

ISSN 1999-9127

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

## **МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА**

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ  
ТОМ 20**

Издается с 2005 года  
Выходит два раза в год

Минск  
2016

УДК [577.21 + 575] (082)

**Молекулярная и прикладная генетика:** сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2016. – Т. 20. – 112 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. Хотылева – зам. главного редактора;  
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.П. Ермишин,  
А.И. Ковалевич, Ф.И. Привалов, А.В. Сукало, В.А. Лемеш, С.А. Лихачев,  
Н.П. Максимова, С.Б. Мельнов, М.Е. Михайлова, И.Б. Моссэ, М.Е. Никифоров,  
В.Е. Падутов, В.Н. Решетников, Е.А. Сычева, Н.И. Дубовец, В.В. Титок, И.П. Шейко,  
О.Н. Харкевич – члены редколлегии;  
И.В. Широкая – ответственный секретарь.

УДК [577.21 + 575] (082)

ISSN 1999-9127

Институт генетики  
и цитологии НАН Беларуси, 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>О.Ю. Баранов, Д.И. Каган, В.Е. Падутов</i> Оценка влияния различных факторов на формирование генетической структуры и уровень генетической изменчивости популяций лесных древесных видов .....	5
<i>С.И. Вакула, Н.В. Анисимова, В.В. Титок, В.Н. Леонтьев, Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский</i> Многомерный статистический анализ генетической изменчивости льна масличного .....	15
<i>О.В. Дубровная, И.И. Лялько, А.В. Бавол, С.С. Воронова, А.Н. Гончарук</i> Анализ мейоза у трансгенных растений пшеницы, полученных методом <i>Agrobacterium</i> -опосредованной трансформации в культуре <i>in vitro</i> и <i>in planta</i> .....	21
<i>О.П. Шатарнов, Т.М. Шатарнова, Т.А. Силкова, Н.С. Фомченко, О.Г. Давыденко</i> Влияние комбинационной способности родительских линий на показатели продуктивности гибридов подсолнечника ( <i>Helianthus annuus</i> L.) .....	30
<i>О.А. Межнина, О.Ю. Урбанович</i> Идентификация сортов земляники садовой ( <i>Fragaria ananassa</i> ) с использованием SSR-маркеров .....	37
<i>Н.В. Савина, Н.В. Никитченко, Т.Д. Кужир, Р.И. Гончарова</i> Полиморфизм генов, кодирующих ДНК-геликазы: влияние на продолжительность жизни ...	46
<i>Е.А. Аксенова, Н.А. Мартусевич, О.В. Сергейчик, Н.П. Митьковская</i> Частота HLA-DRB1 аллелей и генотипов у пациентов с АЦЦП-позитивным вариантом ревматоидного артрита и их родственников 1-й и 2-й степеней родства .....	55
<i>Н.Н. Чакова, С.С. Ниязова, С.М. Комиссарова</i> Взаимодействие аллельных вариантов генов симпатoadреналовой и ренин-ангиотензин-альдостероновой систем при гипертрофической кардиомиопатии .....	61
<i>Н.В. Савина, Н.В. Никитченко, Т.Д. Кужир, С.Л. Поляков, А.И. Ролевич, С.А. Красный, Р.И. Гончарова</i> Полиморфизм генов эксцизионной репарации ДНК: влияние на рецидивирование рака мочевого пузыря у белорусских пациентов .....	70
<i>О.Д. Левданский, М.С. Родькин, Д.Е. Данилов, В.С. Панкратов, А. Около-Кулак, А.В. Троян, И.А. Карпов, О.Г. Давыденко</i> Полиморфизм генов <i>IL28B</i> и <i>TNF-α</i> среди коренного населения Беларуси, а также у пациентов с хроническим гепатитом С .....	80
<i>Н.Г. Седляр, А.Л. Гончар, М.Д. Амелянович, И.Б. Моссэ</i> Роль генетических факторов в предрасположенности к невынашиванию беременности .....	87
<i>Л.В. Кухтинская, А.В. Зураев, В.А. Будевич, И.Б. Моссэ</i> Современные представления о генетических детерминантах психоэмоциональной устойчивости человека (обзорная статья) .....	96
Правила оформления статьи .....	110

## CONTENTS

<i>O.Yu. Baranov, D.I. Kagan, V.E. Padutov</i> Evaluation the Various Factors Influence on Genetic Structure and Variability of Forest Tree Species Populations .....	5
<i>S.I. Vakula, N.V. Anisimova, V.V. Titok, V.N. Leontiev, L.V. Khotyleva, A.V. Kilcheuski</i> Multivariate Statistical Analysis of the Flaxseed Genetic Variability .....	15
<i>O.V. Dubrovna, I.I. Lyalko, A.V. Bovol, S.S. Voronova, A.N. Goncharuk</i> The Analysis of Meiosis in Transgenic Wheat Plants Obtained by <i>Agrobacterium</i> -Mediated Transformation <i>In Vitro</i> and <i>In Planta</i> .....	21
<i>O.P. Shatarnov, T.M. Shatarnova, T.A. Silkova, N.S. Fomchenko, O.G. Davydenko</i> Effect of Combining Ability of Parental Lines on Productivity Indicators of Sunflower Hybrids ( <i>Helianthus annuus</i> L.).....	30
<i>O.A. Mezhnina, O.Yu. Urbanovich</i> Identification of Strawberry ( <i>Fragaria ananassa</i> ) Using SSR-Markers .....	37
<i>N.V. Savina, N.V. Nikitchenko, T.D. Kuzhir, R.I. Goncharova</i> Polymorphism of Genes Coding DNA Helicases: Impact on the Life Span.....	46
<i>E.A. Aksonova, N.A. Martusevich, O.V. Sergeichik, N.P. Mitkovskaya</i> The Frequency of HLA-DRB1 Alleles and Genotypes in Patients with ACCP Antibody-Positive Rheumatoid Arthritis and Their Nearest Relatives.....	55
<i>N.N. Chakova, S.S. Niyazova, S.M. Komissarova</i> Intergenic Interaction of Sympathoadrenal and Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems Genes Polymorphism in Hypertrophic Cardiomyopathy .....	61
<i>N.V. Savina, N.V. Nikitcheko, T.D. Kuzhir, S.L. Polyakov, A.I. Rolevich, S.A. Krasny, R.I. Goncharova</i> Polymorphism of Excision Repair Genes: Impact on Bladder Cancer Recurrences in Belarusian Patients .....	70
<i>A.D. Liaudanski, M.S. Rodzkin, D.E. Danilau, V.S. Pankratov, A. Okolo-Kulak, N.V. Trayan, I.A. Karpov, O.G. Davydenko</i> <i>IL28B</i> and <i>TNF-<math>\alpha</math></i> Gene Polymorphism in Native Belarusians and Patients with Chronic Hepatitis C .....	80
<i>N.G. Sedlyar, A.L. Gonchar, M.D. Ameliyanovich, I.B. Mosse</i> Role of Genetic Factors in Predisposition to Pregnancy Loss.....	87
<i>L.V. Kukhtinskaya, A.V. Zuraev, V.A. Budevich, I.B. Mosse</i> Modern Concepts of Human Psychoemotional Sustainable Genetic Determinants (Review Article) .....	96
Instructions to Authors.....	110

