка связана с дисфункцией центральной нервной системы (ЦНС) и развитием психопатических состояний [14, 15]. Изучение полиморфизма данного гена является перспективным для поиска причин развития нарушений высшей нервной деятельности и аддиктивного поведения (в том числе и наркомании), учитывая наличие доказательств его ассоциации с шизофренией и аффективными расстройствами [11, 16]. Поскольку мышьяк способен оказывать токсическое действие на ЦНС, можно предположить, что нарушение регуляции метаболизма мышьяка опосредует связь между полиморфным локусом rs7085104 гена *AS3MT* и наркотической зависимостью.

Ген *PECR* (peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase, NCBI GeneID: 55825) кодирует белок, который участвует в удлинении цепи жирных кислот. В научной литературе имеются данные о том, что полиморфные варианты этого гена оказывают влияние на модификацию риска развития алкогольной зависимости [17]. В этих исследованиях полиморфный вариант rs7590720 был достоверно ассоциирован с увеличенным риском развития алкогольной зависимости, а аллель А был определен как риск-ассоциированный. *PECR*, возможно, является ключевым ферментом метаболизма жирных кислот, поскольку он катализирует восстановление ненасыщенных еноил-КоА до насыщенных ацил-КоА, которые затем могут подвергаться окислению в митохондриях для производства энергии. Этот путь особен-

но важен в условиях голодания, когда энергоснабжение переключается с использования глюкозы на жирные кислоты. Как известно, уровень триглицеридов обычно повышен в крови у алкоголиков [18]. При разложении до ацетил-КоА жирные кислоты с нечетной цепью превращаются в пропионил-КоА, что требует карбоксилирования до жирных кислот с четной цепью. Этот этап опосредуется метилмалонил-КоА, промежуточным звеном, образованным основными кофакторами метил-тетрагидрофолатом в качестве донора метила и витамином В12. Таким образом, дефицит фолата, часто наблюдаемый у пациентов с алкогольной зависимостью [19], может мешать этому пути и препятствовать доступу достаточного количества ацетил-КоА. Экспрессия *PECR* наиболее высокая в печени, за ней следуют почки, мышечная ткань, легкие и сердце [20].

EPHX2 (epoxide hydrolase 2, NCBI GeneID: 2053) кодирует белок, являющийся членом семейства эпоксидгидролаз. Белок, содержащийся как в цитоплазме, так и в пероксисомах, связывается со специфическими эпоксидами и превращает их в соответствующие дигидроидолы. Существуют многочисленные сообщения о связи полиморфизма rs73229090 с увеличенным риском развития шизофрении [21–24].

MUC7 (mucin 7, secreted, NCBI GeneID: 4589) кодирует слюнный муцин, который, как полагают, играет роль в облегчении клиренса бактерий в полости рта и помогает в жевании и глотании. Центральный домен этого гликопротеина содержит тандемные повторы, каждый из которых состоит из 23 аминокислот. Этот белок обладает антибактериальным и противогрибковым действием. В научной литературе имеются данные о тесной связи аллеля G полиморфизма rs1109501 с развитием алкогольной зависимости [25]. Кроме того, была выявлена связь гена *MUC7* с диабетической нефропатией при диабете 1 типа [26]. Данные, представленные на UniProtKB [<https://www.uniprot.org/>], указывают также на то, что продукт гена *MUC7* поэтапно добавляет углеводы или производные углеводных остатков к первоначально добавленному O-связанному остатку (обычно GalNAc) для образования основной структуры O-гликана, тем самым принимая участие

в формировании гликанов. Как известно, гликаны зачастую формируют комплексные соединения с другими типами молекул, из-за чего формируются такие типы соединений, как гликолипиды, гликопротеины и протеогликаны. Основная функция гликолипидов в организме — служить сайтами узнавания для межклеточных взаимодействий. Гликолипиды связываются с конкретным компонентным углеводом или с лектином (углеводсвязывающим белком) соседней клетки. Взаимодействие этих маркеров является основой распознавания клеток и инициирует клеточные ответы [27], в частности гликофосфолипиды, которые в основном расположены в нервной ткани и отвечают за передачу сигналов клетками [28], а также цереброзиды — группа гликофинголипидов, входящих в состав мембран нервных клеток [29]. В контексте определения роли гена *MUC7* в развитии наркотической зависимости стоит также упомянуть и о протеогликанах, так как они могут влиять на активность и стабильность белков и сигнальных молекул в цитоплазме клеток [30, 31]. Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о том, что полиморфные варианты гена *MUC7*, в частности rs1109501, способны оказывать влияние на формирование гликолипидов и протеогликанов, молекулы которых задействованы в том числе в передаче сигналов и формировании нервной ткани, увеличивая тем самым риск развития такой формы аддиктивного поведения, как наркотическая зависимость.

DGKI (diacylglycerol kinase iota, NCBI GeneID: 9162) является членом подсемейства диацилглицеринкиназы IV типа. Диацилглицеринкиназы регулируют внутриклеточную концентрацию диацилглицерина посредством его фосфорилирования с образованием фосфатидной кислоты. В литературе имеются многочисленные упоминания о том, что полиморфный вариант rs3735025 этого гена тесно связан с увеличенным риском развития шизофрении [32–36] и расстройств аутистического спектра [37]. Продукт экспрессии данного гена принимает непосредственное участие в глутаматергической синаптической передаче сигнала, глутамат является одним из важнейших нейромедиаторов, что, в свою очередь, может объяснять влияние полиморфных вариантов данного гена

на риск развития нарушений высшей нервной деятельности, в том числе и наркотической зависимости [38].

BUB1-PAK6 (NCBI GeneID: 106821730) представляет собой продукт сквозной транскрипции между генами *BUB1B* (UB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B) и *PAK6* (p21 (RAC1) activated kinase 6). Белок, кодируемый сквозными транскриптами, такой же, как продукт ниже лежащего гена (*PAK6*), поэтому в дальнейшем обсуждении целесообразно рассматривать только ген *PAK6*. Серин/треониновая протеинкиназа играет роль в регуляции транскрипции генов. Киназная активность индуцируется различными эффекторами, например, андрогенами, фосфорилирует ДНК-связывающий домен рецептора андрогена и тем самым ингибирует андроген-опосредованную транскрипцию; также подавляет транскрипцию, опосредованную ESR1 (рецептор эстрогена 1). По данным UniProtKB, продукт данного гена вовлечен в моторное, ассоциативное и неассоциативное обучение у детей, разветвление нейритов (генерация и организация ветвей нейронов) [39–41], расширение нейритов (рост на большие расстояния отростков одного нейрона) [42], в передачу сигналов путем фосфорилирования белков, а также в сигнальный каскад стресс-активируемого фосфорилирования белков. Полиморфный локус rs56205728, как сообщается, задействован в формировании шизофрении [32, 43], при этом в обоих исследованиях аллелем повышенного риска являлся А. Исходя из описанного выше, можно предположить, что полиморфные локусы сквозной транскрипции *BUB1-PAK6* вообще и *PAK6* в частности способны оказывать значительное влияние на формирование нейронов, их отростков и связей между нейронами, что, несомненно, может отразиться на психическом здоровье человека.

HIP1 (huntingtin interacting protein 1, NCBI GeneID: 106821730) кодирует мембраносвязанный белок, который участвует в кластин-опосредованном эндоцитозе и переносе белков внутри клетки [44–46]. Продукт экспрессии этого гена участвует в регуляции передачи сигнала рецепторами AMPA (амин-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота) в центральной нервной системе, регулирует деятельность пресинаптических нервных окончаний, усиливает транскрип-

цию, опосредованную рецепторами андрогенов [47]. По данным UniProtKB, продукт данного гена селективно и нековалентно взаимодействует с рецептором глутамата, а также участвует в транспорте нейромедиаторов, что может объяснять влияние полиморфного локуса rs237238 на риск развития наркотической зависимости. Также стоит отметить, что M. Taylor et al. показали связь между полиморфизмом rs237238 и алкогольной зависимостью у детей, у матерей которых имеется выраженный алкоголизм [48].

CACNA1C (calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C, NCBI GeneID: 775) кодирует субъединицу альфа-1 потенциал-зависимого кальциевого канала. Кальциевые каналы опосредуют приток ионов кальция в клетку при поляризации мембраны. *CACNA1C* необходим для нормального сокращения гладкомышечных клеток кровеносных сосудов и кишечника, а также для нормального регулирования артериального давления благодаря своей роли в сокращении гладкомышечных клеток артерий [49]. Несмотря на то, что продукт экспрессии данного гена широко задействован в мышечных клетках, он также оказывает влияние и на мозговую ткань. Так, F. Zheng et al. [50] выявили значимую связь между генотипом по полиморфизму rs2007044 и площадью поверхности правой дорсолатеральной префронтальной коры и левой верхней теменной коры у человека. Обе области демонстрировали одинаковый характер эффектов взаимодействия: пациенты, которые были носителями аллеля G, демонстрировали уменьшенную площадь кортикальной поверхности по сравнению с гомозиготами AA. Обе эти области головного мозга вовлечены в патофизиологию шизофрении [51]. *CACNA1C* играет решающую роль в регулировании потенциал-зависимого притока кальция, который, в свою очередь, модулирует передачу сигналов, включая регуляцию некоторых зависимых от кальция генов, таких как нейротрофический фактор головного мозга [52]. Также известно, что варианты rs2007044 могут изменять эффективность связывания фактора транскрипции и изменять промоторную активность гена *CACNA1C* [53]. Данные факты подтверждают связь полиморфных локусов гена *CACNA1C* с

нарушениями высшей нервной деятельности, в том числе с различными формами аддиктивного поведения, например, наркотической зависимостью.

Заключение

Каждая популяция характеризуется своим специфическим соотношением частот встречаемости различных аллелей генов. Проведенный анализ частоты распространения генотипов и аллелей по полиморфным вариантам генов *ESR1*, *AS3MT*, *PECR*, *NT5C2*, *BUB1B-PAK6*, *EPHX2*, *HIP1*, *MUC7*, *CACNA1C*, *CHRNA4*, *DGKI* и *PIK3C2A* позволил определить их вклад в увеличение вероятности возникновения наркотической зависимости среди индивидов из Республики Беларусь. Генетическими маркерами, ассоциированными с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости, являются: генотип AA по полиморфизму rs7085104 (*AS3MT*) — ОШ = 2,14 [95% ДИ = (1,35–3,37)]; аллель A по полиморфизму rs1109501 (*MUC7*) — ОШ = 1,54 [95% ДИ = (1,03–2,17)]; генотипы CC/CT по полиморфизму rs3735025 (*DGKI*) — ОШ = 2,12 [95% ДИ = (1,30–3,46)]; генотип GG по полиморфизму rs237238 (*HIP1*) — ОШ = 9,41 [95% ДИ = (2,03–43,72)]; генотипы AA/AG по полиморфизму rs2007044 (*CACNA1C*) — ОШ = 1,94 [95% ДИ = (1,09–3,45)].

Анализ, направленный на оценку модификации вероятности развития наркотической зависимости при одновременном носительстве полиморфных вариантов исследованных генов, показал, что при одновременном наличии генотипов AA/AG (rs2007044, *CACNA1C*) // AA (rs7085104, *AS3MT*) // CC/CT (rs3735025, *DGKI*) // AA/AG (rs237238, *HIP1*) или AA (rs7085104, *AS3MT*) // AG (rs2007044, *CACNA1C*) вероятность развития заболевания возрастает более чем в 4 раза — ОШ = 4,68 (95% ДИ = [2,77–7,90]) и ОШ = 4,72 (95% ДИ = [2,54–8,77]) соответственно.

Полученные нами результаты демонстрируют важность исследований по оценке значимости совместного вклада ряда независимо действующих или взаимодействующих генов систем метаболизма, регуляции и клеточного транспорта для выявления возможной совокупности маркеров предрасположенности к наркотической зависимости.

Для ряда исследованных полиморфизмов имеется связь с шизофренией, алкоголизмом, расстройствами аутического спектра. В связи с этим полученные нами результаты будут способствовать дальнейшему поиску и анализу общих генетических компонент для аддиктивных заболеваний, включая наркотическую зависимость.

Таким образом, выявление лиц с повышенной вероятностью развития наркотической зависимости на основе молекулярно-генетического анализа является современным подходом в борьбе с данной патологией, так как позволит своевременно провести комплекс профилактических мероприятий.

Исследование частично поддержано грантом БРФФИ № 20151043 от 04.05.2015 г.

