

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 35**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2023

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, 2023. – Т. 35. – 182 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;
О. Ю. Баранов, К. У. Вильчук, С. И. Гриб, Е. В. Гузенко, Н. И. Дубовец,
А. Н. Евтушенков, А. П. Ермишин, А. И. Ковалевич, С. А. Красный, В. А. Лемеш,
С. А. Лихачёв, Н. П. Максимова, М. Е. Михайлова, П. М. Морозик, И. Б. Моссэ,
М. Е. Никифоров, В. Е. Падутов, Ф. И. Привалов, В. Н. Решетников, В. В. Титок,
И. П. Шейко, Р. И. Шейко — члены редколлегии;
Е. М. Селихова — ответственный секретарь.

УДК [577.21+575] (082)
ISSN 1999-9127

СОДЕРЖАНИЕ

Н. В. Савина, С. В. Кубрак, Л. В. Милько, А. В. Кильчевский, С. С. Савчук, В. Н. Лебедько, Д. К. Гарбарук, Л. М. Турчин, И. В. Шаркевич, А. П. Колбас, Н. Ю. Колбас, Н. В. Михальчук Молекулярно-генетический анализ видов семейства орхидные (<i>Orchidaceae</i> Juss.) флоры Беларуси	7
А. В. Соколюк, Т. Е. Варфоломеева, Н. И. Дубовец Изменчивость хлоропластного генома гексаплоидных тритикале (<i>×Triticosecale</i> Wittm.).....	19
А. Н. Заинчковская, Е. А. Фомина, Ф. Н. Кушанов, О. Ю. Урбанович Экспрессия генов <i>TaDHN9-A</i> , <i>TaDHN13</i> и <i>TaDHN20</i> у сортов яровой пшеницы в ответ на засуху	27
Я. Л. Страх, С. И. Вакула, О. С. Игнатовец Анализ генетического разнообразия дикорастущей морозники приземистой (<i>Rubus chamaemorus</i> L.).....	35
В. А. Лемеш, В. Ю. Агеец, А. И. Царь, М. С. Парфенчик, В. Н. Купень, Т. А. Сергеева Оценка генетического разнообразия и структуры зарубежных пород карпа (<i>Cyprinus carpio</i> L.), выращиваемых в аквакультуре в Беларуси	45
Ю. И. Охременко, Е. С. Гайдученко Генетическое разнообразие сомика американского <i>Ameiurus nebulosus</i> (Lesueur, 1819) на основании изменчивости митохондриального гена <i>COI</i>	53
Е. В. Гузенко, А. И. Царь, М. С. Парфенчик, О. В. Прищепчик Секвенирование полного митохондриального генома медоносных пчел Беларуси: первый опыт	64
Е. Л. Романишко, М. Е. Михайлова, Р. И. Шейко, Е. С. Гридюшко Выявление ассоциаций аллельных вариантов генов <i>BF</i> , <i>LIF</i> , <i>NCOA1</i> с воспроизводительными качествами свиней	75
Т. В. Долматович, Н. С. Сазанович, Р. И. Шейко Генетическая характеристика лошадей белорусской упряжной породы на основе полиморфизма митохондриальной ДНК	89
А. Н. Верчук, Т. В. Осадчук Исследование микросателлитных ДНК-маркеров для идентификации особей бобра речного (<i>Castor fiber</i>) в криминалистических целях	99
О. М. Малышева, Е. П. Михаленко, Ю. В. Полюхович, Е. И. Кузьминова, А. П. Сухарева, М. В. Артюшевская, К. А. Гомолко, А. В. Кильчевский Генетический полиморфизм компонентов системы ангиогенеза и тканевого ремоделирования у недоношенных новорожденных с осложнениями неонатального периода	110

<i>А. А. Яцкив, Н. В. Никитченко, А. Г. Белькевич, И. А. Козыро, Р. И. Гончарова</i> Спектр полиморфных вариантов в экзонах и нетранслируемых областях генов <i>NRHS1</i> и <i>NRHS2</i> у пациентов с нефротическим синдромом	123
<i>О. Ч. Мазур, Е. П. Михаленко, С. В. Байко, А. В. Кильчевский</i> Поиск генетических детерминант артериальной гипертензии ренального генеза	132
<i>Н. И. Рябоконт, И. Д. Кужель</i> Окислительные повреждения ДНК сперматозоидов у пациентов с нормо- и патозооспермией	141
<i>М. А. Vinter, I. S. Kazlouski, A. I. Zinchenko</i> Production of chitosan nanoparticles containing 3',5'-cyclic diadenosine monophosphate	151
<i>А. Б. Булатовский, Н. Н. Веялкина, А. И. Зинченко</i> Получение фармакологически перспективных химерных белков на основе аннексина A5 и аденозиндеградирующих ферментов	157
<i>Е. П. Янчук, И. Б. Моссэ, Н. Г. Седляр, К. А. Моссэ, А. В. Кильчевский</i> Наиболее информативные полиморфные варианты генов, ассоциированные с когнитивными способностями человека	164

CONTENTS

<i>N. V. Savina, S. V. Kubrak, L. V. Milko, A. V. Kilchevsky, S. S. Savchuk, V. N. Lebedko, D. K. Garbaruk, L. M. Turchin, I. V. Sharkevich, A. P. Kolbas, N. Y. Kolbas, M. V. Mikhalchuk</i> Molecular genetic analysis of <i>Orchidaceae</i> Juss. species of the flora of Belarus	7
<i>H. U. Sakalyik, T. E. Varfalamaeva, N. I. Dubovets</i> Variability of the chloroplast genome of hexaploid triticale (\times <i>Triticosecale</i> Wittm.)	19
<i>A. N. Zainchkovskaya, A. A. Famina, F. N. Kushanov, O. Yu. Urbanovich</i> Expression of the <i>TaDHN9-A</i> , <i>TaDHN13</i> and <i>TaDHN20</i> genes in spring wheat varieties in drought response	27
<i>Ya. L. Strakh, S. I. Vakula, O. S. Ignatovets</i> Analysis of the genetic diversity of wild cloudberry (<i>Rubus chamaemorus</i> L.)	35
<i>V. A. Lemesh, V. Yu. Ageyets, N. I. Tsar, M. S. Parfenchyk, V. N. Kipen, T. A. Sergeeva</i> Genetic diversity and structure assessment of foreign carp strains (<i>Cyprinus carpio</i> L.) grown in Belarus	45
<i>Yu. I. Okhremenko, H. S. Gajduchenko</i> Genetic diversity of the brown bullhead <i>Ameiurus nebulosus</i> (Lesueur, 1819) based on the variability of the mitochondrial <i>COI</i> gene	53
<i>E. V. Guzenko, A. I. Tsar, M. S. Parfenchyk, O. V. Prischepchik</i> Sequencing the whole mitochondrial genome of honey bees in Belarus: the first experience	64
<i>E. L. Ramanishka, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko, E. S. Gridiushko</i> Detection of allelic variant associations of <i>BF</i> , <i>LIF</i> , <i>NCOA1</i> genes with the reproduction qualities of pigs	75
<i>T. V. Dolmatovich, N. S. Sazanovich, R. I. Sheyko</i> Genetic characteristics of belarusian harness horses based on mitochondrial DNA polymorphism	89
<i>A. N. Viarchuk, T. V. Asadchuk</i> Investigation into microsatellite DNA markers for identification of Eurasian beaver (<i>Castor fiber</i>) individuals for forensic purposes	99
<i>V. M. Malyshava, A. P. Mikhalenka, Yu. V. Paliukhovich, E. I. Kuzminova, A. P. Sukharava, M. V. Artsiusheuskaya, K. A. Gamolka, A. V. Kilchevsky</i> Genetic polymorphism of angiogenesis and tissue remodeling system components in premature newborns with neonatal complication	110
<i>H. A. Yatskiu, N. V. Nikitchenko, H. G. Bialkevich, I. A. Kazyra, R. I. Goncharova</i> The spectrum of polymorphic variants in exons and UTRs of <i>NPHS1</i> and <i>NPHS2</i> genes in patients with nephrotic syndrome	123

<i>A. Ch. Mazur, A. P. Mikhalenka, S. V. Baiko, A. V. Kilchevsky</i> Search for genetic determinants of renal arterial hypertension	132
<i>N. I. Ryabokon, I. D. Kuzhal</i> Oxidative sperm DNA damage in patients with normo- and pathozoospermia.....	141
<i>М. А. Винтер, И. С. Казловский, А. И. Зинченко</i> Получение наночастиц хитозана, включающих 3',5'-циклический диаденозинмонофосфат	151
<i>A. B. Bulatovski, N. N. Veyalkina, A. I. Zinchenko</i> Production of pharmacologically promising chimeric proteins based on annexin A5 and adenosine degrading enzymes	157
<i>E. P. Yanchuk, I. B. Mosse, N. G. Sedluar, K. A. Mosse, A. V. Kilchevsky</i> The most informative polymorphic gene variants associated with human cognitive abilities...	164

Н. В. Савина¹, С. В. Кубрак¹, Л. В. Милько¹, А. В. Кильчевский¹, С. С. Савчук², В. Н. Лебедько², Д. К. Гарбарук³, Л. М. Турчин³, И. В. Шаркевич³, А. П. Колбас^{4,5}, Н. Ю. Колбас⁴, Н. В. Михальчук⁴

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА ОРХИДНЫЕ (*ORCHIDACEAE* JUSS.) ФЛОРЫ БЕЛАРУСИ

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

²Государственное научное учреждение
«Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

³Государственное природоохранное научно-исследовательское учреждение
«Полесский государственный радиационно-экологический заповедник»
Республика Беларусь, Гомельская область, 247618, г. Хойники, ул. Терешковой, 7

⁴Государственное научное учреждение
«Полесский аграрно-экологический институт Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 224030, г. Брест, ул. Советских пограничников, 41

⁵Государственное научное учреждение
«Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220076, г. Минск, ул. Скорины, 10

Большинство представителей семейства *Orchidaceae* Juss., произрастающих в умеренных широтах, относятся к уязвимым, редким и исчезающим видам и находятся под охраной как национального, так и международного законодательства. Сокращение численности дикорастущих популяций орхидей является следствием их высокой чувствительности к колебаниям факторов среды, а также постоянного антропогенного прессинга. В данной работе представлены результаты исследования 16 видов семейства *Orchidaceae*, произрастающих на территории Республики Беларусь. Рассмотрено использование ДНК-штрихкодирования как дополнительного метода исследования орхидных наряду с анализом морфологических признаков и экологических особенностей. Получены 43 видовые маркерные последовательности по штрихкодам *ITS*, *rbcL*, *psbA-trnH* и *matK*. Филогенетическое взаимоотношение исследуемых видов, построенное на основании нуклеотидной вариабельности *ITS*-района, подтвердило существующую таксономию этого семейства.

Ключевые слова: Орхидные, ДНК-штрихкодирование, *ITS*, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, Красная книга.

Введение

Семейство орхидные (*Orchidaceae* Juss.) насчитывает около 800 родов и более 20 000 видов. Представители этого семейства произрастают преимущественно во влажных тропических лесах Старого и Нового Света, в умеренных широтах они приурочены к лесной зоне. На территории Республики Беларусь орхидные встречаются повсеместно, в разнообразных экологических условиях. Это многолетние, исключительно наземные травянистые растения, способные переносить климат с холодной зимой. Основная часть наших орхидей — обита-

тели лесов, опушек и полей; в меньшей степени представлены орхидеи луговых экосистем, а третье место отведено представителям болотных видов. Орхидные — одно из наиболее высокоспециализированных семейств, большинство представителей которого чутко реагируют на изменения среды обитания, вследствие чего относятся к уязвимым, редким или исчезающим видам [1]. Возрастающая антропогенная нагрузка и интенсивная трансформация естественных экосистем приводит к стремительному сокращению численности видов этого семейства. В Республике Беларусь орхидные

представлены 21 родом и 40 видами, еще три вида считаются регионально утраченными. Так, венерин башмачок крапчатый (*Cypripedium guttatum*), пыльцеголовник крупноцветковый (*Cephalanthera damasonium*), кокушник ароматнейший (*Gymnadenia odoratissima*), ранее встречавшиеся в естественных экотопах на территории республики, в течение долгого времени не обнаружены и считаются исчезнувшими. Согласно прогнозам, в ближайшие десятилетия в Беларуси могут исчезнуть такие уникальные многолетники, как неотинья обожженная (*Neotinea ustulata*), надбородник безлистный (*Epipogium aphyllum*), офрис насекомоносная (*Ophrys insectifera*), бровник одноклубневый (*Herminium monorchis*). В основной список 4-го издания Красной книги Республики Беларусь (2015 г.) включено 24 вида орхидных, в список видов дикорастущих растений и грибов, нуждающихся в профилактической охране (проф-охрана) — еще 11 видов [2–4].

По мнению специалистов, орхидные являются «хрупким компонентом биоразнообразия». В настоящее время стратегия сохранения генетических ресурсов растений в первую очередь предполагает их сохранение в условиях *in situ*, в естественной среде, в пределах конкретных экотопов. Это обеспечит устойчивое существование природных видовых генофондов. Кроме того, перспективным является сохранение орхидных в условиях *ex situ* — в ботанических садах, криобанках, научных опытных станциях, на приусадебных участках садоводов-любителей. Применение молекулярно-генетических методов анализа позволит провести таксономическую ревизию представителей семейства орхидные, произрастающих в Беларуси. Это дополнительный инструмент, позволяющий выявить уникальные с генетической точки зрения микропопуляции, редкие биотипы и формы. Кроме того, в перспективе планируется осуществить паспортизацию всех известных популяций охраняемых видов орхидей, включить их в систему мониторинга растительного мира с целью разработки специальных мер охраны [5].

Цель данного исследования состояла в изучении популяций редких видов семейства орхидные флоры Беларуси на предмет подтверждения их видовой принадлежности с использованием морфологических и мо-

лекулярных методов. В качестве молекулярных маркеров были выбраны ДНК-штрихкоды — переменные таксономически значимые фрагменты генома. Для идентификации растений пока не существует единого универсального участка, поэтому мы использовали комбинации четырех ДНК-штрихкодов *ITS*, *rbcL*, *psbA-trnH* и *matK*, рекомендованные Международным центром по баркодингу CCDB (Canadian Centre for DNA Barcoding).

Материалы и методы

Осуществлен сбор биологического материала растений семейства *Orchidaceae* на территории Брестской, Гомельской, Витебской и Гродненской областей, в том числе в Национальном парке «Нарочанский» и Полесском государственном радиационно-экологическом заповеднике. Проведено натурное обследование состояния популяций, описаны места их произрастания. Видовую принадлежность растений определяли сравнительным морфологическим методом с использованием флористических сводок и определителей. Сбор, подготовка и фиксация биологического материала, без изъятия растений из мест произрастания, проводились согласно «Памятке по сбору растительного материала с целью молекулярно-генетических исследований ДНК», разработанной с целью пополнения коллекции Республиканского банка ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов Института генетики и цитологии НАН Беларуси. В работе использовался материал 16 видов семейства орхидные, каждый из которых представлен тремя экземплярами растений.

Для каждого вида проведен маркер специфический анализ ДНК по четырем ДНК-штрихкодам: *ITS2*, *rbcL*, *psbA-trnH* и *matK*. Тотальную ДНК выделяли из высушенной в силикагеле растительной ткани с использованием коммерческого набора GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Амплификацию маркеров ДНК (*rbcL*, *psbA-trnH*, *matK* и *ITS2*) проводили в конечном объеме 8–10 мкл; смесь для амплификации включала готовый буфер для проведения ПЦР Quick-load Taq 2X Master Mix («Праймтех», РБ), конечная концентрация праймеров — 0,3 пмоль/мкл, конечная концентрация

ДНК матрицы — 10 нг/мкл. Последовательности специфических праймеров и основные условия проведения амплификации приведены в таблице 1.

Полученные ПЦР-продукты очищали набором для энзиматической очистки (Exo I/rSAP). Образцы секвенировали в прямом и обратном направлении с использованием набора реагентов Brilliant Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Nimagen», Нидерланды) с последующим анализом продуктов на автоматическом анализаторе ABI 3500 DNA Analyzer («Applied Biosystems», США). Хроматограммы сиквенсов анализировали в Sequence Scanner 1.0., с помощью модуля Contig Express Project программы Vector NTI и программы MEGA 4.

Для каждого вида растений получено по 2–4 результирующие (консенсусные) последовательности, которые сравнивали с аналогичными последовательностями в международных базах данных NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) и BOLD (Barcode of Life Data Systems). 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. При проведении молекулярно-филогенетического анализа из базы данных GenBank дополнительно взяты нуклеотидные последовательности региона *ITS* для шести видов орхидных.

Таблица 1

Условия генотипирования маркерных последовательностей

Праймеры	Последовательность праймеров	Условия амплификации
ITS2_S2F ITS_S3R	5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3' 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'	33 цикла: 94 °C — 30 сек 58 °C — 30 сек 72 °C — 45 сек
psbA3_F trnHf_05	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3' 5'-CGCGCATGGTGGATTACACAATCC-3'	35 циклов: 94 °C — 40 сек 57 °C — 30 сек 72 °C — 1 мин
rbcLaF rbcLaR	5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' 5'-GTAAAATCAAGTCCACCGCG- 3'	39 циклов: 94 °C — 1 мин 50 °C — 1 мин 72 °C — 1 мин
matK-xF MALPR1	5'-TAATTTACGATCAATTCATTC-3' 5'-GTTCTAGCACAAGAAAGTCG-3'	

Примечание. последовательности праймеров представлены в свободном доступе на сайте международного центра CCDB (*Canadian Centre for DNA Barcoding*)

Результаты и обсуждение

Исследования орхидных на территории Республики Беларусь

Функцию сохранения генетических ресурсов растений в естественных условиях прежде всего выполняют охраняемые природные территории, наиболее значимые из которых: Березинский биосферный заповедник, Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, Национальные парки «Беловежская пуща», «Припятский», «Нарочанский», «Браславские озера». На охраняемых территориях выявлено 34 вида орхидных из 40, произрастающих в Беларуси, и все они требуют к се-

бе пристального внимания специалистов [4–5].

В 2021 г. сотрудниками Полесского государственного радиационно-экологического заповедника проведено натурное обследование состояния 14 популяций 10 дикорастущих видов растений семейства орхидные в Хойникском, Наровлянском и Брагинском участках заповедника. На территории Полесского заповедника за последние десятилетия сложились уникальные условия для изучения естественных процессов восстановления природной среды. Специалисты предлагают рассматривать этот регион Полесья как крупный резерват сохранения биоразнообразия не только данной терри-

тории, но и Европы в целом. Всего в заповеднике произрастает 15 видов орхидных, восемь из которых имеют и национальный, и международный природоохранный статус [6].

Мониторингом популяций диких орхидей, произрастающих в северо-западной части страны, занимаются специалисты национального парка «Нарочанский» и Института экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси. Окрестности Нарочанских озер представляют собой рефугиум для сохранения обширных популяций охраняемых видов орхидных, благодаря высокому уровню грунтовых вод и сохранению традиционного выпаса сельскохозяйственных животных, препятствующего зарастанию мест обитания. Здесь встречаются по меньшей мере семь видов пальчатокоренника, а также дремлик болотный, кокушник длиннорогий, гнездовка яйцевидная, пыльцеголовник красный; представлены и болотные орхидеи — лосняк Лезеля, мякотница однолистная, хаммарбия болотная и др. [7–8].

Видовое разнообразие отдельных представителей орхидных приходится на так называемый «Орхидный пояс Полесья», охватывающий южные части Брестского и Припятского Полесья. Эти природные территории в пределах Малоритской равнины и Средне-Припятской низины в силу определенных условий, особенно благодаря наличию в почвах карбоната кальция и их нейтральной или слабощелочной реакции, являются благоприятными для развития группы кальциефильных представителей

семейства *Orchidaceae*. Приблизительно третья часть охраняемых орхидей белорусской флоры тяготеет к карбонатным почвам. Наиболее надежный индикатор таких почв — *Cypripedium calceolus*, впервые в Европе взятый под охрану еще в 1878 г. в Швейцарии. В пределах «Орхидного пояса Полесья» произрастает восемь видов орхидей, включенных в основной список Красной книги Республики Беларусь (2015): *Cypripedium calceolus* (категория национальной природоохранной значимости — III), *Cephalanthera longifolia* (III), *Cephalanthera rubra* (III), *Epipactis atrorubens* (III), *Gymnadenia conopsea* (III), *Listera ovata* (IV), *Orchis mascula* (II), *Platanthera chlorantha* (IV) [1]. Брестский регион, в целом, характеризуется богатым видовым составом природных сообществ. На территории Брестчины зарегистрировано более 100 охраняемых территорий и объектов, произрастает более половины редких и исчезающих видов, включенных в 4-е издание Красной книги. Мониторинг состояния охраняемых растений осуществляется сотрудниками ряда учреждений: Национальной академии наук, Брестского областного комитета природных ресурсов и охраны окружающей среды, Полесского аграрно-экологического института, Брестского государственного университета им. А. С. Пушкина.








Представители семейства орхидные, собранные на территории Беларуси и включенные в данное исследование, представлены в таблице 2.

Таблица 2








Редкие виды семейства орхидные Республики Беларусь, включенные в исследование

Вид растения	Фото	Охранный статус	Место сбора
Венерин башмачок настоящий <i>Cypripedium calceolus</i>		III (VU) — уязвимый вид	Брестская обл.; Национальный парк «Нарочанский»; Полесский государственный радиационно-экологический заповедник
Гнездовка обыкновенная <i>Neottia nidus-avis</i>		профохрана	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник

Продолжение таблицы 2

Вид растения	Фото	Охранный статус	Место сбора
Дремлик темно-красный <i>Eripactis atrorubens</i>		III (VU) — уязвимый вид	Национальный парк «Нарочанский»
Дремлик широколистный <i>Eripactis helleborine</i>		профохрана	Брестская обл.; Полесский государственный радиационно-экологический заповедник
Любка двулистная <i>Platanthera bifolia</i>		профохрана	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник
Любка зеленоцветковая <i>Platanthera chlorantha</i>		IV (NT) — потенциально уязвимый вид	Брестская обл.; Полесский государственный радиационно-экологический заповедник
Мякотница однолистная <i>Malaxis monophyllos</i>		II (EN) — исчезающий вид	Гродненская обл.
Пальчатокоренник майский <i>Dactylorhiza majalis</i>		III (VU) — уязвимый вид	Гродненская обл.; Брестская обл.
Пальчатокоренник мясо-красный <i>Dactylorhiza incarnata</i>		профохрана	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник

Окончание таблицы 2

Вид растения	Фото	Охранный статус	Место сбора
Пыльцеголовник длиннолистный <i>Cephalanthera longifolia</i>		III (VU) — уязвимый вид	Брестская обл.
Пыльцеголовник красный <i>Cephalanthera rubra</i>		III (VU) — уязвимый вид	Брестская обл.; Полесский государственный радиационно-экологический заповедник
Тайник яйцевидный <i>Listera ovata</i> / <i>Neottia ovata</i>		IV (NT) — потенциально уязвимый вид	Брестская обл.; Полесский государственный радиационно-экологический заповедник
Хаммарбия болотная <i>Hammarbya paludosa</i> / <i>Malaxis paludosa</i>		II (EN) — исчезающий вид	Гродненская обл.
Ятрышник дремлик <i>Orchis morio</i> / <i>Anacamptis morio</i>		I (CR) — вид, находящийся на грани исчезновения	Брестская обл.
Ятрышник клопоносный <i>Orchis coriophora</i> / <i>Anacamptis coriophora</i>		II (EN) — исчезающий вид	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник
Ятрышник шлемоносный <i>Orchis militaris</i>		I (CR) — вид, находящийся на грани исчезновения	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник

Примечание. Номенклатура видов в таблице приведена согласно Красной книге Республики Беларусь (2015). Фото из архива лаборатории флоры и систематики растений Института экспериментальной ботаники НАН Беларуси

Молекулярно-генетические исследования представителей семейства орхидные

Для всех видов выполнена генетическая идентификация с помощью ДНК-маркеров *ITS*, *rbcL*, *psbA-trnH* и *matK*; в результате выравнивания индивидуальных последовательностей сгенерированы суммарно 43 видовые последовательности, их наличие приведено в таблице 3.

Размеры маркерных участков для *ITS* находились в диапазоне 391–661 п. н. (в исследовании использованы праймеры ITS_S2F/ITS_S3R, обеспечивающие амплификацию

межгенного спейсера *ITS2* и соседних с ним участков 5.8S и 28S, так называемый *ITS*-район 5.8S–*ITS2*–28S). Для штрихкода *rbcL* получены фрагменты длиной 515–552 п. н.; для маркера *psbA-trnH* — 224–771 п. н.; максимально протяженные участки были у маркера *matK* — 520–872 п. н. Для 13 видов сходство полученных видовых маркерных последовательностей с аналоговыми из базы данных NCBI составило 98–100%. Три вида — мякотница однолистная, анакамптис клопоносный, ятрышник шлемоносный — требуют повторного исследования.

Таблица 3

Результаты маркерной идентификации представителей семейства орхидные

Вид растения	<i>ITS</i>	<i>rbcL</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>matK</i>
<i>Anacamptis morio</i>	+	+	+	+
<i>Cephalanthera longifolia</i>	+	+	+	+
<i>Cephalanthera rubra</i>	–	+	–	+
<i>Cypripedium calceolus</i>	+	+	+	+
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	–	–	–	+
<i>Dactylorhiza majalis</i>	+	+	+	+
<i>Epipactis atrorubens</i>	+	+	+	+
<i>Epipactis helleborine</i>	+	+	+	+
<i>Hammarbia paludosa</i>	+	+	+	–
<i>Neottia ovata</i>	+	+	+	+
<i>Neottia nidus-avis</i>	–	–	–	+
<i>Platanthera bifolia</i>	+	+	+	+
<i>Platanthera chlorantha</i>	+	+	+	+

Множественное выравнивание полученных последовательностей, выполненное в программе MEGA 4, позволило оценить межвидовые различия в группе орхидных. По результатам выравнивания последовательностей проведено сравнение молекулярных маркеров по их изменчивости (табл. 4).

Хлоропластные маркеры изучаемых образцов характеризовались меньшим количеством нуклеотидных замен и парсимонически-информативных позиций. Низкая вариабельность секвенированных последовательностей выявлена для маркера *rbcL*, у которого из 551 позиции только 37 (7%) вариабельны. Для ядерного участка *ITS* отмечен самый вы-

сокий полиморфизм у изучаемых образцов. Для 16 выровненных последовательностей региона *ITS*, размер которого составил 532 позиции, выявлено 268 вариабельных сайтов, из них 205 — парсимонически-информативные (39%), что значительно превышает этот показатель для хлоропластных маркеров. Поэтому для последующего филогенетического анализа была выбрана область генома *ITS*. Чтобы повысить достоверность анализа, из базы данных NCBI дополнительно были взяты аналоговые видовые последовательности *ITS* для видов семейства орхидные, включенных в наше исследование, их идентификационные номера приведены в таблице 5. В качестве внешней

Таблица 4

Характеристика изменчивости анализируемых маркеров

Маркер	Размер участка, п. н.	Вариабельные позиции		Парсимонически-информативные позиции	
		п. н.	%	п. н.	%
<i>ITS</i>	532	268	50	205	39
<i>rbcL</i>	551	37	7	21	4
<i>psbA-trnH</i>	798	311	39	121	15
<i>matK</i>	874	197	23	109	13

Таблица 5

Маркерные последовательности *ITS-NCBI* для отдельных видов семейства орхидные

ID-ITS	Вид	ID-ITS	Вид
Z94078.1	<i>Anacamptis coriophora</i>	KX167315.1	<i>Epipactis helleborine</i>
Z94092.1	<i>Anacamptis morio</i>	MG215630.1	<i>Hammarbia paludosa</i>
AY146447.1	<i>Cephalanthera longifolia</i>	MG215867.1	<i>Malaxis monophyllos</i>
MT179740.1	<i>Cephalanthera rubra</i>	MT784088.1	<i>Neottia ovata</i>
MF543769.1	<i>Cypripedium calceolus</i>	KX167909.1	<i>Neottia nidus-avis</i>
KF454226.1	<i>Dactylorhiza incarnata</i>	Z94090.1	<i>Orchis militaris</i>
KX166452.1	<i>Dactylorhiza majalis</i>	KX167536.1	<i>Platanthera chlorantha</i>
MF543776.1	<i>Epipactis atrorubens</i>	KX165743.1	<i>Platanthera bifolia</i>

группы использована последовательность KX098568.1 *ITS*-района *Trapa natans* (водяной орех плавающий (чили), семейство дербениковые).

ITS-район представляет собой спейсер между тандемно повторяющимися генами рибосомальной РНК. Некодирующие части *ITS*-района высоко вариабельны, что делает его удобным филогенетическим маркером, позволяющим уточнить таксономический статус изучаемых нами видов семейства орхидные [9.]. В своем развитии таксономия *Orchidaceae* прошла ряд важных этапов, начало которым положил Карл Линней в 1753 г. С 1990-х гг. в таксономии орхидей начали активно использоваться молекулярно-генетические методы, состоялась так называемая «молекулярная революция», приведшая к изменению положения многих, даже хорошо изученных групп растений, как на видовом, так и на родовом уровнях [10]. За период 1999–2014 гг. опу-

бликовано шесть томов *Genera Orchidacearum* (под ред. Alec M. Pridgeon, Phillip J. Cribb, Mark W. Chase, Finn Rasmussen), в которых описаны все известные орхидеи. К настоящему времени общепринятой является классификация М. W. Chase с соавторами (2015), основывающаяся на современных молекулярно-филогенетических методах изучения родства, и признающая 736 родов [11]. Семейство орхидные включает пять подсемейств: *Apostasioideae* (апостасиевые), *Vanilloideae* (ванильные), *Cypripedioideae* (циприпедиевые), *Orchidoideae* (собственно орхидные) и *Epidendroideae* (эпидендровые); последнее подсемейство самое обширное и включает в себя основную часть таксонов (до 80%). С целью реконструкции филогенетических взаимосвязей в семействе орхидные разными авторами используются как пластидные (*matK*, *psaB*, *rbcL*, *trnL-F*, *trnH-psbA*), так и ядерные области (*nrITS*, *Xdh*). В результате

этих исследований систематически пересматривались границы и филогенетические связи между родами орхидных [12–13]. На рисунке 1 представлены наши данные о генетическом взаимоотношении между видами в пределах семейства *Orchidaceae* на основе участков региона *ITS*.

Полученные нами результаты в целом согласуются с секционным делением внутри семейства и подсемейств. Вид венерин башмачок — представитель рода башмачок (*Cypripedium*) — входит в подсемейство *Cypripedioideae*. Пять родов: мякотница/*Malaxis* (представитель *M. monophyllos*), хаммарбия/*Hammarbya* (*Hammarbya paludosa*/*Malaxis paludosa*), гнездовка/*Neottia* (*Neottia nidus-avis* и *N. ovata*/*Listera ovata*), дремлик/

Epipactis (*E. helleborine* и *E. atrorubens*) и род пыльцеголовник/*Cephalanthera* (*C. longifolia* и *C. rubra*) сформировали группу, относящуюся к подсемейству *Epidendroideae*. С помощью маркера *ITS* не удалось выявить межвидовые различия внутри рода *Epipactis*. Четыре рода: ятрышник/*Orchis* (представитель *O. militaris*), пальчатокоренник/*Dactylorhiza* (*D. incarnata* и *D. majalis*), любка/*Platanthera* (*P. chlorantha*, *P. bifolia*) и анакампис/*Anacamptis* (представители *Anacamptis coriophora*/*Orchis coriophora* и *A. morio*/*O. morio*) сформировали группу, относящуюся к подсемейству *Orchidoideae*.

Обращают на себя внимание представители рода любка, для которых маркер *ITS* оказался неинформативен и не выявил межвидовых различий при сравнении любки дву-

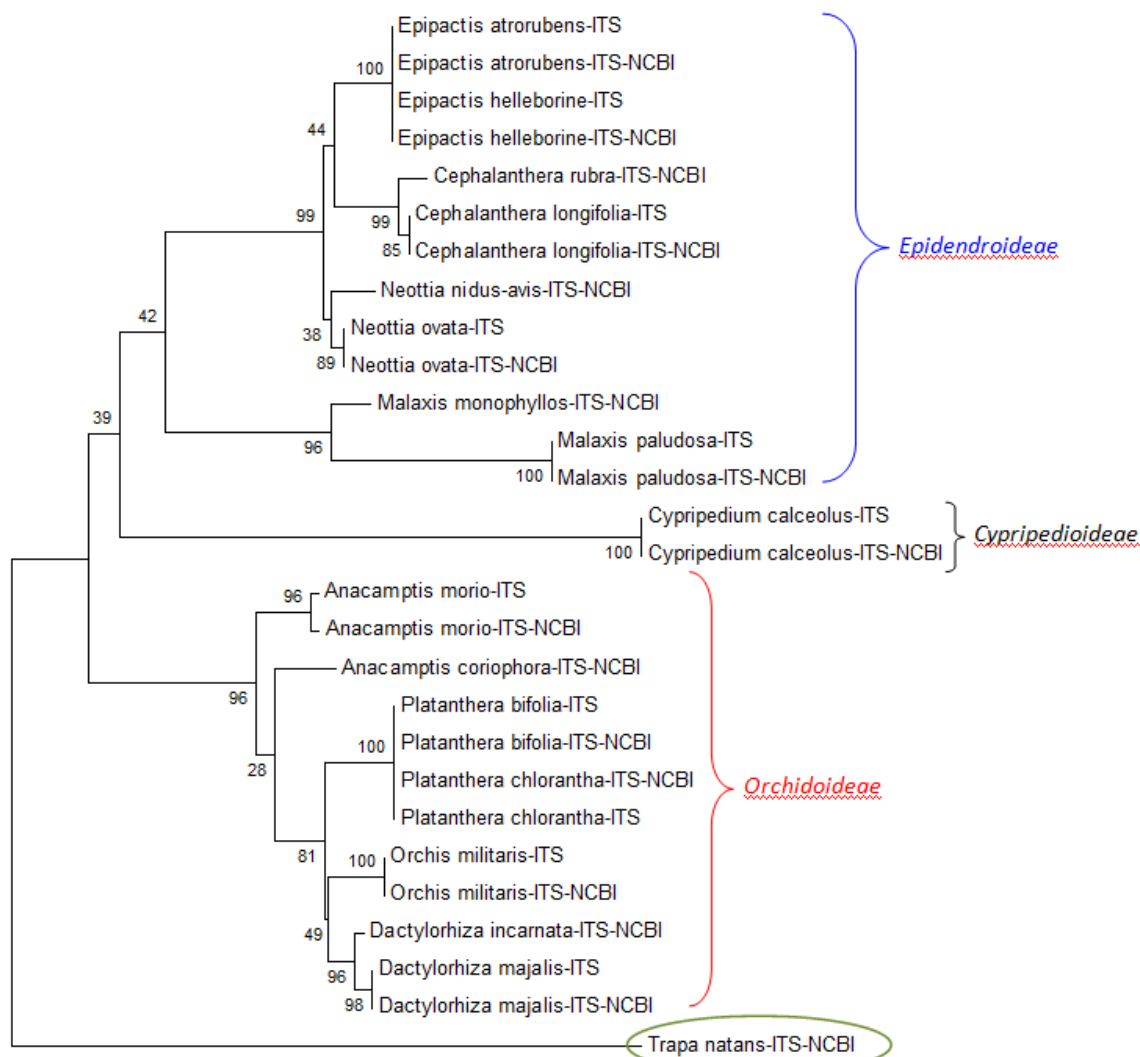


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей региона *ITS* у представителей семейства орхидные

листной (*P. bifolia*) и любки зеленоцветковой (*P. chlorantha*). Использование хлоропластных маркеров *rbcL* и *matK* также не смогло дифференцировать два вида рода *Platanthera*. С помощью хлоропластного маркера *psbA-trnH*, который считается высокоэффективным пластидным маркером, для *P. bifolia* и *P. chlorantha* были получены фрагменты длиной 772 п. н., среди них всего четыре сайта оказались вариabельны, а парсимонически значимых сайтов не обнаружено. *P. bifolia* и *P. chlorantha* — два близких вида евразийских орхидей, широко распространенные на материковой части, имеют ряд морфологических различий и различные экологические предпочтения обитания [14]. Как отмечает ряд авторов, род *Platanthera* — одна из групп орхидных, нуждающаяся в современной таксономической ревизии. Для *Platanthera* отмечена очень высокая морфологическая изменчивость по сравнению с другими крупными родами подсемейства (такими как *Dactylorhiza*, *Ophrys* или *Orchis*) [10, 13–14]. R. M. Bateman с соавторами с использованием ядерного маркера *ITS* (регион *ITS1–5.8S–ITS2*) и восьми пластидных маркеров, исследовал геномы *P. bifolia* и *P. chlorantha*. Был найден только один вариabельный сайт в *ITS* области, который отличал два вида. Принимая во внимание большое сходство генотипов, авторы предположили, что *P. chlorantha* происходит из *P. bifolia* и, соответственно, большая часть генома *P. bifolia* содержится в *P. chlorantha*, а эксклюзивных локусов очень немного. Во многих случаях род *Platanthera* слабо разграничивается как молекулярными, так и морфологическими методами, поэтому еще нет достаточного количества ни молекулярных, ни морфологических данных для их надежной классификации [10, 12].

В исследованиях R. M. Bateman с соавторами (2012) и F. Esposito с соавторами (2017) обоснованы выводы о невосприимчивости отдельных видов к ДНК-штрихкодированию. Подобный пример «молекулярной однородности» наряду с фенотипическим разнообразием был зарегистрирован в работах некоторых авторов и для некоторых представителей рода *Dactylorhiza* [13–14].

Заключение

Проведено исследование представителей 16

видов орхидных флоры Беларуси с помощью ДНК-маркеров *ITS*, *rbcL*, *psbA-trnH* и *matK*, которые проявили различную разрешающую способность на исследуемых образцах. Использованные нами хлоропластные штрихкоды оказались недостаточно эффективными, поскольку не все изучаемые виды удалось идентифицировать. Кроме того, с помощью маркеров *rbcL*, *psbA-trnH* и *matK* нами выявлено небольшое количество нуклеотидных замен и парсимонически-информативных позиций, что не позволило использовать их для сравнения изменчивости филогенетически значимых фрагментов генома и оценить межвидовые различия в группе орхидных.

Для ядерного участка *ITS* у изучаемых образцов отмечен самый высокий полиморфизм, выявлено 50% вариabельных сайтов, из них 39% — парсимонически-информативных. Это позволило использовать *ITS* как филогенетический маркер, позволяющий уточнить таксономический статус видов семейства орхидных. Полученные результаты согласуются с секционным делением внутри семейства и подсемейств: в отдельные ветви дендрограммы выделились представители подсемейств *Cypripedioideae*, *Epidendroideae*, *Orchidoideae*.

Таким образом, для результативного решения задач идентификации и уточнения таксономического статуса видов орхидных, наиболее оптимальным оказалось использование ядерного участка *ITS*-региона, которое целесообразно соотносить с данными морфологии и классической систематики.

Список использованных источников

1. Михальчук, Н. В. Орхидные пояса Полесья / Н. В. Михальчук // Охрана и культивирование орхидей : материалы X Международной научно-практической конференции (1–5 июня 2015 г. Минск, Беларусь) / ред. колл. В. В. Титок и др. – Минск: А. Н. Вараксин, 2015. – С. 166–171.
2. Лебедько, В. Н. Сем. Orchidaceae Juss. // Флора Беларуси. Сосудистые растения. В 6 т. – Т. 3, под общ. ред. В. И. Парфенова. – Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксперим. ботаники им. В. Ф. Купревича. – Минск: Беларуская навука, 2017. – С. 232–310.
3. Лебедько, В. Орхидные Беларуси: местное разнообразие и современное состояние

- / В. Лебедько // Наука и инновации: научно-практический журнал / гл. ред. Ж. В. Комарова; учредитель Национальная академия наук Беларуси (Минск). – 2017. – № 8 (174). – С. 68–72.
4. Лебедько, В. Н. Новые таксоны рода *Epiractis* Zinn во флоре Беларуси / В. Н. Лебедько // Охрана и культивирование орхидей: материалы XI Международной конференции (Нижний Новгород, 25–28 мая 2018 г.). – Нижний Новгород: ННГУ, 2018. – С. 60–62.
5. Стратегия сохранения генофонда семейства Орхидных (*Orchidaceae* Juss.) в Беларуси / С. С. Савчук [и др.] // Охрана и культивирование орхидей: материалы X Международной научно-практической конференции (1–5 июня 2015 г. Минск, Беларусь) / ред. колл. В. В. Титок и др. – Минск: А. Н. Вараксин, 2015. – С. 209–213.
6. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редкол.: И. М. Качановский (предс.) [и др.]. – 4-е изд. – Минск: Беларус. Энцыкл. імя П. Броўкі, 2015. – 448 с.
7. Мониторингом диких орхидей занимаются в национальном парке «Нарочанский» [Электронный ресурс] // Тематический портал Wildlife.by («Дикая природа Беларуси»). – Режим доступа: <https://www.wildlife.by/science/articles/monitoringom-dikikh-orkhidey-zanimayutsya-v-natsionalnom-parke-narochanskiy>. – Дата доступа: 07.04.2023.
8. Биологическое разнообразие Национального парка «Нарочанский»: Сосудистые растения / Д. В. Дубовик [и др.]. – Борисов: Борисов. укрупн. тип. им. 1 Мая, 2014. – 256 с.
9. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species / S. Chen [et al.] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, iss. 1. – e8613. – DOI: 10.1371/journal.pone.0008613
10. Efimov, P. G. An intriguing morphological variability of *Platanthera* s.l. / P. G. Efimov // European Journal of Environmental Sciences. – 2011. – Vol. 1, № 2. – P. 125–136.
11. An updated classification of Orchidaceae / M. W. Chase [et al.] // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2015. – Vol. 177, № 2. – P. 151–174.
12. Phylogenetics of subtribe Orchidinae s.l. (Orchidaceae; Orchidoideae) based on seven markers (plastid *matK*, *psaB*, *rbcL*, *trnL-F*, *trnH-psba*, and nuclear nrITS, *Xdh*): implications for generic delimitation / W-T. Jin [et al.] // BMC Plant Biology. – 2017. – 17:222. – DOI: 10.1186/s12870-017-1160-x
13. Bateman, R. M. Contrast in levels of morphological versus molecular divergence between closely related Eurasian species of *Platanthera* (Orchidaceae) suggests recent evolution with a strong allometric component / R. M. Bateman, K. E. James, P. J. Rudall // New Journal of Botany. – 2012. – Vol. 2, № 2. – P. 110–148.
14. Characterization of sympatric *Platanthera bifolia* and *Platanthera chlorantha* (Orchidaceae) populations with intermediate plants / F. Esposito [et al.] // PeerJ. – 2018. – P. 1–36. – DOI: 10.7717/peerj.4256
15. Bateman, R. M. Two bees or not two bees? An overview of *Ophrys* systematics / R. M. Bateman // Ber. Arbeitskrs. Heim. Orchid. – 2018. – Vol. 35, № 1. – P. 5–46.

**N. V. Savina¹, S. V. Kubrak¹, L. V. Milko¹, A. V. Kilchevsky¹, S. S. Savchuk², V. N. Lebedko²,
D. K. Garbaruk³, L. M. Turchin³, I. V. Sharkevich³, A. P. Kolbas^{4,5}, N. Y. Kolbas⁴, M. V. Mikhalchuk⁴**

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF *ORCHIDACEAE* JUSS. SPECIES OF THE FLORA OF BELARUS

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

²State Scientific Institution

“V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany”

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

³Polesie State Radioecological Reserve

7 Tereshkova St., 247618 Khoyniki, Gomel Region, the Republic of Belarus

⁴The Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus

41 Sovetskikh Pogranichnikov St., Brest, the Republic of Belarus

⁵Institute of Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus

10 Francis Skaryna St., 220114 Minsk, the Republic of Belarus

Most *Orchidaceae* Juss., growing in temperate latitudes, belong to vulnerable, rare and endangered species and are protected by both national and international legislation. A decrease in the number of wild-growing populations of orchids is a consequence of their high sensitivity to fluctuations in environmental factors, as well as constant anthropogenic pressure. This paper presents the study results of 16 *Orchidaceae* species growing in the territory of the Republic of Belarus. The use of DNA barcoding as an additional technique for studying orchids, along with the analysis of morphological characters and ecological features, is considered. Forty-free specific marker sequences were obtained by *ITS*, *rbcL*, *psbA-trnH*, and *matK* barcodes. The phylogenetic relationship of the studied species built on the basis of the nucleotide variability of the *ITS* region confirmed the existing taxonomy of this family.

Keywords: *Orchidaceae*, DNA barcoding, *ITS*, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, The Red Book.

Дата поступления в редакцию: 04 сентября 2023 г.

А. В. Соколюк, Т. Е. Варфоломеева, Н. И. Дубовец

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМА ГЕКСАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ (*×TRITICOSECALE WITTM.*)

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

В результате обработки данных NGS получены полные нуклеотидные последовательности хлоропластных геномов 10 сортов тритикале. При сопоставлении полученных последовательностей с референсным хлоропластным геномом *Triticum aestivum* выявлены 52 изменения структуры кодирующих участков ДНК, включающие одно-, ди- и тетра-нуклеотидные замены, а также делеции, которые в совокупности затрагивают 12 генов. Самыми изменчивыми являются два гена, кодирующие белки, связанные с фотосинтезом: ген *atpA*, ответственный за синтез α -субъединицы H^+ АТФазы (мутации выявлены в 27 позициях) и ген *ndhB*, отвечающий за синтез НАДН-дегидрогеназы, с мутациями в 11 позициях. Минимальное количество мутаций (18), оказавшихся идентичными для всех исследованных сортов, детектировано у озимого тритикале Устье. Максимальным количеством мутаций в хлоропластной ДНК характеризовался сорт Динамо, у которого выявлено 48 замен, из которых четыре в гене *atpA* и одна в гене *psaA* оказались индивидуальными. Каких-либо различий в структуре пластомов между тритикале ярового и озимого типов развития обнаружено не было. В целом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о низком уровне межсортовой изменчивости хлоропластного генома у культивируемых в Республике Беларусь сортов тритикале.

Ключевые слова: тритикале, хлоропластный геном, изменчивость, нуклеотидные замены, NGS.

Введение

Синтетические аллополиплоидные гибриды пшеницы с рожью (*×Triticale*) являются наиболее ярким примером успешного применения отдаленной гибридизации и экспериментальной полиплоидии в селекции зерновых культур. Современный генофонд этих гибридов представлен искусственным полиплоидным рядом, включающим тетраплоидные ($2n = 4x = 28$; геном A/BRR), гексаплоидные ($2n = 6x = 42$; геном AABBRR) и октоплоидные ($2n = 8x = 56$; геном AABBDDRR) формы, из которых лишь гексаплоидные тритикале нашли коммерческое применение и в полной мере отвечают требованиям сельскохозяйственного производства.

Специфика селекции этой культуры обусловлена отсутствием естественного центра формо- и видообразования, вследствие чего генетическое разнообразие пшенично-ржаных гибридов ограничено видовым и в значительной степени сортовым разнообразием пшеницы и ржи [1]. Поскольку генофонд

обоих хлебных злаков в последнее время подвергся значительной эрозии, проблема его расширения и качественного изменения спектра доступной отбору генотипической изменчивости в равной мере касается и тритикале. Для ее решения используются такие, направленные на реконструкцию ядерного генома, подходы, как создание хромосомно-замещенных форм, интрогрессия чужеродного генетического материала с целью передачи ценных признаков от диких видов [2–5]. Между тем, согласно литературным данным, ядерный геном ответственен лишь за 75% общей генотипической изменчивости растений, в то время как остальные 25% контролируются цитоплазматическими генами [6]. Из этого следует, что геномы органелл можно рассматривать как источник дополнительного генетического разнообразия, причем источник весьма ценный, поскольку исследования последних лет указывают на существенную роль цитоплазматических генов в адаптации растений [7]. В условиях наблюдаемого изменения климата

этот аспект приобретает особую важность. Все это свидетельствует о необходимости детальной характеристики на молекулярном уровне генетического разнообразия геномов органелл зерновых злаковых культур. Цель настоящего исследования — провести полногеномное секвенирование и осуществить сборку нуклеотидных последовательностей хлоропластных ДНК сортов тритикале и путем сопоставления их между собой и с референсным геномом пшеницы оценить уровень межсортовой и межвидовой изменчивости пластома данной зерновой культуры.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили 10 культивируемых в Республике Беларусь сортов тритикале, любезно предоставленные нам заведующим лабораторией тритикале РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» В. Н. Буштевичем. Из них шесть сортов (Благо 16, Динамо, Ковчег, Устье, Заречье, Гродно) озимого типа развития, остальные четыре (Узор, Лана, Матейко, Садко) — ярового.

Хлоропласты выделяли путем дифференциального центрифугирования [8] и модифицированного СТАВ метода [9] из 7-дневных проростков. ДНК из хлоропластов выделяли с помощью набора «АРТ-ДНК растения» согласно протоколу.

Качество полученных образцов проверяли рестрикционным анализом с использованием эндонуклеазы EcoRI. Продукты идентифицировали с помощью электрофореза в 1%-ом агарозном геле.

Высокопроизводительное секвенирование осуществлялось с использованием технологии Illumina, с использованием секвенатора MiSeq System. В качестве набора для приготовления использовалась библиотека NexteraXT, а набора для секвенирования — MiSeq Reagent Kit v.3.

Процесс обработки данных секвенирования включал следующие этапы: очистка FASTQ-файлов (Trimmomatic-0.39 [10]), выравнивание прочтений на референсный хлоропластный геном *Triticum aestivum* (код доступа GenBank — KJ592713, [11]) (Bowtie2-2.3.3 [12]), визуализация выравнивания прочтений (Tablet), сборка FASTA-последовательностей (SPAdes, SnapGene 6.2.2).

Результаты и обсуждение

В результате обработки данных высокопроизводительного секвенирования были получены полные нуклеотидные последовательности хлоропластных геномов (хп-геномов) всех включенных в эксперимент сортов тритикале. Номера доступа в NCBI GenBank: Благо 16 — OR727307, Динамо — OR727308, Ковчег — OR727311, Устье — OR727306, Заречье — OR735213, Гродно — OR727309, Узор — OR727311, Лана — OR727310, Матейко — OR727314, Садко — OR727313. При сопоставлении полученных последовательностей с референсным хп-геномом *Triticum aestivum* выявлены изменения в структуре кодирующих участков ДНК, включающие одно-, ди- и тетра-нуклеотидные замены, а также делеции (табл. 1).

В ген-кодирующих областях структурным изменениям подверглись в общей сложности 12 генов (рис. 1), которые условно можно разделить на две основные группы. В первую группу входят гены, кодирующие белки, связанные с фотосинтезом: ген *atpA*, ответственный за синтез α -субъединицы H^+ АТФазы, ген *psaA*, кодирующий белковый комплекс А фотосистемы I, а также гены *ndhB* и *ndhB2*, отвечающие за синтез НАДН-дегидрогеназы. Вторую группу составляют гены, связанные с работой генетического аппарата пластид: гены *rpl23* и *rpl23-A*, кодирующие белки большой субъединицы рибосом, ген *rps7-A*, ответственный за синтез белков малой субъединицы и гены *23S rRNA*, кодирующие синтез доменов рибосомальной 23S РНК. Следует отметить, что гены *ndhB*, *rpl23*, *rps7-A* и *23S rRNA* представлены в хп-геноме двумя копиями вследствие нахождения в инвертированных повторах.

Самой большой изменчивостью в исследованном материале характеризовался ген *atpA* — мутации нуклеотидной последовательности были выявлены в 27 позициях. При этом преобладающим типом изменений являлись однонуклеотидные замены (19). Из них лишь шесть были синонимичными, при которых вследствие вырожденности генетического кода последовательность аминокислот в белке, кодируемом этим геном, не изменяется. Среди несинонимичных замен одна (в позиции 35 432) привела к образованию стоп-кодона.

Таблица 1

Перечень детектированных нуклеотидных замен в XII-гене сортов тритикале

Ген	Позиция	Нуклеотидные замены	Аминнокислотная замена	Яровые				Озимые								
				Узор	Лана	Матейко	Салко	Заречье	Продно	Динамо	Блато 16	Ковчег	Устье			
<i>atpA</i>	34 473	G-A	Gly	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34 477	G-T	Val-Leu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34 480	T-C	Leu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34 486	G-A	Gly-Ser	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34 489	G-T	Asp-Tyr	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34 492	G-делеция	Gly	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34 497	G-T	Leu-Phe	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34 499-34 500	TG-GC	Met-Ser	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34 503	A-делеция	Ile	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34 557	T-C	Ser	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34 559-34 562	AGGC-TATA	Glu, Ala-Val, Tyr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34 564	T-A	Tyr-Asn	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34 579	G-A	Val-Ile	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34 610	A-G	Lys-Arg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34 621	A-G	Ile-Val	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34 664	T-G	Ile-Arg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34 755	A-C	Leu-Phe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34 812-34 813	TC-GA	Asp, Gln-Lys, Lys	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35 091-35 096	AAGACC-делеция	Arg, Arg, Pro-Ser	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35 163	T-G	Ala	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35 305	A-C	Asp-His	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35 343	T-A	Ser	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35 403	A-C	Ser	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35 432	T-G	Leu-Stop	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35 441-35 444	TTGC-делеция	Phe, Ala-Tyr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35 446-35 447	CA-TA	Gln-Leu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35 619	T-G	Asn-Lys	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

Окончание таблицы 1

Ген	Позиция	Нуклеотидные замены	Аминокислотная замена	Яровые				Озимые							
				Узор	Лана	Матейко	Сагако	Заречье	Гродно	Динамо	Блато 16	Ковчег	Устье		
<i>psa A</i>	40 346	T-G	Lys-Gln	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	40 686-40 689	СССА-АГАТ	Leu, Gly-Ile, Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rpl23-A</i>	82 165	A-C	Leu-Val	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ndhB</i>	84 753	C-A	Leu-Ile	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	86 175	T-G	Thr-Pro	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>ndhB</i>	86 563	T-G	Asn-Thr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	86 672	A-C	Thr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	86 726-86 727	TC-GA	Val, Val-Ile, Phe	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>rps7-A</i>	87 544	T-G	Val	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	87 593	G-A	Pro-Ser	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>23S rRNA</i>	94 423	T-G	Ala	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	119 387	A-C	Arg	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>rps7-A</i>	126 217	C-T	Ser	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	126 266	A-C	Met-Leu	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>ndhB</i>	127 083	G-C	Leu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	127 084	A-C	Met-Leu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	127 138	T-G	Ser-Ala	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	127 247	A-C	Gln-Pro	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	127 635	A-C	Ser	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>rpl23</i>	129 057	G-T	Arg-Leu	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	131 645	T-G	Val	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

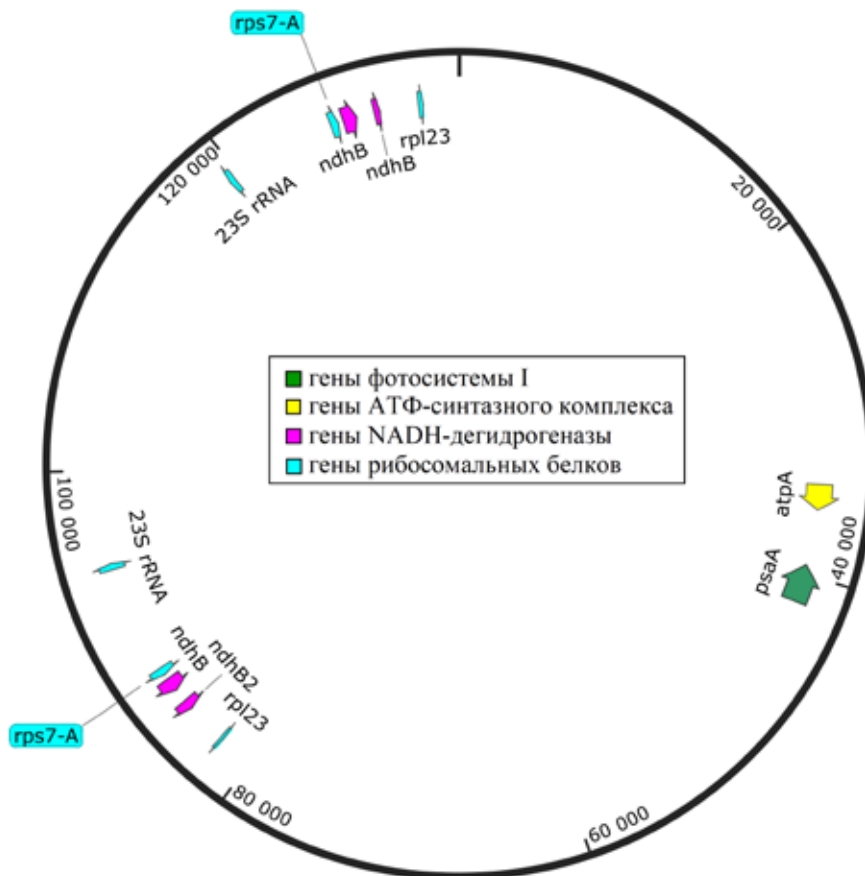


Рис. 1. Локализация выявленных у исследованных сортов тритикале полиморфных локусов на генетической карте хп-генома

В трех позициях отмечены динуклеотидные и в одной — тетрануклеотидная замены. Особенностью данного гена является также наличие четырех делеций.

На втором месте по уровню изменчивости стоит ген *ndhB*, у которого нуклеотидные замены выявлены в 11 позициях. Подавляющее большинство из них (10) были однонуклеотидными и только замена в позиции 86 726–86 727 — динуклеотидная. Синонимичными являлись три однонуклеотидные замены.

Третье место с четырьмя однонуклеотидными заменами, из которых две синонимичные, занимает ген *rps7-A*. Остальные полиморфные гены характеризовались наличием 1–2-х нуклеотидных замен.

При сравнении пластовов сортов тритикале между собой обнаружены различия как в количественном, так и качественном составе структурных изменений. Исключение составляют два яровых сорта — Матейко и Садко, у которых типированы 38 идентичных мутаций ДНК.

Максимальное количество мутаций (48) выявлено у озимого сорта Динамо. Пять из них (три однонуклеотидных замены и делеция одного нуклеотида в гене *atpA*, а также тетрануклеотидная замена в гене *psaA*) являются индивидуальными, не обнаруженными у других сортов. Минимальное количество мутаций (18), затрагивающих лишь пять генов: *atpA*, *psaA*, *rpl23-A*, *rpl23* и *ndhB2*, обнаружено у озимого сорта Устье. Интересно отметить тот факт, что аналогичные структурные изменения хп-ДНК в идентичных позициях (14 позиций для гена *atpA*, для остальных генов — по одной) типированы у всех исследованных сортов, причем одна из нуклеотидных замен в гене *atpA* приводит к образованию stop-кодона.

Среди остальных озимых сортов наиболее близки по структуре хп-генома сорта Благо 16 и Гродно, у которых при сравнении с референсным геномом выявлено соответственно 35 и 36 мутаций ДНК. При этом у второго сорта

дополнительно присутствует несинонимичная нуклеотидная замена в гене *atpA*. Сорта Заречье (34 мутации) и Благо 16 различаются между собой тремя мутациями хп-ДНК, которые касаются гена *atpA* и гена *23S rRNA*, кодирующего домены 23S рибосомальной РНК. При сравнении сортов Ковчег (25 мутаций) и Благо 16, имеющих идентичные изменения в гене *atpA*, обнаруживаются 10 различий, 9 из которых связаны с геном *ndhB*.

Что касается яровых сортов, то, как уже отмечалось выше, Матейко и Садко идентичны по структуре хп-генома. Сорт Узор (37 мутаций) отличается от них по 11 позициям, из которых шесть приходится на ген *atpA*, а сорт Лана (42 мутации) — лишь по шести, причем пять из них касаются этого же гена.

Учитывая имеющиеся в литературе примеры, свидетельствующие о существенной роли внутривидовой изменчивости цитоплазмы в адаптивной дифференциации растительных популяций [13–14], мы ожидали обнаружить различия в структуре пластов между тритикале ярового и озимого типов развития, однако наши ожидания не оправдались. Из выявленных в общей сложности 48 мутаций хп-ДНК лишь индивидуальные для озимого сорта Динамо полиморфизмы не отмечены у яровых форм, однако они не выявлены и у других озимых сортов. Остальные мутации в равной мере были характерны для обоих типов сортов.

В целом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о низком уровне межсортовой изменчивости хп-генома у культивируемых в Республике Беларусь сортов тритикале, что находится в соответствии с литературными данными, согласно которым в процессе одомашнивания и последующей селекции культурных растений произошло существенное снижение уровня полиморфизма не только ядерных, но и оргanelьных геномов. Так, Provan с соавторами [15], исследуя повторяющиеся последовательности хп-ДНК ячменя, обнаружил 25 гаплотипов среди 31 вида рода *Hordeum* L., из которых 11 принадлежали подвиду *H. vulgare* ssp. *spontaneum*, в то время как у всех проанализированных европейских сортов (101 сорт), относящихся к подвиду *H. vulgare* ssp. *vulgare*, был обнаружен только один гаплотип. Наличием единственного типа цитоплазмы характеризовались и 178 сортов

картофеля из Великобритании [16]. И таких примеров можно привести множество. Из этого следует, что искать источник дополнительного генетического разнообразия среди оргanelьных геномов сортового материала не имеет смысла. Как и в случае с ядерным геномом, для расширения изменчивости пластома с целью последующего ее использования для разработки новых селекционных стратегий следует обратиться к генному пулу диких сородичей культурных растений.

Заключение

В ходе исследования изменчивости хлоропластных геномов культивируемых в Республике Беларусь сортов тритикале выявлены структурные изменения ДНК в областях локализации 12 генов, кодирующих белки, связанные с фотосинтезом, и с работой генетического аппарата пластид.

Минимальное количество мутаций (18), оказавшихся идентичными для всех исследованных сортов, детектировано у озимого тритикале Устье. Максимальным количеством мутаций хп-ДНК характеризовался сорт Динамо, у которого выявлено 48 замен, из которых четыре в гене *atpA* и одна в гене *psaA* оказались индивидуальными. Каких-либо различий в структуре пластов между тритикале ярового и озимого типов развития обнаружено не было. В целом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о низком уровне межсортовой изменчивости хп-генома у культивируемых в Республике Беларусь сортов тритикале.

Список использованных источников

1. Тритикале / И. А. Гордей [и др.] // Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 2. : Частная генетика растений / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева ; Нац. Акад. Наук Беларуси, Ин-т генетики и цитологии. – 2 изд. – Минск : Беларуская наука, 2020. – Гл. 2. – С. 52–154.

2. Дубовец, Н. И. Цитогенетические методы в селекции растений / Н. И. Дубовец // Генетические основы селекции растений : в 4 т. Т. 1. : Общая генетика растений / науч. ред. : А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева ; Нац. Акад. Наук Беларуси, Ин-т генетики и цитологии. – 2 изд. – Минск : Беларуская наука,

2018. – Гл. 6. – С. 261–315.

3. Орловская, О. А. Интрогрессия генетического материала эгилопса вгеном гексаплоидных тритикале / О. А. Орловская, Л. Н. Каминская, Л. В. Хотылева // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 363–369.

4. Larter, E. N. Some characteristics of hexaploid triticales substitution lines involving the A-, B-, and D-genome chromosomes of wheat / E. N. Larter, K. Noda // Genome. – 2011. – Vol. 23. – P. 679–689.

5. Molecular, physicochemical and rheological characteristics of introgressive *Triticale* / *Triticum monococcum* ssp. *monococcum* lines with wheat 1D / 1A chromosome substitution / B. P. Salmanowicz [et al.] // Int. J. of Molec. Sciences. – 2013. – Vol. 14. – P. 15 595–15 614.

6. Геномы органелл клетки и их роль в эволюции и селекции растений / О. Г. Давыденко [и др.] // Генетические основы селекции растений : в 4 т. Т. 1. : Общая генетика растений / науч. ред. : А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. : Нац. Акад. Наук Беларуси, Ин-т генетики и цитологии. – 2 изд. – Минск : Беларуская наука, 2018. – Гл. 7. – С. 316–356.

7. Budar, F. The role of organelle genomes in plant adaptation Time to get to work! / F. Budar, F. Roux // Plant Signaling & Behavior. – 2011. – Vol. 6, № 5. – P. 635–639.

8. Ellis, J. R. Detection of rare paternal chloroplast inheritance in controlled crosses of the endangered sunflower *Helianthus verticillatus* / J. R. Ellis, K. E. Bentley, D. E. McCauley // Heredity. – 2008. – Vol. 100, № 6. – P. 574–580.

9. Triboush, S. O. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower / S. O. Triboush, N. G. Danilenko, O. G. Davydenko // Plant Molecular Biology Reporter. – 1998. – Vol. 16. – P. 183–189.

10. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30, № 15. – P. 2 114–2 120.

11. Corrected sequence of the wheat plastid genome / A. Bahieldin [et al.] // Comptes Rendus Biologies. – 2014. – Vol. 337, № 9. – P. 499–502.

12. Jones Hopkins University – Bowtie 2 [Electronic resource]. – Mode of access: – <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>. – Date of access: 10.01.2018.

13. Galloway, L. F. Nuclear and cytoplasmic contributions to intraspecific divergence in an annual legume / L. F. Galloway, C. B. Fenster // Evolution. – 2001. – Vol. 55. – P. 488–97.

14. Leinonen, P. H. Local adaptation, phenotypic differentiation and hybrid fitness in diverged natural populations of *Arabidopsis lyrata* / P. H. Leinonen, D. L. Remington, O. Savolainen // Evolution. – 2010. – Vol. 65. – P. 90–107.

15. Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum* / J. Provan [et al.] // Molecular Ecology. – 1999. – Vol. 8. – P. 505–511.

16. An extreme cytoplasmic bottleneck in the modern European cultivated potato (*Solanum tuberosum*) is not reflected in decreased levels of nuclear diversity / J. Provan [et al.] // Genetics. – 1999. – Vol. 266. – P. 633–639.

H. U. Sakalyik, T. E. Varfalamaeva, N. I. Dubovets

VARIABILITY OF THE CHLOROPLAST GENOME OF HEXAPLOID TRITICALE (\times *TRITICOSECALE WITTM.*)

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: a.sokolyuk@igc.by

Complete nucleotide sequences of the chloroplast genomes of 10 triticale varieties were obtained as a result of NGS data processing. Comparison of the sequences obtained with the reference chloroplast genome of *Triticum aestivum* revealed 52 changes in the structure of gene-coding regions, including single-, di- and tetranucleotide substitutions as well as deletions, which together affect 16 genes. Most variable are the two genes encoding proteins associated with photosynthesis: the *atpA* gene responsible for the synthesis of the α -subunit of H⁺ ATPase (DNA modifications were detected in 27 positions), and the *ndhB* gene responsible for the synthesis of NADH dehydrogenase, with changes in 11 positions. The minimum number of changes (18), which turned out to be identical for all the studied varieties, was detected in the winter triticale Ustye. The maximum number of chloroplast DNA modifications was detected in the triticale Dynamo in which 52 substitutions were identified, and 4 in the *atpA* gene and 1 in the *psaA* gene turned out to be individual. No differences in the structure of plastomes between the spring and winter types of triticale were found. In general, the results of the study indicate a low level of intervarietal variability of the chloroplast genome in triticale varieties cultivated in the Republic of Belarus.

Keywords: triticale, chloroplast genome, variability, nucleotide substitutions, NGS.

Дата поступления в редакцию: 05 сентября 2023 г.

А. Н. Заинчковская¹, Е. А. Фомина¹, Ф. Н. Кушанов², О. Ю. Урбанович¹

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *TaDHN9-A*, *TaDHN13* И *TaDHN20* У СОРТОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ В ОТВЕТ НА ЗАСУХУ

¹Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Ф. Скорины, 34
e-mail: O.Urbanovich@igc.by

²Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан
Республика Узбекистан, 111226, п/о Юкори-Юз Ташкентская область, Кибрайский район

Исследован уровень экспрессии генов *TaDHN9-A*, *TaDHN13* и *TaDHN20*, кодирующих дегидрины, в сортах яровой пшеницы Женис, Эстер, Triso, Дарья, Алмакен и Рассвет, обладающих различным уровнем засухоустойчивости, через 5, 10, 15 и 20 дней после прекращения полива. Показано, что уровень экспрессии данных генов, относящихся к K_n -типу, в сортах яровой пшеницы различается в ответ на моделирование засухи. Наблюдалось статистически значимое постепенное возрастание уровня экспрессии генов *TaDHN9-A* и *TaDHN13* в отдельных сортах по мере увеличения продолжительности водного дефицита. При этом наибольшее статистически достоверное изменение уровня экспрессии гена *TaDHN9-A* наблюдалось после 20 дней прекращения полива для сортов Женис, Эстер, Дарья и Рассвет. При изучении уровня экспрессии гена *TaDHN13* было показано наибольшее статистически значимое увеличение уровня его экспрессии для сорта Рассвет после 15 дней прекращения полива. Отмечено снижение уровня экспрессии гена *TaDHN20* у исследованных сортов на протяжении моделируемых условий засухи с высокой степенью достоверности, за исключением засухоустойчивого сорта Женис через 20 дней, снижение уровня экспрессии которого оказалось статистически не достоверно.

Ключевые слова: яровая пшеница, засухоустойчивость, дегидрины, уровень экспрессии генов.

Введение

Пшеница — один из наиболее важных видов злаков, культивируемых в мире. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (ФАО), в 2021–2022 гг. общее производство пшеницы в мире составило около 778 млн т [1]. Из зерна пшеницы вырабатывают муку и крупку, которые являются основными ингредиентами для различных видов хлебобулочных и мучных изделий. Пшеничный хлеб является основным продуктом питания населения более чем 80 стран мира, поскольку обладает высокой усвояемостью.

В Республике Беларусь пшенице также уделяется большое значение как продовольственной культуре. Обеспечение народного хозяйства страны зерном пшеницы собственного производства — важнейшая государственная задача, выполняемая за счет повышения урожайности, расширения посевных площадей, улучшения качества зерна и внедрения

в производство новых сортов, отвечающих современным требованиям [2, 3]. По данным Национального статистического комитета (на июль 2023 г.), под посевные площади пшеницы было отведено 795 тыс. га, что составляет 31,4% от всех площадей, занятых под зерновые и зернобобовые, и 13,8% от всех посевных площадей в стране [4]. Важная роль в обеспечении страны зерном собственного производства принадлежит сортам отечественной селекции.

В целом в Республике Беларусь часто наблюдаются неблагоприятные условия для выращивания зерновых культур, приводящие к водному дефициту. По мере роста потенциальной продуктивности сортов значение их устойчивости к действию абиотических и биотических стрессов будет неуклонно возрастать. Поэтому создание высокопродуктивных сортов с хорошим качеством зерна, высокоадаптивных, устойчивых к полеганию, неблагоприятным условиям среды (в том числе и засухе) и рас-

пространенным болезням — основное направление в селекции мягкой пшеницы в настоящее время.

Характерным защитным приспособлением, предотвращающим потерю воды и минимизирующим повреждение при дегидратации клетки растений, является накопление белков позднего эмбриогенеза, или LEA (Late Embryogenesis-Abundant) белков. Из нескольких классов обнаруженных LEA белков в связи с адаптацией к разнообразным повреждающим факторам огромный интерес вызвала группа 2 (или LEA-D11) белков, которые называют также дегидринами (dehydrins) [5, 6]. Показано, что дегидрины активно накапливались в проростках и узлах кушения злаковых при адаптации к низкой температуре, адаптации в полевых условиях, а также при засухе. Количество дегидринов было прямо пропорционально устойчивости растений к температурному стрессу и дегидратации [7].

В геноме пшеницы содержится несколько десятков генов, относящихся к дегидринам. Согласно анализу Wang с соавторами базы данных EST (Expressed Sequence Tags), в транскриптоме мягкой пшеницы содержится более 50 различных транскриптов, кодирующих дегидрины, организованных в 32 кластера, которые представлены, как полагают авторы работы, различным количеством расположенных в гомеологичных хромосомах дупликаций отдельных генов [8]. Сама классификация дегидринов на данный момент основывается на наличии и последовательности определенного количества консервативных сегментов — Y, S, K. По комбинации этих консервативных сегментов дегидрины подразделяются на несколько типов [9]. По данным Kosova с соавторами, основной вклад в засухоустойчивость вносят дегидрины, относящиеся к K_n - и Y_nSK_m -типу [10]. Это подтверждается данными по изучению уровня экспрессии генов *TaDHN9-A* [11], *TaDHN13* [11, 12] и *TaDHN20* [8], относящихся к K_2 -, K_3 - и K_4 -типу соответственно.

В связи с важностью данных генов в ответе на водный дефицит целью нашего исследования было изучение уровня экспрессии генов *TaDHN9-A*, *TaDHN13* и *TaDHN20* в сортах яровой пшеницы с различным уровнем засухоустойчивости при засухе в контролируемых условиях.

Материалы и методы

Растительный материал и условия выращивания растений

Объектом исследования послужили шесть образцов яровой пшеницы белорусской и зарубежной селекции, отличающихся по уровню засухоустойчивости. Так, сорта Женис [14] и Эстер [15], согласно полевой оценке, обладают высоким уровнем засухоустойчивости, Triso [16] и Дарья [17] — средним, а Алмакен [18] и Рассвет [19] — низким. Данные образцы были переданы Национальным банком семян генетических ресурсов хозяйственно полезных растений РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино). Растения выращивались в питательном торфяном грунте «ДВИНА» (ПУ «Витебск-торф») в течение семи дней при нормальном поливе, после чего полив половины растений каждого сорта прекращался. Вторая половина растений каждого сорта продолжала получать полив и послужила контрольной группой.

Получение препаратов РНК

Выделение РНК из листьев растений на различных стадиях роста (через 5, 10, 15 и 20 дней после прекращения полива) было осуществлено при помощи реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA (Евроген, Российская Федерация) согласно протоколу производителя.

Получение препаратов кДНК

Перед синтезом кДНК полученные препараты РНК были обработаны ДНКазой (DNase I, RNase-free (Thermo scientific, ЕС)) по предложенному производителем протоколу. Синтез кДНК проводили с использованием ArtMMLV Total (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь) согласно протоколу, предложенному производителем.

Проведение ПЦР в режиме реального времени

Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали смесь ArtMix Color (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь) согласно протоколу производителя. При постановке реакции для каждого сорта использовали по три биологические повторности, каждая из которых включала три растения. При этом каждая биологическая повторность также была представлена тремя аналитическими повторностями. Для проведения амплификации была использована следующая программа:

1 цикл продолжительностью 3 мин — 95 °С; 38 циклов, включающих в себя: 15 сек — 95 °С, 20 сек при температуре отжига, указанной в таблице 1, 30 сек — 72 °С.

Последовательность праймеров отдельных *DHN* генов и референсного гена, кодирующего первичную последовательность актина, приведена в таблице 1.

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых для анализа экспрессии отдельных *DHN* генов

Праймер	Последовательность 5' → 3'	Температура отжига, °С	Литературный источник
TaDHN9-A	F TCAAGGAGAAGCTCCCCGGT R CTCCTTACACCTTGCCATGAGG	64	[11]
TaDHN13	F GCGTCATGGAAAGCATCAC R GTCCAGGCAGCTTGTCTT	62	[12, 13]
TaDHN20	F CAACACTGAGAAAAAGGGCGTC R GTATGTGGCTGTGGTGCTATGC	62	[8]
Ta_АCT	F ACCTTCAGTTGCCAGCAAT R TCGACCGCTGGCATAACAAG	56–64	[20]

Статистическая обработка данных

Количество целевого транскрипта рассчитывали относительно числа копий мРНК референсного гена, кодирующего первичную структуру актина, который стабильно экспрессируется в клетках вне зависимости от внешних воздействий на организм. Кратность изменения уровня экспрессии определенного *DHN* гена в исследуемых условиях относительно нормальных условий проводили по методу $2^{-\Delta\Delta C_T}$, допуская, что уровень эффективности амплификации всех праймеров равен 100%, где $-\Delta\Delta C_T$ — изменение уровня экспрессии определенного *DHN* гена в исследуемых условиях относительно нормальных условий рассчитывали по формуле 1:

$$-\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{рект})} - \Delta C_{T(\text{н.у.})}, \text{ где (1)}$$

$\Delta C_{T(\text{рект})}$ — изменение уровня экспрессии определенного гена *DHN* относительно референсного гена актина в исследуемых условиях;

$\Delta C_{T(\text{н.у.})}$ — изменение уровня экспрессии определенного гена *DHN* относительно референсного гена актина в нормальных условиях.