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И УРОВЕНЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ ЛЕСНЫХ ДРЕВЕСНЫХ ВИДОВ

Институт леса НАН Беларуси

246001, Республика Беларусь, г. Гомель ул. Пролетарская 71; e-mail: betula-belarus@mail.ru

В статье, на примере основных лесных древесных видов Беларуси, рассмотрено влияние различных факторов (размер и структура ареала; наличие географических и репродуктивных барьеров, препятствующих обмену генетическим материалом между насаждениями; интрогрессивная гибридизация; наличие антропогенных и биотических факторов, приводящих к резкому колебанию эффективной численности популяций; особенности размножения и организации генома) на формирование генетической структуры и уровня генетической изменчивости популяций.

**Ключевые слова:** популяционно-генетическая структура, генетическая изменчивость, ДНК-маркеры.

### Введение

Генетические процессы, протекающие в популяциях различных живых организмов, обусловлены биологическими характеристиками видов, включая взаимодействие отдельных индивидов и их сообществ с факторами внешней среды, и являются основой для формирования адаптационного потенциала, определяя направленность микроэволюционных изменений.

Среди основных специфических характеристик лесных древесных видов растений следует отметить: длительность жизненного цикла, доминирующую роль в биоценозах, эволюционные и исторические аспекты, связанные с генезисом и миграционными процессами популяций, наличие древостоев как естественного, так и искусственного происхождения, превалирование панмиксии в популяциях, доминирование абиотических факторов в формировании и функционировании фитоценозов и др. [1]. Среди потенциальных факторов, способных прямым или косвенным образом оказывать влияние на популяционно-генетическую структуру лесных древесных видов, можно выделить следующие: размер, форма и внутренняя структура ареала; наличие географических, физиологических и прочих барьеров, препятствующих обмену генетическим материалом между насаждениями; интрогрессивная гибридизация; негативные

антропогенные и биотические факторы, приводящие к резкому колебанию эффективной численности популяций; особенности размножения и организации генома [2].

В ходе исследований нами было проведено изучение влияния различных факторов и биологических особенностей на формирование популяционно-генетической структуры и значение основных параметров, характеризующих уровень генетической изменчивости лесных древесных растений.

### Материалы и методы

Материал для популяционно-генетических исследований был собран в естественных и искусственных насаждениях основных древесных пород Беларуси на протяжении 2001–2015 гг. В ходе работы были использованы различные методы ДНК-маркирования, согласно [3]. Для оценки основных параметров, описывающих генетическую структуру, уровень изменчивости, степень подразделенности и дифференциации генетического полиморфизма, использован ряд статистических показателей, описанных ранее [4].

### Результаты и обсуждение

В качестве модельных видов для изучения влияния структуры ареала были выбраны береза повислая (*Betula pendula*) и береза карликовая (*Betula nana*). Повислоберезовые леса

широко распространены на территории Беларуси и составляют 11,9% от лесопокрытой площади страны. При этом представленность повислоберезовых фитоценозов в различных частях Беларуси является однородной, в том числе и в разрезе геоботанических подзон [5]. В то же время ареал березы карликовой на территории Беларуси представлен редкими островными насаждениями, произрастающими преимущественно на сфагновых болотах в северной части страны. При этом следует отметить, что береза карликовая является в Беларуси эндемиком, реликтом ледниковой эпохи, и происхождение островных популяций *B. nana* в основном связано не с их формированием из ограниченного числа родительских растений, а с сокращением и фрагментацией ранее сплошного ареала березы карликовой на территории страны в постледниковый период [6].

Анализ уровня генетической дифференциации среди популяций показал, что значение коэффициента  $D_N$  для белорусских насаждений березы повислой варьировало от 0,005 до 0,019 (RAPD-анализ), составляя в среднем 0,009. В то же время для *B. nana* показатель  $D_N$  был выше (0,01–0,025 (0,014)), что указывает на большую индивидуальность генетической структуры островных популяций и относительно низкую интенсивность генного потока между ними. Величина коэффициента подразделенности  $G_{ST}$  между насаждениями березы повислой (0,045) была ниже аналогичного показателя, вычисленного для березы карликовой (0,067), что в свою очередь тоже указывает на более высокий уровень межпопуляционных различий, выявляемых у *B. nana*. Полученные данные об уровне подразделенности и дифференциации, по всей видимости, связаны с превалированием генетико-автоматических процессов в популяциях с низкой эффективной численностью (*B. nana*), что в сочетании с факторами изоляции (географическим барьером) приводит к усилению межпопуляционной генетической разнородности [7].

Одновременно с этим, некоторые древостои видов со сплошным ареалом также могут характеризоваться значительной степенью межпопуляционной дифференциации. Наличие высокого уровня генотипических различий

между насаждениями данных видов в ряде случаев может быть связано с периодическим колебанием численности индивидов и «эффектом основателя», имевших место в ходе исторического генезиса популяций.