Список использованных источников:

1. Всемирный доклад о наркотиках 2018: опиоидный кризис, растущий уровень употребления рецептурных препаратов, рекордные уровни производства кокаина и героина [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.unodc.org/doc/wdr2018/WDR_2018_PressReleaseRUS.PDF. – Дата доступа: 24.08.2020.
2. World Drug Report 2020, booklet 2 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://wdr.unodc.org/wdr2020/field/WDR20_Booklet_2.pdf. – Дата доступа: 24.08.2020.
3. Degenhardt, L. The Global Burden of Disease projects: what have we learned about illicit drug use and dependence and their contribution to the global burden of disease? / L. Degenhardt, H. Whiteford, W. Hall. // *Drug and Alcohol Review*, 2014. – Vol. 33, № 1. – P. 4–12.
4. Personality disorders in early adolescence and the development of later substance use disorders in the general population. / P. Cohen [et al.] // *Drug and Alcohol Dependence*, 2007. – Vol. 88, № 1. – P. 71–84.
5. Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV drug abuse and dependence in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions / W. M. Compton [et al.] // *Archives Of General Psychiatry*, 2007. – Vol. 64, № 5. – P. 566–576.
6. Goldman, D. The genetics of addictions: uncovering the genes / D. Goldman, G. Oroszi, F. Ducci // *Nature Reviews Genetics*, 2005. – Vol. 6, № 7. – P. 521–532.
7. The genetics of addiction—a translational perspective / A. Agrawal [et al.] // *Translational Psychiatry*, 2012. – Vol. 2, № 7. – P. e10–e14.
8. Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins / K. Kendler [et al.] // *Archives Of General Psychiatry*, 2000. – Vol. 57, № 3. – P. 261–269.
9. McGinnis, J Actual causes of death in the United States / J. McGinnis, W. Foege // *JAMA*, 1993. – Vol. 270, №18. – P. 2207–2212.
10. Hupkens, C. Alcohol consumption in the European community: uniformity and diversity in drinking patterns / C. Hupkens, R. Knibbe, M. Drop // *Addiction*, 1993. – Vol. 88, № 10. – P. 1391–1404.
11. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia / S. Ripke [et al.] // *Nature genetics*, 2013. – Vol. 45, № 10. – P. 1150–1159.
12. Sambrook, J., Russel, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / J. Sambrook, D. Russel // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press. / J. Sambrook, D. Russel. – 3rd ed. – New York, 2001. – Chapter 1. – P. 11–14.
13. Sumi, D. Role of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase in arsenic metabolism and toxicity / D. Sumi, S. Himeno // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2012. – Vol. 35, № 11. – P. 1870–1875.
14. Tyler, C. The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review / C. Tyler, A. Allan // *Current environmental health reports*, 2014. – Vol. 1, № 2. – P. 132–147.
15. Ratnaike, R. Acute and chronic arsenic toxicity / R. Ratnaike // *Postgraduate medical journal*, 2003. – Vol. 79, № 933. – P. 391–396.
16. Evidence of AS3MT d2d3-Associated Variants within 10q24.32-33 in the Genetic Risk of Major Affective Disorders / L. Lingyi [et al.] // *Molecular neuropsychiatry*, 2017. – Vol. 2, № 4. – P. 213–218.
17. Genome-wide association study of alcohol dependence / J. Treutlein [et al.]. – *Archives of general psychiatry*, 2009. – Vol. 66, № 7. – P. 773–784.
18. Serum lipids and acyl group composition of alcoholic patients / G. Sun [et al.] // *Alco-*

- hol (Fayetteville, N.Y.), 1988. – Vol. 5, № 2. – P. 153–157.
19. Hamid, A. Decreased expression of transporters reduces folate uptake across renal absorptive surfaces in experimental alcoholism / A. Hamid, J. Kaur // *The Journal of membrane biology*, 2007. – Vol. 220, № 3. – P. 69–77.
20. Das, A. Molecular cloning and expression of mammalian peroxisomal trans-2-enoyl-coenzyme A reductase cDNAs / A. Das, M. Uhler, A. Hajra // *The Journal of biological chemistry*, 2000. – Vol. 275, № 32. – P. 24333–24340.
21. Variability of 128 schizophrenia-associated gene variants across distinct ethnic populations / K. Ohi [et al.] // *Translational psychiatry*, 2017. – Vol. 7, № 1. – P. e1–e16.
22. CalPen (Calculator of Penetrance), a web-based tool to estimate penetrance in complex genetic disorders / A. Addepalli [et al.] // *PloS one*, 2020. – Vol. 15, № 1. – P. e1–e10.
23. A Bayesian framework that integrates multi-omics data and gene networks predicts risk genes from schizophrenia GWAS data / Q. Wang [et al.] // *Nature neuroscience*, 2019. – Vol. 22, № 5. – P. 691–699.
24. Genome-Wide Association Studies Suggest Limited Immune Gene Enrichment in Schizophrenia Compared to 5 Autoimmune Diseases / J. Pouget [et al.] // *Schizophrenia bulletin*, 2016. – Vol. 42, № 5. – P. 1176–1184.
25. A quantitative-trait genome-wide association study of alcoholism risk in the community: findings and implications / A. Heath [et al.] // *Biological psychiatry*, 2011. – Vol. 70, № 6. – P. 513–518.
26. Genome-Wide Association Study of Diabetic Kidney Disease Highlights Biology Involved in Glomerular Basement Membrane Collagen / R. Salem [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2019. – Vol. 30, № 10. – P. 2000–2016.
27. Schnaar, R. Glycolipid-mediated cell-cell recognition in inflammation and nerve regeneration / R. Schnaar // *Archives of biochemistry and biophysics*, 2004. – Vol. 426, № 2. – P. 163–172.
28. Hakomori, S. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling / S. Hakomori, Y. Igarashi // *Journal of biochemistry*, 1995. – Vol. 118, № 6. – P. 1091–1103.
29. Cerebroside synthesis as a measure of the rate of remyelination following cuprizone-induced demyelination in brain / H. Jurevics [et al.] // *Journal of neurochemistry*, 2001. – Vol. 77, № 4. – P. 1067–1076.
30. Syndecan-1 is a novel molecular marker for triple negative inflammatory breast cancer and modulates the cancer stem cell phenotype via the IL-6/STAT3, Notch and EGFR signaling pathways / S. Ibrahim [et al.] // *Molecular cancer*, 2017. – Vol. 16, № 1. – P. e1–e19.
31. Syndecan-1 (CD138) modulates triple-negative breast cancer stem cell properties via regulation of LRP-6 and IL-6-mediated STAT3 signaling / S. Ibrahim [et al.] // *PloS one*, 2013. – Vol. 8, № 12. – P. e1–e14.
32. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci / Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. – *Nature*, 2014. – Vol. 511, № 7510. – P. 421–427.
33. Association of Schizophrenia Risk With Disordered Niacin Metabolism in an Indian Genome-wide Association Study / S. Periyasamy [et al.] // *JAMA psychiatry*, 2019. – Vol. 76, № 10. – P. 1026–1034.
34. Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection / A. Pardiñas [et al.] // *Nature genetics*, 2018. – Vol. 50, № 3. – P. 381–389.
35. Genome-wide association analysis identifies 30 new susceptibility loci for schizophrenia / Z. Li [et al.] // *Nature genetics*, 2017. – Vol. 49, № 11. – P. 1576–1583.
36. Genome-Wide Association Study Detected Novel Susceptibility Genes for Schizophrenia and Shared Trans-Populations/Diseases Genetic Effect / M. Ikeda [et al.] // *Schizophrenia bulletin*, 2019. – Vol. 45, № 4. – P. 824–834.
37. Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia / Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics Consortium // *Molecular autism*, 2017. – Vol. 8, № 21. – P. e1–e17.
38. DGK α regulates presynaptic release during mGluR-dependent LTD / J. Yang [et al.] // *The EMBO journal*, 2011. – Vol. 30, № 1. – P. 165–180.
39. The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology / D. MacLeod [et al.] // *Neuron*, 2006. – Vol. 52, № 4. – P. 587–593.

40. Morley, B. Dendritic spine alterations in the hippocampus and parietal cortex of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor knockout mice / B. Morley, R. Mervis // *Neuroscience*, 2013. – Vol. 233. – P. e1–e20.
41. Dscam expression levels determine presynaptic arbor sizes in *Drosophila* sensory neurons / J. Kim [et al.] // *Neuron*, 2013. – Vol. 78, № 5. – P. 827–838.
42. NRP1 and NRP2 cooperate to regulate gangliogenesis, axon guidance and target innervation in the sympathetic nervous system / C. Maden [et al.] // *Developmental biology*, 2012. – Vol. 369, № 2. – P. 277–285.
43. Genome-wide association study of schizophrenia in Ashkenazi Jews / F. Goes [et al.] // *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 2015. – Vol. 168, № 8. – P. 649–659.
44. The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis / S. Waelter [et al.] // *Human molecular genetics*, 2001. – Vol. 10, № 17. – P. 1807–1817.
45. Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins / S. Mishra [et al.] // *The Journal of biological chemistry*, 2001. – Vol. 276, № 49. – P. 46230–46236.
46. HIP1 and HIP12 display differential binding to F-actin, AP2, and clathrin. Identification of a novel interaction with clathrin light chain / V. Legendre-Guillemain et al.] // *The Journal of biological chemistry*, 2002. – Vol. 277, № 22. – P. 19897–19904.
47. Huntingtin interacting protein 1 modulates the transcriptional activity of nuclear hormone receptors / I. Mills [et al.] // *The Journal of cell biology*, 2005. – Vol. 170, № 2. – P. 191–200.
48. Exploration of a Polygenic Risk Score for Alcohol Consumption: A Longitudinal Analysis from the ALSPAC Cohort / M. Taylor [et al.] // *PloS one*, 2016. – Vol. 11, № 11.
49. Ser1928 phosphorylation by PKA stimulates the L-type Ca^{2+} channel $CaV1.2$ and vasoconstriction during acute hyperglycemia and diabetes / M. Nystoriak [et al.] // *Science signaling*, 2017. – Vol. 10, № 463.
50. The effects of a genome-wide supported variant in the CACNA1C gene on cortical morphology in schizophrenia patients and healthy subjects / F. Zheng [et al.] // *Scientific Reports*, 2016. – Vol. 6, № 34298.
51. Meta-analysis of 41 functional neuroimaging studies of executive function in schizophrenia / M. Minzenberg [et al.] // *Archives of general psychiatry*, 2009. – Vol. 66, № 8. – P. 811–822.
52. Reduced loading of intracellular $Ca(2+)$ stores and downregulation of capacitance $Ca(2+)$ influx in Bcl-2-overexpressing cells / P. Pinton [et al.] // *The Journal of cell biology*, 2000. – Vol. 148, № 5. – P. 857–862.
53. Further evidence for genetic association of CACNA1C and schizophrenia: new risk loci in a Han Chinese population and a meta-analysis / F. Zheng [et al.] // *Schizophrenia research*, 2014. – Vol. 152, № 1. – P. 105–110.

E. V. Snytkov¹, V. N. Kipen², A. A. Alexandrov³, S. B. Melnov¹

ROLE OF GENETIC POLYMORPHISM AND INTERGENIC INTERACTIONS IN THE FORMATION OF DRUG ADDICTION IN HUMAN

¹Educational Institution

“International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University”
23/1, Dolgobrodskaya St., 220070 Minsk, the Republic of Belarus
e-mail: evsnytkov@gmail.com

²State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”
27, Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

³Health Care Institution

“Minsk Regional Clinical Centre “Psychiatry – Narcology”
7, P. Brovki St., 220113 Minsk, the Republic of Belarus

This paper demonstrates the results of molecular genetic analysis of 13 polymorphic gene variants according to the GWAS results associated with the development of addictive states in the group of people with drug addiction ($n = 121$) and in the control ($n = 211$). The main genotyping method is PCR with the subsequent High Resolution Melt of an amplicon and clustering of melting profiles; the melting results are validated using the PCR-RFLP method. Consequently, single-nucleotide polymorphisms associated with an increased likelihood of drug addiction are as follows: AA genotype by the rs7085104 polymorphism (*AS3MT*); A allele by the rs1109501 polymorphism (*MUC7*); CC/CT genotypes by the rs3735025 polymorphism (*DGKI*); GG genotype by the rs237238 polymorphism (*HIP1*); AA/AG genotypes by the rs2007044 polymorphism (*CACNA1C*). In case of the simultaneous presence of genotypes: AA/AG (rs2007044, *CACNA1C*) // AA (rs7085104, *AS3MT*) // CC/CT (rs3735025, *DGKI*) // AA/AG (rs237238, *HIP1*) or AA (rs7085104, *AS3MT*) // AG (rs2007044, *CACNA1C*) — the likelihood of disease development increases more than four times.

Keywords: drug addiction, single nucleotide polymorphism, predisposition, PCR, high resolution melting, intergenic interaction.

Дата поступления статьи: 25 августа 2020 г.

С. Ю. Смирнов, Е. А. Гутковская, В. М. Ходасевич, О. В. Чекун, Е. И. Субоч,
А. С. Портянко, С. А. Красный

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ТЕРАПИИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»
Республика Беларусь, 223040, Минский район, аг. Лесной
e-mail: helen_suboch@mail.ru

Колоректальный рак (КРР) является одним из лидеров по спектру клинически значимых молекулярно-генетических альтераций среди злокачественных новообразований человека. В статье освещены современные представления о прогностической и предиктивной значимости различных молекулярных биомаркеров, характерных для КРР, а также одна из наиболее перспективных на данный момент молекулярных классификаций КРР. Описаны результаты новейших клинических испытаний RAS-, BRAF-, HER2- и NTRK-ингибиторов. Представлены актуальные международные рекомендации по проведению молекулярного тестирования у пациентов с КРР. Продемонстрированы возможности и ограничения использования различных молекулярно-генетических тестов в оценке метастатического потенциала заболевания с целью индивидуализации динамического наблюдения и подходов к лекарственной терапии.

Ключевые слова: колоректальный рак, молекулярные биомаркеры, прогностические факторы, генетическое тестирование, лекарственная терапия.

Введение

Согласно данным Globocan 2018, колоректальный рак (КРР) занимает третье место по частоте встречаемости и второе место по смертности от злокачественных новообразований в мире. В 2018 году было зафиксировано около 1,8 млн новых случаев КРР и более 880 тыс. смертей от данного заболевания. Показатели заболеваемости в различных странах значительно варьируют, около половины всех случаев заболевания регистрируются в странах с высоким уровнем развития (Human Development Index (HDI) $\geq 0,8$) [1]. С учетом текущих показателей к 2030 году ожидается рост заболеваемости и смертности на 60% — более 2,5 млн новых случаев КРР и 1,2 млн смертей от данной патологии [2].

Согласно литературным данным около 40%, всех случаев КРР в развитых странах диагностируется на ранних стадиях. Основным прогностическим фактором в настоящее время остается стадия заболевания: пятилетняя выживаемость пациентов с локализованными формами КРР составляет около 90%, при наличии региональных метастазов — 64–71%, отдаленных — 10–14% [3, 4].