$\Delta C_{T(\text{рект})}$ и $\Delta C_{T(\text{н.у.})}$ рассчитывали по формулам 2, 3:

$$\Delta C_{T(\text{рект})} = C_{T(\text{DHN, рект})} - C_{T(\text{ACT, рект})} \text{ (2)}$$

$$\Delta C_{T(\text{н.у.})} = C_{T(\text{DHN, н.у.})} - C_{T(\text{ACT, н.у.})}, \text{ где (3)}$$

$C_{T(\text{DHN, рект})}$ — пороговый цикл для определенного гена *DHN* в исследуемых условиях;

$C_{T(\text{ACT, рект})}$ — пороговый цикл для референсного гена актина в исследуемых условиях;

$C_{T(\text{DHN, н.у.})}$ — пороговый цикл для определенного гена *DHN* в нормальных условиях;

$C_{T(\text{ACT, н.у.})}$ — пороговый цикл для референсного гена актина в нормальных условиях [21].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA).

Результаты и обсуждение

Как упоминалось выше, основной вклад в засухоустойчивость вносят дегидрины, относящиеся к K_n - и Y_nSK_m -типу [10]. В частности, при изучении профиля экспрессии 55 дегидринов мягкой пшеницы при воздействии различных видов абиотического стресса в шести транскриптомах было показано значительное увеличение уровня экспрессии генов *TaDHN9-A* и *TaDHN13* после 1 и 6 ч воздействия засухи. Количество транскриптов на миллион килобаз (tpm) для гена *TaDHN9-A* через 1 и 6 ч составило 97,6 и 1 045,1 соответственно, а для гена *TaDHN13* — 49,1 и 396,7 [11]. Увеличение уровня экспрессии

гена *TaDHN13* до 5 раз было показано Nasr с соавторами для египетского сорта Giza 168 через 24 ч после подвергания его засухе [12]. Также, по данным Wang с соавторами, максимальный уровень экспрессии гена *TaDHN20* наблюдался в листьях проростков сорта яровой пшеницы Kehan 15, выращенных в условиях гидропоники в течение 10 дней, при их экспозиции на сухой фильтровальной бумаге при влажности 70% и слабом освещении через 48 ч [8]. Поскольку в реальных условиях растения подвергаются засухе более длительный промежуток времени, для нас представляло интерес изучение уровня экспрессии данных генов в моделируемых условиях, приближенным к реальным.

Нами было проведено исследование уровня экспрессии генов *TaDHN9-A*, *TaDHN13* и *TaDHN20* методом ПЦР в реальном времени в условиях моделирования водного дефицита у сортов мягкой пшеницы с различным уровнем засухоустойчивости. Уровень экспрессии указанных генов измеряли через 5, 10, 15 и 20 дней после прекращения полива.

Результаты изменения уровня экспрессии гена *TaDHN9-A* приведены на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, практически у всех сортов наблюдалось увеличение уровня экспрессии гена *TaDHN9-A* после 5, 10, 15 и 20 дней засухи. Однако, к примеру, если после 10 дней засухи статистически значимое увеличение уровня экспрессии данного гена колебалось от 3,21 для сорта Эстер до 4,14 для сорта Triso, после 15 дней — от 4,32 для сорта Эстер до 15,91 для сорта Алмакен, то после 20 дней засухи оно колебалось от 6,66 для сорта Triso до 232,13 для сорта Рассвет, что говорит о значительном увеличении уровня его экспрессии после 20 дней засухи. Также следует отметить, что наибольшее изменение уровня экспрессии гена *TaDHN9-A* после 20 дней засухи наблюдалось для засухоустойчивых сортов Женис, Дарья и Эстер, а также для чувствительного к засухе сорта Рассвет.

При изучении уровня экспрессии гена *TaDHN13* (рис. 2) было показано статистически достоверное максимальное увеличение уровня его экспрессии для сорта Рассвет в 3,13 раза после 15 дней прекращения полива. Также статистически значимое увеличение экспрессии данного гена в 1,96 раза было зафиксировано для сорта Женис после

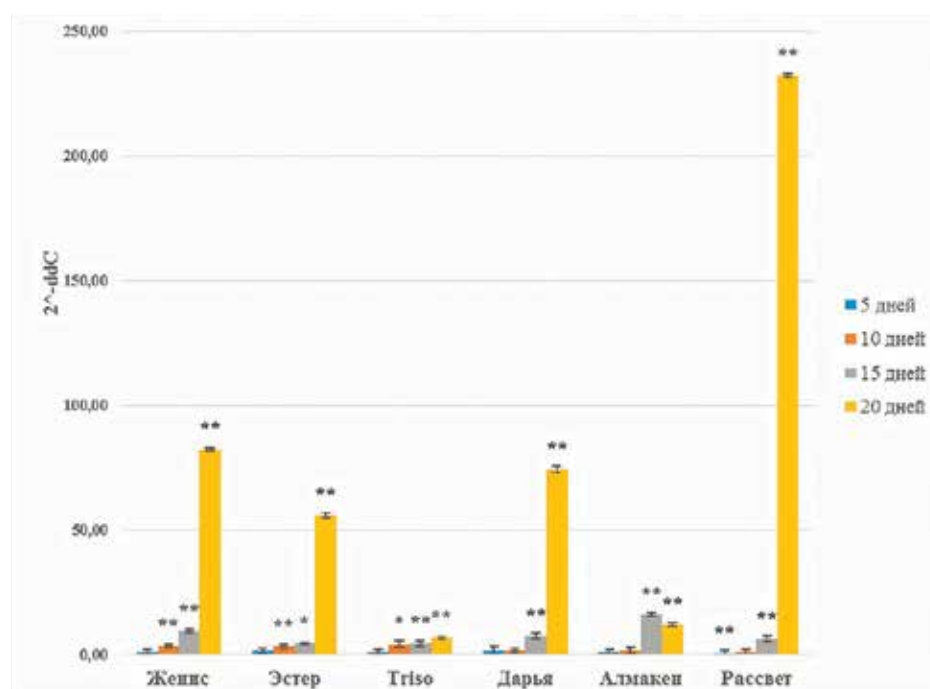


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии гена *TaDHN9-A* у сортов яровой мягкой пшеницы в условиях действия засухи на протяжении 5, 10, 15 и 20 дней. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии гена *TaDHN9-A* у растений, не подвергающихся засухе, равен 1. $P < 0,05$ (*) и $P < 0,01$ (**) по сравнению с контролем

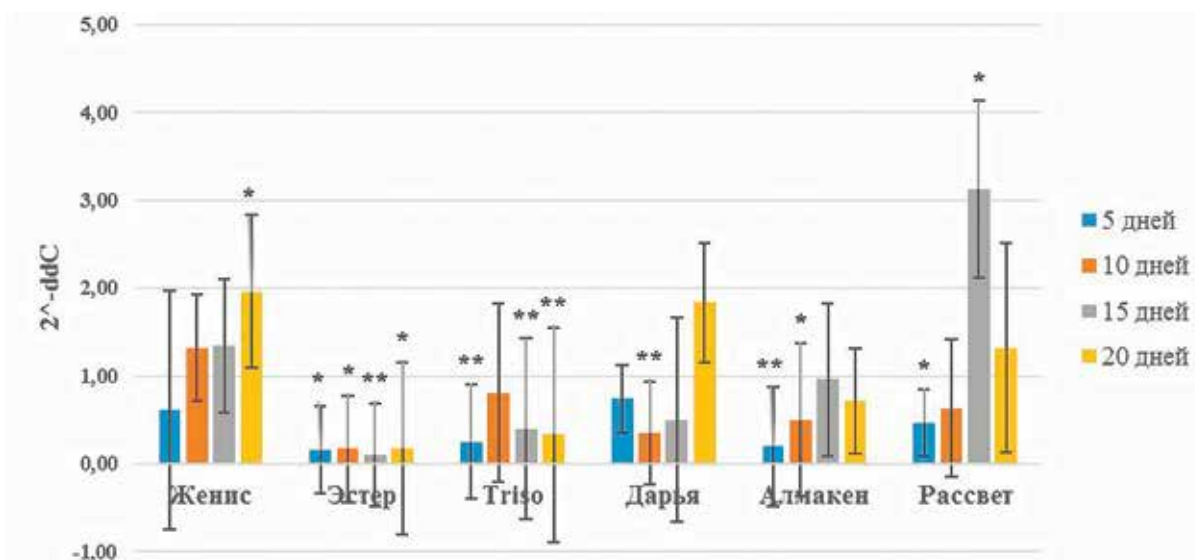


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии гена *TaDHN13* у сортов яровой мягкой пшеницы в условиях действия засухи на протяжении 5, 10, 15 и 20 дней. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии гена *TaDHN13* у растений, не подвергающихся засухе, равен 1. $P < 0,05$ (*) и $P < 0,01$ (**) по сравнению с контролем

20 дней прекращения полива. Для остальных сортов было зафиксировано незначительное снижение или отсутствие изменения уровня экспрессии гена *TaDHN13*. Возможно, более значительное увеличение уровня экспрессии данного гена происходит на более поздних сроках воздействия засухи. В связи с этим представляет интерес изучение его экспрессии, например, через 25, 30 и более дней насту-

пления засухи, особенно в сортах Женис и Рассвет, в которых было показано увеличение экспрессии гена *TaDHN13* через 20 и 15 дней после прекращения полива соответственно.

Исследование уровня экспрессии гена *TaDHN20* показало снижение уровня его экспрессии во всех изученных образцах по сравнению с контрольными образцами (рис. 3). Самый большой показатель уровня экспрессии

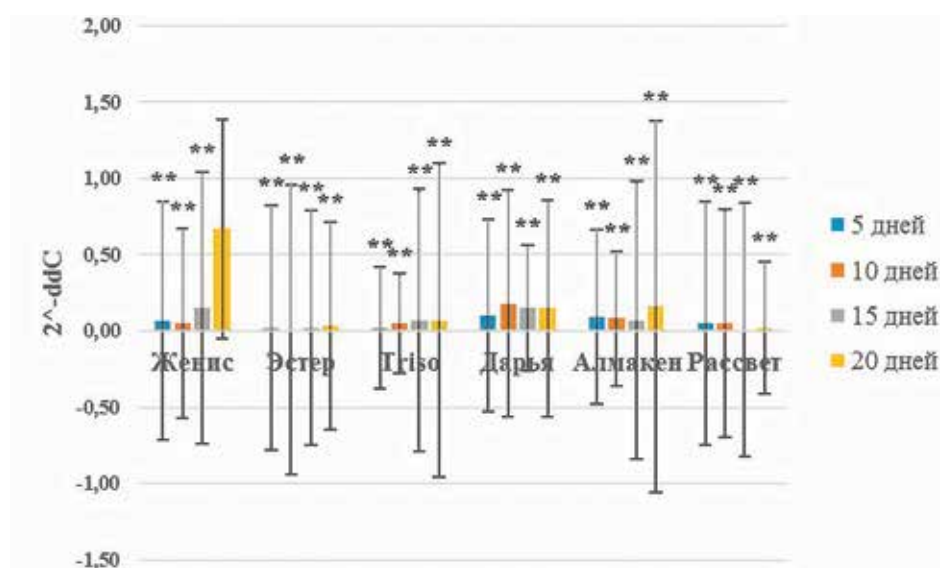


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии гена *TaDHN20* у сортов яровой мягкой пшеницы в условиях действия засухи на протяжении 5, 10, 15 и 20 дней. На диаграмме представлены средние значения и стандартные отклонения. Уровень экспрессии гена *TaDHN20* у растений, не подвергающихся засухе, равен 1. Значение уровня экспрессии достоверно при $P < 0,05$ (*) и $P < 0,01$ (**)

данного гена наблюдался для обладающего средним уровнем засухоустойчивости сорта Дарья через 10 дней засухи, но он составил 0,18 от уровня его экспрессии в контрольных образцах. Более высокий уровень экспрессии гена *TaDHN20* отмечен у засухоустойчивого сорта Женис через 20 дней, однако он оказался статистически не достоверным. Отсутствие выраженных отличий в уровне экспрессии гена *TaDHN20* у изученных сортов, вероятно, говорит об особенностях его экспрессии в данных сортах в моделируемых нами условиях. Возможно, его экспрессия происходит на более ранних или более поздних этапах воздействия засухи, либо в более жестких условиях, как было показано Wang с соавторами [8].

Таким образом, результаты указывают, что уровень экспрессии генов *TaDHN9-A*, *TaDHN13* и *TaDHN20*, относящихся к K_n типу, в сортах яровой пшеницы различается в ответ на моделирование засухи. Однако в целом наблюдалось постепенное увеличение уровня экспрессии генов *TaDHN9-A* и *TaDHN13* у отдельных сортов по мере увеличения продолжительности моделируемого водного дефицита. При этом реакция сортов с различным уровнем засухоустойчивости не одинакова. Это подтверждает данные о том, что дегидрины демонстрируют многовариантную реакцию в ответ на абиотический стресс, при этом важно учитывать виды стресса, его силу и длительность, а также индивидуальную реакцию генотипов [11–13]. Так, например, показано, что уровень экспрессии гена *TaDHN13* возрастает в ответ на засуху и при этом варьирует у различных видов пшеницы и двух сортов с разным уровнем чувствительности к этому абиотическому стрессу [22].

В настоящее время ведутся поиски корреляции между уровнем экспрессии отдельных генов, кодирующих дегидрины, и силой ответа на разные виды стресса, включая засуху, с целью поиска молекулярных маркеров, позволяющих упростить селекционный отбор [23]. Однако засухоустойчивость — это полигенный признак, и контролирующие его гены, в том числе и дегидрины, расположены практически на всех хромосомах. Гены *TaDHN9-A*, *TaDHN13* и *TaDHN20* являются частью всей совокупности этих генов, и анализ уровня только их экспрессии не может объяснить всех

фенотипических отличий по данному признаку. Тем не менее важно понимать вклад каждого гена для разработки стратегии геномной селекции.

Заключение

В результате исследования показано влияние засухи в моделируемых условиях на уровень экспрессии генов *TaDHN9-A*, *TaDHN13* и *TaDHN20* в шести сортах яровой пшеницы с различным уровнем засухоустойчивости. Так, было выявлено статистически значимое ($P < 0,05$) постепенное увеличение уровня экспрессии гена *TaDHN9-A* от 3,40 до 82,27 для сорта Женис, от 3,21 до 55,83 для сорта Эстер, от 4,14 до 6,66 для сорта Triso после 10 и 20 дней прекращения полива соответственно. Для сортов Дарья и Рассвет было установлено статистически достоверное постепенное увеличение уровня экспрессии данного гена в 7,51 и 6,24 раза соответственно от уровня его экспрессии в контрольных образцах через 15 дней после прекращения полива, а также в 74,32 и 232,13 раза после 20 дней прекращения полива. Для сорта Алмакен наблюдалось статистически значимое незначительное постепенное снижение уровня экспрессии гена *TaDHN9-A* от 15,91 до 12,12 также после 15 и 20 дней прекращения полива соответственно. Статистически достоверное максимальное увеличение уровня экспрессии гена *TaDHN13* в 3,13 раза было достигнуто у сорта Рассвет после 15 дней прекращения полива. У сорта Женис экспрессия данного гена возрастала до статистически значимого максимального значения в 1,96 раза после 20 дней прекращения полива. Для сорта Эстер показано статистически достоверное снижение уровня экспрессии данного гена на всем протяжении моделируемых условий засухи, для сорта Triso — через 5, 15 и 20, для сорта Дарья — через 10, для сорта Алмакен — через 5 и 10 дней и для сорта Рассвет — через 5 дней после прекращения полива. Также снижение уровня экспрессии для всех исследованных сортов на всем протяжении моделируемых условий засухи было зафиксировано и для гена *TaDHN20*, за исключением засухоустойчивого сорта Женис через 20 дней, снижение уровня экспрессии которого оказалось статистически не достоверно.

Таким образом, уровень экспрессии генов

TaDHN9-A, *TaDHN13* и *TaDHN20*, относящихся к K_n типу, в сортах яровой пшеницы различается в ответ на моделирование засухи. В связи с этим представляет интерес изучение экспрессии указанных генов в совокупности с другими генами, влияющими на данный признак.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ Б22УЗБ-054.

Список использованных источников

1. Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fao.org>. – Дата доступа: 31.07.2023.
2. Гриб, С. И. Научная кооперация по селекции яровой пшеницы для условий Беларуси и Нечерноземья России / С. И. Гриб // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2013, № 3. – С. 35–39.
3. Гордей, С. И. Направления и основные результаты селекции озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в Республике Беларусь / С. И. Гордей, И. В. Сацюк, Э. П. Урбан // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2019. – Т. 57, № 4. – С. 444–453.
4. Сельское хозяйство Республики Беларусь: Статистический буклет / Национальный статистический комитет Республики Беларусь, Государственный комитет по имуществу Республики Беларусь; редкол.: И. В. Медведева [и др.]. – Минск: Информационно-вычислительный центр Национального статистического комитета республики Беларусь, 2023. – 36 с.
5. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms / M. Hanin [et al.] // *Plant Signal Behav.* – 2011. – Vol. 10. – P. 1 503–1 509.
6. Graether, S. P. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family / S. P. Graether, K. F. Boddington // *Frontiers in Plant Science.* – 2014. – Vol. 5. – P. 576.
7. Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research / A. Sallam [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2019. – Vol. 20, № 13. – P. 1–36.
8. Classification and expression diversification of wheat dehydrin genes / Y. Wang [et al.] // *Plant Science.* – 2014. – Vol. 214. – P. 113–120.
9. Close, T. J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins / T. J. Close // *Physiol. Plant.* – 1996. – Vol. 97. – P. 795–803.
10. Kosova, K. Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity — what can LEA-II proteins tell us about plant stress response? / K. Kosova, P. Vıtamvas, I. T. Prasil // *Front. Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1–6.
11. Genome-wide survey of the dehydrin genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relatives: identification, evolution and expression profiling under various abiotic stresses / Y. Hao [et al.] // *BMC Genomics.* – 2022. – Vol. 23, № 1. – P. 1–18.
12. Gene expression evaluation of DHN gene in some wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under abiotic stress / M. I. Nasr [et al.] // *J. Product. & Dev.* – 2015. – Vol. 20, № 2. – P. 227–237.
13. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes / P. Rampino [et al.] // *Plant, Cell and Environment.* – 2006. – Vol. 29. – P. 2 143–2 152.
14. Национальный аграрный научно-образовательный центр [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://nasec.kz/ru/news/osorte-yarovoy-myagkoj-pshenicy-zhenis>. – Дата доступа: 01.06.2022.
15. Агропромышленная компания КОЛОС [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.apk-kolos.ru/pshenica-jarovaja/c296.html>. – Дата доступа: 01.06.2022.
16. ООО «ДСВ-Украина» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://dsv-seeds.com.ua/ru/product/trizo>. – Дата доступа: 01.06.2022.
17. Агропромышленная компания КОЛОС [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.apk-kolos.ru/pshenica-jarovaja/c214.html>. – Дата доступа: 01.06.2022.
18. Национальный аграрный научно-образовательный центр [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://nasec.kz>. – Дата доступа: 01.06.2022.
19. Амунова, О. С. Исходный материал для селекции мягкой яровой пшеницы на устойчивость к неблагоприятным эдафическим факторам Волго-Вятского региона: дис. ... канд. биол. наук: 06.01.05 / О. С. Амунова. – Киров, 2017. – 157 л.
20. Assessment of candidate reference genes

for the expression studies with brassinosteroids in *Lolium perenne* and *Triticum aestivum* / B. Jurczyk [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2014. – Vol. 171, № 16. – P. 1 541–1 544.

21. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods. – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 402–408.

22. Pour-Benab, S. M. Expression of dehydrin and antioxidant genes and enzymatic antioxidant

defense under drought stress in wild relatives of wheat / S. M. Pour-Benab, S. Fabriki-Ourang, A. A. Mehrabi // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2019. – Vol. 33, № 1. – P. 1 063–1 073.

23. Molecular characterization of 87 functional genes in wheat diversity panel and their association with phenotypes under well-watered and water-limited conditions / M. Khalid [et al.] // Front. Plant Sci. – 2019. – Vol. 10. – P. 1–15.

A. N. Zainchkovskaya¹, A. A. Famina¹, F. N. Kushanov², O. Yu. Urbanovich¹

EXPRESSION OF THE *TaDHN9-A*, *TaDHN13* AND *TaDHN20* GENES IN SPRING WHEAT VARIETIES IN DROUGHT RESPONSE

¹State Scientific Institution

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

34 F. Skorina St., 220141 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: O.Urbanovich@igc.by

²Institute of Genetics and Experimental Plant Biology
of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

111226 Yukori-Yuz settlement, Tashkent Region, Kibray District, the Republic of Uzbekistan

The expression level of the *TaDHN9-A*, *TaDHN13* and *TaDHN20* genes encoding dehydrins was studied in the spring wheat varieties Zhenis, Ester, Triso, Daria, Almaken and Rasvet, which have different levels of drought resistance, after 5, 10, 15 and 20 days after watering stops. It was shown that the expression level of these genes related to the K_n type in spring wheat varieties varies in response to drought modeling. A gradual statistically significant increase in the expression level of the *TaDHN9-A* and *TaDHN13* genes was observed in individual varieties as the duration of water deficiency increased. At the same time, the greatest statistically significant change in the expression level of the *TaDHN9-A* gene was observed after 20 days of watering cessation for the varieties Zhenis, Ester, Daria and Rassvet. When studying the expression level of the *TaDHN13* gene, the greatest statistically significant increase in its expression level was shown for the Rassvet variety after 15 days of watering cessation. A decrease in the expression level of the *TaDHN20* gene was noted in the studied varieties during simulated drought conditions with a high degree of confidence, with the exception of the drought-resistant variety Zhenis (in 20 days) a decrease in the expression level of which was not statistically significant.

Keywords: spring wheat, drought resistance, dehydrins, gene expression level.

Дата поступления в редакцию: 08 сентября 2023 г.

Я. Л. Страх, С. И. Вакула, О. С. Игнатовец

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ДИКОРАСТУЩЕЙ МОРОШКИ ПРИЗЕМИСТОЙ (*RUBUS CHAMAEMORUS* L.)

Белорусский государственный технологический университет
Республика Беларусь, 220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а
e-mail: y.strakh@gmail.com

Исследование генетического разнообразия морошки приземистой *Rubus chamaemorus* L. проводили с использованием доминантных ISSR-маркеров. Установлено, что образцы исследуемых локалитетов (заказников «Лонно», «Ельня», «Болото Мох», «Жада», «Нитауре») имеют высокий уровень межпопуляционного полиморфизма и генетического разнообразия. Общая доля полиморфных локусов составила 87%, для белорусских популяций — 60%. Среди исследуемых популяций самый высокий процент полиморфных локусов отмечен для латвийской популяции «Нитауре» (55%), за ним следует «Болото мох» (33%). Другие изученные популяции имеют более низкий процент полиморфных локусов, среди них самый низкий у «Жада» — 18%. Локалитеты «Ельня», «Жада», «Лонно» и «Болото мох» характеризуются генетической общностью, и относительно удалены от генофонда, представленного в «Нитауре». Популяция «Лонно» разделяет большую часть своего генетического разнообразия с популяциями «Жада» и «Ельня», что, возможно, отражает общность происхождения всех белорусских популяций и разобщение ареала.

Ключевые слова: морошка приземистая (*Rubus chamaemorus* L.), генетическое разнообразие, популяция, ДНК-маркеры, полиморфизм.

Введение

Одной из важнейших задач современного общества является сохранение, развитие и использование генетических ресурсов диких и одомашненных видов. Оценка распределения генетического разнообразия по экосистемам, ареалам и популяциям позволяет грамотно управлять доступом к генетическим ресурсам и получать выгоды от их использования. Ряд таких инструментов был создан в рамках популяционной генетики. Одним из наиболее удобных, информативных и доступных методов оценки общего и видового биоразнообразия являются системы ДНК-маркеров: RFLPs, RAPDs, AFLPs, SNPs, SSR и т. д. [1]. Выбор маркерных систем зависит от ряда факторов: целей, задач и уровня изученности генетических ресурсов вида; а также имеет тенденцию изменяться по мере развития методов ДНК-анализа.

Морошка приземистая (*R. chamaemorus* L., *Rubus chamaemorus* L.) — многолетнее двудомное растение, принадлежащее к семейству розоцветных. Вид является ледниковым реликтом, преимущественно распространен в субарктических и бореальных широтах Северного

полушария [2] и приурочен к тундровой зоне и заболоченным участкам. Основной ареал *R. chamaemorus* L. охватывает Скандинавию, страны Балтии и Шотландию [3]. Небольшие изолированные популяции выявлены в Польше, Германии, Чехии [3, 4, 5] и Республике Беларусь, где морошка считается видом, находящимся под угрозой исчезновения, занесена в Красную книгу и относится ко II-ой категории охраны (EN) [6]. В Беларуси морошка приземистая размножается преимущественно вегетативным путем и распространяется корневыми отводками [7], семенное размножение довольно редко, особенно в странах, где плоды морошки имеют большое хозяйственное значение.

R. chamaemorus L. — октоплоидный вид ($2C = 2n = 8x = 56$) с размером генома $2,46 \pm 0,05$ пг/2C или $3,8 \times 10^9$ п. о. [8]. Популяционная генетика морошки приземистой изучена недостаточно и неполно. Для оценки генетического разнообразия и дифференциации генофонда использовали изоферментные спектры [9] и ДНК-маркеры: RAPD [10], AFLP [11], SSR [4, 10], ISSR [12], iPBS [13]. Некоторые исследования показали низкое

молекулярное разнообразие [8, 10], другие, наоборот, — высокий уровень полиморфизма и уникальный аллельный состав популяций [2, 12]. Латвийские ученые оценили генетическую дифференциацию латвийских и белорусских популяций морошки приземистой с использованием комбинации ретротранспозон-связывающих маркеров iPBS (inter-primer binding site) [14] и секвенирования 5,8S рРНК. При секвенировании 5,8S рРНК были выявлены мутации у представителей белорусских популяций морошки, но не среди латвийских образцов. Кроме того, iPBS профилирование показало, что генетическая дифференциация белорусских популяций морошки приземистой выше по сравнению с представителями, собранными на территории Латвии. Таким образом, белорусские популяции морошки приземистой могут нести редкие генетические варианты и являться ценным генетическим ресурсом для фармацевтической, пищевой промышленности и сохранения биоразнообразия

редких и исчезающих видов.

Цель исследования — изучить генетическую дифференциацию дикорастущих популяций морошки приземистой на территории Республики Беларусь, выявить источники для расширения генетического разнообразия вида на изучаемой территории.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись образцы мужских и женских растений *R. chamaemorus* L., отобранные из четырех белорусских и одной латвийской популяции (рис. 1). Изъятие частей растений осуществляли в соответствии с Положением [15].

Экстракцию ДНК из 12 индивидуальных растений каждой популяции проводили с использованием бромид цетилтриметиламмония (СТАВ) [11] из навески 200 мг лиофилизированных листовых пластинок, очищали смесью хлороформ-изоамиловый спирт и нормализовали до концентрации 50 нг/мкл.

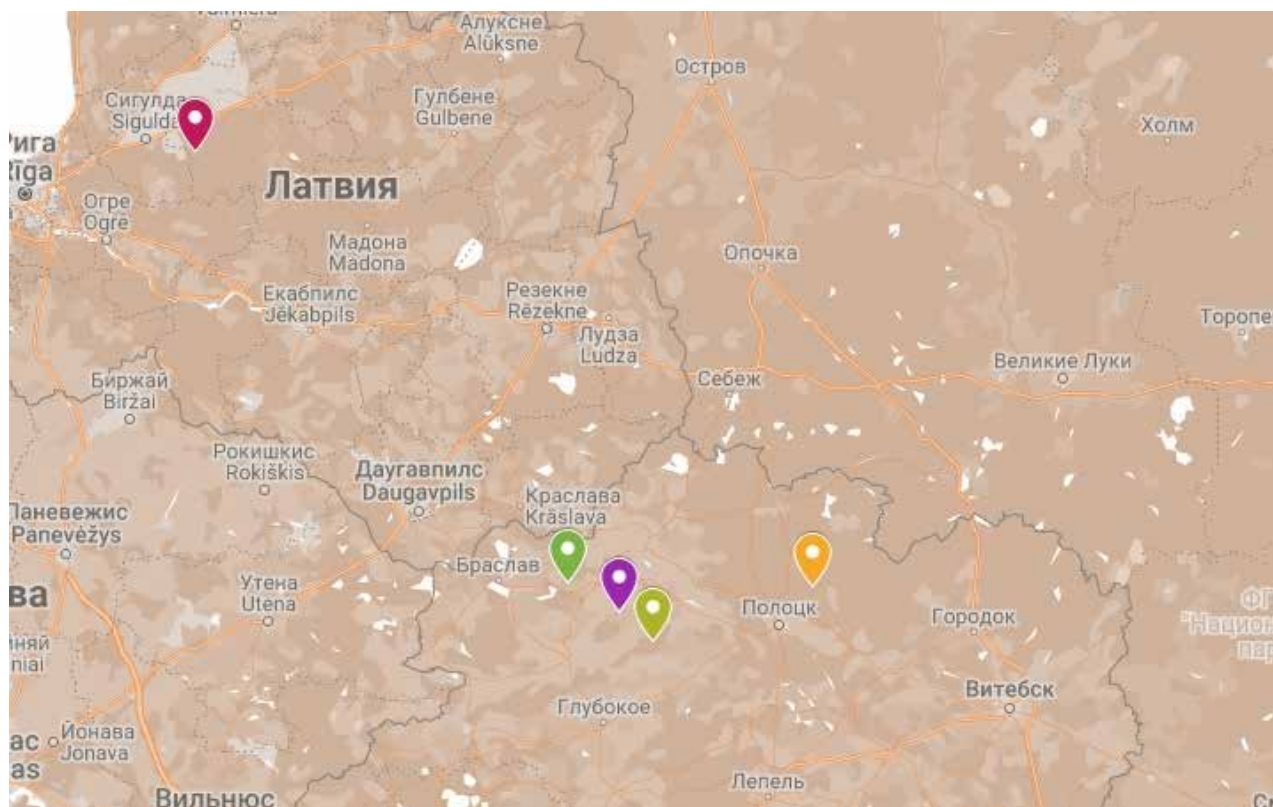


Рис. 1. Расположение популяций *R. chamaemorus* L.

Республика Беларусь: ■ — Заказник «Лонно», д. Лонница, Полоцкий р-н, Витебская обл.; ■ — Заказник «Ельня», Миорский р-н, Витебская обл.; ■ — Заказник «Болото Мох», Миорский р-н, Витебская обл.; ■ — Заказник «Жада», Шарковщинский и Миорский р-н, Витебская обл.;
Латвийская Республика: ■ — «Нитауре», Nītaure, Нитаурская волость, Аматский край

Реакцию амплификации ДНК проводили в объеме 15 мкл, ПЦР-смесь содержала: 1 × ArtMix ДНК-полимераза, 0,01 нг праймера, 100 нг ДНК. Амплификатор С1000 (Bio-Rad, США) был запрограммирован на режим «активация фермента»: 94 °С — 4 мин; 35 циклов: 94 °С — 50 сек; 48–56 °С — 50 сек, 72 °С — 70 сек; терминальная элонгация: 72 °С — 4 мин. Оптимальные температуры отжига для ISSR-праймеров определяли по результатам проведения ПЦР в градиенте температур 48–56 °С (табл. 1).

Таблица 1

ISSR маркеры, используемые в исследовании

Название	Последовательность	Температура отжига, °С
ISSR 4	ACACACACACACACAG	54
ISSR 5	AGAGAGAGAGAGAGG	55
ISSR 6	GAGAGAGAGAGAGAT	50
ISSR 8a	GTGTGTGTGTGTGYC	54
ISSR 9a	CTCCTCCTCCTCCTCA	55
ISSR 9	CTCCTCCTCCTCCTCAC	55
ISSR 10	GAAGAAGAAGAAGAA	53
ISSR 11	AGAGAGAGAGAGAGC	52
ISSR 12	ACACACACACACACC	55
ISSR 17	GACAGACAGACAGACA	49
ISSR 22	ACACACACACACACAA	55
ISSR 23	ACACACACACACACTA	50
ISSR 24	ACACACACACACACTC	56

Продукты амплификации разделяли в 1,8%-ом агарозном геле при 80 В в буфере 1,0 × TAE, визуализировали путем окрашивания бромистым этидием (0,5 мкг/мл) и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью системы гель-документирования

ЕВОХ (Vilber, Франция). Молекулярные массы фрагментов оценивали с использованием 1 kb ДНК-маркера (ЗАО Евrogen, Россия). Электрофореграмма представлена на рисунке 2.

Для каждого из маркеров оценивали наличие (1) или отсутствие (0) фрагмента определен-

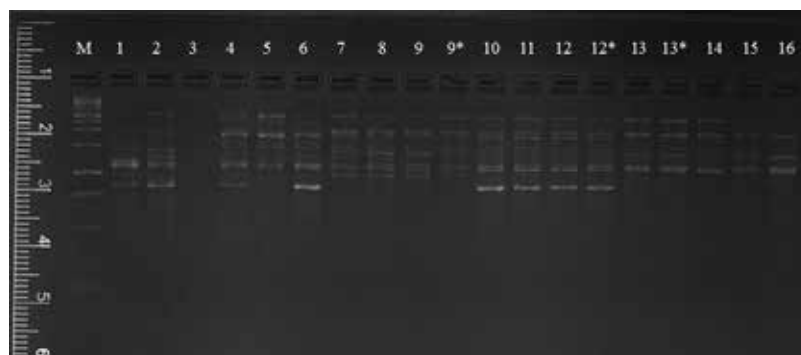


Рис. 2. Электрофореграмма фрагментов ДНК, амплифицированных с праймером ISSR 24 (агарозный гель 1,8%, М: 1 kb ЗАО Евrogen, Россия)

ной длины (рис. 2). Поскольку ISSR-маркеры являются доминантными, предполагается, что каждая полоса представляет фенотип одного биаллельного локуса. Наличие полосы интерпретировалось как гетерозигота или доминантная гомозигота, а отсутствие полосы — как рецессивная гомозигота. Для каждого праймера рассчитывали показатели: общее число локусов (L), число полиморфных локусов (Np), фракция полиморфных локусов (β), доля гомозиготных рецессивных локусов (Vr), индекс информативности (PIC), маркерный индекс (MI). Для каждой популяции рассчитывали следующие показатели: доля полиморфных локусов (%), наблюдаемое количество аллелей (Na), эффективное количество аллелей (Ne), информационный индекс (I), ожидаемая гетерозиготность (He), несмещенная ожидаемая гетерозиготность (uHe). Уровень межпопуляционной и внутрипопуляционной генетической изменчивости оценивали с использованием анализа молекулярной изменчивости (AMOVA), реализованного в программном обеспечении GenAlEx 6.5 [16]. Для расчета генетических дистанций между образцами и построения иерархической

дендрограммы использовали пакет Darwin 6.0 [17]. Корреляционный анализ проводили по методу Пирсона с использованием пакета анализа Excel.

Результаты и их обсуждение

Для оценки генетического разнообразия морошки использовали набор тринадцати ISSR маркеров (табл. 1), но из-за недостаточной амплификации четыре из них (ISSR 17, ISSR 6, ISSR 8a, ISSR 10) пришлось исключить из рассмотрения. В общей сложности было получено 78 ампликонов, в среднем 8,7 локуса на один ДНК-маркер (табл. 2). В зависимости от праймера электрофоретический спектр насчитывал от 6 (ISSR 4, ISSR 12) до 14 (ISSR 24) ДНК фрагментов. Высокая доля полиморфных локусов отмечена для праймеров: ISSR 4, ISSR 9, ISSR 11, ISSR 22, ISSR 24, ISSR 9a. Низкий полиморфизм в общей выборке и отсутствие разнообразия в четырех белорусских субпопуляциях показал маркер ISSR 12.

При использовании доминантных ДНК-маркеров невозможно различить гомозиготные доминантные генотипы и гетерозиготы, поскольку они оба экспрессируют доминантный

Таблица 2

Меры информативности ISSR-маркеров для оценки генетического разнообразия *R. chamaemorus* L.

Маркер	L	Выборка белорусских популяций					Общая выборка				
		Np	β	q	PIC	M	Np	β	q	PIC	M
ISSR 4	6	2	0,33	0,26	0,13	0,04	6	1,00	0,48	0,36	0,36
ISSR 5	7	4	0,57	0,32	0,17	0,10	4	0,57	0,32	0,17	0,10
ISSR 9	11	4	0,36	0,62	0,47	0,17	11	1,00	0,67	0,49	0,49
ISSR 9A	7	6	0,86	0,57	0,43	0,37	7	1,00	0,62	0,48	0,48
ISSR 11	11	10	0,91	0,67	0,49	0,45	11	1,00	0,67	0,50	0,50
ISSR 12	6	0	0,00	0,00	0,00	0,00	2	0,33	0,26	0,12	0,04
ISSR 22	9	4	0,44	0,50	0,37	0,16	9	1,00	0,59	0,46	0,46
ISSR 23	7	3	0,43	0,30	0,16	0,07	4	0,57	0,47	0,34	0,19
ISSR 24	14	14	1,00	0,63	0,48	0,48	14	1,00	0,69	0,50	0,50
Среднее	8,67	5,22	0,54	0,43	0,30	0,20	7,56	0,83	0,53	0,38	0,35

аллель. Поэтому именно доля гомозиготных рецессивных локусов (q) может быть использована в популяционной генетике для оценки генетического разнообразия и вывода о структуре популяции. В общей выборке показатель q варьирует от 0,26 (ISSR 12) до 0,69 (ISSR 24) и в среднем составляет 0,53. Если рассматривать отдельно только белорусские популяции, то рецессивные аллели встречаются значительно реже (0,43).

Для доминантных маркеров информационный индекс (PIC) принимает значения от 0 до 0,5. Максимально возможные значения информационного индекса получены для маркеров ISSR 11, ISSR 24, наиболее низкие — для ISSR 12 (0,00 и 0,12 для белорусских популяций и общей выборки соответственно). Исходя из значений PIC, можно сделать вывод о сужении генетического разнообразия, представленного в белорусских популяциях морошки приземистой.

Результаты оценки генетического раз-

нообразия исследуемых популяций морошки приземистой представлены в таблице 3. Общая доля полиморфных локусов составила 87% (68 шт.), для белорусских популяций доля полиморфных локусов ниже — 60% (47 шт.). Среди исследуемых популяций самый высокий процент полиморфных локусов отмечен для локалитета «Нитауре» (55%), за ним следует «Болото мох» (31%). Остальные три популяции имеют более низкий процент полиморфных локусов, наиболее низкий у «Жада» — 18%. В популяциях «Ельня» и «Нитауре» отмечены уникальные, не встречающиеся в других выборках локусы. Для латвийской популяции уникальные ампликоны генерируют ISSR маркеры к тринуклеотидным повторам (ISSR 9 и ISSR 9a). У популяции «Ельня» уникальные локусы — это тяжелые ампликоны (>1000 п. н.) по маркерам ISSR 22 и ISSR 24.

Показатели генетического разнообразия исследуемых популяций (N_e и N_a) имеют

Таблица 3

Показатели генетического разнообразия популяций морошки приземистой

Показатели	Локалитеты					
	«Ельня»	«Жада»	«Лонно»	«Болото мох»	«Нитауре»	Общее
Количество локусов	69,00	66,00	64,00	66,00	57,00	78,00
Доля полиморфных локусов (%)	24,00	18,00	31,00	33,00	55,00	87,00
Количество уникальных локусов	2	0	0	0	4	—
Наблюдаемое число аллелей (N_a)	1,13 ± 0,07	1,03 ± 0,07	1,13 ± 0,08	1,18 ± 0,08	1,28 ± 0,1	1,15 ± 0,03
Эффективное число аллелей (N_e)	1,18 ± 0,04	1,14 ± 0,03	1,2 ± 0,04	1,24 ± 0,04	1,29 ± 0,04	1,21 ± 0,02
Ожидаемая гетерозиготность (H_e)	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,01
Несмещенная ожидаемая гетерозиготность (uH_e)	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,13 ± 0,010
Информационный индекс (I)	0,15 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,2 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,12 ± 0,01
Наименьшее количество общих локусов ≤50% (No. LComm Bands (≤50%))	3	1	2	5	1	—
Молекулярная дисперсия внутри популяции (SSWP)	27,67	24,67	27,83	19,00	53,17	—

относительно близкие значения. Опять же, самые высокие значения общего и эффективного числа аллелей отмечены для латвийской популяции «Нитауре», а самое низкое у «Жада». Показатели ожидаемой гетерозиготности (H_e , uH_e) и информационный индекс Шеннона (I) следуют той же схеме, что и N_e , и N_a .

В целом данные свидетельствуют о высоком уровне межпопуляционного полиморфизма и генетического разнообразия в исследуемых популяциях *R. chamaemorus* L., при этом локалитет «Нитауре» имеет самые высокие значения по всем показателям генетического разнообразия. Это может быть связано с различиями в окружающей среде, историческими факторами или их комбинацией. Результаты этого исследования могут предоставить ценную информацию при разработке мероприятий по сохранению и управлению генетическим разнообразием популяций *R. chamaemorus* L.

Для оценки межпопуляционной дифференциации морошки приземистой был проведен анализ молекулярной дисперсии (AMOVA). Это статистический метод разделения генетической изменчивости внутри и между популяциями на основе молекулярно-генетических данных. AMOVA обычно используется в популяционной генетике и эволюционной биологии для понимания генетической структуры популяций и проверки гипотез об истории популяций и эволюционных процессах.

Общая молекулярная дисперсия (SSTOT) в исследуемой выборке ($n = 30$) составила 321,67 (табл. 4), что может быть интерпретировано как средний уровень генетического

разнообразия. В четырех белорусских популяциях SSTOT падает до 169,13, и может быть интерпретировано как существенное снижение генетической дисперсии. Генетическая дифференциация между популяциями (Φ_{iPT}) в общей выборке достоверна (при $p \leq 0,01$) и составляет 50%, для отечественных популяций — 38%. Таким образом, выборки «Ельня», «Жада», «Лонно» и «Болото мох» характеризуются генетической общностью, и относительно удалены от генофонда, представленного в «Нитауре».

Показатели молекулярной дисперсии внутри популяций (SSWP) показывают, что аллельная дифференциация между отдельными растениями выборки «Нитауре» почти в два раза выше наиболее генетически разнообразных белорусских популяций (табл. 3). Значения SSWP для белорусских популяций составляют от 19,00 («Жада») до 27,8 («Лонно»), что указывает на низкий и умеренный уровни генетического разнообразия. Однако важно отметить, что значения SSWP не являются единственной мерой генетического разнообразия, и для получения более полного представления о генетической структуре следует проанализировать и другие показатели. Из картины распределения молекулярной дисперсии следует, что генетические маркеры также должны быть проанализированы, чтобы получить более полное представление о генетическом разнообразии и структуре популяции.

Наименьшее количество общих локусов ($\leq 50\%$) характеризует минимум низкочастотных ДНК-локусов, встречающихся одно-

Таблица 4

Результаты оценки молекулярной дисперсии (AMOVA), оцененной с использованием ISSR маркеров в изучаемых популяциях морошки приземистой

Источник	Общая выборка					Белорусские популяции				
	df	SS	MS	Est. Var	%	df	SS	MS	Est. Var	%
Меж популяций	4	169,33	42,33	6,04	50	3	69,96	23,32	3,06	38
Внутри популяций	25	152,33	6,09	6,09	50	20	99,17	4,96	4,96	62
Всего	29	321,67	—	12,13	100	23	169,13	—	8,02	100

временно в нескольких популяциях (табл. 3). Считается, что такие локусы представляют собой области ДНК с низкой скоростью рекомбинации и имеют тенденцию наследоваться вместе, как блок. При сравнении популяций наименьший показатель количество общих полос ($\leq 50\%$) характеризует меру генетической дифференциации между популяциями. Таким образом, белорусские популяции достаточно изолированы от латвийской (No. LComm Bands ($\leq 50\%$) = 1), а из белорусских популяций наиболее изолированным является заказник «Жада». Между остальными популяциями, вероятно, в исторической перспективе существовал генетический обмен или генетическая общность.

Результаты попарного популяционного PhiPT-анализ (оценка степени генетической дифференциации между популяциями на основе молекулярных маркеров) были соотнесены с генетическими расстояниями между популяциями. В общей популяции

PhiPT прямо коррелирует с генетическим расстоянием между популяциями ($r = 0,85$), что в большей мере обусловлено значительной генетической и географической удаленностью популяции «Нитауре». При такой же оценке белорусских популяций наблюдается отрицательная корреляция ($r = -0,78$). Наиболее географически удаленная популяция «Лонно» (Полоцкий р-н) попарно генетически близка со всеми популяциями Миорского района, а расположенные рядом «Болото мох» и «Ельня» наиболее генетически дифференцированы.

Результаты ISSR-типирования представителей популяций морошки приземистой сведены в бинарную матрицу и проанализированы с использованием иерархического кластерного анализа по методу Варда (с целью минимизировать их статистическую дисперсию данных, так как латвийская популяция очень удалена от белорусских) с использованием дистанций Жаккарда (рис. 3).

Популяция «Нитауре» значительно ге-

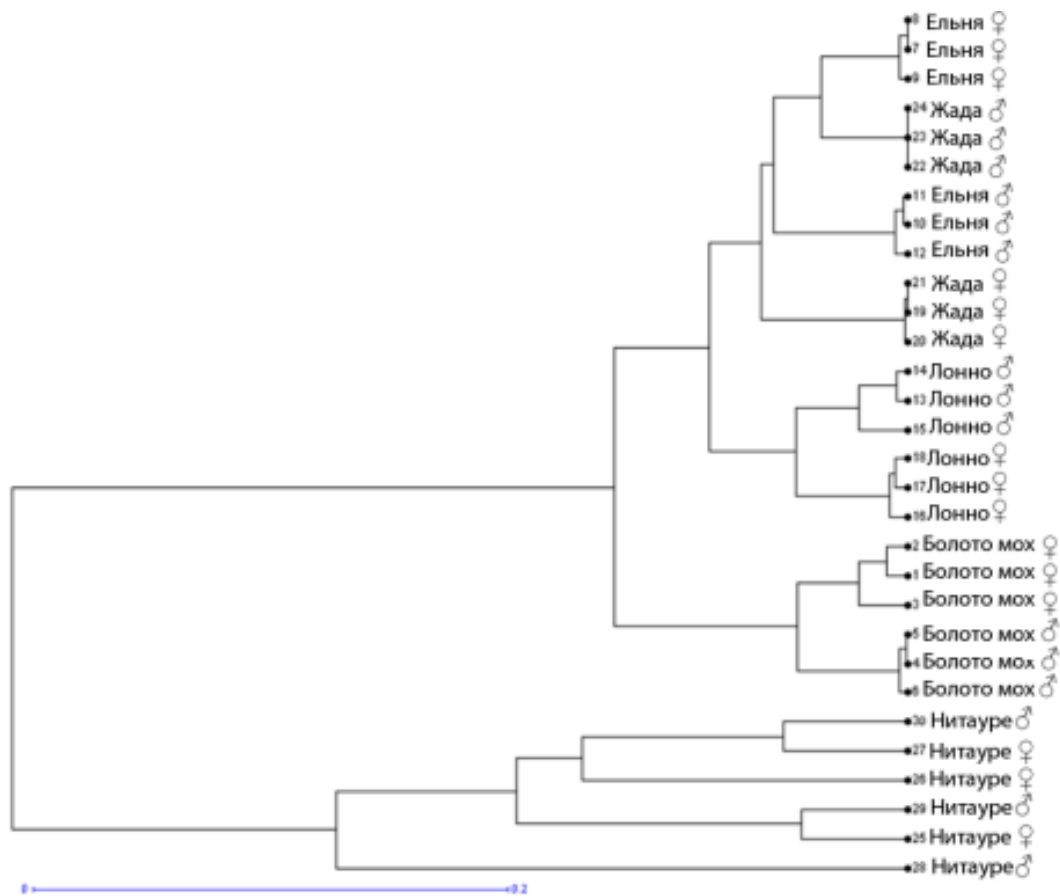


Рис. 3. Дендрограмма генетического сходства растений морошки приземистой на основании данных ISSR-типирования (метод Варда, дистанции Жаккарда)

нетически удалена от образцов морошки приземистой из Беларуси и, вероятно, из-за наличия семенного размножения отличается высокой внутривидовой генетической гетерогенностью. В четырех преимущественно клональных белорусских популяциях морошки отмечены гендерные субкластеры (мужские и женские), которые, в свою очередь, формируют изолированные и компактные кластеры популяций «Болото мох» и «Лонно», или общий кластер популяций «Жада»–«Ельня». Отметим, что к латвийской популяции относительно более близка популяция «Болото

мох», характеризующаяся высоким генетическим разнообразием по результатам AMOVA и частотного анализа. Популяция «Лонно» разделяет большую часть своего генетического разнообразия с популяциями «Жада» и «Ельня», что, возможно, отражает общность происхождения всех белорусских популяций и разобщение ареала в результате отступления ледника и антропогенного влияния. График главных компонент (PC1 × PC2) для генетических расстояний между исследуемыми популяциями растений морошки приземистой представлен на рисунке 4.

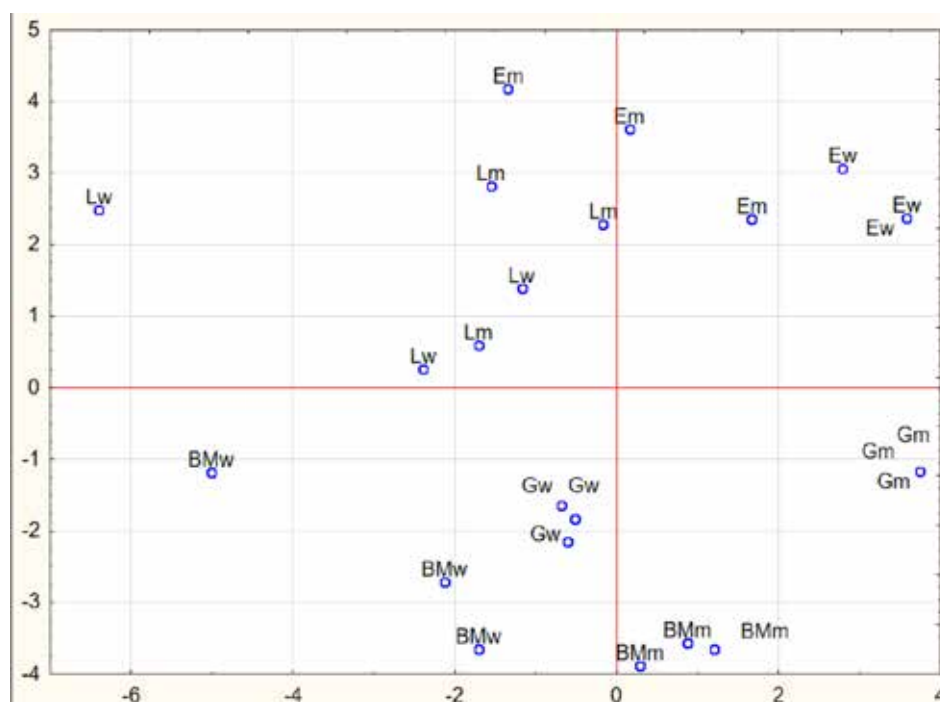


Рис. 4. График главных компонент (PC1 × PC2) для генетических расстояний между исследуемыми популяциями растений морошки приземистой

Заключение

Результаты проведенных исследований показали, что общая доля полиморфных локусов составила 87%, для белорусских популяций доля полиморфных локусов ниже — 60%. Среди исследуемых популяций самый высокий процент полиморфных локусов отмечен для латвийской популяции «Нитауре» (55%), за ним следует «Болото мох» (33%). Другие изученные популяции имеют более низкий процент полиморфных локусов, среди них самый низкий у «Жада» — 18%. Следует отметить, что по результатам исследований наименее

устойчивой к стрессам является популяция «Жада», обладающая наименьшим внутривидовым генетическим разнообразием.

Полученные данные подтверждают, что географический фактор влияет на наблюдаемую в настоящее время структуру популяций морошки. Следует отметить, что выборки «Ельня», «Жада», «Лонно» и «Болото мох» характеризуются генетической общностью и относительно удалены от генофонда, представленного в «Нитауре». Популяция «Лонно» разделяет большую часть своего генетического разнообразия с популяциями

«Жада» и «Ельня», что возможно отражает общность происхождения всех белорусских популяций и разобщение ареала. Также следует отметить, что популяция заказника «Лонно» может расцениваться как наиболее устойчивая среди исследуемых локалитетов на территории Республики Беларусь, что коррелирует с полученными данными биохимического анализа [18] и генетический материал которой может представлять наибольшую ценность в вопросах сохранения и воспроизводства вида.

Список использованных источников

1. Cullis, C. A. Genome mapping and molecular breeding in plants: Oilseeds; ed. K. Chittaranjan / C. A. Cullis // Heidelberg: Springer-Verlag. – 2007. – Vol. 2. – P. 275–295.
2. Nilsen, G. S. Cloudberries — The Northern Gold / G. S. Nilsen // International Journal of Fruit Science. – 2005. – Vol. 2, № 5. – P. 45–60.
3. Thiem, B. *Rubus chamaemorus* L. — A boreal plant rich in biologically active metabolites: A review / B. Thiem / Biol. Lett. – 2003. – Vol. 1, № 40. – P. 3–13.
4. Genetic differentiation of *Rubus chamaemorus* populations in the Czech Republic and Norway after the last glacial period / L. Leidová-Svobodová [et al.] // Ecol. Evol. – 2018. – № 00. – P. 1–11.
5. Страх, Я. Л. Химический состав и биологическая активность метаболитов *Rubus chamaemorus* L. / Я. Л. Страх, О. С. Игнатовец // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 321–331.
6. Красная книга Республики Беларусь: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. ред.: Л. И. Хоружик (пред.) [и др.]. – Минск: БелЭн, 2005. – 456 с.
7. Rantala, E. M. Sexual reproduction in the cloudberry / E. M. Rantala // Ann. Agric. Fenn. – 1978. – Vol. 4, № 15. – P. 295–303.
8. Thiem, B. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures / B. Thiem, E. Sliwiska // Plant Sci. – 2003. – № 164. – P. 129–134.
9. Korpelainen, H. Sex ratios and resource allocation among sexually reproducing plants of *Rubus chamaemorus* / H. Korpelainen // Ann. Bot. – 1994. – № 74. – P. 627–632.
10. Korpelainen, H. Clonal structure of *Rubus chamaemorus* populations: Comparison of different molecular methods / H. Korpelainen, K. Antonius-Klemola, G. Werlemark // Plant Ecology. – 1999. – № 143. – P. 123–128.
11. Ehrlich, D. Where did northern peatland species survive the dry glacials? Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) as an example / D. Ehrlich, I. G. Also, C. Brochmann // J. Biogeogr. – 2008. – № 35. – P. 801–814.
12. Debnath, S. C. Inter-simple sequence repeat (ISSR) — PCR analysis to assess genetic diversity in a collection of wild cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) clones / S. C. Debnath // Journal of Horticultural Science and Biotechnology. – 2007. – № 82 (5). – P. 727–732.
13. Assessment of ipbs primers potential to be used in genetic diversity studies of wild cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) populations / N. Krasòevska [et al.] // Proceedings of the latvian academy of sciences. Section B. – 2022. – Vol. 76, № 2. – P. 314–316.
14. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation / R. Kalendar [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2010. – Vol. 121. – P. 1 419–1 430.
15. Об утверждении Положения о порядке выдачи разрешений на изъятие дикорастущих растений и (или) их частей из среды их произрастания: Постановление Совета Министров Республики Беларусь, 28 ноября 2016 г., № 975. – Минск: Нац. центр правовой информ. Респ. Беларусь, 2016. – 64 с.
16. Peakall, R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update / R. Peakall, P. E. Smouse // Bioinformatics 28. – 2012. – P. 2 537–2 539.
17. Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J. P. DARWIN software (2006). Available online at <http://darwin.cirad.fr/darwin>. Retrieve on 11th July, 2014.
18. Страх, Я. Л. Изучение содержания фенольных соединений и флавоноидов различных популяций морошки приземистой *Rubus chamaemorus* L. / Я. Л. Страх, О. С. Игнатовец // Вестник фонда фундаментальных исследований. – 2020. – № 4. – С. 169–178.

Ya. L. Strakh, S. I. Vakula, O. S. Ignatovets

ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY OF WILD CLOUDBERRY (*RUBUS CHAMAEMORUS* L.)

Belarusian State Technological University
13a Sverdlova St., 220006 Minsk, the Republic of Belarus
e-mail: y.strakh@gmail.com

The genetic diversity of *Rubus chamaemorus* L. was studied using dominant ISSR markers. It was established that the samples from the localities studied (The Reserves: “Lonno”, “Yelnya”, “Boloto Mokh”, “Zhada”, and “Nītaure”) have a high level of interpopulation polymorphism and genetic diversity. The total proportion of polymorphic loci was 87%; for Belarusian populations it was 60%. Among the populations studied, the highest percentage of polymorphic loci was noted for the Latvian population “Nītaure” (55%), followed by “Boloto Mokh” (33%). Other populations studied have a lower percentage of polymorphic loci. Among them the lowest is in “Zhada” — 18%. Localities “Yelnya”, “Zhada”, “Lonno”, and “Boloto Mokh” are characterized by genetic similarity, and are relatively remote from the gene pool presented in “Nītaure”. The “Lonno” population shares most of its genetic diversity with the “Zhada” and “Yelnya” populations, which possibly reflects the common origin of all Belarusian populations and range separation.

Keywords: cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.), genetic diversity, population, DNA markers, polymorphism.

Дата поступления в редакцию: 15 мая 2023 г.

В. А. Лемеш¹, В. Ю. Агеев², А. И. Царь¹, М. С. Парфенчик¹, В. Н. Кипень¹, Т. А. Сергеева²

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И СТРУКТУРЫ ЗАРУБЕЖНЫХ ПОРОД КАРПА (*CYPRINUS CARPIO* L.), ВЫРАЩИВАЕМЫХ В АКВАКУЛЬТУРЕ В БЕЛАРУСИ

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

²Республиканское дочернее унитарное предприятие «Институт рыбного хозяйства»
Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр
Национальной академии наук Беларуси по животноводству»
Республика Беларусь, 220024, г. Минск, ул. Стебенева, 22

На основании молекулярно-генетического анализа 14 микросателлитных локусов дана оценка родства, генетического разнообразия и структуры пяти зарубежных пород карпа *Cyprinus carpio* L. (югославский, немецкий, сарбоянской, черепетский рамчатый и фресинет), выращиваемых в аквакультуре и представляющих коллекционный генофонд карпа в Беларуси.

При сравнении пород количество выявленных аллелей на локус варьировало от 8,714 для сарбоянского карпа до 25,286 для югославского карпа. Югославский, немецкий, черепетский рамчатый и фресинет имеют более низкий индивидуальный индекс фиксации аллелей (F_{IS}), чем сарбоянский карп ($F_{IS} = 0,273$). Выявлено четыре локуса, обладающих наибольшим дифференцирующим потенциалом для различения пород между собой — MFW10, MFW11, Cid0909, MFW16. Дендрограмма, основанная на генетической дистанции Nei's (D_A) и алгоритме Ward, группирует изучаемые породы в два основных кластера: сарбоянская порода и остальные породы (немецкий и югославский — первый субкластер, черепетский рамчатый и фресинет — второй субкластер). Индивидуальный тест на отнесение позволил отнести каждую особь карпа к породе, к которой она принадлежит, с общей точностью 93%. Полученные результаты свидетельствуют о высоком генетическом разнообразии всех пяти пород карпа зарубежной селекции, разводимого в Беларуси. Таким образом, с использованием набора из 14 высокополиморфных микросателлитных маркеров можно проводить мониторинг генетического разнообразия и классификацию разных пород карпа *Cyprinus carpio*.

Ключевые слова: обыкновенный карп, *Cyprinus carpio* L., генетическое разнообразие, тест genetic assignment, микросателлитные локусы.

Введение

Обыкновенный карп (*Cyprinus carpio* L.) является одним из старейших одомашненных видов в аквакультуре, имеет высокую промысловую ценность и выращивается в различных регионах мира. Этот вид сформировался в нескольких локальных популяциях Евразии, что привело к фенотипическим различиям в цвете кожи, наличии чешуек, форме и размерах тела, скорости роста [1].

В Беларуси выведено три белорусские породы карпа (изобелинский, лахвичский, тремлянский). Кроме того, имеются немногочисленные стада адаптированных пород карпа

зарубежной селекции, составляющие коллекционный генофонд (югославский, немецкий, сарбоянский, черепетский рамчатый, карп породы фресинет). Племенная работа с коллекционным генофондом зарубежных пород направлена, в том числе на сохранение их генетической чистоты и контроля инбридинга. Для повышения эффективности формирования ремонтных групп и, в дальнейшем, отбора из них элитных экземпляров в маточное стадо, должны учитываться генетические характеристики рыб.

Одним из распространенных типов генетических маркеров являются микросателлиты

(SSR-маркеры, англ. simple sequence repeats). Популярность использования микросателлитов для изучения генетического разнообразия внутри и между популяциями / породами обусловлена их высокой полиморфностью, кодоминантным наследованием, равномерностью распределения по всему геному, а также экономической эффективностью [2]. SSR-анализ позволяет охарактеризовать генетический полиморфизм представителей разных видов и подвидов, может использоваться для внутри- и межвидовой идентификации [3].

Цель исследования — изучить генетическое разнообразие и структуру пяти пород карпа (*Cyprinus carpio* L.) зарубежной селекции, выращиваемого в аквакультуре в Беларуси, с использованием микросателлитного анализа.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили биологические образцы (плавники) 52 особей карпа югославской породы (ЮГО) двух генераций 5- и 6-летних, 47 особей карпа немецкой породы (НЕМ) двух генераций 5- и 6-летних, 43 особей карпа черепетской рамчатой породы (ЧЕР) двух генераций 4- и 5-летних, 41 особи карпа породы фресинет (ФРЕ) двух генераций 2- и 6-летних и 31 особи сарбоянской породы (САР) карпа одной генерации четырех лет. Образцы отбирались в СПУ «Изобелино». ДНК выделена из биологических образцов с помощью методики, в которой используется фенол-хлороформная смесь [4].

Генетическое разнообразие оценивали по четырнадцати SSR-локусам — MFW1, MFW2, MFW6, MFW9, MFW10, MFW11, MFW13, MFW16, MFW20, MFW24, MFW26, MFW28, MFW29 и Cid0909 [5, 6].

Определение размеров ампликонов осуществлялось путем капиллярного гель-электрофореза на приборе ABI 3500 Genetic Analyzer с использованием размерного стандарта Orange 500 DNA Size Standard (Nimagen, Нидерланды). Обработка полученного массива данных проводилась с использованием ПО GeneMapper Software v5.

С использованием GenAIEx v.6.5 [7] рассчитаны показатели, характеризующие генетическую структуру пяти исследуемых зарубежных пород карпа.

Для определения взаимосвязи между отдель-

ными особями и популяциями используется индивидуальный тест на отнесение (genetic assignment test). Данный тест, с учетом выявленных в популяции аллелей и их частот, позволяет рассчитать вероятность наличия генотипа данной особи в популяции, в которой она была отобрана, по сравнению с вероятностью ее наличия в других изучаемых популяциях. Особь относится к популяции, для которой она имеет наибольшую вероятность отнесения [8]. Тест на отнесение был проведен с использованием GenAIEx v.6.5.

В программе PAST v.3.17 [9] выполнено построение графика главных компонент на основе генетических дистанций. Для количественной оценки генетического полиморфизма и определения уровня дивергенции между изученными породами карпа зарубежной селекции рассчитаны генетические дистанции и построено дерево по методу Уорда [10]. Это метод иерархической кластеризации, основанный на последовательном восходящем объединении индивидуальных объектов в подмножества. Для определения расстояния между двумя кластерами используется критерий минимума дисперсии.

Результаты и обсуждение

Генетическое разнообразие пород карпа по локусам

Для всех пяти пород карпа зарубежной селекции в 14 исследованных SSR-локусах идентифицировали суммарно 459 аллелей, с частотой встречаемости более 5% — 194 аллеля. Среднее значение количества выявленных аллелей (N_a) в исследованных локусах для пяти пород варьировало от 8,800 (для локуса MFW10) до 22,000 (для локуса MFW28), среднее значение — 17,086 (табл. 1).

Наибольшее значение показателя ожидаемой гетерозиготности (H_e) выявлено для локуса MFW28 (0,914), наименьшее — для локуса MFW16 (0,684), при среднем значении $0,845 \pm 0,013$ (табл. 1). Наибольшее значение показателя наблюдаемой гетерозиготности (H_o) отмечено для локуса MFW10 (0,975), наименьшее — для локуса MFW16 (0,439), при среднем значении $0,697 \pm 0,024$ (табл. 1). Значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности различались по локусам. Известно, что искусственный отбор, мутации и другие

Таблица 1

Показатели информативности для 14 исследуемых SSR локусов, полученные при анализе пяти зарубежных пород карпа

SSR-локус	Na	He	Ho	F _{ST}
MFW 1	16,6	0,857	0,742	0,063
MFW 2	20,4	0,888	0,521	0,052
MFW 6	15,6	0,873	0,746	0,044
MFW 9	17,8	0,881	0,764	0,037
MFW 10	8,8	0,757	0,975	0,096
MFW 11	17,0	0,785	0,682	0,127
MFW 13	19,2	0,882	0,632	0,052
MFW 16	14,2	0,684	0,439	0,153
MFW 20	21,8	0,910	0,718	0,045
MFW 24	13,8	0,863	0,560	0,069
MFW 26	16,6	0,850	0,656	0,079
MFW 28	22,0	0,914	0,836	0,045
MFW 29	21,0	0,887	0,620	0,043
Cid0909	14,4	0,794	0,873	0,112
Среднее значение	17,086	0,845	0,697	0,073

Примечание. Na — среднее количество выявленных аллелей, He — средняя ожидаемая гетерозиготность, Ho — средняя наблюдаемая гетерозиготность, F_{ST} — средний индекс дифференциации между популяциями. В таблице приведены средние значения для 14 локусов

эволюционные факторы могут воздействовать на локусы по-разному, что в конечном итоге изменяет степень гетерозиготности [11].

Из 14 исследованных SSR-локусов наибольшим потенциалом по дифференциации исследуемых пород карпа зарубежной селекции обладают те, для которых рассчитанные значения F_{ST} являются максимальными (табл. 1). Наибольшие рассчитанные значения F_{ST} показаны для четырех SSR-локусов: MFW10, MFW11, Cid0909, MFW16 (p-value <0,001). В таблице 2 приведены частоты аллелей по породам для вышеуказанных четырех локусов, при этом показаны аллели с частотой встречаемости более 5%, поскольку породы могут быть дифференцированы за счет аллелей, частота которых внутри одной породы высока, тогда как в других породах данные аллели могут отсутствовать, либо их частота невысока. При этом редкие аллели увеличивают генетическое разнообразие и улучшают качество породы, но не могут служить отличительным признаком всей

породы. Нами были проведены расчеты по всем выявленным аллелям, а в таблице 2 показаны «мажорные аллели», т. е. те, частоты встречаемости которых контрастны в изучаемых породах карпа зарубежной селекции. Например, у сарбоянской породы карпа аллель 114 в локусе MFW16 встречается с частотой 0,081, тогда как у других изученных пород карпа данный аллель в этом локусе выявлен не был.

Генетическая характеристика карпа по породам

Были рассчитаны показатели, характеризующие генетическую структуру изученных пород (табл. 3). Среднее количество выявленных аллелей (Na) в исследованных локусах варьировало от 8,714 (для сарбоянской породы карпа) до 25,286 (для югославского карпа) (табл. 3).

Для всех пород карпа зарубежной селекции, разводимого на территории Беларуси, значение показателя наблюдаемой гетерозиготности (Ho) выше, чем значение показателя ожидаемой гетерозиготности (He) (табл. 3).

Таблица 2

Частоты встречаемости аллелей для четырех локусов, наиболее информативных при дифференциации пяти зарубежных пород карпа

Локус	Аллель	Частота аллеля в породе				
		ЮГО	НЕМ	ЧЕР	ФРЕ	САР
MFW 16	114	–	–	–	–	0,081
	126	0,058	0,043	–	–	–
	128	0,029	0,106	0,023	0,073	0,274
	131	0,173	0,266	0,058	0,037	0,629
	133	0,067	0,064	0,047	0,024	–
	135	0,058	0,053	0,058	0,012	–
	137	0,279	0,213	0,488	0,744	0,016
	161	0,058	0,032	0,116	–	–
	169	0,019	0,043	0,058	–	–
MFW 11	134	0,125	0,170	0,070	–	–
	146	0,038	0,043	0,070	–	–
	149	0,019	–	–	–	0,113
	192	0,135	0,064	0,116	0,024	0,758
	194	0,077	0,138	0,023	0,073	0,032
	196	0,048	0,043	0,035	0,061	0,016
	200	0,087	0,085	0,209	0,293	–
	203	0,212	0,096	0,012	0,171	–
	205	0,019	0,021	0,151	0,122	–
MFW 10	121	0,173	0,330	0,116	0,146	0,500
	126	0,231	0,085	0,209	–	–
	128	0,038	0,096	0,198	0,317	–
	134	0,058	0,011	–	–	–
	136	0,077	0,266	0,128	0,171	0,484
	138	0,058	0,053	–	0,024	–
	142	0,144	0,117	0,209	0,061	–
	145	–	0,043	0,140	0,244	–
Cid 0909	265	0,058	0,011	–	0,195	0,565
	267	0,173	0,330	0,047	0,061	–
	276	0,173	0,160	0,360	0,256	–
	292	0,058	0,011	–	0,061	0,145
	294	–	0,085	0,035	0,037	0,177
	297	0,058	0,085	0,174	0,012	–
	304	0,058	0,085	0,058	0,183	–
	307	0,019	0,011	–	0,061	–
	309	0,096	0,053	0,279	0,012	–
	321	0,067	0,021	0,035	0,024	–

Примечание. ЮГО — югославский, НЕМ — немецкий, ЧЕР — черепецкий рамчатый, ФРЕ — фресинет, САР — сарбоянский. В таблице приведены аллели с частотой встречаемости более 5%

Таблица 3

Выявленные генетические характеристики по породам зарубежного карпа

Породы карпа зарубежной селекции	Na	He	Ho	F_{IS}	Assignment Test, %
ЮГО	25,286	0,915	0,777	0,149	80,769
HEM	20,571	0,893	0,798	0,102	91,489
ЧЕР	15,857	0,865	0,718	0,167	100
ФРЕ	15,000	0,834	0,692	0,180	100
САР	8,714	0,716	0,502	0,273	100

Примечание. Na — среднее количество выявленных аллелей, He — средняя ожидаемая гетерозиготность, Ho — средняя наблюдаемая гетерозиготность, F_{IS} (индивидуальный индекс фиксации) — позволяет оценить степень родственного спаривания особей в субпопуляции, отражает отклонения генотипических частот с точки зрения недостатка или избытка гетерозигот. Приведены средние значения для каждой породы по 14 локусам

Это может свидетельствовать о достаточно высоком генетическом разнообразии всех пяти пород карпа зарубежной селекции.

Карпы югославской, немецкой, черепетской рамчатой и породы фресинет имели более низкий показатель F_{IS} , чем карп сарбомянской породы ($F_{IS} = 0,273$) (табл. 3). Это свидетельствует о более высоком генетическом разнообразии югославской, немецкой, черепетской рамчатой породы и карпа породы фресинет, чем сарбомянской породы.

Индивидуальный тест на отнесение (genetic assignment) позволил отнести каждую особь карпа к породе, к которой она принадлежит, с общей точностью 93%. При этом три породы карпа самоидентифицируются на 100%, две породы карпа югославский и немецкий — на 80,769% и 91,489% соответственно (табл. 3). Схожие результаты отнесения к породам по-

казаны в исследовании Bianka Tóth и соавторов для 13 венгерских пород. Общая точность составила 93,64% [1].

Анализ иерархического генетического разнообразия (AMOVA) также показал, что общая генетическая изменчивость, основанная на аллелях, представленных во всех пяти породах, составляет 23%, в то время как разнообразие внутри пород оценивается в 77% (p value <0,001) за счет редких и частных аллелей, т. е. представленных только в одной породе. На основании выявленных аллелей и их частот рассчитаны генетические дистанции между породами по Nei's (D_A) [7] и F_{ST} (табл. 4). Генетические дистанции варьировали от 0,276 (между югославской и немецкой породами карпа), до 1,283 (между сарбомянской и черепетской рамчатой породами карпа).

Дендрограмма, основанная на генетиче-

Таблица 4

Генетические дистанции между породами

	ЮГО	HEM	ЧЕР	ФРЕ	САР
ЮГО	0,000	0,013	0,020	0,03	0,071
HEM	0,276	0,000	0,022	0,037	0,068
ЧЕР	0,367	0,388	0,000	0,029	0,092
ФРЕ	0,501	0,614	0,406	0,000	0,095
САР	0,877	0,783	1,283	1,104	0,000

Примечание. Nei's (D_A) — значения под диагональю, F_{ST} — значения над диагональю

ской дистанции Nei's (D_A) и алгоритме Ward, сгруппировала изучаемые породы в два основных кластера. Первый кластер образован одной породой карпа (сарбоянский), второй кластер сформирован двумя субкластерами: немецкий и югославский карп, черепетский рамчатый и карп породы фресинет (рис. 1).

На пересечении линий указан процент схожести образцов / субкластеров (первого, второго и т. д. порядка) / кластеров относительно друг друга на основании функции BOOTSTRAP ($n = 10K$). Чем выше значение, тем с большей вероятностью расположение образцов по отношению друг к другу является достоверным.