Так, в ходе SSRP-анализа шести географически удаленных искусственных древостоев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), представляющих собой полусибсовое потомство от двух плюсовых деревьев (№ 462 и № 479), выращиваемых в трех различных опытных объектах, были определены параметры, характеризующие популяционно-генетическую структуру. Несмотря на умеренные различия уровня генетической изменчивости (<10% от величины параметров), группы древостоев, принадлежащие к разным семьям, характеризовались специфическими особенностями генетической структуры. Так, уровень генетической дифференциации  $D_N$  между семьями составил 0,2, что в 8–10 раз превышало аналогичный показатель, рассчитанный для географически изолированных выборок, но относящихся к тому или иному полусибсовому потомству – 0,02–0,025 [8].

Аналогичные процессы, связанные с «эффектом основателя», а также превалирующим участием определенных генотипов для воспроизводства структуры популяции, могут наблюдаться при анализе насаждений, произрастающих в различных типах экологических условий.

В качестве модельных объектов были выбраны популяции сосны обыкновенной (*P. sylvestris*), произрастающих в альтернативных условиях гидрологического режима, в частности – суходольных и болотных насаждений. Проведенное изучение параметра подразделенности  $G_{ST}$  среди изученных выборок показало значительное варьирование значений среди используемых RAPD-локусов [9]. Исходя из полученных результатов, для дальнейшего анализа межпопуляционных различий были выбраны локусы, характеризующиеся высоким уровнем показателя  $G_{ST}$  – Oligo 6-1, Oligo 6-3, Oligo 9-1, Oligo 8-2, Oligo 26-1, Oligo 6-2 [9]. Сравнение коэффициентов генетической дистанции  $H_{ei}$ , рассчитанных на основании изучения частот встречаемости аллельных вариантов для каждого из выбранных локусов по отдельности, для большинства маркеров (Oligo 6-1, Oligo 6-3, Oligo

9-1, Oligo 8-2 и Oligo 6-2) не выявило существенных различий между болотными и суходольными насаждениями ( $D_N = 0,032$ ) [7, 9]. В то же время при анализе уровня генетической дифференциации по локусу Oligo 26-1, было установлено наличие существенных отличий между популяциями, различающихся условиями произрастания. Так, величина  $D_N$  между экотипами в 15–18 раз превышала аналогичный показатель, выявленный среди насаждений со сходным типом гидрологического режима.

Таким образом, проведенное изучение генетических структур суходольных и болотных насаждений в целом не выявило существенных изменений в геноме деревьев сосны обыкновенной из различных условий местопроизрастания. Тем не менее, по ряду маркеров были выявлены достоверные различия между данными типами насаждений, что по всей видимости указывает на наличие ограниченного числа генов, детерминирующих приспособленность к условиям гидрологического режима. Уровень выявленных различий по диагностическим RAPD-маркерам не являлся абсолютным, что указывает на отсутствие прямой взаимосвязи между конкретными данными локусами и приспособленностью к типу условий произрастания (степени увлажненности). По всей видимости, данные локусы следует рассматривать как генетические маркеры, находящиеся в группе сцепления с генами, отвечающими за приспособление к степени увлажненности [3].

Аналогичные результаты были получены при сравнении суходольных и пойменных популяций дуба черешчатого (*Quercus robur*). Коэффициент генетической дистанции между суходольными и пойменными насаждениями по отдельным локусам составил 0,09, что в два раза превысило значения  $D_N$  между различными популяциями суходольных дубрав (0,04) и в полтора раза – между популяциями пойменных дубрав (0,06). Полученные данные для дуба черешчатого также подтверждают отсутствие существенных геномных различий между различными экологическими формами [7].

Генный поток является одним из ведущих факторов, направленных на снижение уровня межпопуляционной дифференциации и под-

разделенности. По литературным данным, интенсивность генного потока, превышающая одного мигранта на поколение, является достаточной для нивелирования процессов дрейфа генов [10]. Оценка влияния интенсивности генного потока на популяционно-генетическую структуру лесных древесных видов была изучена на основании анализа гаплотипической структуры насаждений с использованием маркерных локусов хлоропластной ДНК. В качестве исследуемых видов были выбраны дуб черешчатый, ель европейская (*Picea abies*) и сосна обыкновенная. Выбор данных видов был связан со следующими биологическими особенностями: установлено, что у покрытосеменных растений (дуб черешчатый) хлДНК преимущественно наследуется по материнской линии и распространение гаплотипов происходит посредством разноса семян, у голосеменных растений (сосна обыкновенная, ель европейская) – по отцовской линии – распространение гаплотипов осуществляется за счет разлета пыльцы [3]. Отличительной характеристикой эффективности расселения пыльцы и семян является дальность — данный показатель пыльцы на несколько порядков превышает аналогичный параметр для семян (плодов) и в особенности для (желудей) дуба [11].

Анализ хлоропластной ДНК дуба черешчатого с использованием шести микросателлитных маркеров (*μcd4*, *μcd5*, *μkk4*, *μdt1*, *μdt3*, *μdt4*) позволил выявить на территории Беларуси 18 различных аллельных вариантов, образующих 17 различных гаплотипов (комбинаций). При этом, пять из них являлись доминирующими (долевое участие в составе дубрав варьирует от 7% до 48%), остальные 12 обнаружены на ограниченных территориях (табл. 1). Важным моментом, связанным с особенностями распределения гаплотипов на изученной территории, является их групповой характер, с формированием выраженных границ областей распространения. Кроме того, в большинстве изученных насаждений дуба черешчатого, находящихся в зоне перекрытия областей распространения, количество выявляемых гаплотипов в пределах популяции не превышало двух [7].

Таблица 1

Долевое участие гаплотипов дуба черешчатого на территории Беларуси, %

Обозначение гаплотипа	Область						Республика Беларусь
	Брестская	Витебская	Гомельская	Гродненская	Минская	Могилевская	
№ 1	26	46	60	20	53	62	48
№ 2	–	–	14	–	4	28	7
№ 3	22	–	6	13	31	5	11
№ 7	22	13	4	27	8	–	10
№ 8	17	33	–	13	–	–	9
Остальные	13 (2*)	8(2*)	16 (4*)	27 (4*)	4 (1*)	5 (1*)	15 (12*)

\* – количество редких гаплотипов, выявленных на исследуемой территории

Анализ распределения гаплотипов хлДНК для ели европейской и сосны обыкновенной отличался от описанной структуры, выявленной для дуба черешчатого.