В большинстве европейских стран уровень заболеваемости КРР находится в пределах 30–40 на 100 000 жителей. Республика Беларусь входит в группу стран с высоким уровнем заболеваемости (31,8 на 100 тыс. жителей в 2017 году) и отмечающимся ростом данного показателя с 26,5 на 100 тыс. человек с 2012 года [5].

В целом в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в Республике Беларусь за 2017 год КРР составляет 10,6% и занимает первое место, что соответствует 3159 новым случаям рака ободочной кишки и 2286 случаям рака прямой кишки. В общей структуре смертности от злокачественных новообразований в Республике Беларусь в 2017 году КРР находился на втором месте. Грубый показатель смертности составил 11,2 и 14,6 на 100 тыс. человек, стандартизированный — 5,8 и 7,2 на 100 тыс. человек для рака прямой и ободочной кишки соответственно. В 2017 году от злокачественных новообразований кишечника умерло 2446 пациентов [6].

Основным прогностическим фактором для пациентов в Республике Беларусь, как и в мире, является стадия заболевания. Около 53%

всех случаев КРР в стране диагностируется на I–II стадиях заболевания, при этом общая пятилетняя выживаемость при I–II стадии составляет 61,6% и 68%, при III стадии — 42,5 и 46,4%, при IV стадии — 8,1 и 6,2% для рака ободочной и прямой кишки соответственно [6].

В настоящее время в международной клинической практике используется широкий спектр различных молекулярных биомаркеров прогноза течения заболевания и определения чувствительности к лекарственным средствам при КРР. В связи с высокой актуальностью проблемы злокачественных новообразований толстой кишки ежегодно в мире проводятся десятки тысяч научных исследований, направленных на поиск и валидацию новых биомаркеров.

Основные молекулярно-генетические нарушения при колоректальном раке

Мутационный статус семейства генов RAS

Онкогенные мутации в генах семейства RAS встречаются при широком спектре злокачественных новообразований человека [7]. Бесконтрольная клеточная пролиферация в 40–50% всех случаев КРР вызвана независимой активацией MAPK/ERK-сигнального пути вследствие мутаций генов KRAS и NRAS [8, 9]. Согласно литературным данным, гиперэкспрессия KRAS также играет важную роль в процессах метастазирования опухоли, опосредуя увеличение продукции протеаз, которые деградируют внеклеточный матрикс и индуцируют процессы ангиогенеза [10].

Несмотря на то, что в ранних работах была установлена связь между мутационным статусом гена KRAS и неблагоприятным прогнозом заболевания, результаты научных исследований значительно варьируют. В некоторых работах прогностическая значимость патогенных вариантов в гене KRAS подтверждена только в ассоциации с локализацией заболевания [11], или микросателлитным (MSI) статусом опухоли [12], или не обнаружена вовсе [13]. В последней редакции рекомендаций Национальной всеобщей онкологической сети (National Comprehensive Cancer Network; NCCN) по лечению КРР KRAS-тестирование не рекомендовано для определения прогноза заболевания [14]. В литературных источ-

никах также активно обсуждается вопрос прогностической значимости определенных патогенных вариантов в гене KRAS. Так, в исследовании RASCAL II, включавшем 3439 пациентов с КРР из 35 различных медицинских центров, было обнаружено, что наличие мутации в 12 кодоне гена KRAS ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания [15]. Схожие результаты были получены в результате клинического испытания Alliance N1047 на выборке из 2478 пациентов с III стадией заболевания — пациенты с мутациями в 12 и 13 кодонах гена KRAS характеризовались худшими показателями беспрогрессивной выживаемости [16]. Для более точной оценки прогностической значимости генных альтераций при КРР необходимо проведение дальнейших исследований.

В настоящее время наличие мутаций во 2, 3 и 4 экзонах генов KRAS и NRAS является основным предиктором резистентности опухолей кишечника к терапии EGFR-ингибиторами (Цетуксимаб, Панитумумаб) при метастатической форме КРР [14].

Отдельный интерес представляет разработка лекарственных средств, направленных на инактивацию мутантных форм белка KRAS. В 2019 году начались клинические испытания специфичного KRAS-ингибитора (AMG 510, Sotorasib), который необратимо связывает мутантный белок KRAS G12C, образующийся в результате активирующей мутации с.34G>T во 2 экзоне гена KRAS, и блокирует его в ГДФ-связанном (неактивном) состоянии [17]. Однако, объективный уровень ответа на терапию препаратом у пациентов с КРР составил 7%, а частота контроля заболевания — 70%, что значительно хуже показателей в группе пациентов с раком легкого [18] и может быть обусловлено высокой экспрессией гена EGFR. В исследовании V. Amodio и соавторов продемонстрирована эффективность использования комбинации EGFR-ингибиторов и AMG 510 на клеточных линиях и животных моделях КРР с мутацией KRAS G12C [19].

Мутации в генах RAS являются одним из ранних событий в процессе канцерогенеза опухолей кишечника, поэтому их мутационный статус в метастазах и первичной опухоли в значительной степени коррелируют. В связи с этим для проведения генетического тестиро-

вания возможно использование любого из этих видов биоматериала. В настоящее время не существует каких-либо ограничений по выбору методологии *RAS*-тестирования, однако разные методы исследования обладают различной аналитической чувствительностью, что стоит учитывать на этапе отбора биологического материала. Так, согласно рекомендациям Европейского общества медицинской онкологии (European Society for Medical Oncology; ESMO) по лечению метастатического КРР, при наличии менее 30% опухолевых клеток в биологическом образце возможен ложноотрицательный результат при использовании метода секвенирования, что следует отражать в заключении [20].

Мутационный статус гена *BRAF*

BRAF-активирующие мутации встречаются в 5–15% всех случаев КРР [21]. Более 80% выявляемых мутаций приходится на патогенный вариант р.V600E (с.1799Т>А), который приводит к конститутивной активации белкового продукта гена *BRAF* и, как следствие, *MAPK/ERK*-сигнального пути независимо от активности вышестоящих участников каскада. Этот механизм лежит в основе резистентности *BRAF*-мутантных опухолей к терапии *EGFR*-ингибиторами (Цетуксимаб, Панитумумаб) [22].

Мутации в гене *BRAF*, как правило, встречаются в *MSI*-нестабильных (*MSI-H*) опухолях кишечника [23]. Кроме того, согласно данным крупного мета-анализа, включившего результаты 21 исследования на 9885 пациентах с КРР, установлено, что мутация V600E в гене *BRAF* ассоциирована с такими клинико-морфологическими характеристиками, как локализация опухоли в проксимальном отделе кишечника, степень распространения опухолевого процесса, соответствующая Т4, низкая дифференцировка опухоли [24].

Мутации в генах *KRAS* и *BRAF* не являются взаимоисключающими, однако крайне редко встречаются совместно [25].

Наличие мутации V600E в гене *BRAF* ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания у пациентов с КРР. В исследовании Yukai Wang и соавт., включившем данные 2953 пациентов с метастатическим КРР, медиана общей выживаемости при отсутствии мутаций в генах *RAS/BRAF* и наличии *KRAS*-,

NRAS- или *BRAF*-мутаций составила 49,2 мес., 36,2 мес., 30,1 мес. и 22,5 мес. соответственно ($p < 0,001$) [26]. Отдельный научный интерес представляют более редкие патогенные варианты в гене *BRAF*, встречающиеся в 1–3% случаев при КРР. Пациенты с атипичными *BRAF*-мутациями характеризуются несколько лучшими показателями общей и беспрогрессивной выживаемости в сравнении с теми, у которых выявлена мутация *BRAF* V600E (14,5 мес. против 11,2 мес. и 9,7 мес. против 6,0 мес. соответственно ($p < 0,001$)) [27].

Наличие мутации *BRAF* V600E значительно снижает вероятность ответа опухоли на терапию *EGFR*-ингибиторами, кроме тех случаев, когда они используются совместно с *BRAF*-ингибиторами. Частота ответа на монотерапию у пациентов с КРР в ранних клинических испытаниях была невысокой и составляла 5–16%, а медиана беспрогрессивной выживаемости не превышала 3,5 месяца. Согласно данным последних клинических испытаний по использованию комбинации *BRAF/EGFR/MEK*-ингибиторов частота ответа у пациентов с мутацией *BRAF* V600E составляет 16–48%, а медиана беспрогрессивной выживаемости — от 4,2 до 8 месяцев [28]. Это позволило рекомендовать применение как двойной, так и тройной схем таргетной терапии у пациентов с распространенным *BRAF*-V600E-положительным метастатическим КРР (мКРР) после двух предшествующих линий лечения [14].

Оценка мутационного статуса гена *BRAF* проводится в образцах опухолевой ткани с помощью методов молекулярного секвенирования, аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) или секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing; NGS) [14].

Статус микросателлитной нестабильности (*MSI*)

Микросателлитная нестабильность (*MSI*) отражает наличие дефекта в системе репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (Mismatch Repair; MMR) и характеризуется соматическими альтерациями в микросателлитных повторах. Примерно в 15–20% всех случаев КРР выявляется *MSI*-нестабильный фенотип (*MSI-H*), связанный, в первую очередь, с гиперметилированием гена *MLH1*. В 2–4% случаев *MSI-H*

вариант обусловлен наличием герминальных мутаций в генах системы MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) и дефицитом экспрессии одного или более соответствующих белков (Deficient Mismatch Repair; dMMR), которые приводят к развитию синдрома Линча [29, 30].

В текущих рекомендациях NCCN (Version 4.2020) MSI/MMR-тестирование показано всем пациентам с КРР, а MSI-H/dMMR статус опухоли является предиктивным маркером чувствительности к терапии PD-1- и PD-L1-ингибиторами. При II стадии КРР MSI-H/dMMR фенотип опухоли ассоциирован с благоприятным прогнозом заболевания, что не требует проведения адьювантной терапии 5-фторурацилом. Следует отметить, что низкий уровень дифференцировки опухоли является фактором риска у пациентов с II стадией заболевания вне зависимости от наличия MSI-H/dMMR фенотипа [14].

Согласно результатам новейших научных исследований, при III и IV стадиях КРР MSI-H/dMMR фенотип опухоли, наоборот, является маркером неблагоприятного прогноза заболевания. Данная особенность может быть следствием того, что до 75% MSI-H опухолей кишечника также имеют мутацию *BRAF* V600E, которая является независимым негативным прогностическим фактором у пациентов с КРР [31].

Определение уровня *MSI* проводится методами ПЦР, фрагментного анализа или валидированными панелями NGS. Последняя технология приобретает все большую популярность в связи с возможностью одновременного определения мутационного статуса генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* [14].

Оценка экспрессии белков системы MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) осуществляется иммуногистохимическим (ИГХ) методом. Потеря экспрессии хотя бы одного белка указывает на наличие дефекта в системе MMR и на необходимость проведения дальнейшего генетического исследования для диагностики синдрома Линча. В случае отсутствия окрашивания протеина *MLH1* дальнейший алгоритм предполагает выполнение *BRAF*-тестирования для исключения спорадического КРР, поскольку большинство случаев потери экспрессии белка *MLH1* связано с метилированием его промоторной

области, а не с герминальными мутациями в кодирующем белок гене. Наличие корреляции между *MLH1*-метилированием и *BRAF* V600E генотипом позволяет использовать *BRAF*-диагностику в качестве скринингового теста [32]. Однако около 1% случаев КРР с мутацией *BRAF* V600E и утратой экспрессии *MLH1* могут развиваться в составе синдрома Линча. Поэтому необходимо соблюдать осторожность и не исключать генетическое тестирование у пациентов с *BRAF*-мутацией при наличии семейного онкологического анамнеза [14].

HER2-аберрации

HER2 представляет собой трансмембранный белок, принадлежащий к семейству рецепторов эпидермального фактора роста, кодируемый геном *HER2* (*ERBB2*). Амплификация и/или гиперэкспрессия *HER2* играет важную роль в патогенезе различных злокачественных новообразований человека, а также является биомаркером чувствительности опухолей молочной железы и желудка к препаратам анти-*HER2* терапии *HER2*-ингибиторами [14].

Амплификация гена *ERBB2* наблюдается в 2–3% случаев КРР в общей выборке пациентов и в 6–14% случаев в группе пациентов с *RAS/BRAF* диким типом опухоли [33].

Установлено, что уровень экспрессии *HER2* не является прогностическим маркером у пациентов с КРР [14]. Однако вопрос о потенциальной резистентности опухолей кишечника с наличием амплификации/экспрессии *HER2* к терапии *EGFR*-ингибиторами остается открытым. В проведенном исследовании ($n = 69$) у пациентов с *RAS/BRAF* диким типом КРР медиана беспрогрессивной выживаемости в первой линии лечения (без использования *EGFR*-ингибиторов) была одинакова независимо от уровня амплификации онкогена. При использовании *EGFR*-ингибиторов во второй линии терапии медиана беспрогрессивной выживаемости была значительно ниже при наличии амплификации *HER2* в сравнении с пациентами без амплификации (2,8 мес. против 9,3 мес.) [34].

В то же время в работе G. Bregni и соавт. при анализе результатов клинического испытания HERACLES-A отмечено, что, несмотря на низкий уровень объективного ответа опухоли на проводимую терапию *EGFR*-ингибиторами (ча-

стога объективного ответа (Objective Response Rate; ORR) — 11%), стабилизация заболевания была отмечена у 54% пациентов с амплификацией *HER2*. Это указывает на наличие определенной чувствительности к анти-*EGFR* терапии *HER2*-амплифицирующих опухолей кишечника [35].