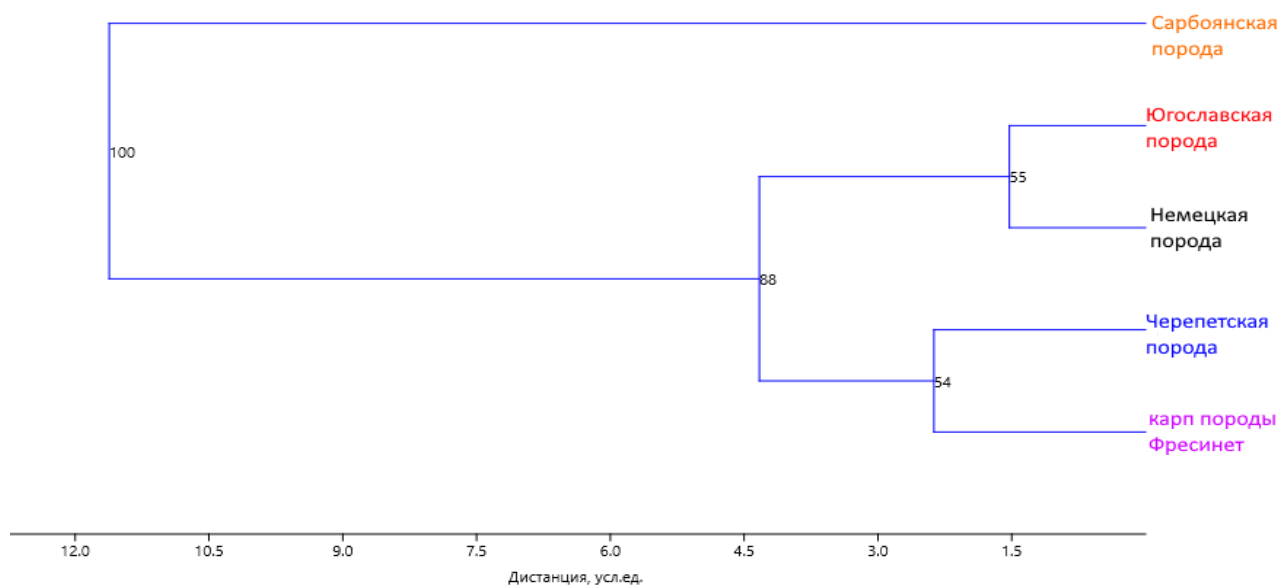


Рис. 1. Дендрограмма на основе матрицы попарных генетических дистанций между пятью породами карпа зарубежной селекции, выращиваемого в аквакультуре Беларуси (по методу Уорда)

Проведен сравнительный анализ данных научных исследований, посвященных оценке генетического разнообразия популяций европейских пород карпа и пород карпа зарубежной селекции, разводимых в аквакультуре в Беларуси. Данные по средней наблюдаемой гетерозиготности в породах карпа зарубежной селекции, выращиваемого в аквакультуре в Беларуси (от 0,502 до 0,798) сопоставимы с исследованиями, посвященными оценке генетического разнообразия различных пород карпа, разводимого в Чешской Республике (средняя наблюдаемая гетерозиготность в породах варьировала от 0,489 до 0,691 [12]), Хорватии (от 0,3692 до 0,6121 [13]), Польше (от 0,418 до 0,781 [14]), Венгрии (от 0,720 до 0,990 [1]). Показатель F_{IS} для локуса для зарубежных пород карпа, выращиваемого в Беларуси, находился в пределах от 0,273 до 0,102, что сходно с таковым для Чешской Республики (от 0,266 до 0,050) и Хорватии (от 0,467 до 0,214). Для Польши и Венгрии этот показатель немного ниже и находится в пределах от 0,188 до -0,144

(Польша) и от 0,083 до -0,250 (Венгрия).

Заключение

Дана оценка родства, генетического разнообразия и структуры пяти зарубежных пород карпа *Cyprinus carpio* L. (югославский, немецкий, сарбоянской, черепетский рамчатый и фресинет), выращиваемых в аквакультуре в Беларуси, с использованием 14 микросателлитных локусов.

Для пяти пород карпа зарубежной селекции суммарно выявлено 459 аллелей с частотой встречаемости $>0,05$ — 194 аллеля. При сравнении пород по 14 локусам среднее количество выявленных аллелей варьировало от 8,714 (для сарбоянского карпа) до 25,286 (для югославского карпа). Для всех пород карпа зарубежной селекции, разводимого на территории Беларуси, значение показателя наблюдаемой гетерозиготности (H_o) выше, чем значение показателя ожидаемой гетерозиготности (H_e). Югославский, немецкий, черепетский рамчатый и карп породы фресинет имеют

более низкий показатель F_{IS} , чем сарбоянский карп ($F_{IS} = 0,273$). Анализ иерархического генетического разнообразия (AMOVA) показал, что общая генетическая изменчивость между породами составляет 23%, в то время как разнообразие внутри пород оценивается в 77%.

Выявлено четыре локуса, обладающих наибольшим дифференцирующим потенциалом (MFW10, MFW11, Cid0909, MFW16). Дендрограмма, основанная на генетической дистанции Nei's (D_A) и алгоритме Ward, сгруппировала изучаемые породы в два основных кластера. Первый кластер образован одной породой карпа (сарбоянской), второй кластер сформирован двумя субкластерами: немецкий и югославский, черепетский рамчатый и фресинет. Индивидуальный тест на отнесение (genetic assignment) позволил отнести каждую особь карпа к породе, к которой она принадлежит, с общей точностью 93%. Полученные результаты свидетельствуют о высоком генетическом разнообразии всех пяти пород карпа зарубежной селекции, разводимого в Беларуси.

Таким образом, с использованием панели из 14 микросателлитных маркеров установлено высокое генетическое разнообразие пяти зарубежных пород карпа, выращиваемых в аквакультуре и представляющих коллекционный генофонд карпа в Беларуси. На основании полученных результатов будут разработаны рекомендации по проведению мониторинга и племенных работ для повышения качества, и конкурентоспособности рыбной продукции.

Список использованных источников

1. Genetic Diversity and Structure of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) in the Centre of Carpathian Basin: Implications for Conservation / B. Tóth [et al.]. – Genes. – 2020. – Vol. 11. – P. 1 268.
2. Wenne, R. Microsatellites as Molecular Markers with Applications in Exploitation and Conservation of Aquatic Animal Populations / R. Wenne // Genes. – 2023. – Vol. 14. – P. 808.
3. Kohlmann, K. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations / K. Kohlmann, P. Kerstena, M. Flajšhansb // Aquaculture. – 2005. – Vol. 247. – P. 253–266.
4. Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / J. Sambrook, D. W. Russell. – 3rd ed. – New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 2 344 p.
5. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) / R. P. M. A Crooijmans [et al.]. – Animal Genetics. – 1997. – Vol. 28. – P. 129–134.
6. A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs / J. H. Xia [et al.]. – BMC Genomics. – 2010. – Vol. 11, № 135. – P. 2–16.
7. Peakall, R. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update / R. Peakall, P. E. Smouse // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28, № 19. – P. 2 537–2 539.
8. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears / D. Paetkau [et al.]. – Molecular Ecology. – 1995. – Vol. 4, № 3. – P. 347–354.
9. Hammer, Ø. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / Ø. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // Palaeontologia Electronica. – 2001. – Vol. 4 (1). – P. 1–9.
10. Ward, J. H. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function / J. H. Ward // Journal of the American Statistical Association. – 1963. – Vol. 58, № 301. – P. 236–244.
11. Abebe, A. S. Genetic Diversity of Five Local Swedish Chicken Breeds Detected by Microsatellite Markers / A. S. Abebe, S. Mikko, A. M. Johansson // PloS ONE. – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. e0120580.
12. Microsatellite-based genetic diversity and differentiation of foreign common carp (*Cyprinus carpio*) strains farmed in the Czech Republic / M. Hulak [et al.]. – Aquaculture. – 2010. – Vol. 298, № 3–4. – P. 194–201.
13. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of hatchery and feral common carp *Cyprinus carpio* L. (*Cyprinidae*, *Cyprinidae*) populations in Croatia / T. Tomljanovic [et al.]. – Archives of Biological Sciences. – 2013. – Vol. 65. – P. 577–584.
14. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains breed in Poland based on microsatellite, AFLP, and mtDNA genotype data / Ł. Napora-Rutkowska [et al.]. – Aquaculture. – 2017. – Vol. 473. – P. 433–442.

V. A. Lemesh¹, V. Yu. Ageyets², N. I. Tsar¹, M. S. Parfenchyk¹, V. N. Kipen¹, T. A. Sergeeva²

GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE ASSESSMENT OF FOREIGN CARP STRAINS (*CYPRINUS CARPIO* L.) GROWN IN BELARUS

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: v.lemesh@igc.by

²Republican Daughter Unitary Enterprise

“Fish Industry Institute”

22 Stebeneva St., 220024 Minsk, the Republic of Belarus

Based on the molecular genetic analysis of 14 microsatellite loci, an assessment of the relationship, genetic diversity, and a structure of five foreign strains of the carp *Cyprinus carpio* L. (Yugoslavskiy, Nemetskiy, Sarboyanskiy, Cherepetskiy ramchatyi, and Frecinet carp), grown in the aquaculture and representing the collection gene pool of carp in Belarus, is provided.

When comparing the strains, the number of identified alleles per locus varied from 8,714 for the Sarboyanskiy carp to 25,286 for the Yugoslavskiy carp. Yugoslavskiy, Nemetskiy, Cherepetskiy ramchatyi, and Frecinet carp have a lower individual allele fixation index (F_{IS}) than the Sarboyanskiy carp ($F_{IS} = 0.273$). Four loci that have the greatest differentiating potential allowing to distinguish the strains from each other were identified: MFW10, MFW11, Cid0909, and MFW16. The dendrogram, which is based on the Nei's (D_A) genetic distance and the Ward's algorithm, groups the strains being studied into two main clusters: the Sarboyanskaya strain and remaining strains (Nemetskaya and Yugoslavskaya — the first subcluster; Cherepetskaya ramchataya, and Frecinet carp — the second subcluster). An individual assignment test allowed each individual carp to be assigned to the strain it belongs to with the overall accuracy of 93%. The results obtained indicate the high genetic diversity of all five carp strains of foreign selection being grown in Belarus. Thus, using a set of 14 highly polymorphic microsatellite markers, it is possible to monitor genetic diversity and to classify different *Cyprinus carpio* strains.

Keywords: common carp, *Cyprinus carpio* L., genetic diversity, genetic assignment test, microsatellite loci.

Дата поступления в редакцию: 04 сентября 2023 г.

Ю. И. Охременко, Е. С. Гайдученко

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СОМИКА АМЕРИКАНСКОГО *AMEIURUS NEBULOSUS* (LESUEUR, 1819) НА ОСНОВАНИИ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА *COI*

Государственное научно-производственное объединение
«Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: okhremenko.yulia@yandex.by

Впервые на обширном фактическом материале проанализированы и представлены оригинальные данные о генетической вариабельности фрагмента митохондриального гена *COI* сомика американского (*Ameiurus nebulosus*) в естественном и приобретенном ареале. В ходе работы проанализированы гаплотипы 178 особей из семи стран. Все полученные последовательности фрагмента мтДНК особей водоемов Беларуси относятся к одному наиболее распространенному гаплотипу (*Har_1*). Показано, что популяции вида в приобретенном ареале, в том числе и в Беларуси, характеризуются низким уровнем генетического разнообразия. Установлены филогенетические связи естественных и инвазивных популяций, а также определены возможные пути проникновения вида на территорию Беларуси.

Ключевые слова: инвазивный вид, *Ameiurus nebulosus*, нативный ареал, инвазивный ареал, Беларусь, митохондриальный ген *COI*, гаплотип, генетическое разнообразие.

Введение

Экспансия неаборигенной фауны является одной из основных угроз биоразнообразию во всем мире [1, 2]. В последние десятилетия наблюдается активное заселение водных экосистем чужеродными видами рыб.

Среди чужеродных видов рыб особое место занимают представители семейства *Ictaluridae* (Икталуровые). Три вида сомов: американский (коричневый) сомик *Ameiurus nebulosus* (Lesueur, 1819), американский (черный) сомик *Ameiurus melas* (Rafinesque, 1820), американский (желтый) сомик *Ameiurus natalis* (Lesueur, 1819) были завезены в Европу [3, 4]. *A. natalis* был завезен в 1906 г. и образовал самостоятельные популяции только в Италии, другие два вида широко расселились по всему континенту [5, 6].

Морфологически *A. nebulosus* и *A. melas* трудно отличимы между собой, поэтому американские сомики, впервые отловленные в водоемах Франции, Италии и Румынии, были ошибочно идентифицированы как *A. nebulosus*, являясь при этом *A. melas* [7]. Более точная видовая идентификация и установление филогенетических связей возмож-

ны с помощью молекулярно-генетических методов.

Проведенные ранее молекулярные таксономические исследования были направлены только на идентификацию видов семейства *Ictaluridae* посредством ДНК-баркодинга [8–12]. В ряде случаев был уточнен видовой статус представителей рода *Ameiurus*, обитающих в водоемах нативного ареала [13–14].

Благодаря исследованиям, посвященным гибридизации трех видов сомиков, проводимым на территории Венгрии, удалось показать появление гибридов при совместном обитании *A. nebulosus* и *A. melas* [15].

В связи с малым количеством исследованных образцов сомика американского из центральной и западной части Европы, а также полным отсутствием образцов из Беларуси, целью данной работы является анализ генетического разнообразия инвазивного вида и выявление филогенетических связей нативных и инвазионных популяций по полиморфизму фрагмента митохондриального гена *COI*.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили

данные, собранные на протяжении 2020–2022 гг. Сбор ихтиологического материала осуществляли в водоемах Брестской, Гродненской и Минской областей.

В качестве орудий лова использовали экспериментальные ловушки зонтичного типа на четыре входа из сетного полотна размером 80 × 80 см.

В качестве материала для анализа филогенетических связей мы использовали последовательности митохондриального гена,

кодирующего первую субъединицу цитохромоксидазы $C_{(mt)}COI$, полученные авторами статьи, и последовательности из международной базы данных GenBank (NCBI). Последовательности, полученные авторами статьи, депонированы в международную базу данных ДНК-штрихкодов Barcode of Life Data System (www.boldsystems.org). Информация о всех последовательностях, использованных в ходе проведения исследований, приведена в таблице 1.

Таблица 1

Последовательности образцов сомика американского (фрагмент гена $_{mt}COI$) включенные в анализ

Место сбора	Координаты, номер в NCBI GenBank, BOLD	Литература
Беларусь (Брестская область) n = 82		
оз. Безуменник	51.93517, 25.67249 NEBBY035-23	Наши данные
оз. Белое	51.93793, 25.68705 NEBBY036-23, NEBBY037-23, NEBBY038-23, NEBBY039-23	
оз. Верхолесье	52.08935, 24.30998 NEBBY040-23, NEBBY041-23, NEBBY042-23, NEBBY043-23	
оз. Головчицкое	52.14065, 24.85087 NEBBY044-23, NEBBY045-23	
Днепровско-Бугский канал	52.05903, 25.01541 NEBBY046-23, NEBBY047-23, NEBBY048-23, NEBBY049-23	
оз. Дворище	51.70320, 23.99104 NEBBY050-23, NEBBY051-23, NEBBY052-23, NEBBY053-23, NEBBY054-23, NEBBY055-23, NEBBY056-23, NEBBY057-23	
р. Мухавец	52.18462, 24.04372 NEBBY058-23, NEBBY059-23, NEBBY060-23, NEBBY061-23	
оз. Жлобинское	53.14145, 26.06109 NEBBY062-23, NEBBY063-23, NEBBY064-23, NEBBY065-23	
мелиоративный канал вблизи д. Каташи	52.14389, 24.31836 NEBBY066-23, NEBBY067-23, NEBBY068-23, NEBBY069-23	
пруд Карпин	51.75529, 24.03632 NEBBY027-23, NEBBY028-23, NEBBY029-23, NEBBY030-23, NEBBY031-23, NEBBY032-23, NEBBY033-23, NEBBY034-23	
оз. Каташи	52.12729, 24.34539 NEBBY070-23, NEBBY071-23	
водоем Копытское болото	51.77259, 23.65866 NEBBY072-23, NEBBY073-23, NEBBY074-23, NEBBY075-23, NEBBY076-23	
оз. Корасин	51.93180, 25.66130 NEBBY077-23, NEBBY078-23, NEBBY079-23, NEBBY080-23	
оз. Олтушское	51.69147, 23.95539 NEBBY011-23, NEBBY012-23, NEBBY013-23, NEBBY014-23, NEBBY015-23, NEBBY016-23, NEBBY017-23, NEBBY018-23	

Продолжение таблицы 1

Место сбора	Координаты, номер в NCBI GenBank, BOLD	Литература
Ореховские разливы	51.65202, 23.91237 NEBBY082-23, NEBBY083-23, NEBBY084-23, NEBBY085-23	Наши данные
оз. Ореховское	51.65020, 23.93297 NEBBY019-23, NEBBY020-23, NEBBY021-23, NEBBY022-23, NEBBY023-23, NEBBY024-23, NEBBY025-23, NEBBY026-23	
водоем в г. Пружаны	52.56266, 24.45166 NEBBY086-23, NEBBY087-23, NEBBY088-23, NEBBY089-23	
оз. Светиловское	53.14842, 26.00588 NEBBY090-23, NEBBY091-23, NEBBY092-23, NEBBY093-23	
Беларусь (Минская область) n = 3		
водоем аг. Засулье	53.58469, 26.83671 NEBBY005-23, NEBBY006-23	
водоем в г. Минск	53.80834, 27.68916 NEBBY081-23	
Беларусь (Гродненская область) n = 8		
водоем аг. Верейки	53.24954, 24.19017 NEBBY001-23, NEBBY002-23, NEBBY003-23, NEBBY004-23	
водоем аг. Новый двор	53.81665, 24.56617 NEBBY007-23, NEBBY008-23, NEBBY009-23, NEBBY010-23	
Канада	46.55, -73.79 KX 145148, KX 145343 46.56, -73.78 KX 145196 44.45949, -79.37121 KX 145411 43.113542, -79.803033 OR 081752, OR 081753, OR 081633, OR 081632, OR 081634	Unpub- lished
	45.44, -75.81 OQ 554347 44.55, -79.34 OQ 554348	[20]
	45.87, -73.13 EU 524426, EU 524427, EU 523909 46.25, -72.82 EU 524429, EU 524430, EU 524431 46.30, -72.70 EU 524432, EU 524433	[10]
	45.367, -76.883 JX 517067, JX 516946, JX 516987	[9]
Австрия	46.752, 15.37 ON 097475 46.943, 15.344 ON 097289, ON 097822 47.088, 15.411 ON 097302, ON 097397, ON 097877	[11]
Польша	51.178, 20.187 KJ 552549, KJ 552541	[12]

Окончание таблицы 1

Место сбора	Координаты, номер в NCBI GenBank, BOLD	Литература
Венгрия	46.86521, 20.00960 KX 909528, KX 909529, KX 909531, KX 909532, KX 909522, KX 909516, KX 909521, KX 909524, KX 909523, KX 909519, KX 909520, KX 909518, KX 909515, KX 909527 47.98141, 22.15260 KX 909544, KX 909534, KX 909546, KX 909547, KX 909549, KX 909550, KX 909551, JX 517108	[15]
США	42.00194, -81.32132 MF 621734	[21]
	42.60941, -121.81142 OL 339392 38.89616, -76.56177 MT455262 38.891, -76.558 MT 150962, MT456141 44.67335, -117.98824 OL 806597 47.46584, -87.26030 OM 736814	Unpub- lished
	38.891, -76.558 KX 459334	[8]
	43.07578, -79.07262 MT 150961, MT 150960	[22]
	41.866, -73.883 JX 517026 34.3267, -80.2451 JN 024753, JN 024754, JN 024755, JN 024756, HQ 557164	[9]
	42.98827, -70.61517 USNM-384243-BBC-2005-2-5, USNM-384243-BBC-2005-2-4, USNM-384243-BBC-2005-2-3, USNM-384243-BBC-2005-2-2, USNM-384243-BBC-2005-2-1	
Чехия	50.218, 15.118 MK 439917 50.218, 15.118 IFCZE1051, IFCZE1052, IFCZE1053, IFCZE1049, IFCZE1050 49.195, 16.576 IFCZE1393, IFCZE1394 49.245, 15.763 IFCZE1395	Unpub- lished

Примечание. полужирным шрифтом отмечены образцы выгруженные в BOLD

Образец ткани от каждой отловленной особи помещали в отдельную пробирку и хранили в 96%-ом спирте при -20°C . ДНК выделяли с помощью набора «Нуклеосорб» (Праймтех, Беларусь). Для получения целевого фрагмента использовали пару праймеров FF2d (5'-TTCTCCACCAACCACAARGA YATYGG-3') и FR1d (5'-CACCTCAGGGTG

TCCGAARAAYCARAA-3') [16]. Программа для амплификации: начальная денатурация 2 мин — 94°C ; 35 циклов денатурации в течении 30 сек — 94°C , отжиг 40 сек — 52°C , элонгация 1 мин — 72°C ; финальная стадия элонгации 10 мин — 72°C . Результаты амплификации анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле в присутствии бро-

мистого этидия. Проведено секвенирование фрагмента гена *mtCOI* на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 с использованием набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Выравнивание последовательностей и построение дендрограммы проводили в программе MEGAX [17]. Филогенетическое дерево было построено при помощи метода максимального правдоподобия (ML), модель Tamura-Nei model [18]. Выбор модели для построения дерева осуществляли в программе jModelTest. Надежность ветвления филогенетического дерева была определена при помощи бутстреп-анализа с учетом 1 000 псевдореплик. В качестве внешней группы для филогенетического анализа был выбран представитель рода *Ameiurus*: *Ameiurus brunneus* (номер в Genbank OQ 554340.1). Анализ внутригруппового генетического разнообразия проводили в программе DnaSP6. Медианная сеть гаплотипов была построена в программе PopArt [19].

Результаты и обсуждение

Полученные в ходе исследования нуклеотидные последовательности фрагмента гена *mtCOI* имели длину 558 п. н. Всего нами про-

анализировано 178 последовательностей: 93 последовательности сомика американского из Беларуси, 85 последовательностей взяты из международных баз данных NCBI GenBank и BOLD (табл. 1).

Важно отметить, что в первом нашем исследовании [23, 24] для образцов из Беларуси было ошибочно выделено три гаплотипа. Это произошло за счет некорректного прочтения одного нуклеотида в последовательностях двух образцов.

В настоящем исследовании представлены окончательные данные генетического разнообразия особей сомика американского водных объектов Беларуси по фрагменту гена *mtCOI*. Установлены 12 гаплотипов, при этом для образцов, собранных в водоемах Беларуси, характерен только гаплотип *Hap_1*.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *mtCOI* построена дендрограмма (рис. 1).

Также видно четкое разделение изучаемых гаплотипов на два крупных кластера: гаплотипы распространенные как в естественном, так и в инвазионном ареале (кластер В) и гаплотипы распространенные только в естественном ареале (кластер А) (рис. 1).

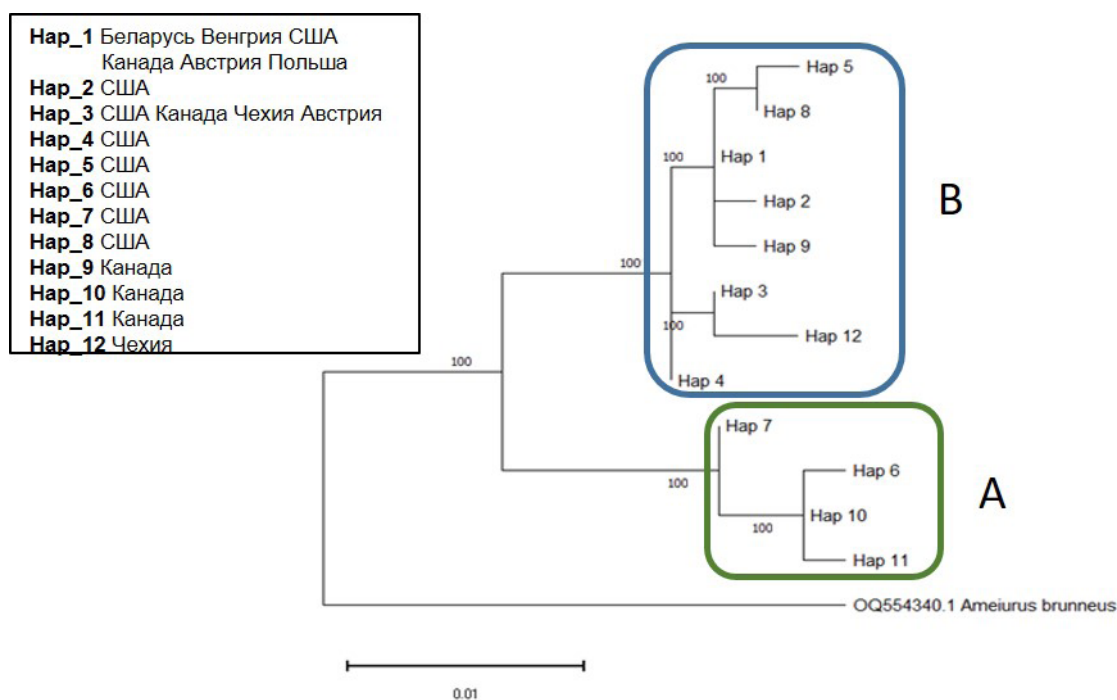


Рис. 1. Дендрограмма гаплотипов ($n = 12$) фрагмента гена *mtCOI* (558 п. н.), иллюстрирующая уровень генетических различий между гаплотипами. Цветом объединены гаплотипы, относящиеся к кластерам: А — естественный ареал; В — инвазионный ареал

Изучение медианной сети, построенной с целью проведения более точной кластеризации гаплотипов сомика американского, четко показывает наличие одного наиболее распространенного гаплотипа *Hap_1*, предположительно являющегося предковым (рис. 2). Данный гаплотип широко представлен как в нативном ареале (Канада, США),

так и в приобретенном (Венгрия, Польша, Австрия, Беларусь).

При изучении медианной сети (рис. 2) четко выделяется наличие двух гаплогрупп: гаплогруппа А (объединяющая в себе гаплотипы *Hap_6, 7, 10, 11* и обнаруженная только в США и Канаде) и гаплогруппа В (гаплотипы *Hap_1–5, 8, 9, 12*).

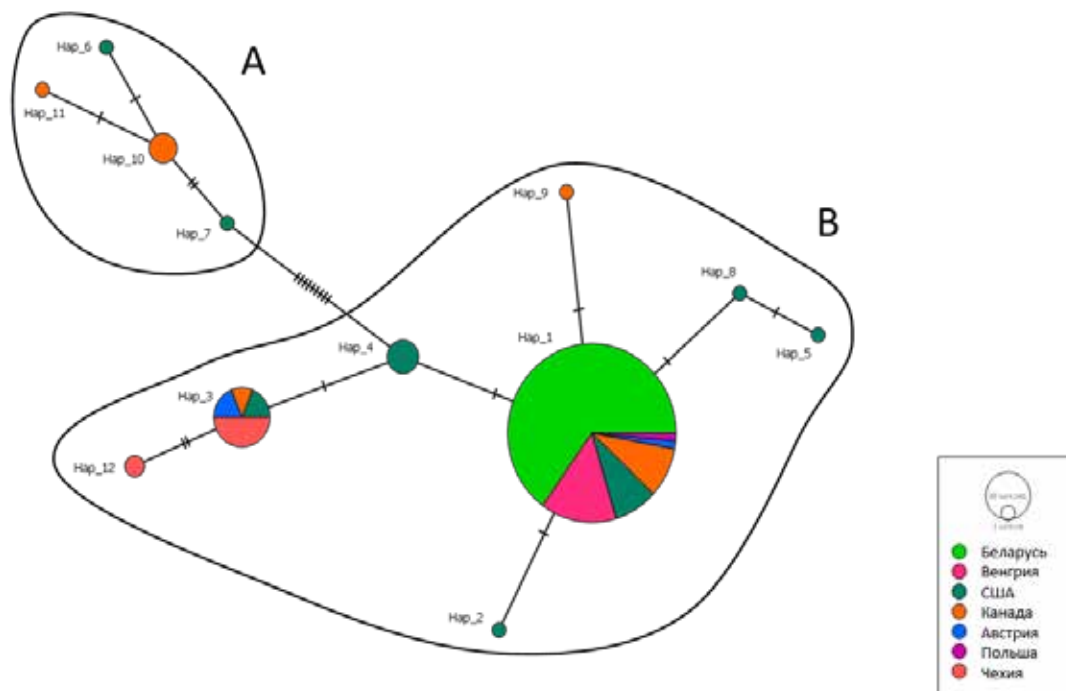


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов из 178 последовательностей фрагмента гена *mtCOI* (558 п. н.) образцов естественного (гаплогруппа А) и инвазионного (гаплогруппа В) ареала. Цветные кружки обозначают гаплотипы, обнаруженные в образцах сомика американского, собранных в Беларуси и других странах естественного и приобретенного ареала. Штрихи на линиях, соединяющих кружки, обозначают количество нуклеотидных замен

Характер дендрограммы (рис. 1) и медианной сети гаплотипов (рис. 2) показывает особенности заселения видом территории Европы. При анализе карты (рис. 3 а, б, с) можно заметить, что в естественном ареале из 11 обнаруженных гаплотипов двух гаплогрупп 50% последовательностей принадлежат гаплотипу *Hap_1* (гаплогруппа В). На основании проведенного анализа мы можем предположить изначальное проникновение (преднамеренное вселение) единичных особей сомика американского с гаплотипом *Hap_1* в водоемы Европы — наиболее массовым гаплотипом в естественном ареале, впоследствии успешно расселившимся по всей Европе.

Также можно предположить отдельное проникновение путем преднамеренного вселения

особей гаплотипа *Hap_3* в водоемы Австрии и Чехии — особи данного гаплотипа наряду с естественным ареалом встречаются только в водоемах данных стран.

Для анализа показателей генетического разнообразия все образцы разделены на две группы (рис. 1, 2): 1) образцы из приобретенного ареала — Беларусь, Венгрия, Польша, Чехия и Австрия; 2) образцы из естественного (нативного) ареала — США и Канада. Для каждой группы были рассчитаны показатели генетического разнообразия, а также тест Таджимы на нейтральность и оценка внутригрупповых генетических дистанций (табл. 2).

Анализ общего генетического разнообразия по фрагменту гена *mtCOI* показал высокий уровень гаплотипического (Hd) и низкий уровень

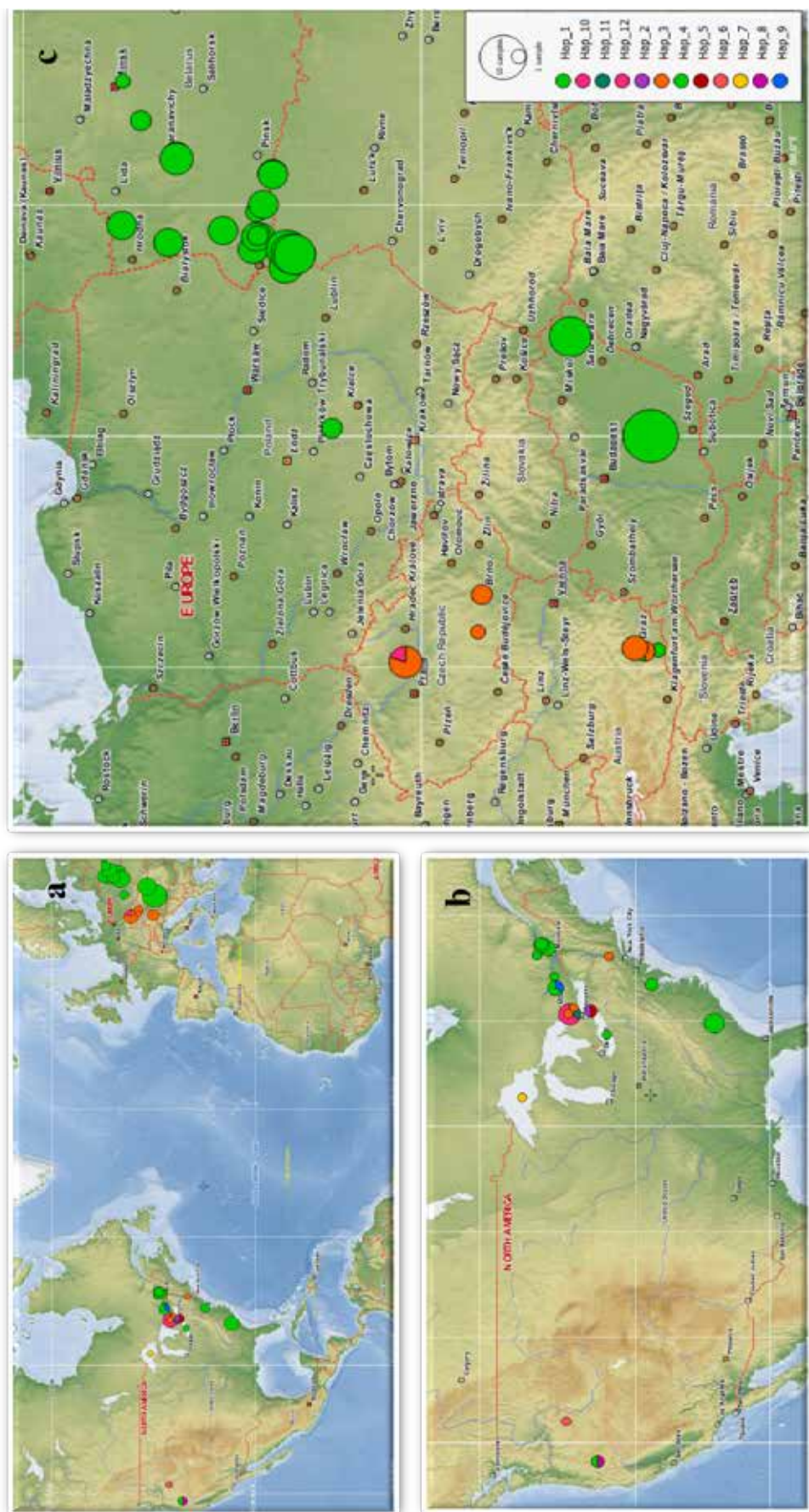


Рис. 3. Географическое распределение гаплотипов по фрагменту гена *SOI* сомки американского: а — общее распределение гаплотипов; б — естественный ареал (Северная Америка); с — приобретенный ареал (Беларусь и Западная Европа)

Таблица 2

Данные генетического разнообразия сомика американского по фрагменту гена *COI*

Ареал	N	S	H	Hd ± SDHd	π ± SDπ	k	p	T's D
Естественный	47	19	11	0,694 ± 0,067	0,00680 ± 0,00019	3,793	0,014	-0,37873
Приобретенный	131	4	3	0,187 ± 0,043	0,00075 ± 0,00019	0,421	0,005	-0,80892

Примечание. N — число последовательностей; S — число варьируемых сайтов; H — число гаплотипов; Hd — гаплотипическое разнообразие; π — нуклеотидное разнообразие; k — среднее число нуклеотидных различий, p — общая генетическая дистанция; SD — стандартное отклонение, T's D — тест Таджимы

нуклеотидного (π) разнообразия в естественном ареале. Такие показатели характерны для стабильных и генетически целостных популяций, которые расширяют свою среду обитания с высокой величиной эффективного числа основателей.

Для популяций приобретенного ареала, анализ показал низкий уровень как гаплотипического (Hd), так и нуклеотидного (π) разнообразия. Низкие показатели гаплотипического разнообразия сомика американского в приобретенном ареале могут быть объяснены эффектом «основателя» [25] и подтверждают гипотезу о расселении особей по территории Европы из одного первоначального места интродукции.

D-критерий теста на нейтральность Таджимы (T's D) показал значения, близкие к нулю, что предполагает нейтральную эволюцию ДНК и отсутствие доказательств отбора.

В результате изучения генетической структуры популяции сомика американского по фрагменту гена *COI* уточнены пути проникновения вида на территорию западной Европы и Беларуси. Исследуемые образцы особей сомика американского, обитающего в водоемах Беларуси, были завезены из стран западной Европы, куда, в свою очередь, попали из Северной Америки путем преднамеренного вселения малого числа особей. Следует отметить, что на территорию Европы таких ввозов было несколько, о чем свидетельствует наличие отдельных гаплотипов *Hap_3* и *12* наряду с нативным ареалом встречающихся только в водоемах Австрии и Чехии. Это согласуется с данными первого обнаружения вида в странах Западной Европы. Впервые сомик американский в 1871 г. был зарегистрирован во Франции, а затем в 1880 и 1885 гг. осуществлен крупный завоз данного

вида в Германию [26, 27]. С 1884 г. был налажен регулярный грузопассажирский трафик между Америкой и Европой, и данный вид был завезен в Бельгию [28]. Впоследствии, в первой половине XX в. вид широко расселился в Венгрии, Румынии, Чехословакии и водоемах Закарпатья [29–32]. В 1935 г. завезен из Германии в пределы западных областей БССР и УССР [33].

По территории Беларуси вид распространяется предположительно при участии рыбаков (преднамеренное вселение в новые водоемы, использование в качестве приманки), и впоследствии за счет биологических особенностей (высокая выживаемость, забота о потомстве, отсутствие естественных врагов) вид быстро оккупирует новые водоемы.

Заключение

В ходе анализа генетического разнообразия сомика американского в естественном и приобретенном ареале на основании изменчивости *COI* было обнаружено 12 гаплотипов, принадлежащих двум гаплогруппам. При этом особи с гаплотипами гаплогруппы А отмечены только в естественном ареале. Установлено широкое распространение гаплотипа *Hap_1*. Данный гаплотип был обнаружен как в нативном, так и в приобретенном ареале. При этом в естественном и приобретенном ареале большинство особей в исследуемых выборках принадлежат к гаплотипу *Hap_1*.

Полученные исходные данные о генетическом разнообразии образцов американского сомика свидетельствуют о низком гаплотипическом (Hd = 0,187 ± 0,043) и нуклеотидном (π = 0,00075 ± 0,00019) разнообразии в приобретенном ареале, что может быть объяснено эффектом «основателя» и подтверждать гипо-

тезу о расселении вида по территории Европы из места первоначальной интродукции. Исследование генетического разнообразия инвазивного вида сомика американского представляет значительный интерес, так как позволяет уточнить пути проникновения и особенности дальнейшего распространения особей по гидрографической сети Европы.

Особенно актуально проведение данной работы в свете отсутствия подобных исследований для популяции сомика американского приобретенного ареала: имеющиеся работы затрагивают только вопросы первого обнаружения особей в новых акваториях Европы, уточнение видового статуса и межвидовой гибридизации видов рода *Ameiurus*.

Впервые на обширном фактическом материале проанализированы и представлены оригинальные данные о генетической вариабельности фрагмента митохондриального гена *COI* сомика американского (*A. nebulosus*) в естественном и приобретенном ареале. Полученные результаты включают оригинальные данные о генетическом разнообразии сомика американского и охватывают необследованные ранее регионы. Анализ генетической структуры данного инвазивного вида вызывает особый интерес для изучения его дальнейшего распространения как по территории западной Европы, так по территории Беларуси.

Работа была поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований на 2023–2025 гг. (Проект Б23М-089) и стипендией Президента Республики Беларусь на 2023 г.

Список использованных источников

1. What do we really know about the impacts of one of the 100 worst invaders in Europe? A reality check / P. E. Hirsch [et al.] // *Ambio*. – 2016. – Vol. 45. – P. 267–279.
2. Leppäkoski, E. Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management / E. Leppäkoski, S. Gollasch, S. Olenin // Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. – 2002. – 583 p.
3. Carlander, K. D. Life history data on centrarchid fishes of the United States and Canada / K. D. Carlander // *Handbook of freshwater fishery biology*. 1st Ed. Iowa State University

Press, Ames. – 1977. – Vol. 2. – 431 p.

4. Rapid genetic identification of brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*), black bullhead (*Ameiurus melas*) and their hybrids / R. P. Walter [et al.] // *Conservation Genetics Resources*. – 2014. – Vol. 6. – P. 507–509.

5. Wilhelm, S. A Berettyóés Ér folyók fekete törpeharcsa (*Ictalurus melas*, Rafinesque, 1820) állományának biometriai vizsgálata / S. Wilhelm // *Múzeumi Füzetek Kolozsvár*. – 1999. – Vol. 7. – P. 131–134.

6. *Ameiurus melas (black bullhead)*: morphological characteristics of new introduced species and its comparison with *Ameiurus nebulosus (brown bullhead)* / J. Rutkayová [et al.] // *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. – 2013. – Vol. 23. – P. 51–68.

7. Bănărescu, P. Pzitia sistimatica a somnului pitis american aclimatizat in apele Romaniei / P. Bănărescu // *St. Cerc. Biol. Ser. Zoologie*. – 1968. – 20. – P. 261–263.

8. Gutsy genetics: identification of digested piscine prey items in the stomach contents of sympatric native and introduced warmwater catfishes via DNA barcoding / R. Aguilar [et al.] // *Environ. Biol. Fishes*. – 2017. – Vol. 100, № 4. – P. 325–336. – DOI: 10.1007/s10641-016-0523-8

9. Glacial cycles as an allopatric speciation pump in north-eastern American freshwater fishes / J. April [et al.] // *Mol. Ecol*. – 2013. – Vol. 22, № 2. – P. 409–422. – DOI: 10.1111/mec.12116

10. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes / N. Hubert [et al.] // *PLoS ONE*. – 2008. – Vol. 3, № 6. – e2490. – DOI: 10.1371/journal.pone.0002490

11. A comprehensive DNA barcode inventory of Austria's fish species / L. Zangl [et al.] // *PLoS One*. – 2022. – 17 (6). – e0268694. – DOI: 10.1371/journal.pone.0268694

12. Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes / M. F. Geiger [et al.] // *Mol Ecol Resour*. – 2014. – 14 (6). – P. 1 210–1 221. – DOI: 10.1111/1755-0998.12257

13. Rapid genetic identification of brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*), black bullhead (*Ameiurus melas*) and their hybrids / R. P. Walter [et al.] // *Conservation Genet Resour*. – 2014. – Vol. 6. – P. 507–509. – DOI: 10.1007/s12686-014-0161-4

14. Use of mtDNA to Identify Genetic Introgression among Related Species of Catfish /

- D. W. Hunnicutt [et al.] // Journal of Great Lakes Research. – 2005. – Vol. 31, iss. 4. – P. 482–491. – DOI: 10.1016/S0380-1330(05)70278-1
15. Species-specific markers provide molecular genetic evidence for natural introgression of bullhead catfishes in Hungary / B. Beres [et al.] // PeerJ. – 2017. – Vol. 5. – e2804. – DOI: 10.7717/peerj.2804
16. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding / N. V. Ivanova [et al.] // Molecular Ecology Notes. – 2007. – Vol. 7, № 4. – P. 544–548. – DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x
17. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2018. – Vol. 35. – P. 1 547–1 549. – DOI: 10.1093/molbev/msy096
18. Tamura, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // Molecular Biology and Evolution. – 1993. – Vol. 10. – P. 512–526. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
19. Leigh, J. W. PopART: Full-feature software for haplotype network construction / J. W. Leigh, D. Bryant // Methods Ecological Evolution. – 2015. – Vol. 6. – P. 1 110–1 116. – DOI: 10.1111/2041-210X.12410
20. Phylogenetic relationships of the North American catfishes (Ictaluridae, Siluriformes): Investigating the origins and parallel evolution of the troglobitic species / F. N. Janzen [et al.] // Mol Phylogenet Evol. – 2015. – Vol. 182. – e107746. – DOI: 10.1016/j.ympev.2023.107746
21. Fish mitochondrial genome sequencing: expanding genetic resources to support species detection and biodiversity monitoring using environmental DNA / J. C. Schroeter [et al.] // Conserv Genet Resour. – 2020. – Vol. 12, № 3. – P. 433–446. – DOI: 10.1007/s12686-019-01111-0
22. Is Niagara Falls a barrier to gene flow in riverine fishes? A test using genome-wide SNP data from seven native species / N. K. Lujan [et al.] // Mol Ecol. – 2020. – Vol. 29, № 7. – P. 1 235–1 249. – DOI: 10.1111/mec.15406
23. Охременко, Ю. И. Генетический полиморфизм сомика американского (*Ameiurus nebulosus* (Lesueur, 1819)) на основе анализа последовательностей гена *COI* в популяциях естественного и приобретенного ареала / Ю. И. Охременко, Е. С. Гайдученко // Трансграничное сотрудничество в области экологической безопасности и охраны окружающей среды: VI Международная научно-практическая конференция (Гомель, 2–3 июня 2022 г.) : сборник материалов / М-во образования Республики Беларусь, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины ; редкол. : А. П. Гусев (гл. ред.) [и др.]. – Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины. – 2022. – С. 188–191.
24. Охременко, Ю. И. Генетическое разнообразие популяций сомика американского *Ameiurus nebulosus* (Le Sueur, 1819) — инвазивного вида в Беларуси / Ю. И. Охременко, Е. С. Гайдученко // Современные проблемы биологической эволюции: материалы IV Международной конференции к 875 летию Москвы и 115 летию со дня основания Государственного Дарвиновского музея. 17–20 октября 2022, г. Москва. – М.: ГДМ. – 2022. – С. 76–78.
25. Avise, J. C. Molecular markers, natural history and evolution / J. C. Avise // N. Y.: Chapman and Hall. – 1994. – P. 766–767. – DOI: 10.1007/978-1-4615-2381-9
26. Vivier, P. Poissons et crustacés d’eau douce acclimatés en France en eaux libres depuis le début du siècle / P. Vivier // Terre Vie. – 1951. – Vol. 98. – P. 57–82.
27. Schindler, O. Unsere Süsswasserfische / O. Schindler // Stuttgart: Kosmos, 1953. – 222 p.
28. Kendal, W. C. American catfishes: habits, culture and commercial importance / W. C. Kendal // Rep. U. S. Commnr. Fish, 1910. – Vol. 733. – 39 p.
29. Balon, E. Verzeichnis, Arten und quantitative Zusammen set zung sowie Veränderung der Ichthyofauna de Längs- und Querprofils des tschechoslowakischen Donau abschnittes / E. Balon // Zool. Anz. – 1964. – Vol. 172, № 2. – P. 113–130.
30. Antonescu, C. S. Elemente noi în fauna apelor dulci din România / C. S. Antonescu // Volumul Jubiliar “Grigore Antipa”. – 1938. – P. 85–91.
31. Holčík, J. The systematic status of bullhead (*Rafinesque, 1820*) (Osteichthyes: Ictaluridae) in Czechoslovakia / J. Holčík // Vest. Českoslov. Spol. Zool. – 1972. – Vol. 36. – P. 187–191.
32. Movchan, Yu. V. Fauna of Ukraine. Fishes. / Yu. V. Movchan. – Kyiv: Naukovadumka, 1988. – Vol. 8, Part 3. – 368 p.
33. Жуков, П. И. Рыбы Белоруссии / П. И. Жуков. – Минск: Наука и техника, 1965. – С. 339–344.

Yu. I. Okhremenko, H. S. Gajduchenko

GENETIC DIVERSITY OF THE BROWN BULLHEAD *AMEIURUS NEBULOSUS* (LESUEUR, 1819) BASED ON THE VARIABILITY OF THE MITOCHONDRIAL *COI* GENE

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: okhremenko.yulia@yandex.by

For the first time, based on extensive factual material, the original data on the genetic variability of the mitochondrial *COI* gene fragment in the brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) in the native and invasive range were analyzed and presented. In the course of work, haplotypes of 178 individuals from 7 countries were analyzed. All obtained sequences of mtDNA fragment individuals from the water bodies of Belarus belong to the most common haplotype (*Hap_1*). It was shown that species populations in the invasive range, including Belarus, are characterized by a low level of genetic diversity. Phylogenetic relationships between native and invasive populations were established, including the possible ways of the species spread into the territory of Belarus.

Keywords: invasive species, *Ameiurus nebulosus*, native range, invasive range, Belarus, mitochondrial *COI* gene, haplotype, genetic diversity.

Дата поступления в редакцию: 31 августа 2023 г.

Е. В. Гузенко, А. И. Царь, М. С. Парфенчик, О. В. Прищепчик

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПОЛНОГО МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ БЕЛАРУСИ: ПЕРВЫЙ ОПЫТ

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

В статье представлены данные молекулярно-генетического анализа митохондриальной ДНК медоносных пчел, собранных на территории Гомельской и Витебской областей (Беларусь). Анализ межсемейного полиморфизма обнаружил четыре варианта локуса COI-COII (Q, PQ, PQQ, PQQQ), что свидетельствует о разном происхождении семей пчел по материнской линии (эволюционные линии С, М). Для Беларуси особый интерес представляют образцы эволюционной линии М, поскольку к этой линии относится аборигенный подвид *A. m. mellifera*. Чистопородные популяции *A. m. mellifera* считаются ценным генетическим ресурсом, т. к. в результате естественного отбора в условиях слабой медоносной и пыльценосной базы, неустойчивого климата сформировали генотип с адаптивными вариантами генов. С целью точной идентификации выполнено секвенирование (NGS, Illumina, iSeq 100) митохондриальных геномов двух образцов эволюционной линии М и одного образца эволюционной линии С. Собрана митохондриальная ДНК длиной 14 047 п. н., 14 276 п. н. и 14 022 п. н., соответственно. По результатам BLAST-анализа идентичность образцов эволюционной линии М подвида *A. m. mellifera* составила 99,62–99,68%, корректность картирования — 94,58–94,18%.

Ключевые слова: медоносная пчела, *Apis mellifera* L., *Apis mellifera mellifera*, мтДНК, COI-COII, секвенирование полного митохондриального генома.

Введение

Медоносные пчелы *Apis mellifera* L. являются основными насекомыми-опылителями, поскольку опыляют 85% цветковых растений (около 300 тыс. видов). От их деятельности зависит биологическое разнообразие и устойчивость природных экосистем [1], а также продовольственная безопасность стран [2]. Медоносные пчелы широко распространены в Европе, Африке, Ближнем Востоке и Центральной Азии. Описаны многочисленные подвиды *A. mellifera* [3, 4, 5]. В настоящее время на основе наиболее полных данных геномного анализа подвиды медоносных пчел сгруппированы в шесть эволюционных линий с соответствующим ареалом распространения: А (тропическая Африка (11 подвидов)), М (Северная и Западная Европа (3 подвида)), С (Средиземноморье, Центральная и Восточная Европа (9 подвидов)), О (Ближний Восток (6 подвидов)), Y (Республика Йемен (1 подвид)) и Z (Сирия (1 подвид)) [6]. Биология медоносных пчел такова, что особи разных подвидов свободно скрещиваются и дают плодовитое

потомство. Распространение пакетного пчеловодства и неконтролируемое перемещение пчелиных семей приводит к гибридизации аборигенных подвидов и потере уникальных генофондов [7, 8].

Для стран северо-западной части Европы автохтонным является подвид *Apis mellifera mellifera* — темная лесная пчела (среднерусская пчела, или европейская темная пчела). По современным таксономическим данным *A. mellifera mellifera* принадлежит к эволюционной линии М, к которой также относятся *A. mellifera iberensis* и *A. mellifera sinisxinyuan* [6]. Чистопородные популяции *A. m. mellifera* считаются ценным генетическим ресурсом, т. к. в результате естественного отбора в условиях слабой медоносной и пыльценосной базы, неустойчивого климата с продолжительными холодными периодами сформировали генотип с адаптивными вариантами генов. Естественный ареал обитания темной лесной пчелы в последние годы существенно сократился в результате импорта и замены маток матками других подвидов *Apis*. Данные

исследований показывают, что значительное количество пчелосемей *A. m. mellifera*, обитающих в Европе, сильно гибридизированы, но отдельные территории с генетически чистыми популяциями все еще существуют и нуждаются в защите [9].

Темная лесная пчела является аборигенным подвидом и для Беларуси. До Великой Отечественной войны данный подвид существовал повсеместно. В конце 1940-х гг. в СССР для восстановления пчеловодства в районы, пострадавшие от войны, завозили пчел южных подвидов (*A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. caucasica*). В 1965–1970 гг. был

разработан и внедрен план породного районирования пчел для всей Беларуси, который рекомендовал использовать пчеломаток южных подвидов [10]. К сожалению, и в настоящее время в Беларуси с целью максимального получения товарного меда продолжается активная интродукция различных подвидов и линий пчел, что приводит к неконтролируемому скрещиванию, широкому распространению гибридных форм и болезней, а следовательно, к деградации генофонда местных популяций [11]. Считается, что автохтонный подвид *A. m. mellifera* не сохранился на территории нашей страны (рис. 1).

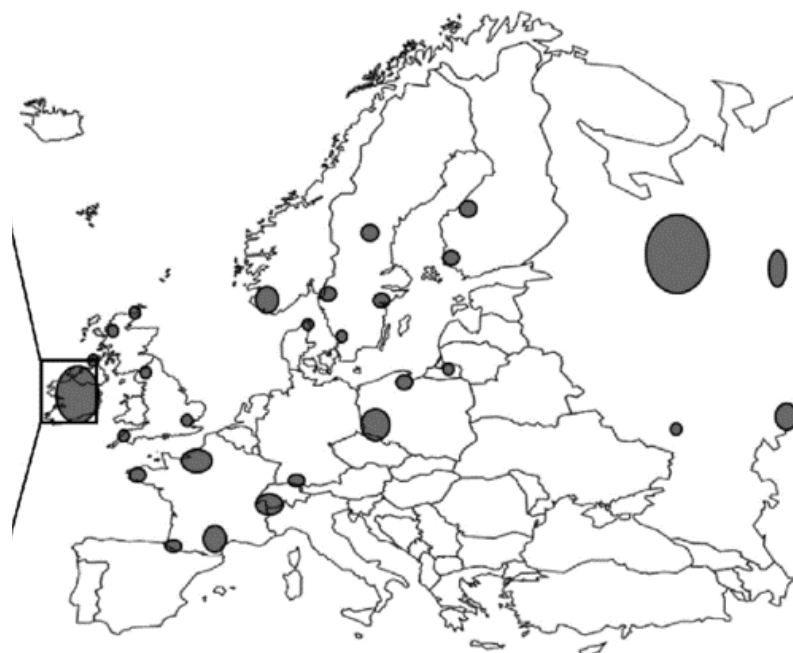


Рис. 1. Современные ареалы обитания темной лесной пчелы *A. m. mellifera* в Евразии [9]

Нами начаты системные молекулярно-генетические исследования медоносных пчел, обитающих на территории республики [12, 13]. Показано, что в Беларуси сохранились популяции пчел, которые относятся к эволюционной линии М [14]. Анализ локуса COI-COII митохондриальной ДНК (мтДНК) с последующей рестрикцией (*DraI*-тест) установил, что митотип популяций пчел Гомельской области отличается от митотипа популяций пчел Витебской области.

Цель данного исследования — с высокой степенью достоверности установить таксономическую принадлежность образцов медоносных пчел Гомельской и Витебской

областей Беларуси.

Материалы и методы

Материалом для исследований служила коллекция медоносных пчел, которая была собрана в географических районах: Припятское Полесье (Гомельская область) и Витебская область. Рабочих пчел отбирали из бортей и ульев пасек, расположенных на окраинах деревень. В таблице 1 указаны места расположения борти/пасеки.

Отобранных для исследования пчел фиксировали в 96%-ом этаноле и хранили до выделения ДНК при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Выделение ДНК проводили из торакса (груди). Матери-

Таблица 1

Перечень образцов, использованных в исследовании

Шифр семьи	Расположение пасеки, борти
18	Витебская область, Глубокский район, д. Сазановщина, местная пчела
19	Витебская область, Глубокский район, д.Шуневцы, местная пчела
20	Витебская область, Глубокский район, д. Морги, местная пчела
37	Гомельская область, Лельчицкий район, д. Дзержинск, местная пчела
38	Гомельская область, Лельчицкий район, д. Дзержинск, бортевая пчела
39	
40	
41	
42	
43	
45	
46	
47	Гомельская область, Лоевский район, бортевая пчела
48	
49	
50	Витебская область, Сененский район, д. Тепляки, местная пчела
51	

ал измельчали, ресуспендировали в 200 мкл TE буфера (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA). Для выделения ДНК использовали Genomic DNA Purification Kit (#K0512) (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ полиморфизма локуса COI-COII в мтДНК проводили с использованием ПЦР со специфическими праймерами (GGCAGAATAAGTGCATTG; CAATATCATTGATGACC). Реакционная смесь включала 20 нг геномной ДНК, по 5 пмоль прямого и обратного праймера, 2 mM смеси дНТП (dNTPs), 50 mM MgCl₂ и 5 ед./мкл Taq-полимеразы. ПЦР проводили в термоциклере MyCycler™ (BioRad, США) в следующих

условиях: 92 °C — 3 мин, 30 циклов с параметрами: денатурация при 92 °C — 30 сек, отжиг праймеров при 50 °C — 1 мин 30 сек, элонгация при 63 °C — 2 мин. Конечная элонгация при 72 °C — 10 мин. Качество прохождения реакции оценивалось по гель-электрофорезу. При наличии продукта реакции проводили рестрикционный анализ (*DraI*-тест) с использованием эндонуклеазы *DraI* (SibEnzyme®) в соответствии с инструкцией производителя. Продукты рестрикции оценивали в 1,5%-ом агарозном геле.

Проведено полногеномное секвенирование трех образцов пчел (табл. 2).

Для амплификации всего митохондриаль-

Таблица 2

Перечень образцов для полногеномного секвенирования мтДНК

Шифр семьи	Расположение пасеки, борти	Вариант локуса COI-COII мтДНК	Эволюционная линия
18	Витебская область, Глубокский район	PQQ	M
37	Гомельская область, Лельчицкий район	PQQ	M
9	Полесский радиоэкологический заповедник	Q	C

ного генома в 12 перекрывающихся фрагментах использованы специфические праймеры, последовательности которых приведены в работе М. С. Arias с соавторами. [15]. Реакционная смесь включала 20 нг геномной ДНК, по 5 пмоль прямого и обратного праймера, 2 мМ смеси дНТП (dNTPs), 50 мМ MgCl₂ и 5 ед./мкл Taq-полимеразы. ПЦР проводили в термоциклере Thermal Cycler C1000 (BioRad, США) в следующих условиях: 94 °С — 5 мин, 30 циклов с параметрами: денатурация при 94 °С — 60 сек, отжиг праймеров — 80 сек (температура отжига подбиралась в зависимости от праймера), элонгация при 64 °С — 120 сек. Конечная элонгация при 64 °С — 10 мин. Качество прохождения реакции оценивалось с помощью гель-электрофореза. При наличии продукта реакции проводилось NGS (next generation sequencing). Для подготовки фрагментов ПЦР-реакции к секвенированию использовался набор Nextera XT DNA Library Prep по протоколу производителя. Постановка NGS проводилась на платформе секвенирования Illumina (iSeq 100) с использованием стандартных процедур. Библиотеки размером 300 п. о., покрытие не менее 50 раз. Всего было сгенерировано 27,112 МБ данных «чистой последовательности», т. е. после стандартной предобработки «сырых данных» программным обеспечением секвенатора.

Биоинформатический анализ включал оцен-

ку качества прочтений, сборку митохондриального генома, BLAST-анализ для установления наиболее вероятной таксономической принадлежности пчел (база данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)), картирование прочтений, выявление полиморфных участков, а также аннотацию и построение геномных карт собранных митохондриальных геномов. Использованное программное обеспечение: FastQC — проверка качества прочтений, первичная оценка полученных последовательностей [16], Trimmomatic — удаление прочтений, качеством ниже Q 30 и меньше 36 п. н. [17], SPAdes — сборка мтДНК, расчет среднего покрытия при сборке консенсусной последовательности [18], PROKSEE сервер — построение геномных карт, аннотация [19], Samtools — картирование и идентификация нуклеотидных замен/делеций [20], Mega — выравнивание последовательностей и построение дерева [21].

Результаты и обсуждения

Полиморфизм локуса COI–COII мтДНК

При индивидуальном ДНК-анализе пчел по локусу COI–COII, особи с разными гаплотипами внутри семьи не выявлены. При анализе межсемейного полиморфизма найдено четыре варианта локуса мтДНК, что свидетельствует о разном происхождении семей пчел по материнской линии (табл. 3, рис. 2)

Таблица 3

Обнаруженные варианты локуса COI–COII мтДНК

Шифр образца	Вариант элемента	Шифр образца	Вариант элемента
18	PQQ	43	PQQ
19	PQQQ	45	PQQQ
20	PQ	46	PQQ
37	PQQ	47	Q
38	PQQ	48	Q
39	PQQ	49	Q
40	PQQ	50	Q
41	PQQ	51	Q
42	PQQ		

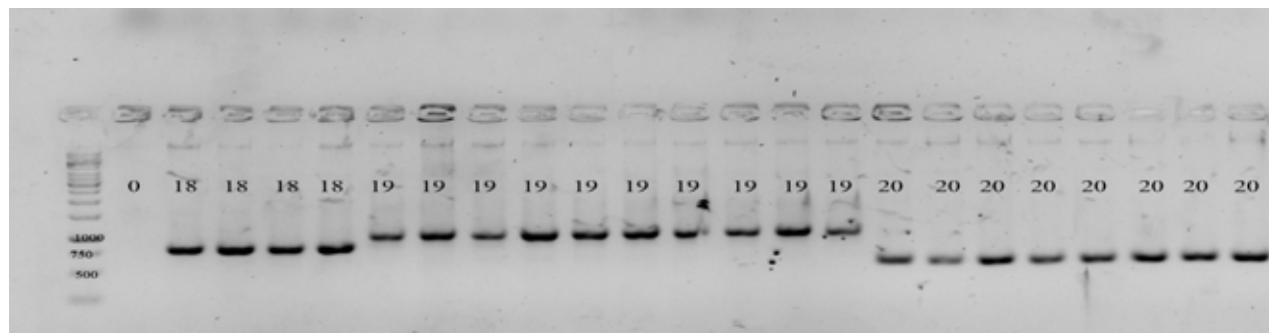


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации локуса COI-COII мтДНК

Известно, что локус между генами COI-COII мтДНК образован последовательностью гена *mPDKLeu* и сложными повторами Р и Q элементов [22]. Пчелы разных эволюционных ветвей характеризуются разными комбинациями элементов Р и Q. Наиболее коротким фрагментом локуса COI-COII мтДНК, содержащим единственный элемент Q (350 п. н.), характеризуются подвиды пчел эволюционной линии С. Подвиды других эволюционных линий имеют более длинный фрагмент COI-COII мтДНК, поскольку содержат элемент Р и от 1 до 5 копий элемента Q, в частности, у особей подвида темная лесная пчела регистрируются несколько вариантов — PQQ, PQQQ, PQQQQ (от 500 до 1 500 п. н.) [22].

В нашем исследовании пчелосемьи 47, 48, 49, 50, 51 соответствовали эволюционной линии С — южные подвиды пчел, а образцы 18, 19, 20, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46 соответствовали другой эволюционной линии — вероятнее всего эволюционной линии М, к которой относится аборигенный подвид — темная лесная пчела. Возможно существование экотипов, поскольку в образцах Гомельской области исследуемый участок мтДНК представлен набором фрагментов PQQ длиной около 800 п. н., для Витебской области — PQ, PQQ, PQQQ с набором фрагментов 600, 800, 1 000 п. н. соответственно. М. D. Meixner и др. (2010) показали, что на территории Европы существуют экологические группы (экотипы) *A. m. mellifera*, которые отличаются друг от друга по генетическим маркерам на уровне ниже подвидового.

С целью уточнения эволюционной принадлежности пчел нами проведен *Dral*-тест [23]. Установлено, что пчелосемьи 18, 20 имеют гаплотип М3, пчелосемья 19 — М6, пчелосемьи

37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46 — М7. Согласно карте рестрикции [23] данные образцы имеют западно-европейское происхождение, и могут относиться к *A. mellifera mellifera*.

Полное секвенирование мтДНК

Мы продолжили установление таксономической принадлежности образцов, которые по данным ПЦР анализа и последующей рестрикции были идентифицированы как образцы, принадлежащие эволюционной линии М.

Нами проведено секвенирование полного генома мтДНК (NGS) по одной пчеле от трех семей: 18 с гаплотипом М3 (Витебская область), 37 с гаплотипом М7 (Гомельская область) и 9 с гаплотипом С1 (Полесский радиологический заповедник). Данные секвенирования обрабатывали с помощью программного обеспечения FastQC, Trimmomatic, SPAdes, Mega и онлайн-сервера PROKSEE (см. Материалы и методы).

Для трех исследованных особей из семей 9, 18 и 37 были получены консенсусные последовательности мтДНК длиной 14 022 п. н. (средняя глубина покрытия 85,22), 14 047 п. н. (средняя глубина покрытия 89,43) и 14 276 п. н. (средняя глубина покрытия 97,28) соответственно. Поиск референсных последовательностей проводили онлайн на сайте NCBI (BLAST-анализ) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

В результате поиска референсных последовательностей для особи из семьи 9 был идентифицирован наиболее близкий подвид: MN250878.1 *A. m. carnica* (99,86% идентичность; 95,87% точность картирования).

Для двух других исследуемых пчел, представляющих для нас наибольший интерес, идентифицированы три ближайших подвида *A. mellifera*: KY926884 — *A. mellifera*

mellifera, OK075087.1 — *A. mellifera iberiensis*, MN733955.1 — *A. mellifera sinisxinyuan*. Картирование прочтений на указанные референсные геномы и идентификацию полиморфизмов осуществляли с помощью программного обеспечения Samtools. Результаты BLAST-анализа и картирования представлены в таблице 4.

На рисунках 3А–Б, 4А–Б представлены физические карты полной кольцевой молекулы мтДНК референсного образца (кольцо серо-

го цвета) и исследуемого образца (внешнее кольцо).

На основе попарных генетических дистанций между последовательностями мтДНК была построена дендрограмма (рис. 5), отражающая филогенетические взаимоотношения исследуемых образцов (9, 18, 37) и десяти подвидов медоносных пчел, относящихся к трем разным эволюционным линиям. В качестве референсных брали последовательно-

Таблица 4

Результаты BLAST-анализа и картирования двух образцов медоносных пчел эволюционной линии М

Референс	NCBI BLAST, % идентичности			Корректно картированные прочтения, %		
	KY926884	OK075087.1	MN733955.1	KY926884	OK075087.1	MN733955.1
family_18	99,29	99,68	99,31	94,55	94,56	94,50
family_37	99,23	99,62	99,70	96,26	96,18	96,27

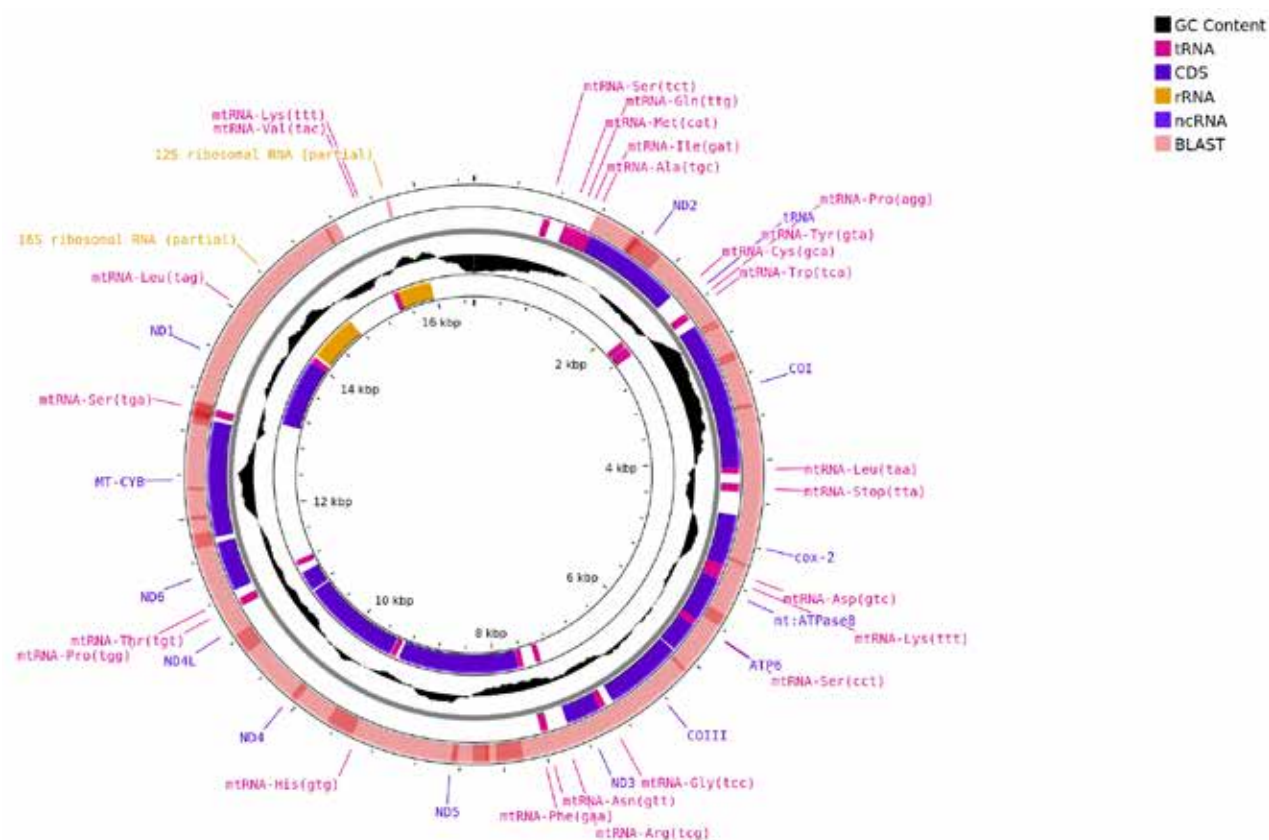


Рис. 3А. Физические карты полной последовательности референсного образца OK075087.1 — *A. mellifera iberiensis* и исследуемого образца из семьи 18

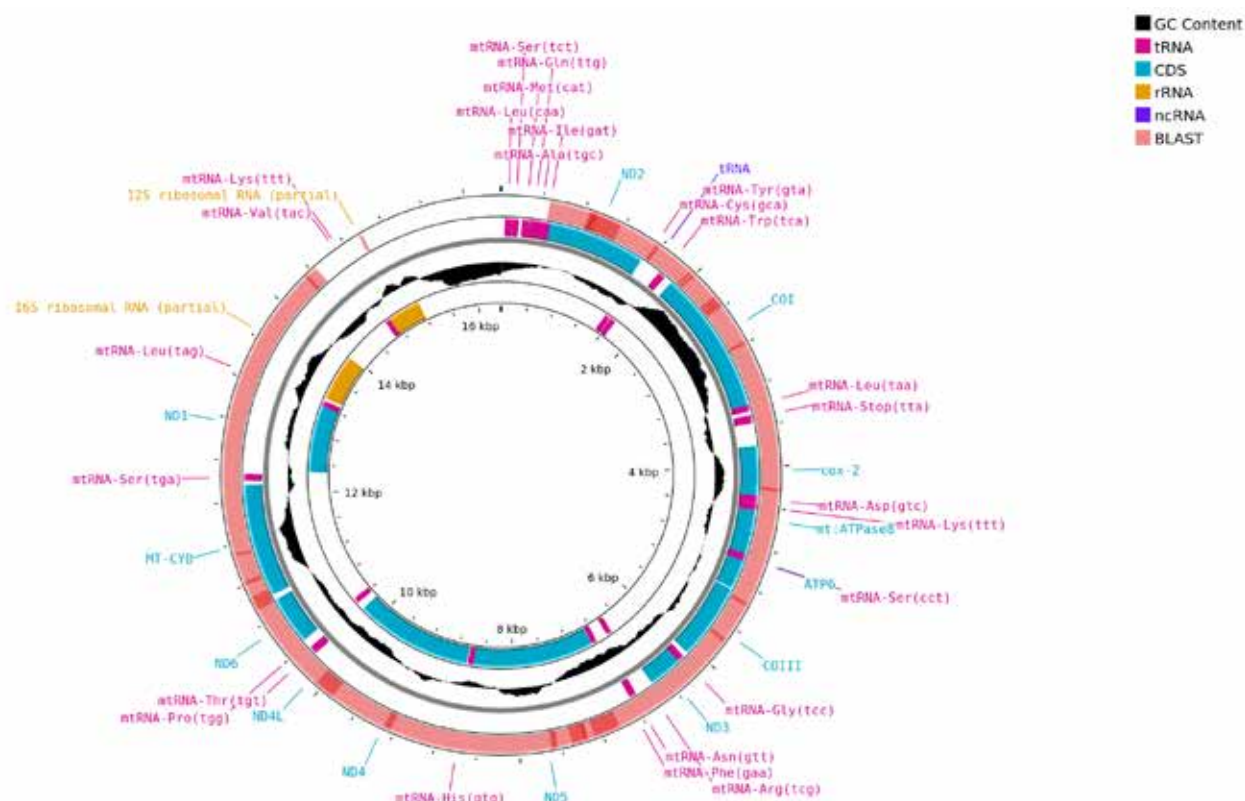


Рис. 3Б. Физические карты полной последовательности референсного образца KY926884 — *A. mellifera mellifera* и исследуемого образца из семьи 18

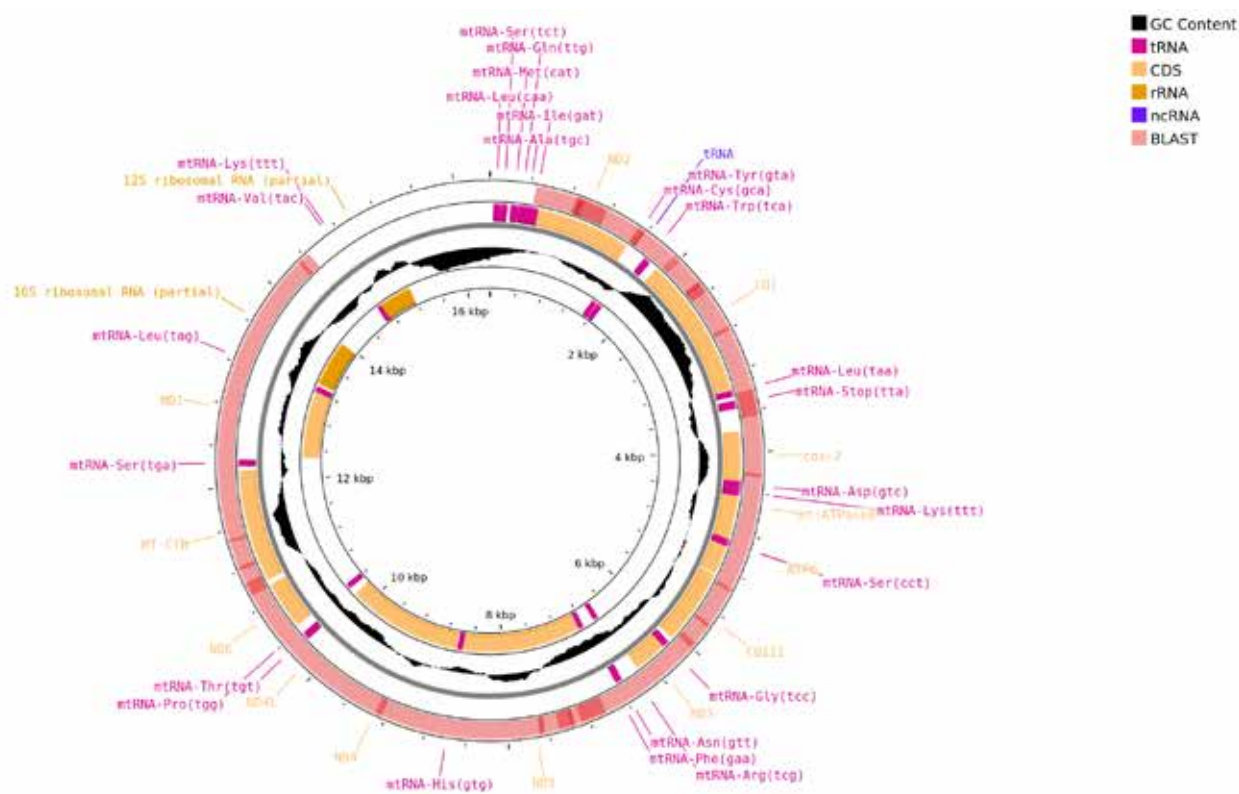


Рис. 4А. Физические карты полной последовательности референсного образца KY926884 — *A. mellifera mellifera* и исследуемого образца из семьи 37

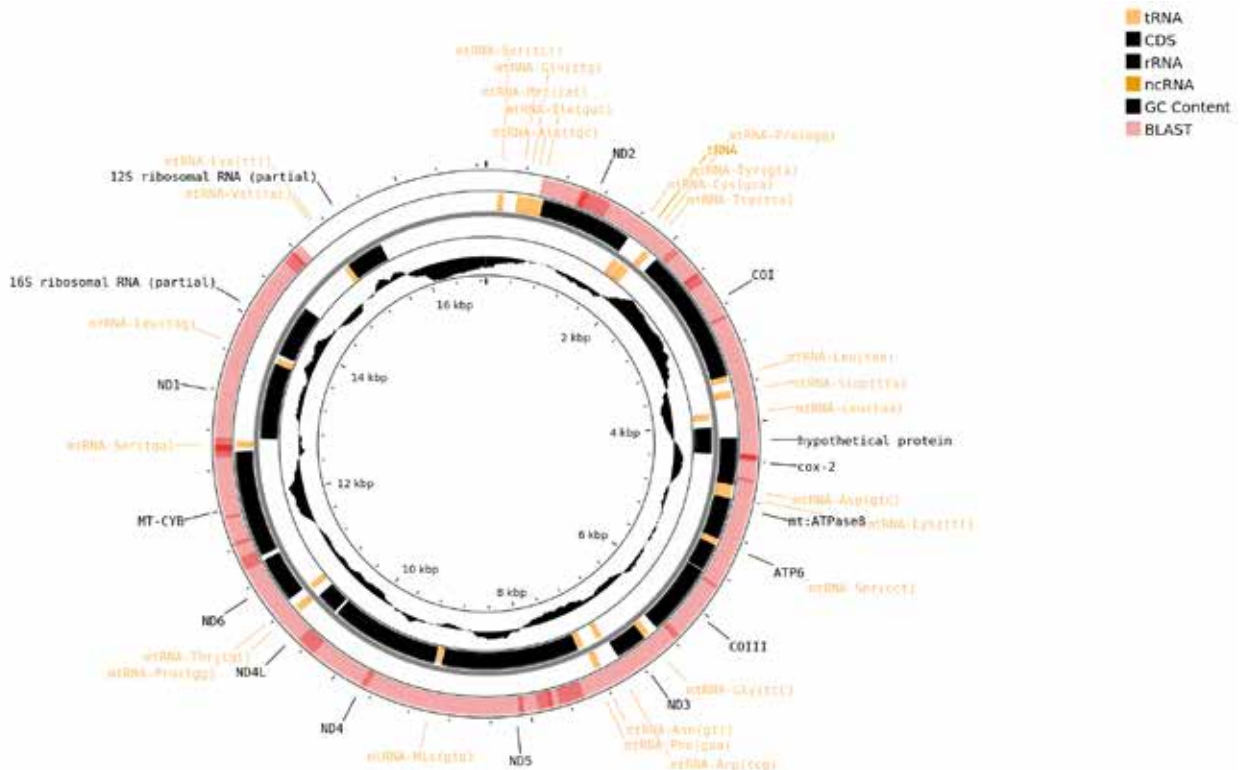


Рис. 4Б. Физические карты полной последовательности референсного образца MN733955.1 — *A. mellifera sinisxinyuan* и исследуемого образца из семьи 37

сти, опубликованные в GenBank, следующих подвидов: *A. m. lamarckii*, *A. m. scutellate*, *A. m. capensis*, *A. m. siciliana*, *A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. carpatica*, *A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*, *A. m. sinisxinyuan*.