Так, микросателлитный анализ трех локусов хлДНК *P. abies*, даже в пределах только одного естественного насаждения (Прошковское лесничество, Двинская экспериментальная лесная база), позволил диагностировать пять вариантов гаплотипов (А, В, С, D, Е). Изучение смежного искусственного насаждения (быстрорастущие лесные культуры, созданные заслуженным лесоводом Беларуси Е.Г. Орленко) показал наличие только трех вариантов гаплотипов (А, В, С). При этом быстрорастущие формы (серия Ор) в 70% случаях были представлены гаплотипом А хлДНК, в то же время встречаемость данного гаплотипа в природном насаждении не превышала 13%. Различия в частотах встречаемости и отсутствие гаплотипов D и Е у быстрорастущих форм, по всей видимости, связаны с ограниченным числом отцовских особей, участвовавших в опылении, и низкой частотой встречаемости данных гаплотипов в природных популяциях [12].

В ходе изучения генетической структуры деревьев сосны обыкновенной из 20 географически удаленных насаждений по шести SSR-локусам хлоропластной ДНК (PCP 1289, PCP 87314, PCP 71987, PCP 30277, PCP 26106, PCP 4507) был выявлен 31 аллельный вариант. При этом среди проанализированных локусов у пяти (PCP 1289; PCP 87314; PCP 71987; PCP 26106, PCP 4507) в изученных популяциях доминировал один аллельный вариант (частота

встречаемости 60–80%), для локуса PCP 30277 частота основного аллеля не превысила 45% [13, 14].

В то же время, следует отметить, что анализ гаплотипического разнообразия хлДНК деревьев сосны обыкновенной показал, что в исследуемых популяциях было идентифицировано 116 комбинаций гаплотипов, большинство из которых (63%) были уникальными для насаждения и имели частоту встречаемости в отдельно взятых популяциях менее 5%. Оставшаяся часть хлоротипов была представлена в изучаемой выборке в большем количестве, но не превышающем 15%. При этом одинаковые варианты встречались у деревьев, как из одного, так и из разных насаждений. Также следует особо подчеркнуть, что каждая популяция характеризовалась сложной гаплотипической структурой – было диагностировано наличие от 6 до 11 вариантов одновременно [13].

Важной особенностью гаплотипической структуры сосновых насаждений являлось отсутствие доминирующих хлоротипов. Так, средняя частота встречаемости наиболее распространенного варианта, в среднем по всем насаждениям, не превысила 9%. Представленность остальных вариантов гаплотипов была ниже 5%. Проведенный анализ географической изменчивости в большинстве случаев выявил дисперсное распределение для всех вариантов гаплотипов хлДНК в изученной части ареала *P. sylvestris* [14].

Кроме изучения хлоропластной ДНК, для хвойных видов была дополнительно изучена популяционно-генетическая структура с использованием митохондриальных маркеров.

В отличие от хлоропластной ДНК, митохондриальный геном передается у хвойных по материнской линии и связан с распространением семян. Анализ локуса mt15-D02 *P. abies* выявил в Беларуси только два основных гаплотипа, при этом альтернативный гаплотип был обнаружен исключительно в юго-западном регионе республики [7]. В целом характер распределения гаплотипов мтДНК ели европейской совпадал данными, полученными для хлДНК дуба, что указывает на сходство процессов формирования популяционно-генетической структуры для локусов, характеризующихся материнским наследованием и связанных с распространением семян: низкий уровень гаплотипического разнообразия популяций, групповой характер географического распределения гаплотипов, с формированием выраженных границ областей распространения, ограниченное число комбинаций гаплотипов вследствие отсутствия рекомбинации.

Таким образом, по результатам проведенных исследований, нами установлено, что генный поток, осуществляемый через миграцию пыльцы, вносит более существенный вклад в обмен генетическим материалом между насаждениями и нивелированием уровня межпопуляционных различий, по сравнению с распространением наследственной информации через семенное потомство.

Интрогрессивная гибридизация также может оказывать влияние на формирование особенности генотипической структуры популяций. Так, отсутствие строгой репродуктивной изоляции между симпатрическими видами *Q. robur* и *Q. petraea*, наряду с интенсивным пыльцевым потоком, зачастую приводит к образованию фертильных межвидовых гибридов и появлению в ходе дальнейших скрещиваний различных вариантов гибридного потомства [15]. В ходе исследований с использованием SSR-маркеров проведена сравнительная оценка генетической структуры потомства, получаемого при различных вариантах скрещивания *Q. robur* и *Q. petraea*. Полученные результаты кластеризации групп по уровню генетического сходства выявили соответствие с биологическими особенностями каждого из типов (по происхождению) потомства, что указывает на формирование различных генотипических вариаций, отличных от исходных видовых форм [16].

Сходные процессы межвидового потока генов выявлены и для симпатрических видов березы *B. pendula* (диплоид) и *B. pubescens* (тетраплоид). В ходе анализа видовой структуры смешанных насаждений березы повислой и березы пушистой с использованием SSR-маркеров в структуре древостоев выявлены гибридные растения, имеющие триплоидный набор хромосом [6]. Частота встречаемости межвидовых гибридов варьировала среди насаждений, что может быть связано с различиями по доле участия *B. pendula* и *B. pubescens*, фенологическими и репродуктивными особенностями генотипов [17]. Проведенное рядом авторов изучение способности межвидовых гибридов *B. pendula* × *B. pubescens* к плодоношению и образованию пыльцы показало пониженную фертильность или ее полное отсутствие. Исходя из этого, эффективная численность популяции при совместном произрастании березы повислой и березы пушистой зачастую является ниже расчетной, что, по всей видимости, может оказывать определенное влияние на формирование популяционно-генетической структуры [3]. Наличие генного потока между видами подтверждается выявлением в популяциях каждого из видов нехарактерных для них аллельных вариантов [18].