Отдельный научный интерес вызывает феномен клональной эволюции опухоли на фоне проводимого лечения. Согласно исследованию F. Pietrantonio амплификация *HER2* может отсутствовать или детектироваться ниже порогового уровня в первичной опухоли, но появляться на фоне использования *EGFR*-ингибиторов. Эта особенность свидетельствует о целесообразности тестирования *HER2*-статуса при КРР после терапии *EGFR*-ингибиторами [36].

Также остается неизученным вопрос клинической значимости активирующих мутаций в гене *ERBB2*, которые согласно данным Атласа генома рака (The Cancer Genome Atlas; TCGA) встречаются в 7% случаев КРР [37]. В работах с использованием клеточных линий и животных моделей показано наличие резистентности к *EGFR*-терапии и потенциальная чувствительность к комбинированной анти-*HER2* терапии *ERBB2*-позитивных опухолей [33].

В настоящее время доказана клиническая эффективность использования *HER2*-ингибиторов у пациентов с КРР при наличии амплификации и/или экспрессии *HER2* и отсутствии мутаций в генах *RAS* и *BRAF*, что позволило включить их в текущие рекомендации NCCN (Version 4.2020) в составе комбинированной терапии (Трастузумаб + Пертузумаб или Лапатиниб) [35, 38–40].

Принципы диагностики *HER2*-статуса (NCCN, Version 4, 2020 г.) [14]:

– используемые методы диагностики: ИГХ, флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), NGS;

– гиперэкспрессия белка HER2 при ИГХ-исследовании диагностируется при наличии окрашивания более чем в 50% клеток с интенсивностью 3+. В случае выявления интенсивности окрашивания, соответствующей 2+, дополнительно выполняется FISH;

– амплификация гена *HER2* при FISH-исследовании диагностируется при наличии соотношения $HER2/CEP17 \geq 2$ более чем в 50% клеток.

В случае обнаружения в опухоли мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* или *BRAF* необходимость в *HER2*-тестировании отсутствует.

Рearанжировки генов семейства *NTRK*

Семейство тропомиозиновых рецепторных киназ включает в себя три трансмембранных белка Trk A, B и C, кодируемых генами *NTRK1*, *NTRK2* и *NTRK3* соответственно. Данные белки являются медиаторами различных эффектов фактора роста нервов, включающих дифференцировку нейронов и избегание апоптоза. Экспрессия Trk, как правило, локализована в тканях нервной системы, где киназы помогают в процессах регуляции болевого ответа, ориентации в пространстве, контролируют аппетит и память [41].

Рearанжировки генов *NTRK* (слитные гены, фьюжен-гены) приводят к транскрипции химерных белков, имеющих онкогенный потенциал. Данные нарушения встречаются примерно в 1% случаев солидных опухолей человека. Однако при некоторых злокачественных новообразованиях частота детекции генных транслокаций возрастает: при секреторной карциноме молочной железы фьюжен-гены с участием *NTRK* обнаруживаются более чем в 90% опухолей, при папиллярном раке щитовидной железы — у 25% пациентов [41, 42].

При КРР частота обнаружения рearанжировок генов *NTRK* составляет от 0,2 до 1%. В большей степени они характерны для опухолей кишечника с диким типом генов *KRAS/NRAS/BRAF* и высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H) [41].

В настоящее время для лечения пациентов со злокачественными новообразованиями, характеризующимися наличием слитных генов *NTRK*, одобрено использование таргетных препаратов группы *NTRK*-ингибиторов (Ларотректиниб и Энтректиниб). Использование ларотректиниба и энтректиниба в группе пациентов с различными злокачественными новообразованиями («корзинное» исследование) позволило достичь частоты ответа на терапию 79% и 57,4%, при этом медиана общей выживаемости составила 44,4 месяца и 20,9 месяцев для данных препаратов соответственно. При КРР показатели ответа на терапию не превысили 50% и 25% для ларотректиниба и энтректиниба соответственно [43, 44].

Как и в случае с ингибитором *KRAS-G12C* (AMG 510), пациенты с КРР характеризуются значительно более низкими показателями ответа на терапию *NTRK*-ингибиторами в сравнении с пациентами, страдающими раком легкого. Возможно, это связано с активностью в опухолях кишечника альтернативных сигнальных путей. Однако, в связи с крайней редкостью данных генетических событий, проведение научных исследований по данному вопросу затруднительно.

В настоящее время одобренными методами детекции *NTRK* фьюжен-генов являются ИГХ, FISH, обратно-транскрибируемая ПЦР (ОТ-ПЦР), NGS ДНК или РНК. При выборе варианта тестирования для скрининга и окончательной диагностики *NTRK* фьюжен-генов важно учитывать имеющиеся ресурсы (материал для исследования, доступ к различным технологиям) и клинический контекст (необходимость одновременного определения различных генетических детерминант). В опухолях, где *NTRK* фьюжен-гены встречаются часто, в качестве основных методов детекции могут использоваться: FISH, ОТ-ПЦР и секвенирование РНК. При тестировании общей выборки пациентов или локализаций, где *NTRK* фьюжен-гены встречаются крайне редко, в качестве 1-й линии скрининга могут быть использованы секвенирование РНК или ИГХ с последующим ДНК-секвенированием положительных результатов. Установлено, что, несмотря на более низкую чувствительность, секвенирование ДНК обладает высокой специфичностью в диагностике *NTRK* фьюжен-генов, что позволяет избежать ложноположительных результатов [41, 45].

Молекулярная классификация КРР

В связи с широким спектром молекулярно-генетических альтераций в КРР, влияющих на прогноз течения заболевания и чувствительность к терапии, было разработано несколько различных вариантов молекулярной классификации данного заболевания: TCGA, CRCA, CCS, CCMS и др. [46].

Наибольшее распространение в настоящее время получила Consensus Molecular Subtypes (CMS) классификация, разработанная Sadanandam и соавт., учитывающая генетические и эпигенетические характеристики опухолевых клеток, экспрессионный профиль

молекулярных маркеров различных сигнальных путей и клинические данные [47]. Данная классификация разделяет КРР на 4 молекулярных подтипа [48]:

– CMS1, или иммунный подтип (14%): гипермутантные опухоли с низкой частотой соматокопийных альтераций (Somatic Copy Number Alterations; SCNA), в большинстве случаев с MSI-H фенотипом, гиперактивацией рецептор-тирозинкиназного (Receptor Tyrosine Kinase; RTK) и митоген-активированного протеинкиназного (Mitogen Activated Protein Kinase; MAPK) сигнального путей, высокой частотой гиперметилирования и *BRAF*-мутаций, характеризующиеся воспалительной инфильтрацией CD8+ лимфоцитами;

– CMS2, или канонический подтип (37%): микросателлитно-стабильные опухоли (Microsatellite Stable; MSS), характеризующиеся хромосомной нестабильностью (Chromosomal Instability; CIN), обусловленной высокой частотой SCNA, гиперактивацией *WNT/MYC* сигнального пути, *EGFR*-амплификацией и гиперэкспрессией мутантного *TP53*, демонстрирующие эпителиальную дифференцировку;

– CMS3, или метаболический подтип (13%): опухоли с низким уровнем CIN, в 30% являющиеся гипермутантными, с умеренной активацией MAPK-сигнального пути и наличием активирующих *KRAS*-мутаций и гиперэкспрессии *IGBP2*.

– CMS4, или мезенхимальный подтип (23%): CIN-гетерогенные опухоли, экспрессирующие гены, участвующие в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП), и сигнатуры, связанные с активацией сигнального пути трансформирующего фактора роста β (Transforming Growth Factor β ; *TGF- β*), характеризующиеся инфильтрацией стромы и сверхэкспрессией белков внеклеточного матрикса.

Еще 13% опухолей имеют смешанные характеристики нескольких молекулярных типов. Данное явление, возможно, вызвано внутриопухолевой гетерогенностью [48].

В ряде исследований обнаружены ассоциации молекулярных подтипов CMS с прогнозом течения заболевания и чувствительностью к химиотерапии. В работе S. Stintzing и соавт., изучавших прогностическое значение CMS-классификации в рамках клинического испытания FIRE-3 (n = 438), независимо от

проведенного лечения CMS-подтипы являлись прогностическим фактором ответа на терапию ($p = 0,023$), беспрогрессивной ($p < 0,001$) и общей выживаемости ($p < 0,001$). CMS2-подтип характеризовался лучшими показателями безрецидивной выживаемости как среди пациентов, получавших терапию цетуксимабом, так и в группе пациентов, получавших бевацизумаб. Показатели пятилетней общей выживаемости при использовании EGFR-ингибиторов были более высокими в случаях CMS2 и CMS4 молекулярных подтипов опухолей, при применении бевацизумаба — при CMS2 подтипе [49].

В клиническом испытании TRIBE-2 ($n = 426$) благоприятный прогноз заболевания отмечен при CMS2-подтипе опухоли, а наиболее неблагоприятный — при CMS1-подтипе. Молекулярный подтип KPP также являлся независимым прогностическим признаком в группе пациентов с высокой частотой встречаемости *RAS*- и *BRAF*-мутаций, в случаях синхронного заболевания и правосторонней локализацией опухоли [50].

Исследование CMS-статуса опухоли проводится методом анализа уровня экспрессии генов с использованием биочиповых технологий на платформах Affimetrix или Agilent, а также методом NGS РНК. Стоит отметить высокую стоимость исследования экспрессии генов с помощью биочипов (до 600\$). Стоимость RNA-секвенирования значительно ниже (до 200\$) и зависит от производительности используемой платформы для NGS. Однако клиническое применение РНК-секвенирования методом NGS для оценки экспрессионного профиля генов ограничено в связи с отсутствием валидированных методик.

В настоящее время в рекомендациях ESMO и NCCN отсутствует информация о возможности использования данной классификации в клинической практике.

Заключение

Быстрое развитие молекулярного тестирования, а также постоянно улучшающееся понимание молекулярных механизмов KPP способствуют вступлению в новую эру индивидуализации терапии онкологических пациентов, основанной на оценке мутационного ландшафта опухоли в сочетании с клинико-

патологическими характеристиками. В настоящее время в Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» в рамках выполнения НИОК(Т)Р «Разработать метод выявления прогностически неблагоприятных форм рака толстой кишки на основе эпигенетических и молекулярно-генетических маркеров» задания «Разработка технологии выявления риска онкологических заболеваний на основе эпигенетических и молекулярно-генетических маркеров» научно-технической программы Союзного государства «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства» («ДНК-идентификация») (сроки выполнения 2017–2021 гг.) ведется разработка инновационной ДНК-технологии, которая позволит определить значимые молекулярно-генетические и эпигенетические маркеры риска рецидивирования и (или) прогрессирования заболевания у пациентов с раком толстой кишки, в том числе с использованием технологии NGS. К текущему моменту в исследование включено 298 пациентов со II-III стадиями KPP.

Результаты данного исследования расширят представление об основных механизмах течения и прогрессирования заболевания, позволят выделить группы повышенного риска возврата болезни, а также использовать изученные маркеры в качестве дополнительных критериев контроля опухолевого роста и коррекции индивидуальной системной противоопухолевой, в том числе мишень-направленной, терапии, что позволит увеличить показатели выживаемости пациентов. Активное внедрение в практику наиболее клинически значимых из них позволит значительно повысить качество оказываемой медицинской помощи пациентам с KPP в Республике Беларусь.

Список использованных источников

1. Colorectal cancer // Globocan 2018 [Electronic resource]. – 2018. – Mode of access: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf. – Date of access: 01.09.2020.

2. Cancer Tomorrow // Globocan 2018 [Electronic resource]. – 2018. – Mode of access: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype>. – Date of access: 01.09.2020.
3. Cancer Stat Facts: Colorectal cancer // National Cancer Institute [Electronic resource]. – 2016. – Mode of access: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>. – Date of access: 01.09.2020.
4. Bowel cancer incidence statistics // Cancer research UK. [Electronic resource]. – 2017. – Mode of access: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bowel-cancer/incidence#heading=Three>. – Date of access: 01.09.2020.
5. Cancer Today Colorectum // Globocan 2018 [Electronic resource]. – 2018. – Mode of access: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>. – Date of access: 01.09.2020.
6. Океанов, А. Е. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2008–2017) / А. Е. Океанов, П. И. Моисеев, Л. Ф. Левин ; под ред. О. Г. Суконко. – Минск : РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова. – 2018. – С. 60–61.
7. Kras. Gene view // Cosmic [Electronic resource]. – 2017. – Mode of access: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?Ln=KRAS#tissue>. – Date of access: 02.12.2017.
8. KRAS Gene Mutation in Colorectal Cancer Is Correlated With Increased Proliferation and Spontaneous Apoptosis / L. Xiuli [et al.] // *AJCP*. – 2015. – Vol. 135. – P. 245–252.
9. ESMO Consensus Guidelines for the Management of Patients with Metastatic Colorectal Cancer / V. Cutsem [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2016. – Vol. 27. – P. 1386–1422.
10. Molecular Events in Primary and Metastatic Colorectal Carcinoma: A Review / R. Kanthan [et al.] // *Patholog. Res. Int.* [Electronic resource]. – 2012. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3357597>. – Date of access: 02.12.2017.
11. Association of Prognostic Value of Primary Tumor Location in Stage III Colon Cancer With RAS and BRAF Mutational Status / J. Taieb [et al.] // *JAMA Oncol.* [Electronic resource]. – 2017. – Mode of access: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/article-abstract/2663951>. – Date of access: 02.12.2017.
12. Prognostic Effect of BRAF and KRAS Mutations in Patients With Stage III Colon Cancer Treated With Leucovorin, Fluorouracil, and Oxaliplatin With or Without Cetuximab A Post Hoc Analysis of the PETACC-8 Trial / J. Taieb [et al.] // *JAMA Oncol.* [Electronic resource]. – 2016. – Vol. 2. – P. 643–653. – Mode of access: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/article-abstract/2481020>. – Date of access: 02.12.2017.
13. Prognostic impact of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal carcinomas: a population-based study / G. Palomba [et al.] // *J. Transl. Med.* [Electronic resource]. – 2016. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5064898>. – Date of access: 02.12.2017.
14. Colon Cancer v.4.2020 // NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf. – Date of access: 01.09.2020.
15. A Review of the Most Promising Biomarkers in Colorectal Cancer: One Step Closer to Targeted Therapy / V. Deschoolmeester [et al.] // *Oncologist* [Electronic resource]. – 2010. – Vol. 15. – P. 699–731. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3228001>. – Date of access: 02.12.2017.
16. Yoon, H. H. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 Alliance) / H.H. Yoon [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 20. – P. 3033–3043.
17. KRAS(G12C)–AMG 510 interaction dynamics revealed by all-atom molecular dynamics simulations / T. Pantzar [et al.] // *Scientific reports* [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-68950-y>. – Date of access: 01.09.2020.
18. CodeBreak 100: Activity of AMG 510, a novel small molecule inhibitor of KRASG12C, in patients with advanced colorectal cancer / M. Fakhri [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2020. – Vol. 38, sup. 5. – P. 4018.
19. EGFR blockade reverts resistance to KRAS G12C inhibition in colorectal cancer / V. Amodio [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2020. – Vol. 10, № 8. – P. 1129–1139.