В результате секвенирования генома мтДНК нам удалось собрать в среднем 14 115 п. н., в то время как полный митохондриальный геном медоносной пчелы составляет примерно 16 300 п. н. Предварительный анализ данных секвенирования мтДНК показал, что последовательность мтДНК образца из семьи 18 больше сходна с последовательностью мтДНК референсного образца OK075087.1 (*A. mellifera iberiensis*), последовательность мтДНК образца из семьи 37 имеет больший процент сходства с последовательностью мтДНК двух референсных образцов KY926884 (*A. mellifera mellifera*) и MN733955.1 (*A. mellifera sinisxinyuan*). Вполне вероятно, что после повторного секвенирования недостающих участков мтДНК мы сможем однозначно идентифицировать принадлежность изучаемых образцов конкретному подвиду медоносных пчел.

На дендограмме представители подвидов

линий А, С и М четко группируются в отдельные кластеры. Образец *A. mellifera* 9 с митотипом C1 корректно группируется с подвидами *A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. carpatica*. Это так называемые «южные пчелы» эволюционная линия С.

Образцы *A. mellifera* (18) и *A. mellifera* (37) группируются с подвидами *A. m. iberiensis*, *A. m. sinisxinyuan* и *A. m. mellifera*. Данные подвиды принадлежат эволюционной линии М, которая для нас представляет наибольший интерес, т. к. к ней относится аборигенный для Беларуси подвид пчел.

Apis mellifera iberiensis (Engel 1999) встречается на Пиренейском полуострове (Испания и Португалия), а также на некоторых близлежащих островах. Медоносные пчелы этого подвида могут иметь митохондриальные гаплотипы либо африканской (А)-линии, либо западно-средиземноморской и северо-западной европейской (М)-линии, причем медоносные пчелы на юго-западе ее ареала относятся к линии А, а пчелы на северо-востоке — к линии М [24].

В 2016 г. исследователи из Китая обнаружили новую зимостойкую популяцию *A. mellifera*

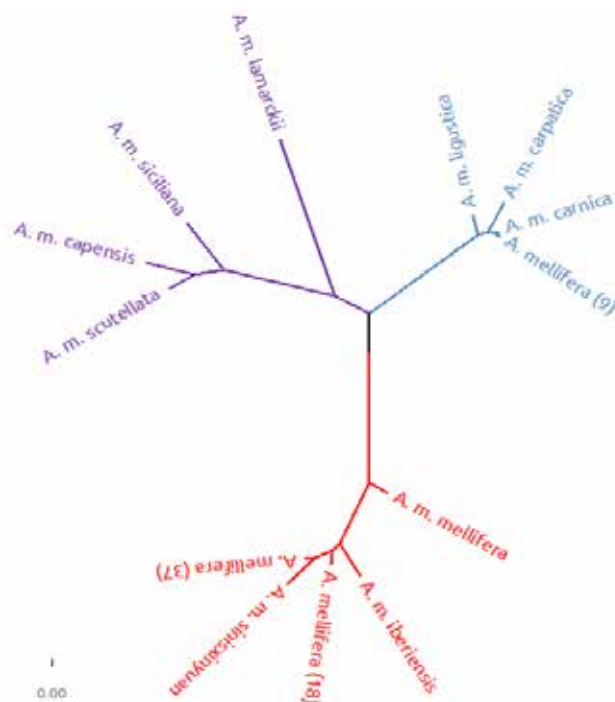


Рис. 5. Филогенетические отношения представителей *A. m. lamarckii*, *A. m. scutellata*, *A. m. capensis*, *A. m. siciliana* (эволюционная линия А); *A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. carpatica* (эволюционная линия С); *A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*, *A. m. sinixinyuan* и исследуемых образцов белорусских популяций (*A. mellifera* (9), *A. mellifera* (18), *A. mellifera* (37)) на основе кластерного анализа полной последовательности мтДНК

в префектуре Синьюань, расположенную в Синьцзян-Уйгурском автономном районе. Подвид был назван *A. m. sinixinyuan* [25]. С применением методов молекулярно-генетического анализа были изучены генетическое разнообразие и эволюционная история данной группы. В итоге *A. m. sinixinyuan* «расширил» эволюционную линию М, к которой ранее относилось только два подвида — *A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*.

Подвид *A. m. mellifera* встречается на острове Корсика, в Великобритании, Ирландии, Южной Швеции, всей Северной и Западной Европе от Пиренеев и Альп до Урала. Предполагается, что на обширной территории Европы существуют экологические группы (эотипы), отличающиеся друг от друга как по генетическим параметрам, так и по поведенческим, физиологическим и морфологическим признакам на уровне ниже подвидового [26]. Несмотря на то, что за последние два века ареал данного

подвида существенно сократился вследствие интенсивных вырубок лесов, интродукции на северные территории южных подвидов пчел, его еще можно встретить в соседних с Беларусью странах — Польше, Литве.

Таким образом, по результатам секвенирования полного генома мтДНК с большой долей вероятности образцы 18 и 37 являются особями темной лесной пчелы. Возможно, что это эотипы подвида *A. m. mellifera* с характерными генетическими особенностями.

Заключение

В настоящее время темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L., один из уникальных подвидов медоносной пчелы, признан исчезающим на территории Европы. Для Беларуси темная лесная пчела является аборигенным подвидом и считается утерянным вследствие повсеместного разведения южных пород пчел. Нами собран биологический материал (рабочие пчелы) в Гомельской и Витебской областях Беларуси и проведен молекулярно-генетический анализ мтДНК. Выполнено секвенирование полных митохондриальных геномов образцов с митотипами М3 и М7. Результаты BLAST-анализа и картирования идентифицировали три ближайших родственных подвида: KY926884 — *A. mellifera mellifera*, OK075087.1 — *A. mellifera iberiensis*, MN733955.1 — *A. mellifera sinixinyuan*. Представленные в статье результаты исследований являются новыми данными о генетике медоносных пчел, обитающих в Республике Беларусь.

Список использованных источников

1. Кривцов, Н. И. Генофонд пчёл *Apis mellifera mellifera* в России / Н. И. Кривцов // Пчеловодство — XXI век. Темная пчела (*Apis mellifera mellifera* L.) в России: материалы междунар. конф., Москва, 19–22 мая 2008 г. / Пищепромиздат, 2008. – С. 22–27.
2. Черевко, Ю. А. Пчеловодство. Приусадебное хозяйство / Ю. А. Черевко, Г. А. Аветисян. – М. : ЮНИОН-паблик, 2002. – 320 с.
3. Ruttner, F. Biogeography and taxonomy of honeybees / F. Ruttner. – Berlin : Springer-Verlag, 1988. – 284 p.
4. Engel, M. S. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*) /

- M. S. Engel // Journal of Hymenoptera Research. – 1999. – Vol. 8. – P. 165–196.
5. Sheppard, W. S. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia / W. S. Sheppard, M. D. Meixner // Apidologie. – 2003. – Vol. 34. – P. 367–376.
6. Cridland, J. M. The complex demographic history and evolutionary origin of the Western honey bee, *Apis mellifera* / J. M. Cridland, N. D. Tsutsui, S. R. Ramirez // Genome Biol. Evol. – 2017. – Vol. 9, iss. 2. – P. 457–472. – DOI: 10.1093/gbe/evx009
7. Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data / M. A. Pinto [et al.] // J. Apic. Res. – 2014. – Vol. 53. – P. 269–278.
8. Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis / A. B. Jensen [et al.] // Conservation Genetics. – 2005. – Vol. 6. – P. 527–537. – DOI: 10.1007/s10592-005-9007-7
9. Native Irish Honey Bee Society. A significant pure population of the dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) remains in Ireland / J. Hassett [et al.] // Journal of Apicultural Research. – 2018. – Vol. 57, iss. 3. – P. 337–350. – DOI: 10.1080/00218839.2018.1433949
10. Шеметков, М. Ф. Советы пчеловоду / М. Ф. Шеметков, В. И. Головнев, М. М. Кочевой. – 3-е изд., перераб. и доп. – Минск : Ураждай, 1991. – 399 с.
11. Прищепчик, О. В. Метисация пчелиных семей на территории Беларуси / О. В. Прищепчик, Н. Г. Козулько. – Вестник Брестского государственного университета. – 2021. – С. 55–62. – (Серия 5: Биология. Химия. Науки о земле; № 1).
12. Генетическая характеристика медоносных пчёл *Apis mellifera* L., разводимых на пасеках Беларуси / Е. В. Гузенко [и др.] // Пчеловодство холодного и умеренного климата: материалы 5-й междунар. науч.-практ. конф. – Москва–Псков, 2021. – С. 48–52.
13. Establishing of Taxonomic Affiliation and Hybridization of Honeybees (*Apis mellifera* L.) in Belarus Using Molecular Genetic Methods / E. Guzenko [et al.] // International Congress on Bee Sciences, 16–18 June 2022. – P. 95.
14. Гузенко, Е. В. Установление таксономической принадлежности и чистопородности пчёл *Apis mellifera* L., разводимых на пасеках Беларуси, с помощью молекулярно-генетических методов / Е. В. Гузенко // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы : материалы V Междунар. науч. конф., Минск, 21–25 нояб. 2022 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А. В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2022. – С. 96.
15. An oligonucleotide primer set for PCR amplification of the complete honey bee mitochondrial genome / M. C. Arias [et al.] // Apidologie. – 2008. – Vol. 39. – P. 475–480. – DOI: 10.1051/apido:2008024
16. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. – Date of access: 23.07.2023.
17. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina Sequence Data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30. – P. 2 114–2 120. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170
18. Using SPAdes De Novo Assembler [Electronic resource] / A. Prjibelski [et al.] // Current protocols in bioinformatics. – 2020. – Vol. 70, iss. 1. – Mode of access: <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>.
19. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes / J. R. Grant [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2023. – Vol. 51, iss. W1. – P. W484–W492. – DOI: 10.1093/nar/gkad326
20. Li, H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data / H. Li // Bioinformatics. – 2011. – Vol. 27, iss. 21. – P. 2 987–2 993.
21. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 / K. Tamura [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2021. – Vol. 38, iss. 7. – P. 3 022–3 027. – DOI: 10.1093/molbev/msab120
22. Crozier, R. H. The cytochrome b and ATPase genes of honeybee mitochondrial DNA / R. H. Crozier, Y. C. Crozier // Mol. Biol. Evol. – 1992. – Vol. 9. – P. 474–482.
23. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial-DNA to study the genetic-structure of *Apis mellifera* L. / L. Garnery

[et al.] // *Experientia*. – 1993. – Vol. 49, iss. 11. – P. 1 016–1 021.

24. The mitochondrial genome of the Spanish honey bee, *Apis mellifera iberiensis* (Insecta: Hymenoptera: Apidae), from Portugal / L. Boardman [et al.] // *Mitochondrial Dna Part B*. – 2020. – Vol. 5, № 1. – P. 17–18. – DOI: 10.1080/23802359.2019.1693920

25. Genomic Analyses Reveal Demographic

History and Temperate Adaptation of the Newly Discovered Honey Bee Subspecies *Apis mellifera sinixinyuan* n. ssp. / Ch. Chen [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2016. – Vol. 33, iss. 5. – P. 1 337–1 348. – DOI: 10.1093/molbev/msw017

26. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding / M. D. Meixner [et al.] // *Journal of Apicultural Research*. – 2010. – Vol. 49, № 1. – P. 85–92.

E. V. Guzenko, A. I. Tsar, M. S. Parfenchyk, O. V. Prischepchik

SEQUENCING THE WHOLE MITOCHONDRIAL GENOME OF HONEY BEES IN BELARUS: THE FIRST EXPERIENCE

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: e.guzenko@igc.by

The Article presents data on the molecular genetic analysis of the mitochondrial DNA of the honey bees collected in Gomel and Vitebsk Regions (Belarus). Analysis of interfamily polymorphism revealed four variants of the COI-COII locus (Q, PQ, PQQ, PQQQ), which suggests a different origin of bee families on the maternal side (evolutionary lines C, M). For Belarus, the samples of the evolutionary line M are of particular interest since this line includes the native subspecies of *A. m. mellifera*. Purebred populations of *A. m. mellifera* are considered a valuable genetic resource since, as a result of natural selection, under the conditions of a weak honey and pollen base as well as an unstable climate, a genotype with adaptive gene variants was formed. For the purpose of accurate identification, the mitochondrial genome sequencing (NGS, Illumina, iSeq 100) of two samples was performed. The mitochondrial DNA of 14,200 bp in length was assembled. According to the results of BLAST analysis, the affiliation of samples to *A. m. mellifera* is 99.62–99.68%; the mapping accuracy: 94.58–94.18%.

Keywords: honey bee, *Apis mellifera* L., *Apis mellifera mellifera*, mtDNA, COI-COII, whole mitochondrial genome sequencing.

Дата поступления в редакцию: 05 сентября 2023 г.

Е. Л. Романишко¹, М. Е. Михайлова¹, Р. И. Шейко¹, Е. С. Гридюшко²

ВЫЯВЛЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *BF*, *LIF*, *NCOA1* С ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫМИ КАЧЕСТВАМИ СВИНЕЙ

¹Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

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

e-mail: lenaramanishko@mail.ru

²ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита»

Республика Беларусь, Минская обл., Смолевичский р-н, а/г Барсуки

Впервые проведено исследование потенциально-значимых полиморфизмов генов *BF* (rs339261793), *NCOA1* (rs335362002, rs697739229) и *LIF* (rs322167972) на выборке свиноматок пород ландрас и йоркшир белорусской селекции. С помощью разработанных методик для идентификации исследуемых полиморфизмов генотипирована выборка свиней ($n = 109$), определены частоты встречаемости аллелей и генотипов. Показано, что количество рожденных и рожденных живых поросят от свиноматок с генотипом *LIF^{BB}* породы ландрас превосходило на 1,0 гол. животных с генотипом *LIF^{AA}* ($p < 0,05$). Масса гнезда при рождении была достоверно выше у животных породы ландрас с генотипом *LIF^{BB/BB}* по сравнению с животными с генотипом *LIF^{AA}* на 0,9 кг ($p = 0,017$). Животные с генотипом *LIF^{AA/AB}* достоверно превосходили животных с генотипом *LIF^{BB}* по живой массе гнезда в 21 день на 3,685 кг ($p = 0,018$). У животных породы йоркшир была отмечена сходная тенденция, однако различия не были статистически значимыми. Показана тенденция, что живая масса гнезда в 21 день была выше у животных породы ландрас с генотипом *BF^{BB}* по сравнению с животными с генотипом *BF^{AA/AB}* на 2,28 кг ($p = 0,054$).

Ключевые слова: ДНК-тестирование, локусы количественных признаков (QTLs), репродуктивные качества, SNP, *BF*, *NCOA1*, *LIF*, свиноводство.

Введение

Эффективность отрасли свиноводства связана с организацией воспроизводства поголовья животных в сельскохозяйственных предприятиях. Важнейшим показателем продуктивности свиноматок являются их репродуктивные качества [1]. Воспроизводительные или репродуктивные признаки животных зависят как от наследственных, так и ненаследственных факторов. К числу первых относят генотип особи, а вторых — условия кормления, содержания и ухода. Правильное сочетание этих факторов и позволит обеспечить максимальный выход продукции [2]. Совместное применение традиционных методов селекции и современных молекулярно-генетических методов в свиноводстве позволяет проводить оценку животных не только по фенотипическим признакам, но и по генотипу. Поэтому выявление генетических маркеров, контролирующих репродуктивные

признаки свиноматок, в том числе и генных сочетаний, ассоциированных с повышенной вероятностью развития у животных желательного фенотипа, является одной из важных задач ученых селекционеров в свиноводстве.

В этой связи разработка молекулярно-генетических методов для ДНК-диагностики репродуктивных качеств свиноматки домашней (*Sus scrofa*) является актуальной задачей. Данные методы предоставляют возможность отбирать и тестировать ремонтных свинок и хряков в раннем возрасте, отбирать для разведения животных с желательными генотипами по комплексу генов, детерминирующих воспроизводительные качества, что обеспечит получение отобранного поголовья для повышения их плодовитости. В настоящее время для свиней известен целый ряд генов-маркеров, представляющих интерес для селекции на воспроизводительные качества: ген фактора комплемента

В (*BF*), ген коактиватора ядерных рецепторов 1 (*NCOA1*), ген лейкемия-ингибирующего фактора (*LIF*).

Ген фактора комплемента В (*BF*) кодирует белок пропердин, который играет неотъемлемую роль в росте эпителия матки и обнаружен в области QTL (локусы количественных признаков) с другими генами, связанными со специфическими репродуктивными признаками. Ген *BF* у свиней локализован на 7-й хромосоме. Присутствие фактора комплемента В в эндометрии матки регулируется гормонально и требует наличия как эстрогена, так и прогестерона.

Исследование L. A. Nasty и соавторов указывает на то, что функционально активная система комплемента присутствует во время имплантации эмбриона на ранних сроках беременности [3]. Ряд исследователей: В. Buske с соавторами, Agnes Hunyadi-Bagi с соавторами и А. Marantidis с соавторами, считают, что ген *BF* влияет на репродуктивные признаки у свиней, а именно на общее число рожденных поросят и количество рожденных живых поросят в гнезде [4–6]. Исследования, проведенные А. Marantidis с соавторами на коммерческих греческих линиях свиней, показали, что свиньи с генотипом АВ давали статистически значимое меньшее число рожденных поросят, чем свиноматки с генотипом ВВ [4].

Ген коактиватора ядерных рецепторов 1 (*NCOA1*) кодирует белок NCOA1, который стимулирует транскрипционную активность эстрогеновых рецепторов генов, экспрессирующих стероидные половые гормоны самок. Ген *NCOA1* локализован на 3-й хромосоме. Исследуемые полиморфизмы rs335362002 и rs697739229 локализованы в 11 экзоне. Согласно литературным данным, свиноматки породы йоркшир канадской селекции с генотипом А1А1 превосходили животных с гетерозиготным генотипом как по числу поросят при рождении (+1,00 поросенка на опорос), так и по числу живых поросят (+1,32 поросенка на опорос). Свиноматки крупной белой породы с генотипами А1А1 и А1А2 достоверно превосходили по числу поросят при рождении животных с генотипом А2А2 соответственно на 2,37 и 2,50 поросенка на опорос, а по числу живых поросят — соответственно на 2,01 и 2,25 поросенка на опорос [7]. В иссле-

довании Melville с соавторами показано, что у свиноматок с генотипом А1А1 рождалось большее количество живых поросят по сравнению с генотипом А2А2 [8].

Ген лейкемия-ингибирующего фактора (*LIF*) кодирует цитокин, связывание которого со своим специфическим рецептором в клетках эндометрия приводит к активации сигнальных путей, что оказывает влияние на синтез других белковых маркеров в слизистой оболочке матки, что, в целом, повышает рецептивность эндометрия [9–11]. Благодаря своим функциям в регулировании воспроизводительных показателей ген *LIF* рассматривается как ген-кандидат для повышения плодовитости у многих видов млекопитающих, включая свиней [12–14]. *LIF* оказывает влияние на выживаемость клетки, что имеет особенное значение в процессе имплантации эмбриона. Цитокин регулирует репродуктивные функции начиная от развития половых гамет и вплоть до процесса оплодотворения. Ген *LIF* локализован на 14-й хромосоме, состоит из пяти экзонов, три из которых — альтернативные [15]. Исследуемый полиморфизм (rs322167972 А/Г) локализован в 3-ем экзоне. Выявленные полиморфные варианты гена *LIF* исследователи обозначили как А и В аллели или Т и С аллели.

Согласно исследованию Y. G. Liu с соавторами установлено, что свиньи породы ландрас генотипа *LIF^{AB}* достоверно превосходят своих аналогов с генотипом АА и ВВ по среднесуточному приросту на 77,9 г ($p < 0,05$).

Napierala с соавторами (2014 г.) показали, что в выборке польских ландрасов у свиноматок с генотипами ТТ и ТС локуса гена *LIF* родилось живыми больше поросят по сравнению со свиноматками СС генотипа. Во втором опоросе и после четвертого эта тенденция сохранялась, но различия не были статистически значимыми. В среднем свиноматки СС рожали на 1,38 меньше живых поросят и на 1,11 больше мертвых поросят на опорос, чем свиноматки с генотипом ТТ, однако различия статистически не достоверны [16].

Результаты Spötter с соавторами (2005 г.), проведенные на помесной немецкой линии, показали положительное влияние рецессивного аллеля С на число живорожденных поросят. Последующие исследования Spötter и др. (2009 г.), которые включали два больших

стада крупной белой породы и породы ландрас, показали, что гетерозиготные свиноматки обеих пород имели наибольшее количество живорожденных поросят в первом помете. Тем не менее при анализе расширенной выборки выявлено большее количество живых поросят, рожденных от свиноматок с генотипом ТТ. Объединенный анализ всех пометов свиноматок немецкой крупной белой породы показал, что у свиноматок с аллелем Т было в среднем на 0,94 поросенка больше, чем у свиноматок *LIF^{CC}* гена. В породе немецкий ландрас в среднем свиноматки ТТ родили на 0,22 поросенка больше по сравнению со свиноматками СС [17].

Исследования, проведенные Mucha с соавторами (2013 г.) на поросятах польской крупной белой породы и породы ландрас, показали, что свиноматки с генотипом ТТ рожали значительно ($P < 0,01$ и $P < 0,05$ соответственно) больше живых поросят в первом опоросе по сравнению со свиноматками генотипов СС и ТС [18]. Таким образом, результаты Spötter с соавторами (2009 г.) и Mucha с соавторами (2013 г.) показывают положительное влияние аллеля Т на количество живых поросят в опоросе.

Гетманцева Л. В. (2014 г.) на популяциях различных пород свиней, разводимых в России, показала, что свиноматки генотипа *LIF^{AA}* по сравнению с генотипом *LIF^{BB}* достоверно отличаются лучшими показателями по количеству поросят при рождении и многоплодию на 1,6 и 1,7 поросенка ($p < 0,05$) соответственно. Свиноматки генотипа *LIF^{AB}* имеют промежуточные значения, что является свидетельством того, что концентрация «желательного» аллеля А в генотипе животных способствует повышению многоплодия [19].

Поэтому целью нашего исследования было изучение потенциально-значимых локусов генов *BF* (rs339261793), *NCOA1* (rs335362002, rs697739229) и *LIF* (rs322167972) и выявление предпочтительных аллельных вариантов исследуемых генов, ассоциированных с репродуктивными качествами свиноматок пород ландрас и йоркшир.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были использованы свиноматки пород ландрас и йоркшир белорусской селекции ($n = 109$ го-

лов). Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из биологического материала — проб ткани (ушной выщип). Биологический материал свиней и данные по опоросам свиноматок пород ландрас и йоркшир представлены РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». Выделение ДНК проводили набором реагентов «Нуклеосорб» («Праймтех», Беларусь). Количество выделенной ДНК определяли с помощью флуориметра DeNovix DS 11. Проведен поиск генетических маркеров, влияющих на репродуктивные качества свиноматок. Анализ последовательности исследуемых генов проводили с помощью базы данных Ensembl и NSBI в форматах FASTA. В результате этого сформирована панель потенциально-значимых полиморфизмов генов, ассоциированных с репродуктивными качествами свиноматок. Подобраны оптимальные методики с использованием ПЦР-ПДРФ метода и секвенирования по Сэнгеру для валидации метода и ДНК-идентификации экономически значимых полиморфизмов в локусах генов *BF*, *NCOA1* и *LIF*, включенных в разработанную панель (табл. 1).

ПЦР–ПДРФ (полимеразная цепная реакция–полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)

ПЦР проводили на приборе C1000 (Bio-Rad, США).

Для получения специфичного фрагмента гена *BF* использовали следующие праймеры F: АСТГСТАТGACGGTTACACTCTCCG и R: ТССААGAGCCACCTTCCTGG. [4]. Реакционная смесь для ПЦР в 20 мкл содержала: 10 × ПЦР буфер, 1–1,2 ед. Taq-полимеразы, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, по 0,3–0,5 μM каждого праймера, MQ–H₂O и по 10 нг геномной ДНК для каждого образца. Программа амплификации: 94 °C — 5 мин; 94 °C — 30 сек, 60 °C — 30 сек, 72 °C — 40 сек, (35 циклов) 72 °C — 1 мин.

Для анализа рестрикционных фрагментов использовали 1 ед. SmaI. Определение аллельных вариантов гена *BF* осуществляли с помощью электрофореза в 2,5%-ом агарозном геле (SeaKem LE Agarose, «Lonsa») с интеркалирующим красителем ZUBR Green-1 («Праймтех», Беларусь). Анализ результатов проводили относительно маркера молеку-

Таблица 1

Панель локусов генов, ассоциированных с репродуктивными качествами свиноматок

Наименование гена	Позиция в хромосоме	Полиморфизм	Локация в референсной последовательности	Тип мутации
Фактор комплемента В (<i>BF</i>)	Ch 7:24035584	rs339261793	NC_010449.5:g.24035584A > G ENSSSCT00000036375.4:c.742 + 58A > G	A > G
Коактиватор ядерных рецепторов 1 (<i>NCOA1</i>)	Ch 3:114052819	rs335362002, rs697739229	NC_010445.4:g.114052819A > G ENSSSCT00000039793.3:c.1972T > C NC_010445.4:g.114052820T > G ENSSSCT00000039793.3:c.1971A > C	T > C (Leu658=) A > C (Val657=)
Лейкемия-ингибирующий фактор (<i>LIF</i>)	Ch 14:47224772	rs322167972	NC_010456.5:g.47224772A > G ENSSSCT00000044908.2:c.*24T > C	T > C

лярных масс SM1233 DNA Ladder («Thermo scientific», EU) и контрольных образцов. Анализ и учет полученных результатов ПЦР фрагментов генов осуществляли с помощью системы гель-документирования Quantum ST4 (рис. 1).

Специфичность ПЦР-продуктов исследуемых локусов генов подтверждена с помощью

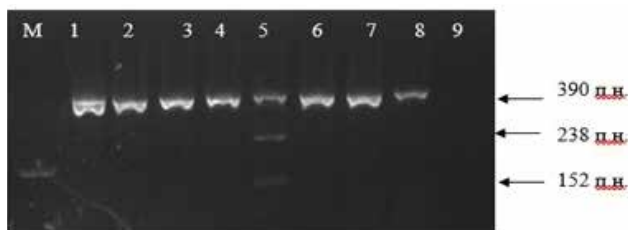


Рис. 1. Электрофореграмма рестриционных фрагментов анализируемого локуса гена *BF*: М — маркер молекулярной длины, DNA Ladder SM1223 («Thermo scientific», EU); 9 — отрицательный контрольный образец (ОКО); 1 — положительный контрольный образец (ПКО); 2–4, 6–8 — генотип ВВ, длина рестриционного фрагмента 390 п. н., 5 — генотип АВ, длина рестриционных фрагментов 390, 238, 152 п. н.

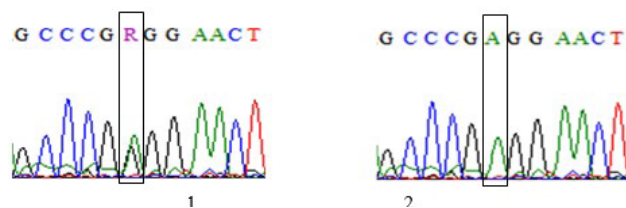


Рис. 2. Результаты секвенирования исследуемого локуса гена *BF* (rs339261793): 1 — образец с гетерозиготным генотипом АВ, 2 — образец с гомозиготным генотипом ВВ

секвенирования по Сэнгеру (рис. 2).

Для получения специфичного фрагмента гена *NCOA1* использовали следующие праймеры F: CGTCAGTGAGCTATGAGAGGAG и R: GACTCTCAGATGGGGACAATAAATA. Дизайн праймеров для получения специфичных фрагментов гена *NCOA1* длиной 200 п. н. осуществлялся с помощью программы Primer 3. Анализ последовательности исследуемых генов проводили с помощью Ensembl в форматах FASTA. Реакционная смесь для ПЦР в 20 мкл содержала: 10 × ПЦР буфер, 1–1,2 ед. Taq-полимеразы, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, по 0,3–0,5 μM каждого праймера, MQ-H₂O и по 10 нг геномной ДНК для каждого образца. Программа амплификации: 94 °C — 5 мин; 94 °C — 30 сек, 59 °C — 30 сек, 72 °C — 40 сек, (35 циклов) 72 °C — 1 мин. Для анализа рестриционных фрагментов использовали 1 ед. RsaI. Определение аллельных вариантов гена *NCOA1* осуществляли с помощью электрофореза в 2,5%-ом агарозном геле (рис. 3).

Для получения специфичного фрагмента гена *LIF* использовали следующие праймеры F: GTCTCCCAGAACAAGGGATG и R: CGCCTGTGCAACAAGTACC. Дизайн праймеров для получения специфичных фрагментов гена *LIF* длиной 382 п. н. осуществлялся с помощью программы Primer 3. Анализ последовательности исследуемых генов проводили с помощью Ensembl в форматах FASTA. Реакционная смесь для ПЦР в 20 мкл содержала: 10 × ПЦР буфер, 1–1,2 ед.

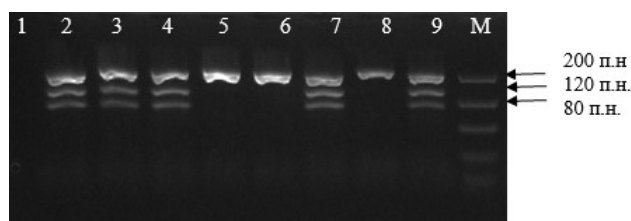


Рис. 3. Электрофореграмма рестриционных фрагментов анализируемого локуса гена *NCOA1*: М — маркер молекулярной длины, DNA Ladder SM1223 («Thermo scientific», EU); 1 — отрицательный контрольный образец (ОКО); 2–4, 7 — генотип А1А2, длина рестриционного фрагмента 200, 120, 80 п. н.; 5, 6, 8 — генотип А2А2, длина рестриционного фрагмента 200 п. н.; 9 — положительный контрольный образец (ПКО)

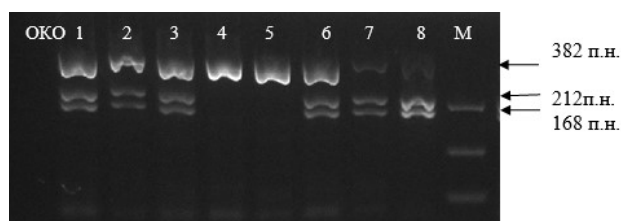


Рис. 4. Электрофореграмма рестриционных фрагментов анализируемого локуса гена *LIF*: М — маркер молекулярной длины, DNA Ladder SM1223 («Thermo scientific», EU); OKO — отрицательный контрольный образец; 1 — положительный контрольный образец (ПКО); 2–3, 6 — генотип АВ, длина рестриционного фрагмента 382, 212, 168 п. н.; 4, 5 — генотип АА, длина рестриционных фрагментов 382 п. н.; 7, 8 — генотип ВВ, длина рестриционных фрагментов 212, 168 п. н.

Тaq-полимеразы, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, по 0,3–0,5 μM каждого праймера, MQ-H₂O и по 10 нг геномной ДНК для каждого образца. Программа амплификации: 94 °C — 5 мин; 94 °C — 30 сек, 60 °C — 30 сек, 72 °C — 40 сек, 72 °C — 40 сек, 72 °C — 1 мин (35 циклов). Для анализа рестриционных фрагментов использовали 1 ед. *AdeI*. Определение аллельных вариантов гена *NCOA1* осуществляли с помощью электрофореза в 2%-ом агарозном геле (рис. 4).

Специфичность ПЦР-продуктов с использованием подобранных олигонуклеотидных праймеров была подтверждена секвенированием по Сэнгеру (рис. 5).

Секвенирование по Сэнгеру

Специфичные ПЦР-продукты контрольных образцов изучаемых локусов генов вырезали из геля и очищали с помощью набора реагентов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («Thermo scientific», Литва). Для постановки секвенирующей ПЦР использовали Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Секвенирующую ПЦР проводить соглас-

но следующим условиям: 96 °C — 1 мин; 25 циклов: 96 °C — 10 сек, 50 °C — 5 сек, 60 °C — 4 мин; 16 °C — 5 мин. ПЦР-продукты после секвенирующей ПЦР очищали от непрореагировавших флуоресцентно меченых терминаторных нуклеотидов переосаждением этанолом/ Na₂ЭДТА. Определение нуклеотидной последовательности проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Генотипирование референтных образцов показало полное совпадение результатов, полученных посредством секвенирования по Сэнгеру и с использованием разработанных методов.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и SPSS v.20.0 (IBM, США). Количественные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение ($\bar{x} \pm SD$). Уровень статистической значимости *p* при множественных сравнениях вычислялся экспериментально для каждого

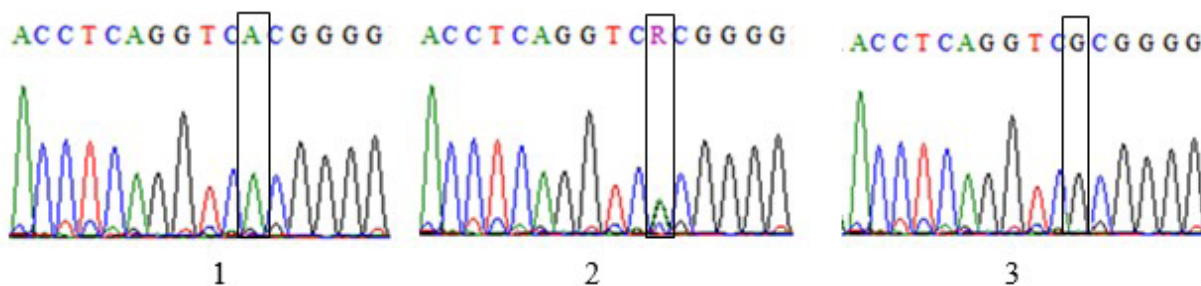


Рис. 5. Результаты секвенирования исследуемого локуса гена *LIF* (rs322167972): 1 — образец с гомозиготным генотипом ВВ, 2 — гетерозиготным генотипом ВА, 3 — образец с гомозиготным генотипом АА

конкретного случая (сравнения) в процессе моделирования в пакете SPSS v.20. Использовали точный критерий Фишера, основанный на пермутации (permutation) — уровень p вычисляется по формулам комбинаторной теории вероятностей.

Для сравнения количественных данных после проверки на гомоскедастичность (тест Левена, Levene test) и нормальность распределения (критерий согласия Колмогорова) использовали метод дисперсионного анализа — ANOVA (англ. ANalysis Of VAriance). В случае обнаружения статистически значимых различий при проверке на гомоскедастичность и нормальность распределения

использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллеса.

Результаты и обсуждение

С помощью разработанных методов было проведено молекулярно-генетическое тестирование выборок свиноматок ($n = 109$) пород йоркшир ($n = 33$), ландрас ($n = 76$) (табл. 2) по локусам генов *BF* (rs339261793), *NCOA1* (rs335362002, rs697739229) и *A > G* гена *LIF* (rs322167972) (табл. 2).

Проведен анализ ассоциаций воспроизводительных качеств свиной породы ландрас и йоркшир с аллельными вариантами генов *LIF*, *BF*, *NCOA1* (табл. 3–5).

Таблица 2

Частота встречаемости аллелей и генотипов локусов генов *BF*, *LIF* и *NCOA1* выборок свиной

Ген	Порода	N	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
			n / A1A1	n / A2A1	n / A2A2	A1	A2
Коактиватор ядерных рецепторов 1 (<i>NCOA1</i>)	Ландрас	70	–	17 / 24,3	53 / 75,7	0,121 ± 0,028	0,879 ± 0,028
	Йоркшир	33	1 / 3,0	4 / 12,1	28 / 84,8	0,091 ± 0,035	0,909 ± 0,035
			n / AA	n / AB	n / BB	A	B
Лейкемия-ингибирующий фактора (<i>LIF</i>)	Ландрас	76	21 / 27,6	40 / 52,6	15 / 19,7	0,539 ± 0,040	0,461 ± 0,040
	Йоркшир	33	5 / 15,2	13 / 39,4	15 / 45,5	0,348 ± 0,059	0,652 ± 0,059
			n / AA	n / AB	n / BB	A	B
Фактора комплемента В (<i>BF</i>)	Ландрас	69	6 / 8,7	28 / 40,6	35 / 50,7	0,290 ± 0,039	0,710 ± 0,039
	Йоркшир	33	1 / 3,0	7 / 21,2	25 / 75,8	0,136 ± 0,042	0,864 ± 0,042

Таблица 3

Анализ аллельных вариантов гена *LIF* и воспроизводительных качеств свиноматок

Воспроизводительные качества свиноматок	Генотипы (ландрас)			Генотипы (йоркшир)		
	<i>LIF^{AA}</i>	<i>LIF^{AB}</i>	<i>LIF^{BB}</i>	<i>LIF^{AA}</i>	<i>LIF^{AB}</i>	<i>LIF^{BB}</i>
Количество маток, гол.	12	25	7	3	9	5
Количество опоросов	18	56	34	6	28	17
Количество рожденных порсят, гол.	10,9 ± 0,39*	11,9 ± 0,19	11,9 ± 0,41	11 ± 1,32	12,52 ± 0,34	10,92 ± 1,06

Окончание таблицы 3

Воспроизводительные качества свиноматок	Генотипы (ландрас)			Генотипы (йоркшир)		
	<i>LIF^{AA}</i>	<i>LIF^{AB}</i>	<i>LIF^{BB}</i>	<i>LIF^{AA}</i>	<i>LIF^{AB}</i>	<i>LIF^{BB}</i>
Количество живых поросят (многоплодие), гол.	10,8 ± 0,46*	11,9 ± 0,19	11,9 ± 0,41	11 ± 1,32	12,46 ± 0,36	10,92 ± 1,06
Масса гнезда при рождении, кг	11,7 ± 0,42*	12,7 ± 0,19	12,5 ± 0,35	11,5 ± 1,32	13,18 ± 0,37	11,66 ± 1,02
Масса поросенка при рождении (крупноплодность), кг	1,09 ± 0,01*	1,06 ± 0,005	1,06 ± 0,01	1,05 ± 0,005	1,06 ± 0,01	1,07 ± 0,02
Количество поросят в 21 день (после выравнивания гнезда), гол.	13,0 ± 0,28	13,33 ± 0,21	12,53 ± 0,34	12,5 ± 0,5	12,32 ± 0,35	11,94 ± 0,44
Живая масса гнезда в 21 день (условная молочность), кг	62,4 ± 0,83	63,1 ± 0,78	59,2 ± 1,60*	61 ± 2,25	59,49 ± 1,83	57,56 ± 1,87
Средняя масса 1 головы в 21 день, кг	4,80 ± 0,06	4,74 ± 0,03	4,73 ± 0,06	4,88 ± 0,02	4,83 ± 0,07	4,82 ± 0,05
Количество поросят при отъеме, гол.	12,67 ± 0,39	12,95 ± 0,28	12,0 ± 0,50	12,17 ± 0,44	12,24 ± 0,3	11,6 ± 0,37
Масса гнезда при отъеме в 35 дней, кг	94,84 ± 3,39	91,39 ± 1,75	87,54 ± 2,2	82,07 ± 6,82	91,4 ± 2,50	85,46 ± 4,39
Средняя масса 1 головы при отъеме, кг	7,50 ± 0,19	7,08 ± 0,10	7,34 ± 0,20	6,73 ± 0,37	7,49 ± 0,23	7,36 ± 0,19
Сохранность поросят, %	97,27 ± 1,55	97,01 ± 1,11	95,5 ± 2,26	97,43 ± 2,56	99,40 ± 0,43	97,28 ± 1,68

Примечание. * — уровень значимости (p < 0,05)

Таблица 4

Анализ аллельных вариантов гена *BF* и воспроизводительных качеств свиноматок

Воспроизводительные качества свиноматок	Генотипы (ландрас)			Генотипы (йоркшир)		
	<i>BF^{AA}</i>	<i>BF^{AB}</i>	<i>BF^{BB}</i>	<i>BF^{AA}</i>	<i>BF^{AB}</i>	<i>BF^{BB}</i>
Количество маток, гол.	6	15	22	—	6	11
Количество опоросов	13	42	52	—	14	37
Количество рожденных поросят, гол.	11,58 ± 0,44	11,85 ± 0,29	11,40 ± 0,28	—	11,75 ± 0,78	11,8 ± 0,55
Количество живых поросят (многоплодие), гол.	11,58 ± 0,44	11,85 ± 0,29	11,37 ± 0,31	—	11,72 ± 0,76	11,76 ± 0,56
Масса гнезда при рождении, кг	12,47 ± 0,38	12,62 ± 0,27	12,22 ± 0,29	—	12,48 ± 0,82	12,41 ± 0,53
Масса поросенка при рождении (крупноплодность), кг	1,08 ± 0,01	1,07 ± 0,01	1,08 ± 0,01	—	1,07 ± 0,01	1,06 ± 0,01

Окончание таблицы 4

Воспроизводительные качества свиноматок	Генотипы (ландрас)			Генотипы (йоркшир)		
	<i>BF^{AA}</i>	<i>BF^{AB}</i>	<i>BF^{BB}</i>	<i>BF^{AA}</i>	<i>BF^{AB}</i>	<i>BF^{BB}</i>
Количество поросят в 21 день (после выравнивания гнезда), гол.	13,38 ± 0,53	12,84 ± 0,25	13,28 ± 0,20	–	11,75 ± 0,38	12,51 ± 0,27
Живая масса гнезда в 21 день (условная молочность), кг	61,97 ± 1,42	60,93 ± 1,05	63,50 ± 0,78**	–	57,8 ± 1,42	59,95 ± 1,62
Средняя масса 1 головы в 21 день, кг	4,65 ± 0,09**	4,75 ± 0,04	4,79 ± 0,04	–	4,93 ± 0,04**	4,79 ± 0,48**
Количество поросят при отъеме, гол.	13,0 ± 0,76	12,35 ± 0,32	12,93 ± 0,29	–	11,55 ± 0,24	12,3 ± 0,29
Масса гнезда при отъеме в 35 дней, кг	91,67 ± 3,64	89,73 ± 2,13	93,59 ± 2,23	–	84,45 ± 4,65	89,95 ± 2,32
Средняя масса 1 головы при отъеме, кг	7,13 ± 0,31	7,3 ± 0,17	7,25 ± 0,12	–	7,33 ± 0,36	7,32 ± 0,17
Сохранность поросят, %	96,83 ± 2,73	96,07 ± 1,24	97,26 ± 1,25	–	98,48 ± 1,21	98,40 ± 0,87

Примечание. ** — уровень значимости ($p < 0,1$)

Таблица 5

Анализ аллельных вариантов гена *NCOAI* и воспроизводительных качеств свиноматок

Воспроизводительные качества свиноматок	Генотипы (ландрас)			Генотипы (йоркшир)		
	<i>NCOAI^{A1A1}</i>	<i>NCOAI^{A2A1}</i>	<i>NCOAI^{A2A2}</i>	<i>NCOAI^{A1A1}</i>	<i>NCOAI^{A2A1}</i>	<i>NCOAI^{A2A2}</i>
Количество маток, гол.	–	15	29	–	2	14
Количество опоросов	–	29	79	–	5	46
Количество рожденных поросят, гол.	–	11,31 ± 0,37	11,74 ± 0,19	–	12,9 ± 0,6	11,63 ± 0,48
Количество живых поросят (многоплодие), гол.	–	11,25 ± 0,42	11,74 ± 0,19	–	12,9 ± 0,6	11,59 ± 0,48
Масса гнезда при рождении, кг	–	12,09 ± 0,39	12,54 ± 0,18	–	13,5 ± 0,5	12,29 ± 0,48
Масса поросенка при рождении (крупноплодность), кг	–	1,08 ± 0,01	1,07 ± 0,01	–	1,05 ± 0,01	1,06 ± 0,01
Количество поросят в 21 день (после выравнивания гнезда), гол.	–	13,3 ± 0,24	13,0 ± 0,19	–	12,25 ± 1,25	12,24 ± 0,24
Живая масса гнезда в 21 день (условная молочность), кг	–	63,17 ± 0,69	61,8 ± 0,81	–	57,6 ± 9,1	59,4 ± 0,96
Средняя масса 1 головы в 21 день, кг	–	4,76 ± 0,05	4,76 ± 0,03	–	4,68 ± 0,27	4,86 ± 0,03

Окончание таблицы 5

Воспроизводительные качества свиноматок	Генотипы (ландрас)			Генотипы (йоркшир)		
	<i>NCOAI^{A1A1}</i>	<i>NCOAI^{A2A1}</i>	<i>NCOAI^{A2A2}</i>	<i>NCOAI^{A1A1}</i>	<i>NCOAI^{A2A1}</i>	<i>NCOAI^{A2A2}</i>
Количество поросят при отъеме, гол.	–	13,13 ± 0,26	12,49 ± 0,28	–	12,3 ± 1,25	12,01 ± 0,22
Масса гнезда при отъеме в 35 дней, кг	–	93,39 ± 3,16	90,84 ± 1,41	–	81,8 ± 1,5	88,83 ± 2,45
Средняя масса 1 головы при отъеме, кг	–	7,1 ± 0,14	7,32 ± 0,11	–	6,75 ± 0,85	7,4 ± 0,15
Сохранность поросят, %	–	98,75 ± 0,69	95,84 ± 1,18	–	100	98,22 ± 0,76

Анализ воспроизводительных качеств свиной показал, что наши данные согласуются с данными Spötter с соавторами [17], которые показали, что у свиноматок с генотипом *LIF^{BB}* рождается в среднем больше живых поросят. В нашем исследовании показано, что количество рожденных и рожденных живых поросят от свиноматок с генотипом *LIF^{BB}* породы ландрас превосходило на 1,0 гол. животных с генотипом *LIF^{AA}* ($p = 0,043$ и $p = 0,038$) соответственно. Масса гнезда при рождении была достоверно выше у животных породы ландрас с генотипом *LIF^{AB/BB}* по сравнению с живот-

ными с генотипом *LIF^{AA}* на 0,9 кг (табл. 6) ($p = 0,017$). Крупноплодность была достоверно выше у животных с генотипом *LIF^{AA}* (ландрас) на 20 г, в сравнении с животными с генотипом *LIF^{AB/BB}* ($p = 0,039$). Животные с генотипом *LIF^{AA/AB}* достоверно превосходили животных с генотипом *LIF^{BB}* по живой массе гнезда в 21 день на 3,7 кг (табл. 6) ($p = 0,018$). Однако животные породы йоркшир с генотипом *LIF^{AA}* превосходили животных с генотипом *LIF^{BB}* по живой массе гнезда в 21 день, на 3,44 кг ($p = 0,623$), однако выявленные различия были не достоверными, возможно, в следствии

Таблица 6

Статистический анализ взаимосвязи некоторых хозяйственно-полезных признаков и генотипов анализируемых локусов генов *LIF* и *BF*

Полиморфизм (ген), rs	Генотип	Среднее значение	Стандартное отклонение	Значение F	p (для F)	p (тест Левена)
14:g.47224772A > G (<i>LIF</i>), rs322167972	Количество рожденных поросят, гол. (ландрас)					
	AA	10,9	1,38	3,407	0,043	0,605
	AB	11,9	1,00			
	BB	11,9	1,08			
	AA	10,9	1,38	6,978	0,012	0,314
	AB/BB	11,9	1,00			
	BB	11,9	1,08	0,393	0,534	0,576
	AA/AB	11,5	1,21			
	Количество живых поросят, гол. (ландрас)					
	AA	10,8	1,59	3,546	0,038	0,413
AB	11,9	1,00				
BB	11,9	1,08				

Продолжение таблицы 6

Полиморфизм (ген), rs	Генотип	Среднее значение	Стандартное отклонение	Значение F	p (для F)	p (тест Левена)	
14:g.47224772A > G (LIF), rs322167972	AA	10,8	1,59	7,264	0,010	0,181	
	AB/BB	11,9	0,10				
	BB	11,9	1,08	0,409	0,526	0,560	
	AA/AB	11,5	1,30				
	Масса гнезда при рождении, кг. (ландрас)						
	AA	11,7	1,45	3,095	0,056	0,551	
	AB	12,7	0,97				
	BB	12,5	0,93				
	AA	11,7	1,45	6,176	0,017	0,300	
	AB/BB	12,6	0,95				
	BB	12,5	0,93	0,076	0,784	0,476	
	AA/AB	12,4	1,22				
	Масса поросенка при рождении, кг. (ландрас)						
	AA	1,09	0,04	2,710	0,078	0,523	
	AB	1,07	0,03				
	BB	1,06	0,04				
	AA	1,09	0,04	4,517	0,039	0,872	
	AB/BB	1,07	0,03				
	BB	1,06	0,04	2,098	0,155	0,398	
	AA/AB	1,08	0,03				
	Живая масса гнезда в 21 день, гол. (ландрас)						
	AA	62,37	2,89	3,153	0,054	0,471	
	AB	63,13	3,82				
	BB	59,17	4,25				
	AA	62,37	2,88	0,009	0,923	0,46	
	AB/BB	62,24	4,20				
	BB	59,19	4,25	6,054	0,018	0,908	
	AA/AB	62,88	3,51				
	Живая масса гнезда в 21 день, гол. (йоркшир)						
	AA	61,00	3,91	0,489	0,623	0,715	
AB	59,49	5,50					
BB	57,56	4,18					
AA	61,00	3,91	0,507	0,488	0,575		
AB/BB	58,80	4,99					
BB	57,56	4,18	0,811	0,382	0,504		
AA/AB	59,87	5,02					

Окончание таблицы 6

Полиморфизм (ген), rs	Генотип	Среднее значение	Стандартное отклонение	Значение F	p (для F)	p (тест Левена)
7:g.24035584A > G (BF), rs339261793	Средняя масса одной головы в 21 день, гол. (йоркшир)					
	AB	4,92	0,12	3,475	0,082	0,763
	BB	4,78	0,15			
	Живая масса гнезда в 21 день, гол. (ландрас)					
	AA	61,97	3,49	2,108	0,135	0,779
	AB	60,93	4,08			
	BB	63,51	3,55			
	AA	61,97	3,49	0,074	0,787	0,985
	AB/BB	62,43	3,94			
	BB	63,51	3,55	3,955	0,054	0,489
	AA/AB	61,23	3,86			
	Средняя масса одной головы в 21 день, гол. (ландрас)					
	AA	4,63	0,23	1,535	0,228	0,765
	AB	4,75	0,18			
	BB	4,79	0,18			
	AA	4,63	0,23	2,864	0,098	0,483
	AB/BB	4,77	0,18			
	BB	4,79	0,18	1,298	0,261	0,547
	AA/AB	4,72	0,20			

небольшой выборки животных.

Анализ воспроизводительных качеств свиной показал, что наши данные противопоставляются данным A. Marantidis с соавторами [4], которые показали, что у свиноматок с генотипом BF^{BB} рождается в среднем больше живых поросят. В нашем исследовании свиноматки с генотипом BF^{AB} принесла всего на 0,45 гол. и живыми на 0,48 гол. больше, по сравнению с животными с генотипом BF^{BB} , однако различия не были статистически значимыми. Для породы йоркшир отличий по количеству рожденных и рожденных живых поросят для двух генотипов не были выявлены. В нашем исследовании показана тенденция, что живая масса гнезда в 21 день была выше у животных породы ландрас с генотипом BF^{BB} по сравнению с животными с генотипом $BF^{AA/AB}$ на 2,28 кг ($p = 0,054$). По показателю «средняя масса 1 головы в 21 день» наблюдалась тенденция к увеличению массы на 140 г и 100 г

соответственно для свиноматок породы ландрас с генотипом $BF^{AB/BB}$ ($p = 0,098$). В то время как у свиноматок породы йоркшир наблюдалась тенденция к увеличению массы одной головы в 21 день у животных с генотипом BF^{AB} на 140 г в сравнении с животными с генотипом BF^{BB} ($p = 0,082$).

В исследовании Melville с соавторами [8] показано, что у свиноматок с генотипом $NCOAI^{A1A1}$ рождалось большее количество живых поросят по сравнению с генотипом $NCOAI^{A2A2}$. В нашем исследовании свиноматок породы ландрас с генотипом $NCOAI^{A1A1}$ не выявлено, животные с генотипом $NCOAI^{A2A2}$ превосходили по количеству живорожденных поросят животных с генотипом $NCOAI^{A2A1}$ на 0,49 гол. и массе гнезда на 0,45 кг, однако в 21 день свиноматки с генотипом $NCOAI^{A2A1}$ превосходили животных с генотипом $NCOAI^{A2A2}$ на 0,3 гол. и по количеству поросят при отъеме на 0,64 гол., однако различия не были статисти-

стически значимыми. Оценка воспроизводительных качеств свиней породы йоркшир показала, что свиноматки $NSOAI^{A2A1}$ превосходили свиноматок с генотипом $NSOAI^{A2A2}$ по количеству живорожденных поросят на 1,27 гол, и при отъеме на 0,29 гол. Масса гнезда в 35 дней была на 7,03 кг больше у свиноматок с генотипом $NSOAI^{A2A2}$ в сравнении со свиноматками с генотипами $NSOAI^{A2A1}$ и по массе 1 головы при отъеме на 0,65 кг, однако различия не были статистически значимыми, вероятно, из-за небольшой выборки животных. Таким образом, достоверных ассоциаций между разными генотипами гена $NSOAI$ и значением показателей воспроизводительных качеств свиноматок пород ландрас и йоркшир не было выявлено.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа для некоторых генов и воспроизводительных качеств свиней представлены в таблице 6.

Заключение

Анализ ассоциаций исследованных полиморфизмов генов с воспроизводительными качествами свиноматок пород ландрас и йоркшир отечественной селекции позволил выявить животных с предпочтительными генотипами по отношению к экономически-значимым признакам. Было выявлено, что животные породы ландрас с генотипом LIF^{BB} являются предпочтительными по таким показателям, как количество рожденных и рожденных живых поросят; предпочтительным генотипом по показателю масса гнезда при рождении является $LIF^{B/B}$; по показателю крупноплодность предпочтительным генотипом является LIF^{A} . Это обусловлено отрицательной корреляцией данных признаков между собой, как правило, относительная живая масса каждого поросенка уменьшается пропорционально их количеству в гнезде. У животных породы йоркшир достоверных различий между генотипами свиноматок и их воспроизводительными признаками по гену LIF выявлено не было и, соответственно, не выявлены предпочтительные генотипы, что может быть связано с недостаточной выборкой животных. В нашем исследовании показана тенденция увеличения живой массы гнезда в 21 день, так называемой молочности ($p = 0,054$) и массы одной головы

в 21 день ($p = 0,098$), у животных породы ландрас с генотипом BF^{BB} , который может быть предпочтительным по данным показателям. Достоверных ассоциаций между разными генотипами гена $NSOAI$ и показателями воспроизводительных качеств свиноматок пород ландрас и йоркшир не было выявлено, что может быть связано как с недостаточной выборкой, так и с особенностью генома в результате селекции данной популяции, что не дает возможность использовать ген $NSOAI$ в качестве маркера воспроизводительных качеств свиней в исследованных выборках.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГП «Инновационные биотехнологии» ГП «Научно-технологические и техника» на 2021–2025 гг., мероприятие 96ИБа «Разработать ДНК-технологии для выявления предпочтительных аллелей полиморфных локусов генов, ассоциированных с репродуктивными качествами свиноматок».

Список использованных источников

1. Самсонова, О. Е. Воспроизводительные, откормочные и мясные качества свиней в зависимости от условий кормления и генотипа животных в условиях центрально-чернозёмной зоны : монография / О. Е. Самсонова, В. А. Бабушкин. – Тамбов, 2019. – С. 33.
2. Плясунов, Е. Д. Влияние генотипа на воспроизводительные качества свиноматок и показатели роста поросят / Е. Д. Плясунов, Ю. В. Матросова // Вестник Курганской ГСХА. – 2020. – № 1. – С. 45–47.
3. Hormonal regulation of complement factor B in human endometrium / L. A. Nasty [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 1993. – Vol. 30. – P. 63–67.
4. Association of BF gene polymorphism with litter size in a commercial pig cross population / A Marantidis [et al.] // Anim Reprod Sci. – 2013. – Vol. 141, iss. 1–2. – P. 75–79.
5. Association and polymorphism study of seven candidate genes with reproductive traits in three pig breeds in Hungary / Ágnes Hunyadi-Bagi [et al.] // ABP. – Vol. 63, № 2. – 2016. – P. 359–364.
6. Analysis of properdin (BF) genotypes associated with litter size in a commercial pig cross population / B. Buske [et al.] // J Anim

Breed Genet. – 2005. – Vol. 122. – P. 259–263.

7. Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификация племенного материала в животноводстве : учебное пособие / Н. А. Зиновьева [и др.] // Москва, 2008. – С. 144.

8. A meishan positive QTL for prolificacy traits found at the NCOA1 locus on SSC 3. / J. S. Melville [et al.] // 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. – August 19–23. – 2002, Montpellier, France.

9. Особенности эндометриальной экспрессии лейкоингибирующего фактора у женщин с различным эстроген-прогестерон-рецепторным статусом эндометрия / С. С. Аганезов [и др.] // Акушерство, Гинекология и Репродукция. – 2019. – Т. 13, № 2. – С. 85–94.

10. Shurshalina, A. V. Morphofunctional rearrangements of the endometrium during the implantation window / A. V. Shurshalina, T. A. Demura // Akusherstvo i ginekologiya. – 2011. – № 7 (2). – С. 9–13.

11. Increased Kruppel-like factor 12 impairs embryo attachment via downregulation of leukemia inhibitory factor in women with recurrent implantation failure / C. Huang [et al.] // Cell Death Discov. – 2018. – № 6 (4). – С. 23.

12. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor / C. L. Stewart [et al.] // Nature. – 1992. – Vol. 359, iss. 6390. – P. 76–79.

13. Vogiagis, D. Review: The role of leukaemia

inhibitory factor in the establishment of pregnancy / D. Vogiagis, L. A. Salamonsen // J Endocrinol. – 1999. – Vol. 160, iss. 2. – P. 181–190.

14. Межевикина, Л. М. Роль лейкоингибирующего фактора в процессах роста и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток и в раннем эмбриогенезе : автореферат дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.02 / Л. М. Межевикина ; Ин-т биофизики клетки РАН. – Пушкино, 2011. – 46 с.

15. Molecular characterization and chromosomal assignment of the porcine gene for leukemia inhibitory factor LIF / A. Spotter [et al.] // Cytogenet Cell Genet. – 2001. – № 93. – P. 87–90.

16. Effect of polymorphism in the LIF gene on reproductive performance of hybrid Polish Large White and Polish Landrace / D. Napierała [et al.] // South African Journal of Animal Science. – 2014. – Vol. 44. – P. 49–53.

17. Evidence of a new leukemia inhibitory factor-associated genetic marker for litter size in a synthetic pig line / A. Spotter [et al.] // Journal Animal Science. – 2005. – Vol. 83. – P. 264–270.

18. Effect of EGF, AREG and LIF genes polymorphisms on reproductive traits in pigs / A. Mucha [et al.] // Anim. Reprod. Sci. – 2013. – № 137. – P. 88–92.

19. Взаимосвязь полиморфизма гена LIF / DRAIII с продуктивными качествами свиней / Л. В. Гетманцева [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. Результаты научных исследований. – 2014. – № 3. – С. 36–39.

E. L. Ramanishka¹, M. E. Mikhailova¹, R. I. Sheyko¹, E. S. Gridiushko²

DETECTION OF ALLELIC VARIANT ASSOCIATIONS OF *BF*, *LIF*, *NCO1* GENES WITH THE REPRODUCTION QUALITIES OF PIGS

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: lenaramanishko@mail.ru

²SE “ZhodinoAgroPlemElita”

a/g Badgers, Minsk Region, Smolevichi District, the Republic of Belarus

For the first time, a study of potentially significant polymorphisms of the *BF* (rs339261793), *NCO1* (rs335362002, rs697739229), and *LIF* (rs322167972) genes was carried out on a sample of Landrace and Yorkshire sows of the Belarusian breeding. Using the methods developed for identifying the polymorphisms under study, a sample of pigs ($n = 147$) was genotyped, and the frequencies of occurrence of alleles and genotypes were determined. It was shown that the number of born piglets and the piglets born alive from the sows with the LIF^{BB} genotype of the Landrace breed exceeded the animals with the LIF^{AA} genotype ($p < 0.05$) by 1.0 heads. The litter weight at birth was significantly higher in Landrace animals with the $LIF^{BB/BB}$ genotype compared to the animals with the LIF^{AA} genotype by 0.9 kg ($p = 0.017$). Animals with the $LIF^{AA/AB}$ genotype were significantly superior to the animals with the LIF^{BB} genotype in live litter weight on the 21st day by 3,685 kg ($p = 0.018$). A similar trend was observed in Yorkshire animals, but the differences were not statistically significant. A tendency was shown that the live litter weight on the 21st day was higher in Landrace animals with the BF^{BB} genotype compared to the animals with the $BF^{AA/AB}$ genotype by 2.28 kg ($p = 0.054$).

Keywords: DNA testing, quantitative trait loci (QTLs), reproductive qualities, SNP, *BF*, *NCO1*, *LIF*, swine breeding.

Дата поступления в редакцию: 31 августа 2023 г.

Т. В. Долматович¹, Н. С. Сазанович², Р. И. Шейко¹

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОШАДЕЙ БЕЛОРУССКОЙ УПРЯЖНОЙ ПОРОДЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

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

²Республиканское дочернее унитарное предприятие по племенному делу «ЖодиноАгроПлемЭлита»,
Республика Беларусь, 222168, Минская обл., агрогородок Барсуки, ул. Центральная, 1

В статье представлены результаты секвенирования генов митохондриального генома цитохром с-оксидаз *COX1*, *COX2* и *COX3* и прилегающих участков мтДНК у лошадей белорусской упряжной породы, разводимой на племенном конном заводе «ЖодиноАгроПлемЭлита». Проведено множественное выравнивание полученных консенсусных последовательностей мтДНК лошадей белорусской упряжной породы с известными гаплогруппами A–R (номера GenBank JN398377–JN398457, EF597513–EF597514). У изученных образцов лошадей идентифицировано семь гаплогрупп: B, I, E, G, L, P и R, что свидетельствует о генетическом разнообразии материнских линий в селекции породы. Идентифицированные гаплогруппы типичны для популяции лошадей Евразии. Особенностью лошадей, разводимых на племенном конном заводе «ЖодиноАгроПлемЭлита» является доминирование гаплогруппы L (35%). Гаплогруппы E, B, P и G имели процент встречаемости: 26%, 13%, 13% и 7% соответственно. Редко представленными оказались гаплогруппы I (3%) и R (3%).

Ключевые слова: лошадь, белорусская упряжная порода, секвенирование митохондриальной ДНК, гаплогруппы мтДНК, филогенетический анализ.

Введение

Митохондриальная ДНК (мтДНК) стала важным инструментом для исследований материнской наследственности, филогенетических взаимосвязей и оценки уникальности пород лошадей. В мире разводят около 300 пород и породных групп лошадей, которые различаются по происхождению, своим биологическим особенностям, экстерьерным признакам, работоспособности, и, соответственно, по назначению и использованию.

Нуклеотидная последовательность митохондриального генома *Equus caballus* в силу небольшого размера определена гораздо раньше ядерного [1]. Референсный геном митохондрий лошадей размером 16 600 пар нуклеотидов оказался схож по организации с аналогичными геномами всех млекопитающих, включая человека. С геномом близкого родственника лошади — осла *Equus asinus*, он совпадает на 93,1%. Во многих исследованиях показано [2], что изучение последователь-

ности гипервариабельного участка D-петли мтДНК и цитохром с-оксидаз дает возможность оценивать внутрипородное разнообразие лошадей по женским линиям и сравнивать сходство маточных семейств по митохондриальному геному.

Изучение особенностей мтДНК лошадей различных ареалов распространения, включая найденные останки древних лошадей, позволило изучить важные вопросы эволюции. В частности, была обнаружена высокая вариабельность мтДНК, свидетельствующая о существовании разных центров одомашнивания современных лошадей, что привело к переосмыслению процесса одомашнивания лошадей с самых ранних этапов и до современности [3]. Изучение митохондриального генома показало, что лошадь Пржевальского не является источником мтДНК для домашней лошади [4]. Проведенный анализ мтДНК у лошадей разных пород и популяций выявил наличие комплексной вариабельности митохондриаль-

ных гаплогрупп, которые не были обнаружены у других домашних видов [5].

На сегодняшний день в базе данных GenBank представлено 425 полных митохондриальных геномов лошадей различных пород [6]. В то же время анализ генетического разнообразия мтДНК и исследование филогенетических отношений между современными породами и древними лошадьми у белорусской упряжной породы до настоящего момента не проводились.

Белорусская упряжная — единственная порода лошадей, выведенная на территории Беларуси для сельхозработ и перевозки грузов. Принадлежит к породам северного лесного типа [7]. Начиная с IX в. местным лошадям лесного типа отводится главная роль в хозяйстве. Они используются как рабочие животные для езды верхом и в упряжи, поступают на вооружение княжеских дружин. На формирование современной популяции большое влияние оказали лошади конных заводов и заводских конюшен, начало создания которых относится к XVII в. В итоге многолетней народной селекции и воспроизводительного скрещивания жеребцов заводских пород: арденской, гудбрансдальской, шведской, брабансонской, ганноверской, орловской и т. д. с аборигенными матками лесного типа к концу XIX в. сформировался новый тип белорусской упряжной лошади. К сороковым годам XX в. из лучших многопородных помесей желательного типа и улучшенных местных животных была сформирована популяция белорусских лошадей, называемая в то время ошмянскими, а с 1946 г. — белорусская упряжная [7].

Зарегистрирована белорусская упряжная порода в Беларуси 25 мая 2000 г. На момент регистрации породы в 2000 г. только племенных кобыл насчитывалось около 3 000 голов. В 2020 г. был выпущен каталог лошадей белорусской упряжной породы. В соответствии с этим каталогом в племенных хозяйствах Беларуси осталось около 230 племенных кобыл и около 30 жеребцов, что является критичной отметкой для породы.

Цель нашей работы — охарактеризовать генетическое разнообразие лошадей белорусской упряжной породы, разводимых на племенном конном заводе «ЖодиноАгроПлемЭлита» на основе полиморфизма мтДНК.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили образцы волосных луковиц из гривы лошадей белорусской упряжной породы, полученные из племенного конного завода ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита». Конепоголовье хозяйства состоит из 125 голов, из которых 39 племенных кобыл, 8 жеребцов (рис. 1). Остальное — молодняк разных возрастов и рабочие лошади.

Для выделения ДНК из волосных фолликулов лошадей использовали набор Нуклеосорб комплектации В «Праймтех» согласно инструкции производителя. Секвенирование последовательностей генов цитохром с-оксидазы *COX1*, *COX2* и *COX3* и прилегающих участков мтДНК проводили с использованием семи пар перекрывающихся праймеров, разработанных с учетом референсной последовательности ископаемой шведской лошади X79547. Дизайн праймеров осуществляли с помощью програм-



Рис. 1. Лошади белорусской упряжной породы племенного конного завода «ЖодиноАгроПлемЭлита», слева — Гордость, справа — Буран

мы Primer3Plus [8]. Для постановки терминальной реакции секвенирования использовали «Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» («Nimagen», Нидерланды).

Для идентификации полученных секвенированных последовательностей использовали данные GeneBank [6], размещенные под номером доступа ($n = 83$): JN398377-JN398457, EF597513-EF597514. Для анализа данных использовали классификацию [9]. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы ClustalW, реализованной в MEGA-X [10]. Для реконструкции филогенетических деревьев использовали пакет MEGA-X и Байесовский метод (программа BEAST).

Результаты и обсуждения

Проведено секвенирование по Сэнгеру генов митохондриального генома у белорусской упряжной породы лошадей, разводимых на племенном конном заводе «ЖодиноАгроПлемЭлита». Нами определены последовательности генов цитохром с-оксидаз: *COX1*, *COX2*, *COX3* и прилегающих участков митохондриального генома, включая гены: *tRNA-Trp*, *tRNA-Ala*, *tRNA-Asn*, *tRNA-Cys*, *tRNA-Tyr*, *tRNA-Ser*, *tRNA-Asp*, *tRNA-Lys*, *ATPase8*,

ATPase6 у 76 образцов лошадей белорусской упряжной породы. В результате размер объединенного фрагмента ДНК из 12 отдельных перекрывающихся секвенированных последовательностей в прямом и обратном прочтении составил 4 550 п. н. для каждого образца.

Картирование полученных фрагментов ДНК длиной 4 550 п. н. на референсный геном *Equus caballus* X79547.1 позволило идентифицировать 81 полиморфный нуклеотидный сайт (табл. 1), из которых 46 оказались филогенетически информативными. Подавляющее большинство переменных нуклеотидных сайтов локализовано в третьем положении кодонов. Анализ полиморфных сайтов в генах: *COX1*, *COX2*, *COX3* и *ATP6–ATP8* позволил идентифицировать 69 замен. Замены нуклеотидов в первых и вторых позициях кодонов немногочисленны (9 и 2 соответственно), т. к. они могут повлиять на функционирование субъединиц 1, 2, 3 цитохром-оксидаз и окислительно-восстановительную систему митохондрии в целом. Основная часть замен локализована в третьих позициях кодонов.

В изученных секвенированных последовательностях лошадей чаще встречались замены: C > T (27), T > C (20), G > A (16), A > G (10). Оставшиеся замены составили:

Таблица 1

Однонуклеотидные замены, идентифицированные у белорусской упряжной породы лошадей, разводимой на ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита»

Название гена	Координаты гена	Однонуклеотидные замены/делеции
<i>tRNA-Ala</i>	5 051–5 119	5061G > A
<i>tRNA-Asn</i>	5 121–5 193	5098T > A
origin of L strand replication	5 194–5 225	5210 delG
<i>tRNA-Cys</i>	5 226–5 293	5238delA, 5276delA
<i>tRNA-Tyr</i>	5 294–5 360	–
<i>COX1</i>	5 362–6 906	5418C > T, 5457C > T, 5500C > T, 5529C > T, 5640T > C, 5671T > C, 5817A > G, 5829C > T, 5832G > A, 5883A > G, 5886C > T, 5931T > C, 6006G > A, 6093T > C, 6177T > C, 6177T > A, 6249G > A, 6300T > C, 6309T > C, 6414A > G, 6507T > C, 6531G > A, 6600C > T, 6690T > C, 6714T > C, 6726C > T, 6786G > A,
<i>tRNA-Ser</i>	6 904–6 972	6932A > G, 6949T > C
<i>tRNA-Asp</i>	6 981–7 047	7003G > A
<i>COX2</i>	7 048–7 731	7245G > A, 7249T > C, 7429C > T, 7449T > C, 7479C > T, 7518A > G, 7575T > C, 7578G > A, 7614A > T, 7629T > C, 7726T > C

Окончание таблицы 1

Название гена	Координаты гена	Однонуклеотидные замены/делеции
<i>tRNA-Lys</i>	7 735–7 802	7668A > G
<i>ATP8</i>	7 804–8 007	7900T > C, 7902T > C, 7914A > G, 7983G > A
<i>ATP6</i>	7 965–8 645	8007G > A, 8039A > G, 8045C > T, 8060C > T, 8078C > T, 8152G > A, 8174T > C, 8240T > C, 8303A > G, 8321C > T, 8306C > T, 8354T > C, 8360G > A, 8363G > A, 8381C > T, 8492G > A, 8504C > T, 8558A > T, 8567C > T
<i>COX3</i>	8 645–9 427	8794C > T, 8857C > T, 9055C > T, 9088C > T, 9241A > G, 9304A > T, 9333G > A, 9403C > T, 9404G > A
<i>tRNA-Gly</i>	9 429–9 497	9458C > T
<i>ND3</i>	9 498–9 842	9620T > C

A > T (3), T > A (2), delA (2) и delG (1). Транзиции составили основную часть наблюдаемых замен — 73, превышая количество трансверсий (5), причем количество пуриновых C ↔ T транзиций преобладало над пиримидиновыми A ↔ G. Высокие темпы эволюции митохондриального генома основаны, главным образом, на транзиционных различиях. Самые частые замены в генах, кодирующих белки, — это транзиции в третьих позициях кодонов, вторые по частоте — трансверсии в третьих позициях, и затем — молчащие транзиции в некоторых первых кодоновых позициях. Трансверсии типа G ↔ T, A ↔ C, G ↔ C в секвенированных нами фрагментах лошадей выявлены не были.

Для изучения филогенетических отношений между современными породами лошадей и изученными образцами белорусской упряжной породы лошадей проведено множественное выравнивание полученных нами секвенированных фрагментов мтДНК длиной 4 550 п. н. в программе ClustalW с 83 полными митохондриальными геномами современных лошадей, описанными в работе Ачилли [9]. Авторы, на основе секвенирования и анализа полных митохондриальных геномов 83 лошадей различного происхождения Европы, Азии, Ближнего Востока и Америки, определили 18 основных гаплогрупп современных домашних лошадей, обозначенных в алфавитном порядке (A–R). Для каждой гаплогруппы идентифицированы свои диагностические мутационные мотивы, включающие как кодирующие, так и контрольные области, возникшие к периоду неолита. Времена расхождения этих гаплогрупп

лежат во временных рамках от среднего палеолита до неолита. Исследователями показано, что последний общий предок по материнской линии всех исследованных современных лошадей жил около 130–160 тыс. лет назад.