Кроме прямого влияния на уровень межпопуляционных различий, трансформация генетической структуры, как было показано различными авторами, в большинстве случаев оказывает воздействие на уровень генетической изменчивости, что связано с изменением параметров аллельного и генотипического разнообразия, количественного соотношения генотипов, представленных в гомозиготной и гетерозиготной форме и др. [1, 2]. Исходя из этого, на следующем этапе исследования было изучено опосредованное (через изменение генетической структуры) воздействие большинства изученных ранее факторов на уровень генетического полиморфизма насаждений.

Так, для проведения сравнительного анализа популяций видов, характеризующихся различиями по структуре и размеру ареала, были использованы усредненные значения основных показателей генетического полиморфизма белорусских насаждений *B. nana* и *B. pendula* (табл. 2).

Таблица 2

Усредненные значения основных показателей генетического полиморфизма для белорусских популяций березы повислой и березы карликовой (RAPD-анализ)

Виды	Доля полиморфных локусов		Число аллелей		Ожидаемая гетерозиготность $H_e$
	95%	99%	>0%	>1%	
<i>B. pendula</i>	0,560	0,910	2,000	2,000	0,161
<i>B. nana</i>	0,295	0,442	1,842	1,842	0,098

Как следует из таблицы, значения всех рассчитанных показателей генетического полиморфизма для популяций березы повислой характеризовались большими величинами, по сравнению с данными, установленными для березы карликовой. Таким образом, полученные результаты указывают на усиление процессов дрейфа генов и потери генетического разнообразия для насаждений березы карликовой, вследствие уменьшения эффективной численности популяций в сочетании со снижением уровня обмена генетической информации между ними [7].

Интересными оказались результаты сравнения показателей генетического разнообразия популяций березы пушистой и березы повислой (табл. 3). Данные виды характеризуются значительным морфологическим сходством, однако они различаются по плоидности. Поэтому одна из задач данного исследования заключалась в изучении влияния изменения плоидности на показатели гене-

тической изменчивости популяций. Установлено, что у березы пушистой (тетраплоид) не произошло увеличения значения показателя числа аллелей (RAPD-анализ), а сами аллели являлись сходными с вариантами, найденными у березы повислой. В то же время усредненный для исследованных популяций показатель ожидаемой гетерозиготности, с использованием набора RAPD-локусов, для березы пушистой составил 40,2%. Таким образом, удвоение числа хромосом у березы пушистой более, чем в два раза увеличило долю генов, представленных у одного растения различными аллельными вариантами (табл. 3).

В ходе оценки влияния условий произрастания на уровень генетического полиморфизма был проведен сравнительный анализ параметров изменчивости экологических форм дуба черешчатого (пойменный и суходольный экотипы). Результаты исследований представлены в табл. 4.

Таблица 3

Усредненные значения основных показателей генетического полиморфизма для белорусских насаждений березы повислой и березы пушистой (RAPD-анализ)

Виды	Доля полиморфных локусов		Число аллелей		Ожидаемая гетерозиготность $H_e$
	95%	99%	>0%	>1%	
<i>B. pendula</i>	0,560	0,910	2,000	2,000	0,161
<i>B. pubescens</i>	0,700	0,778	2,000	2,000	0,402

Таблица 4

Сравнительная характеристика генетических параметров пойменного и суходольного экотипов дуба черешчатого на основе RAPD-маркеров

Показатель	Пойменный экотип	Суходольный экотип
Доля полиморфных локусов ( $P_{95}$ )	1,00	1,00
Среднее число аллелей на локус ( $A$ )	2,000	2,000

## Продолжение табл. 4

Показатель	Пойменный экотип	Суходольный экотип
Эффективное число аллелей ( $n_e$ )	1,581	1,572
Ожидаемая гетерозиготность ( $H_e$ )	0,347	0,338
Внутрипопуляционная генетическая изменчивость ( $H_s$ )	0,324	0,314

Как следует из табл. 4, средние значения показателей доли полиморфных локусов и среднего числа аллелей на локус для обоих экотипов составили 1,00 и 2,00, соответственно. Эффективное число аллелей в пойменных популяциях в среднем равнялось 1,58, в суходольных – 1,57. Средний уровень ожидаемой гетерозиготности в пойменных и суходольных насаждениях составил 0,347 и 0,338, соответственно. Таким образом, исходя из полученных данных, достоверной взаимосвязи между общим уровнем генетического полиморфизма и экологическими условиями произрастания выявлено не было [7].

Аналогичные результаты были получены для суходольных и болотных насаждений сосны обыкновенной – межпопуляционные различия для большинства рассчитанных параметров полиморфизма находились в пределах, выявленных между экологическими формами [7]. В среднем значение доли полиморфных локусов составило  $0,052 \pm 0,009$ , среднего числа аллелей на локус –  $1,52 \pm 0,15$ , ожидаемой гетерозиготности –  $0,234 \pm 0,022$ .

Таким образом, проведенное сравнительное изучение уровня генетической изменчивости популяций древесных видов, произрастающих в различных экологических условиях, не выявило существенных различий, что также подтверждает предположение о наличии ограниченного числа генов, детерминирующих приспособленность к почвенно-гидрологическому режиму. В то же время установленные рядом авторов особенности характера генетического полиморфизма для некоторых экологических условий местопроизрастания популяций, по всей видимости, могут быть связаны с действием некоторых сторонних факторов, а не ассоциированы с формированием адаптивного уровня изменчивости [3].

Исследование влияния процессов интрогрессивной гибридизации на уровень генетической изменчивости выявило ряд аспектов,

связанных с репродуктивной стратегией видов, определяющих эффективность межвидового скрещивания и направленность процессов обмена генетической информацией. Исходя из базовых постулатов классической генетики, наличие постоянных интенсивных процессов гибридизации, по всей вероятности, должно оказывать влияние на уровень генетической изменчивости – приводить к увеличению аллельного разнообразия, уровня гетерозиготности (вследствие наличия гибридного потомства) и степени генотипического разнообразия. Одновременно с этим, анализ литературных и экспериментальных данных для ряда древесных видов выявил несоответствие полученных результатов общепринятой модели межвидовой гибридизации, что, по всей видимости, может быть объяснено избирательным характером скрещивания (совместимости) генотипов различных видов [1, 15, 17].