20. ESMO Consensus Guidelines for the Management of Patients with Metastatic Colorectal Cancer / V. Cutsem [et al.] // *Ann. Oncol.* [Electronic resource]. – 2016. – Vol. 27. – P. 1386–1422.
21. Molecular targeted therapy of *BRAF*-mutant colorectal cancer / M. Ducreux [et al.] // *Ther. Adv. Med. Oncol.* – 2019. – Vol. 11. – P. 1–15.
22. *BRAF* Mutation in Colorectal Cancer: An Update / D. Barras [et al.] // *Biomark. Cancer* [Electronic resource]. – 2015. – Vol. 7. – P. 9–12. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4562608> – Date of access: 02.12.2017.
23. High microsatellite instability (MSI-H) colorectal carcinoma: a brief review of predictive biomarkers in the era of personalized medicine / Z. Gatalica [et al.] // *Fam. Cancer* [Electronic resource]. – 2016. – Vol. 15. – P. 405–412. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4901118> – Date of access: 02.12.2017.
24. Clancy, C. *BRAF* mutation is associated with distinct clinicopathological characteristics in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. / C. Clancy [et al.] // *Colorectal Dis.* – 2013. – Vol. 15, № 12. – P. e711–8.
25. Concomitant *KRAS* and *BRAF* mutations in colorectal cancer / L. Midthun [et al.] // *J. Gastrointest. Oncol.* – 2019. – Vol. 3, №10 – P. 577–581.
26. Distinct impacts of *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations on survival of patients with metastatic colorectal cancer / Y. Wang [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2018. – Vol. 36, № 15. – P. 3513.
27. Atypical non-V600E *BRAF* (a*BRAF*) mutations as a prognostic and predictive factor in real-life metastatic colorectal cancer patients from the Nordic countries // *Oncology Pro (ESMO)* [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: <https://oncologypro.esmo.org/meeting-resources/esmo-world-gi-2020-virtual/short-oral-22-atypical-non-v600e-braf-abraf-mutations-as-a-prognostic-and-predictive-factor-in-real-life-metastatic-colorectal-cancer-patients-f>. – Date of access: 01.09.2020.
28. Treatment Algorithms for MSI and/or *BRAF*-Mutant Metastatic CRC // *Oncology Pro (ESMO)* [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: <https://oncologypro.esmo.org/meeting-resources/esmo-world-gi-2020-virtual/keynote-treatment-algorithms-for-msi-and-or-braf-mutant-metastatic-crc>. – Date of access: 01.09.2020.
29. Microsatellite instability in colorectal cancer / J. N. Nojadedh [et al.] // *EXCLI J.* – 2018. – Vol. 17. – P. 159–168.
30. Prognostic impact of microsatellite instability/mismatch repair deficiency on patients with stage III colon cancer and stage IV colorectal cancers (CRC): analysis of 42,984 patients in the national cancer database (NCDB) / M. Salem // *Oncology Pro (ESMO)* [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: <https://oncologypro.esmo.org/meeting-resources/esmo-world-gi-2020-virtual/short-oral-23-prognostic-impact-of-microsatellite-instability-mismatch-repair-deficiency-on-patients-with-stage-iii-colon-cancer-and-stage-iv-colo>. – Date of access: 01.09.2020.
31. How the *BRAF* V600E Mutation Defines a Distinct Subgroup of Colorectal Cancer: Molecular and Clinical Implications / C. E. Bond [et al.] // *Gastroenterol. Res. Pract.* [Electronic resource]. – 2018. – Mode of access: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30598662>. – Date of access: 01.09.2020.
32. A tailored approach to *BRAF* and *MLH1* methylation testing in a universal screening program for Lynch syndrome / T. Adar [et al.] // *Modern Pathol.* – 2017. – Vol. 30. – P. 440–447.
33. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) oncogene in colorectal cancer / S. Siena [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2018. – Vol. 29, № 5. – P. 1108–1119.
34. Validation of *HER2* Amplification as a Predictive Biomarker for Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Therapy in Metastatic Colorectal Cancer / K. Raghav [et al.] // *JCO Precision Oncology* [Electronic resource]. – 2019. – Vol. 3. – Mode of access: <https://ascopubs.org/doi/full/10.1200/PO.18.00226>. – Date of access: 01.09.2020.
35. *HER2* Amplification and Anti-EGFR Sensitivity in Advanced Colorectal Cancer / G. Bregni [et al.] // *JAMA Oncol.* – 2019. – Vol. 5, № 5. – P. 605–606.
36. Heterogeneity of Acquired Resistance to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies in Patients with Metastatic Colorectal Cancer / F. Pietrantonio [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 10, № 23. – P. 2414–2422.

37. Colorectal cancer // The Cancer Genome Atlas [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: <https://portal.gdc.cancer.gov>. – Date of access: 01.09.2020.
38. Triumph: primary efficacy of a phase ii trial of trastuzumab (T) and pertuzumab (P) in patients (PTS) with metastatic colorectal cancer (MCRC) with HER2 (ERBB2) amplification (AMP) in tumor tissue or circulating tumor DNA (CTDNA): A Gozila Sub-Study // Oncology Pro (ESMO) [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: <https://oncologypro.esmo.org/meeting-resources/esmo-2019-congress/TRIUMPH-Primary-Efficacy-of-a-Phase-II-Trial-of-Trastuzumab-T-and-Pertuzumab-P-in-Patients-pts-with-Metastatic-Colorectal-Cancer-mCRC-with-HER2-ERBB2-Amplification-amp-in-Tumor-Tissue-or-Circulating-Tumor-DNA-ctDNA-A-GOZILA-Sub-study>. – Date of access: 01.09.2020.
39. Phase ii study of pertuzumab and trastuzumab-emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive metastatic colorectal cancer: the HERACLES-B (HER2 amplification for colorectal cancer enhanced stratification, cohort b) trial // Oncology Pro (ESMO) [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: <https://oncologypro.esmo.org/meeting-resources/esmo-2019-congress/Phase-II-Study-of-Pertuzumab-and-Trastuzumab-emtansine-T-DM1-in-Patients-with-HER2-positive-Metastatic-Colorectal-Cancer-the-HERACLES-B-HER2-Amplification-for-Colo-rectal-cancer-Enhanced-Stratification-cohort-B-Trial>. – Date of access: 01.09.2020.
40. Pertuzumab plus trastuzumab for HER2-amplified metastatic colorectal cancer (MyPathway): an updated report from a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study / F. Meric-Bernstam [et al.] // The Lancet Oncology. – 2019. – Vol. 20, № 4. – P.518–530.
41. ESMO recommendations on the standard methods to detect *NTRK* fusions in daily practice and clinical research / C. Marchio [et al.] // Ann. Oncol. – 2019. – Vol. 3, № 9. – P. 1417–1427.
42. Epidemiology of cancers with *NTRK* gene fusion // OncologyPro (ESMO) [Electronic resource]. – 2018. – Mode of access: <https://oncologypro.esmo.org/oncology-in-practice/anti-cancer-agents-and-biological-therapy/targeting-ntrk-gene-fusions/overview-of-cancers-with-ntrk-gene-fusion/ntrk-gene-fusions-as-oncogenic-drivers/epidemiology-of-cancers-with-ntrk-gene-fusion>. – Date of access: 01.09.2020.
43. Larotrectinib in patients with *TRK* fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials / D.S. Hong [et al.] // Lancet oncol. – 2020. – Vol. 21, № 4. – P.531–540.
44. Doebele, R. C. Entrectinib in patients with advanced or metastatic *NTRK* fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1–2 trials / R. C. Doebele [et al.] // Lancet Oncol. – 2020. – Vol. 21, № 2. – P. 271–282.
45. *NTRK* fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls / J. P. Solomon [et al.] // Modern Pathol. – 2020. – Vol. 33. – P. 38–46.
46. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes / N. Rodriguez-Salas [et al.] // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2017. – № 109. – P. 9–19.
47. Molecular pathological classification of colorectal cancer / M. F. Müller [et al.] // Virchows Arch. – 2016. – № 469. – P. 125–134.
48. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. / J. Guinney [et al.] // Nat. Med. – 2015. – № 297. – P. 123–127.
49. Consensus molecular subgroups (cms) of colorectal cancer (crc) and first-line efficacy of folfiri plus cetuximab or bevacizumab in the fire3 (aiokr-0306) trial / S. Stintzing [et al.] // J. clin. Oncol. – 2017. – Vol. 21. – P. 1350–1356.
50. Consensus molecular subtypes and crclassifier classifications in metastatic colorectal cancer (mrc): prognostic and predictive impact in the tribe2 study / b. Borelli // Oncology Pro (ESMO) [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: <https://oncologypro.esmo.org/meeting-resources/esmo-world-gi-2020-virtual/short-oral-20-consensus-molecular-subtypes-and-crclassifier-classifications-in-metastatic-colorectal-cancer-mrc-prognostic-and-predictive-impac>. – Date of access: 01.09.2020.

**S. Y. Smirnov, K. A. Hutkouskaya, V. M. Khadasevich, A. V. Chakun, A. I. Subach, A. S. Portyanko,
S. A. Krasny**

MOLECULAR-GENETIC MARKERS OF COLORECTAL CANCER CHEMOSENSITIVITY

State Institution
“N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus”
223040 Lesnoy Agro-town, Minsk Region, the Republic of Belarus
e-mail: helen_suboch@mail.ru

Colorectal cancer (CRC) is one of the leaders by the spectrum of clinical significant molecular-genetic alterations among human malignant neoplasms. The article highlights contemporary ideas of the prognostic and predictive significance of various molecular biomarkers for colorectal cancer, as well as one of the most perspective molecular classifications of colorectal cancer to date. Results of the latest clinical trials of RAS-, BRAF-, HER2- and NTRK inhibitors are described. Relevant international recommendations for molecular testing in patients with colorectal cancer are provided. Possibilities and limitations of the use of various molecular genetic tests in assessing the metastatic potential of a disease in order to individualize dynamic follow-up and approaches to drug therapy are demonstrated.

Keywords: colorectal cancer, molecular biomarkers, prognostic factors, genetic testing, drug therapy.

Дата поступления статьи: 15 сентября 2020 г.

Ю. М. Капустина, Л. В. Рубаник

ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ В ИЗМЕНЧИВОСТИ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23.
e-mail: kapystinaj@gmail.com

Проведен обзор литературных данных, касающихся рекомбинации в геноме *Chlamydia trachomatis* и ее влияния на изменение биологических свойств патогена. Информация о генетической рекомбинации, ее участках и протяженности позволяет определять изменения вирулентности возбудителя, предсказывать течение патогенетических реакций и развитие иммунного ответа. Практическая значимость обнаружения рекомбинантных изолятов *C. trachomatis*, обладающих детерминантами резистентности к основным группам антибиотиков, заключается в обосновании целесообразности корректировки схем лечения урогенитальной хламидийной инфекции.

Ключевые слова: рекомбинация, вирулентность, геном, хламидиоз, *Chlamydia trachomatis*.

Введение

C. trachomatis — возбудитель урогенитального хламидиоза, способный вызывать развитие тяжелых форм воспалительных процессов урогенитального тракта, различных органных поражений у человека, а также участвовать в формировании патологии плода, новорожденного и ребенка [1, 2].

Все известные серовары вида *C. trachomatis*, определенные на основании различий в главном наружном белке мембраны (Major Outer Membrane Protein, МОМР), в зависимости от типа инфекции, ее локализации (тканевого тропизма), разделены на 3 биовара. Серовары от D до K (также подтипы Da, Ga, Ia, Ja) относятся к биовару, вызывающему развитие урогенитальной инфекции, а L1–L3 (включая подтипы L2a, L2b, L2c) — к биовару возбудителей паховой лимфогранулемы [3–8].

Течение урогенитальной хламидийной инфекции чаще всего характеризуется слабо выраженной клинической симптоматикой, но сопровождается в дальнейшем развитием серьезных осложнений (бесплодие, артропатии и т. д.) [1]. Этому способствует персистенция возбудителя в организме человека и хронизация инфекции за счет присутствия у *C. trachomatis* эффективных механизмов уклонения от иммунного ответа. Все это благоприятствует

широкому распространению возбудителя в популяции человека.