Проведенный, согласно описанной классификации, анализ полученных объединенных фрагментов мтДНК лошадей белорусской упряжной породы, разводимой на ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита», позволил идентифицировать 46 диагностических мутаций (табл. 2). Перечень идентифицированных мутаций и филогенетический анализ в программе BEAST определили принадлежность 76 изученных образцов лошадей к семи гаплогруппам: B, E, G, I, L, P, R (табл. 2). Для построения филогенетического дерева, последовательности полных митохондриальных геномов усекали до размера секвенированных нами фрагментов ДНК. На рисунке 2 представлено филогенетическое дерево, построенное в MEGA-X по данным множественного выравнивания секвенированных фрагментов мтДНК лошадей белорусской упряжной породы и последовательностям из базы данных GenBank [6]. Для лучшей визуализации полученных данных из 83 проанализированных фрагментов митохондриальных геномов лошадей различного географического происхождения мы отобрали 36 — наиболее филогенетически близких к изученным нами образцам белорусской упряжной породы. Образцы белорусской упряжной породы объединены в семь групп и обозначены римскими цифрами (рис. 2, табл. 2).

Согласно Ачилли [9], гаплогруппа B вклю-

Таблица 2

Диагностические однонуклеотидные замены/делеции у лошадей белорусской упряжной породы племенного конного завода «ЖодиноАгроПлемЭлита» и принадлежность к гаплогруппам согласно классификации Ачили [9]

Кличка лошади	Диагностические нуклеотидные замены в образцах ДНК лошадей	Гаплогруппа по Ачили	Обозначение на филогенетическом древе
Бронза, Гавань, Галерея, Гамбия, Гасконь, Гвадалахара, Гелика, Геральдика, Гербера, Гибискус, Гипербола, Гиперион, Готика, Паненка, Палладий, Пика, Пляма, Побелка, Полк, Полтава, Польша, Полянка, Пломбир, Потеха, Пралеска, Хургада, Чага	5817A > G, 7518A > G, 8060C > T, 8303A > G, 8321C > T	L	I
Гаага, Гадалка, Галатея, Галька, Гедемина, Гильдия, Глубинка, Горихвост, Грань, Гроздь, Грюнвальд, Лирика, Ладога, Лейла, Лига, Лилей, Холодок, Черемуха, Чех, Чуйга	8354T > C, 9333G > A	E	II
Гардарика, Гордон, Гордость, Гудок, Догма, Маска, Млын, Мольба, Морошка, Угра	5931T > C, 7629 T > C	B	III
Багет, Валдай, Намибия, Натака, Небраска, Нильс, Ношпа, Октава, Олаф, Охта	6507T > C, 6531G > A, 6714T > C, 7245G > A, 7429C > T, 7614A > T, 7900T > C, 8078C > T, 8240T > C, 8363G > A, 8558A > T, 8857C > T	P	IV
Диплом, Карамель, Шкода, Штаб, Шхуна	5500C > T, 5883A > G, 6690T > C, 9404G > A	G	V
Маланка, Мох	5418C > T, 5457C > T, 5671T > C, 6177T > A, 6414A > G, 6600C > T, 6726C > T, 6932A > G, 6949T > C, 7449T > C, 7575T > C, 7578G > A, 7914A > G, 8363G > A, 8504C > T	R	VI
Белена, Блакит	5061G > A, 5210delG, 6177T > C, 6249G > A, 8381C > T, 8794C > T	I	VII

чает следующие породы лошадей: Вестфальскую (WeP01, Центральная Европа), Мареманно (Mrm08, Mrm14, Южная Европа), неопределенную сирийскую породу (Syr04, Syr05, Средний Восток), неопределенную итальянскую породу (Ita01, Южная Европа). Среди образцов белорусской упряжной породы,

отнесенных к данной гаплогруппе (табл. 2), по данным родословных не удалось определить принадлежность к конкретной женской линии.

Гаплогруппа E представлена породой Мареманно (Mrm05, Южная Европа), является редкой, восходящей к бронзовому веку. Все указанные образцы белорусской упряжной по-

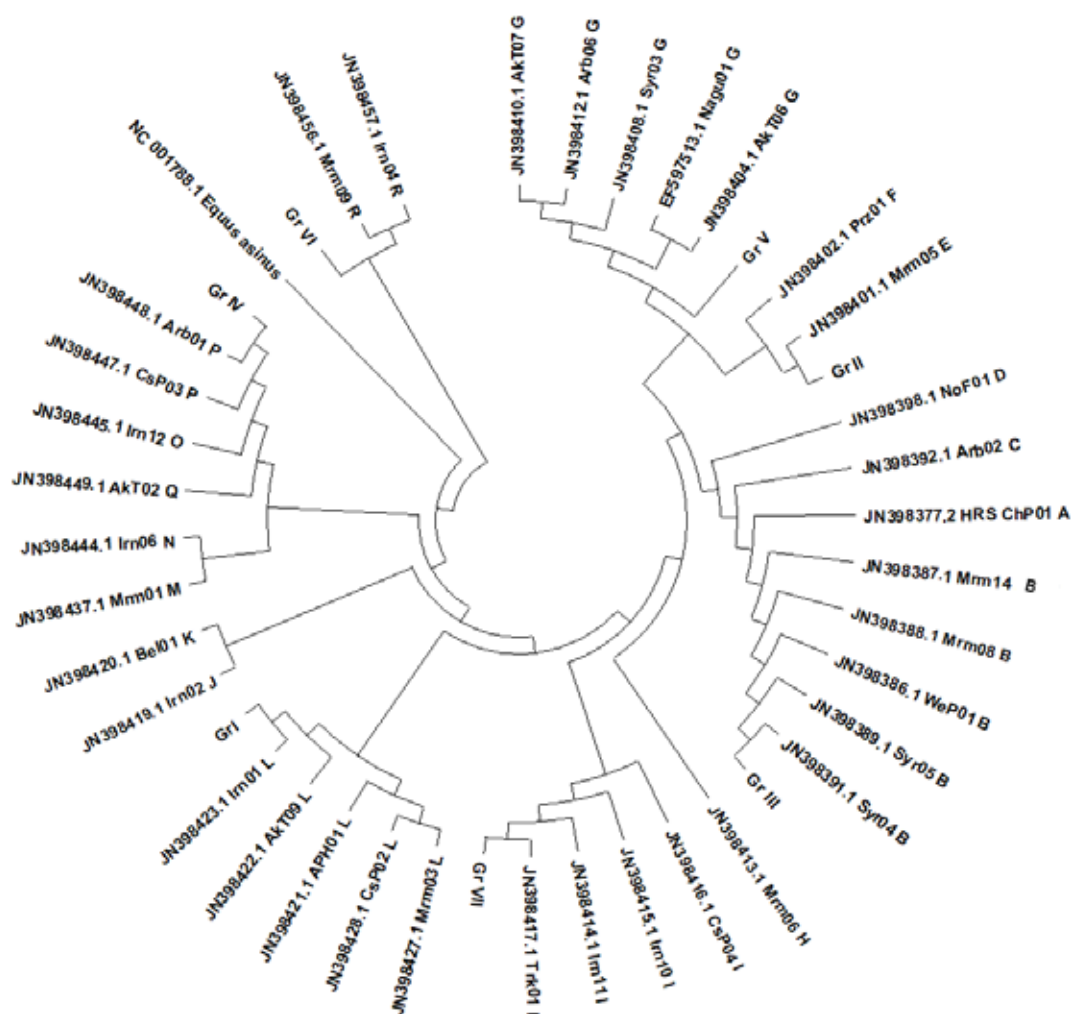


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное в MEGA-X по данным множественного выравнивания секвенированных фрагментов мтДНК лошадей белорусской упряжной породы и последовательностям из базы данных GenBank (приведен номер секвенированного митохондриального генома и ID линии)

роды, вошедшие в гаплогруппу E, принадлежат к двум семействам по женской линии: Голубки и Липы. К семейству Голубки, по данным родословных, отнесены образцы: Грань, Гаага, Галька, Горихвост, Гроздь, Грюнвальд, Черемуха, Чех, Чуйга, а к гнезду Липы отнесены образцы: Гадалка, Галатея, Гедемина, Гильдия, Глубинка, Ладога, Лейла, Лига, Лилей, Лирика.

Гаплогруппа I по классификации Ачилли [9] включает следующие породы лошадей: Каспийский пони (CsP04, Средний Восток), неопределенную иранскую породу (Irn10, Irn11, Средний Восток), Тракененскую (Trk01, Северная Европа). К этой группе отнесены: Белена и Блакит, в родословных которых указана их принадлежность к семейству Бабульки. Близкородственная к ней гаплогруппа G

включает породы: Наку (Naqu01, Центральная Азия), Ахалтекинскую (Akt06, Akt07, Центральная Азия), неопределенную иранскую породу (Irn05, Средний Восток), Арабскую (Arb03, Arb06, Средний Восток), неопределенную сирийскую породу (Syr03, Средний Восток), Джара (Gia01, Gia02, Южная Европа), неопределенную итальянскую породу (Ita02, Южная Европа). С данным гаплотипом кластеризовались образцы лошадей белорусской упряжной породы: Диплом, Карамель, Шкода, Штаб, Шхуна, причем Шкода, Штаб и Шхуна принадлежат к семейству Шипки. Интересно, что гаплогруппа G является одной из древних, и недавно она была обнаружена у ископаемых лошадей Китая и Монголии [13].

По данным, приведенным в статье [9] га-

плогруппа L включает породы: Ахалтекинскую (Akt08, Центральная Азия), Мареманно (Mrn03, Mrn10, Южная Европа), Андалузскую (And01) и неопределенную итальянскую породу (Ita03, Южная Европа), Американский пейнтхорс (ARH01, Северная Америка), неопределенную иранскую породу (Irn01) и Каспийский пони (CsP02, Средний Восток), Силезскую (Sil01, Центральная Европа), Ольденбургскую (Old01, Северная Европа). Близкородственная к ней гаплогруппа Р включает: Каспийский пони (CsP03) и Арабскую породу (Arb01), неопределенную иранскую породу (Irn03, Средний Восток). К этому эволюционному кластеру отнесены: Багет, Валдай, Намибия, Натака, Небраска, Нильс, Ношпа, Октава, Олаф, Охта, причем Намибия, Натака, Небраска, Нильс и Ношпа принадлежат к семейству Нарочанки, а Багет — к семейству Буланки II.

Наиболее отдаленная гаплогруппа R включает: Мареманно (Mrn09, Южная Европа) и неопределенную иранскую породу (Irn04, Средний Восток), а также представителей белорусской упряжной породы: Маланку и Мох, в родословных которых указано, что они принадлежат к гнезду Галочки. Гаплогруппа R по классификации Ачилли [9] относится к одной из двух ветвей, берущих свое начало от самого глубокого узла, во главе которого стоит древний митогеном кобылы, датированный примерно 153 ± 30 тыс. лет назад. Вторая ветвь дала начало всем остальным гаплогруппам. Причем гаплогруппы: В, Е, G, I сильно удалены от L. Гаплогруппа Р берет свое начало от предковой M–Q и эволюционно достаточно удалена от гаплогрупп А–L.

У протестированных нами лошадей белорусской упряжной породы не выявлена гаплогруппа F, типичная для дикой лошади Пржевальского.

Особенностью лошадей, разводимых на племенном конном заводе «ЖодиноАгроПлемЭлита» является доминирование гаплогруппы L (35%). Гаплогруппы Е, В, Р и G имеют процент встречаемости: 26, 13, 13 и 7% соответственно. Редко представленными оказались гаплогруппы I (3%) и R (3%).

В работе [12] изучение особенностей митохондриального генома лошадей чистокровной арабской породы разных стран показало, что

они относятся к 13 гаплогруппам: А, В, С, D, Е, G, I, L, M, N, P, Q и R мтДНК, при этом во всех популяциях зарегистрирована высокая частота гаплогруппы L. При исследовании полиморфизма гиперварибельного региона D-петли мтДНК у лошадей вятской породы [13, 14], авторами выявлено семь гаплогрупп: А, В, L, M, N, P и Q, что свидетельствует об участии в ее создании и азиатских материнских линий. По данным авторов [13, 14], в матрилинейной структуре вятской породы наиболее широко представлены гаплогруппы В и L. Вместе с тем у вятских лошадей отсутствовала гаплогруппа I, распространенная в мезенской породе, занимающей самый северный ареал Европейской части России [15, 16]. Мезенская порода лошадей включала широкий спектр вариантов гаплотипов мтДНК, представленных 10 гаплогруппами — А, D, G, I, L, M, N, O, Q и U, среди которых наиболее часто встречались варианты I и Q [16]. Наличие гаплогрупп D и Q в генофонде мезенской лошади свидетельствует об участии в ее создании женских предков восточного происхождения. Обе аборигенные лесные породы Европейской части России — вятская и мезенская — имели общие гаплогруппы L, M, Q и U, при этом различались по наличию гаплогрупп: D, G, I, которые встречались только у лошадей мезенской породы и отсутствовали у вятской.

Генетическая структура чистокровной верховой породы лошадей России по гаплогруппам D-петли мтДНК в целом типична для популяций Европы, в которых наибольшее распространение получили гаплогруппы: В, G, I и L [16]. Секвенирование гиперварибельного региона D-петли мтДНК у донских лошадей показало наличие 10 гаплогрупп: А, В, D, G, L, M, N, O, P и Q [16, 17]. Большинство гаплотипов мтДНК донских лошадей было представлено гаплогруппами G, В и L. В целом для лошадей донской, вятской, бурятской, кабардинской и других пород России характерна сравнительно высокая частота встречаемости гаплогрупп В и L [15, 16].

Интересно, что гаплогруппа А была представлена в геномах многих аборигенных лошадей Европы и Азии, включая эталонную последовательность ископаемой шведской лошади X79547, возраст которой датирован 2-м тыс. до н. э.

Среди кабардинских лошадей, как показано в работе Хаудова [18], наиболее частыми гаплогруппами были G, L, Q и B; редко встречаются — N и R. Гаплогруппы G, L, Q и B также часто встречаются у азиатских верховых лошадей (например, бурятских, киргизских, монгольских, забайкальских, тувинских), процентное содержание отдельных гаплогрупп заметно различалось. Сравнение с азиатскими породами верховых лошадей показывает, что в этих породах часто присутствуют гаплогруппы L, B и Q [18]. Тем не менее между породами существуют различия в частотах гаплотипов. Гаплогруппы Q и L очень часты у монгольских лошадей, тогда как у тувинских лошадей часто встречаются гаплогруппы B и L. Основная гаплогруппа бурятской лошади — B, в то время как гаплогруппа L в этой породе встречается редко. В отличие от кабардинских лошадей, бурятские лошади показывают высокую частоту гаплогруппы I, монгольские лошади — M, O и P, а тувинские лошади гаплогруппу H [16, 18]. У пород с Ближнего Востока (Ахкал Теке, Каспий) доминирует гаплогруппа L, за которой следует смесь A, B и G [5].

При изучении полиморфизма гипервариабельного региона D-петли мтДНК у забайкальских лошадей был выявлен 31 гаплотип, представляющий восемь гаплогрупп: B, C, G, H, L, M, Q и R. В структуре мтДНК породы преобладали гаплогруппы Q, B, G и H [19]. Эти гаплогруппы также распространены у местных пород лошадей Сибири и у монгольских лошадей.

Расхождения в частоте встречаемости гаплогрупп часто возникают из-за ограниченного числа исследованных лошадей, что часто не является репрезентативным для всей породы.

Результаты полногеномного анализа ДНК 273 древних лошадей из захоронений предполагаемых центров одомашнивания Евразии и Средней Азии привели международную команду исследователей [20] к мнению, что все современные домашние породы лошадей берут свое начало с главнейшего центра Европейско-Азиатского региона. В результате изучения структуры ДНК останков животных из археологических раскопок было установлено [20], что многие породы лошадей Европы ведут свое начало от лошадей, прирученных человеком в южных степях Волги и Дона еще

в 5-ом тыс. до н. э. Лошади из этого региона активно мигрировали на запад и восток, благодаря чему к началу 2-го тыс. до н. э. широко распространились по всей Европе, потеснив при этом местные популяции. Тарпаны, считавшиеся «дикими предками домашних лошадей», оказались помесью древних диких центральноевропейских лошадей и домашних восточноевропейских.

Высокое разнообразие митохондриальных гаплотипов у лошадей — общеизвестный факт [21], и большинство гаплотипов и гаплогрупп не ограничиваются определенной географической областью или конкретной породой. Вероятными причинами этого явления считаются широко распространенные приручения различных кобыл-основателей, а также смешанное происхождение большинства пород [22]. Татаро-монгольское нашествие на Европу также оказало значительное влияние на поголовье лошадей Придонья и других регионов России, внося определенную долю восточно-азиатской крови [19].

Заключение

Проведенное секвенирование генов митохондриального генома цитохром с-оксидаз *COX1*, *COX2* и *COX3* и прилегающих участков мтДНК у лошадей белорусской упряжной породы племенного конного завода «ЖодиноАгроПлемЭлита» позволило идентифицировать у исследуемых лошадей семь гаплогрупп: B, I, E, G, L, P, R и определить филогенетические связи между различными современными породами и белорусской упряжной породой.

Присутствие семи гаплогрупп, удаленных друг от друга, позволяет сделать вывод о высоком уровне генетического разнообразия материнских линий лошадей белорусской упряжной породы, разводимых в племенном конном заводе «ЖодиноАгроПлемЭлита». В то же время полученные данные для ограниченного количества особей могут не являться репрезентативными для всей породы лошадей, разводимой на племенных конезаводах Республики Беларусь.

Список использованных источников

1. Xu, X. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region / X. Xu

- // Gene. – 1994. – Vol. 148, № 2. – P. 357–362.
2. BOLDSYSTEMS [Электронный ресурс]. – 2023. – Режим доступа: <https://boldsystems.org/>. – Дата доступа: 01.09.2023.
3. Orlando, L. Ancient Genomes Reveal Unexpected Horse Domestication and Management Dynamics / L. Orlando // BioEssays. – 2020. – Vol. 42, № 1. – P. 1900164. – DOI: 10.1002/bies.201900164
4. Taylor, W. T. T. Rethinking the evidence for early horse domestication at Botai / W. T. T. Taylor, C. I. Barrón-Ortiz // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – P. 7 440. – DOI: 10.1038/s41598-021-86832-9
5. Origin and History of Mitochondrial DNA Lineages in Domestic Horses / M. Cieslak [et al.] // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, № 12. – P. e15311. – DOI: 10.1371/journal.pone.0015311
6. GenBank [Электронный ресурс]. – 2023. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. – Дата доступа: 01.09.2023.
7. Гладенко, В. К. Коневодство Белоруссии // В. К. Гладенко. – Минск : Ураджай, 1985. – 72 с.
8. Primer3Plus [Электронный ресурс]. – 2023. – Режим доступа: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. – Дата доступа: 01.08.2023.
9. Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication / A. Achilli [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2012. – Vol. 109, № 17. – P. 2 449–2 454. – DOI: 10.1073/pnas.1111637109
10. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2013. – Vol. 30. – P. 2 725–2 729.
11. Steiner, C. C. Molecular phylogeny and evolution of the Perissodactyla / C. C. Steiner, O.A. Ryder // Zoological J. – 2011. – Vol. 163, № 4. – P. 1 289–1 303. – DOI: 10.1111/j.1096-3642.2011.00752.x
12. Khanshour, A. M. Maternal phylogenetic relationships and genetic variation among Arabian horse populations using whole mitochondrial DNA D-loop sequencing / A. M. Khanshour, E. G. Cothran // BMC Genetics. – 2013. – Vol. 14, № 83. – DOI: 10.1186/1471-2156-14-83
13. Структура Вятской породы лошадей по гаплогруппам мтДНК / Л. А. Храброва. [и др.] // Коневодство и конный спорт. – 2020. – № 4. – С. 4–6. – DOI: 10.25727/HS.2020.4.62190
14. Оценка генеалогической структуры Вятской породы лошадей (*Equus ferus caballus*) с использованием анализа ДНК / Л. А. Храброва [и др.] // Коневодство и конный спорт. – 2022. – Т. 58, № 1. – С. 457–462. – DOI: 10.31857/S0016675822040063
15. Оценка генетического разнообразия и структуры автохтонных пород лошадей России и Монголии с использованием ядерных и митохондриальных ДНК-маркеров / В. Н. Воронкова [и др.] // Генетика. – 2022. – Т. 58, № 8. – С. 902–919. – DOI: 10.31857/S0016675822080100
16. Блохина, Н. В. Использование ДНК-маркеров для идентификации сохранения и развития генетических ресурсов коневодства Российской Федерации : дис. ... докт. с/х. наук : 06.02.07 / Н. В. Блохина. – Д., 2022. – 271 л.
17. Храброва, Л. А. Особенности матричной структуры донской породы лошадей, сформировавшейся в центральном ареале одомашнивания / Л. А. Храброва, А. А. Николаева, Н. В. Блохина. – Коневодство и конный спорт. – 2022, № 1. – С. 18–21. – DOI: 10.25727/HS.2022.1.60291
18. Khaudov, A. D. Genetic analysis of maternal and paternal lineages in Kabardian horses by uniparental molecular markers // Veterinary Journal. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 40–46. – DOI: 10.4314/ovj.v8i1.7
19. Вариативность последовательности D-петли митохондриальной ДНК у лошадей забайкальской породы / Л. А. Храброва [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25, № 5. – С. 486–491.
20. The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes / P. Librado [et al.]. – Nature. – 2021. – Vol. 598. – P. 634–640. – DOI: 10.1038/s41586-021-04018-9
21. An Overview of Ten Italian Horse Breeds through Mitochondrial DNA / Cardinali I. [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 4. – P. 1–15. – DOI: 10.1371/journal.pone.0153004
22. Multiple maternal origins of native modern and ancient horse populations in China / C. Z. Lei [et al.] // Anim. Genet. – 2009. – Vol. 40, № 6. – P. 933–944. – DOI: 10.1111/j.1365-2052.2009.01950.x

T. V. Dolmatovich¹, N. S. Sazanovich², R. Sheyko¹

GENETIC CHARACTERISTICS OF BELARUSIAN HARNESS HORSES BASED ON MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHISM

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: t.dolmatovich@igc.by

²Republican Affiliated Unitary Enterprise for Livestock Breeding

“ZhodinoAgroPlemElita”

1 Tsentralnaya St., 222168 Barsuki agro-town, Minsk Region, the Republic of Belarus

The Article presents sequencing results on the genes of the mitochondrial genome of cytochrome c oxidases (*COX1*, *COX2*, and *COX3*) and adjacent mtDNA regions in the horses of the Belarusian harness breed at the stud farm “ZodinoAgroPlemElita”. Multiple alignment of the obtained consensus mtDNA sequences of the horses of the Belarusian harness breed with known haplogroups A–R (GenBank numbers: JN398377–JN398457; EF597513–EF597514) was carried out. Seven haplogroups were identified in the horse samples studied: B, I, E, G, L, P and R, which indicates the genetic diversity of maternal lines in the breeding of this breed. The identified haplogroups are typical for the Eurasian horse population. A feature of the horses bred at the “ZhodinoAgroPlemElita” breeding stud is the dominance of the haplogroup L (35%). The haplogroups E, B, P, and G had the following percentage of occurrence: 26%, 13%, 13% and 7% respectively. Haplogroups I (3%) and R (3%) were turned out to be rarely represented.

Keywords: horse, Belarusian harness horse, mitochondrial DNA sequencing, mtDNA haplogroups, phylogenetic analysis.

Дата поступления в редакцию: 07 сентября 2023 г.

А. Н. Верчук, Т. В. Осадчук

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОСОБЕЙ БОБРА РЕЧНОГО (*CASTOR FIBER*) В КРИМИНАЛИСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

Государственное учреждение

«Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь»
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Филимонова, 25
e-mail: a.n.verchuk@mail.ru

Бобр речной (*Castor fiber*) является одним из объектов судебной экспертизы, для идентификации которого наиболее актуальным является анализ ДНК, основанный на применении микросателлитных маркеров. Целью работы являлась разработка тест-системы для ДНК-идентификации особей бобра речного в рамках судебно-экспертной деятельности, а также оценка генетического разнообразия исследованной популяции с помощью разработанной тест-системы. Для создания мультилокусной тест-системы были протестированы 30 микросателлитных маркеров, специфичных для бобра речного и его ближайшего родственника — бобра канадского. По результатам проведенного исследования было отобрано 9 STR-локусов (*CF17*, *CF18*, *CF19*, *CF30*, *CF33*, *CF44*, *CF49*, *Csa8*, *Csa62*), на основе которых создана мультилокусная тест-система. По результатам генотипирования 115 особей животных с помощью разработанной тест-системы дана оценка генетического разнообразия белорусской популяции бобра речного. Анализ результатов исследования свидетельствует о невысоком уровне внутривидового разнообразия исследованной выборки.

Ключевые слова: ДНК-маркер, бобр речной, STR-маркеры, мтДНК, судебная экспертиза, генотипирование.

Введение

К роду бобры (*Castor*) относятся полуводные млекопитающие, которые являются самыми крупными грызунами в Евразии и Северной Америке и вторыми по величине грызунами в мире после капибары (*Hydrochoerus capybara*). В роду представлены два сохранившихся вида бобра: бобр речной, или европейский (*Castor fiber*), ареал которого простирается по Европе и Азии, и канадский бобр, или американский (*Castor canadensis*). Канадский бобр является аборигенным видом для Северной Америки, был завезен в Европу, где и акклиматизировался [1, 2]. Оба вида имеют значительно схожий фенотип, что делает их почти неразличимыми по внешнему виду. Но, несмотря на морфологическое сходство, отмечаются биохимические особенности и различное количество хромосом (в кариотипе речного бобра 48 хромосом, у канадского бобра — 40), что подтверждает их разделение на отдельные виды [3], поэтому для их дифференциации могут применяться молекулярные и цитогенетические методы.

Бобры моногамны и живут поодиночке или семейными группами. Полная семья состоит из 5–8 особей: семейной пары и молодых бобров — приплода прошлого и текущего годов [4].

Бобры являются мощным биогенным фактором и главной преобразующей силой после человека, сильно влияющим на среду в местах их обитания. Они строят плотины и создают запруды, превращая сухие лесные участки в водно-болотные угодья, в которых обеспечивают стабильный уровень воды [1, 2], воздействуя косвенно или напрямую, изменяют химический состав почвы и вод, рельеф, прибрежную флору [5, 6]. Масштабы воздействия зависят от продолжительности жизни колонии данного вида [7].

На протяжении многих веков бобры интенсивно добывались людьми для получения меха и мяса, а также бобровой струи и жира, особенно хвостового, которые использовались в лечебных целях. По этой причине бобр речной, как ценный промысловый вид, привлекал к себе внимание многих охотников и браконье-

ров, а также исследователей [8, 9]. Интенсивная охота привела к постепенному исчезновению бобров с обширных территорий. В начале XX в. на территории Европы бобры практически вымерли [10]. Поэтому с 1920-х гг. были начаты программы реинтродукции бобра речного, который находился под строгой охраной. Благодаря предпринятым мерам численность бобра начала медленно восстанавливаться, что привело к увеличению фактов незаконной охоты.

На территории современной Беларуси целенаправленное изучение бобра речного началось в 1920-х гг., когда он находился на грани полного исчезновения [11]. Основное внимание обращали на поиск мест, где еще могли сохраняться данные животные. К 1929–30 гг. в восточной части страны исследователи насчитывали около 170 бобров в 54 местообитаниях. В результате проводимых мероприятий численность бобра речного в Беларуси стабильно росла, и к концу 1960-х гг. насчитывалось порядка 24–31 тыс. особей. До начала 1990-х гг. численность вида держалась на относительно стабильном уровне, а в период с 1992 по 1996 гг. — резко снизилась с 20 до 12 тыс. особей. Однако в последующие годы произошло быстрое восстановление численности популяции, и к 2010 г. насчитывалось около 65 тыс. особей бобра речного. В настоящее время численность бобров в Беларуси держится на относительно стабильном уровне. На рисунке 1 показана динамика восстановления численности популяции бобра речного на территории Беларуси начиная с 1930 г. [4, 12–15].

Для изучения генетического разнообразия животных, в том числе и бобра речного, обычно используют микросателлитные маркеры (STR, Short Tandem Repeat), которые являются наиболее универсальным инструментом для молекулярно-генетической характеристики и идентификации животных. В настоящее время разработано значительное количество STR-маркеров для вида бобр речной, однако первые исследования начинались с изучения генетического разнообразия бобра канадского. Использование микросателлитов, разработанных для вида *C. canadensis*, для изучения популяций европейских бобров, описано в различных исследованиях [17, 19–21].

В 2008 г. группой американских ученых были разработаны и охарактеризованы 10 микросателлитных локусов у бобра канадского (*C. canadensis*). В исследовании были использованы образцы 60 животных из южного и центрального Иллинойса, а для дизайна праймеров было выбрано 50 последовательностей. После проведенного исследования панель отобранных маркеров включала следующие локусы: *Cca4*, *Cca5*, *Cca8*, *Cca9*, *Cca10*, *Cca13*, *Cca15*, *Cca18*, *Cca19*. Данные локусы характеризовались высоким полиморфизмом и имели от 5 до 13 аллелей на локус с наблюдаемой гетерозиготностью от 0,317 до 0,867 [16].

Позднее, в 2009 г., были разработаны еще девять ядерных микросателлитных локусов для *C. canadensis*: *Cca15*, *Cca20*, *Cca56*, *Cca62*, *Cca76*, *Cca92*, *Cca112*, *Cca122*, *Cca151*. Все разработанные локусы были апробированы на 55 животных из популяций Аризоны и 30 животных из Висконсина. Проведенные иссле-

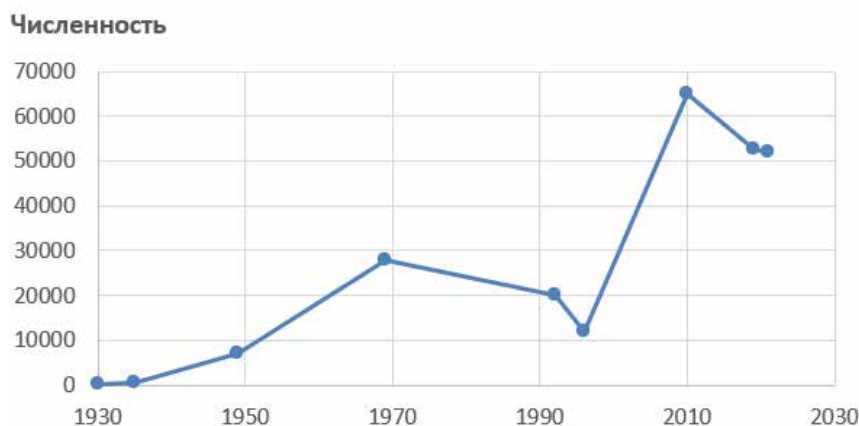


Рис. 1. Количество особей бобра речного (*C. fiber*) на территории современной Беларуси с 1930 по 2021 гг.

дования выявили один мономорфный локус *Sca151* для обеих исследуемых групп, остальные локусы оказались полиморфными. Количество аллелей в локусах колебалось от 2 до 4 в популяции Аризоны и от 5 до 12 в популяции Висконсина. Средняя гетерозиготность варьировала от 0,27 до 0,65 в популяции Аризоны и от 0,13 до 0,86 в популяции Висконсина. Разработанные в этом исследовании микросателлитные маркеры, а также маркеры, описанные J. Crawford соавторами, были использованы для амплификации на образцах бобра речного [16, 17]; четыре вновь разработанных маркера и восемь ранее описанных маркеров успешно амплифицировались, при этом все четыре новых локуса и пять ранее опубликованных были полиморфными [17].

В 2010 г. с целью изучения генетической структуры популяции и подвидовой дифференциации бобра речного были разработаны 58 пар праймеров, однако только 25 из них давали воспроизводимые ампликоны правильного размера. С помощью дальнейшего анализа было отобрано 15 микросателлитных локусов для изучения бобров вида *C. fiber*: *CF05*, *CF06*, *CF07*, *CF17*, *CF18*, *CF19*, *CF21*, *CF30*, *CF31*, *CF32*, *CF33*, *CF41*, *CF44*, *CF48*, *CF49*. Количество аллелей на локус колебалось от двух до шести с наблюдаемыми значениями гетерозиготности от 0,24 до 0,77. Для трех локусов (*CF06*, *CF18*, *CF49*) наблюдался значительный дефицит гетерозигот [18].

В исследовании, проведенном в 2015 г. для оценки происхождения в колониях бобра речного (38 особей) в Кировской области Российской Федерации, использовали 26 микросателлитных локусов, разработанных для бобра речного и бобра канадского [16–18]. В связи с тем, что амплификация с использованием семи праймеров, первоначально разработанных для бобра канадского, имела низкую эффективность у бобра речного, были внесены изменения в последовательность праймеров. Восемь локусов проявили себя как мономорфные (*Sca5*, *Sca20*, *CF5*, *CF7*, *CF21*, *CF30*, *CF48*, *CF49*) и не использовались для дальнейшего анализа. Три локуса показали значительный дефицит гетерозигот (*Sca112*, *CF18*, *CF33*) и также были исключены из дальнейшего исследования. В остальных 15 локусах наблюдалось от 2 до 5 аллелей (в среднем 2,9) [19].

9 микросателлитов, опубликованных ранее [16], в 2017 г. были амплифицированы у бобра речного из Чехии (32 особи) и Латвии (27 особей) [20]. Для исследованных особей бобра речного из Чешской Республики полиморфизм был показан в шести локусах, в колониях латвийских бобров — только в пяти локусах. В полиморфных локусах выявлялось от 2 до 4 аллелей. Результаты, полученные для чешской популяции в 2017 г., сопоставимы с результатами, полученными для особей речного бобра К. Pelz-Serrano с соавторами в 2009 г. [17]. Что касается латвийской популяции, результаты также аналогичны, за исключением локуса *Sca5*, где наблюдался только один аллель [20].

Примерно в это же время было проведено исследование по 11 микросателлитным маркерам, разработанным для канадского бобра [16, 17], с использованием 251 образца бобров из швейцарской популяции. Количество аллелей на локус колебалось от одного (для локусов *Sca5* и *Sca72*) до шести, среднее число аллелей в локусе составило 2,5 [21].

В целом можно отметить, что в описанных популяциях бобра речного было обнаружено низкое аллельное разнообразие или его отсутствие (например у бобров Кировского региона России восемь локусов были мономорфными). Такой довольно низкий уровень генетической изменчивости может быть связан с генетической однородностью реинтродуцированных популяций европейских бобров, которая связана с прохождением популяций бобра через «бутылочное горлышко».

Каждая из исследованных популяций характеризовалась низким внутривидовым полиморфизмом, что может быть результатом вымирания части популяции под воздействием антропогенного фактора, а также может быть следствием изолированности популяций бобров водоразделами крупных европейских рек, выступающих в качестве барьеров и ограничивающих поток генов между ними.

Целью данной работы являлась разработка тест-системы для ДНК-идентификации особей белорусской популяции бобра речного в рамках судебно-экспертной деятельности, а также оценка генетического разнообразия исследованной популяции с помощью разработанной тест-системы.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования использовали образцы шкур и мышечной ткани от 115 особей бобра речного, собранных на территории Республики Беларусь: 60 образцов из Минской области, 2 из Брестской, 15 из Витебской, 28 из Гомельской, 1 из Гродненской, 9 из Могилевской.

ДНК выделяли по методике, основанной на высвобождении ДНК в ходе инкубирования биологического материала в лизирующем буфере, содержащем 2%-й додецилсульфат натрия (SDS), лизат подвергали процедуре очистки на силикагеле [22].

Микросателлитные маркеры отбирали на основе анализа данных литературы. Всего в исследовании было протестировано 30 микросателлитных маркеров: 14 маркеров, разработанных для вида бобр речной (*Castor fiber*) (*CF05*, *CF06*, *CF07*, *CF17*, *CF18*, *CF19*, *CF21*, *CF30*, *CF32*, *CF33*, *CF41*, *CF44*, *CF48*, *CF49*) и 16 маркеров, разработанных для вида бобр канадский (*C. canadensis*) (*Cca4*, *Cca5*, *Cca8*, *Cca9*, *Cca10*, *Cca13*, *Cca15*, *Cca18*, *Cca19*, *Cca20*, *Cca56*, *Cca62*, *Cca76*, *Cca92*, *Cca112*, *Cca122*) [16–19].

Для всех исследованных локусов прямые праймеры имели флуоресцентные метки на 5'-конце. Подбор маркеров для тест-системы проводили с учетом температуры отжига праймеров, типа тандемного повтора, гетерозиготности, длины амплифицированного фрагмента. Для предотвращения загрязнения образцов и последующих ошибок генотипирования в каждый анализ включали положительный (образец с выявленным ранее генотипом) и отрицательный (без целевой матрицы) контроля ПЦР.

Анализ результатов ПЦР осуществляли методом капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме генотипирования. Размер аллелей определяли в парах нуклеотидов (п. н.) путем сравнения длины со стандартом длины Orange 500bp (NimaGen, Нидерланды).

Статистический анализ данных проводили с использованием программ GenAlEx v.6.5 [23], Structure v.2.3.4 [24], Past v.3.17 [25] и Pophelper v1.0.10 [26]. Были рассчитаны показатели, характеризующие генетическую

структуру исследуемой выборки бобра речного: Na (среднее количество выявленных аллелей на локус), Ne (количество эффективных аллелей), Ho (наблюдаемая гетерозиготность), He (ожидаемая гетерозиготность), PIC (мера информационного полиморфизма) [27], I (индекс разнообразия Шеннона) [28], F_{IS} (индивидуальный индекс фиксации) [29]. Для определения комплексного значения вероятности случайного совпадения для системы микросателлитов и значения вероятности разделения двух неродственных особей использовали программу Forstat [30].

С использованием GenAlEx v.6.5 проведен расчет генетических дистанций. В программе Structure v.2.3.4 рассчитан критерий Q, который характеризует принадлежность каждой отдельной особи к соответствующему кластеру. С использованием веб-приложения Pophelper v1.0.10 (<http://pophelper.com>) произведена графическая интерпретация результатов, полученных в Structure v.2.3.4. В программе Past v.3.17 выполнено построение графика главных компонент на основе расчета генетических дистанций.

Результаты и обсуждение

По результатам анализа литературы было отмечено, что STR-маркеры, разработанные для обоих видов животных, относящихся к роду *Castor*, могут перекрестно амплифицироваться, однако возможность успешной амплификации и полиморфизм будут иметь отличия для популяций бобра речного, обитающих в различных географических регионах Европы [16–21].

Для оценки информативности и возможности включения в разрабатываемую тест-систему отобранных по данным научной литературы STR-маркеров, каждый из маркеров сначала был протестирован в монолокусной реакции на контрольной выборке образцов бобра речного ($n = 24$ образца), представленной образцами из разных областей Беларуси.

При исследовании 14 STR-маркеров, разработанных для вида бобр речной, локусы *CF05*, *CF07*, *CF17*, *CF18*, *CF19*, *CF30*, *CF33*, *CF44* выявлялись в выборке бобра речного как полиморфные, в то время как локусы *CF21* и *CF49* были мономорфными. Наиболее высокий уровень полиморфизма был показан для локусов

CF17 и *CF44* (по семь аллельных вариантов); наименее полиморфными оказались локусы *CF05*, *CF07*, *CF18* (по два аллельных варианта). Амплификация STR-маркеров *CF06*, *CF32*, *CF41*, *CF48* в условиях мультилокусной ПЦР приводила к образованию неспецифических продуктов, что не позволило включить их в тест-систему.

При исследовании 16 STR-маркеров, разработанных для вида бобр канадский, шесть локусов (*Csa5*, *Csa9*, *Csa10*, *Csa15*, *Csa19*, *Csa20*) оказались мономорфными. Наиболее высокий уровень полиморфизма был показан для локусов *Csa8* и *Csa62* (по пять аллельных вариантов); наименее полиморфными оказались локусы *Csa13* и *Csa18* (по два аллельных варианта). Маркеры *Csa4*, *Csa56*, *Csa76*, *Csa92*, *Csa112*, *Csa122* имели несколько мест посадки праймеров, образуя продукты ПЦР различной длины, что может говорить о неоптимальной последовательности праймера для вида *Castor fiber* — данные STR-маркеры были исключены из тест-системы.

По результатам проведенного на контрольной группе исследования были отобраны восемь наиболее полиморфных маркеров (*CF17*, *CF18*, *CF19*, *CF30*, *CF33*, *CF44*, *Csa8*, *Csa62*), подходящих по диапазону длин амплифицированных фрагментов для мультиплексной ПЦР. При постановке мультиплексной ПЦР использовали контрольные образцы, для которых в монолокусных реакциях был определен генотип по каждому STR-маркеру. Для получения оптимальной интенсивности продуктов амплификации проводили подбор условий мультиплексной ПЦР: праймеры смешивали в различных концентрациях, амплификацию проводили с использованием диапазона температуры отжига праймеров и различном количестве циклов ПЦР.

Также в мультиплексную ПЦР был добавлен маркер *CF49*, который возможно использовать для видовой идентификации представителей отряда *Rodentia* (маркер был протестирован на следующих видах: ондатра, нутрия, шиншилла, дегу, морская свинка). В итоге, тест-система для идентификации бобра речного включала девять STR-маркеров: *CF17*, *CF18*, *CF19*, *CF30*, *CF33*, *CF44*, *CF49*, *Csa8*, *Csa62*. С помощью разработанной тест-системы проведено генотипирование 115 образцов бобра речного,

отобранных из различных областей Республики Беларусь. Генетико-популяционные характеристики исследованных локусов представлены в таблице 1.

В девяти исследованных микросателлитных локусах идентифицировали 41 аллель, в том числе 15 редких (с частотой встречаемости менее 5,0%), что составляет 36,6% от общего количества выявленных аллелей. Наибольшее число редких аллелей выявлено для STR-локусов *CF17* (четыре аллеля, суммарная частота 3,5%) и *CF33* (три аллеля, суммарная частота 3,9%). Число эффективных аллелей (N_e) в локусах варьировало от 1,000 (*CF49*) до 3,474 (*CF44*), при среднем значении $2,510 \pm 0,672$ аллеля на локус. Для некоторых STR-локусов с большим числом наблюдаемых аллелей (например, для *CF17*), характерны относительно невысокие значения числа эффективных аллелей (N_e), что можно объяснить наличием в этих локусах редких аллелей.

Анализ гетерозиготности исследуемой выборки бобра позволил выявить достаточно высокий уровень генетического разнообразия в локусах *CF17*, *CF30*, *CF44*, значения показателей наблюдаемой гетерозиготности (H_o) для которых составили 0,513, 0,526 и 0,583 соответственно. Достаточно большое количество гетерозиготных генотипов также было выявлено для локусов *CF19*, *Csa8* и *Csa62* со значениями 0,447, 0,504 и 0,478 соответственно. Для других микросателлитов системы (*CF18*, *CF33*) частота встречаемости гетерозиготных генотипов была значительно ниже и составила 0,088 и 0,211 соответственно. Среднее значение H_o для 8 локусов составило $0,419 \pm 0,174$. Наибольшее значение показателя ожидаемой гетерозиготности (H_e) выявлено для локусов *CF44* (0,712) и *Csa8* (0,686), наименьшее — для локуса *CF18* (0,266), при среднем значении $0,570 \pm 0,140$.

Большая часть маркеров характеризовалась неравномерным распределением аллельных вариантов, о чем свидетельствует наличие большого количества как редких аллелей, так и частых. Для локусов *CF30*, *CF44*, *Csa62* было выявлено по одному мажорному аллелю с частотой встречаемости 0,519, 0,422 и 0,63 соответственно, при этом другие варианты аллелей встречались со средней частотой 0,16, 0,096, 0,092. Для локусов *CF33*, *CF17* и *CF19*

Таблица 1

Генетико-популяционные характеристики исследованных локусов

Локус	Na	Ne	Ho	He	F _{IS}	I	PIС
<i>CF17</i>	7	2,708	0,513	0,631	0,187	1,152	0,560
<i>CF18</i>	2	1,362	0,088	0,266	0,670	0,436	0,231
<i>CF19</i>	5	2,233	0,447	0,552	0,190	0,928	0,466
<i>CF30</i>	4	2,807	0,526	0,644	0,183	1,188	0,593
<i>CF33</i>	5	2,149	0,211	0,535	0,606	0,867	0,429
<i>CF44</i>	7	3,474	0,583	0,712	0,182	1,465	0,668
<i>Csa8</i>	5	3,187	0,504	0,686	0,265	1,215	0,621
<i>Csa62</i>	5	2,158	0,478	0,537	0,109	0,999	0,483
Среднее значение	5	2,510	0,419	0,570	0,299	1,031	0,506
Стандартное отклонение (SD)	–	0,672	0,174	0,140	0,214	0,306	0,138
<i>CF49</i>	1	1,000	–	–	–	–	–

обнаружено по два наиболее частых аллеля с частотами встречаемости от 0,361 до 0,557.

Среднее значение информационного содержания полиморфизма (PIС) определяется способностью маркера устанавливать полиморфизм популяции в зависимости от числа обнаруженных аллелей и распределения их частот. Среднее значение PIС для исследованных маркеров было $0,506 \pm 0,138$, при этом наиболее информативным для идентификации отдельной особи оказался локус *CF44* (PIС = 0,668). Высокие значения PIС рассчитаны для локусов *CF30* и *Csa8* со значениями 0,593 и 0,621 соответственно, а наименее информативным оказался *CF18* (PIС = 0,231). Комплексное значение вероятности случайного совпадения для системы из восьми микросателлитов составило $105,245 \times 10^{-7}$. Значение вероятности разделения двух неродственных особей по комплексу выявляемых признаков достигло 99,9989%.

Индивидуальный индекс фиксации (F_{IS}) — коэффициент инбридинга особей в субпопуляциях, указывающий на редукцию гетерозиготности из-за неслучайного спаривания, означает меру отклонения частот встреча-

емости генотипов от таковых при равновесии Харди-Вайнберга внутри субпопуляций с точки зрения недостатка или избытка гетерозигот [29]. Дефицит гетерозиготных особей (близкородственное спаривание, F_{IS} > 0), показан для всех 8 локусов (за исключением *CF49*, который является мономорфным) с показателями от 0,109 (*Csa62*) до 0,670 (*CF18*), со средним значением показателя $0,299 \pm 0,214$, т. е. существенное смещение генетического равновесия в сторону инбридинга. Данный показатель может свидетельствовать о частых близкородственных спариваниях внутри популяции бобра, подтверждая эффекты «бутылочного горлышка». Данное предположение может подтверждаться индексом биоразнообразия Шеннона (I), рассчитанного для совокупности восьми STR-локусов, который составил в среднем $1,031 \pm 0,306$, что указывает на низкое генетическое разнообразие вида и однородность структуры популяции бобра речного на территории Республики Беларусь.

Поскольку бобр речной распространяется по руслам рек, было принято решение оценить субпопуляционную подразделенность анали-

зируемой выборки бобра речного. С помощью веб-приложения PopHelper v1.0.10 и программы Structure v.2.3.4 провели обработку результатов для выявления подгрупп внутри сформированной выборки бобра речного ($n = 115$). Генетическую структуру исследуемой выборки оценивали с помощью анализа главных компонент (principal component analysis, PCA) посредством кластеризации в программе STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard с соавторами, 2000) с использованием смешанной моде-

ли (число предполагаемых кластеров K — от 2 до 10; длина burn-in периода — 50K; модель Марковских цепей Монте-Карло — 5K). Для каждого значения K выполнялось по 10 итераций. С помощью данного анализа оценивалась субпопуляционная подразделенность анализируемой выборки бобра речного. По полученным результатам (опираясь на показатель $\Delta K = 31,813$) было сделано предположение о наличии 4 кластеров внутри выборки (рис. 2).

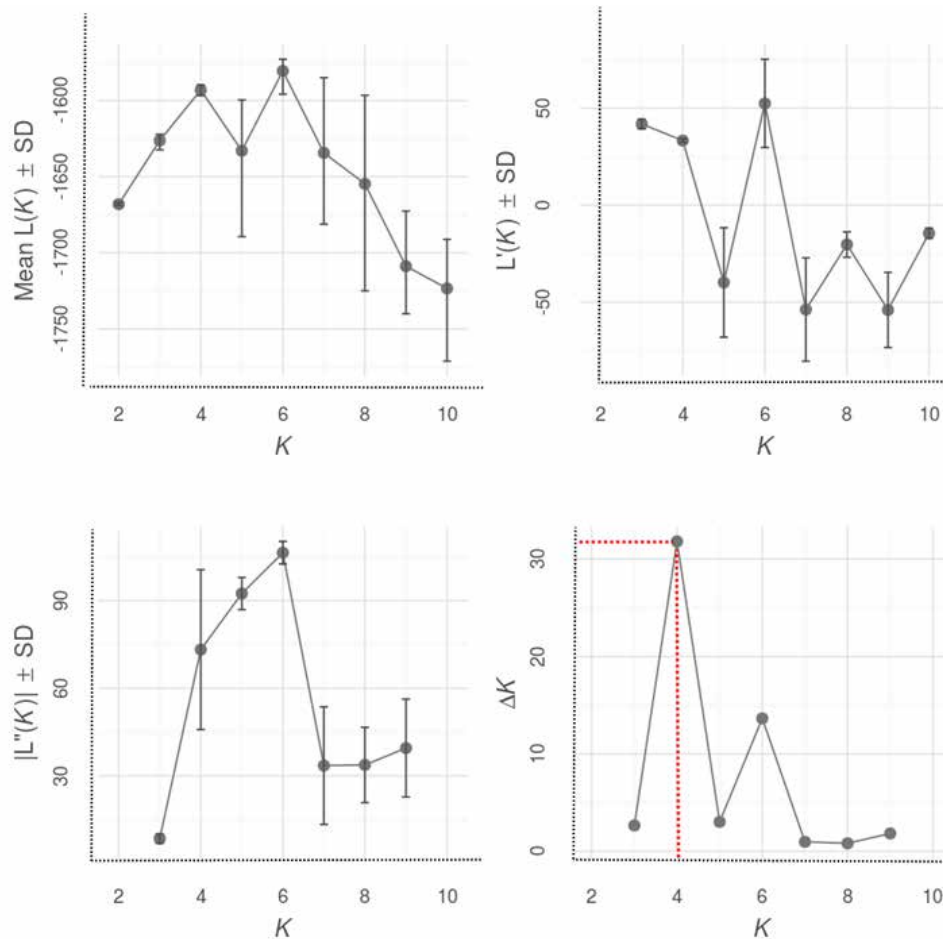


Рис. 2. Результаты анализа генетической структуры белорусской популяции бобра речного для K — от 2 до 9 (адаптировано из <http://pophelper.com/>)

После анализа полученных результатов и их графического представления, было выявлено 37 образцов (32,17% от общего объема выборки), не вошедших ни в один из 4 кластеров: 6 — из Витебской области, 6 — из Гомельской, 21 — из Минской, 4 — из Могилевской, что может быть связано с наличием редких аллелей. Однако, выравнивание и увеличение выборки может снизить процент образ-

цов, не отнесенных ни к одному из кластеров. Наиболее гомогенной оказалась подгруппа из Гомельской области — 71,4% (20/28) особей бобра речного вошли в один кластер, точность отнесения — $87,8 \pm 5,7\%$ (рис. 3). Подгруппа из Минской области разделилась на три кластера: 13,3% (8/60) особей вошли в первый кластер (точность — $84,1 \pm 6,2\%$); 18,3% (11/60) особей составили второй кластер (точ-

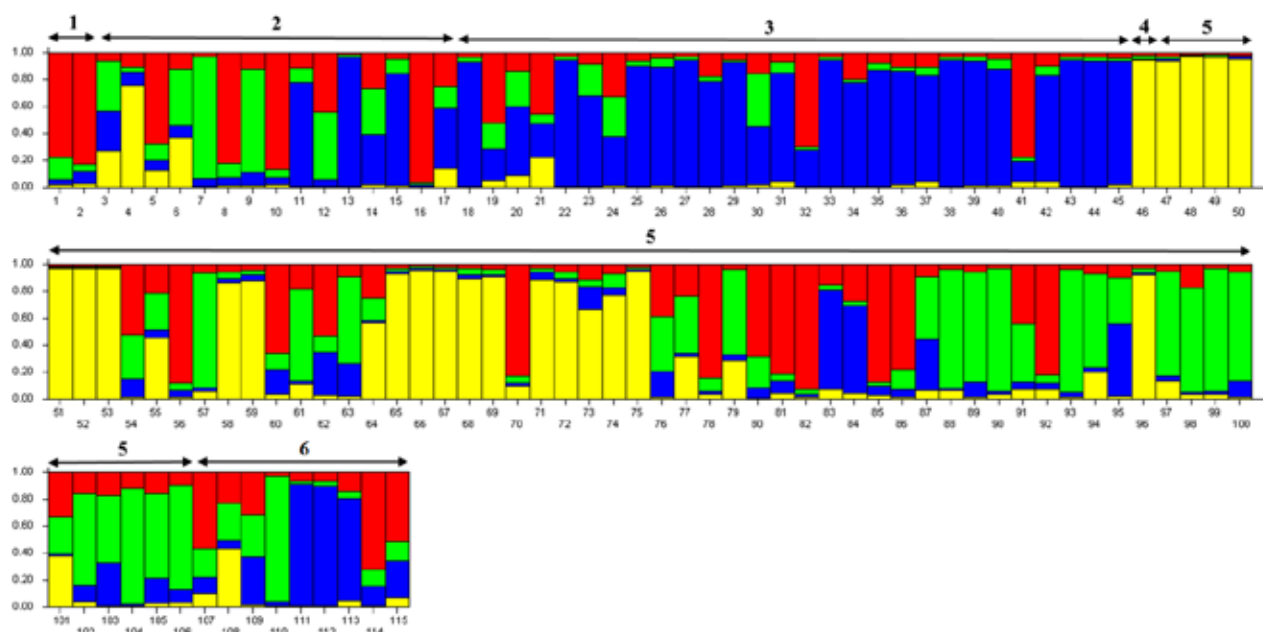


Рис. 3. Результаты кластеризации исследуемой выборки бобра речного для $K = 4$ (адаптировано из Structure v.2.3.4.); 1 — Брестская область, 2 — Витебская область, 3 — Гомельская область, 4 — Гродненская область, 5 — Минская область, 6 — Могилевская область

ность — $84,4 \pm 6,6\%$); 31,7% (19/60) — в третий кластер (точность — $92,4 \pm 5,4\%$). Для подгрупп из других областей Республики Беларусь выраженная подразделенность на кластеры отсутствовала, предположительно из-за небольшого количества особей.

На основании анализа генетических дистанций по маркерам, входящим в тест-систему, построены графики главных компонент

(PCA, Principal Component Analysis). На рисунках 4–5 представлены результаты анализа главных компонент для 115 образцов исследуемой выборки бобра речного.

Согласно полученным данным, на долю первых трех компонент приходится 71,6% вариации признака, отражающие взаимное сходство или различие исследованных особей бобра речного.

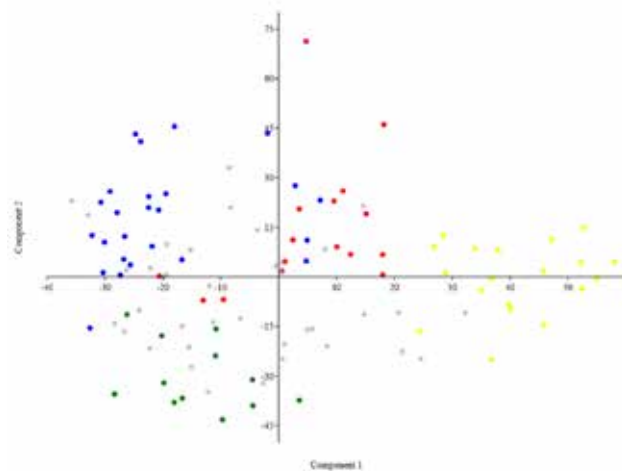


Рис. 4. Результаты анализа главных компонент 1 и 2 (по совокупности 8 STR-локусов) для 115 образцов бобра речного; цветовая палитра аналогична представленной на рис. 3. Серым цветом обозначены образцы, не вошедшие ни в один кластер

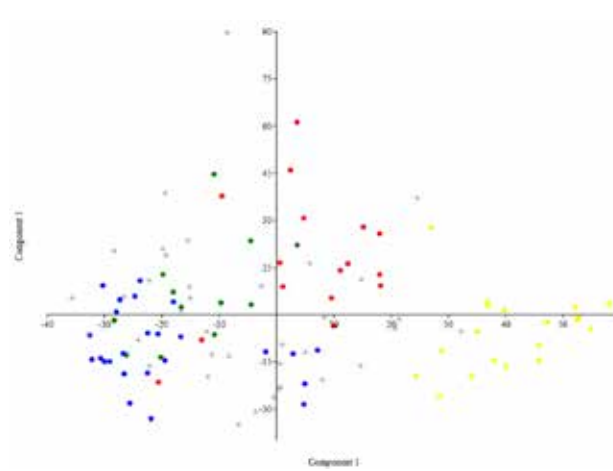


Рис. 5. Результаты анализа главных компонент 1 и 3 (по совокупности 8 STR-локусов) для 115 образцов бобра речного; цветовая палитра аналогична представленной на рис. 3. Серым цветом обозначены образцы, не вошедшие ни в один кластер

Заключение

В результате проведенного исследования создана мультилокусная тест-система, состоящая из девяти STR-локусов (*CF17*, *CF18*, *CF19*, *CF30*, *CF33*, *CF44*, *CF49*, *Csa8*, *Csa62*), позволяющая проводить идентификацию особей бобра речного.

При анализе научной литературы и результатов собственных исследований выборки бобра речного (*Castor fiber*), географически локализованного на территории Республики Беларусь, установлено, что рассчитанные параметры генетического разнообразия сопоставимы с данными из аналогичных исследований бобров в других странах Европы. Для всех популяций характерен невысокий уровень полиморфизма STR-локусов, который можно объяснить прохождением популяций бобра речного через эффект «бутылочного горлышка». В исследованной нами выборке бобра речного в большинстве локусов были обнаружены относительно невысокие значения числа эффективных аллелей (N_e), что можно объяснить наличием в этих локусах редких аллелей, наблюдающихся также и для популяций бобра в других странах Европы.

Комплексное значение вероятности случайного совпадения для системы из восьми микросателлитов составило $105,245 \times 10^{-7}$. Значение вероятности разделения двух неродственных особей по комплексу выявляемых признаков достигло 99,9989%.

Список использованных источников

1. Fatty acid composition, cholesterol content and lipid oxidation indices of intramuscular fat from skeletal muscles of beaver (*Castor fiber* L.) / P. Domaradzki [et al.] // Meat Sci. – 2019. – Vol. 150. – P. 131–140.
2. First case of *Trichinella spiralis* infection in beavers (*Castor fiber*) in Poland and Europe / M. Różycki [et al.] // Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. – 2020. – Vol. 11. – P. 46–49.
3. Cytogenetics of beavers: a case of speciation by monobrachial centric fusions / O. G. Ward [et al.] // Genome. – 1991. – Vol. 34, № 3. – P. 324–328.
4. Бондаревич, В. Бобр обыкновенный / В. Бондаревич // Лесное и охотничье хозяйство. – 2015. – № 12. – С. 44–47.
5. Can beaver impact promote river renaturalization? The example of the Raba River, south-

ern Poland / E. Gorczyca [et al.] // Sci. Total Environ. – 2018. – Vol. 615. – P. 1 048–1 060.

6. Mitsch, W. J. Wetlands and carbon revisited / W. J. Mitsch, Ü. Mander // Ecol. Eng. – 2018. – Vol. 114. – P. 1–6.

7. Gariat, D. Beaver ponds' impact on fluvial processes (Beskid Niski Mts., SE Poland) / D. Gariat, E. Gorczyca, M. Sobucki // Sci. Total Environ. – 2016. – Vol. 544. – P. 339–353.

8. Characterization of Fatty Acid Composition in the European Beaver (*Castor fiber* L.) / K. Zalewski [et al.] // Polish J. of Environ. Stud. – 2009. – Vol. 18, № 3. – P. 493–499.

9. Proximate composition and physicochemical properties of European beaver (*Castor fiber* L.) meat / M. Florek [et al.] // Meat Sci. – 2017. – Vol. 123. – P. 8–12.

10. Admixture of two phylogeographic lineages of the Eurasian beaver in Poland / A. Biedrzycka [et al.] // Mamm. Biol. – 2014. – Vol. 79, № 5. – P. 287–296.

11. Официальный сайт «Фауна Беларуси» [интернет ресурс]: Позвоночные Бобр речной или европейский (*Castor fiber*). – Режим доступа: <https://gurkov2n.jimdofree.com/млекопитающие/грызуны/бобр/>. – Дата доступа: 24.09.2022.

12. Охрана окружающей среды в Республике Беларусь: Статистический сборник / Национальный статистический комитет Республики Беларусь; редкол.: И. В. Медведева (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2020. – С. 169–170.

13. Состояние природной среды Беларуси: экологический бюллетень / Е. И. Громадская [и др.]; под общ. ред. к.т.н., С. А. Дубенок. – Минск: РУП «ЦНИИКИВР», 2021. – С. 60–63.

14. Отчет о ведении охотничьего хозяйства за 2021 год. Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://mlh.by/documents/>. – Дата доступа: 18.05.2022.

15. minpriroda.gov.by [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://minpriroda.gov.by/uploads/files/gl-8.pdf>. – Дата доступа: 20.09.2022.

16. Isolation and characterization of microsatellite loci in the beaver (*Castor canadensis*) / J. C. Crawford [et al.] // Mol Ecol Resour. – 2008. – Vol. 8. – P. 616–618.

17. Development of nine new microsatellite loci for the American beaver, *Castor canadensis* (*Rodentia: Castoridae*), and cross-species

- amplification in the European beaver, *Castor fiber* / K. Pelz-Serrano [et al.] // *Mol Ecol Resour.* – 2009. – Vol. 9. – P. 551–554.
18. Frosch, C. First set of microsatellite markers for genetic characterization of the Eurasian beaver (*Castor fiber*) based on tissue and hair samples / C. Frosch, P. Haase, C. Nowak // *Eur J Wildl Res.* – 2011. – Vol. 57, № 3. – P. 679–682.
19. Genetic relationships within colonies suggest genetic monogamy in the Eurasian beaver (*Castor fiber*) / A. Syrůčková [et al.] // *Mamm Res.* – 2015. – Vol. 60. – P. 139–147. – DOI: 10.1007/s13364-015-0219-z
20. Comparison of Czech and Latvian Beaver Population by Microsatellite Analysis and Genetic Differences between *Castor Fiber* and *Castor Canadensis* / M. Ernst [et al.] // *Transylvanian Review.* – 2017. – Vol. 1. – P. 5 339–5 349.
21. Minnig, S. Genetic monitoring of Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Switzerland and implications for the management of the species / S. Minnig, C. Angst, G. Jacob // *Russian J. Theriol.* – 2016. – Vol. 15, № 1. – P. 20–27.
22. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 1990. – Vol. 28, № 3. – P. 495–503. – DOI: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990
23. Peakall, R. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update / R. Peakall, P. E. Smouse // *Bioinformatics.* – 2012. – Vol. 28, № 19. – P. 2 537–2 539. – DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460
24. Pritchard, J. K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics.* – 2000. – Vol. 155, № 2. – P. 945–959.
25. Hammer, Ø. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / Ø. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // *Palaeontologia Electronica.* – 2001. – Vol. 4, № 1. – P. 1–9.
26. Francis, R. M. Pophelper: an R package and web app to analyse and visualize population structure / R. M. Francis // *Mol Ecol Resour.* – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 27–32. – DOI: 10.1111/1755-0998.12509
27. Чесноков, Ю. В. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия / Ю. В. Чесноков, А. М. Артемьева // *Сельскохозяйственная биология.* – 2015. – Т. 50, № 5. – С. 571–578.
28. Шайхутдинова, А. А. Методы оценки биоразнообразия: методические указания / А. А. Шайхутдинова // *Оренбургский гос. ун-т.* – Оренбург: ОГУ, 2019. – 37 с.
29. Кузнецов, В. М. F-статистики Райта: Оценка и интерпретация / В. М. Кузнецов // *Проблемы биологии продуктивных животных.* – 2014. – № 4. – С. 80–104.
30. Forstat [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://fdl-uwc.shinyapps.io/forstat/>. – Дата доступа: 13.10.2022.

A. N. Viarchuk, T. V. Asadchuk

**INVESTIGATION INTO MICROSATELLITE DNA MARKERS
FOR IDENTIFICATION OF EURASIAN BEAVER (*CASTOR FIBER*)
INDIVIDUALS FOR FORENSIC PURPOSES**

Government agency

“Scientific and Practical Center of the State Committee for Forensic Examinations of the Republic of Belarus”
25 Filimonova St., 220114 Minsk, the Republic of Belarus
e-mail: a.n.verchuk@mail.ru

The Eurasian beaver (*Castor fiber*) is one of the forensic examination objects for the identification of which the DNA analysis based on the use of microsatellite markers is most relevant. The aim of work was to develop a test system for the DNA identification of Eurasian beaver individuals as part of forensic activity, as well as to assess the genetic diversity of the population studied using the developed test system. Thirty microsatellite markers, specific to the Eurasian beaver and its closest relative — the North American beaver (*Castor canadensis*), were tested to create a multilocus test system. Using the study results, 9 STR loci (*CF17*, *CF18*, *CF19*, *CF30*, *CF33*, *CF44*, *CF49*, *Cca8*, and *Cca62*) were selected, and a multilocus test system was developed based on them. An assessment of the genetic diversity of the Eurasian beaver population in the Republic of Belarus was provided based on the genotyping results of 115 animals using the test system developed. Analysis of the study findings evidences a low level of the interspecies diversity of the sampling examined.

Keywords: DNA marker, *Castor fiber*, STR markers, mtDNA, forensic examination, genotyping.

Дата поступления в редакцию: 30 января 2023 г.

О. М. Малышева¹, Е. П. Михаленко¹, Ю. В. Полохович¹, Е. И. Кузьминова¹, А. П. Сухарева²,
М. В. Артюшевская³, К. А. Гомолко², А. В. Кильчевский¹

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ АНГИОГЕНЕЗА И ТКАНЕВОГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С ОСЛОЖНЕНИЯМИ НЕОНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА

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

²Учреждение здравоохранения
«Клинический родильный дом Минской области»
Республика Беларусь, 220076, г. Минск, ул. Ф. Скорины, 16

³Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
учреждения образования «Белорусская медицинская академия последиplomного образования»
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3

С целью поиска молекулярных маркеров развития синдрома дыхательного расстройства (СДР), бронхолегочной дисплазии (БЛД) и ретинопатии недоношенных (РН) исследована частота встречаемости полиморфных вариантов генов *MMP2* (-735C > T, -1575G > A), *MMP9* (-1562C > T, 2660A > G), *VEGF* (-2578A > C, -634C > G, +936C > T), *KDR* (-906A > G, 1719T > A), *TGFBI* (-509A > G), *TGFBR1* (TGFBR1*6A) у 325 недоношенных младенцев в сроке гестации 28–36 недель с осложнениями неонатального периода и 242 доношенных новорожденных (группа сравнения).

Обнаружено статистически значимое влияние на риск развития СДР и тяжесть его течения полиморфных вариантов локуса -735C > T гена *MMP2* как независимо (рисковый аллель T и протективный — C), так и в комбинации с другими исследуемыми локусами (шесть протективных комбинаций), и локуса -1562C > T гена *MMP9* только в сочетании с другими локусами (две рисковые, пять протективных комбинаций). У мальчиков степень тяжести течения СДР ассоциирована с полиморфными вариантами локуса -509A > G гена *TGFBI*, в том числе в комбинации с исследуемыми локусами генов *MMP2* и *MMP9*, у девочек течение СДР связано с комбинациями полиморфных вариантов генов *KDR* (1719T > A) и *VEGF* (-2578A > C, +936C > T). Полиморфные варианты локусов 2660A > G гена *MMP9* и TGFBR1*6A гена *TGFBR1* ассоциированы с риском развития ретинопатии независимо и в комбинации с другими локусами.

Ключевые слова: полиморфизм генов, недоношенные новорожденные, синдром дыхательного расстройства, бронхолегочная дисплазия, ретинопатия недоношенных, фактор роста эндотелия сосудов, трансформирующий фактор роста, матриксные металлопротеиназы.

Введение

По статистике Всемирной Организации Здравоохранения ежегодно в мире каждый 10 младенец рождается недоношенным, при этом 10% из них не выживает. В Республике Беларусь неонатальная и младенческая смертность за последние годы снизилась в два раза при сохраняющихся 4% преждевременных родов [1, 2]. Совершенствование мероприятий по выхаживанию детей, рожденных преждевременно, спо-

собствует их выживаемости, но не исключает развитие серьезных нарушений здоровья, которые могут повлиять на их дальнейшую жизнь.

Незрелость органов и систем, характерная недоношенным детям, может способствовать возникновению различных патологий неонатального периода. Синдром дыхательного расстройства (СДР) возникает из-за незрелости легких и дефицита сурфактанта, что приводит к гипоксии и необходимости применения

искусственной вентиляции легких и/или кислородотерапии. В то же время повышенные дозы кислорода негативно влияют на формирующиеся легкие и сетчатку глаза недоношенных детей, что повышает риск развития таких осложнений неонатального периода, как бронхолегочная дисплазия (БЛД) и ретинопатия недоношенных (РН) [3, 4].

Ключевое значение в опосредованном гипоксией воспалении, фиброгенезе легочной паренхимы, ремоделировании сосудистой сети имеют трансформирующий фактор роста TGFβ1, фактор роста эндотелия сосудов VEGF и их рецепторы, матриксные металлопротеиназы (ММП) 2 и 9. В физиологических процессах динамическое изменение концентраций этих соединений строго контролируется, а их избыток или недостаток может привести к нарушению биологических процессов в организме и развитию различных заболеваний. Например, повышенные концентрации ММП-2 и ММП-9 ведут к изменению содержания компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), развитию фиброзной ткани и формированию БЛД, повышенный уровень VEGF — развитию РН [5]. Полиморфные локусы в генах *MMP2*, *MMP9*, *VEGF*, *KDR*, *TGFβ1* и *TGFβR1* могут изменять их экспрессию, снижая или повышая концентрацию белковых продуктов, приводить к модификации структуры белка, влияя на его функцию, что может вызвать нарушение физиологического ангиогенеза и ремоделирования ткани и способствовать развитию различных заболеваний.

Поэтому с целью поиска прогностических маркеров развития СДР и тяжести его течения,

развития БЛД и РН были проанализированы полиморфные локусы $-735C > T$ и $-1575G > A$ гена *MMP2*, $-1562C > T$ и $836A > G$ ($2660A > G$) гена *MMP9*, $-2578A > C$, $-634C > G$ и $+936C > T$ гена *VEGF*, $-906A > G$ и $1719T > A$ гена *KDR*, $-509A > G$ гена *TGFβ1*, *TGFβR1**6A гена *TGFβR1*.

Материалы и методы

В анализ включены 567 образцов ДНК новорожденных, родившихся в УЗ «Клинический родильный дом Минской области». Сбор биологического материала осуществлялся с 2016 по 2020 гг. с письменного информированного согласия законного представителя ребенка и разрешения Комитета по этике БелМАПО на проведение исследований.

Наследственные и врожденные заболевания, ВИЧ-инфекция у матери, инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода, являлись критериями исключения новорожденных из исследования.

Распределение новорожденных по исследуемым патологиям представлено на рисунке 1.

Среди недоношенных новорожденных 87 детей характеризовались наличием осложнений неонатального периода: 44 ребенка имели диагноз ретинопатия недоношенных, 20 детей — диагноз бронхолегочная дисплазия и 23 пациента — сочетание РН и БЛД. Исследуемые осложнения встречались у пациентов в сроке гестации 28–34 недели, при этом БЛД — только у пациентов с СДР тяжелой степени.

У пациентов проведен анализ 11 полиморфных вариантов генов, контролирующих



Рис. 1. Характеристика исследуемой группы новорожденных детей

компоненты системы ангиогенеза и ремоделирования ткани. Выделение геномной ДНК из лейкоцитов венозной крови проводили с помощью метода фенольно-хлороформной экстракции [6]. Для выявления полиморфных вариантов с.-735C > T (rs2285053), с.-1575G > A (rs243866) гена *MMP2* и с.836A > G (2660A > G) p.Gln279Arg (rs17576), с.-1562C > T (rs3918242) гена *MMP9*; с.-634C > G (rs2010963), с.+936C > T (rs3025039) и с.-2578A > C/A > T (rs699947) гена *VEGF*; с.1416T > A (1719T > A), p.Gln472His (rs1870377) и с.-906A > G (rs2071559) гена *KDR* использовали метод ПЦР с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР–ПДРФ). Для анализа полиморфизма с.-509A > G (rs1800469) гена *TGFBI* применяли метод ПЦР в режиме реального времени, а микросателлитного локуса *TGFBR1*6A* гена *TGFBR1* — фрагментный анализ. Шести аланинам (6A) в сигнальном домене рецептора *TGFBR1* соответствовал детектируемый аллель 107 п. н., а девяти аланинам (9A) — аллель 115 п. н.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программного обеспечения GraphPadInStat Version 3.05 и онлайн-ресурса SNPStats. Для сравнения качественных признаков применяли критерий χ^2 . Для проверки достоверности при сравнении частот генотипов в группах использовали точный критерий Фишера и отношение шансов (OR) с расчетом 95% доверительного интервала (CI). Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$. При условии, когда объем выборки не превышал пяти случаев, использовали значение p с поправкой Йетса.

Результаты и обсуждение

Анализ распределения исследуемых полиморфных вариантов генов *MMP2*, *MMP9*, *VEGF*, *KDR*, *TGFBI* и *TGFBR1* проводили в четыре этапа: выявление риска развития СДР, анализ тяжести его течения, оценка риска развития БЛД и РН.

При анализе риска развития СДР у недоношенных новорожденных группу сравнения составили 242 доношенных новорожденных без исследуемых патологий (срок гестации 37–40 недель). Распределение частот полиморф-

ных вариантов исследуемых полиморфных локусов у доношенных новорожденных соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Для выявления риска развития СДР тяжелой степени из 325 недоношенных новорожденных срока гестации 28–36 недель были сформированы две группы наблюдений: группа из 198 недоношенных детей с тяжелой формой СДР, критериями включения в которую являлись сурфактантная терапия, респираторная поддержка более суток, оксигенотерапия после перевода на спонтанное дыхание, и группа из 127 недоношенных новорожденных с СДР умеренной формы (респираторная поддержка не более суток).

Для оценки риска развития БЛД в качестве контроля подобрана группа из 100 недоношенных детей срока гестации 28–34 недели с СДР тяжелой формы без БЛД и РН, для выявления риска развития РН — группа из 187 недоношенных младенцев срока гестации 28–34 недели с СДР различной степени тяжести без исследуемых осложнений.

Определение риска развития СДР и тяжести его течения проводили как с учетом, так и без учета пола, в то время как деление групп с РН и БЛД по полу нецелесообразно из-за небольшого размера выборок. Доношенные новорожденные представлены по полу равномерно (1:1). В группу недоношенных младенцев входило 180 мальчиков (55%) и 145 девочек (45%). Распределение мальчиков и девочек в группах с СДР тяжелой и умеренной формы составляло 59% / 41% и 50% / 50% соответственно.