Так, например, для симпатрических видов дуб черешчатый – дуб скальный был выявлен ассиметричный характер генного потока в популяциях [15]. Избирательный характер скрещивания, как было показано в ряде исследований (при проведении серии искусственных скрещиваний и последующей оценки гибридного потомства), наибольший вклад в репродуктивную изоляцию вносит предзиготической барьер. Так, например, яйцеклетки *Q. petraea* оплодотворяются в основном спермиями этого же вида, в отличие от *Q. robur* [15].

Для определения уровня генетического полиморфизма для семенного потомства различного типа происхождения были рассчитаны показатели генетического полиморфизма с использованием SSR-маркеров. Установлено, что наименьшим уровнем наблюдаемой гетерозиготности (40–43%) характеризовалось гибридное потомство, происходящее от исходных видов – *Q. robur* и *Q. petraea*, что, с одной стороны, противоречит биологической

концепции процесса гибридизации, но, с другой стороны, может быть объяснено ограниченным числом индивидуумов, участвующих в скрещивании, вследствие наличия репродуктивного барьера – несовпадения сроков цветения, прогамной несовместимости и др. [16]. Для исходных видов значение  $H_c$  составило 70,2% (*Q. robur*) и 58,3% (*Q. petraea*). При этом уровень ожидаемой гетерозиготности у гибридных индивидов был выше в случае материнских растений *Q. robur* (78,2%), по сравнению с *Q. petraea* (57,4%), тем самым дополнительно подтверждая избирательный характер опыления дуба скального. Исходя из полученных данных, наибольшим уровнем наблюдаемой гетерозиготности среди гибридного потомства характеризовались индивиды, происходящие от гибридных материнских растений. Увеличение доли гетерозиготных деревьев может быть обусловлено большим количеством вариантов генотипов, участвующих в скрещивании, и высокой репродуктивной пластичностью всей группы в целом.

Следует отметить, что группа полусибсового потомства дуба скального, полученная от гибридных материнских растений, характеризовалась сходными значениями параметров ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, что, по всей видимости, связано с однородностью выявленной для них генетической структуры. Для групп растений, представленных видами *Q. robur* и *Q. petraea*, уровень наблюдаемой гетерозиготности был несколько ниже ожидаемого, указывая на наличие инбредных процессов, происходящих при естественном опылении [15].

Противоречивые данные, связанные с генетическими аспектами процессов межвидовой гибридизации, отмечаются и для симпатрических видов береза повислая – береза пушистая. Рядом исследователей также установлена несовместимость при взаимном опылении. Результаты проведенных диаллельных скрещиваний показали, что в 30% случаев эти виды не скрещивались, а в остальных случаях полученные полные семена составляли 50% от всего количества. При этом наилучшие результаты гибридизации были получены при опылении цветков *B. pendula* пыльцой *B. pubescens* [19]. Детальные исследования потомства 10 полусибсовых семей березы по-

вислой показали, что только 0,2% из них были гибридами между *B. pendula* × *B. pubescens* [18]. Другим аспектом, как указывалось ранее, является пониженная фертильность или ее полное отсутствие у гибридов по причине их триплоидности. Несмотря на наличие незначительного дополнительного аллельного разнообразия, уровень наблюдаемой гетерозиготности у межвидовых гибридов не превысил аналогичный показатель, выявленный для популяций березы пушистой [7].

### Заключение

В результате проведенной работы установлены основные факторы, оказывающие влияние на генетическую структуру и уровень генетического разнообразия популяций лесных древесных видов. Среди факторов, приводящих к увеличению уровня генетической дифференциации и уменьшению генетического полиморфизма, наибольшее значение имеют географическая и репродуктивная изоляция, низкая эффективная численность популяций и эффект основателя. Интенсивный генный поток, интрогрессивная гибридизация и превалирование панмиксии приводят к снижению межпопуляционных различий и увеличению уровня генетического разнообразия. В целом, полученные данные указывают на необходимость учета влияния вышеперечисленных факторов при проведении популяционных исследований лесных древесных растений, разработке мероприятий по сохранению генофонда видов и совершенствованию стратегии селекционного семеноводства.

### Список использованных источников

1. Hamrick, J.L. Allozyme diversity in plant species // Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Chapter 3 / J.L. Hamrick, M.J.W. Godt; editors: A.H.D. Brown et al. – Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 1989. – P. 43–63.
2. Nevo, E. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates / E. Nevo, A. Beiles, P. Ben-Shlomo // Lect. Notes Biomath. – 1984. – Vol. 53 – P. 13–213.
3. Which DNA Marker for Which Purpose. Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of mo-

lecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union / E.M. Gillet (lead.), DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. – Frankfurt, 1999. – 253 p.

4. Гончаренко, Г.Г. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов / Г.Г. Гончаренко, В.Е. Падутов, В.В. Потенко. – Гомель: Полеспечать, 1989. – 164 с.

5. Березовые леса Беларуси: Типы, ассоциации, сезонное развитие и продуктивность / под. общ. ред. И.Д. Юркевича. — Минск: Наука і тэхніка, 1992. – 183 с.

6. Кузенева, О.И. Род береза – *Betula* L. // Флора СССР. – М.-Л., 1936. – Т. 5. – С. 269–305.

7. Молекулярно-генетические аспекты исследования лесных древесных видов растений / В.Е. Падутов [и др.] // Генетические основы селекции растений: в 4 т. Т. 4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларуская навука, 2014. – С. 467–506.

8. Юшкаускайте, А. Фенотипическая пластичность полусибсовых семей сосны обыкновенной и связь пластичности с полиморфизмом ядерной ДНК / А. Юшкаускайте, О.Ю. Баранов, В. Балюцкас // Наука – инновационному развитию лесного хозяйства: материалы международной научно-практической конференции, Гомель, 13–17 ноября / Институт леса НАН Беларуси; ред.: А.И. Ковалевич [и др.]. – Гомель: Институт леса НАН Беларуси, 2015. – С. 222–224.