К числу возможных механизмов противостояния иммунологическому давлению со стороны организма человека относят рекомбинационные процессы в геноме возбудителя. Известно, что генетическая рекомбинация у прокариот приводит к возникновению новых комбинаций генов за счет перераспределения генетического материала (ДНК). По молекулярному механизму этот процесс принято классифицировать на законную (гомологичная (общая) и сайт-специфическая рекомбинация, транспозиция) и незаконную рекомбинацию (соединение концов негомологичных участков ДНК при помощи топоизомераз) [9]. Рекомбинация в большей степени характерна для внеклеточных или факультативных внутриклеточных бактерий (роды *Neisseria*, *Yersinia*, *Borrelia*, *Leptospira* и *Anaplasma*), чем для облигатных внутриклеточных патогенов. Среди последних способность к рекомбинации отмечена для *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Wolbachia*, *Anaplasma*, *Coxiella*, *Ehrlichia* и *Orientia* [10, 11].

Отмечается вариабельность значимости генетического обмена для жизнедеятельности микроорганизмов. Существуют виды бактерий с низкой частотой рекомбинации, обладающие высокой клональной стабильностью

(*Mycobacterium spp.*, *Haemophilus influenza*, *Bacillus cereus*), и типичные рекомбинанты, у которых основным источником аллельной изменчивости являются рекомбинационные события (*Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*). Частота рекомбинации (ρ) в популяции разных видов микроорганизмов варьирует в широком диапазоне — от 0,7 у *B. cereus* до 73,3 у *H. pylori* [12]. Промежуточное положение занимают виды с умеренной рекомбинационной активностью [13].

Последствия возникновения рекомбинации в геноме *C. trachomatis* только начинают выясняться, и многие аспекты этого явления требуют дальнейших исследований. Показано, что генетический обмен в геноме *C. trachomatis* встречается реже, чем мутации [14]. Однако измененные рекомбинацией нуклеотидные последовательности генов более стабильно наследуются и накапливаются в популяции, составляя при этом новые комбинации, определяющие гено- и фенотипическую изменчивость патогена.

Следует отметить, что важность этого процесса неравнозначна даже среди биоваров *C. trachomatis*. Так, отмечено, что рекомбинация играет более важную роль среди урогенитальных штаммов по сравнению с биоварами трахомы или лимфогранулемы [14]. Характеризуясь большой протяженностью, генетический обмен может привести в первую очередь к значительному антигенному многообразию, а также к существенным различиям в вирулентности и тканевом тропизме штаммов данного вида за счет изменения структуры генов, кодирующих функциональные белки, участвующие в этих процессах.

Цель работы — провести анализ литературных данных, касающихся рекомбинационных процессов в геноме *Chlamydia trachomatis* и их влиянии на молекулярно-биологические характеристики патогена.

В настоящее время изучение этих процессов у хламидий направлено на определение основных локусов в геноме чаще всего подвергающихся рекомбинации, ассоциации измененного состава генома и биологических свойств патогена, а также на установление факторов, способствующих генетическому обмену. Все эти вопросы далее будут детально рассмотрены.

Горячие точки рекомбинации

Генетическая рекомбинация у *C. trachomatis* приводит к гомологичному обмену множества геномных областей, и этот процесс является основной движущей силой современной эволюции и появления видового разнообразия патогена [7, 14, 15]. Возникновение рекомбинационных событий характерно для всего генома *C. trachomatis*, тем не менее определены области генома, в которых наиболее часто регистрируются эти явления — так называемые горячие точки рекомбинации. Прежде всего это локусы, кодирующие белки, вовлеченные в различные этапы патогенеза — гены полиморфных мембранных белков (*ptp*) и *ptp*-подобных белков (СТ049-СТ051), главного белка наружной мембраны (*ompA*), а также кодирующие последовательности зоны пластичности (СТ144-СТ176) [16]. Зона пластичности — высокодинамичный участок генома *C. trachomatis*, состоящий из генов, определяющих основные различия между геномами. Туда входят гены цитотоксина, фосфолипазы D и гены α и β цепей триптофан синтазы (*trpA*, *trpB*), играющие важную роль в патогенезе [15, 17].

В результате биоинформационного анализа геномов штаммов *C. trachomatis*, принадлежащих к трем биоварам, Joseph S. J. и др. идентифицировали 6 наиболее характерных среди исследованных 32 штаммов рекомбинантных гена: 3 гена, кодирующие гипотетические белки неизвестной функции, а также гены *ompA*, *karG* и локус, кодирующий серин/треонин протеинкиназу [14].

Более детальные исследования помогли дополнительно определить потенциальные локусы генетического обмена для урогенитального биовара. Ими являются порядка десяти генов, половина из которых кодирует гипотетические белки. Остальные — ген *pbpB*, который располагается непосредственно перед *ompA* и вовлечен в рекомбинацию, два гена (*ptpB* и *ptpE*) аутотранспортных белков с неуточненной функцией, *pfkA*, участвующий в процессах метаболизма, и *uscC*, который, вероятно, играет важную роль в системе секреции III типа [14]. В исследовании T. Eder, которое посвящено анализу последовательности генома E и F сероваров *C. trachomatis*, было отмечено, что рекомбинационные события затрагивали

различные участки генома этих генотипов, которые необходимы как для различных стадий патогенеза (ген интегрального мембранного белка (СТ147), фактор адгезии (СТ166), ген цитотоксина), так и для жизнедеятельности патогена (гены ДНК-лигазы (СТ146), протейн-аргенин киназа (СТ675), альфа цепь триптофан синтазы (СТ171) и др.) [6]. У рекомбинантных штаммов L2 продемонстрированы изменения в метаболизме гликогена, зависящее от нуклеотидного состава гена *glgB*. Отмечают, что это может влиять на патологическое взаимодействие патогена с эндомембранной системой клетки хозяина [18].

Кроме того, одним из важнейших аспектов изучения рекомбинантных штаммов является возможность утраты/приобретения детерминант резистентности к антибиотикам. В эксперименте по изучению горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам было показано, что при моделировании ко-инфекции штаммами *C. trachomatis* и *C. miridarium* в культуре клеток McCoу посредством межвидовой рекомбинации происходила передача генов антибиотикорезистентности, изменяющая профиль резистентности штаммов [19]. Проведенное детальное исследование рекомбинантных штаммов *C. trachomatis* различных генотипов выявило высокий уровень рекомбинационных событий в генах устойчивости к фторхинолонам (*gyrA*) и рифампицину (*rpoB*) и альфа цепи триптофан синтазы (*trpA*) [17]. В исследовании Nguyen B. D., в котором искусственно создавали рекомбинантные штаммы L2, показана способность штаммов к рекомбинации с образованием новых фенотипов, обладающих генами устойчивости к рифампицину, спектиномицину и триметоприму [18].

Отмечено, что рекомбинационным событиям способствует микст-генотипное инфицирование изолятами *C. trachomatis*. Рекомбинация участков генома *C. trachomatis* становится возможной вследствие одновременного инфицирования эпителиальной клетки хозяина несколькими штаммами хламидий с последующим слиянием вакуолей, в которых происходит репликация возбудителя [10]. В результате этого процесса изоляты могут приобретать новые биологические свойства (факторы адгезии, инвазии, возможность использования

нехарактерных источников питательных веществ и др.), благоприятствующие их диссеминации в организме человека. Вместе с этим рекомбинационные события могут остаться незамеченными и не изменять свойства возбудителя, если генетическому обмену подверглись геномы изолятов одного генотипа или имеющие сходные признаки.

Частота встречаемости микст-генотипного варианта хламидийной инфекции по данным литературы варьирует в диапазоне от 2,4 до 21,2% [20–24]. Так, при идентификации принадлежности изолятов *C. trachomatis* к биовару было обнаружено, что 24 образца из 95 содержали более 1 генотипа урогенитального биовара *C. trachomatis*, один из которых идентифицировали как принадлежащий одновременно к урогенитальному и биовару трахомы [25]. В России микст-генотипный вариант хламидийной инфекции идентифицирован в 18% случаях, в Нидерландах — до 16%, в Тунисе — 21,2%, в Чили — 8,4% [22–24, 26]. Соответственно, чем выше уровень микст-генотипной инфекции, тем более благоприятны условия для возникновения генетического обмена между штаммами *C. trachomatis* и появления новых биологических свойств у возбудителя. Однако иногда сложно проследить эту взаимосвязь ввиду того, что используемые технологии для детекции и генотипирования хламидий не всегда способны идентифицировать микст-генотипный вариант инфекции.

Рекомбинация *ompA* гена

Рекомбинация участков гена *ompA*, кодирующих эпитопы белка МOMP, может напрямую влиять на белковую антигенную структуру и иммуногенность патогена. Этот белок является основной мишенью для антител и клеточного иммунитета. На основании полиморфизма кодирующего его гена различают более 60 геновариантов *C. trachomatis* [27]. Ген *ompA* состоит из перемежающихся доменов: 5 константных (CD 1-5) и 4 переменных (VDI-IV), кодирующих соответствующие участки белка МOMP. Каждый из доменов представляет собой комплекс антигенных детерминант, участвующих как в клеточном, так и в гуморальном иммунном ответе. Известны участки гена, в которых локализуются В-, СТЛ- и Тh- клеточные эпитопы. Так, участвующие в

гуморальном иммунном ответе В-клеточные эпитопы расположены в VDI-IV. Соответствующие этим доменам вторая (L2), третья (L3), пятая (L5) и седьмая (L7) внеклеточные петли МОМР экспонированы во внеклеточную среду. Антигенные детерминанты цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL-клеточные эпитопы) и Т-хелперов (Th-клеточные эпитопы), инициирующие клеточный иммунитет, в основном локализируются в CD1-5. Так, из 23 известных Th-клеточных эпитопов 22 расположены в CD и только 1 перекрывает VDI и CD3 [28]. Следует отметить, что локализация эпитопов относительно домена или гена *ompA* для каждого генотипа имеет свои особенности распределения. Таким образом, рекомбинационные изменения в нуклеотидной структуре участков гена *ompA*, кодирующих эпитопы, способны напрямую влиять на представление антигенов и развитие иммунного ответа.

Экспонирование эпитоп(ов) МОМР, их размер и окружение играют критическую роль в проявляемых возбудителем иммунореактивных свойствах. К примеру, считается, что бессимптомное течение инфекции, вызванной наиболее распространенным генотипом *E. C. trachomatis* во многом связано с особенностью структуры внеклеточных петель МОМР. Компактная свертка и удаленность от поверхности белковой цепи при минимальном экспонировании ухудшает представление антигенных детерминант и может обуславливать низкий уровень антителобразования. Так, VDI и VDIII МОМР имеют более компактную структуру и их эпитопы экранированы близлежащими третьей и седьмой внеклеточными петлями. Образование антител только против VDI и VDIV МОМР у этого генотипа также может быть одним из факторов, способствующих низкой иммунологической реактивности организма хозяина, что благоприятствует его широкому распространению в популяции [29].

Изменчивость *ompA*, обусловленная рекомбинацией, также обнаружена у генотипов D, F и J, в последовательности гена которых были идентифицированы сходные для этих генотипов обменные события. В других областях хромосомы этих изолятов также регистрировались последствия рекомбинации, однако происходившие уже независимо друг от друга [30].

Установлено, что рекомбинация охватывает область от гена *rs2* (СТ680), располагающегося непосредственно перед *ompA*, и до участка внутри *ompA* [31]. Кроме того, рекомбинантный штамм может приобретать селективное преимущество в результате обмена генами, близлежащими с *ompA* (*rrf*, *pyrH*, *tsf*, *rpsB*). Продукты этих генов принимают участие в ключевых функциях патогена и отвечают за рециркуляцию рибосом, метаболизм пиримидина, удлинение трансляции и структурную конституцию рибосом соответственно [32].

Межбиоварная рекомбинация

Чаще всего генетический обмен возникает между штаммами с одинаковым тканевым тропизмом и относящихся к одному биовару. Межбиоварная рекомбинация у хламидий менее выражена, хотя все чаще стали появляться сведения о рекомбинантных изолятах, имеющих разную тропность [10, 14, 32].

В литературе имеется масса примеров, свидетельствующих о существовании рекомбинации генов между биоварами хламидий. Так, исследователи из Испании при детальном изучении генотипа А, ассоциированного с трахомой, но выделенного из урогенитального тракта, с использованием филогенетического анализа генов *pmp* определили наличие рекомбинации. Вследствие обмена генами *pmpH* генотипа А с аналогичным участком генотипа J этот изолят биовара трахомы приобрел способность к колонизации урогенитального тракта [7]. Как известно, белки семейства Pmp являются структурными компонентами наружной мембраны и играют одну из важных ролей в антигенной изменчивости и иммунном ответе. Это семейство состоит из 9 представителей (PmpA, PmpB, PmpC, PmpD, PmpE, PmpF, PmpG, PmpH, PmpI). К примеру, PmpB и PmpD способны стимулировать выработку провоспалительных цитокинов [33]. Отмечено, что белок PmpF содержит большое количество эпитопов МНС II (major histocompatibility complex II) в регионе, в котором наблюдались качественные и количественные изменения состава аминокислот в зависимости от штамма [17]. Кроме того, на важность анализа *pmp* генов указывает филогенетическое родство генов *pmpC* и *pmpH*, при оценке которых определяют группу генотипа в соответствии с тканевым тропизмом [7].

Как известно, при хламидийной инфекции аноректальной области в исследуемом материале прямой кишки наиболее часто обнаруживаются представители биовара лимфогранулемы, реже — урогенитальный генотип D. Этот генотип инициирует развитие более легких симптомов инфекции, в то время как генотипы L1, L2 и L3 связаны с тяжелым лимфаденитом и проктитом. В результате анализа множества геномов генотипа D удалось установить, что в гене *ompA* последовательность третьего и четвертого переменных доменов идентична таковой генотипа L1. Возможным объяснением присутствия данных участков гена в геноме урогенитального генотипа D является акт рекомбинации между этими последовательностями у предковых штаммов. Таким образом, рекомбинация с генотипом L1, по-видимому, позволила генотипу D более эффективно проникать в слизистую оболочку прямой кишки [34].