Помимо независимого анализа локусов в поиске рискованных и протективных полиморфных вариантов, ассоциированных с дыхательными расстройствами и РН, проводилось исследование комбинаций полиморфных локусов как относящихся к одному гену, так и к разным, учитывая их функциональную значимость. Так как ферменты ММП-2 и ММП-9 относятся к классу желатиназ, имеют схожие субстраты для расщепления, функции и регулируются схожими транскрипционными факторами, был проведен анализ сравнения комбинаций локусов, кодирующих их генов *MMP2* и *MMP9*. Сигнал от молекулы фактора роста внутрь клетки передается через его рецептор, поэтому проведен анализ комбинаций локусов генов,

кодирующих факторы роста и их рецепторы: *VEGF/KDR* и *TGFβ1/TGFBR1*. Фактор *TGFβ1* может контролировать экспрессию ММП-2 и ММП-9 на уровне транскрипции, которые, в свою очередь, активируют путем протеолиза латентные *TGFβ1* во внеклеточном матриксе [5, 7]. Исходя из этого, проведен поиск ассоциации комбинаций исследуемых локусов с риском развития и тяжести течения СДР, БЛД и РН.

Определение риска развития СДР у недоношенных новорожденных с учетом и без учета пола

Сравнение групп доношенных и недоношенных новорожденных с СДР без учета пола не выявило значимых различий во встречаемости генотипов исследуемых локусов, за исключением полиморфного локуса $-735C > T$ *MMP2* (rs243866). Обнаружено, что мажорный аллель $-735C$ достоверно реже, а минорный аллель $-735T$ достоверно чаще ($p = 0,047$) встречались в группе недоношенных новорожденных.

При разделении сравниваемых групп по гендерному признаку обнаружено, что генотип 2660AA (rs17576) гена *MMP9* в 1,5 раза чаще встречался у недоношенных девочек ($p = 0,02$). В группе мальчиков достоверных различий распределения частоты встречаемости полиморфных вариантов исследуемых локусов выявлено не было.

Анализ комбинации локусов выявил, что носительство комбинации $-1575GG/-1562CC$ *MMP2/MMP9* повышает риск развития СДР ($p = 0,015$), в то время как ком-

бинации $-1575GG/-1562CT$ *MMP2/MMP9*, $-735CC/-1562CT$ *MMP2/MMP9* снижают этот риск ($p = 0,008$ и $p = 0,016$ соответственно). Комбинация $-2578AA/-906AG$ *VEGF/KDR* встречалась в 1,7 раза чаще в группе доношенных новорожденных, чем в группе недоношенных младенцев ($p = 0,017$). При поиске ассоциации с риском развития СДР сочетания генов, кодирующих ММП и трансформирующий фактор роста и его рецептор, обнаружено, что гетерозигота локуса $-1562C > T$ *MMP9* в составе с гомозиготой 9A/9A гена *TGFBR1* и гомозиготой $-509GG$ гена *TGFβ1* образует две протективные комбинации ($p = 0,02$ и $p = 0,028$ соответственно).

При разделении исследуемых групп по полу выявлено, что сочетание $-1575GG/-1562CT$ *MMP2/MMP9* встречалось в 2,3 раза чаще среди доношенных мальчиков, чем среди недоношенных ($p = 0,007$). У девочек обнаружено, что встречаемость комбинации $-735CC/2660AG$ *MMP2/MMP9* в 1,4 раза выше среди доношенных ($p = 0,036$), чем среди недоношенных. Также показана рисковая значимость в развитии СДР среди недоношенных девочек комбинации $-1562CC/2660AA$ гена *MMP9* ($p = 0,011$), что соответствует рисковому среди девочек генотипу 2660AA гена *MMP9* при независимом анализе локусов.

В таблице 1 представлены повышающие и снижающие риск развития СДР у недоношенных детей полиморфные варианты и их комбинации генов *MMP2*, *MMP9*, *VEGF*, *KDR*, *TGFβ1* и *TGFBR1*.

Таблица 1

Рисковые и протективные полиморфные варианты и их комбинации в развитии СДР

Полиморфные варианты и их комбинации генов <i>VEGF</i> , <i>KDR</i> , <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>TGFβ1</i> , <i>TGFBR1</i>	Выборка, n (N)		OR (95% CI); p		
	Пациенты	Группа сравнения	Все пациенты	Мальчики	Девочки
$-735C$ <i>MMP2</i>	526 (628) ¹	419 (476) ¹	0,70 (0,50–0,99); 0,047		
$-735T$ <i>MMP2</i>	102 (628) ¹	57 (476) ¹	1,43 (1,01–2,02); 0,047		
2660AA <i>MMP9</i>	59 (142) ³	30 (109) ³			1,87 (1,09–3,20); 0,02
$-1575GG/-1562CC$ <i>MMP2/MMP9</i>	126 (296) ¹	75 (235) ¹	1,58 (1,11–2,26); 0,015		

Окончание таблицы 1

Полиморфные варианты и их комбинации генов <i>VEGF</i> , <i>KDR</i> , <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>TGFBI</i> , <i>TGFBR1</i>	Выборка, n (N)		OR (95% CI); p		
	Пациенты	Группа сравнения	Все пациенты	Мальчики	Девочки
-1575GG/-1562CT <i>MMP2/MMP9</i>	35 (296) ¹	48 (235) ¹	0,52 (0,33–0,84); 0,008		
-1575GG/-1562CT <i>MMP2/MMP9</i>	16 (173) ²	23 (107) ²		0,37 (0,19–0,74); 0,007	
-735CC/-1562CT <i>MMP2/MMP9</i>	55 (310) ¹	62 (235) ¹	0,60 (0,40–0,91); 0,016		
-2578AA/-906AG <i>VEGF/KDR</i>	31 (284) ¹	43 (234) ¹	0,54 (0,33–0,90); 0,017		
9A_9A/-1562CT <i>TGFBR1/MMP9</i>	59 (297) ¹	61 (232) ¹	0,62 (0,41–0,93); 0,02		
-509GG/-1562CT <i>TGFBI/MMP9</i>	31 (304) ¹	39 (232) ¹	0,56 (0,34–0,93); 0,028		
-1562CC/2660AA <i>MMP9</i>	59 (139) ³	29 (109) ³			2,03 (1,18–3,50); 0,011
-735CC/2660AG <i>MMP2/MMP9</i>	45 (141) ³	49 (109) ³			0,57 (0,34–0,96); 0,036

Примечание. n — количество новорожденных (аллелей) с исследуемым полиморфным вариантом или их комбинацией, N — общее количество исследуемых новорожденных (аллелей): ¹ — без учета пола; ² — среди мальчиков; ³ — среди девочек. В таблице представлены только статистически значимые различия между сравниваемыми группами

Определение риска тяжести течения СДР у недоношенных новорожденных с учетом и без учета пола

Статистически значимых различий по частотам встречаемости генотипов и аллелей локусов исследуемых генов в изучаемых выборках независимо от пола обнаружено не было. В группе мальчиков с СДР тяжелой степени в гене *TGFBI* аллель -509A встречался в 1,5 раза чаще, чем у мальчиков с СДР умеренной степени, а аллель -509G — в 1,2 раза реже ($p = 0,02$). Также у мальчиков, носителей генотипа -509GG *TGFBI*, риск развития СДР тяжелой степени ($p = 0,02$) снижен. Среди девочек достоверной разницы в частотах распределения генотипов и аллелей исследуемых локусов генов *MMP2*, *MMP9*, *VEGF*, *KDR*, *TGFBI* и *TGFBR1* не выявлено.

При анализе комбинаций локусов обнаружено, что гомозигота по аллелю 6A микросателлитного локуса *TGFBR1**6A совместно с генотипом -735CC и -1575GA гена *MMP2* образует два сочетания, протективных в разви-

тии СДР тяжелой степени ($p = 0,01$ и $p = 0,02$ соответственно). При учете гендерного признака у мальчиков выявлена одна повышающая и шесть снижающих риск развития СДР тяжелой степени комбинации. Так, гетерозигота -509AG гена *TGFBI* в комбинации с гомозиготой GG локуса -1575G > A гена *MMP2* является рискованной ($p = 0,031$) в развитии СДР тяжелой степени. А генотип -509GG гена *TGFBI*, снижающий риск развития СДР тяжелой степени среди мальчиков при независимом анализе локусов, вошел в три протективные комбинации в сочетании с генотипами -1575GG ($p = 0,02$) и -735CC ($p = 0,033$) гена *MMP2*, и 2660AG гена *MMP9* ($p = 0,005$). Также выявлены две благоприятные комбинации, в составе которых содержится гомозигота CC локуса -735C > T гена *MMP2* совместно с гомозиготой 6A/6A микросателлитного локуса гена *TGFBR1* и генотипом 2660AG гена *MMP9* ($p = 0,033$ и $p = 0,038$ соответственно). Обнаружено, что мальчики, носители комбинации +936CT/-2578AA *VEGF*, имели сниженный риск развития СДР тяжелой

степени ($p = 0,039$).

Среди девочек риск развития СДР тяжелой степени повышен при наличии комбинации +936СТ/1719ТА *VEGF/KDR* ($p = 0,021$), а комбинации –2578АС/1719ТТ *VEGF/KDR* ($p = 0,035$) и –509АГ/–1562СС *TGFBI/MMP9*

($p = 0,028$) являются протективными при развитии СДР тяжелой степени.

Все значимые в развитии СДР тяжелой степени полиморфные варианты и их комбинации генов *MMP2*, *MMP9*, *VEGF*, *KDR*, *TGFBI* и *TGFBR1* представлены в таблице 2.

Таблица 2

Рисковые и протективные полиморфные варианты и их комбинации в развитии СДР тяжелой степени

Полиморфные варианты и их комбинации генов <i>VEGF</i> , <i>KDR</i> , <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>TGFBI</i> , <i>TGFBR1</i>	Выборка, n (N)		OR (95% CI); p		
	Пациенты	Группа сравнения	Все пациенты	Мальчики	Девочки
–509А <i>TGFBI</i>	85 (218) ²	31 (120) ²		1,84 (1,12–3,0); 0,02	
–509G <i>TGFBI</i>	133 (218) ²	89 (120) ²		0,55 (0,33–0,89); 0,02	
–509GG <i>TGFBI</i>	41 (109) ²	34 (109) ²		0,46 (0,24–0,88); 0,02	
6А_6А/–1575GA <i>TGFBR1/MMP2</i>	4 (183) ¹	10 (117) ¹	0,24 (0,07–0,78); 0,02		
6А_6А/–735СС <i>TGFBR1/MMP2</i>	10 (181) ¹	17 (116) ¹	0,34 (0,15–0,77); 0,01		
6А_6А/–735СС <i>TGFBR1/MMP2</i>	4 (109) ²	8 (57) ²		0,23 (0,07–0,81); 0,033	
–735СС/2660АГ <i>MMP2/MMP9</i>	28 (112) ²	25 (61) ²		0,48 (0,25–0,93); 0,038	
+936СТ/–2578АА <i>VEGF</i>	4 (111) ²	8 (60) ²		0,24 (0,07–0,84); 0,039	
–509АГ/–1575GG <i>TGFBI/MMP2</i>	35 (109) ²	10 (60) ²		2,37 (1,07–5,21); 0,031	
–509GG/–1575GG <i>TGFBI/MMP2</i>	18 (109) ²	20 (60) ²		0,40 (0,19–0,83); 0,02	
–509GG/–735СС <i>TGFBI/MMP2</i>	25 (108) ²	24 (60) ²		0,45 (0,23–0,90); 0,033	
–509GG/2660АГ <i>TGFBI/MMP9</i>	15 (109) ²	20 (60) ²		0,32 (0,15–0,69); 0,005	
–509АГ/–1562СС <i>TGFBI/MMP9</i>	18 (73) ³	27 (62) ³			0,42 (0,20–0,88); 0,028
+936СТ/1719ТА <i>VEGF/KDR</i>	13 (76) ³	2 (61) ³			6,09 (1,32–28,1); 0,021
–2578АС/1719ТТ <i>VEGF/KDR</i>	15 (73) ³	23 (61) ³			0,43 (0,20–0,92); 0,035

Примечание. n — количество новорожденных (аллелей) с исследуемым полиморфным вариантом или их комбинацией, N — общее количество исследуемых новорожденных (аллелей): ¹ — без учета пола; ² — среди мальчиков; ³ — среди девочек. В таблице представлены только статистически значимые различия между сравниваемыми группами

Определение риска развития БЛД у недоношенных новорожденных

Независимый и комбинативный анализ локусов генов *MMP2*, *MMP9*, *VEGF*, *KDR*, *TGFBI* и *TGFBR1* выявил повышенный риск развития БЛД только у носителей комбинации $-509GG/2660GG$ *TGFBI/MMP9* ($p = 0,03$).

Определение риска развития РН у недоношенных новорожденных

Статистически значимые различия в частотах распределения генотипов 11 исследуемых локусов генов *MMP2*, *MMP9*, *VEGF*, *KDR*, *TGFBI* и *TGFBR1* между недоношенными новорожденными с РН и контрольной для них группой обнаружены только в локусе $2660A > G$ гена *MMP9*: генотип 2660AA достоверно чаще встречался у новорожденных с РН ($p = 0,02$), а 2660AG — у новорожденных без данного осложнения ($p = 0,029$).

Поиск комбинаций полиморфных вариантов исследуемых генов, ассоциированных с риском развития РН, выявил пять рискованных и три протективных сочетания. Так, частота встречаемости комбинации $-2578AA/-906AA$ *VEGF/KDR* в 2,2 раза выше у младенцев с РН, чем у недоношенных детей без осложнений в сроке гестации 28–34 недели ($p = 0,047$). Также риск развития ретинопатии недоношенных повышен у носителей комбинаций, в составе

которых встречается выявленный при независимом анализе рискованный в развитии РН генотип 2660AA гена *MMP9*: $-735CT/2660AA$ *MMP2/MMP9* ($p = 0,044$), $-1575GG/2660AA$ *MMP2/MMP9* ($p = 0,024$), $-1562CC/2660AA$ *MMP9* ($p = 0,013$). В группе младенцев с РН встречаемость комбинации $6A_9A/-1575AA$ *TGFBR1/MMP2* составила 6,5%, в то время как в контрольной группе такая комбинация не встречалась ($p = 0,005$).

Две комбинации, в состав которых входит выявленная при независимом анализе протективная гетерозигота 2660AG гена *MMP9*, снижают риск развития РН: $9A_9A/2660AG$ *TGFBR1/MMP9* ($p = 0,04$) и $-509GG/2660AG$ *TGFBI/MMP9* ($p = 0,03$). Также протективным является сочетание гомозиготы по аллелю 9A микросателлитного локуса *TGFBR1**6A и гомозиготы CC локуса $735C > T$ гена *MMP2* ($p = 0,037$).

В таблице 3 представлены все значимые в развитии БЛД и РН полиморфные варианты и их комбинации генов *MMP2*, *MMP9*, *VEGF*, *KDR*, *TGFBI* и *TGFBR1*.

На рисунке 2 представлены генотипы, аллели, комбинации генотипов исследуемых локусов генов *VEGF*, *KDR*, *MMP2*, *MMP9*, *TGFBI*, *TGFBR1*, для которых выявлены статистически значимые различия в группах сравнения.

Таблица 3

Рисковые и протективные полиморфные варианты и их комбинации в развитии БЛД и РН

Полиморфные варианты и их комбинации генов <i>VEGF</i> , <i>KDR</i> , <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>TGFBI</i> , <i>TGFBR1</i>	Выборка, n (N)		OR (95% CI); p
	Пациенты	Группа сравнения	
Риск развития БЛД			
$-509GG/2660GG$ <i>TGFBI/MMP9</i>	6 (38)	3 (94)	5,69 (1,34–24,1); 0,03
Риск развития РН			
2660AA <i>MMP9</i>	37 (66)	70 (182)	2,04 (1,15–3,61); 0,02
2660AG <i>MMP9</i>	20 (66)	85 (182)	0,50 (0,27–0,90); 0,029
$-2578AA/-906AA$ <i>VEGF/KDR</i>	10 (60)	13 (174)	2,48 (1,02–5,99); 0,047
$-735CT/2660AA$ <i>MMP2/MMP9</i>	10 (65)	12 (180)	2,55 (1,04–6,22); 0,044
$-1575GG/2660AA$ <i>MMP2/MMP9</i>	25 (65)	43 (182)	2,02 (1,10–3,70); 0,024

Окончание таблицы 3

Полиморфные варианты и их комбинации генов <i>VEGF, KDR, MMP2, MMP9, TGFB1, TGFBR1</i>	Выборка, n (N)		OR (95% CI); p
	Пациенты	Группа сравнения	
-1562CC/2660AA <i>MMP9</i>	37 (64)	70 (179)	2,13 (1,20–3,81); 0,013
6A_9A/-1575AA <i>TGFBR1/MMP2</i>	4 (62)	0 (172)	26,5 (1,4–500,7); 0,005
9A_9A/-735CC <i>TGFBR1/MMP2</i>	25 (62)	96 (169)	0,51 (0,28–0,93); 0,037
9A_9A/2660AG <i>TGFBR1/MMP9</i>	13 (63)	60 (171)	0,48 (0,24–0,96); 0,04
-509GG/2660AG <i>TGFBI/MMP9</i>	4 (61)	34 (176)	0,29 (0,10–0,86); 0,033

Примечание. n — количество новорожденных с исследуемым полиморфным вариантом или их комбинацией, N — общее количество исследуемых новорожденных

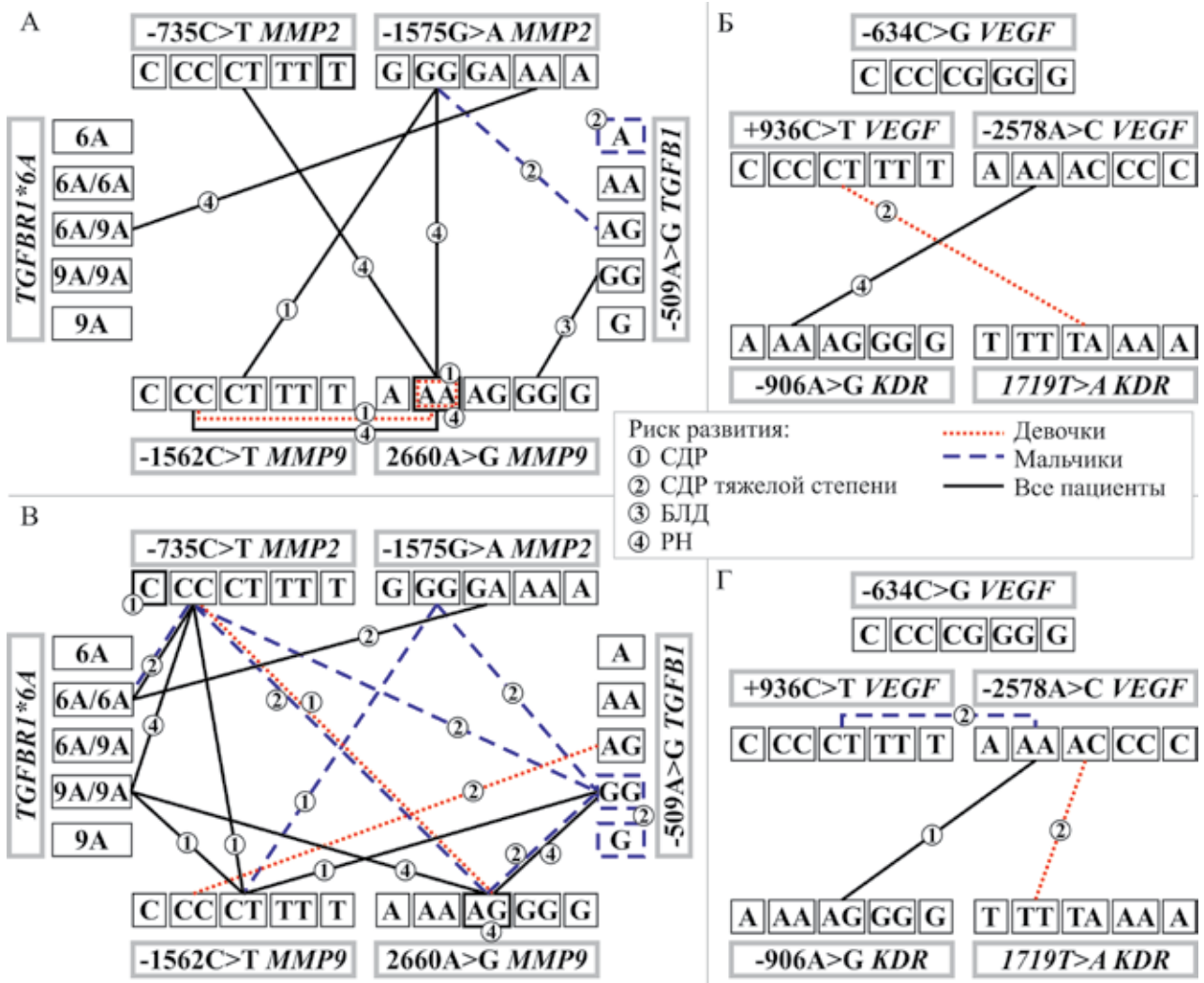


Рис. 2. Рисковые (А, Б) и протективные (В, Г) генотипы локусов и их комбинации генов *VEGF, KDR, MMP2, MMP9, TGFB1, TGFBR1* в развитии и тяжести течения СДР, БЛД и РН

Рассматриваемые полиморфизмы генов *VEGF*, *KDR*, *MMP2*, *MMP9*, *TGFBI*, *TGFBR1* имеют функциональное значение: локусы, расположенные в промоторной области гена, ответственны за дифференцированную экспрессию генов за счет изменения взаимодействия между транскрипционными факторами и сайтами их связывания; локусы, расположенные в экзонах, ответственны за модификацию структуры белков.

Однонуклеотидные полиморфные варианты генов *VEGF* и *KDR*, рассматриваемые независимо друг от друга в нашем исследовании, не показали значимой ассоциации с риском развития СДР, тяжести его течения, РН и БЛД. Схожие результаты были получены у М. Mahlman с соавторами при поиске ассоциации 31 полиморфизма генов *VEGF* и *KDR* с риском развития БЛД в финской популяции [8]. В других исследованиях показано, что аллель $-634G$ локуса rs2010963 гена *VEGF* является рисковым в развитии БЛД в японской популяции [9], ассоциирован с тяжестью течения РН среди младенцев из Египта и Турции, что характерно и для аллеля $+936T$ (rs3025039) гена *VEGF* [10, 11]. Повышен риск развития диабетической РН у носителей аллеля C локуса $-2578C > A$ (rs699947) гена *VEGF* в азиатской популяции и индонезийцев, но не в европейской популяции [12]. В этом же локусе аллель A встречался достоверно реже у турецких мальчиков с РН 4–5 стадии по сравнению с недоношенными без РН или с РН 1–3 стадии [11]. В исследованиях Yuan с соавторами не наблюдалось связи локуса $-906A > G$ гена *KDR* с диабетической и пролиферативной диабетической РН у пациентов Северного Китая, хотя в других исследованиях такая связь была выявлена [13]. Противоречивые результаты разных исследователей об ассоциации полиморфных локусов генов *VEGF* и *KDR* и риска развития БЛД и РН, могут быть связаны с этнической принадлежностью, размером выборки, дизайном исследования, включением или исключением критериев в анализе.

Снижение риска развития СДР при наличии комбинации $-2578AA/-906AG$ *VEGF/KDR* и тяжести его течения у мальчиков при наличии сочетания $+936CT/-2578AA$ *VEGF* с функциональной точки зрения может обеспечиваться генотипом $-906AG$ и $+936CT$

соответственно, так как генотип $-2578AA$ снижает уровень экспрессии гена *VEGF* за счет изменения сайта связывания с фактором транскрипции, что нарушает ангиогенез и способствует нарастанию дыхательной недостаточности [14]. В локусе $+936C > T$ (rs3025039) гена *VEGF* и $-906A > G$ (rs2071559) гена *KDR* потеря потенциального сайта связывания с транскрипционными факторами, снижение экспрессии гена и уровня белка в плазме происходит при наличии аллелей T и G соответственно [15, 16].

Рисковая $+936CT/1719TA$ *VEGF/KDR* и протективная $-2578AC/1719TT$ *VEGF/KDR* комбинации, ассоциированные с тяжестью течения СДР у девочек, объясняются, вероятно, кумулятивным функциональным действием входящих в них генотипов. У носителей генотипа TT локуса $1719T > A$ (rs1870377) гена *KDR* эффективность связывания рецептора с фактором роста эндотелия сосудов не изменена (при генотипе AA — снижена) [16].

Комбинаций генотипов локусов генов *VEGF* и/или *KDR*, сопряженных с развитием БЛД и РН, не выявлено, за исключением рисковой в развитии РН $-2578AA/-906AA$ *VEGF/KDR*. Гипероксией индуцированное снижение концентрации фактора роста *VEGF* в сочетании с генотипом $-2578AA$ играют ключевую роль в развитии первой фазы РН.

Отсутствие значимых в определении риска развития РН результатов при независимом анализе локусов генов *VEGF* и *KDR* и только одна выявленная рисковая комбинация (при известном факте участия *VEGF* в неоваскуляризации и ангиогенезе), вероятно, объясняется небольшим размером выборки пациентов с осложнением, акцентом на риск развития РН, а не тяжестью ее течения (пациентов с 1–3 и 4–5 стадиями РН были объединены в одну группу).

В нашем исследовании в наибольшее количество комбинаций, как рискованных, так и протективных, входили локусы генов *MMP2* и *MMP9*.

Концентрация ММП динамически изменяется как в физиологических, так и в патологических процессах. Низкая активность ММП-2 является фактором риска развития дыхательных нарушений у недоношенных новорожденных, при этом для развития БЛД необходима высокая концентрация ММП-2 в первые дни после рождения [17]. Однако в дальнейшем,

уже при наличии БЛД, наблюдаются сниженные концентрации ММП-2 и повышенные концентрации ММП-9 [18]. При кислородной терапии и/или ИВЛ у недоношенных новорожденных происходит увеличение уровня TGFβ1 (контролирует экспрессию ММП-2 и ММП-9), что приводит к воспалению, индуцированному гипоксией острым повреждению легких и развитию БЛД [19].

Обнаруженный в нашем исследовании повышающий риск развития СДР без учета пола аллель Т локуса $-735C > T$ (rs2285053) гена *MMP2* снижает активность промотора, концентрацию белка в плазме, что повышает риск развития дыхательных осложнений у недоношенных детей [20]. Протективный в развитии СДР без учета пола аллель $-735C$ и комбинации, в состав которых входит генотип $-735CC$ гена *MMP2* ($-735CC/-1562CT$ *MMP2/MMP9* без учета пола, $-735CC/2660AG$ *MMP2/MMP9* у девочек) (рис. 2В), обеспечивают снижение риска развития СДР и тяжести его течения за счет нормальной или повышенной активности промоторов их генов.

Повышающая риск развития СДР комбинация $-1575GG/-1562CC$ *MMP2/MMP9* вне зависимости от пола и комбинация $-1562CC/2660AA$ гена *MMP9* у девочек функционально объясняется генотипом CC локуса $-1562C > T$ гена *MMP9* (аллель C обеспечивает связь промотора гена с ингибитором транскрипции) при нормальной активности промотора гена *MMP2* (генотип GG локуса $-1575G > A$) и нормальной аффинности ММП-9 с субстратом (генотип $2660AA$ *MMP9*) [20]. В то же время выявленная при независимом анализе рисковость генотипа $2660AA$ гена *MMP9* у девочек, вероятно, обеспечивается другими факторами.

Комбинации $9A_9A/-1562CT$ *TGFBR1/MMP9*, $-735CC/-1562CT$ *MMP2/MMP9* и $-509GG/-1562CT$ *TGFBI/MMP9* без учета пола и $-1575GG/-1562CT$ *MMP2/MMP9* у мальчиков снижают риск развития СДР, что функционально обеспечивается кумулятивным эффектом входящих в них генотипов, одним из которых во всех 4 вариантах является гетерозигота локуса $-1562C > T$ гена *MMP9*.

В развитии СДР тяжелой формы среди мальчиков статистически значимые результаты показал локус $-509A > G$ гена *TGFBI* как неза-

висимо, так и в сочетании с локусами других генов. Так, рисковый аллель $-509A$ увеличивает сродство промотора к транскрипционному фактору на 30%, тем самым увеличивает уровни TGFβ1 в плазме и опосредованно влияет на воспаление и ремоделирование дыхательных путей [21], что объясняет и рисковость комбинации $-509AG/-1575GG$ *TGFBI/MMP2* (генотип GG локуса $-1575G > A$ гена *MMP2* обеспечивает нормальную активность промотора). Аллель $-509G$ и генотип $-509GG$, снижающие активность промотора гена *TGFBI*, а также сочетания этого генотипа с локусами генов *MMP2* и *MMP9*, характеризуются протективным эффектом в риске развития СДР тяжелой степени у мальчиков. У девочек протективные свойства комбинации $-509AG/-1562CC$ *TGFBI/MMP9* в риске развития СДР тяжелой степени, вероятно, обеспечиваются аллелем G гетерозиготы локуса $-509AG$ гена *TGFBI*. Противоречивые результаты показаны относительно ассоциации этого полиморфного локуса и заболеваний дыхательной системы: например, как генотип AA [21], так и генотип GG [22] был связан с повышенным риском развития астмы.

У носителей комбинаций $6A_6A/-735CC$ *TGFBR1/MMP2* (особенно среди мальчиков), $6A_6A/-1575GA$ *TGFBR1/MMP2* риск развития СДР тяжелой степени снижен, что функционально связано с генотипами локусов гена *MMP2*. Генотипу $6A$ соответствует делеция трех аланинов в гидрофобном ядре сигнальной последовательности рецептора. В результате посттрансляционного расщепления пробелка TGFBR1 высвобождаются разные сигнальные пептиды, один из которых короче на три аланина, в результате чего рецептор обладает сниженной активностью передачи рост-ингибирующих сигналов [23, 24].

Рисковая в развитии БЛД комбинация $-509GG/2660GG$ *TGFBI/MMP9* приводит к снижению активности промотора гена *TGFBI* и снижению аффинности связывания ММП-9 с субстратом (при генотипе GG изменяется конформация белка ММП-9), что функционально должно снижать риск развития БЛД. Вероятно, противоположный эффект выявленного сочетания генотипов обеспечивается другими факторами. По литературным данным зависимости этого локуса с риском

развития БЛД выявлено не было [25].

Повышающие риск развития РН сочетания генотипов исследуемых локусов функционально определяются входящим в их состав генотипом АА локуса 2660А > G гена *MMP9* (связывание фермента с субстратом не нарушено, что способствует неоваскуляризации) и генотипами других локусов, обеспечивающих нормальную активность промоторов их генов. Протективный в развитии РН генотип 2660AG гена *MMP9*, выявленный при независимом исследовании локусов, обеспечивает протективность комбинаций 9А_9А/2660AG *TGFBR1/MMP9* и –509GG/2660AG *TGFBR1/MMP9*. Гомозигота по варианту 9А гена *TGFBR1* в сочетании с генотипом –735СС гена *MMP2* снижает риск развития РН, а гетерозигота 6А/9А локуса *TGFBR1**6А в комбинации с –1575АА гена *MMP2* — увеличивает, что функционально обеспечивается вариантами локуса *TGFBR1**6А.

Так как рассматриваемые заболевания являются полиэтиологическими, выявленные рисковые полиморфные варианты рассматриваются как один из факторов, способствующих развитию патологии.

Заключение

Выявлено влияние локуса –735С > Т гена *MMP2* на риск развития СДР при независимом исследовании локусов: аллель Т — рисковый, аллель С — протективный без учета пола. При комбинативном анализе определены шесть снижающих риск развития СДР и тяжесть его течения сочетаний генотипа –735СС с локусами генов *MMP9*, *TGFBR1* и *TGFBR1*.

Обнаружено статистически значимое влияние на риск развития СДР как с учетом, так и без учета пола локуса –1562С > Т гена *MMP9* только в комбинации с другими локусами, рисковый из которых без учета пола является –1575GG/–1562СС *MMP2/MMP9*.

Определены статистически значимые различия в ассоциации полиморфных вариантов изучаемых локусов с развитием и течением СДР с учетом пола. Так, у девочек значимым в развитии СДР является генотип 2660АА локуса 2660А > G гена *MMP9*, который образует значимые комбинации с другими локусами, рисковый из них является –1562СС/2660АА *MMP9*. Значимым в развитии тяжелой формы

СДР у девочек является локус 1719Т > А гена *KDR* (только в комбинации с другими локусами), а у мальчиков — локус –509А > G гена *TGFBR1* (аллель –509А — рисковый, аллель –509G и генотип –509GG — протективные). У девочек риск развития СДР тяжелой степени связан с комбинацией +936СТ/1719ТА *VEGF/KDR*, у мальчиков — с комбинацией –509AG/–1575GG *TGFBR1/MMP2*.

Риск развития БЛД и РН у недоношенных новорожденных срока гестации 28–34 недели связан с полиморфными вариантами локуса 2660А > G гена *MMP9*. Риск развития БЛД повышен у носителей комбинации –509GG/2660GG *TGFBR1/MMP9*. С риском развития ретинопатии ассоциированы генотип 2660АА *MMP9* и три комбинации, в состав которых он входит.

С риском развития РН связаны также комбинации локусов 6А_9А/–1575АА *TGFBR1/MMP2* и –2578АА/–906АА *VEGF/KDR*.

Полученные данные могут быть использованы в клинической практике в качестве генетических маркеров раннего выявления осложнений перинатального периода, что позволит скорректировать тактику лечения недоношенных новорожденных, увеличить показатели выживаемости, а также снизить тяжесть инвалидности детей.

Список использованных источников

1. Child mortality and causes of death [Electronic resource] // World Health Organization. – Mode of access: <https://www.who.int/data/gho/data/indicators>. – Date of access: 07.08.2023.
2. Гнедько, Т. В. Технологии выхаживания недоношенных детей: индикаторы эффективности внедрения / Т. В. Гнедько // Рос. Вестн. Перинат. Педиатр. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 102–109.
3. Chandrasekharan, P. Complications of prematurity: an infographic / P. Chandrasekharan, M. Rawat, S. Lakshminrusimha // J. Perinatol. – 2017. – Vol. 37. – P. 1 185–1 186.
4. Retinopathy of prematurity: a review of risk factors and their clinical significance / S. J. Kim [et al.] // Surv. Ophthalmol. – 2018. – Vol. 63. – P. 618–637.
5. Krstic, J. Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating

- myeloid cells [Electronic resource] / J. Krstic, J. F. Santibanez // *Sci. World. J.* – 2014. – A. 521754. – P. 1–14. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/521754>. – Date of access: 04.08.2023.
6. Mathew, C. C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA / C.C. Mathew // *Methods in Molecular Biology*. – Clifton: Human Press. – 1984. – Vol. 2, № 4. – P. 31–34.
7. Cui, N. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases / N. Cui, M. Hu, R. A. Khalil // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2017. – Vol. 147. – P. 1–73.
8. Genes encoding vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and VEGF receptor 2 (VEGFR-2) and risk for bronchopulmonary dysplasia / M. Mahlman [et al.] // *Neonatology*. – 2015. – Vol. 108. – P. 53–59.
9. Association of a vascular endothelial growth factor polymorphism with the development of bronchopulmonary dysplasia in Japanese premature newborns [Electronic resource] / K. Fujioka [et al.] // *Sci. Rep.* – 2014. – A. 4459. – Mode of access: <https://DOI: 10.1038/srep04459>. – Date of access: 04.08.2023.
10. An updated and comprehensive meta-analysis of association between *VEGFA* –634G > C, –460T > C, +405G > C and +936C > T polymorphisms and retinopathy of prematurity risk, fetal and pediatric pathology [Electronic resource] / M. Gohari [et al.] // *Fet. Pediatr. Pathol.* – 2019. – P. 1–17. – Mode of access: doi:10.1080/15513815.2019.1703227. – Date of access: 12.12.2022.
11. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in neonatal pathologies: a systematic search and narrative synthesis of the literature / M. G. Hasmasanu [et al.] // *Children*. – 2023. – Mode of access: <https://www.mdpi.com/2227-9067/10/4/744>. – Date of access: 04.08.2023.
12. Polymorphisms of vascular endothelial growth factor –2578C/A rs699947 are risk factors for diabetic retinopathy in type-2 diabetes mellitus patients in Bali, Indonesia / W. A. Rachel [et al.] // *BioMed*. – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 11–17.
13. Association between the VEGFR-2 -604T/C polymorphism (rs2071559) and type 2 diabetic retinopathy [Electronic resource] / Y. Yuan [et al.] // *Open. Life. Sci.* – 2023. – Vol. 18. – Mode of access: <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0081>. – Date of access: 04.08.2023.
14. Association of rs699947 (–2578 C/A) and rs2010963 (–634 G/C) single nucleotide polymorphisms of the *VEGF* gene, VEGF-A and leptin serum level, and cardiovascular risk in patients with excess body mass: a case-control study [Electronic resource] / D. Skrypnik [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2020. – Vol. 9. – P. 1–16. – Mode of access: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/2/469>. – Date of access: 04.08.2023.
15. Association of the rs2071559 (T/C) polymorphism with lymphatic metastasis in patients with nasopharyngeal carcinoma / K. Hu [et al.] // *Onc. Lett.* – 2017. – Vol. 14, № 6. – P. 7 681–7 686.
16. Germline polymorphisms of the *VEGF* pathway predict recurrence in nonadvanced differentiated thyroid cancer / V. Marotta [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2017. – Vol. 102, № 2. – P. 661–671.
17. Very low birth weight outcomes of the national institute of child health and human development neonatal network / M. Hack [et al.] // *Pediatrics*. – 1991. – Vol. 87. – P. 587–597.
18. Вязовая, И. В. Бронхолегочная дисплазия у детей в фокусе фенотип-ассоциированных полиморфизмов кандидатных генов / И. В. Вязовая, П. Б. Хиштилова // *Фарматека*. – 2021. – № 10. – С. 46–51.
19. Conditional overexpression of *TGFβ1* promotes pulmonary inflammation, apoptosis and mortality via *TGFβR2* in the developing mouse lung [Electronic resource] / A. Sureshbabu [et al.] // *Resp. Res.* – 2015. – Vol. 16. – Mode of access: <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0162-6>. – Date of access: 04.08.2023.
20. Полиморфизмы генов *MMP2* и *MMP9* у недоношенных новорожденных с синдромом дыхательных расстройств / О. М. Малышева [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика*. – 2020. – Т. 28. – С. 59–69.
21. Transforming growth factor-b1 C-509T polymorphism, oxidant stress, and early-onset childhood asthma / M. T. Salam [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2007. – Vol. 176. – P. 1 192–1 199.
22. Variants in *TGFBI*, dust mite exposure, and disease severity in children with asthma / S. Sharma [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2009. – Vol. 179, № 5. – P. 356–362.
23. Somatic acquisition and signaling of *TGFBR1*6A* in cancer / B. Pasche [et al.] //

JAMA. – 2005. – Vol. 294. – P. 1 634–1 646.

24. TGFBR1*6A as a modifier of breast cancer risk and progression: advances and future prospects [Electronic resource] / K. Agyemang [et al.] // Breast. Cancer. – 2022. – Vol. 84. – P. 1–9. – Mode of access: [https://doi.org/10.1038/s41523-](https://doi.org/10.1038/s41523-022-00446-6)

022-00446-6. – Date of access: 04.08.2023.

25. Беляшова, М. А. Молекулярно-генетические механизмы развития бронхолегочной дисплазии / М. А. Беляшова, Д. Ю. Овсянников, Л. М. Огородова // Неонат. Нов. Мнен. Обучен. – 2015. – № 3. – С. 50–68.

V. M. Malysheva¹, A. P. Mikhalenka¹, Yu. V. Paliukhovich¹, E. I. Kuzminova¹, A. P. Sukharava², M. V. Artsiusheuskaya³, K. A. Gamolka², A. V. Kilchevsky¹

GENETIC POLYMORPHISM OF ANGIOGENESIS AND TISSUE REMODELING SYSTEM COMPONENTS IN PREMATURE NEWBORNS WITH NEONATAL COMPLICATION

¹State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220076 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: o.malysheva@igc.by

²Clinical Maternity Hospital of Minsk Region

16 F. Skoriny St., 220114 Minsk, the Republic of Belarus

³State Educational Establishment

“Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”

3/3 P. Brovkiy St., 220013 Minsk, the Republic of Belarus

The allele frequency and genotype distribution of *MMP2* (–735C > T, –1575G > A), *MMP9* (–1562C > T, 2660A > G), *VEGF* (–2578A > C, –634C > G, +936C > T), *KDR* (–906A > G, 1719T > A), *TGFBI* (–509A > G), *TGFBR1* (TGFBR1*6A) polymorphisms were investigated in 325 preterm neonates with a gestational age 28–36 weeks and in 242 full-term newborns (comparison group) in order to search for molecular markers in the development of respiratory distress syndrome (RDS), bronchopulmonary dysplasia (BPD) and retinopathy of prematurity (ROP).

A statistically significant effect on the risk of RDS development and its severity was found for the –735C > T *MMP2* polymorphism, both independently (risk T allele and protective C allele), and in combination with other studied loci (6 protective combinations), and for the –1562C > T *MMP9* polymorphism only in combination with other loci (2 risk and 5 protective combinations). In boys, the RDS severity is associated with the *TGFBI* –509A > G gene polymorphism, including in combination with the analyzed *MMP2* and *MMP9* loci; in girls, the RDS severity is associated with the combinations of polymorphic variants of the *KDR* (1719T > A) and *VEGF* (–2578A > C, +936C > T) genes. The *MMP9* 2660A > G polymorphism and the TGFBR1*6A microsatellite are associated with the risk of a retinopathy incidence, both independently and in combination with other loci.

Keywords: gene polymorphism, premature newborns, respiratory distress syndrome, bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity, vascular endothelial growth factor, transforming growth factor, matrix metalloproteinases.

Дата поступления в редакцию: 31 августа 2023 г.

А. А. Яцкив¹, Н. В. Никитченко¹, А. Г. Белькевич², И. А. Козыро², Р. И. Гончарова¹

СПЕКТР ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ В ЭКЗОНАХ И НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ОБЛАСТЯХ ГЕНОВ *NPHS1* И *NPHS2* У ПАЦИЕНТОВ С НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

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

²Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»
Республика Беларусь, 220083, г. Минск, пр. Дзержинского, 83

Определен спектр полиморфных вариантов генов *NPHS1* и *NPHS2* в экзонах, 5'- и 3'- не транслируемых областях (UTR) у 47 детей с нефротическим синдромом (НС). Посредством высокопроизводительного секвенирования полных последовательностей этих генов выявлено 22 SNP: из них 31,8% замен были синонимичными, 22,7% — не синонимичными и 45,5% — вариантами в UTR. Несмотря на относительно небольшой объем выборки, удалось установить 44,0% (для гена *NPHS1*) и 78,6% (для гена *NPHS2*) содержащихся в базе Ensemble SNP исследуемых областей. Распределение аллелей по выявленным SNP среди белорусских пациентов с НС совпадает с распределением аллелей в европейской популяции. Показано, что аллель А в локусе rs12406197 5' UTR гена *NPHS2* ассоциирован с гематурией (OR 3,3 [1,30–8,69], $p = 0,017$) при НС, которая является предиктором неблагоприятного почечного прогноза. Этот же вариант на уровне тенденции чаще встречался при стероид-резистентной форме заболевания, чем при стероид-зависимой (OR 3,68 [1,08–12,6], $p = 0,057$).

Ключевые слова: нефротический синдром, стероид-резистентность, генетический полиморфизм, *NPHS1*, *NPHS2*.

Введение

Нефротический синдром (НС) представляет собой клинико-лабораторный симптомокомплекс, характеризующийся протеинурией, гипопроteinемией с гипоальбуминемией, гиперлипидемией и отеками. Ежегодная частота возникновения НС составляет 2–7 первичных случаев на 100 000 детского населения, распространенность — 12–16 случаев [1]. У большинства детей НС является идиопатическим. В 10–20% случаев у пациентов наблюдается отсутствие ответа на стандартную терапию глюкокортикоидами, или стероид-резистентность (СР), которая ассоциирована с высоким риском развития хронической почечной недостаточности (ХПН).

В основе патогенеза НС лежит увеличение проницаемости клубочкового фильтра вследствие функционального или структурного повреждения. Фильтрационный барьер состоит из эндотелия капилляров, базальной мембраны

и щелей между ножками подоцитов — особых эпителиальных клеток на внешней поверхности клубочкового фильтрационного барьера. Первым в качестве неотъемлемого компонента щелевой диафрагмы был идентифицирован белок нефрин, выполняющий как структурные, так и сигнальные функции [2].

Показано, что протеинурия, обусловленная нарушением синтеза нефрина, возникает на ранних стадиях повреждения клубочков, и существует положительная корреляция данного явления с тяжестью заболеваний почек [3].

Передача сигналов, индуцируемых нефрином, значительно усиливается подоцином, который связывается с цитоплазматическим хвостом нефрина [4]. Подоцин экспрессируется почти исключительно в подоцитах клубочков. Нарушение передачи сигналов через комплекс нефрин-подоцин способствует развитию дисфункции подоцитов. На сегодняшний день накоплено довольно много данных

о связи дефектов подоцина с протеинурией и терминальной стадией хронической болезни почки (ХБП) как у животных, так и у людей. Так, нокаут гена *nphs2* приводит к протеинурии и ХБП у мышей, а унаследованные мутации *NPHS2* являются основной причиной стероид-резистентного НС у детей, который неизменно прогрессирует до терминальной ХБП [5–9].

Следует отметить, что основной фокус внимания исследований изменчивости генов *NPHS1*, *NPHS2* был направлен на обнаружение патогенных мутаций, и работы, посвященные изучению более частых вариантов, так называемых SNP, относительно редки. Чаще всего в них фигурирует миссенс-вариант p.R229Q гена *NPHS2*.

Кроме того, общеизвестно, что значительная часть SNP, ассоциированных с развитием патологических состояний, локализована в некодирующих областях генов, и установление их функциональной значимости сильно осложнено. Генетические вариации в нетранслируемых областях могут модифицировать регуляторные элементы и тем самым влиять на взаимодействие UTR с белками и микроРНК. Изменение этих регуляторных механизмов способно нарушить нормальное протекание клеточных процессов, потенциально приводя к развитию заболевания. Имеются данные, что генетические вариации в UTR играют роль в развитии таких патологий, как болезнь Альцгеймера, синдром ломкой X-хромосомы, биполярное расстройство, множественная миелома, меланома, рак молочной железы [10, 11].

Работы по изучению генетического полиморфизма генов *NPHS1* и *NPHS2* вне последовательности экзонов единичны, касаются промоторной области и экзон-интронных границ гена *NPHS2* в группах пациентов итальянского, индийского и китайского происхождения [12–15].

В данной статье представлены впервые полученные результаты анализа генетического полиморфизма полных последовательностей экзонов и нетранслируемых областей генов *NPHS1* и *NPHS2* у детей с НС в Республике Беларусь.

Материалы и методы

Исследуемая группа состояла из 47 пациентов с НС, проходивших лечение на базе педиатрического отделения № 1 (для нефрологи-

ческих больных) УЗ «2-я городская детская клиническая больница» г. Минска (табл. 1). В зависимости от морфологических изменений пациенты с НС разделены на группы: болезнь минимальных изменений (БМИ), фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), диффузный мезангиопролиферативный гломерулонефрит (ДМПГН). Геномную ДНК выделяли из образцов периферической цельной крови стандартным фенол-хлороформным методом. Полные последовательности генов *NPHS1* и *NPHS2* амплифицировали с помощью long-range ПЦР (фрагменты в 5,3–8,5 kb). Целевые бэнды вырезали из агарозного геля и очищали с помощью набора реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб», комплектация «G» (ОДО «Праймтех»). Для приготовления библиотек использовали набор реагентов «Illumina DNA Prep» (Illumina). Высокопроизводительное секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina). Файлы .vcf генерировали с помощью инструментов, доступных на платформе Galaxy (<http://usegalaxy.org>). Аннотацию вариантов выполняли в веб-версии программного пакета ANNOVAR (<http://wannovar.wglab.org/>). Для поиска полиморфных вариантов в экзонах и UTR-областях исследуемых генов использовали фильтр по частоте (>0,01). Для оценки выявляемости SNP в исследуемых кодирующих и нетранслируемых областях генов обратились к данным проекта Ensembl. К общим перечням вариантов применили следующие фильтры: «Global MAF: 0.011–0.5», «Class: SNP», «Consequences: only exonic + 5 prime UTR variant + 3 prime UTR variant». Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ IBM SPSS Statistics 22.0 (SPSS Inc.), STATISTICA 7.0 (Statsoft), MS Excel 2010. Статистическую значимость различий между изучаемыми группами определяли с помощью Wilcoxon Signed-Rank-test и двустороннего точного критерия Фишера. Об ассоциации генотипов или аллелей с заболеванием судили по величине показателя отношения шансов и 95% доверительного интервала. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных высокопроизводительного секвенирования позволил оце-

Таблица 1

Клинико-anamнестическая характеристика исследуемой группы пациентов

Группы и подгруппы исследования	Число пациентов	Пол	Возраст (годы на момент обследования)	Возраст дебюта заболевания (годы)	Ответ на гормональную терапию	Гематурия	Артериальная гипертензия
	n (%)	м / ж n (%)	Средняя (m ± SD) Медиана (25–75%)	Средняя (m ± SD) Медиана (25–75%)	СЧ / СР / СЗ n (%)	Есть / нет n (%)	Есть / нет n (%)
Общая группа	47 (100,0)	31 / 16 (66 / 34)	7 ± 5,28 5 (3–11)	3,2 ± 2,92 2,6 (0–16,8)	6 / 29 / 12 (13 / 62 / 25)	17 / 30 (36 / 64)	18 / 29 (38 / 62)
Морфологические варианты НС по результатам нефробиопсии							
БМИ	12 (25,5)	8 / 4 (67 / 33)	10 ± 4,81 10 (5,8–15)	2,8 ± 0,57 2,9 (2,5–3,3)	0 / 8 / 4 (0 / 67 / 33)	1 / 11 (8 / 92)	1 / 11 (8 / 92)
ФСГС	17 (36,2)	13 / 4 (77 / 23)	8 ± 5,87 5 (4–15)	4,5 ± 4,29 3 (2–3,8)	0 / 14 / 3 (0 / 82 / 18)	8 / 9 (47 / 53)	10 / 7 (59 / 41)
ДМПГН	11 (23,4)	8 / 3 (73 / 27)	5 ± 4,81 3 (1,3–8,5)	1,8 ± 1,70 1,6 (0,3–2,4)	0 / 9 / 2 (0 / 82 / 18)	5 / 6 (45 / 55)	7 / 4 (64 / 26)
Нефробиопсия не показана или не информативна	7 (14,9)	2 / 5 (29 / 71)	4 ± 1,91 4 (3–5,5)	2,5 ± 1,32 2,3 (2,1–3,5)	6 / 1 / 0 (86 / 14 / 0)	3 / 4 (43 / 57)	0 / 7 (0 / 100)

Примечание. m ± SD (среднее значение плюс, минус стандартное отклонение); стероид-чувствительный (СЧ), стероид-резистентный (СР), стероид-зависимый (СЗ); болезнь минимальных изменений (БМИ), фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), диффузный мезангиопролиферативный гломерулонефрит (ДМПГН)

нить полиморфизм генов *NPHS1* и *NPHS2* в исследуемой выборке пациентов с НС. Выявлено 22 полиморфных варианта в кодирующих и UTR-областях генов (табл. 2); в том числе 31,8% замен были синонимичными, 22,7% — не синонимичными и 45,5% — вариантами в UTR-областях.

База данных проекта Ensemble содержит информацию о 23 SNP в 29 экзонах и UTRs гена *NPHS1* (при этом 12 замен являются довольно редкими полиморфными вариантами с частотой минорного аллеля от 1 до 5%) и 14 SNP в 8 экзонах и UTRs гена *NPHS2* (из них 3 также имеют частоту минорного аллеля в пределах 1–5%). Таким образом, несмотря на относительно небольшой объем выборки, нам удалось установить 78,6% SNP исследуемых областей в гене *NPHS2*. Что касается гена *NPHS1*, то выявленных rs148755697 и rs113825926 не оказалось в полученном перечне SNP из Ensemble. Эти два варианта были автоматически отфильтрованы ввиду низкой общей частоты минорного аллеля (0,01 и 0,004

соответственно), в то время как частота в базе Gnomad (NFE), которую использовали для фильтрации данных, полученных в исследовании, составила 0,03173 и 0,01339, соответственно. С учетом этих двух вариантов в исследуемой выборке выявлено 44,0% известных в экзонах и нетранслируемых областях SNPs.

Все обнаруженные варианты содержатся в базе данных ClinVar, и почти все из них классифицированы как доброкачественные/вероятно доброкачественные, 1 патогенная/вероятно патогенная несинонимичная замена и 1 замена неопределенного клинического значения в UTR.

Сравнение частот альтернативных аллелей в исследуемой выборке и в базе данных Gnomad_NFE не выявило статистически значимых различий (*p-value* = 0,7646 для *NPHS2* и *p-value* = 0,3652 для *NPHS1*), то есть в целом распределение аллелей по выявленным SNP в генах *NPHS1* и *NPHS2* среди белорусских пациентов с НС совпадает с распределением аллелей в европейской популяции.

Таблица 2
Перечень выявленных SNP в генах *NPHS1*, *NPHS2* с указанием частоты альтернативного аллеля в базах данных и в исследуемой выборке

Ген	rs	Функциональное значение	Альтернативный аллель	Частота в Gnomad_total	Частота в Gnomad NFE	Частота в исследуемой выборке	ClinVar (ID, классификация)	GWAS Catalog
<i>NPHS2</i>	rs1079292	synonymous, p.G34G	C	0,971	0,993	0,987	260424, B	-
	rs1410592	synonymous, p.A250A	A	0,6184	0,6308	0,592	260432, B	-
	rs3738423	synonymous, p.S96S	A	0,07543	0,08498	0,051	260426, B/LB	-
	rs3818587	synonymous, p.L278L	C	0,07549	0,08503	0,122	260425, B/LB	-
	rs12406197	5' UTR, c.*51G > T	A	0,2458	0,2774	0,388	225144, B	-
	rs1410590	3' UTR, c.*157G > A	T	0,9126	0,932	0,915	224483, B	-
	rs1410591	3' UTR, *54G > C	G	0,6139	0,6299	0,592	293845, B	-
	rs2274622	3' UTR, c.*258A > G	C	0,2334	0,2772	0,244	224485, B	-
	rs2274623	3' UTR, c.*200G > A	T	0,162	0,2039	0,256	224484, B	-
	rs1060775	3' UTR, c.*428A > G	C	0,9098	0,9318	0,913	224486, B	-
	rs6174728	missense, p.R229Q	T	0,03025	0,03601	0,037	5370, P(4); LP(3); VUS(8); B(1)	+
	rs2071327	synonymous, p.S1105S	T	0,3939	0,3849	0,5	259497, B	-
	rs392702	synonymous, p.P440P	A	0,04953	0,03287	0,024	259484, B	-
	rs437168	synonymous, p.V763V	A	0,08751	0,03534	0,025	259489, B	-
rs73928331	5' UTR, c.-81C > G	C	0,1498	0,02989	0,024	328887, B	-	
<i>NPHS1</i>	rs148755697	3' UTR, c.**529C > T	A	0,02199	0,03173	0,026	328849, VUS	-
	rs71354105	3' UTR, c.*538G > A	T	0,07071	0,1025	0,103	328848, LB	-
	rs80296922	3' UTR, c.*706A > G	C	0,03692	0,05277	0,122	328846, LB	-
	rs33950747	missense, p.R408Q	T	0,04859	0,06283	0,095	259482, B/LB	-
	rs3814995	missense, p.E117K	T	0,3195	0,3102	0,329	259500, B	+
	rs4806213	missense, p.N1077S	C	0,09709	0,0969	0,073	259496, B	-
	rs113825926	missense, p.T294I	A	0,00797	0,01339	0,024	259508, B/LB	-

По данным GWAS Catalog, полиморфный вариант rs3814995 гена *NPHS1* ассоциирован со скоростью гломерулярной фильтрации и уровнем сывороточного креатинина и витамина Д; rs61747728 гена *NPHS2* — с уровнями тромбомодулина, рецептора фактора некроза опухоли II, витамина Д и диастолическим артериальным давлением. Тромбоэмболические осложнения являются достаточно распространенным явлением при НС [16]. Ткаczyk М. и др. показали, что у детей с НС обнаруживаются маркеры эндотелиальной дисфункции, в том числе повышенный тромбомодулин (интегральный мембранный белок, рецептор тромбина, находящийся на клетках эндотелия кровеносных сосудов и участвующий в системе антикоагуляции), при этом их уровень коррелирует со степенью активности заболевания [17].

Полиморфный вариант rs61747728 (p.R229Q) гена *NPHS2* ранее был описан как «не нейтральный» и ассоциирован с развитием микроальбуминурии в общей популяции [18]. В популяциях европейского происхождения частота минорного аллеля варьируется от 2 до 7% [19]. Гомозиготность по данному варианту не всегда приводит к развитию НС, что можно объяснить следующим: либо он не является патогенным сам по себе, либо его пенетрантность неполная. Kerti А. и др. предположили, что данный вариант не является каузальным, но модифицирует эффект вариантов в других генах [20]. Toru К. и др. проливает свет на механизм, посредством которого замена p.R229Q может обуславливать возникновение заболевания. Авторы показали, что данный вариант является причиной СР НС только при сочетании с некоторыми мутациями гена *NPHS2*, особенно в экзонах 7 и 8, которые приводят к заменам С-концевых аминокислот подоцина [21]. Это было подтверждено Phelan Р. J. и др.: при СР НС патогенные мутации L327F у мальчика с ФСГС и А297V у девочки с БМИ (обе локализованы в экзоне 8) были выявлены в компаунд-гетерозиготе с вариантом R229Q [22].

Предположительно, негативный эффект варианта p.R229Q обусловлен нарушением гетеродимеризации и локализации белка [21]. Анализ *in silico*, проведенный Joshi В. В. и др. также показал наибольший вероятно повреждающий эффект замены p.R229Q (по срав-

нению с p.G35D и p.P20L) [15].

Показано, что у лиц, несущих p.R229Q в компаунд-гетерозиготе с патогенной мутацией в *NPHS2*, наблюдается менее тяжелое течение НС с более поздним началом заболевания, чем в случае пациентов с двумя патогенными мутациями [21]. В нашем исследовании полиморфный вариант rs61747728 p.R229Q обнаружен у двух пациентов (частота минорного аллеля 3,7%): в гетерозиготном состоянии при СЧ НС, возраст дебюта заболевания 3 года 6 месяцев и в гомозиготном состоянии при врожденном СР НС. Следует отметить, что в последнем случае у пациента помимо p.R229Q было выявлено две патогенных мутации в гене *NPHS1* в гетерозиготном состоянии.

В связи с тем, что артериальная гипертензия (АГ) и гематурия (ГУ) при НС являются предикторами неблагоприятного прогноза, свидетельствующими о более тяжелом поражении почек [23], мы проанализировали наличие связи выявленных полиморфных вариантов генов *NPHS1* и *NPHS2* с данными клинико-лабораторными проявлениями в исследуемой выборке. При этом в группе пациентов со СР НС распространенность ГУ была в 2,6 раза выше, чем при СЗ НС (43% против 16,6%), хотя эти различия и не достигли уровня статистической значимости ($p = 0,15$).

Как следует из данных таблицы 3, альтернативный аллель А в локусе rs12406197 5' UTR гена *NPHS2* значительно чаще обнаруживался среди пациентов с ГУ (56,6% против 28,0%, OR 3,3 [1,30–8,69], $p = 0,017$). Кроме того, в группе пациентов со СР НС данный вариант встречался в 2,2 раза чаще, чем в группе с СЗ НС (44,0% против 20,0%, OR 3,68 [1,08–12,6], $p = 0,057$).

В работе Wynn S. R, посвященной проблеме долгосрочного прогноза для пациентов с НС, было показано, что СР является признаком неблагоприятного исхода заболевания. Среди пациентов, умерших от почечных причин, ГУ изначально присутствовала у 41,0% пациентов и АГ — у 22,0%, по сравнению с 14,0% и 10,0% соответственно, среди тех, кто был жив на момент проведения исследования [24]. Также есть данные о том, что ГУ значительно чаще наблюдается ($p = 0,008$) у пациентов с часто рецидивирующим НС (два и более рецидива в течение шести месяцев после пер-

Таблица 3
Распределение частот аллелей в полиморфных локусах генов *NPHS1* и *NPHS2* при различных вариантах HC

Ген	rs	Аллель	Частота, %											
			CP HC	C3 HC	P-value	AG+	AG-	P-value	ГУ+	ГУ-	P-value			
<i>NPHS2</i>	rs1079292	C	1	0,95	0,29	1,0	0,98	1,0	0,98	1,0	0,98	1,0	1,0	
	rs1410592	A	0,652	0,389	0,77	0,61	0,59	1,0	0,60	0,81	0,60	0,81	0,81	
	rs3738423	A	0,063	0,056	1,0	0,1	0,02	0,29	0,04	0,99	0,04	0,99	0,99	
	rs3818587	C	0,06	0,1	0,62	0,09	0,04	0,64	0,06	1,0	0,04	1,0	1,0	
	rs12406197	A	0,44	0,2	0,057 OR 3,68 [1,08–12,6]	0,47	0,33	0,24	0,566	0,28	0,017 OR 3,3 [1,30–8,69]	0,28	0,017 OR 3,3 [1,30–8,69]	0,28
	rs1410590	T	0,92	0,85	0,66	0,94	0,89	0,69	0,906	0,92	1,0	0,92	1,0	
	rs1410591	G	0,652	0,389	0,09	0,61	0,59	1,0	0,57	0,60	0,81	0,60	0,81	
	rs2274622	C	0,28	0,2	0,56	0,25	0,25	1,0	0,16	0,30	0,19	0,30	0,19	
	rs2274623	T	0,196	0,35	0,21	0,21	0,27	0,78	0,25	0,26	1,0	0,26	1,0	
	rs1060775	C	0,917	0,85	0,66	0,93	0,89	0,7	0,90	0,92	1,0	0,92	1,0	
<i>NPHS1</i>	rs61747728	T	0,038	0	1,0	0,058	0,02	0,57	0,058	0,57	0,021	0,57	0,57	
	rs2071327	T	0,479	0,5	1,0	0,44	0,54	0,49	0,47	0,52	0,52	0,81	0,81	
	rs392702	A	0,04	0	1,0	0,066	0	0,13	0,066	0	0	0,13	0,13	
	rs437168	A	0,042	0	0,57	0,066	0	0,13	0,066	0	0	0,14	0,14	
	rs73928331	C	0,038	0	1,0	0,058	0	0,17	0,063	0	0	0,14	0,14	
	rs148755697	A	0,045	0	0,54	0,035	0,02	1,0	0	0,04	0,04	0,55	0,55	
	rs71354105	T	0,114	0,136	1,0	0,14	0,08	0,46	0,12	0,1	1,0	0,1	1,0	
	rs80296922	C	0,114	0,111	1,0	0,07	0,16	0,46	0,038	0,166	0,14	0,166	0,14	
	rs33950747	T	0,06	0,182	0,19	0,06	0,12	0,47	0,093	0,96	1,0	0,96	1,0	
	rs3814995	T	0,312	0,273	0,78	0,30	0,34	0,8	0,3	0,35	0,81	0,35	0,81	
rs4806213	C	0,04	0	1,0	0,06	0,08	1,0	0,13	0,04	0,18	0,04	0,18		
rs113825926	A	0,019	0	1,0	0,03	0,02	1,0	0,058	0	0,16	0	0,16		

воначального ответа на терапию или четыре и более рецидива в течение одного года) [25].

Хотя непосредственно вариант rs12406197 (с.–51G > T) гена *NPHS2* в базе данных ClinVar обозначен как доброкачественный, в этой же базе содержится запись о патогенном гаплотипе с.[–52C > G(;)-51G > T] (Variation ID: 225143). Считается, что мутации *NPHS2* связаны с патологией почек по аутосомно-рецессивному типу, то есть требуют наличия в генотипе гомозиготного варианта или компунд-гетерозиготы, и значение случаев только с одним гетерозиготным вариантом не вполне понятно. Развитие заболевания, вероятно, связано с наличием дополнительных мутаций в регуляторных регионах гена, либо мутации *NPHS2* взаимодействуют с другими генами и вносят вклад в развитие заболевания только в определенном генетическом окружении [5].

Oleggini R. и др. показали, что область промотора гена *NPHS2* с позиции –628 до АТG-кодона может специфически направлять экспрессию подоцина в разных клеточных линиях, включая клетки гломерулярного эпителия [26]. Так, в работе Di Duca M. и др. выявлены три функциональных полиморфных варианта в промоторе *NPHS2* (–51Т, –116Т и –535 insСТТТТТТТ3), которые определяли значительное снижение (на 73,0; 59,0; и 82,0%, соответственно) экспрессии гена-репортера в трансфицированных подоцитах. Кроме того, авторы показали, что дикие варианты аллелей образовывали специфичные комплексы ДНК-белок. В случае с аллелем –51G, комплекс формировался с фактором USF1 (upstream stimulatory factor-1) [12], что может свидетельствовать в пользу функционального значения нуклеотидной замены rs12406197 (с.–51G > T).

Таким образом, полиморфный локус rs12406197, расположенный в 5' UTR гена *NPHS2*, ассоциирован с ГУ при НС у детей в Республике Беларусь.

Следует отметить, что исследуемая в настоящей работе выборка на 87,0% состоит из пациентов со СР и СЗ НС. Это не дает возможности оценить локус rs12406197 на предмет ассоциации с часто рецидивирующим течением НС у детей в Республике Беларусь в рамках представленной статьи. Однако анализ полученных результатов в совокупности с данными

из источников литературы позволяет предположить, что такая связь может существовать, и rs12406197 — потенциальный ДНК-маркер, который в комплексе с другими клинико-лабораторными данными может быть применен для выделения пациентов с НС в группу высокого риска частых рецидивов заболевания.

Заключение

С помощью высокопроизводительного секвенирования исследован спектр полиморфных вариантов кодирующих и нетранслируемых областей генов нефрина (*NPHS1*) и подоцина (*NPHS2*) у педиатрических пациентов с нефротическим синдромом.

Было идентифицировано 22 полиморфных варианта с частотой альтернативного аллеля в европейской популяции от 1,3 до 99,3%. Значительная часть замен — 45,5% — локализована в нетранслируемых областях генов, 31,8% замен были синонимичными, 22,7% — не синонимичными.

Показано, что аллель А в локусе rs12406197 в 5' UTR гена *NPHS2* ассоциирован с гематурией (OR 3,3 [1,30–8,69], $p = 0,017$), которая является предиктором неблагоприятного прогноза при нефротическом синдроме. Этот же вариант на уровне тенденции чаще встречался при стероид-резистентной форме заболевания, чем при стероид-зависимой (OR 3,68 [1,08–12,6], $p = 0,057$). Таким образом, данный локус можно рекомендовать в качестве ДНК-маркера для определения стратегии лечения и прогноза заболевания у пациентов с НС.

Работа выполнена в рамках задания 2.2.4 ГПНИ «Биотехнологии-2» на 2021–2025 гг.

Список использованных источников

1. Детская нефрология / под ред. Э. Лойманн, А. Н. Цыгин, А. А. Саркисян. – Москва: Литтера, 2010. – 390 с.
2. Patrakka, J. Nephritin — a unique structural and signaling protein of the kidney filter / J. Patrakka, K. Tryggvason // Trends in molecular medicine. – 2007. – Vol. 13, № 9. – P. 396–403.
3. Nephritin — a biomarker of early glomerular injury / Y. Kandasamy [et al.] // Biomarker research. – 2014. – Vol. 2, № 21. – P. 1–8.
4. Interaction with podocin facilitates nephritin signaling / T. B. Huber [et al.] // Journal of

- biological chemistry. – 2001. – Vol. 276, № 45. – P. 41 543–41 546.
5. Identification of podocin (NPHS2) gene mutations in African Americans with nondiabetic end-stage renal disease / J. A. Dusel [et al.] // *Kidney Int.* – 2005. – Vol. 68. – P. 256–262.
6. Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice / S. Roselli [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 550–560.
7. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome / N. Boute [et al.] // *Nat. Genet.* – 2000. – Vol. 24. – P. 349–354.
8. Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation in patients with mutations of podocin / R. Bertelli [et al.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 2003. – Vol. 41. – P. 1 314–1 321.
9. Caridi, G. NPHS2 (Podocin) mutations in nephrotic syndrome. Clinical spectrum and fine mechanisms / G. Caridi, F. Perfumo, G. M. Ghiggiari // *Pediatr. Res.* – 2005. – Vol. 57. – P. 54–61.
10. Genome-wide functional screen of 3' UTR variants uncovers causal variants for human disease and evolution / D. Griesemer [et al.] // *Cell.* – 2021. – Vol. 184, № 20. – P. 5 247–5 260.
11. Genetic variants in mRNA untranslated regions / M. Steri [et al.] // *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA.* – 2018. – Vol. 9, № 4. – e1474.
12. Cis and trans regulatory elements in NPHS2 promoter: Implications in proteinuria and progression of renal diseases / M. Di Duca [et al.] // *Kidney international.* – 2006. – Vol. 70, № 7. – P. 1 332–1 341.
13. Molecular analysis of NPHS2 and ACTN4 genes in a series of 33 Italian patients affected by adult-onset nonfamilial focal segmental glomerulosclerosis / F. Aucella [et al.] // *Nephron Clinical Practice.* – 2005. – Vol. 99, № 2. – P. c31–c36.
14. Mutations in NPHS2 in familial steroid-resistant nephrotic syndrome in Southern Chinese Han ethnic group / R. Fu [et al.] // *Zhonghua er ke za zhi = Chinese Journal of Pediatrics.* – 2008. – Vol. 46, № 8. – P. 591–596.
15. Characterization of NPHS2 gene polymorphisms associated to steroid resistance nephrotic syndrome in Indian children / B. B. Joshi [et al.] // *Gene.* – 2017. – Vol. 628. – P. 134–140.
16. Singhal, R. Thromboembolic complications in the nephrotic syndrome: pathophysiology and clinical management / R. Singhal, K. S. Brimble // *Thrombosis research.* – 2006. – Vol. 118, № 3. – P. 397–407.
17. Markers of endothelial dysfunction in children with idiopathic nephrotic syndrome / M. Tkaczyk [et al.] // *American journal of nephrology.* – 2008. – Vol. 28, № 2. – P. 197–202.
18. NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population / A. C. Pereira [et al.] // *Kidney Int.* – 2004. – Vol. 65. – P. 1 026–1 030.
19. NPHS2 gene, nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review / N. Franceschini [et al.] // *Genetics in Medicine.* – 2006. – Vol. 8, № 2. – P. 63–75.
20. NPHS2 homozygous p.R229Q variant: potential modifier instead of causal effect in focal segmental glomerulosclerosis / A. Kerti [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2013. – Vol. 28, № 10. – P. 2 061–2 064.
21. Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome / K. Tory [et al.] // *Nat. Genet.* – 2014. – Vol. 46, № 3. – P. 299–304.
22. Variability in phenotype induced by the podocin variant R229Q plus a single pathogenic mutation / P. J. Phelan [et al.] // *Clinical Kidney Journal.* – 2015. – Vol. 8, № 5. – P. 538–542.
23. Клинические и морфологические особенности фокально-сегментарного гломерулосклероза у детей казахской национальности / А. Е. Наушабаева [и др.] // *Клиническая нефрология.* – 2013. – № 2. – С. 51–53.
24. Wynn, S. R. Long-term prognosis for children with nephrotic syndrome / S. R. Wynn, G. B. Stickler, E. C. Burke // *Clinical pediatrics.* – 1988. – Vol. 27, № 2. – P. 63–68.
25. Ali, S. H. The predictive factors for relapses in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome / S. H. Ali, A. M. Ali, A. H. Najim // *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation.* – 2016. – Vol. 27, № 1. – P. 67–72.
26. Rare functional variants of podocin (NPHS2) promoter in patients with nephrotic syndrome / R. Oleggini [et al.] // *GeneExpr.* – 2006. – Vol. 13. – P. 59–66.

Н. А. Yatskiu¹, N. V. Nikitchenko¹, Н. Г. Bialkevich², I. А. Kazyra², R. I. Goncharova¹

THE SPECTRUM OF POLYMORPHIC VARIANTS IN EXONS AND UTRS OF *NPHS1* AND *NPHS2* GENES IN PATIENTS WITH NEPHROTIC SYNDROME

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: a.yatskiv@igc.by

²Educational Institution

“Belarusian State Medical University”

83 Dzerzhinsky Ave., 220083 Minsk, the Republic of Belarus

Polymorphic variants in coding and untranslated regions (UTRs) of *NPHS1* and *NPHS2* genes of 47 children with nephrotic syndrome (NS) were studied using complete sequences obtained with NGS technology. 22 SNPs were identified: 31.8% of the substitutions were synonymous, 22.7% were non-synonymous, and 45.5% were UTR variants. Despite the relatively small sample size, it was possible to establish 44.0% and 78.6% of the SNPs of the studied regions listed in the Ensemble database for *NPHS1* and *NPHS2* genes respectively. The distribution of alleles in these loci among Belarusian patients with NS did not differ from the distribution of alleles in the European population. Allele A in the rs12406197 locus of the 5'-UTR of the *NPHS2* gene was shown to be associated with hematuria (OR 3.3 [1.30–8.69], $p = 0.017$) in NS, which is known to be a predictor of poor renal prognosis. The same variant at the trend level was more common in the steroid-resistant form of the disease than in the steroid-dependent one (OR 3.68 [1.08 – 12.6], $p = 0.057$).

Keywords: nephrotic syndrome, steroid resistance, genetic polymorphism, *NPHS1*, *NPHS2*.

Дата поступления в редакцию: 24 августа 2023 г.

О. Ч. Мазур¹, Е. П. Михаленко¹, С. В. Байко², А. В. Кильчевский¹

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ РЕНАЛЬНОГО ГЕНЕЗА

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

²Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»
Республика Беларусь, 220016, г. Минск, пр. Дзержинского, 83

Вторичная артериальная гипертензия (ВАГ) является сопутствующим заболеванием и осложнением ряда патологий. Этиология ВАГ в первую очередь обусловлена основной патологией и характеризуется разнообразием патофизиологических механизмов. В данной работе представлены результаты биоинформатического анализа полиморфных локусов в 16 генах, ассоциированных с артериальной гипертензией, у 107 детей с хронической болезнью почек с ВАГ и без нее. У пациентов выявлены 12 вариантов с неизвестным значением (VUS), которые не встречались в группе сравнения и требуют дальнейшего изучения. Проведенный анализ полиморфных вариантов 12 локусов генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) и генов *NPPA*, *MYH9* и *ADD1*, ассоциированных с ВАГ, не выявил статистических различий между пациентами с заболеваниями почек и группой сравнения. Требуется дальнейший поиск локусов, ассоциированных с ВАГ, у пациентов с почечной патологией.

Ключевые слова: вторичная артериальная гипертензия, секвенирование нового поколения, хроническая болезнь почек, дети.

Введение

Артериальная гипертензия (АГ) — это одно из наиболее распространенных хронических заболеваний сердечно-сосудистой системы, которым страдает более одного миллиарда человек в мире [1]. АГ относится к мультифакториальным заболеваниям с наследственной предрасположенностью. Выделяют первичную (эссенциальную) и вторичную АГ. Эссенциальная АГ может дебютировать уже с подросткового возраста и диагностируется в том случае, если исключены причины вторичных форм АГ. Возникновение вторичной АГ (ВАГ) прежде всего обусловлено основным заболеванием (табл. 1) [2]. Однако не у всех пациентов с однотипной патологией имеет место ВАГ, что предполагает наличие других этиологических факторов ее развития, включая генетическую предрасположенность.