9. Особенности генотипической структуры популяций сосны обыкновенной, различающихся условиями гидрологического режима / В.Е. Падутов [и др.] // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. трудов Института леса НАН Беларуси. – Вып. 67. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2007. – С. 592–596.

10. Slatkin, M. Gene flow in natural populations / M. Slatkin // Ann. Rev. Ecol. Syst. – 1985. – Vol. 16. – P. 393–430.

11. Качалов, А.А. Деревья и кустарники / А.А. Качалов. – М.: Лесная промышленность, 1970. – 410 с.

12. Баранов, О.Ю. Молекулярно-генетический анализ быстрорастущих форм ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) / О.Ю. Баранов,

В.Е. Падутов // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы: материалы междунауч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения академика Н.В. Турбина, Минск, 8–11 октября 2012 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2012. – С. 103.

13. Молекулярно-генетический анализ полусибсового потомства сосны обыкновенной с различным уровнем экологической пластичности / О.Ю. Баранов [и др.] // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири: материалы 4-го международного совещания, Барнаул, 24–29 августа / Ин-т леса им. В.Н. Сукачева СО РАН; редкол.: В.В. Тараканов [и др.]. – Барнаул, 2015. – С. 9–10.

14. Paprastosisi pušies populiacijų genetinė struktūra Lietuvoje pagal chloroplastų DNR žymenis / D. Kavaliauskas [et al.]. – Miškininkystė. – 2015. – Vol. 1 (77). – P. 45–55.

15. Nuclear and organelle diversity in *Quercus robur* and *Q. petraea* / A. Kremer [et al.] // Genetic variation in European populations of forest trees. – Germany: Sauerländer, 1991. – P. 141–166.

16. Генетическая структура полусибсового потомства дуба черешчатого и дуба скального различного происхождения (SSRP-анализ) / О.Ю. Баранов [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – № 3. – 2015. – С. 94–98.

17. Phylogenetic relationships of *Betula* species (Betulaceae) based on nuclear ADH and chloroplast MATK sequences / P. Jarvinen [et al.] // American Journal of Botany. – Vol. 91(11). – 2004. – P. 1834–1845.

18. Балюцкас, В. Морфолого-генетическая характеристика межвидовых гибридов (*B. pendula* × *pubescens*) в полусибсовом потомстве березы повислой / В. Балюцкас, А. Балюцкене, О.Ю. Баранов // Наука о лесе XXI: материалы международной научно-практической конференции, Гомель, 17–19 ноября / Институт леса НАН Беларуси; ред.: А.И. Ковалевич [и др.]. – Гомель: Институт леса НАН Беларуси, 2010. – С. 130–134.

19. Hagman M. On self- and cross-incompatibility shown by *Betula verrucosa* Ehrh. and *Betula pubescens* // Ehrh. Commun. Inst. Forest. Fenn. – 1971. – Vol. 73. – P. 1–125.

O.Yu. Baranov, D.I. Kagan, V.E. Padutov

## EVALUATION THE VARIOUS FACTORS INFLUENCE ON GENETIC STRUCTURE AND VARIABILITY OF FOREST TREE SPECIES POPULATIONS

The Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus  
Gomel BY-246001, Republic of Belarus

In this article, the influence of different factors (size and habitat structure, geographic and reproductive barriers to the exchange of genetic material between stands; introgressive hybridization; anthropogenic and biotic factors, leading to fluctuations in the effective population size; breeding and genome organization features) on the formation of the genetic structure and the level of genetic variability of populations on the example of the main forest tree species of Belarus was shown.

**Key words:** population genetic structure, genetic variation, DNA markers.

*Дата поступления статьи 12 февраля 2016 г.*

С.И. Вакула<sup>1</sup>, Н.В. Анисимова<sup>1</sup>, В.В. Титок<sup>2</sup>, В.Н. Леонтьев<sup>3</sup>, Л.В. Хотылева<sup>1</sup>, А.В. Кильчевский<sup>1</sup>

## МНОГОМЕРНЫЙ СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: svettera@yandex.ru

<sup>2</sup>ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

<sup>3</sup>Белорусский государственный технологический университет

Республика Беларусь, 227006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а

На основании оценки корреляционных связей в коллекции сортов льна масличного различного эколого-географического происхождения выделены четыре группы признаков, характеризующих: 1) продуктивность; 2) состав семян; 3) жирнокислотную композицию масла и 4) уровень накопления запасных соединений фосфора. Выделенные комплексы признаков использованы для оценки *k*-кластерной структуры исследуемого сортифта. Применение AMOVA для разделения меж- и внутригрупповой изменчивости RAPD- и ISSR-локусов позволило оценить уровень молекулярно-генетической дивергенции между кластерами сортов.

**Ключевые слова:** лен масличный, корреляционная плеяда, кластерный анализ, AMOVA.

### Введение

Масличный морфотип льна культурного (*Linum usitatissimum* L.) выращивают, главным образом, для получения семян, используемых в производстве круп, быстросохнущих олиф и жидких сиккативов, косметических и лекарственных препаратов. Для культуры льна масличного показана широкая фенотипическая изменчивость признаков продуктивности и качества семян. В зависимости от сорта и условий произрастания высота растений льна может составлять 30–80 см, вес тысячи семян – 5–9 г [1], концентрация  $\alpha$ -линоленовой кислоты (АЛК) в масле семян – от 3 до 70% [2]. Химический состав семян льна определяет основное направление их хозяйственного использования. Так, содержание АЛК в кулинарном льняном масле составляет около 3%, а в техническом – более 50% [3]. Создание сортов с комплексом хозяйственно-ценных признаков, отвечающих требованиям различных отраслей промышленности, – основная задача современной селекции льна масличного.

В основу любого селекционного процесса заложены оценка изменчивости исходного материала и поиск путей ее использования. В этом отношении возможности простого фенотипического скрининга ограничены как полигенной приро-

дой количественных признаков, так и эффектами генетической комплементации и эпистаза. Целью данного исследования являлась оценка изменчивости коллекции сортов льна масличного различного эколого-географического происхождения и идентификация сортов-доноров, обладающих благоприятным сочетанием хозяйственно-ценных признаков. Подходы к комплексной оценке изменчивости включали поиск ассоциаций признаков и анализ закономерностей их проявления в структуре коллекционного генофонда.