Дальнейшие исследования, направленные на выяснение случаев возникновения аноректальной хламидийной инфекции с нетипичными симптомами, позволили подтвердить роль урогенитальных рекомбинантных штаммов в развитии этих процессов. Так, установлен факт генетического обмена между штаммами L2 и D, в результате которого образовался новый генотип L2c [35]. В этом исследовании у рекомбинантного изолята L2c, выделенного из соскобного материала прямой кишки мужчины, отмечена комбинация специфичных признаков, характерных как для L2, так и D. У исследуемого изолята показано отсутствие мембранного белка включений (*incA*). Данный белок способствует слиянию мембран хламидийных включений внутри клетки и отсутствует у генотипов B, D-H, Ia и J за счет полной делеции кодирующего гена или его участка. У таких штаммов образуется множество мелких включений, которые не способны сливаться в одно за счет отсутствия *incA* белка. Аналогичная особенность, очевидно приобретенная от штамма генотипа D, отмечена и для L2c. При этом установлено, что у пациентов, из биологического материала которых выделяли генотипы, лишенные *incA* белка, наблюдалась менее выраженная клиническая симптоматика, низкая пролиферативная способность и формирование небольшого количества включений

в культуре клеток. Однако L2c, не экспрессируя *incA*, все еще являлся гипервирулентным, что характерно для генотипа L2. Последовательность, кодирующая этот белок, была аналогична таковой L2, поэтому полагают, что подобные изменения связаны с возникшим пострекомбинационным нарушением процессинга белка *incA*. Кроме того, в культуре клеток HeLa изолят L2c проявлял выраженное цитотоксическое действие, что отличалось от такового у L2, но было сходным с генотипом D. Это объяснялось идентификацией у L2c токсина, характерного для генотипа D, но не L2. Токсин *C. trachomatis* инициирует повреждение актиновых микрофиламентов клетки-хозяина, что способствует росту внутриклеточного включения. Считают, что токсин функционирует как инактиватор ГТФаз, расположенных вблизи участков проникновения элементарных телец на ранней стадии инфекции, что приводит к отсутствию или слабому проявлению иммунного ответа. Таким образом, выделенный изолят L2c за счет наличия токсина способен ускользать из-под иммунного надзора организма человека, а благодаря отсутствию белка *incA* — реплицироваться в не сливающихся включениях. Это способствует проявлению тяжелого локализованного заболевания слизистой оболочки (более характерного для генотипа D) и отсутствию пахового синдрома из-за высокой степени цитотоксичности, что сдерживает распространение патогена в регионарные лимфатические узлы [35].

Еще одним подтверждением возможности генетического обмена между изолятами, принадлежащими к разным биоварам, стали результаты исследования Seth-Smith M. H. и др. в 2017 году. При генетическом анализе изолята *C. trachomatis*, вызвавшего тяжелый гемморагический проктит и нехарактерные для биовара лимфогранулемы симптомы и проявления заболевания, установлено, что он является рекомбинантной формой генотипа L2. В результате секвенирования *ompA* гена был обнаружен участок, идентичный генотипу D. Последовательность гена этого изолята на 100% совпадала с последовательностью рекомбинантного штамма L2-D, описанного в 2011 году Somboona N. и др. [36]. Таким образом, можно предположить, что данный геновариант способен в течение длительного

времени успешно распространяться в популяции человека.

Также был идентифицирован случай рекомбинационных межбиоварных взаимодействий, которые привели к формированию штамма L2b с новой последовательностью гена *ompA*. Из соскобного материала прямой кишки пациента был выделен изолят *C. trachomatis*, который идентифицировали как L2b. Однако симптомы заболевания были не характерны для лимфогранулемы. При детальном исследовании этого случая было обнаружено, что только первые 302 п. н. гена *ompA* совпадают с аналогичным участком последовательности штамма лимфогранулемы (L2b/UCH-1/proctitis и L2/434/BU), а участок от 366 до 1182 п. н. соответствовал эталонному урогенитальному штамму D/UW-3 и Da. Кроме того, филогенетический анализ показал, что последовательность *ompA* гена этого штамма группируется в общий кластер с генотипом D, что говорит о достаточной протяженности рекомбинации, которая повлекла за собой изменение биологических свойств возбудителя [32].

Имеется ряд других доказательств рекомбинации в *ompA* гене между представителями разных биоваров — D и L1, у которых произошел обмен Т-клеточными эпитопами, В и D, а также Ва и D изоляты с рекомбинантными генами, ответственными за тканевую тропизм, вследствие чего они приобрели способность колонизировать эпителиальные клетки не только конъюнктивы, но и урогенитального тракта человека [10, 35]. В частности генетическая рекомбинация, приводящая к изменению последовательности, кодирующей соответствующие Т-клеточные эпитопы, отрицательно влияет на распознавание иммунокомпетентными клетками и инициацию клеточного иммунного ответа, что в конечном итоге приводит к персистентной хламидийной инфекции [34].

Особая проблема, к которой приводит межбиоварная рекомбинация, кроется в устойчивости штаммов *C. trachomatis* к стандартным дозам лекарственных средств. Как известно, схемы лечения лимфогранулемы, трахомы и урогенитального хламидиоза различаются, поэтому для оптимального применения антибиотиков важно обладать информацией о принадлежности к биовару и наличии рекомбинации у патогена.

Заключение

Изучение рекомбинационных процессов у *C. trachomatis* важно, так как является одним из основных факторов формирования генотипической изменчивости патогена и его штаммового разнообразия. Однако это является трудоемкой задачей, требующей учета всех параметров, влияющих на изменения биологических свойств возбудителя.

Получение ценной научной информации с помощью методов биоинформатики способствует детальному изучению нуклеотидной последовательности геномов рекомбинантных штаммов, лучшему пониманию и предсказанию течения патогенетических реакций. Вместе с этим необходимо проводить дополнительные исследования фенотипических свойств патогена и взаимодействия рекомбинантных изолятов *C. trachomatis* с организмом человека. С практической точки зрения идентификация рекомбинантных вариантов патогена с измененными биологическими свойствами, такими как вирулентность, иммуногенность, тропность к различным органам и тканям, чувствительность к антибиотикам, необходима для эффективной элиминации *C. trachomatis* и предотвращения их распространения в популяции человека.

Список использованных источников

1. Самороднова, Е. А. Хламидиозы у детей: неизвестное об известном / Е. А. Самороднова, О. И. Пикуза // Практическая медицина. — 2014. — Т. 9, № 85. — С. 60–66.
2. Спонтанный хламидиоз у обезьян как модель хламидийной инфекции / В. В. Слободенюк [и др.] // Биомедицина. — 2010. — № 5. — С. 6–16.
3. Презентация методических рекомендаций воз по хламидийной инфекции [Электронный ресурс] / С. В. Рищук [и др.] // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. — 2014. — № 4. — Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=25680981>. — Дата доступа: 30.04.2020.
4. Капустина, Ю. М. Современные подходы к генотипированию *Chlamydia trachomatis* / Ю. М. Капустина, Л. В. Рубаник // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. — 2019. — Т. 64, № 1. — С. 112–124.
5. Хрянин, А. А. Общее понятие и классификация / А. А. Хрянин, О. В. Решетников //

Хламидийная инфекция. Эволюция взглядов: руководство. – 2-е изд. – Минск, 2020. – Гл. 1. – С. 7–12.

6. Genome sequencing of *Chlamydia trachomatis* serovars E and F reveals substantial genetic variation / T. Eder [et al.] // *Pathog Dis.* – 2017. – Vol. 75, № 9. – ftx120. doi: 10.1093/femspd/ftx120.

7. *Chlamydia trachomatis* genotypes A and B from urogenital specimens of patients in Spain: molecular characterization / L. Pineiro [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2018. – Vol. 24, № 8. – P. 910.e5–910.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.025.

8. Spectroscopic analysis of chlamydial major outer membrane protein in support of structure elucidation / R. W. Hepler [et al.] // *Protein Sci.* – 2018. – Vol. 27. – P. 1923–1941.

9. Глазер, В. М. Гомологичная генетическая рекомбинация // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 7. – С. 13–21.

10. Evolution of *Chlamydia trachomatis* diversity occurs by widespread interstrain recombination involving hotspots / J. P. Gomer [et al.] // *Genome Res.* – 2007. – Vol. 17, № 1. – P. 50–60.

11. Wood, D. O. Genetic systems for studying obligate intracellular pathogens: an update / D. O. Wood, R. R. Wood, A. M. Tucker // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 17. – P. 11–16.

12. Hanage, W. P. Not so simple after all: bacteria, their population genetics, and recombination [Electronic resource] / W. P. Hanage // *Gold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2016. – Vol. 8, № 7. – a018069. doi: 10.1101/cshperspect.a018069.

13. Impact of loci nature on estimating recombination and mutation rates in *Chlamydia trachomatis* / R. Ferreira [et al.] // *G3 (Bethesda)*. – 2012. – Vol. 2, № 7. – P. 761–768.

14. Population genomics of *Chlamydia trachomatis*: insights on drift, selection, recombination, and population structure / S. J. Joseph [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2012. – Vol. 29, № 12. – P. 3933–3946.

15. Interplay of recombination and selection in the genomes of *Chlamydia trachomatis* [Electronic resource] / S. J. Joseph [et al.] // *Biol. Direct.* – 2011. – Vol. 6. – P. 28. doi: 10.1186/1745-6150-6-28.

16. *Chlamydia trachomatis*: genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates / N.R. Thompson [et al.] // *Genome Res.* – 2008. – Vol. 18, № 1. – P. 161–171.

17. In vitro recombinants of antibiotic-resistant *Chlamydia trachomatis* strains have statistically more breakpoints than clinical recombinants for the same sequenced loci and exhibit selection at unexpected loci / T. Srinivasan [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2012. – Vol. 194, № 3. – P. 617–626.

18. Nguyen, B. D. Virulence determinants in the obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* revealed by forward genetic approaches / B. D. Nguyen, R. H. Valdivia // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2012. – Vol. 109, № 4. – P. 1263–1268.

19. Chromosomal recombination targets in *Chlamydia* interspecies lateral gene transfer / R. J. Suchland [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2019. – Vol. 201, № 23. – e00365–19. doi: 10.1128/JB.00365-19.

20. *Chlamydia trachomatis* genotypes in a cross-sectional study of urogenital samples from remote Northern and Central Australia / P. M. Giffard [et al.] // *BMJ Open.* – 2016. – Vol. 6, № 1. – e009624. doi: 10.1136/bmjopen-2015-009624.

21. OmpA genotyping of *Chlamydia trachomatis* from Korean female sex workers / G. Lee [et al.] // *J. Infect.* – 2006. – Vol. 52, № 7. – P. 451–454.

22. Urogenital *Chlamydia trachomatis* multi-locus sequence types and genovar distribution in chlamydia infected patients in a multi-ethnic region of Saratov, Russia / V. A. Feodorova [et al.] // *Plos One.* – 2018. – Vol. 13, № 4. – e0195386. doi: 10.1371/journal.pone.0195386.

23. High prevalence of co-infections by invasive and non-invasive *Chlamydia trachomatis* genotypes during the lymphogranuloma venereum outbreak in Spain / M. Rodriguez-Dominguez [et al.] // *Plos One.* – 2015. – Vol. 10, № 5. – e0126145. doi: 10.1371/journal.pone.0126145.

24. *Chlamydia trachomatis* genovar distribution in clinical urogenital specimens from Tunisian patients: high prevalence of *C. trachomatis* genovar E and mixed infections / H. Charsallah [et al.] // *BMC Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 12. – P. 333. doi: 10.1186/1471-2334-12-333.

25. Rapid detection and strain typing of *Chlamydia trachomatis* using a highly multiplexed microfluidic PCR assay / R.S. Turingan [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 5. – e0178653. doi: 10.1371/journal.pone.0178653.
26. High frequency of *Chlamydia trachomatis* mixed infections detected by microarray assay in South American samples / L. G. Valet [et al.] // Plos One. – 2016. – Vol. 11, № 4. – e0153511. doi: 10.1371/journal.pone.0153511.
27. Chlamydia trachomatis strain types have diversified regionally and globally with evidence for recombination across geographic divides / V. Smelov [et al.] // Front Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – 2195 p. doi: 10.3389/fmicb.2017.02195
28. The bioinformatics analyses reveal novel antigen epitopes in major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* / T. Zhang [et al.] // Indian J. Med. Microbiol. – 2017. – Vol. 35, № 4. – P. 522–528.
29. Литовченко, О. А. Сравнительный анализ структуры внеклеточных петель главного белка наружной мембраны серотипов Е и К *Chlamydia trachomatis* и их антигенности / О. А. Литовченко // Вестник Харьков. нац. ун-та им. В. Н. Каразина. Сер. биол. – 2012. – Т. 16, № 1035. – С. 56–62.
30. Culture-independent sequence analysis of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens identifies regions of recombination and in-patient sequence mutations / T. E. Putman [et al.] // Microbiology. – 2013. – Vol. 159, № 10. – P. 2109–2117.
31. Genome sequencing of recent clinical *Chlamydia trachomatis* strains identifies loci associated with tissue tropism and regions of apparent recombination / B. M. Jeffrey [at al.] // Infect. Immun. – 2010. – Vol. 78, № 6. – P. 2544–2553.
32. Chlamydia trachomatis: when the virulence-associated genome backbone imports a prevalence-associated major antigen signature / V. Borges [et al.] // Microb. Genom. – 2019. – Vol. 5, № 11. – e000313. doi: 10.1099/mgen.0.000313.
33. Chlamydia trachomatis-infected patients display variable antibody profiles against the nine-member polymorphic membrane protein family / C. Tan [et al.] // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77, № 8. – P. 3218–3226.
34. Millman, K. L. Recombination in the *ompA* gene but not the *omcB* gene of *Chlamydia* contributes to serovar-specific differences in tissue tropism, immune surveillance, and persistence of the organism / K. L. Millman, S. Tavaré, D. Dean // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183, № 20. – P. 5997–6008.
35. Hypervirulent *Chlamydia trachomatis* clinical strain is a recombinant between lymphogranuloma venereum (L(2)) and D lineages / N. Somboonna [et al.] // mBio. – 2011. – Vol. 2, № 3. – e00045-e11. doi: 10.1128/mBio.00045-11.
36. Concern regarding the alleged spread of hypervirulent lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* strain in Europe / M. H. Seth-Smith [et al.] // Euro Surveill. – 2017. – Vol. 22, № 15. – 30511 p. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.15.30511.