В 80% случаев причиной ВАГ являются паренхиматозные заболевания почек, которые включают гломерулонефриты, пиелонефри-

ты, поликистоз почек, врожденные аномалии мочевыводящих путей и почек (ВАМП) [3]. Большинство этих патологий сопровождается снижением ренальных функций с прогрессированием хронической болезни почек (ХБП) вплоть до необходимости проведения диализа или трансплантации. Почки играют очень важную роль в регуляции артериального давления (АД), поэтому уже на ранних стадиях ХБП может диагностироваться АГ [4]. Присоединение АГ является неблагоприятным фактором прогрессирования ХБП, увеличивает риск развития сердечно-сосудистых осложнений и смерти [4, 5].

Патофизиологические механизмы АГ, ассоциированной с ВАМП, включает симпатическую гиперактивацию, активацию РААС, перегрузку жидкостью, эндотелиальную дисфункцию, вторичный гиперпаратиреоз, снижение депрессорной функции почек [1–3, 5].

Наибольшее внимание проведенных ранее исследований было направлено на выявление

Таблица 1

Этиология вторичной артериальной гипертензии

Болезни почек	Гломерулонефриты, кистозные заболевания почек, хроническая болезнь почек
Эндокринные расстройства	Гипертиреоз, феохромоцитомы, гиперальдостеронизм
Артериальные стенозы и обструкции	Стеноз и аномалии строения почечных артерий
Лекарства и вещества	Оральные контрацептивы, глюкокортикоиды, амфетамины
Гестоз	ВАГ беременных
Соматические заболевания	Некоторые соматические заболевания и состояния: гиперкальциемия, обструктивные аномалии аорты и др.

ние генетических факторов эссенциальной АГ [6–8]. В исследованиях GWAS было выявлено >1 000 распространенных и редких генетических вариантов, связанных с АД и/или АГ [8]. Вероятно, эти же генетические варианты могут обуславливать и развитие ВАГ.

Цель работы: провести анализ полиморфных локусов генов, ассоциированных с АГ, у детей с заболеваниями почек.

Материалы и методы

В исследование включено 107 пациентов с хронической почечной патологией (ВАМП, гломерулярные и тубулоинтерстициальные заболевания почек), которые были разделены на 2 группы: 1-я — с ВАГ (51 пациент) и 2-я — без ВАГ (56 детей). Группу сравнения составили 52 ребенка без видимой патологии. Всем пациентам проведено полноэкзомное ДНК секвенирование. Наличие письменного информированного согласия законного представителя ребенка являлось обязательным условием участия в исследовании.

Пробоподготовка образцов ДНК проводилась по протоколу Exome sequencing Nextera plus IDT (Illumina). Секвенирование образцов осуществлялось на приборе NextSeq 550 (Illumina). Биоинформатическая обработка полученных fastQ-файлов была проведена в облачном сервере BaseSpace, в приложении Dragene (Illumina) — пайплайн Dragene Enrichment, версии 4.0.3. Данные аннотировались в программе wAnnotar. Используемый нами метод имеет перечень ограничений исследования [9], а также не позволяет выяв-

лять полные интронные участки (в таргеты для анализа были включены около 20 п. н. прилежащих к экзонным регионам генов).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программного обеспечения GraphPad InStat Version 3.05 и онлайн-ресурса SNPStats. Для проверки достоверности при сравнении частот генотипов в группах использовали двухсторонний точный критерий Фишера и отношение шансов (OR) с расчетом 95%-го доверительного интервала (CI). Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе проведена фильтрация генов, ассоциированных с ренальной ВАГ базы данных DisGeNet и отобраны 16 генов, отвечающих запрашиваемым критериям (табл. 2).

После применения фильтрации по панели генов, ассоциированных с АГ, было выявлено, что в большинстве случаев генетические нарушения были представлены однонуклеотидными заменами. У пациентов с почечными патологиями и АГ было выявлено 88 вариантов замен в кодирующих регионах генов и 58 в некодирующих областях, в том числе 38 замен были несинонимичными, одна делеция в рамке считывания, 49 синонимичных замен, три замены в UTR и 55 — в интронных областях (табл. 3).

Выявленная делеция в рамке считывания в гене *MMP7* c.410del p.Gly137Alafs Ter19 (rs781386509) не представлена в ClinVar, по предикторам патогенности (Mutation Taster,

Таблица 2

Перечень генов, по DISGENET, имеющих наивысший индекс корреляции ген-заболевание для ассоциации с ренальной гипертензией

Ген	id гена	UniProt	Полное название гена	DSI_g	DPI_g	pLI	Score gda Gene
<i>NPPA</i>	4 878	P01160	natriuretic peptide A	0,505	0,769	0,00054522	0,51
<i>AGT</i>	183	P01019	angiotensinogen Enzyme modulator	0,367	0,923	4,9706e-08	0,32
<i>MYH9</i>	4 627	P35579	myosin heavy chain 9	0,505	0,808	1,0	0,3
<i>CRP</i>	1 401	P02741	C-reactive protein	0,299	0,962	0,0036969	0,21
<i>TNF</i>	7 124	P01375	tumor necrosis factor	0,231	0,962	0,8033	0,21
<i>CDK-N1A</i>	1 026	P38936	cyclin dependent kinase inhibitor 1A	0,403	0,769	0,0018575	0,2
<i>CYP2J2</i>	1 573	P51589	cytochrome P450 family 2 subfamily J member 2	0,628	0,615	1,6181e-15	0,2
<i>AGTR1</i>	185	P30556	angiotensin II receptor type 1	0,423	0,846	0,00053161	0,2
<i>HMOX1</i>	3 162	P09601	heme oxygenase 1	0,381	0,923	0,0096817	0,2
<i>MMP2</i>	4 313	P08253	matrix metalloproteinase 2	0,333	0,923	0,83878	0,2
<i>MMP7</i>	4 316	P09237	matrix metalloproteinase 7	0,446	0,885	1,0404e-09	0,2
<i>MMP9</i>	4 318	P14780	matrix metalloproteinase 9	0,305	0,923	1,8869e-17	0,2
<i>NOS2</i>	4 843	P35228	nitric oxide synthase 2	0,364	0,923	4,0277e-15	0,2
<i>NOS3</i>	4 846	P29474	nitric oxide synthase 3	0,378	0,885	6,7246e-07	0,2
<i>NPPB</i>	4 879	P16860	natriuretic peptide B	0,513	0,808	9,8786e-06	0,2
<i>TIMP4</i>	7 079	Q99727	TIMP metalloproteinase inhibitor 4 Enzyme modulator	0,559	0,769	0,00038342	0,2

Примечание. UniProt — идентификационный номер белка или белкового продукта в базе данных UniProt; DSI_g — индекс специфичности заболевания для гена (Disease Specificity Index for the gene); DPI_g — индекс плейотропии заболевания для гена (Disease Pleiotropy Index for the gene); pLI — вероятность потери функции (Probability of being Loss of function intolerant); Score gda Gene — оценка ассоциации генов и заболеваний (Disease Association Score)

LRT, SIFT, EIGEN, MVP) и согласно рекомендациям по интерпретации вариантов с неизвестным клиническим значением Руководства по интерпретации данных [9] — благоприятная. Среди несинонимичных вариантов с популяционной частотой менее 1% по базе данных ExAc выявлено 14 замен, среди которых восемь замен представлено в ClinVar: шесть из них являются благоприятными

и вероятно благоприятными, две — с неизвестным значением (VUS), остальные шесть замен не представлены в ClinVar. Среди представленных в ClinVar вариантов согласно анализу *in silico* по программам-предикторам патогенности (Mutation Taster, LRT, SIFT, EIGEN, MVP) и рекомендациям Руководства по интерпретации данных [9], пять вариантов являются вариантами с благоприятным и ве-

Таблица 3

Варианты нуклеотидных последовательностей, выявленные в исследуемых группах (абс.)

Тип замены нуклеотидных последовательностей	Группа с ВАГ (n = 51)	Группа без ВАГ (n = 56)
Несинонимичные SNV (single nucleotide variations)	38	33
Делеция в рамке считывания	1	0
Синонимичные SNV	49	42
Интронные варианты	55	45
UTR	3	2

роятно благоприятным значением, один вариант — VUS (*TNF*, rs 867435711).

У пациентов с почечной патологией и без клинических признаков АГ выявлено 75 замен в кодирующих областях и 47 замен в некодирующих регионах исследуемых генов. Среди несинонимичных замен с частотой менее 1% согласно базе данных ExAc выявлено 15 вариантов, из которых девять представлены в ClinVar: восемь вариантов с благоприятным значением, один вариант — VUS (*CRP*, rs77832441). Шесть несинонимичных редких вариантов не представлены в ClinVar и согласно программам-предсказателям *in silico* все они являются благоприятными и вероятно благоприятными. Среди некодирующих вариантов выявлено две замены в UTR и 45

интронных вариантов.

Следует также отметить, что 12 выявленных редких вариантов (<1% по ExAc) с неизвестным значением не встречались в группе сравнения (52 человека). Несмотря на то, что по предикторам патогенности большинство из данных замен вероятно благоприятные, либо благоприятные (согласно программам-предсказателям *in silico*), необходимо продолжить их изучение на различных группах пациентов. Варианты VUS, обнаруженные в группе пациентов с почечной патологией, представлены в таблице 4.

Патогенных замен в обеих группах пациентов в исследуемом перечне генов, ассоциированных с АГ, не обнаружено.

Следует отметить, что у пациентов с ХБП

Таблица 4

Редкие варианты с неопределенным значением, выявленные у пациентов

Ген	VUS	ExAc, частота	ClinVar
<i>NPPB</i>	rs771168425	0,000059	не представлен
<i>MYH9</i>	rs757448185	0,000007*	не представлен
<i>ACE</i>	rs3730043	0,004348	представлен
<i>AGT</i>	rs138340265	0,000058	не представлен
	rs1805090	0,001	представлен
<i>NOS2</i>	rs148088114	0,00066	не представлен
	rs201381506	0,00033	не представлен
	rs748014613	0,000085	не представлен
	rs148088114	0,00066	представлен
<i>TNF</i>	rs867435711	0,000012*	не представлен
<i>CRP</i>	rs77832441	0,001510	представлен
<i>MMP2</i>	rs112710941	0,000107*	представлен

Примечание. * — частота по базе GnomAd

2–3 стадии и при дальнейшем прогрессировании патологического процесса чаще встречалась ВАГ. В исследуемых группах пациентов проведен анализ ассоциации с ВАГ девяти полиморфных локусов генов, связанных с регуляцией ренин-ангиотензин-альдостероновой

системы (*ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *CYP11B2*), и трех полиморфных локусов генов *ADD1*, *NPPA*, *MYH9* (табл. 5). Не выявлено значимых различий частот встречаемости полиморфных вариантов исследуемых генов между данными группами пациентов.

Таблица 5

Перечень SNP, анализируемых у пациентов с почечными аномалиями и в группе сравнения

Название гена	Роль в механизме АГ	SNP
<i>ACE</i> Angiotensin-Converting Enzyme	кодирует фермент, преобразующий ангиотензин I в ангиотензин II, играющий важную роль в РААС	rs4341 rs4343 rs4362 rs4363
<i>AGT</i> Angiotensinogen	кодирует предшественника ангиотензина, важного регулятора АД	rs4762 rs699
<i>CYP11B2</i> Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 2	кодирует фермент, участвующий в синтезе альдостерона, который может повышать АД	rs4539 rs4546
<i>NPPA</i> Natriuretic Peptide A	кодирует предсердный натрийуретический пептид, который участвует в регуляции сосудистого тонуса и АД	rs5065
<i>MYH9</i> Myosin Heavy Chain 9	кодирует белок, который может быть связан с различными заболеваниями, включая АГ	rs3752462
<i>AGTR1</i> Angiotensin II Receptor Type 1	кодирует рецептор ангиотензина II, который участвует в регуляции АД	rs5186
<i>ADD1</i> Adducin 1	кодирует белок, который связан с регуляцией выведения натрия и калия в почках, что может влиять на АД	rs4961

Требуется дальнейший поиск локусов генов, ассоциированных с ВАГ, у пациентов с ренальными патологиями для выявления молекулярных маркеров предрасположенности к ВАГ с целью оказания своевременной помощи и выбора правильной тактики лечения.

Далее был проведен анализ по представлен-

ном в таблице 5 локусам генов в общей группе пациентов с почечной патологией (с и без ВАГ) и группой сравнения.

Не выявлено значимых различий частоты встречаемости полиморфных вариантов исследуемых генов между группой пациентов и практически здоровыми детьми (табл. 6).

Таблица 6

Распределение частот встречаемости генотипов генов РААС у пациентов с почечными аномалиями и группы сравнения

Полиморфный вариант	Основная группа, n (%)	Группа сравнения, n (%)	OR (95% CI)	p
<i>ACE rs4343</i>				
G/G	22 (20,6)	8 (15,4)	1,15 (0,55–2,43)	0,85
G/A	53 (49,5)	30 (57,7)	0,72 (0,37–1,40)	0,40
A/A	32 (29,9)	14 (26,9)	1,16 (0,55–2,43)	0,85
G/A + A/A	85(79,4)	44 (84,6)	0,70 (0,29–1,71)	0,52

Окончание таблицы 6

Полиморфный вариант	Основная группа, n (%)	Группа сравнения, n (%)	OR (95% CI)	p
ACE rs4362				
T/T	21 (19,6)	8 (15,4)	1,34 (0,55–3,28)	0,66
T/C	52 (48,6)	29 (55,8)	0,75 (3,85–1,46)	0,40
C/C	34 (31,8)	15 (28,9)	1,15 (0,56–2,37)	0,86
T/C + C/C	86 (80,4)	44 (84,6)	0,75 (0,30–1,82)	0,66
ACE rs4363				
G/G	80 (74,8)	43 (82,7)	1,80 (0,27–1,45)	0,31
G/A	20 (18,7)	7 (13,5)	1,48 (0,58–3,76)	0,5028
A/A	7 (6,5)	2 (3,8)	1,75 (0,35–8,74)	0,745
G/A + A/A	27 (25,2)	9 (17,3)	1,61 (0,70–3,74)	0,316
ACE rs4341				
G/G	83 (77,6)	44 (84,6)	0,63 (2,61–1,52)	0,40
G/C	17 (15,9)	7 (13,5)	1,21 (0,47–3,14)	0,82
C/C	7 (6,5)	1 (1,9)	3,57 (0,42–29,83)	0,39
G/C + C/C	24 (22,4)	8 (15,4)	1,59 (0,66–3,83)	0,40
AGTR1 rs5186				
A/A	97 (90,7)	46 (88,5)	1,09 (0,73–1,61)	0,78
A/C	8 (7,5)	5 (9,6)	0,76 (0,24–2,49)	0,87
C/C	2 (1,9)	1 (1,9)	0,76 (0,24–2,45)	0,98
A/C + C/C	10 (9,3)	6 (11,5)	0,79 (0,27–2,31)	0,77
AGT rs4762				
G/G	77 (72)	38 (73,1)	0,95 (0,45–1,99)	1,00
G/A	29 (27,1)	12 (23,1)	1,24 (0,57–2,69)	0,70
A/A	1 (0,9)	2 (3,8)	0,24 (0,02–2,67)	0,52
G/A + A/A	30 (28)	14 (26,9)	1,06 (0,50–2,23)	1,00
AGT rs699				
G/G	30 (28)	17 (32,7)	0,80 (0,39–0,64)	0,58
A/G	54 (50,5)	26 (50)	1,02 (5,25–1,97)	1,00
A/A	23 (21,5)	9 (17,3)	1,32 (0,56–3,07)	0,67
A/G + A/A	77 (72)	35 (67,3)	1,24 (0,61–2,55)	0,58
CYP11B2 rs4539				
T/T	33 (30,8)	12 (23,1)	1,49 (0,69–3,19)	0,35
T/C	51 (47,7)	25 (48,1)	0,98 (0,51–1,91)	1,00
C/C	23 (21,5)	15 (28,9)	0,68 (0,32–1,44)	0,32
T/C + C/C	74 (69,2)	40 (76,9)	0,67 (0,31–1,45)	0,35
CYP11B2 rs4546				
G/G	33 (30,8)	11 (21,1)	1,66 (0,76–3,63)	0,26
G/A	55 (51,4)	25 (48,1)	1,14 (0,59–2,21)	0,74
A/A	19 (17,8)	16 (30,8)	0,49 (0,22–1,05)	0,07
G/A + A/A	74 (69,2)	41 (78,8)	0,60 (2,75–1,31)	0,26

В группе генов *NPPA*, *MYH9* и *ADD1* для исследуемых локусов статистически значимых различий также не было выявлено (табл. 7).

Представленные в нашем исследовании локусы генов РААС, а также генов *NPPA*, *MYH9* и *ADD1* по литературным данным относят-

ся к локусам, для которых показана наибольшая ассоциация с артериальной гипертензией. Отсутствие различий в нашем исследовании, вероятнее всего, связано с недостаточной выборкой детей и разными механизмами развития первичной и вторичной АГ.

Таблица 7

Распределение частот встречаемости генотипов полиморфных локусов *ADD1*, *NPPA*, *MYH9* у пациентов с почечной патологией и группы сравнения

Полиморфный вариант	Основная группа, n (%)	Группа сравнения, n (%)	OR (95% CI)	p
<i>ADD1 rs4961</i>				
G/G	73 (68,2)	40 (76,9)	0,64 (0,30–1,38)	0,27
G/T	32 (29,9)	11 (21,1)	1,59 (0,73–3,48)	0,26
T/T	2 (1,9)	1 (1,9)	0,97 (0,09–10,97)	0,98
G/T+T/T	34 (31,8)	12 (23,1)	1,55 (0,72–3,33)	0,271
<i>NPPA rs5065</i>				
A/A	80 (74,8)	43 (82,7)	0,62 (0,27–1,44)	0,32
A/G	25 (23,4)	9 (17,3)	1,46 (0,62–3,40)	0,42
G/G	2 (1,9)	0 (0)	2,49 (0,12–52,81)	0,82
A/G-G/G	27 (25,2)	9 (17,3)	1,61 (0,70–3,72)	0,32
<i>MYH9 rs3752462</i>				
T/T	73 (68,2)	39 (75)	0,72 (0,34–1,51)	0,46
T/C	22 (20,6)	6 (11,5)	1,98 (0,75–5,24)	0,19
C/C	12 (11,2)	7 (13,5)	0,81 (0,30–2,20)	0,80
T/C+C/C	34 (31,8)	13 (25)	1,40 (0,66–2,95)	0,46

Заключение

По результатам проведенного анализа генов, ассоциированных с развитием артериальной гипертензии, не выявлено патогенных и вероятно патогенных мутаций у пациентов с хроническими заболеваниями почек с и без АГ. В этой группе выявлены варианты с неизвестным значением в сравнении с группой практически здоровых детей. Также не выявлено значимых различий частоты полиморфных вариантов 12 локусов генов РААС и генов *NPPA*, *MYH9* и *ADD1* между пациентами с почечной патологией и группой сравнения. Таким образом, необходимо продолжить дальнейший поиск генов и локусов, ассоциированных с вторичной артериальной гипертензией у детей с заболеваниями почек, что поможет выявить маркеры риска возникновения данной патологии и предотвратить развитие тяжелых

осложнений, прогрессирование ХБП. Выявленные в будущем ассоциации могут иметь клиническое значение для предсказания риска и разработки персонализированных стратегий профилактики и лечения артериальной гипертензии.

Список использованных источников

- Hengel, F. E. Arterielle Hypertonie — Eine Übersicht für den ärztlichen Alltag [Arterial Hypertension] / F. E. Hengel, C. Sommer, U. Wenzel // Dtsch Med Wochenschr. — 2022. — Vol. 147, № 7. — P. 414–428. — DOI: 10.1055/a-1577-8663
- Practice Recommendations for Diagnosis and Treatment of the Most Common Forms of Secondary Hypertension / G. P. Rossi [et al.] // High Blood Press Cardiovasc Prev. — 2020. — Vol. 27, № 6. — P. 547–560. — DOI: 10.1007/

s40292-020-00415-9

3. Tammy, M. B. Pediatric Approach to Hypertension / M. B. Tammy, G. F. Leonard // *Seminars in Nephrology*. – 2009. – Vol. 29, iss. 4. – P. 379–388. – DOI: 10.1016/j.semnephrol.2009.03.014

4. Байко, С. В. Хроническая болезнь почек у детей: определение, классификация и диагностика / С. В. Байко // *Нефрология и диализ*. – 2020. – Т. 22, № 1. – С. 53–70. – DOI: 10.28996/2618-9801-2020-1-53-70

5. Ameer, O. Z. Hypertension in chronic kidney disease: What lies behind the scene / O. Z. Ameer // *Front Pharmacol*. – 2022. – Vol. 13. – P. 949260. – DOI: 10.3389/fphar.2022.949260

6. Manosroi, W. Genetics of Human Primary Hypertension: Focus on Hormonal Mechanisms / W. Manosroi, G. H Williams. – *Endocrine Reviews*. – 2019. – Vol. 40, iss. 3. – P. 825–856. –

DOI: 10.1210/er.2018-00071

7. Hypertension and genetic variation in endothelial-specific genes / E. Larsson [et al.]. – *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 4. – e62035. – DOI: 10.1371/journal.pone.0062035

8. Wang, Y. Genome-Wide Association Studies of Hypertension and Several Other Cardiovascular Diseases / Y. Wang, J. G. Wang. – *Pulse (Basel)*. – 2019. – Vol. 6, № 3–4. – P. 169–186. – DOI: 10.1159/000496150

9. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) / О. П. Рыжкова [и др.]. – *Медицинская генетика*. – 2019. – Vol. 18, № 2. – P. 3–23. – DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23

A. Ch. Mazur¹, A. P. Mikhalenka¹, S. V. Baiko², A. V. Kilchevsky¹

SEARCH FOR GENETIC DETERMINANTS OF RENAL ARTERIAL HYPERTENSION

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: o.mazur@igc.by

²Educational Establishment

“Belarusian State Medical University”

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

Secondary arterial hypertension (SAH) is a comorbid condition and complication of a number of pathologies. The etiology of SAH is primarily determined by the underlying pathology and is characterized by a variety of pathophysiological mechanisms. This study presents the results of a bioinformatics analysis of polymorphic loci in 16 genes associated with arterial hypertension in 107 children with chronic kidney disease with and without SAH. Twelve variants of unknown significance (VUS) were identified in patients, which were not found in the comparison group and require further study. An analysis of the polymorphic variants of 12 loci of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) genes and the *NPPA*, *MYH9*, and *ADD1* genes associated with HAV did not reveal statistical differences between the patients with kidney diseases and the comparison group. A further search is needed to identify loci associated with SAH in patients with renal pathology.

Keywords: secondary arterial hypertension, next-generation sequencing, chronic kidney disease, children.

Дата поступления в редакцию: 13 сентября 2023 г.

Н. И. Рябоконт, И. Д. Кужель

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ У ПАЦИЕНТОВ С НОРМО- И ПАТОЗООСПЕРМИЕЙ

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

Проведено пилотное исследование окислительных повреждений ДНК в сперматозоидах мужчин репродуктивного возраста с нормозооспермией и патозооспермией (диагнозы астено-, астенотерато-, олиго- и олигоастенозооспермия). Для проведения исследования адаптирована энзим-модифицированная щелочная версия метода ДНК-комет, включающая обработку сперматозоидов гликозилазой hOGG1. Этот фермент специфически распознает наиболее частые окислительные повреждения ДНК — окисленные формы гуанина: 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-оксогуанин) и 2,6-диамино-4-гидрокси-5N-метилформаимидопиримидин (Фару-гуанин). Установлено существенно повышенное количество окислительных повреждений ДНК в группе с патозооспермией по сравнению с нормозооспермией. Показана обратная корреляция между количеством окислительных повреждений ДНК и общей подвижностью сперматозоидов, что указывает на окислительный стресс как на общую причину возникновения исследуемых повреждений ДНК и снижения подвижности сперматозоидов.

Ключевые слова: нормозооспермия, патозооспермия, окислительные повреждения ДНК сперматозоидов, 8-оксогуанин, Фару-гуанин, энзим-модифицированная щелочная версия метода ДНК-комет, hOGG1.

Введение

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), по состоянию на начало 2023 г. в среднем около 17,5% взрослого населения (приблизительно каждый шестой человек репродуктивного возраста) имеет бесплодие [1], что делает это заболевание серьезной проблемой здоровья во всем мире [2]. При этом около 50% случаев бесплодия в браке частично или полностью обусловлены мужским фактором [2, 3]. Ситуация усложняется ухудшением репродуктивных качеств спермы мужчин, а именно снижением концентрации и общего количества сперматозоидов в сперме, которое наблюдается с 1970-х гг. [4]. Среди основных причин мужского бесплодия отмечают заболевания общего характера, варикоцеле, гормональные отклонения, генетические нарушения, нездоровый образ жизни и др. Однако в 30–50% случаев точная этиология мужского бесплодия остается неопределенной, и заболевание классифицируется как идиопатическое [5]. Поэтому поиск причин мужского бесплодия имеет актуальный характер.

В настоящее время накоплено непровер-

жимое количество данных о том, что окислительный стресс играет значимую роль в формировании мужского бесплодия. Клетки человека постоянно находятся под окислительным воздействием внутреннего и внешнего происхождения. Основными источниками активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) в сперме являются лейкоциты и незрелые сперматозоиды. Однако важно отметить, что АФК и АФА в умеренных концентрациях необходимы для нормального созревания и функционирования половых клеток, а потому генерируются их окислительной системой и поддерживаются на нормальном физиологическом уровне их антиоксидантной системой. Дисбаланс в работе этих двух систем с преобладанием АФК и АФА может приводить к окислительному стрессу, повреждению ДНК и патозооспермии [3, 5–7]. Отмечается, что 30–80% мужчин с бесплодием имеют повышенные концентрации АФК, а у 84% пациентов с идиопатическим бесплодием обнаружен дисбаланс между АФК и количеством антиоксидантов в сперме в сторону преобладания АФК. Международными эксперта-

ми предлагается ввести новый термин MOSI (male oxidative stress infertility) для обозначения мужского бесплодия, связанного с окислительным стрессом, и рекомендовать пациентам с диагнозом идиопатическое бесплодие проведение скрининга на окислительно-восстановительный потенциал спермы [5].

ДНК сперматозоидов имеет высокую степень упаковки хроматина по сравнению с соматическими клетками, что частично защищает ее от повреждений, которые могут быть индуцированы АФК и АФА. В то же время считается, что ограниченное количество цитоплазмы с элементами системы антиоксидантной защиты делают сперматозоиды наиболее чувствительными к окислительному стрессу клетками у многоклеточных организмов [8]. Более того, предполагается, что окислительный стресс является основным фактором, повреждающим ДНК сперматозоидов. Имеются отрывочные данные, свидетельствующие о высоких уровнях окислительных повреждений в сперматозоидах человека и отмечается необходимость их изучения у мужчин с пониженной фертильностью [3, 8]. Кроме того, разработанные протоколы исследования окислительных повреждений ДНК сперматозоидов требуют их оптимизации и более широкого апробирования.

Поэтому целью нашей работы был сравнительный анализ окислительных повреждений ДНК в сперматозоидах пациентов с нормо- и патозооспермией для оценки их диагностической значимости в отношении мужской фертильности. В задачи исследования входила адаптация энзим-модифицированной щелочной версии метода ДНК-комет на сперматозоидах мужчин с использованием фермента hOGG1 (human 8-oxoguanine DNA glycosylase), специфически распознающей и вырезающей из ДНК окисленные формы гуанина: 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-оксогуанин, или 8-oxoGuo) и 2,6-диамино-4-гидрокси-5N-метилформамидопиримидин (Фару-гуанин, или Фару-Gua) [9, 10]. Энзим-модифицированный метод ДНК-комет широко используется в биомониторинге с 1990-х гг. [10]. Предполагается, что он распознает более реалистичные уровни окислительных повреждений ДНК при меньших финансовых затратах, чем высокоэффективная жидкостная хроматография,

при которой дополнительное окисление ДНК происходит при подготовке к анализу (на этапах выделения, хранения и гидролиза ДНК) [11, 12]. Однако ранее в подавляющем большинстве работ с энзим-модифицированным методом ДНК-комет использовался фермент Fpg (formamidopyrimidine-DNA glycosylase), который, по данным С. С. Smith с соавторами [9], менее специфичен к окислительным повреждениям ДНК, чем hOGG1.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись образцы спермы в количестве 35 ед., полученные в 2021 г. из Республиканского банка ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск). Сбор и депонирование образцов в банк осуществлены в 2013–2015 гг. при выполнении задания отраслевой научно-технической программы «Здоровая мать — здоровое дитя — сильное государство» (2013–2017 гг.), одобренного этическим комитетом Республиканского научно-практического центра «Мать и дитя» в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. От каждого пациента при сборе образцов получено информированное согласие об участии в научных исследованиях. Образцы спермы собраны пациентами путем мастурбации. Диагнозы поставлены по результатам спермограммы, выполненной с использованием автоматического анализатора SQA-V (Medical Electronic Systems, Israel), и на основании рекомендаций ВОЗ 2010 г. [13]. В исследуемые группы по анкетным данным включены образцы от пациентов белорусской национальности. Группу с нормозооспермией составили образцы от 16 человек (средний возраст 31,1 года), с патозооспермией — от 19 человек (средний возраст 34,5 года). Индивидуальный возраст пациентов в группах находился в диапазоне 25–48 лет. В группе с патозооспермией преобладали образцы от пациентов с диагнозами астенозооспермия (пониженная подвижность сперматозоидов, $n = 11$). Затем по численности в сторону уменьшения следовали образцы с диагнозами астенотератозооспермия (пониженная подвижность в сочетании с повышенным количеством морфологических аномалий сперматозоидов, $n = 4$), олигозооспермия (по-

ниженное количество сперматозоидов, $n = 2$) и олигоастенозооспермия (пониженные количество и подвижность сперматозоидов, $n = 2$).

Общая фрагментация ДНК сперматозоидов в образцах изучена с применением щелочной версии метода ДНК-комет в соответствии с инструкцией, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь [14]. Метод состоит из следующих этапов, подробно описанных в работе [15]: погружение сперматозоидов в агарозу, лизис клеточных мембран, денатурация и электрофорез ДНК при $pH \geq 13$, фиксация и анализ препаратов с использованием флуоресцентного микроскопа и визуального способа учета повреждений ДНК [10, 16].

Изучение окислительных повреждений ДНК выполнено с помощью энзим-модифицированной щелочной версии метода ДНК-комет с использованием фермента hOGG1. Поскольку нами не найдено публикаций, описывающих применение данного фермента на спермиях мужчин, то при отработке метода за основу взяты работы, проведенные на лейкоцитах периферической крови человека [17], клетках мышины лимфомы [9] и на незрелых половых клетках (сперматоцитах) мыши [18]. Ферментная обработка препаратов со сперматозоидами мужчин выполнена нами после этапа лизиса и промывки от лизирующего раствора, с использованием hOGG1 производства Abcam (Cambridge, UK) в концентрации 1:1000 буферного раствора (40 mM Hepes, 0,1 M KCl, 0,5 mM Na₂EDTA, 0,2 mg/ml BSA pH = 8,0) при 37 °C в течение 30 мин. Одновременно в тех же условиях проводилась инкубация аналогичных препаратов в буферном растворе без фермента. После охлаждения всех препаратов в течение 20 мин в холодильной камере и смывания буфера с hOGG1 (или без фермента) охлажденной дистиллированной водой проведена стандартная денатурация ДНК с последующим электрофорезом, фиксацией и анализом высушенных и окрашенных бромистым этидием препаратов с помощью флуоресцентного микроскопа BX51 (производства Olympus, Japan) при 400-кратном увеличении, фильтре возбуждения на 515–560 nm и барьерном фильтре на 590 nm. Каждый образец спермы проанализирован в 2–3 повторностях. Оценивались средние величины как

нагруженности клеток повреждениями ДНК (уровня фрагментации ДНК в условных единицах — усл. ед.), так и количества клеток с повреждениями ДНК (индекса фрагментации — DFI, DNA fragmentation index, — выраженного в процентах от общего количества проанализированных клеток). Уровни окислительных повреждений ДНК в общем пуле фрагментированной ДНК рассчитывались как разница между результатами исследования клеток, обработанных hOGG1 в буферном растворе, и результатами анализа клеток, находившихся под воздействием только буферного раствора [10].

Статистическая обработка данных проведена в пакете прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, USA). Сравнительный анализ выполнен с использованием непараметрического теста Манна-Уитни (U теста). При этом все значения $p < 0,05$ признавались за статистически значимые.

Результаты исследования

Основные результаты исследования повреждений ДНК в сперматозоидах мужчин при нормо- и патозооспермии с использованием двух версий метода ДНК-комет представлены в таблице 1.

Хорошо известно, что используемая нами стандартная щелочная версия метода ДНК-комет позволяет учитывать одно- и двунитевые разрывы ДНК, а также щелочно-лабильные сайты, состоящие главным образом из апуриновых-апириимидиновых сайтов (AP-сайтов) [10]. Все эти повреждения учитываются как фрагменты ДНК, отделившиеся от ядерного матрикса под действием $pH \geq 13$ и электрического поля. В нашем исследовании, как и ожидалось, количество этих повреждений было существенно ($p = 9,1 \times 10^{-6}$) выше в группе с патозооспермией по сравнению с нормозооспермией (табл. 1).

Применение щелочной версии ДНК-комет в сочетании с ферментами направлено на расширение спектра исследуемых повреждений ДНК за счет дифференциального анализа модифицированных оснований ДНК [10]. Из всех оснований ДНК гуанин, обладающий низким редокс-потенциалом, наиболее часто подвергается окислению [19]. А его окисленная форма 8-оксогуанин, а также Фару-гуанин, специфич-

Таблица 1

Обнаружение повреждений ДНК сперматозоидов мужчин с нормо- и патозооспермией при использовании обычной и модифицированной щелочной версии метода ДНК-комет

Исследуемые группы	Количество пациентов	Повреждения ДНК (усл. ед.)			Индекс фрагментации ДНК (DFI, %)		
		Среднее значение \pm ошибка среднего	Медиана (минимальное–максимальное значение)	U test, p	Среднее значение \pm ошибка среднего	Медиана (минимальное–максимальное значение)	U test, p
<i>Щелочная версия метода ДНК-комет (обнаружение одно- и двунитевых разрывов ДНК, а также щелочно-лабильных сайтов ДНК)</i>							
Нормозооспермия	16	11,0 \pm 1,6	9,0 (3,0–26,0)	–	10,1 \pm 1,6	9,0 (3,0–25,0)	–
Патозооспермия	19	100,3 \pm 18,5	93,0 (10,0–300,0)	9,1 $\times 10^{-6}$	69,9 \pm 7,9	90,0 (10,0–100,0)	9,1 $\times 10^{-6}$
<i>Модифицированная (с использованием hOGG1) щелочная версия метода ДНК-комет (обнаружение окислительных повреждений ДНК)</i>							
Нормозооспермия	16	6,8 \pm 1,3	4,9 (0,7–17,5)	–	5,1 \pm 1,0	4,5 (0,0–12,0)	–
Патозооспермия	19	20,0 \pm 3,3	17,8 (2,7–47,3)	0,0018	12,3 \pm 2,5	10,0 (2,0–38,0)	0,0469

чески распознающиеся ферментом hOGG1 [9, 10], представляют собой наиболее частые окислительные повреждения ДНК. Появление 8-оксогуанина как компонента 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-ОНдГ) в молекуле ДНК является причиной трансверсий G:C–T:A в процессе репликации [19], что свидетельствует о его высоком мутационном потенциале. Так, известно, что 8-оксогуанин (8-ОНдГ) инициирует и стимулирует карциногенез. Он признан критическим биомаркером риска возникновения и прогрессирования злокачественных опухолей и дегенеративных заболеваний [20]. Вследствие высокой частоты и опасности для здоровья Европейским комитетом по стандартизации ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) [21] с 2004 г. рекомендован мониторинг 8-оксогуанина в лимфоцитах периферической крови человека. Использование 8-оксогуанина в качестве маркера окислительных повреждений ДНК в различных клетках подтверждается в обзорных работах [19, 22]. Таким образом, применение нами гликозилазы hOGG1 в энзим-модифицированном методе ДНК-комет

было направлено на специфическое обнаружение и вырезание (с образованием апуриновых сайтов) наиболее частых окисленных оснований ДНК — 8-оксогуанина и Фару-гуанина, — что позволяет увеличивать спектр исследуемых повреждений ДНК в сперматозоидах мужчин и выявлять наиболее опасные для зиготы повреждения генома с высоким мутационным потенциалом.

Анализ результатов, представленных в таблице 1, показывает, что с использованием фермента hOGG1 в каждом образце спермы обнаружены сперматозоиды с окисленными основаниями ДНК. Уровни нагруженности сперматозоидов этими повреждениями при нормозооспермии находились в диапазоне от 0,7 до 17,5 при среднем значении 6,8 \pm 1,3 усл. ед., что приблизительно в 2 раза меньше по сравнению с общим количеством одно- и двунитевых разрывов ДНК, а также щелочно-лабильных сайтов, обнаруживаемых с помощью стандартной щелочной версии метода ДНК-комет. В группе с патозооспермией нагруженность сперматозоидов окисленными основаниями ДНК также была меньше, чем разрывами нитей ДНК

и щелочно-лабильными сайтами. Однако в этой группе уровни окисленных оснований ДНК спермиев были существенно ($p = 0,0018$) выше, чем при нормозооспермии, при среднем значении $20,0 \pm 3,3$ усл. ед. и кратности превышения 2,9 раза. Аналогичная зависимость наблюдалась для индекса фрагментации ДНК (DFI) при кратности превышения 2,4 раза (табл. 1).

Отсутствие аналогичных исследований с использованием hOGG1-модифицированной версии ДНК-комет не позволило провести сравнительный анализ полученных нами результатов с другими опубликованными данными. Однако сравнение наших результатов с данными, полученными другими авторами при использовании других методов исследования, подтверждает высокую чувствительность применимого нами подхода. Так, S. Vorilhon с соавторами [23], используя проточную цитофлуориметрию в сочетании с моноклональным антителом, показали 1,5-кратное повышение 8-OHdG в сперматозоидах мужчин с астенозооспермией по сравнению с нормозооспермией. Также полуторакратное увеличение 8-OHdG в сперматозоидах мужчин с бесплодием по сравнению с фертильной группой было показано в работе K. Taken с соавторами [24] при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Существенное превышение относительно количества окисленных оснований ДНК в группе с патозооспермией по сравнению с нормозооспермией, а также широкий диапазон индивидуальных уровней окисленных оснований ДНК в исследуемых группах (табл. 1) могут свидетельствовать о возможности использования анализа окислительных повреждений ДНК в диагностике генетических причин пониженной мужской фертильности после проведения дополнительных исследований на большей выборке пациентов. Однако, по мнению авторов этой работы, требуется апробирование дополнительных подходов для адаптации энзим-модифицированной версии метода ДНК-комет на сперматозоидах с целью уменьшения дисперсии фрагментов ДНК вокруг нуклеоида, а также снижения вариабельности уровней повреждений ДНК между повторностями одного образца, которые наблюдались в этой работе. О более высокой вариабельности результатов исследований

с использованием энзим-модифицированных (hOGG1 и Fpg) версий по сравнению со стандартной щелочной версией метода ДНК-комет хорошо известно [10], что не исключает необходимости дальнейшей оптимизации методических приемов.

Необходимо также отметить, что обнаруживаемые с помощью фермента hOGG1 окисленные основания ДНК представляют собой остатки тех повреждений, которые по каким-то причинам не были подвергнуты действию системы репарации ДНК сперматозоидов. Известно, что зрелые сперматозоиды обладают ограниченными репарационными возможностями, что способствует накоплению повреждений в их геноме. Экзизионная репарация оснований ДНК (base excision repair — BER), являясь основной системой восстановления наиболее частых повреждений ДНК (модифицированных, в т. ч. окисленных, оснований ДНК, одно- и частично двунитевых разрывов ДНК) в соматических клетках, представлена не в полном, а в сокращенном варианте в сперматозоидах. Из комплекса ферментов системы BER в сперматозоидах присутствует именно гликозилаза OGG1, аналогом которой является используемый нами фермент hOGG1. Гликозилаза OGG1 проявляет высокую активность при окислительном стрессе, вырезая 8-оксогуанин и оставляя апуриновый сайт, который далее не репарируется по причине отсутствия в сперматозоидах других ферментов BER (апуриновой-апириимидиновой эндонуклеазы I, лигазы III, XRCC1). Обычно завершение процесса BER, начатого в сперматозоидах, происходит с участием системы материнской репарации ооцитов после оплодотворения и до этапа первого эмбрионального деления. Однако, если повреждений ДНК в сперматозоидах много и/или система материнской репарации имеет слабый потенциал, то высока вероятность гибели зиготы или возникновения *de novo* мутаций, которые могут влиять на здоровье ребенка [3, 8]. Таким образом, даже небольшое остаточное количество 8-оксогуанина в сперматозоидах может иметь негативный эффект на репродуктивную функцию и здоровье ребенка. А потому обнаруживаемые с помощью фермента hOGG1 остаточные количества окисленных оснований ДНК в сперматозоидах мужчин имеют значение для оценки возможных причин

бесплодия пациентов или негативных эффектов на здоровье их детей.

Проведенный нами корреляционный анализ по Spearman показал статистически значимую ($p < 0,05$) прямую связь между индивидуальными данными, полученными с использованием обычной и энзим-модифицированной версиями метода ДНК-комет (рис. 1), что может быть следствием общих причин возникновения повреждений ДНК, детектируемых с помощью этих методов. Однако низкое значение коэффициента корреляции ($R_s = 0,528$) в дополнение к различным мутационным эффектам разных типов повреждений ДНК может указывать на

невозможность замены одного теста другим и на то, что каждый из предлагаемых методов исследований может дать дополнительную информацию о состоянии генома пациента. Похожие данные были описаны ранее А. Micillo с соавторами [25], получившими низкие значения коэффициента корреляции ($R_s = 0,48$, $p < 0,0001$) между фрагментацией ДНК сперматозоидов, изученной у мужчин из субфертильных пар методом TUNEL (Transferase mediated dUTP Nick End Labeling), и концентрацией 8-OHdG, обнаруживаемого с помощью моноклонального антитела и проточной цитофлуориметрии.

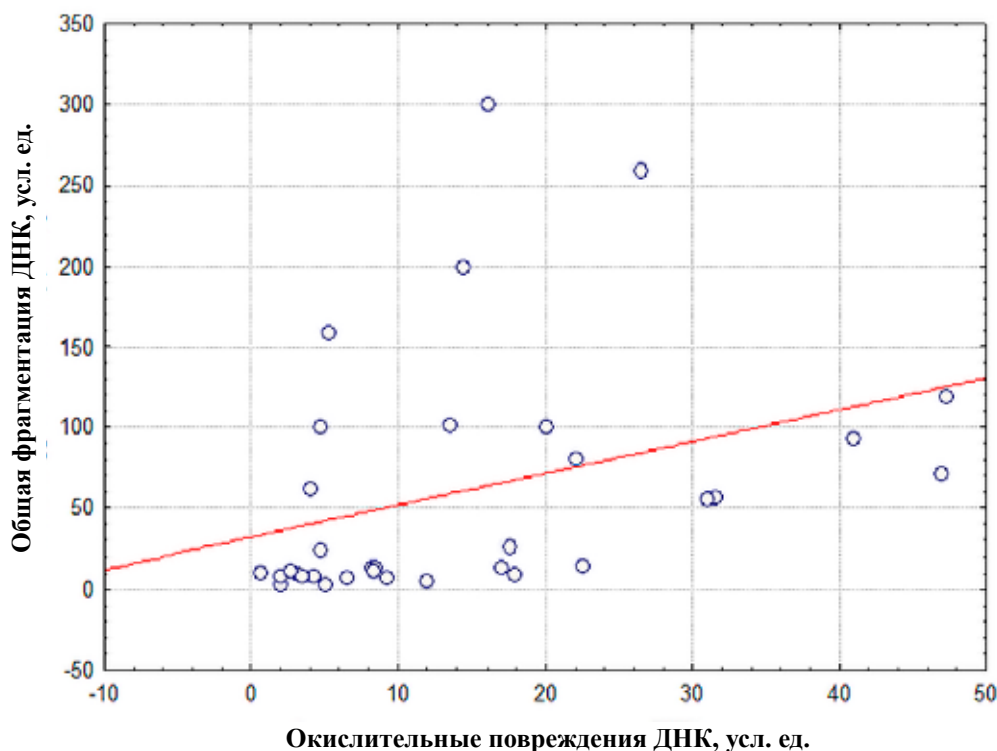


Рис. 1. Положительная корреляция между уровнями окисленных оснований ДНК и общей фрагментацией ДНК, оцененной с использованием щелочной версии метода ДНК-комет (коэффициент корреляции по Spearman $R_s = 0,528$, $p < 0,05$)

Дальнейший корреляционный анализ не показал связи между выявленными окислительными повреждениями ДНК и возрастом пациентов ($R_s = 0,150$ при $p > 0,05$). Влияние возраста мужчин на повреждения ДНК сперматозоидов широко обсуждается. В нашем пилотном исследовании использовались небольшие выборки пациентов. Поэтому можно только предположить наличие очень слабой корреляции между возрастом мужчин и окис-

лительными повреждениями ДНК в сперматозоидах и говорить о необходимости большего объема материала для ее доказательства.

Поскольку в нашей выборке с патозооспермией преобладали образцы спермы с дефектами подвижности сперматозоидов, а о негативном влиянии окислительного стресса на подвижность сперматозоидов известно с 1970-х гг. [3], то нами был проведен корреляционный анализ между количеством окис-

ленных оснований ДНК и общим количеством подвижных сперматозоидов (с поступательными и непоступательными движениями жгутиков). Результаты анализа представлены на рисунке 2 и демонстрируют хорошую обратную корреляцию между исследуемыми характеристиками сперматозоидов ($R_s = -0,702$, $p < 0,05$), что согласуется с известными данными о влиянии окислительного стресса на подвижность сперматозоидов [3]. В то же время имеется ограниченное количество работ по изучению связи между окислительными повреждениями ДНК и подвижностью сперматозоидов, а их результаты носят не совсем убедительный характер. К примеру, в упомянутой выше работе S. Vorilhon с соавторами [23] корреляция между 8-OHdG в сперматозоидах мужчин с астенозооспермией и поступательной подвижностью сперматозоидов не была статистически значимой. А в исследовании K. Taken с соавторами [24] показана

слабая ($r = -0,300$, $p = 0,024$) корреляция между 8-OHdG и поступательной подвижностью сперматозоидов. Слабая ассоциация ($R_s = 0,36$, $p < 0,0001$) между уровнями 8-OHdG и общей подвижностью сперматозоидов мужчин из субфертильных пар была показана также в работе A. Micillo с соавторами [25]. В отличие от перечисленных исследований, установленная нами корреляция имела среднюю силу ($R_s = -0,702$). Она указывает на окислительный стресс как на общую причину снижения подвижности сперматозоидов и возникновения повреждений ДНК, изученных нами с помощью hOGG1. Отсутствие высокой степени корреляции между этими параметрами свидетельствует о том, что существуют и другие причины снижения подвижности сперматозоидов, а сами окисленные повреждения ДНК должны быть изучены более детально как независимый диагностический показатель мужского бесплодия.

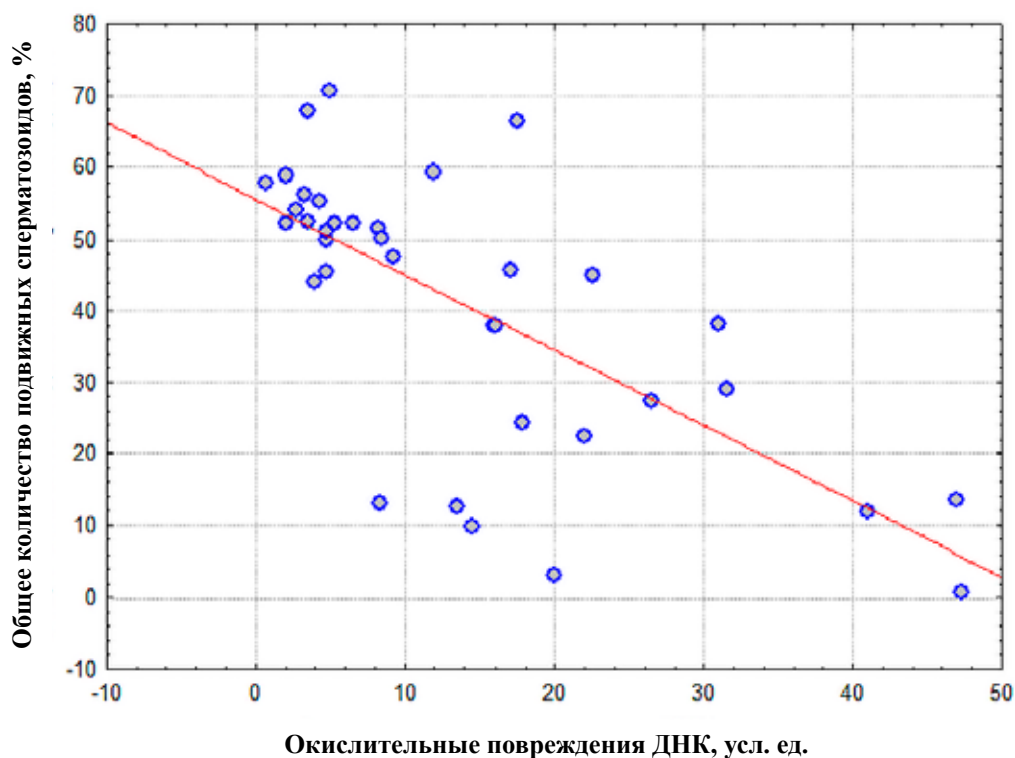


Рис. 2. Отрицательная корреляция между уровнями окисленных оснований ДНК и общей подвижностью сперматозоидов (коэффициент корреляции по Spearman $R_s = -0,702$, $p < 0,05$)

Заключение

В ходе проведенного пилотного исследования впервые адаптирована модифицированная щелочная версия метода ДНК-комет с приме-

нением фермента hOGG1 для оценки окислительных повреждений, а именно окисленных оснований ДНК в сперматозоидах мужчин: 8-оксогуанина и Фару-гуанина, — представля-

ющих собой рискованные факторы для мужской фертильности. С использованием адаптированной методики описаны уровни окислительных повреждений ДНК при нормо- и патозооспермии. Установлено существенно ($p = 0,0018$) более высокое количество окислительных повреждений ДНК при патозооспермии по сравнению с нормозооспермией, что указывает на хорошую значимость этого параметра для диагностики мужской фертильности. Показана обратная корреляция между количеством окислительных повреждений ДНК и общей подвижностью сперматозоидов, что свидетельствует о том, что окислительный стресс может представлять собой общую причину возникновения анализируемых повреждений ДНК и снижения подвижности сперматозоидов. В то же время не обнаружена связь между окислительными повреждениями ДНК сперматозоидов и возрастом мужчин.

Однако небольшая выборка исследуемых образцов спермы, а также технические трудности, возникшие при использовании энзим-модифицированной версии метода ДНК-комет (большая дисперсия фрагментов ДНК и вариабельность уровней повреждений ДНК между повторностями одного образца), не позволяют авторам работы рекомендовать широкое использование данного метода в настоящее время без проведения дальнейшей оптимизации методических подходов и дополнительных исследований на большей выборке образцов спермы.

Представленная работа выполнена в рамках задания 2.2.5 «Изучение спектра повреждений ДНК спермиев при пониженной мужской фертильности» государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» (2021–2025 гг.). Авторы выражают благодарность сотрудникам Республиканского научно-практического центра «Мать и дитя», осуществлявших в 2012–2015 гг. сбор образцов спермы и анкетных данных пациентов; сотрудникам лаборатории молекулярных основ стабильности генома Института генетики и цитологии НАН Беларуси и Республиканского банка ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов за оказанную услугу по депонированию и выдаче образцов спермы из хранилищ банка для проведения исследования.

Список использованных источников

- 1 in 6 people globally affected by infertility: WHO [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility/>. – Дата доступа: 08.08.2023.
- Pereira, R. Morphological and molecular bases of male infertility: a closer look at sperm flagellum / R. Pereira, M. Sousa // *Genes (Basel)*. – 2023. – Vol. 14, № 2. – Pub. 383.
- Male infertility and oxidative stress: A focus on the underlying mechanisms / R. J. Aitken [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2022. – Vol. 11, № 2. – Pub. 306.
- Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries / H. Levine [et al.] // *Hum. Reprod. Update*. – 2023. – Vol. 29, № 2. – P. 157–176.
- Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility / A. Agarwal [et al.] // *World J. Mens Health*. – 2019. – Vol. 37, № 3. – P. 296–312.
- Male subfertility and oxidative stress / E. P. P. Evans [et al.] // *Redox Biol.* – 2021. – Vol. 46. – Pub. 102071.
- Dutta, S. The role of nitric oxide on male and female reproduction / S. Dutta, P. Sengupta // *Malays. J. Med. Sci.* – 2022. – Vol. 29, № 2. – P. 18–30.
- Oxidation of sperm DNA and male infertility / L. R. Ghaleno [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10, № 1. – Pub. 97.
- Smith, C. C. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII / C. C. Smith, M. R. O'Donovan, E. A. Martin // *Mutagenesis*. – 2006. – Vol. 21, № 3. – P. 185–190.
- Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols / A. Collins [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2023. – Vol. 18, № 3. – P. 929–989.
- Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? / A. R. Collins [et al.] // *Environ. Health Perspect.* – 1996. – Vol. 104, Suppl. 3. – P. 465–469.
- Collins, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay / A. R. Collins // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2014. – Vol. 1840, № 2. – P. 794–800.

13. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. – Geneva, Switzerland: World Health Organization. – 2010. – 272 p.
14. Метод диагностики генетически обусловленных форм мужского бесплодия. Инструкция по применению / О. В. Прибушня [и др.] // Министерство здравоохранения Республики Беларусь. – Рег. № 196–1115 от 18.03.2016. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://med.by/methods/book.php?book=2110/>. – Дата доступа: 07.08.2023.
15. Двунитевые разрывы ДНК спермиев у пациентов с нормозооспермией и патозооспермией / И. Д. Кужель [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2023. – Т. 67, № 4. – С. 307–314.
16. Collins, A. In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleotide DNA by human cell extract / A. Collins, I. Fleming, C. Gedik // *Biochem. Biophys. Acta*. – 1994. – Vol. 1 219. – P. 724–727.
17. Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood / K. Al-Salmi [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 51, № 3. – P. 719–725.
18. Mouse spermatocytes express CYP2E1 and respond to acrylamide exposure / B. J. Nixon [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, № 5. – P. e94904.
19. Generation, repair and replication of guanine oxidation products / K. Kino [et al.] // *Genes Environ.* – 2017. – Vol. 39. – Pub. 21.
20. Valavanidis, A. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis / A. Valavanidis, T. Vlachogianni, C. Fiotakis // *J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* – 2009. – Vol. 27, № 2. – P. 120–139.
21. Gedik, C. M. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study / C. M. Gedik, A. Collins; ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19, № 1. – P. 82–84.
22. Cadet, J. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation / J. Cadet, J. R. Wagner // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – Vol. 5, № 2. – Pub. a012559.
23. Accuracy of human sperm DNA oxidation quantification and threshold determination using an 8-OHdG immuno-detection assay / S. Vorilhon [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2018. – Vol. 1, № 33. – P. 553–562.
24. Oxidative DNA damage to sperm cells and peripheral blood leukocytes in infertile men / K. Taken [et al.] // *Med. Sci. Monit.* – 2016. – Vol. 22. – P. 4 289–4 296.
25. Semen leukocytes and oxidative-dependent DNA damage of spermatozoa in male partners of subfertile couples with no symptoms of genital tract infection / A. Micillo [et al.] // *Andrology.* – 2016. – Vol. 4. – P. 808–815.

N. I. Ryabokon, I. D. Kuzhal

OXIDATIVE SPERM DNA DAMAGE IN PATIENTS WITH NORMO- AND PATHOZOOSPERMIA

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.ryabokon@igc.by

A pilot study of oxidative DNA damage in the spermatozoa of men of reproductive age with normozoospermia and pathozoospermia (diagnoses astheno-, asthenoteratho-, oligo-, and oligoasthenozoospermia) was carried out. For the study, an enzyme-modified alkaline version of the comet assay was adapted, which includes the treatment of spermatozoa with the glycosylase hOGG1. This enzyme specifically recognizes the most common oxidative DNA damage — oxidized forms of guanine: 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoguanine) and 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-methylformamidopyrimidine (Fapy-Gua). A significantly increased amount of oxidative DNA damage was found in the group with pathozoospermia compared to normozoospermia. An inverse correlation was shown between the amount of oxidative DNA damage and the total sperm motility, which indicates that oxidative stress is a common cause of the DNA damage under study and of decreased sperm motility.

Keywords: normozoospermia, pathozoospermia, oxidative sperm DNA damage, 8-oxoguanine, Fapy-guanine, enzyme-modified alkaline version of the DNA comet assay, hOGG1.

Дата поступления в редакцию: 29 августа 2023 г.

M. A. Vinter, I. S. Kazlouski, A. I. Zinchenko

PRODUCTION OF CHITOSAN NANOPARTICLES CONTAINING 3',5'-CYCLIC DIADENOSINE MONOPHOSPHATE

State Scientific Institution
 “Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus”
 2 Kuprevich St., 220141 Minsk, the Republic of Belarus
 e-mail: rita.vinter.abc@gmail.com

The possibility to use natural biopolymer chitosan for the production of nanoparticles containing molecules of pharmaceutically valuable 3',5'-cyclic diadenosine monophosphate (cyclic di-AMP) was demonstrated. Experimental conditions were optimized to produce chitosan complexes with cyclic di-AMP (sized about 100 nm), which capacity in regard to cyclic di-AMP reached 38–40%. It was established that cyclic di-AMP is released from its complex with chitosan in a pH-dependent mode (more actively at pH 4.5 than at pH 7.5). The obtained results show that the studied nanocomplexes can be used for the pH-controlled delivery of cyclic di-AMP into cells.

Keywords: 3',5'-cyclic diadenosine monophosphate, nanoparticle, chitosan, adjuvant, chitosan dinucleotide complex, controlled delivery of drug to target cells.

Introduction

The apprehension of emerging new devastating pandemic outbreaks dictates the need to seek effective antiviral formulas [1].

Earlier, the authors [2] have proposed to apply pharmacologically attractive compound cyclic 3',5'-diadenylate (cyclic di-AMP) (Fig. 1), recently discovered in bacteria and archaea [3, 4], as a universal antiviral agent playing a role of the inducer of species-specific endogenous interferon in nature [5, 6], which protects the body of vertebrata from various infectious pathogens.

However, this negatively charged natural dinucleotide remains unstable in blood vessels and can hardly penetrate into immunocytes [7].

This fact requires that scientists develop new

methods enabling the efficient delivery of cyclic di-AMP into pathological tissues and immune target cells.

In this regard our interest was focused on relatively safe natural polymer chitosan — the product of the partial deacetylation of chitin isolated from the shells of crustaceous species, mollusks, insects and fungi [8, 9].

Cationic characteristics of chitosan make the derived nanoparticles (NPs) an attractive material for the elaboration of novel systems providing the delivery of negatively charged drug substances to the target cell tissues [10].

Moreover, chitosan NPs combine the features and benefits of both chitosan and nanocorpuscles [11], capable per se of selectively accumulating

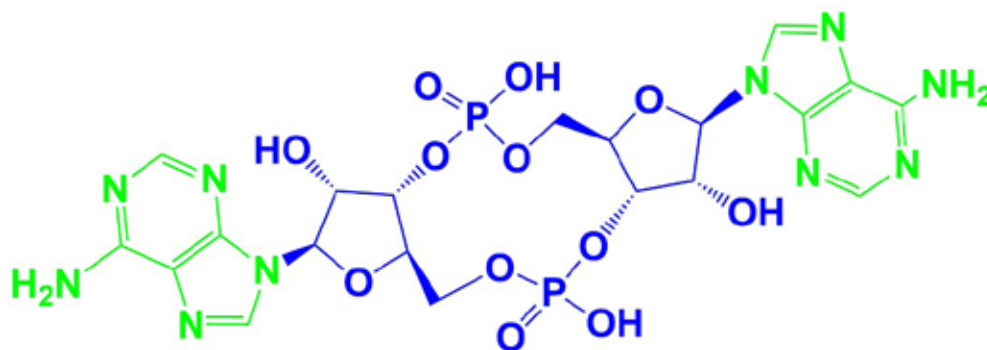


Fig. 1. Structural formula of cyclic di-AMP

within lymph nodes and stimulating the presentation of antigen and congenital immune responses not mediated by adjuvants [12].

To date, numerous techniques were developed for chitosan NPs production [13], yet the most popular methods are ionotropic gelation and polyelectrolyte complexing [14].

To produce chitosan complexes incorporating cyclic di-AMP, in this study we resorted to the method of ionotropic gelation because it is relatively simple and does not require toxic ligating agents and organic solvents.

Materials and methods

For the synthesis of its complexes with cyclic di-AMP, chitosan was provided by the company Acros Organics (Belgium). The stock material with the molecular weight of 100–300 kDa and the 75% deacetylation degree was dissolved in the 1% acetic acid to 0.1% concentration.

The aqueous solution (0.1%) of cyclic di-AMP, synthesized as described previously [15], was added dropwise to the above-mentioned compound at ambient temperature and continuous agitation with magnetic stirrer. The resulting suspension was centrifuged for 10 min at 10,000 g, and the sediment was washed twice with distilled water and subsequently was desiccated in the air at 60 °C during 24 h.

The efficiency of cyclic di-AMP integration into chitosan complexes was estimated via the spectrophotometric ($\lambda = 259$ nm) determination of its concentration in the supernatant upon precipitation of complex particles. The parameter was calculated in accordance with the following formula 1:

$$A = \frac{m1}{m2} \times 100, \quad (1)$$

where A — incorporation efficiency (%),

m1 — the mass of cyclic di-AMP integrated into the particles,

m2 — the mass of cyclic di-AMP engaged in the reaction of complexing.

The capacity of chitosan complexes relative to cyclic di-AMP was evaluated by the formula 2:

$$E = \frac{m1}{m3} \times 100, \quad (2)$$

where E — the capacity of complex prepara-

tion (%),

m1 — the mass of cyclic di-AMP integrated into the nanocomplex,

m3 — the mass of a dried complex.

The size of NPs was measured in collaboration with colleagues from the Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus, by the method of dynamic light scattering using Zetasizer Nano (Malvern Instruments, UK) in compliance with the manufacturer's guidelines.

To release cyclic di-AMP from chitosan complexes, a sample of the complex was resuspended in distilled water or in a citrate-phosphate buffer. The suspension was incubated at room temperature, and aliquots were collected at defined time intervals. The elution rate was assessed via the spectrophotometric ($\lambda = 259$ nm) determination of its concentration in the supernatant upon the sedimentation of complex particles.

The antibacterial activity of chitosan complexes with cyclic di-AMP was analyzed using the method described in the study [16]. The test cultures *Escherichia coli* BIM B-1033 and *Staphylococcus aureus* BIM B-1841 were provided by the Belarussian collection of non-pathogenic microorganisms, the Institute of Microbiology, NAS of Belarus.

Experimental data obtained in this research represent the confidence range of arithmetic means for 95% probability level.

Results and discussion

The initial investigation stage was devoted to the synthesis of NPs from chitosan and cyclic di-AMP. Mixing of chitosan and cyclic di-AMP solutions, according to the procedure described in the section “Materials and methods”, resulted in the transparent, slightly opalescent solution. The component loading efficiency, NPs capacity with regard to the molecules of a ligand (cyclic di-AMP), and their size were chosen as the main parameters characterizing produced NPs. It was presumed that shifting of chitosan — the cyclic di-AMP ratio toward the latter component — is likely to promote the efficient binding of a ligand to the support and holding capacity of resultant NPs with respect to a cyclic di-AMP constituent.

Results of the experiment illustrated by Fig. 2 testify that with an increase in chitosan

(the cyclic di-AMP mass ratio above 1:3) the component loading efficiency tends to decline, whereas capacity of NPs in relation to immobilized cyclic di-AMP expands.

Experimental results evaluating the size of dinucleotide-chitosan complexes are reflected in Fig 3. It should be noted that size measurements were conducted for the complexes displaying, in

our opinion, the highest parameters of loading efficiency and elevated holding capacity.

It may be seen in Fig. 3 that all derived complexes are distinguished by nanosize dimensions. Their size tends to rise with an increase in the chitosan/cyclic di-AMP mass ratio toward the latter component. Thus, we originally demonstrated the first evidence of chitosan binding with cyclic di-

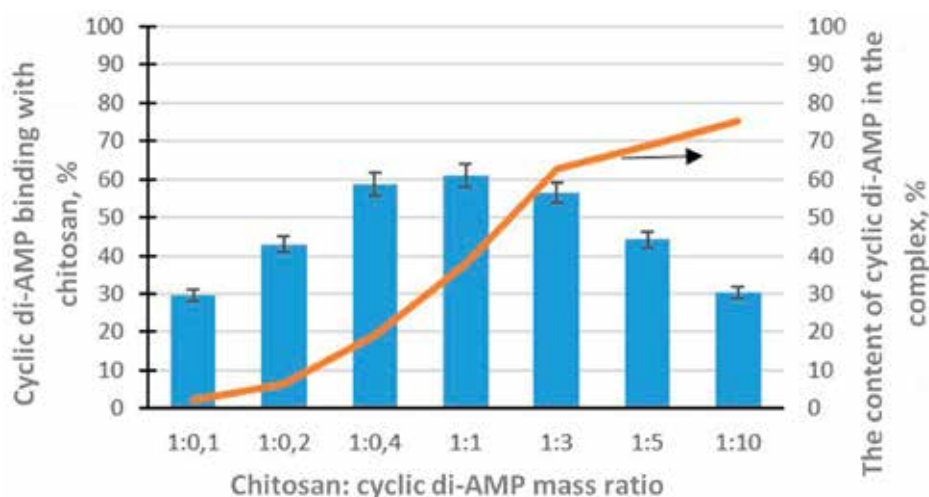


Fig. 2. Binding of cyclic di-AMP to chitosan

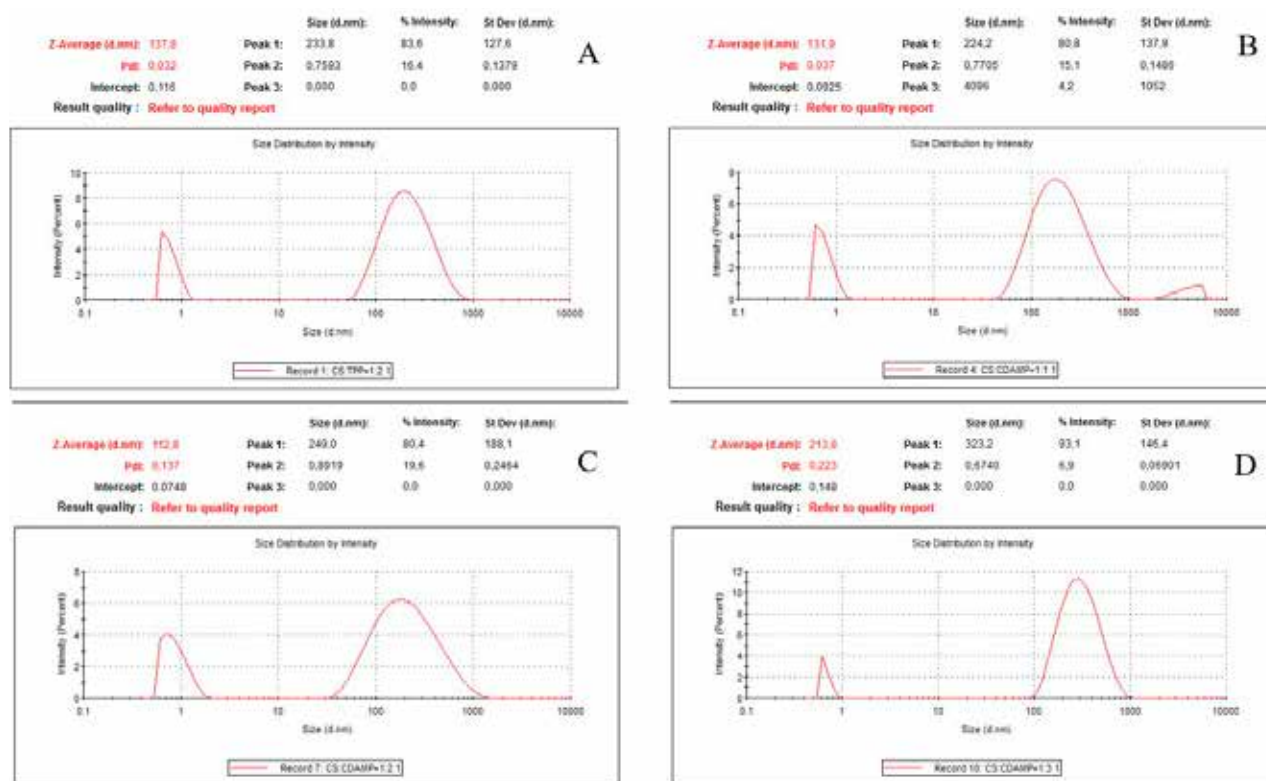


Fig. 3. The size of chitosan/cyclic di-AMP NPs: empty chitosan NPs with TPP in the ratio 1:2 (A); chitosan NPs with cyclic di-AMP in the mass ratio 1:1 (B), 1:2 (C) and 1:3 (D)

AMP and the production of nanosize complexes.

Noteworthy is that the produced chitosan/cyclic di-AMP complexes possess antibacterial activity, as stated in previous reports by other authors for chitosan NPs [17].

Fig. 4 illustrates the antibacterial activity of NPs resulting from the interaction of chitosan and cyclic di-AMP in 1:1 ratio during the experiments with two test cultures.

It follows from the results presented in Fig. 5

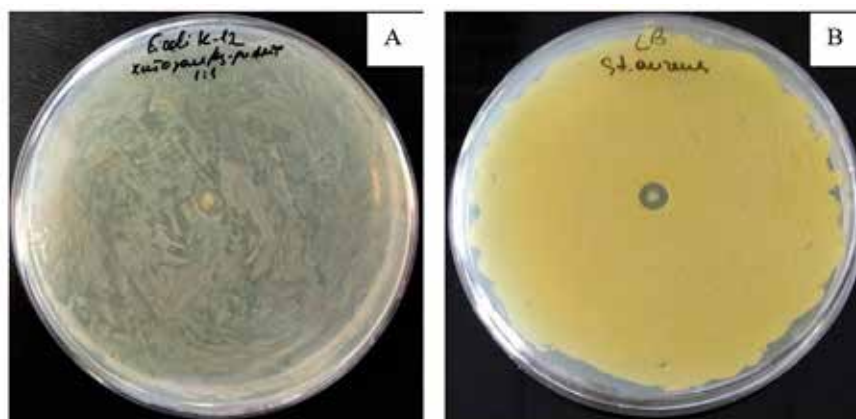


Fig. 4. Antibacterial activity of chitosan NPs tested on the cultures *E. coli* BIM B-1033 (A) and *St. aureus* BIM B-1841 (B)

that the produced NPs show antibacterial activity towards both microbial strains studied.

To elucidate the prospects of applying chitosan/cyclic di-AMP complexes for the delivery of an active compound to target cells, we staged an experiment releasing a dinucleotide from NPs under different conditions.

Fig. 5 provides the curves reflecting the extent of cyclic di-AMP liberation from the chitosan complex with time of incubation in distilled water and the citrate-phosphate buffer at various pH values (7.4, 4.5 and 1.5). Such pH values were motivated by normal blood acidity around 7.4 [18], while pH within lysosomes fluctuates in the

range from 4 to 5 [19].

The citrate-phosphate buffer was selected to maintain pH of the solution in the optimal testing area.

It is evident from Fig. 5 that cyclic di-AMP was not eluted from nano-complex into water. In contrast, elution into the citrate-phosphate buffer (pH 7.4.) reached 38% by nearly 24 h. Under acidosis conditions (pH 4.5 and 1.5), the release of cyclic di-AMP from chitosan complexes upon 21 h attained 49% and over 90%, respectively.

The proven fact of cyclic di-AMP liberation from chitosan complexes evidences in favor of engaging the system studied into the prolonged

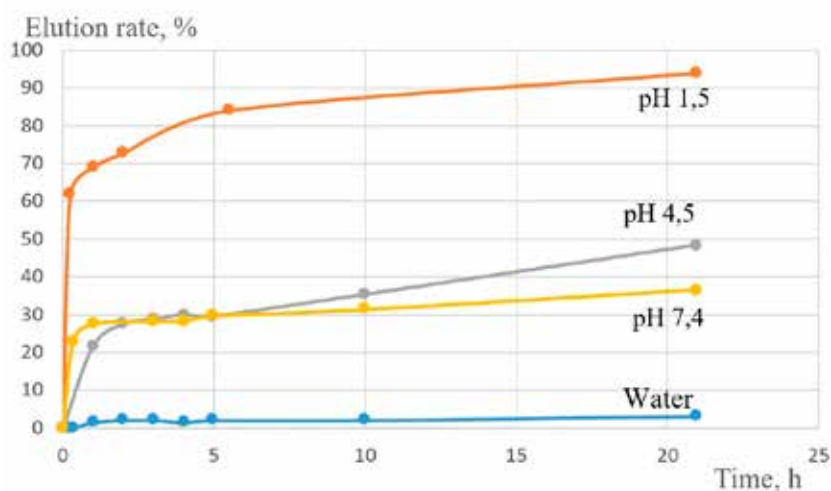


Fig. 5. The pH-dependent release of cyclic di-AMP from complexes with chitosan

delivery of an active dinucleotide to target cells.

Conclusion

Earlier, we proposed using the inducer of endogenous interferon cyclic di-AMP as a universal antiviral agent. The advantage of this compound over other numerous interferon inducers is that cyclic di-AMP represents an element of a naturally evolved mechanism ensuring the universal protection of vertebrata from the attack of multiple viral pathogens. Unfortunately, a molecule of this dinucleotide has two negative charges presumably complicating its penetration into negatively charged virus-infected and malignant cells.

In the literature known, the process of the immobilization of active compounds on positively charged supports, including chitosan carriers, was described as a solution to the problem.

The present study showed the effects of the prolonged cyclic di-AMP release from chitosan nanoparticles in mildly acidic media and indicated the principal possibility of using the nanocomplexes studied for the pH-controlled delivery of cyclic di-AMP to target cells.