Y. M. Kapustina, L. V. Rubanik

ROLE OF GENETIC RECOMBINATION IN VARIABILITY OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

State Institution

“Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology”
23, Filimonov St., 220114 Minsk, the Republic of Belarus

A review of literature data relating to recombination in the *Chlamydia trachomatis* genome and its effect on changes in biological pathogen properties was carried out. Information about genetic recombination, its regions and length allows determining changes in the pathogen virulence and predicting a course of pathogenetic reactions and the immune response development. Practical relevance of the detection of recombinant *C. trachomatis* isolates, which possess the determinants of resistance to main antibiotic groups, is in justifying the feasibility of adjusting of therapy regimens for the urogenital chlamydial infection.

Keywords: recombination, virulence, genome, chlamydiosis, *Chlamydia trachomatis*.

Дата поступления статьи: 31 августа 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ ПО ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Редакция сборника научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика» принимает к рассмотрению обзорные статьи и экспериментальные статьи по результатам исследований, выполненных с использованием современных методов в области молекулярной и прикладной генетики, отражающие изучение фундаментальных генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется актуальным проблемам биоинформатики и системной биологии, биоинженерии, вопросам сохранения и рационального использования генетических ресурсов, а также исследованиям, основанным на междисциплинарном подходе.

Статьи публикуются на русском, белорусском и английском языках.

Сборник входит в Перечень научных изданий, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертационных работ (для биологических, медицинских (медико-биологические аспекты), сельскохозяйственных наук), и реферируется и индексируется в РИНЦ (Российский индекс научного цитирования).

Решение о публикации принимается редакционной коллегией после рецензирования, учитывая научную значимость и актуальность представленных материалов.

ДЛЯ ОПУБЛИКОВАНИЯ РАССМАТРИВАЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ТИПЫ СТАТЕЙ

Экспериментальная статья

Основной тип статей, размещаемых в сборнике. Этот формат предназначен для публикации полученных авторами новых данных, представляющих существенный интерес для научного сообщества. Объем экспериментальной статьи не должен превышать 12 страниц. В список использованных источников следует включать не более 30 источников.

Обзорная статья

Авторы могут предложить для публикации обзорную статью по теме, представляющей интерес для широкого круга читателей. Объем обзорной статьи не должен превышать 15 страниц. В список использованных источников следует включать не более 50 источников.

Краткое сообщение

В исключительных случаях по решению редколлегии в сборнике публикуются краткие сообщения объемом не более 5 страниц, список литературы в этом случае не должен включать более 15 источников.

СТРУКТУРА СТАТЬИ

Статья набирается в текстовом редакторе Microsoft Word. Поля: верхнее и нижнее — 2 см, левое — 3 см, правое — 1,5 см. Текст набирается шрифтом Times New Roman, 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Выравнивание — по ширине. Абзацный отступ — 1,25 см. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца. Автоматическая расстановка переносов обязательна. Все страницы должны быть пронумерованы. Для создания формул следует использовать только **MathType**.

1. УДК

Располагается в верхнем левом углу страницы.

2. Инициалы и фамилии авторов

Располагаются по центру, выделяются полужирным начертанием. Между инициалами и перед фамилией ставятся неразрывные пробелы (Ctrl + Shift + пробел) (**И. И. Иванов**).

3. Название статьи

Располагается по центру, набирается **ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ** полужирным начертанием. Переносы в заголовках не допускаются.

Название статьи должно четко отражать суть работы, не содержать лишних слов. По возможности следует избегать узкой региональности, а данные о географии исследования давать в резюме.

4. Место работы авторов с почтовым адресом

Место работы авторов (аббревиатура не допускается) располагается по центру, набирается прямым начертанием. На следующей строке указывается почтовый адрес учреждения (страна, индекс, город, улица, дом).

Если авторы работают в разных учреждениях, то после каждой фамилии и перед соответствующим местом работы надстрочными знаками проставляется цифровой индекс (1, 2 и т. д.).

5. Авторское резюме (аннотация)

Располагается после места работы авторов, набирается прямым начертанием.

Авторское резюме должно полно и понятно излагать основное содержание и результаты проведенного исследования. Если из названия статьи очевидны предмет, тема, цель, методы исследования, их не следует повторно излагать в резюме. Объем текста аннотации определяется содержанием публикации (объемом сведений, их научной ценностью и/или практическим значением) и должен быть в пределах 800–1000 знаков с пробелами.

6. Ключевые слова (5–10 слов)

Перечисляются после слов «Ключевые слова:». В конце ставится точка.

7. Основной текст статьи

Экспериментальная статья должна включать следующие разделы: «**Введение**», «**Материалы и методы**», «**Результаты и обсуждение**», «**Заключение**», «**Список использованных источников**». Обзорная статья и краткое сообщение в обязательном порядке должны содержать разделы: «**Введение**», «**Заключение**» и «**Список использованных источников**». Название остальных разделов выбирается на усмотрение авторов.

Названия разделов располагаются на отдельной строке по центру и выделяются полужирным начертанием.

Изложение статьи должно быть ясным, сжатым, без длинных исторических введений и повторений.

Помимо общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, ДНК), допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте. Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте при их первом упоминании.

Вставка в текст символов (например, β , ϵ) производится только через опцию Вставка/Символ.

Для набора надстрочных и подстрочных символов (C^2 , C_4) использовать меню *Шрифт/Надстрочный знак/Подстрочный знак*.

Общие правила набора текста

Прямое начертание должны иметь:

- 1) греческие символы (α , β , δ , ϕ , λ и др.) и знаки ($\%$, \leq , \pm , \times , \neq , ∞ , \rightarrow , $^\circ$, \notin и др.);
- 2) единицы измерения (Вт, В, Дж, кг, м и пр.);
- 3) кириллические (т. е. русские) буквы (П, Л, Ц);
- 4) сокращения от русских или белорусских слов ($q_{св}$);
- 5) обозначения химических элементов и соединений (P, H₂O);
- 6) названия белков;
- 7) скобки () и запятые (,) в формулах и после них ($x^2 - 0,5b(1,5 + ca)$).

Курсивное начертание должны иметь названия генов, латинские (т. е. английские) буквы, обозначающие переменные (K , y , z , x , V , i , j), латинские названия семейств, родовые и видовые названия.

Без пробелов следует проставлять:

- 1) дефис (-) в сложных словах (минерал-индикатор, К-пространство) и при наращении падежных окончаний к цифрам и буквам (1-го, j-го);
- 2) короткое тире (—) (Ctrl + «←» на нумерационной клавиатуре) между цифрами, обозначающими пределы какой-либо величины (20–30 чел.);
- 3) знаки -, +, ≤, > в значении положительной или отрицательной величины, степени увеличения или уменьшения;
- 4) знак %;
- 5) скобки () и кавычки «» от заключенных в них слов (по всей работе кавычки должны быть одного рисунка — «елочки»).

С пробелами проставлять:

- 1) тире (—) (Ctrl + Alt + «←» на нумерационной клавиатуре) с обеих сторон пробелом как знак препинания между словами.
- 2) математические знаки (–, +, ≤, ±, ·, ×, =, ≠ и др.) в формулах, уравнениях, когда они являются знаками арифметического действия ($R_1 + R_2 = 0,75$);
- 3) знаки №, § от следующих за ними чисел (№ 4);
- 4) многозначные целые числа, содержащие 5 и более знаков, разбиваются по 3 цифры справа налево (40 450, 8 345 458);
- 5) сокращенные слова от имен собственных, к которым они относятся (ул. Академическая);
- 6) цифры от полных или сокращенных наименований (100 м, 2005 г.).

Требования к рисункам

Растровые изображения должны иметь разрешение не менее 300 dpi для полутоновых изображений (фотографии, газетные вырезки, книжные иллюстрации) и не менее 600 dpi для штриховых изображений (графики, таблицы, детали, выполненные чертежными инструментами). Повышение разрешения после сканирования программными средствами недопустимо.

Рисунки должны размещаться только после их упоминания в тексте статьи. Если ссылка на рисунок включена в предложение, используется полное написание — «рисунок 1»; если слова заключаются в скобки, используется сокращение — (рис. 1).

Слово **Рис. 1.** и подрисовочная подпись располагаются на следующей строке после самого рисунка (**Рис. 1.** Название). Точка после названия не ставится.

Рисунки должны быть представлены в электронном виде отдельными файлами в следующих форматах: JPEG, TIFF, PNG. Название файла должно соответствовать номеру рисунка (Рис. 1, Рис. 2 и т. д.). Для отправки все файлы рисунков объединяются в одну архивную папку zip или rar. Не допускается размещение рисунков в конце статьи (перед списком литературы).

Оформление таблиц

Таблицы должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора Microsoft Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах.

Таблицы должны быть пронумерованы и иметь названия, размещаться только после их упоминания в тексте статьи. Если ссылка на таблицу включена в предложение, используется полное написание — «таблица 1»; если слова заключаются в скобки, используется сокращение — (табл. 1).

Слово **Таблица 1** выравнивается по правому краю и выделяется полужирным начертанием.

На следующей строке за словом **Таблица 1** следует название таблицы, которое набирается прямым начертанием и выравнивается по центру (без абзацного отступа).

Примечание к таблице располагается на следующей строке после таблицы. Слово **Примечание** выделяется полужирным начертанием, после него ставится точка. Текст примечания следует за словом **Примечание** и начинается с прописной буквы. Точка после текста примечания не ставится. Четко указывается размерность показателей. Цифры в таблицах должны соответствовать своему упоминанию в тексте статьи.

Не допускается размещение таблиц в конце статьи (перед списком литературы).

Информация о соблюдении требований Нагойского протокола

Если работа связана с исследованиями, в которых в качестве объекта используются генетические ресурсы (растения, животные, микроорганизмы), полученные от зарубежных партнеров, необ-

ходимо дать ссылку на Международно признанный сертификат о соблюдении (Internationally Recognized Certificate of Compliance) Нагойского протокола к Конвенции о биологическом разнообразии, подтверждающий легальное получение данных ресурсов.

Информация о соблюдении биоэтических стандартов

Если работа связана с исследованиями, в которых в качестве объекта используются лабораторные животные, то необходимо указать, соблюдались ли международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных.

Если в качестве объектов исследования выступает человек, то необходимо указать:

- соответствуют ли процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики;
- получено ли от каждого из включенных в исследование участников информированное добровольное согласие.

В конце статьи по желанию авторов приводится следующая справочная информация:

Общая информация о помощи в проведении работы и подготовке статьи: сообщения о предоставлении материалов, данных, компьютерного обеспечения, приборов во временное пользование; информация о проведении исследований в центрах коллективного пользования; помощь в технической подготовке текста; а также все прочее, что оценивается как полезная помощь. Информация о грантах и другой финансовой поддержке исследований. Авторы не должны использовать сокращенные названия институтов и спонсирующих организаций.

8. Список использованных источников

Оформляется в соответствии с приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 25 июня 2014 г. № 159. Источники должны быть представлены в виде списка в порядке упоминания ссылок в тексте статьи. Нумерация — автоматическая.

Не допускаются ссылки на работы, которых нет в списке литературы, а также на неопубликованные материалы. В список использованных источников преимущественно следует включать работы не старше 10 лет (исключение составляют редкие высокоинформативные материалы).

9. На английском языке повторяются п. 2–6

10. Дата поступления статьи

К статье прилагаются:

1. Акт экспертизы о возможности опубликования в открытой печати.

2. Сопроводительное письмо, в структуре которого должны содержаться сведения о том, что:
– рукопись не находится на рассмотрении в другом издании;
– не была ранее опубликована.

Авторы несут ответственность за достоверность представленных в рукописи материалов.

3. Краткие сведения о каждом из авторов, включающие ФИО (полностью), год рождения, служебный адрес, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность. Сведения об авторах предоставляются отдельным документом.

Бумажный экземпляр статьи подписывается всеми авторами.

Статья (в двух экземплярах) и сопроводительные документы представляются лично либо по почте на адрес: ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь. Электронная копия материалов направляется на электронный адрес: redactor@igc.by.

Редакция оставляет за собой право в процессе редакционной подготовки сокращать и исправлять рукопись по согласованию с автором.

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 29

Ответственный за выпуск *А. Л. Богданова*
Переводчик *М. Г. Пыжова*

Подписано в печать 08.12.2020. Формат 60×84^{1/8}. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 12,79. Уч.-изд. л. 7,52. Тираж 100 экз. Заказ № 8745.

Отпечатано в типографии общества с ограниченной ответственностью «Киви групп».
223051, Минский район, а/г Колодищи, ул. Минская, 5/108.

Оригинал-макет подготовлен в Государственном научном учреждении
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/51 от 08.10.2013.
220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.