References

1. Origin and evolution of SARS-CoV-2 / I. Pagani [et al.] // *The European Physical Journal Plus*. – 2023. – Vol. 138, № 2. – Art. 157. – DOI: 10.1140/epjp/s13360-023-03719-6
2. Zinchenko, A. I. Interferons and their inducers as the elements to control COVID-19 / A. I. Zinchenko, V. A. Vinter, I. S. Kazlouski // *Science and Innovations*. – 2023. – № 2. – P. 24–29 (in Russian).
3. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates / G. Witte [et al.] // *Molecular cell*. – 2008. – Vol. 30, № 2. – P. 167–178. – DOI: 10.1016/j.molcel.2008.02.020
4. A decade of research on the second messenger c-di-AMP / W. Yin [et al.] // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2020. – Vol. 44, № 6. – P. 701–724. – DOI: 10.1093/femsre/fuaa019
5. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors / L. Deng [et al.] // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41, № 5. – P. 843–852. – DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.019
6. Intratumoral administration of cGAMP transiently accumulates potent macrophages for anti-tumor immunity at a mouse tumor site / T. Ohkuri [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2017. – Vol. 66, № 6. – P. 705–716. – DOI: 10.1007/s00262-017-1975-1
7. Nanoparticle delivery improves the pharmacokinetic properties of cyclic dinucleotide STING agonists to open a therapeutic window for intravenous administration / M. Wehbe [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2021. – Vol. 330. – P. 118–129. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.11.017
8. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives / M. R. Kumar [et al.] // *Chemical reviews*. – 2004. – Vol. 104, № 12. – P. 6017–6084. – DOI: 10.1021/cr030441b
9. Kean, T. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan / T. Kean, M. Thanou // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – Vol. 62, № 1. – P. 3–11. – DOI: 10.1016/j.addr.2009.09.004
10. Chitosan nanoparticles: a versatile platform for biomedical applications / S. M. Bashir [et al.] // *Materials*. – 2022. – Vol. 15, № 19. – Art. 6521.
11. Divya, K. Chitosan nanoparticles preparation and applications / K. Divya, M. Jisha // *Environmental Chemistry Letters*. – 2018. – Vol. 16. – P. 101–112. – DOI: 10.1007/s10311-017-0670-y
12. A STING-activating nanovaccine for cancer immunotherapy / M. Luo [et al.] // *Nature Nanotechnology*. – 2017. – Vol. 12, № 7. – P. 648–654. – DOI: 10.1038/nnano.2017.52
13. Grenha, A. Chitosan nanoparticles: A survey of preparation methods / A. Grenha // *Journal of Drug Targeting*. – 2012. – Vol. 20, № 4. – P. 291–300. – DOI: 10.3109/1061186X.2011.654121
14. Tiyaboonchai, W. Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery / W. Tiyaboonchai // *Naresuan University Journal: Science and Technology*. – 2013. – Vol. 11, № 3. – P. 51–66.
15. Vinter, M. A. Construction of bacterial strain forming inclusion bodies, exhibiting diadenylate cyclase activity / M. A. Vinter, I. S. Kazlouski, A. I. Zinchenko // *Molecular and Applied Genetics*. – 2022. – Vol. 33. – P. 105–109.
16. Potential antimicrobial applications of chitosan nanoparticles (ChNP) / N. A. S. Rozman

[et al.] // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2019. – Vol. 29, № 7. – P. 1 009–1 013. – DOI: 10.4014/jmb.1904.04065

17. Evaluation of the antibacterial activity of ciprofloxacin in the composition of chitosan nanoparticles / A. M. Zhirov [et al.] // Medical News of North Caucasus. – 2022. – Vol. 17, № 1. – P. 47–51. – DOI: 10.14300/mnnc.2022.17013 (In Russian).

18. *In vitro* sustained release of LMWH from MgAl-layered double hydroxide nanohybrids / Z. Gu [et al.] // Chemistry of Materials. – 2008. – Vol. 20, № 11. – P. 3 715–3 722. – DOI: 10.1021/cm703602t

19. Inorganic delivery vector for intravenous injection / S. Y. Kwak [et al.] // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25, № 28. – P. 5 995–6 001. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.056

М. А. Винтер, И. С. Казловский, А. И. Зинченко

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА, ВКЛЮЧАЮЩИХ 3',5'-ЦИКЛИЧЕСКИЙ ДИАДЕНОЗИНМОНОФОСФАТ

Государственное научное учреждение
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Купревича, 2
e-mail: rita.vinter.abc@gmail.com

Показана возможность использования природного биополимера хитозана для получения наночастиц, включающих молекулы фармацевтически важного 3',5'-циклического диаденозинмонофосфата (цикло-ди-АМФ). Подобраны экспериментальные условия для получения комплексов хитозана с цикло-ди-АМФ (размером порядка 100 нм), емкость которых в отношении цикло-ди-АМФ достигает 38–40 мас.%. Установлен факт высвобождения цикло-ди-АМФ из его комплекса с хитозаном pH-зависимым способом (при pH среды 4,5 более активно, чем при pH 7,4). Полученные результаты свидетельствуют в пользу возможности применения изученных наноконструкций для pH-контролируемой доставки цикло-ди-АМФ в клетки-мишени.

Ключевые слова: 3',5'-циклический диаденозинмонофосфат, наночастица, хитозан, адъювант, хитозан-ди-нуклеотидный комплекс, контролируемая доставка лекарства в клетки-мишени.

Дата поступления в редакцию: 11 июля 2023 г.

А. Б. Булатовский¹, Н. Н. Веялкина², А. И. Зинченко¹

ПОЛУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ АННЕКСИНА А5 И АДЕНОЗИНДЕГРАДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ

¹Государственное научное учреждение
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220084, г. Минск, ул. Акад. Купревича, 2
e-mail: a.bulatovski@yandex.by

²Государственное научное учреждение
«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 246007, г. Гомель, ул. Федюнинского, 4

Приведены результаты исследований, посвященных разработке биологической технологии получения препаратов химерных белков, представляющих собой человеческий белок аннексин А5, генно-инженерно слитый с аденозиндезаминазой или пуриннуклеозидфосфорилазой бактериальной природы. Технологическая схема содержит следующие стадии: создание штаммов-продуцентов, глубинное культивирование соответствующих штаммов, ультразвуковая дезинтеграция клеток и осветление клеточного лизата, металл-аффинная хроматография с последующим диализом растворов целевых белков. Указанная технология позволяет получать химерные белки аннексин-аденозиндезаминаза и аннексин-пуриннуклеозидфосфорилаза с чистотой более 95% и выходом порядка 74%. Препараты полученных белков проявили ограниченную противоопухолевую активность на мышинной модели солидной опухоли при перевивке клеток асцитной карциномы Эрлиха. .

Ключевые слова: химерный белок, аннексин А5, *Escherichia coli*, фосфатидилсерин, аденозиндезаминаза, пуриннуклеозидфосфорилаза, лабораторная технология.

Введение

Рак является серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. По данным Американского онкологического общества, в 2022 г. в Соединенных Штатах произошло 1,9 млн новых случаев заболевания раком и 610 000 случаев смерти от рака, что представляет серьезную угрозу для здоровья человека [1, 2].

В настоящее время для лечения рака применяются главным образом лучевая терапия, хирургия и химиотерапия — отдельно или в комбинациях. Радиация и хирургия имеют ограниченные возможности, так как они не могут излечивать метастазы, которые образуются иногда уже на ранних стадиях заболевания.

Основной проблемой, тормозящей развитие химиотерапии рака, является неспособность таких препаратов эффективно отличать «больные» клетки от здоровых. Так, считается, что в результате системного введения противоопухолевых цитостатиков лишь 1% препаратов

достигает цели, тогда как основная часть поражает здоровые ткани организма. В результате они вызывают серьезные побочные эффекты, которые часто сводят на нет пользу от такого лечения. Кроме того, традиционная химиотерапия (предусматривающая непосредственную гибель опухолевых клеток) становится фактором отбора резистентных клеточных вариантов и ослабляет иммунитет организма в отношении инфекционных заболеваний и рецидивов рака в будущем.

Важный успех в изучении рака (обнаружение молекулярных мишеней, уникальных для раковых клеток) дал толчок к развитию так называемой таргетной (или адресной) терапии — одного из перспективных направлений лечения онкологических заболеваний. Этот способ лечения предполагает использование препаратов, мишенью которых служат молекулы, синтезирующиеся только опухолевыми клетками [3, 4].

Фосфатидилсерин (ФС) представляет собой

компонент клеточной мембраны, находящийся главным образом на ее внутренней стороне, за исключением раковых клеток и кровеносных сосудов опухолей, где он находится на наружной стороне клеточных мембран [5]. Поэтому ФС служит в качестве мишени для таргетной терапии рака [6]. В качестве транспортера противораковых субстанций при такой терапии может выступать аннексин А5 — человеческий плацентарный белок, который имеет сильное сродство к ФС [7].

Нами ранее предложена идея устранения защиты рака от хозяинского иммунитета с помощью аденозиндеградирующих ферментов, в частности аденозиндезаминазы (АДазы) и пурипнуклеозидфосфорилазы (ПНФазы), слитых с человеческим белком аннексином А5 [8, 9].

Целью данной работы явилось создание простой лабораторной технологии получения и предварительное изучение противоопухолевой активности препаратов химерных белков аннексин-АДазы («Аннексин-АДазы») и аннексин-ПНФазы («Аннексин-ПНФаза»).

Материалы и методы

Полученные нами ранее плазмиды рAA17 и рAD19 [10, 11] использовали для трансформации компетентных клеток *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3), в результате чего были получены рекомбинантные штаммы *E. coli* AA17 — продуцент химерного белка аннексин-АДазы и *E. coli* AD19 — продуцент химерного белка аннексин-ПНФазы.

Трансформированные бактерии высевали на среду Luria-Bertani с селективным антибиотиком (канамицин 100,0 мкг/мл) и растили в течение 18 ч. По прошествии этого времени выросшие колонии анализировали по цвету, прозрачности и текстуре края колоний (светло-бежевого цвета, прозрачные, с ровным краем). Колонии, имеющие правильные признаки, подвергали молекулярно-генетическому скринингу методом ПЦР, для определения вставки генов химерных белков в плазидах.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 50 мкл содержала: 1 ед. активности Flash ДНК-полимеразы (ООО «АртБиоТех», Беларусь), 20 мкл 2,5X буфера для Flash ДНК-полимеразы, по 20 пмоль прямого (5'-GTGGTGGTCCACAACGCTACCCACACATTA

ATG-3') и обратного праймеров (5'-GGTGATGGTGATGCTCGTCATCTTCTCCACAGAGCAG-3') и ДНК бактериальных клеток трансформантов. Амплификацию проводили по следующей программе: этап предденатурации (2 мин — 98 °С); 25 циклов амплификации (5 сек — 98 °С; 5 сек — 55 °С; 60 сек — 72 °С); финальная элонгация (2 мин — 72 °С). Используемые в работе олигонуклеотидные праймеры синтезированы ООО «АртБиоТех» (Беларусь).

Колонии, имеющие вставки генов химерных белков, были пересеяны и использованы для наработки целевых белков.

На первом этапе работы проводили культивирование ночной культуры полученных рекомбинантных штаммов *E. coli* AA17 и *E. coli* AD19 в 50 мл жидкой питательной среды Luria-Bertani с селективным антибиотиком канамицином 100,0 мкг/мл в течение 18 ч.

Глубинное культивирование полученных штаммов-продуцентов для экспрессии химерных белков проводили в двухлитровых колбах Эрленмейера с 540 мл жидкой питательной среды ZYM505 [12], содержащей канамицин в концентрации 100,0 мкг/мл. В каждую колбу вносили по 10 мл ночной культуры *E. coli* AA17 и *E. coli* AD19.

Бактерии культивировали на термостатируемой качалке в течение 4 ч при температуре 37 °С до достижения оптической плотности культуральной жидкости (КЖ) 0,6 ($\lambda = 600$ нм), затем в колбы вносили по 200 мкл индуктора изопропил- β -D-1-тио-галактопиранозид (0,5 М) и продолжали культивирование в течение 4 ч. Далее клетки осаждали центрифугированием при 15 000 g в течение 10 мин и температуре 4 °С. Супернатант отбрасывали, осадок промывали 100 мл буфера А (300 мМ NaCl, 50 мМ Na₂HPO₄, 10 мМ имидазол, рН 8,0) и повторно центрифугировали при тех же условиях. Клетки ресуспендировали в 25 мл охлажденного буфера А и разрушали ультразвуком, используя прибор «Sonifier-450» («Brandson», США) при следующих режимах: мощность — 0,05 кВт; температура — 4 °С; продолжительность — 600 импульсов по 0,5 сек. Клеточные лизаты осветляли центрифугированием при 60 000 g в течение 40 мин и температуре 4 °С.

Супернатанты, содержащие целевые бел-

ки, наносили на хроматографические колонки с 5 мл смол Ni-NTA («Quagen», США). Через колонки последовательно пропускали 200 мл промывочного буфера А. Химерные белки элюировали буфером Б (300 мМ NaCl, 50 мМ Na₂HPO₄, 500 мМ имидазол, pH 8,0). Полученные в результате металл-аффинной хроматографии растворы белков объединяли и подвергали диализу против 400-кратного объема фосфатно-солевого буфера (137 мМ NaCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 2,7 мМ KCl, 1,8 мМ KH₂PO₄, pH 7,4; PBS). Препараты химерных белков после диализа анализировали с помощью додецилсульфат натрия (ДСН) полиакриламидного гель-электрофореза.

Измерение ферментативных активностей (АДазной и ПНФазной) проводили как описано нами ранее [9].

Проверку противоопухолевой активности препаратов «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» проводили на самках мышей линии BALB/c в возрасте 2,5–3 месяца. Животных содержали в условиях стационарного вивария Института радиобиологии НАН Беларуси на полноценном стандартном пищевом рационе и свободным доступом к воде, 12/12-часовом режиме освещения и темноты.

Использование животных в эксперименте проводилось с соблюдением норм, регламентированных международными рекомендациями и правилами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 г.

Суспензию клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), для последующей перевивки получали у мышей-доноров на 9-е сутки роста опухоли. Для прививки опухоли приготавливалась суспензия клеток АКЭ в концентрации 9×10^7 клеток на 1 мл суспензии. Животным вводили по 0,1 мл суспензии (9×10^6 клеток) в область первой пары молочной железы у правой передней конечности животного, место прокола обрабатывали спиртом.

Начиная с 5-х суток прививки опухолевых клеток животным двух групп вводили препараты химерных белков «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» в область образования опухолевого узла в дозе 5 мг/кг массы животного. Контрольной группе животных вводили стерильный 0,9%-й раствор NaCl в соот-

ветствующем объеме.

Наблюдение за состоянием животных вели на протяжении всего экспериментального периода. На 22 сутки эксперимента выполнялся рентгеновский снимок при помощи установки для облучения биологического назначения X-RAD 320 с системой визуализации OptiMAX (PrecisionX-RayInc., США), для чего мышь наркотизировали и фиксировали на специальной подложке. Далее полученные изображения обрабатывали при помощи программного пакета ImageJ. Значения площади опухолевого узла (S) использовали для расчета процента торможения роста опухоли (ТРО, %). Расчеты проводили по формуле 1:

$$\text{ТРО} = \frac{S_{\text{контроля}} - S_{\text{опыта}}}{S_{\text{контроля}}} \times 100 \quad (1)$$

Животных выводили из эксперимента путем декапитации на фоне глубокого эфирного наркоза на 22-е сутки после прививки опухолевых клеток.

Приведенные в работе экспериментальные данные (кроме табл. 2) представляют собой доверительный интервал среднего арифметического для 95%-го уровня вероятности.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы проводили глубинное культивирование бактерий и выделение из них химерных белков. Для этого мы использовали подобранные условия: штаммы *E. coli* AA17 и *E. coli* AD19; среда ZYM505; время индукции синтеза целевых белков — 4 ч. Полученные клеточные биомассы подвергали непрерывной ультразвуковой дезинтеграции и центрифугированию на ультраскоростной центрифуге при 60 000 g в течение 40 мин для освобождения от телец-включения. Клеточные лизаты наносили на колонку со смолой и проводили промывку смолы для удаления примесных компонентов. Первый, отмывочный, буфер А служил для отмывки от не целевых клеточных компонентов. Второй буфер Б служил для проведения элюции химерных белков со смолы Ni-NTA. Элюцию проводили градиентным методом, начиная от 80 мМ имидазола в буфере и заканчивая буфером с концентрацией имидазола 500 мМ. Этот метод элюции помогает получить более чистые фракции хи-

мерного белка, содержащих минимальное количество имидазола.

Концентрацию белка в образцах определяли методом Брэдфорд [13]. Пробы с наибольшей концентрацией белка объединяли и подвергали диализу против 400-кратного объема буфера PBS. В данном буфере осмолярность и концентрации ионов соответствуют концентрациям в теле человека и животных. Применение этого буфера в качестве растворителя препаратов химерных белков не будет способствовать вызову неспецифического иммунного ответа или воспаления, поэтому PBS-буфер является более удобным для проведения исследований на мышах. Чистота полученных препаратов химерных белков по данным гель-электрофореза (рис. 1) составила не менее 95%.

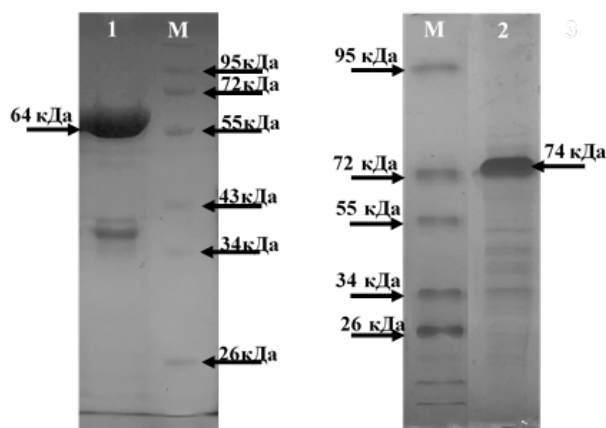


Рис. 1. Электрофореграмма в ДСН-полиакриламидном геле очищенных химерных белков: 1 — белок аннексин-ПНФаза, 2 — белок аннексин-АДаза; М — стандарты молекулярной массы белков

Разработанная в настоящем исследовании общая технологическая схема получения препаратов химерных белков «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» представлена на рисунке 2.

Применение этой схемы позволяет получать высокоочищенные препараты целевых белков с выходом не менее 74% (табл. 1).

Результаты исследования противоопухолевой активности препаратов «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» на мышах линии BALB/c показали, что на 5–6 сутки после прививки клеток опухоли АКЭ у животных наблюдалось наличие опухолевого очага и припухлости в области верхних правых молочных

желез. При этом у мышей сформировались опухолевые узлы плотной консистенции с бугристой неровной поверхностью, которые хорошо определялись при пальпации и при рентгенографии.

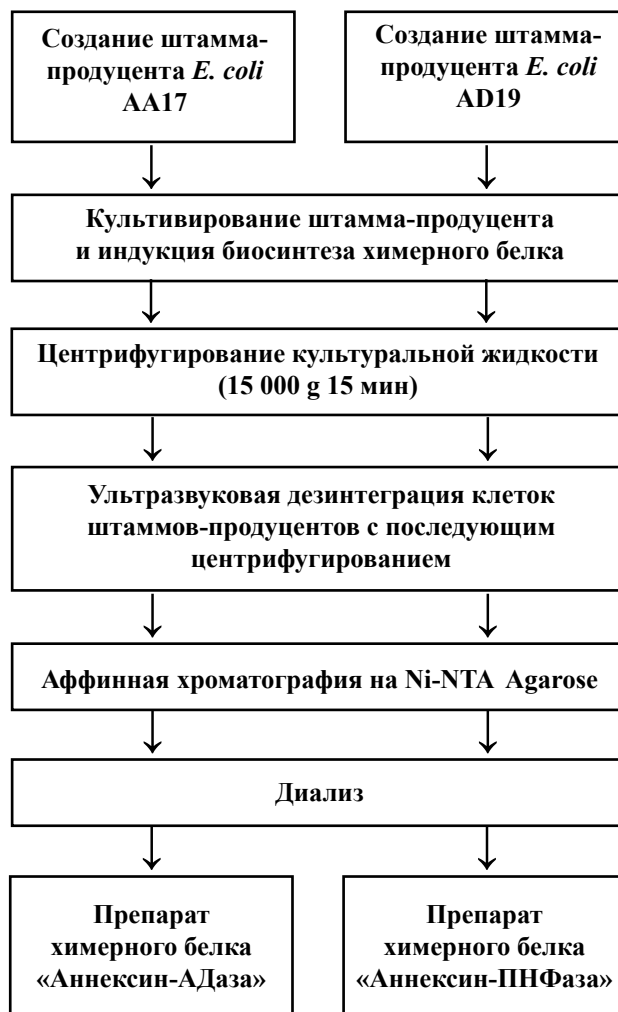


Рис. 2. Схема получения препаратов химерных белков

Введение мышам-опухоленосителям обоих изучаемых препаратов вызывало снижение размеров опухоли по сравнению с контролем (табл. 2). В качестве примера противоопухолевого действия изученных препаратов приведена на рисунке 3 обзорная рентгенограмма мышей в задне-передней проекции на 22 сутки после прививки клеточной суспензии АКЭ, которым вводили препарат «Аннексин-АДаза».

В частности, при введении растворов препаратов «Аннексин-АДаза» и «Аннексин-ПНФаза» показатель торможения роста опухоли составлял 49,82 и 32,18% соответственно.

Таблица 1

Выделение и очистка химерных белков

Стадия очистки	Химерный белок	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки	Выход, %
Осаждение клеток из КЖ центрифугированием (15 000 g, 15 мин)	аннексин-АДаза	7 100 ± 56	6,8 ± 0,5	1	100
	аннексин-ПНФаза	13 500 ± 86	7,9 ± 0,6	1	100
УЗ-дезинтеграция клеток с последующим центрифугированием (15 000 g, 30 мин)	аннексин-АДаза	6 900 ± 56	6,5 ± 0,5	1	95,6
	аннексин-ПНФаза	12 800 ± 81	7,7 ± 0,6	1	94,8
Аффинная хроматография на смоле Ni-NTA с последующим диализом	аннексин-АДаза	5 280 ± 25	50,6 ± 4,1	7,4	74,4
	аннексин-ПНФаза	10 000 ± 86	57,9 ± 4,3	7,1	74,1

Таблица 2

Изменение массы опухоли мышей после введения им препаратов химерных белков

Вводимый препарат	Масса опухоли, г	Площадь опухоли, см ²	Торможение роста опухоли, %
«Аннексин-АДаза»	1,11 ± 0,23*	1,394 ± 0,26	49,82
«Аннексин-ПНФаза»	1,71 ± 0,20	1,884 ± 0,25	32,18
Контроль	2,33 ± 0,55	2,779 ± 0,40	—

Примечание. * — стандартная ошибка среднего арифметического

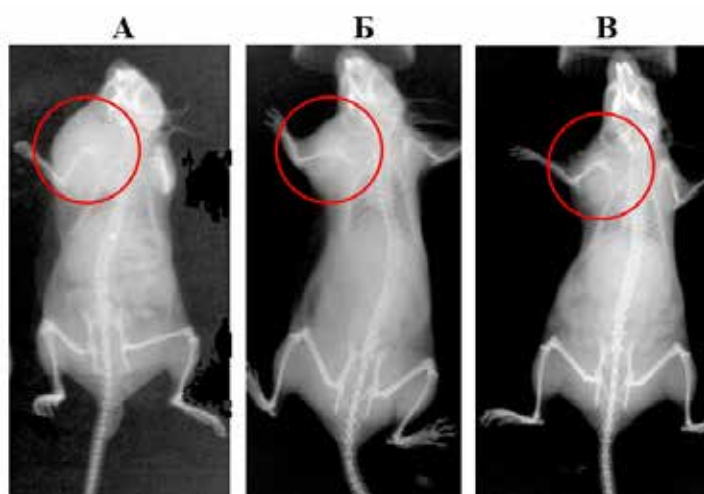


Рис. 3. Рентгеновский снимок животных с опухолью. А — животное из контрольной группы, Б и В — животные после введения препарата «Аннексин-АДаза» в дозах 5 и 10 мг/кг соответственно

Заключение

Для проверки ранее высказанной нами идеи устранения защиты рака от хозяйского иммунитета с помощью аденозиндеградирующих

ферментов, слитых с аннексином А5, в ходе настоящего исследования была создана биологическая технология получения препаратов химерных белков «Аннексин-АДаза» и «Ан-

нексин-ПНФаза». Разработанная технология позволяет получать указанные белки с чистотой более 95% и выходом порядка 74%. В частично оптимизированных экспериментальных условиях изученные белки проявили ограниченную противоопухолевую активность на мышинной модели солидной опухоли при перевивке клеток асцитной карциномы Эрлиха.

Список использованных источников

1. Li, K. Development of small-molecule immune checkpoint inhibitors of PD-1/PD-L1 as a new therapeutic strategy for tumour immunotherapy / K. Li, H. Tian // *J. Drug. Target.* – 2019. – Vol. 27. – P. 244–256.
2. New developments in the mechanism and application of immune checkpoint inhibitors in cancer therapy (Review) / Y. Wang [et al.] // *Int. J. Oncology.* – 2023. – Vol. 63, № 1. – Art. 86.
3. Basistyi, V. S. A sticky situation for targeted cancer therapy / V. S. Basistyi, J. H. Frederich // *Cell. Chem. Biol.* – 2023. – Vol. 30, № 6. – P. 569–572.
4. Trajkovic-Arsic, M. Is metabolism the magic bullet for targeted cancer therapy? / M. Trajkovic-Arsic, E. Subramani // *BMC Cancer.* – 2023. – Vol. 23, № 1. – Art. 484.
5. In search of a novel target—phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy / S. B. Riedl [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1 808, № 11. – P. 2 638–2 645.
6. Delivery of IL-2 to the T cell surface through phosphatidylserine permits robust expansion of CD8 T cells / A. MacDonald [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 755 995.
7. Ran, S. Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy / S. Ran, P. E. Thorpe // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2002. – Vol. 54, № 5. – P. 1 479–1 484.
8. Зинченко, А. И. Аденозин как потенциальная мишень для биотерапии рака / А. И. Зинченко // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук.* – 2016. – № 4. – С. 118–128.
9. Булатовский, А. Б. Создание штамма — продуцента бактериальной нуклеозидфосфорилазы, слитой с человеческим аннексином А5 / А. Б. Булатовский, А. И. Зинченко // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук.* – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 239–244.
10. Создание штамма-продуцента химерного белка, состоящего из человеческого аннексина и бактериальной аденозиндезаминазы / А. Б. Булатовский [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2017. – Т. 61, № 4. – С. 89–95.
11. Булатовский, А. Б. Создание генетической конструкции для получения штамма-продуцента пурииннуклеозидфосфорилазы, слитой с аннексином-А5 / А. Б. Булатовский, И. С. Казловский, А. И. Зинченко // *Сб. науч. трудов Института микробиологии НАН Беларуси «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты».* – Минск, «Беларуская навука», 2019. – Т. 11. – С. 62–71.
12. Validation of the catalytic mechanism of *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase by structural and kinetic studies / G. Mikleusevic [et al.] // *Biochimie.* – 2011. – Vol. 93. – P. 1 610–1 622.
13. Walker, J. M. The protein protocols handbook / J. M. Walker. – 2-d ed. – Totowa: Humana Press, 2002. – 15 p.

A. B. Bulatovski¹, N. N. Veyalkina², A. I. Zinchenko¹

PRODUCTION OF PHARMACOLOGICALLY PROMISING CHIMERIC PROTEINS BASED ON ANNEXIN A5 AND ADENOSINE DEGRADING ENZYMES

¹State Scientific Institution

“Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus”

2 Kuprevich St., 220084 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: a.bulatovski@yandex.by

²State Scientific Institution

“Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus”

4, Fedyuninskogo St., 246007 Gomel, the Republic of Belarus

A biological technology for the production of chimeric protein preparations, representing the human protein annexin A5, genetically engineered and fused to bacterial adenosine deaminase or purine nucleoside phosphorylase, has been developed. The technological scheme contains the following stages: development of producer strains, submerged cultivation of relevant strains, ultrasonic disintegration of cells, and metal affinity chromatography with subsequent dialysis of target protein solutions. The specified technology enables to obtain chimeric proteins — annexin-adenosine deaminase and annexin-purine nucleoside phosphorylase, with the purity of more than 95% and the yield of about 74%. The obtained protein preparations showed limited antitumor activity on the mouse model of a solid tumour during the transplantation of Erlich ascites carcinoma cells.

Keywords: chimeric protein, annexin A5, *Escherichia coli*, phosphatidylserine, adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase, laboratory technology.

Дата поступления в редакцию: 31 августа 2023 г.

Е. П. Янчук, И. Б. Моссэ, Н. Г. Седляр, К. А. Моссэ, А. В. Кильчевский

НАИБОЛЕЕ ИНФОРМАТИВНЫЕ ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С КОГНИТИВНЫМИ СПОСОБНОСТЯМИ ЧЕЛОВЕКА

Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая 27
e-mail: e.p.yanchuk@igc.by

Результаты многочисленных молекулярно-генетических исследований, и в том числе проведенных на гомозиготных близнецах, доказали связь интеллектуальных способностей с вариативностью ДНК. Несмотря на множественные исследования, посвященные передаче IQ по наследству, сведения о генетических механизмах, вовлеченных в когнитивное функционирование, до сих пор окончательно не установлены. В связи с этим цель данной работы заключается в анализе современных публикаций в области генетики интеллекта и выявлении наиболее информативных вариантов генов, ассоциированных с когнитивными способностями человека. Результаты крупнейших GWAS исследований способствовали выявлению ряда значимых локусов генов, ассоциированных с различными показателями интеллекта. Однако даже в тех случаях, когда генетические варианты статистически значимо ассоциированы с когнитивными фенотипами, размеры их эффектов, как правило, очень малы (1–2%). В то же время уровень интеллекта детерминируется большим количеством генов, и эффект их взаимодействия может многократно превышать сумму эффектов отдельных генов. Наибольший вклад в формирование интеллектуальных способностей человека вносят гены, детерминирующие регуляцию нейрогенеза и синаптическую пластичность, в особенности гены дофаминергических и серотонинергических нейронов. Определение генетической составляющей интеллекта представляет большой интерес для врачей психиатров, психотерапевтов и психологов, используется криминалистами для идентификации личности по ДНК, учитывается при отборе кандидатов для экстремальных профессий, а также в ряде других областей жизни.

Ключевые слова: GWAS (полногеномный поиск ассоциаций), когнитивные способности, интеллект, полиморфные варианты генов, нейрогенез, синаптическая пластичность, гены дофаминергических и серотонинергических нейронов.

Введение

Когнитивные способности являются наиболее сложными функциями головного мозга, с помощью которых осуществляется процесс познания мира и обеспечивается целенаправленное взаимодействие индивида с окружающей средой [1]. Уровень интеллекта играет решающую роль в жизни каждого человека. Интеллектуальные способности влияют на уровень образования, социально-экономический статус, достигнутые успехи, здоровье и даже продолжительность жизни [2]. К основным структурным элементам интеллектуальных способностей относятся память, внимание, речь, воображение, скорость обработки информации и т. п.

Несмотря на многочисленные исследова-

ния, посвященные передаче IQ по наследству, сведения о генетических механизмах, вовлеченных в когнитивное функционирование, до сих пор окончательно не установлены. В связи с этим цель данной работы заключается в анализе современных публикаций в области генетики интеллекта и выявлении наиболее информативных вариантов генов, ассоциированных с когнитивными способностями индивида.

Еще в XIX в. Ф. Гальтон впервые выдвинул предположение о том, что индивидуальные психологические черты генетически детерминированы и передаются по наследству, однако в то время данная гипотеза не получила научного признания [3].

Впоследствии роль наследственности в формировании интеллекта была доказана главным

образом в исследованиях, проведенных на монозиготных близнецах: у них одинаковая ДНК, т. е. генетическая корреляция между ними равна единице. И даже если их разлучили в раннем детстве, и они выросли в разных условиях, фенотипическая корреляция между ними остается очень высокой — 86%. В этом случае влияние наследственности четко прослеживается (табл. 1), несмотря на существенные различия в воспитании и обучении, однако чрезвычайно сложно набрать достаточный для статистической обработки материал [4].

Дизиготные близнецы, а также сибсы полу-

чают разные сочетания генов своих родителей, у них генотипы различаются примерно на 50% (генетическая корреляция 0,5). Соответственно, корреляция между ними по признаку IQ не такая высокая, как у однойцевых близнецов, и зависит от того, вместе их воспитывали или нет. Что же касается приемных детей (часто их усыновляют в очень раннем возрасте), то у них нет генетической корреляции с приемными родителями, поэтому уровень их интеллекта коррелирует с IQ приемных родителей лишь на 2%, тогда как вклад наследственности биологических родителей составляет около 98% [4].

Таблица 1

Роль наследственности и воспитания в развитии интеллекта [4]

Генетическая корреляция	Отношение	Совместное воспитание	Корреляция	Число протестированных пар
1,0	Один и тот же индивид, тестированный дважды	+	0,9	–
1,0	МЗ близнецы*	+	0,86	4 672
1,0	МЗ близнецы*	–	0,76	158
0,5	ДЗ близнецы**	+	0,55	8 600
0,5	ДЗ близнецы**	–	0,35	112
0,5	Сибсы	+	0,47	26 473
0,5	Сибсы	–	0,24	203
0	Сибсы	+	0,02	385

Примечание. МЗ близнецы* — монозиготные близнецы, ДЗ близнецы** — дизиготные близнецы

Результаты многих исследований доказали связь интеллектуальных способностей с особенностями ДНК, однако выяснить, какие именно гены вовлечены в формирование индивидуальных различий долгое время не представлялось возможным. Оценка наследуемости интеллекта — это очень сложный процесс, поскольку когнитивные способности являются полигенными признаками, детерминированными большим количеством генов, и вклад каждого отдельного гена очень мал [5].

В последние десятилетия передаче интеллекта по наследству посвящены сотни и сотни работ. Установлено, что зависимость уровня интеллекта от генотипа колеблется в пределах от 50 до 80%. Причем в специальной литературе чаще упоминается цифра в 80% [6].

В современном изучении когнитивных спо-

собностей большую роль играют психогенетические исследования. Данный подход позволяет изучать связь генетических и средовых факторов и определять вклад тех или иных генов в особенности проявления интеллекта.

Как известно, еще в раннем возрасте окружающая среда выступает значимым фактором, который влияет на формирование и развитие интеллектуальных способностей. Под окружающей средой понимаются условия, в которых растет и воспитывается ребенок. В частности, уровень материального благосостояния родителей, место проживания, взаимоотношения в семье и методы воспитания — являются фундаментом развития когнитивных способностей в детстве. Вместе с тем, по мере взросления ребенка, влияние таких факторов снижается, а с достижением совершеннолетия

данная зависимость практически полностью исчезает. В целом генетические факторы обуславливают формирование интеллекта в любом возрасте, поэтому можно говорить о генетической предрасположенности к высоким или низким показателям интеллекта [7, 8].

Одним из наиболее перспективных подходов в генетике интеллекта является изучение связей когнитивных (мыслительных) процессов человека с определенными генами, белковые продукты которых (структурные белки, гормоны, рецепторы, ферменты) могут прямо или косвенно участвовать в развитии интеллекта [9]. Одним из основных параметров, описывающих уровень интеллекта, является IQ — коэффициент интеллектуальности (Intelligence coefficient), который измеряет способность быстрого решения несложных задач, не требующих предварительной подготовки. Способы определения IQ стали разрабатывать еще в начале XX в., и за столь долгое время тест усовершенствовали таким образом, что с его помощью измеряются преимущественно врожденные способности, независимо от приобретенных знаний и условий воспитания. В связи с этим считается, что IQ человека практически не изменяется после достижения 8–10-летнего возраста [10].

Методы оценки уровня интеллекта

Современное понятие интеллекта хорошо сформулировано в работе Беккера [11]: «интеллект — это комплексная глобальная способность индивидуума целенаправленно вести себя, разумно мыслить и успешно взаимодействовать с внешней средой». Поэтому исследовать интеллект нужно в основном в трех аспектах: способность к обучению, способность к адаптации, способность к абстрактному мышлению [11].

Уровень когнитивных способностей можно количественно измерить с помощью специальных IQ тестов. Первые попытки измерения коэффициента интеллекта были предприняты французскими учеными У. Штерном и А. Бине (1916) [12]. Первоначально тесты для оценки IQ преследовали цель выявить отстающих учеников, которые нуждаются в дополнительной помощи при обучении, но современные тесты измеряют не только общий IQ, но и позволяют рассчитать отдельно вербальные и невер-

бальные показатели.

Наиболее известными тестами, используемыми в настоящее время для измерения уровня когнитивных способностей, являются: тест Г. Айзенка, Д. Векслера, Дж. Равена, Р. Амтхауэра, Р. Б. Кеттелла. Большинство этих тестов предназначены для индивидуумов старше 18 лет [13].

В практике здравоохранения обычно применяют тест Д. Векслера, который относится к числу индивидуальных и требует личного взаимодействия психодиагноста и испытуемого. Тест разработан на основе иерархической модели Д. Векслера, которая делит общий интеллект на два составляющих: вербальный и невербальный интеллекты.

Методика Векслера состоит из вербально-логических и перцептивно-деятельных заданий. Оценка интеллектуальных способностей в целом проходит на основании 11 отдельных субтестов (шесть вербальных, пять невербальных).

Вербальные субтесты направлены на выявление общей осведомленности, общей понятливости, вычислительных способностей, нахождение сходства, воспроизведение цифровых рядов. А невербальные субтесты включают в себя определение объема внимания, нахождение недостающих деталей в картине, определение последовательности картин, сложение фигур.

Выполнение каждого субтеста оценивают в баллах с их последующим переводом в унифицированные шкальные оценки, позволяющие анализировать разброс показателей [14]. Стандартная обработка результатов заключается в подсчете первичных «сырых» баллов по каждому отдельному субтесту, которые переводятся в стандартные баллы на основании соответствующих коэффициентов. Кроме того, после суммирования баллов по вербальным и невербальным субтестам, и перевода их в унифицированные оценки с помощью таблиц, определяют показатели общего, вербального и невербального интеллекта. Невербальные субтесты диагностируют не только полученные знания, но и способности индивидов к моторно-перцептивному взаимодействию с объектами окружающей среды.

С помощью приведенных тестов исследовано большое количество людей и выявлено

у них разнообразие умственных способностей. Общепринятым является следующее деление интеллектуальных особенностей людей в соответствии с их IQ (табл. 2) [12].

Если распределить величины IQ с амплитудой от 0 до значения 140 и более, выявленные у большого количества лиц, то они распределяются согласно кривой нормального распределения (колоколообразная кривая) (рис. 1).

Наибольшее количество людей (примерно 50% популяции) имеет средние значения IQ: от 90 до 110. В обе стороны от среднего

значения число индивидуумов прогрессивно уменьшается, и чем более выражен признак, тем у меньшего количества индивидуумов он наблюдается.

Одним из наиболее перспективных подходов исследования в генетике интеллекта является изучение связей когнитивных (мыслительных) процессов человека с определенными генами, белковые продукты которых (структурные белки, гормоны, рецепторы, ферменты) могут прямо или косвенно участвовать в развитии интеллекта [15].

Таблица 2

Классификация людей по значению IQ

IQ	Группы
140 и выше	Одаренные
120–140	Очень способные
110–120	Способные
90–110	Нормальные
80–90	Неспособные
70–80	Пограничный класс Слабоумные
50–70	Слабоумные
25–50	Имбецилы
0–25	Идиоты

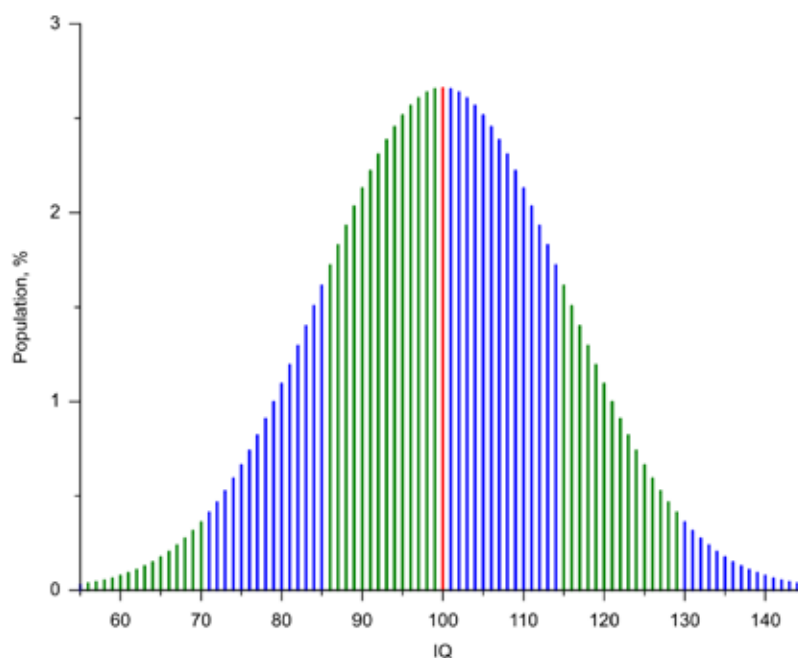


Рис. 1. Кривая распределения уровней IQ

Современные методы определения генов, детерминирующих когнитивные способности

Гены, ассоциированные с когнитивными функциями, обеспечивают нейрогенез и синаптическую пластичность: специализацию нейронов, миграцию в различные мозговые слои, формирование проекций аксонов и разрастание дендритов и т. д. Функционирование мозга в целом зависит от процессов, в результате которых происходит переключение, активация и выключение определенных генов. Структурные изменения в генах могут повлечь за собой функциональные изменения в работе синапсов. В большинстве случаев меняется скорость образования новых и уничтожения ненужных синапсов, скорость энергетического обмена, цитоскелет нервных клеток, а также работа рецепторов и белков-переносчиков [9].

Наиболее перспективным и активно применяемым подходом признан полногеномный поиск ассоциаций (GWAS), который является мощным инструментом и основывается на изучении полиморфных вариантов однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) сотен тысяч генов, детерминирующих фенотипическое проявление интеллектуальных способностей, в больших группах неродственных индивидов [15]. Благодаря GWAS удалось доказать фундаментальное предположение количественной генетической теории о том, что наследуемость сложных признаков, таких как интеллект, обусловлена многими генетическими вариантами, каждый из которых имеет небольшой эффект [16]. Главное преимущество GWAS в том, что поиск ассоциаций позволяет объединять малые эффекты однонуклеотидных полиморфизмов и устанавливать их значимость.

Результаты GWAS показали, что самые большие эффекты отдельных SNPs описывают лишь 0,05% дисперсии интеллекта [17, 18, 19]. Поэтому для объяснения хотя бы 50% его наследования необходимо изучить как минимум 10 000 таких ассоциаций SNP. При этом, чтобы получить статистически значимые результаты, численность выборок должна составлять более 50 000 участников.

Тем не менее в 2017–2018 гг. были представлены результаты крупномасштабных GWAS, выявивших ряд ассоциаций SNPs с когнитивными способностями. К примеру, в исследо-

вании J. R. Coleman с соавторами было обнаружено 23 локуса генов, ассоциированных с чрезвычайно высокими показателями интеллекта [20]. Для того чтобы в полной мере изучить вклад SNPs, возникла необходимость в дополнительной статической обработке, которая может учитывать совпадения выборок в нескольких генетических исследованиях на основе сводных данных. В связи с этим разработан усовершенствованный метод статистической обработки результатов GWAS — MTAG (multi-trait analysis GWAS), который объединяет результаты сразу по нескольким выборкам, что существенно увеличивает эффективность поиска генов, ассоциированных с когнитивными функциями мозга [21].

Благодаря такому подходу выявлен целый ряд статистически значимых локусов, ассоциированных с различными показателями интеллекта. Наибольший вклад в формирование интеллектуальных способностей человека вносят гены, детерминирующие регуляцию нейрогенеза и синаптическую пластичность, а также гены дофаминергических и серотонинергических нейронов (табл. 3).

Гены регуляции нейрогенеза и синаптической пластичности

Показано, что с очень высокими показателями IQ связан ген *ADAM12* (10q26.2), кодирующий заякоренную в мембране металлопептидазу ADAM [22]. Данный белок участвует в нейрогенезе, обеспечивая взаимодействие между клеточными структурами и матриксом. Основными местами экспрессии *ADAM12* являются олигодендроциты, астроциты и миелинизированные нейроны. Считается, что металлопептидаза может играть роль в патофизиологии заболеваний головного мозга и связана с познавательными способностями [22]. Недавние исследования выявили ассоциацию трех интронных локусов rs4962322, rs4962520 и rs1079407 гена *ADAM12* с индивидуальными различиями в показателях интеллекта [23]. В 2018 г. при исследовании группы индивидов с IQ выше 170 (1 238 чел.) и группы популяционного контроля (8 172 чел.) была выявлена ассоциация данных вариантов гена *ADAM12* с чрезвычайно высокими показателями интеллекта ($p < 1,18 \times 10^{-8}$) [23].

По результатам S. Snickers с соавторами [24],

Таблица 3

Наиболее информативные полиморфные варианты генов, ассоциированные с когнитивными способностями человека

Название rs	Название гена	Локализация полиморфизма	Аллельные варианты
<i>Гены регуляции нейрогенеза и синаптической пластичности</i>			
rs4962520	<i>ADAM12</i>	10q26.2, интрон	C/T
rs2490272	<i>FOXO3</i>	6q21, интрон	C/T
rs113315451	<i>CSEIL</i>	20q13.13, интрон	del(ATTT)4/ del(ATTT)3/ del(ATTT)2/ delATTT/ dupATTT/ dup(ATTT)2
rs41352752	<i>MEF2C</i>	5q14.3, интрон	A/G
rs4728302	<i>EXOC4</i>	7q33, интрон	T/C
rs10236197	<i>PDE1C</i>	7p14.3, интрон	T/C
rs7412	<i>APOE</i>	19q13.32, экзон	C/T
rs429358	<i>APOE</i>	19q13.32, экзон	C/T
rs6265	<i>BDNF</i>	11p14.1, интрон	C/T
<i>Гены дофаминергических и серотонинергических нейронов</i>			
rs1611115	<i>DBH</i>	9q34.2, интрон	C/T
rs1108580	<i>DBH</i>	9q34.2, экзон	G/A
rs4680	<i>COMT</i>	22q11.1-q11.2, интрон	G/A
rs907094	<i>DARPP-32</i>	17q12, интрон,	A/G
rs879606	<i>DARPP-32</i>	17q12, интрон	G/A
rs3764352	<i>DARPP-32</i>	17q12, интрон	T/C
rs6277	<i>DRD2</i>	11q22.3-23.1, экзон	A/G
HTTLPR	<i>5-HTT</i>	17q11.2, интрон	L/S
VNTR	<i>MAOA</i>	Xp11.3, экзон	345/315

самая сильная ассоциация с интеллектом обнаружена для гена *FOXO3* (6q21), являющегося частью инсулинового пути и кодирующего инсулин-подобный фактор роста 1 (IGF-1). Данный фактор обеспечивает апоптоз и гибель нервных клеток в ответ на окислительный стресс. В экспериментах на крысах было выяснено, что инсулиноподобный фактор роста 1 способствует увеличению и разрастанию дендритов, особенно в пирамидных нейронах поверхностных слоев соматосенсорной коры мозга [25]. Показано также, что низкие уровни IGF-1 снижают когнитивные функции при старении посредством ухудшения связей между структурами мозга.

В интронной области гена *FOXO3* имеется вариант rs2490272, представляющий собой однонуклеотидную замену, которая обуславливает различия в нейрональной функции

и, соответственно, влияет на показатель интеллектуальных способностей ($p < 9,96 \times 10^{-14}$) [24]. Кроме того, показана ассоциация данного варианта с долголетием [26]. Люди с высокими показателями интеллекта реже болеют, а также обладают лучшим психическим и физическим здоровьем, а также большей продолжительностью жизни.

Выявлено влияние на когнитивные способности ряда других генов, играющих важную роль в поддержании нейрональной функции. Так, ген *CSEIL* (*CAS*) кодирует ядерный фактор транспорта, принимающий участие в поддержании клеточного цикла, апоптозе и пролиферации нервных клеток. Фактор *CAS* переводит импортин- α из неактивной в активную форму [27]. Показано, что полиморфный вариант rs113315451 (20q13.13), локализованный в интронной области гена *CSEIL*, досто-

верно ассоциирован с интеллектуальными способностями ($p < 1,15 \times 10^{-8}$), а также с развитием и функционированием синапсов [24].

С помощью GWAS также выявлена тесная связь между показателями IQ и геном *MEF2C* ($p < 1,35 \times 10^{-8}$) [24]. Этот ген кодирует энхансерный фактор транскрипции миоцитов 2С, необходимый для дифференцировки и развития нервных клеток. Он участвует в нейрогенезе, распределении нейронов по областям, обеспечивает электрическую активность неокортекса и является негативным регулятором синаптогенеза [28]. Однонуклеотидная замена rs41352752, расположенная в интронной области гена *MEF2C* (5q14.3), влияет на обучение и память индивидуумов, поскольку регулирует число возбуждающих синапсов [24].

Аналогичные данные получены и при исследовании гена *EXOC4* ($p < 2,42 \times 10^{-9}$), который кодирует компонент экзоцитарного комплекса 4 и принимает участие в стыковке экзоцитарных везикул с сайтами их слияния на плазматической мембране. Влияние этого гена на интеллект связано со способностью к обучению и образному мышлению. В интронной области этого гена находится вариант rs4728302 (7q33), который ассоциирован с общими когнитивными способностями [24].

В одном из крупных GWAS установлена связь полиморфного варианта rs10236197 (7p14.3) гена *PDE1C* с интеллектуальными характеристиками человека ($p < 1,03 \times 10^{-10}$) [24]. Ген *PDE1C* кодирует фермент, который относится к семейству фосфодиэстераз, которые гидролизуют внутриклеточные сигнальные молекулы — циклический аденозинмонофосфат и циклический гуанозинмонофосфат. Кроме того, данный фермент задействован в remodelировании сосудов путем регулирования стабильности рецепторов факторов роста [29].

Большую роль в формировании интеллектуальных способностей играет ген *APOE* (19q13.31), который кодирует липид-транспортный белок аполипопротеин-Е (АроЕ), за счет которого ЦНС получает липиды, необходимые для роста и восстановления нейронов и поддержания синаптической пластичности [30]. Ген *APOE* имеет три основных полиморфных варианта — ε2, ε3 и ε4. Носительство варианта АроЕ4 приводит к снижению эффективности транспортировки холестерина в моз-

ге по сравнению с вариантом АроЕ3, в результате чего нарушается общая поставка липидов, необходимых для поддержания целостности и пластичности синапсов. Вследствие этого носительство аллеля ε4 ассоциировано с низкой синаптической пластичностью и нарушением образования миелина, что обуславливает более низкие показатели интеллекта [31].

Доказана также ассоциация с когнитивными способностями гена *BDNF* (11p14.1), который экспрессируется в клетках нейронов и глии и кодирует нейротрофический фактор мозга BDNF [32]. Данный нейротрофин обеспечивает дифференцировку, пролиферацию и выживание холинергических, дофаминергических и серотонинергических нейронов. Фактор BDNF секретируется при активации нейронов и служит мессенджером, изменяющим силу синаптических связей [33, 34]. Хорошо изученным полиморфным вариантом гена *BDNF* является однонуклеотидная замена G196A (rs6265), приводящая к изменению аминокислоты валин на метионин в позиции 196. Исследования показали, что гомозиготы и гетерозиготы по аллелю Met имеют меньший объем памяти по сравнению с носителями Val аллеля [35].

Гены дофаминергических и серотонинергических нейронов

В головном мозге локализуется большое число нейронов моноаминоергических систем мозга, связанных с когнитивным функционированием. К примеру, дофаминергическая система мозга представляет собой совокупность дофаминергических нейронов, секретирующих дофамин, проекции которых обнаруживаются в префронтальной коре, бледном шаре, полосатом теле (рис. 2).

Центральная дофаминергическая система играет важнейшую роль в формировании интеллекта человека, главным образом за счет координации двигательной активности и влияния на когнитивные навыки. Она играет важную роль в абстрактном интеллектуальном поведении и языковых навыках, которые являются важными составляющими вербального интеллекта. Дофамин участвует в процессах поддержания памяти, стимулирует внимание, отвечает за языковые навыки и является главным нейромедиатором лимбической системы

Мезокортикальная дофаминергическая подсистема

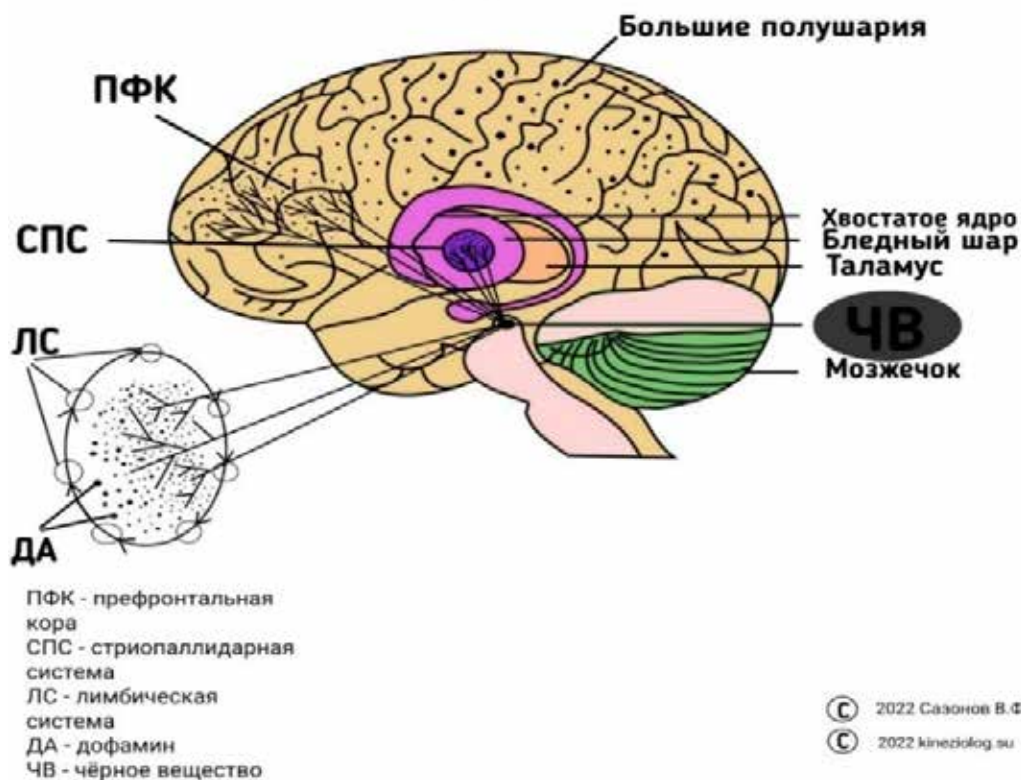


Рис. 2. Мезокортикальная дофаминергическая подсистема хеморегуляции работы мозга [36]

[37]. Количество дофамина в префронтальной коре обеспечивает поддержание рабочей памяти, а его высвобождение в головном мозге способствует обновлению рабочей памяти [38].

Ген *DBH* (9q34.2) кодирует фермент дофамин-бета-гидроксилазу, которая катализирует превращение дофамина в норадреналин. Фермент располагается в синаптических пузырьках постганглионарных симпатических нейронов. Полиморфные варианты гена *DBH* оказывают влияние на активность фермента, который, в свою очередь, связан с памятью и вниманием. Снижение экспрессии *DBH* приводит к нарушению устойчивого внимания и обнаруживается у людей с синдромом дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) [39]. Полиморфный вариант rs161115 гена *DBH* представляет собой транзицию С на Т в промоторе гена и ассоциируется с рабочей памятью, принятием решений, исполнительными функциями и устойчивостью внимания. Генотип Т/Т указывает на более низкую экс-

прессию гена *DBH* по сравнению с генотипами С/С и С/Т [38].

Кроме того, во втором экзоне этого гена находится полиморфный вариант rs1108580, представляющий собой однонуклеотидную замену G на A в положении 444. Поскольку фермент катализирует превращение дофамина в норадреналин, то наличие аллели А способствует снижению уровня как дофамина, так и норадреналина в синаптической щели. Аллель А ассоциирован с повышенной вероятностью развития СДВГ, а также шизофрении. Аллель G связан с лучшей способностью к запоминанию и переключению внимания [39].

С когнитивными способностями мозга также связан ген *DRD2*, кодирующий рецептор дофамина второго типа. Рецептор D2 ассоциирован со способностью к обучению, с развитием навыков чтения и языковых навыков [40]. Предполагается, что в норме существует сбалансированная функциональная активность пре- и постсинаптических D2 рецепторов в го-

ловном мозге, обеспечивающих нормальную нейронную пластичность. Установлено, что однонуклеотидная замена rs6277 (11q22.3–23.1) гена *DRD2* ассоциирована с контролем внимания, планированием и вербальным мышлением [41]. В исследовании I. Nkam с соавторами [42] было выявлено, что носители аллели T rs6277 лучше справлялись с заданиями на когнитивную гибкость, чем носители генотипа С, который оказался ассоциированным со снижением общих когнитивных способностей.

Ген *COMT* кодирует катехол-О-метилтрансферазу, которая катализирует разрушение дофамина, адреналина и норадреналина в лобных долях (префронтальной коре) [43]. Данные структуры систематизируют и упорядочивают информацию от нисходящих частей мозга, поэтому с работой фермента *COMT* связывают поведенческие особенности человека, а также объем его рабочей памяти [44, 45].

Полиморфный вариант rs4680 (22q11.1–11.2) гена *COMT* представляет собой однонуклеотидную замену G на A в 158 кодоне, которая приводит к изменению валина на метионин в аминокислотной последовательности *COMT*. В связи с этим активность фермента может снижаться на 35–50%. [46]. В разных этнических группах минорный аллель A обладает противоположными характеристиками. В китайской популяции данный аллель связан со снижением показателей рабочей памяти, тогда как в европейской популяции он сопряжен с высокой префронтальной пластичностью и лучшей рабочей памятью [47].

Ген *PP1R1B* (*DARPP-32*) кодирует регуляторную ингибиторную субъединицу 1В белка фосфатазы 1. Продукт гена — ингибитор фосфатазы 1 локализован преимущественно в областях мозга, обогащенных дофаминергическими нервными окончаниями [48]. Ген *DARPP-32* расположен на длинном плече 17 хромосомы (17q21) и содержит несколько хорошо изученных полиморфных вариантов. Rs907094, rs879606, rs3764352 ассоциированы с независимым фактором принятия решений в процессе обучения, ассоциативным мышлением и эмоциями. У носителей минорных аллелей данных вариантов наблюдается снижение экспрессии гена *DARPP-32*, что приводит к ухудшению концентрации внимания и восприятия [48].

Показано, что продукт гена *DARPP-32* высвобождается в ответ на активацию D1/D5 дофаминовых рецепторов при обучении [48], и носители рецессивных аллелей G/A/C вариантов rs907094, rs879606 и rs3764352 демонстрируют низкую способность к обучению и ухудшение когнитивных функций мозга [49].

Вырабатывающие серотонин нейроны проецируются на несколько ключевых областей мозга, которые играют важную роль в процессах познания, а также регулируют поведение человека [50]. Высвобожденный серотонин может связываться с множеством уникальных рецепторов и белков-переносчиков серотонина, выполняющих разнообразные функции.

К примеру, интересные результаты получены при исследовании частот генотипов и аллелей полиморфного локуса 5-HTTLPR гена *5-HTT*, который кодирует белок-переносчик серотонина [51]. Показано повышение частот генотипа L/L и аллеля L в группе лиц с высокими показателями IQ [52]. Аллель S является следствием делеции в промоторной области гена *5-HTT*, содержащей короткие повторы. Данная делеция обуславливает снижение уровня транскрипции гена и, как следствие, недостаток белка-переносчика серотонина 5-HTT в пресинаптических мембранах нейронов, что может замедлять скорость передачи нервных импульсов [52].

Ген *MAOA* (Xp11.3) кодирует фермент моноаминоксидазу А, который встречается в катехоламинергических клетках ЦНС. Моноаминоксидаза А катализирует деградацию ключевых нейротрансмиттеров мозга. В промоторе гена *MAOA* располагается переменное число tandemных повторов (VNTR), влияющих на транскрипционную активность гена. Одна tandemная последовательность состоит из 30 п. н. и может повторяться от трех до шести раз [53]. Неблагоприятные аллели гена *MAOA* (3R и 5R) ассоциируются со сложностью пространственного восприятия и трудностями в обучении, а носители аллелей 3,5R и 4R лучше и быстрее справляются с поставленными задачами [54]. Фермент *MAOA* участвует в превращении дофамина, серотонина и норадреналина, которые влияют на поведение и эмоции человека.

Ген *MAOA* называют «геном воина», потому что мутации в нем связаны с повышенным

уровнем агрессии и насилия. Такая информация представляет несомненный интерес для криминалистики. Важно знать когнитивные особенности лица, совершившего преступление — есть ли у него склонность к агрессии? Совершил ли он поступок осознанно или под каким-либо воздействием? В более широком понимании совокупность когнитивных способностей человека определяет индивидуальность его поведения, в том числе противоправного.

Учет индивидуальных интеллектуальных особенностей важен также для профессионального отбора и оптимизации профессиональной деятельности. В настоящее время в связи с усложнением технологических процессов, созданием «умных» машин и использованием нейронных сетей возрастает потребность в профессионалах с высоким уровнем интеллекта.

Заключение

По современным представлениям, наследуемость когнитивных способностей составляет 50–80%. Оценка уровня интеллекта человека чрезвычайно сложна, поскольку когнитивные способности являются полигенными признаками, детерминированными большим количеством генов. Результаты крупнейших GWAS исследований способствовали выявлению ряда локусов генов, ассоциированных с различными показателями интеллекта. Однако даже в тех случаях, когда генетические варианты статистически достоверно ассоциированы с когнитивными фенотипами, размеры их эффектов, как правило, очень малы (1–2%). Поскольку уровень интеллекта является результатом влияния большого количества генов, то эффект их взаимодействия может многократно превышать сумму эффектов отдельных генов. Тем не менее проведенный анализ опубликованных данных позволил выявить наиболее информативные полиморфные варианты генов, ассоциированных с когнитивными способностями человека. Наибольший вклад в формирование интеллектуальных способностей человека вносят гены, детерминирующие регуляцию нейрогенеза и синаптическую пластичность, а также гены дофаминергических и серотонинергических нейронов. Эти комплексы генов могут быть использованы с це-

лью выявления кандидатов для интеллектуальной профессиональной деятельности.

Список используемых источников

1. Критерии оценки когнитивных нарушений в клинических исследованиях / А. П. Соловьева [и др.] // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2018. – Т. 8, № 4. – С. 218–230.
2. Sauce, B. The Paradox of Intelligence: Heritability and Malleability Coexist in Hidden Gene-Environment Interplay / B. Sauce, L. D. Matzel // Psychol Bull. – 2018. – Vol. 144, № 1. – P. 26–47.
3. Galton, F. Hereditary genius: An inquiry into its laws and consequences / F. Galton. – London: Macmillan and Co, 1869. – 390 p.
4. Ушаков, Д. В. Психология интеллекта и одаренности / Д. В. Ушаков. – М.: Институт психологии РАН, 2011. – 464 с.
5. A combined analysis of genetically correlated traits identifies 187 loci and a role for neurogenesis and myelination in intelligence / W. D. Hill [et al.] // Mol Psychiatry. – 2019. – Vol. 24, № 2. – P. 169–181.
6. Stumm, S. von. Using DNA to predict intelligence / S. von Stumm, R. Plomin // Intelligence. – 2021. – Vol. 86. – P. 101–153.
7. Genome-wide association studies / E. Uffelmann [et al.] // Nat Rev Methods Primers. – 2021. – Vol. 1, № 1. – P. 1–21.
8. The Wiring of Intelligence / A. O. Savi [et al.] // Perspect Psychol Sci. – 2019. – Vol. 14, № 6. – P. 1034–1061.
9. Plomin, R. Why are Children in the Same Family So Different? Nonshared Environment a Decade Later / R. Plomin, K. Asbury, J. Dunn // Can J Psychiatry. – 2001. – Vol. 46, № 3. – P. 225–233.
10. Deary, I. J. Genetic variation, brain, and intelligence differences / I. J. Deary, S. R. Cox, W. D. Hill // Mol Psychiatry. – 2022. – Vol. 27, № 1. – P. 335–353.
11. Becker, K. A. History of the Stanford-Binet Intelligence Scales: Content and Psychometrics / K. A. Becker // Ithaca, IL: Riverside Publishing. – 2003. – P. 16.
12. Дружинин, В. Н. Психология и психодиагностика общих способностей. – М.: Наука, 1994 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://pedlib.ru/Books/3/0306/3_0306-46.shtml. – Дата доступа: 27.01.2023.
13. Kovacs, K. A unified cognitive/differential approach to human intelligence: Implications for

- IQ Testing. / K. Kovacs, A. R. A. Conway // *Journal of Applied Research in Memory and Cognition*. – 2019. – Vol. 8, № 3. – P. 255–272.
14. Интеллект как основа развития личности: понятия и определения интеллекта [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/intellekt-kak-osnova-razvitiya-lichnosti-ponyatiya-i-opredeleniya-intellekta/viewer>. – Дата доступа: 15.10.2022.
15. Plomin, R. The new genetics of intelligence / R. Plomin, S. von Stumm // *Nat Rev Genet*. – 2018. – Vol. 19, № 3. – P. 148–159.
16. An atlas of genetic correlations across human diseases and traits / ReproGen Consortium [et al.] // *Nat Genet*. – 2015. – Vol. 47, № 11. – P. 1 236–1 241.
17. Multi-polygenic score approach to trait prediction / E. Krapohl [et al.] // *Mol Psychiatry*. – 2018. – Vol. 23, № 5. – P. 1 368–1 374.
18. Biological annotation of genetic loci associated with intelligence in a meta-analysis of 87,740 individuals / J. R. I. Coleman [et al.] // *Mol Psychiatry*. – 2019. – Vol. 24, № 2. – P. 182–197.
19. Genome-wide association meta-analysis in 269,867 individuals identifies new genetic and functional links to intelligence / J. E. Savage [et al.] // *Nat Genet*. – 2018. – Vol. 50, № 7. – P. 912–919.
20. Functional consequences of genetic loci associated with intelligence in a meta-analysis of 87,740 individuals / J. R. I. Coleman [et al.]. – bioRxiv, 2017.
21. Multi-trait analysis of genome-wide association summary statistics using MTAG / 23 and Me Research Team [et al.] // *Nat Genet*. – 2018. – Vol. 50, № 2. – P. 229–237.
22. From putative brain tumor marker to high cognitive abilities: Emerging roles of a disintegrin and metalloprotease (ADAM) 12 in the brain / H.-G. Bernstein [et al.] // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2020. – Vol. 109. – P. 101 846.
23. A genome-wide association study for extremely high intelligence / D. Zabaneh [et al.] // *Mol Psychiatry*. – 2018. – Vol. 23, № 5. – P. 1 226–1 232.
24. Genome-wide association meta-analysis of 78,308 individuals identifies new loci and genes influencing human intelligence / S. Sniekers [et al.] // *Nat Genet*. – 2017. – Vol. 49, № 7. – P. 1 107–1 112.
25. The Hierarchy of Brain Networks Is Related to Insulin Growth Factor-1 in a Large, Middle-Aged, Healthy Cohort: An Exploratory Magnetoencephalography Study / P. Sorrentino [et al.] // *Brain Connectivity*. – 2017. – Vol. 7, № 5. – P. 321–330.
26. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity / B. J. Willcox [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2008. – Vol. 105, № 37. – P. 13 987–13 992.
27. A Novel Mutation in Cse11 Disrupts Brain and Eye Development with Specific Effects on Pax6 Expression / L. E. Blizzard [et al.] // *J Dev Biol*. – 2021. – Vol. 9, № 3. – P. 27.
28. Genes influenced by MEF2C contribute to neurodevelopmental disease via gene expression changes that affect multiple types of cortical excitatory neurons / D. Cosgrove [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2021. – Vol. 30, № 11. – P. 961–970.
29. Gurney, M. E. Genetic Association of Phosphodiesterases with Human Cognitive Performance / M. E. Gurney // *Front Mol Neurosci*. – 2019. – Vol. 12. – P. 22.
30. APOE genotype and cognition in healthy individuals at risk of Alzheimer’s disease: A review / M. C. O’Donoghue [et al.] // *Cortex Special Section: The body and cognition: the relation between body representations and higher level cognitive and social processes*. – 2018. – Vol. 104. – P. 103–123.
31. APOE Effects on Cognition From Childhood To Adolescence / C. A. Reynolds [et al.] // *Neurobiol Aging*. – 2019. – Vol. 84. – P. 239.e1–239.e8.
32. Ассоциация метилирования генов нейромедиаторных систем мозга с психоэмоциональными характеристиками человека / И. Б. Моссэ [и др.] // *Генетика*. – 2021, № 12. – С. 1 415–1 422.
33. Impact of brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism on cognition: A systematic review / Y. L. Toh [et al.] // *Brain Behav*. – 2018. – Vol. 8, № 7. – P. e01009.
34. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain / M. Miranda [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2019. – Vol. 13.
35. BDNF Val66Met Polymorphism Influences Motor System Function in the Human Brain / S. A. McHughen [et al.] // *Cereb Cortex*. – 2010. – Vol. 20, № 5. – P. 1 254–1 262.
36. Luo, S. X. Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways / S. X. Luo, E. J. Huang // *Am J Pathol*. – 2016. – Vol. 186, № 3. – P. 478–488.
37. Molecular Genetic Studies of Cognitive Ability / S. B. Malykh [et al.] // *Russ. J. Genet*. – 2019. – Vol. 55, № 7. – P. 783–793.
38. Волков, А. Н. Изучение полиморфизма RS1611115 (–1021C/T) гена дофамин-в-гидроксисилазы (DBH) у лиц с алкогольными психоза-

- ми и здоровых доноров Кемеровской области / А. Н. Волков, А. М. Селедцов, Н. В. Сомова // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2013. – Т. 77, № 2. – С.32–38.
39. Wongpaiboonwattana, W. Association between 19-bp Insertion/Deletion Polymorphism of Dopamine β -Hydroxylase and Autism Spectrum Disorder in Thai Patients / W. Wongpaiboonwattana, A. Hnoonual, P. Limprasert // *Medicina*. – 2022. – Vol. 58, № 9. – P. 1 228.
40. Sun, X. DRD2: Bridging the Genome and Ingestive Behavior / X. Sun, S. Luquet, D. M. Small // *Trends Cogn Sci*. – 2017. – Vol. 21, № 5. – P. 372–384.
41. Янчук Е. П., Моссэ И. Б. Ассоциация полиморфных вариантов генов рецепторов дофамина с психоэмоциональной стабильностью // Молодежь в науке–2022: Тез. докл. XIX Международной научной конференции (25–28 октября 2022 г., г. Минск). – Минск, 2022. – С. 232–234.
42. Impact of DRD2/ANKK1 and COMT Polymorphisms on Attention and Cognitive Functions in Schizophrenia / I. Nkam [et al.] // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12, № 1. – P. 47.
43. Association of COMT and PRODH gene variants with intelligence quotient (IQ) and executive functions in 22q11.2DS subjects / M. Carmel [et al.] // *Journal of Psychiatric Research*. – 2014. – Vol. 56. – P. 28–35.
44. Роль полиморфных вариантов генов дофаминергической системы в формировании психоэмоционального статуса человека / И. Б. Моссэ [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 3. – С.294–300.
45. COMT rs4680 Met is not always the ‘smart allele’: Val allele is associated with better working memory and larger hippocampal volume in healthy Chinese / Y. Wang [et al.] // *Genes, Brain and Behavior*. – 2013. – Vol. 12, № 3. – P. 323–329.
46. Jiang, W. Genetic influences on insight problem solving: the role of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphisms / W. Jiang, S. Shang, Y. Su // *Front. Psychol*. – 2015. – Т. 6.
47. COMT rs4680 Met is not always the “smart allele”: Val allele is associated with better working memory and larger hippocampal volume in healthy Chinese / Y Wang [et al.] // *Genes Brain Behav*. – 2013. – Vol. 12, № 3. – P. 323–329.
48. Effects of DARPP-32 Genetic Variation on Prefrontal Cortex Volume and Episodic Memory Performance / N. Persson [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2017. – Vol. 11. – P. 24–36.
49. Association between DARPP-32 gene polymorphism and personality traits in healthy Chinese-Han subjects / J. Li [et al.] // *J Mol Neurosci*. – 2011. – Vol. 44, № 1. – P. 48–52.
50. Serotonergic modulation in executive functioning: Linking genetic variations to working memory performance / S. Enge [et al.] // *Neuropsychologia*. – 2011. – Vol. 49, № 13. – P. 3 776–3 785.
51. Высокoinформативные эпигенетические маркеры психоэмоционального статуса человека / И. Б. Моссэ [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. – 2022. – Т. 32. – С.54–63.
52. Serotonin transporter gene (SLC6A4) variation and sensory processing sensitivity — Comparison with other anxiety-related temperamental dimensions / C. L. Licht [et al.] // *Mol Genet Genomic Med*. – 2020. – Т. 8, № 8. – С. e1352.
53. Evidence of MAOA genotype involvement in spatial ability in males / S. C. Mueller [et al.] // *Behav Brain Res*. – 2014. – Vol. 267. – P. 106–110.
54. Генетические и эпигенетические маркеры психоэмоционального статуса человека / И. Б. Моссэ [и др.] // Материалы III международной научно-практической конференции «Судебная экспертиза: теория и практика в современных условиях». – Минск, 26–27 апреля 2023 г. – 2023. – С. 295–297.

E. P. Yanchuk, I. B. Mosse, N. G. Sedluar, K. A. Mosse, A. V. Kilchevsky

THE MOST INFORMATIVE POLYMORPHIC GENE VARIANTS ASSOCIATED WITH HUMAN COGNITIVE ABILITIES

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: e.p.yanchuk@igc.by

The results of numerous, molecular genetic studies, including those conducted on homozygous twins, have demonstrated an association between intellectual abilities and a DNA variation. Despite numerous studies on the IQ inheritance, data on the genetic mechanisms involved in cognitive functioning has not yet wholly been established. Therefore, the aim of this study is to analyze the latest publications in the field of genetics of intelligence and to identify the most informative genetic variants associated with human cognitive abilities. The results of the largest GWAS studies have revealed a number of significant gene loci associated with various intelligence scores. However, even in those cases where genetic variants are statistically significantly associated with cognitive phenotypes, the effect sizes are usually very small (1-2%). At the same time, the intelligence level is determined by a large amount of genetic factors, and the result of the gene interaction can be many times greater than the sum of single gene effects. The greatest contribution to the formation of human intellectual abilities is made by the genes that determine the regulation of neurogenesis and synaptic plasticity, in particular by the genes of dopaminergic and serotonergic neurons. Determination of an intelligence genetic component is of great interest to psychiatrists, psychotherapists and psychologists; it is used by forensic scientists for person identification, as well as in a number of other life areas.

Keywords: GWAS (a genome-wide association study), cognitive abilities, intelligence, genetic polymorphism, neurogenesis, synaptic plasticity, genes of dopaminergic and serotonergic neurons.

Дата поступления статьи: 04 сентября 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ ПО ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Редакция сборника научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика» принимает к рассмотрению обзорные 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 реферировается 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 отключена*. 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 буквами как в предложении, 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*; пишем: Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси») 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_{cp});
- 5) обозначения химических элементов и соединений (Р, H_2O);
- 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, обозначаю-

щими пределы какой-либо величины (20–30 чел.);

3) знаки $-$, $+$, \leq , $>$ в значении положительной или отрицательной величины, степени увеличения или уменьшения;

4) знак %;

5) скобки $()$ и кавычки « \gg » от заключенных в них слов (по всей работе кавычки должны быть одного рисунка — «елочки»).

С пробелами проставлять:

1) тире (—) (Ctrl + Alt + « \rightarrow » на нумерационной клавиатуре) с обеих сторон пробелом как знак препинания между словами.

2) математические знаки ($-$, $+$, \leq , \pm , \cdot , \times , $=$, \notin 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 пар-

тнеров, необходимо 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 (ВАК–Нормативные правовые акты–Приказы ВАК–Образцы оформления БО...). 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** (в печатном виде) о возможности опубликования в открытой печати.
- 2. Сопроводительное письмо** (в печатном виде), 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** (в электронном виде), включающие ФИО (полностью), год рождения, служебный адрес, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность. Сведения об авторах предоставляются отдельным документом Word.

Два экземпляра статьи (один — с указанием в «шапке» авторов и мест работы (на русск. и англ. яз.), другой — без) и сопроводительные документы представляются лично либо по почте на адрес: Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27. 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. **Обращаем Ваше внимание!** Редакция может выборочно проверить статьи системой антиплагиат (статьи направляются на проверку (антиплагиат) в Национальную библиотеку Беларуси).

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 35

Ответственный за выпуск *Е. М. Селихова*
Переводчик *М. Г. Пыжова*

Подписано в печать 01.12.2023 г. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 21,16. Уч.-изд. л. 15,86. Тираж 80 экз.

Отпечатано на государственном предприятии «СтройМедиаПроект»
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/42 от 13.02.2014.
220123, г. Минск, ул. В. Хоружей, 13/61

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.