### Материалы и методы

Материал исследования – коллекция 25 образцов льна масличного различного эколого-географического происхождения: Antares, Mivast, Atalante (Франция); Blue Chip (Болгария); Glenelg (Австралия); Deep Pink (Нидерланды); Linota, SU-1-10, Omega, (США); K-5827 (Уругвай); Gold Flax, McGregor, Somme, Л-6582, K-6570, Flanders (Канада); Raluca, Sandra (Чехия); Cyan (Польша); K-2398 (Китай); Воронежский, K-5627, Небесный (Россия); ЛМ-1, ЛМ-2, (Беларусь). Полевой опыт (2005–2009 гг.) и учет морфологических признаков проводили согласно «Методическим рекомендациям по селекции и семеноводству льна-долгунца» [4].

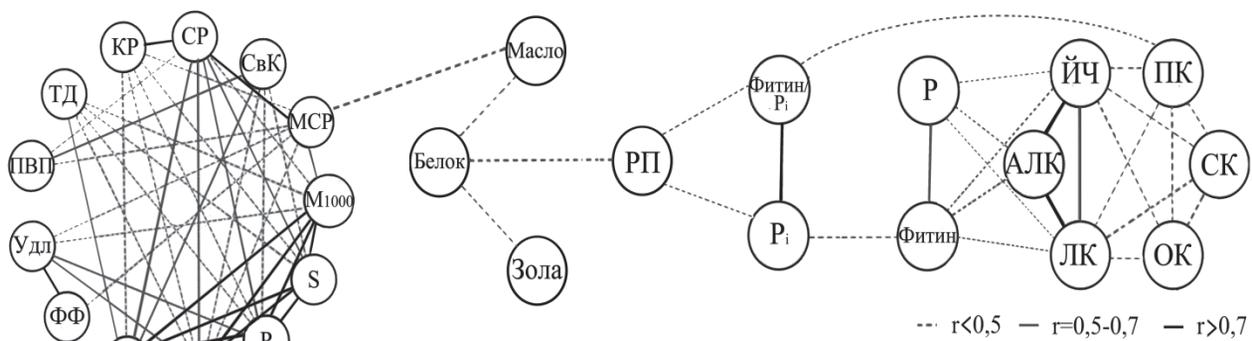
Содержание масла в семенах льна устанавливали по сухому остатку после экстракции в аппарате Сокслета [5]. Определение жирных кислот проводили по методу Welch с модификациями [6]. Для оценки содержания запасного белка в образцах семян использовали метод Кьельдаля [7]. Выход растворимых полисахаридов из водного экстракта семян рассчитывали гравиметрически, после осаждения 98%-ным этиловым спиртом [8]. Для оценки содержания в образцах семян фитина и неорганических фосфатов (P<sub>i</sub>) использовали методы Латта и Эскин [9] и Лоури-Лопеса [10], соответственно. Термогравиметрический анализ (термоанализатор TA-4000 Mettler Toledo STARe System, Швейцария) образцов семян проводили в интервале 25–500 °С при скорости нагревания 5 °С/мин и расходе воздуха 200 мл/мин. Кривые потери массы рассчитывали при помощи программного обеспечения STARe [11]. Для элементного анализа зольного остатка семян использовали электронный микроскоп JSM-5610 LV, оснащенный системой химического анализа EDX JED-2201 JEOL (Япония) [12]. Исследования молекулярной гетерогенности коллекции проводили на основе RAPD- (8 праймеров) и ISSR-ПЦП (12 праймеров). Для статистической обработки экспериментальных данных использовали MS Excel 2007 (описательная статистика), Statistica 10.0 (корреляционный анализ и итеративная кластеризация по методу *k*-средних), SPSS Statistics (таблицы сопряженности), Arlequin 3.5 [13] (анализ молекулярной дисперсии AMOVA).

### Результаты и обсуждение

Проведена оценка характера проявления 25 хозяйственно-ценных признаков у 25 образцов льна масличного из селекционных регионов, охватывающих страны Северной Америки, Западной и Восточной Европы, Азию. Оценка мер среднего уровня (среднее арифметическое, мода, медиана, асимметрия и т.д.) показала соответствие эмпирического распределения признаков закону нормального распределения. Наибольшую вариабельность в коллекции сортов льна проявляют признаки семенной продуктивности ( $V^0\%$  для массы и количества семян с растения составил соответственно 27,6 и 27,5), содержание полиненасыщенных жирных кислот ( $V^0\%=60,0$ ) и растворимых полисахаридов ( $V^0\%=26,2$ ).

Для выявления значимых ассоциаций признаков в коллекции сортов льна масличного использован непараметрический корреляционный анализ Спирмена. Между 25 признаками показано наличие 59 статистически достоверных связей, 36 из которых представляют обратные зависимости. Сила связи между исследуемыми признаками варьирует от слабой ( $r=0,2$  между содержанием пальмитиновой и стеариновой кислот) до тесной ( $r>0,9$  между признаками формы и размера семян, содержанием  $\alpha$ -линоленовой и линолевой кислот). Группы признаков, описывающие продуктивность и качество семян льна, относительно независимы. Достоверная ассоциация показана только между массой 1000 семян и содержанием масла, что отражает сопряженность отбора этих признаков при окультуривании льна масличного [1, 3]. На основании полученных данных исследуемые признаки разделены на 4 корреляционные плеяды (см. рис.), объединяющие признаки: 1) морфологии семян (площадь, периметр, длина, ширина, фактор формы и удлинение) и продуктивности (техническая длина стебля, количество коробочек, семян с растения и семян в коробочке, масса семян с растения, масса 1000 семян); 2) содержания в семенах масла, белка, зольных веществ и растворимых полисахаридов (далее – состав семян); 3) жирнокислотного состава масла (йодное число, содержание  $\alpha$ -линоленовой, линолевой, олеиновой, стеариновой и пальмитиновой кислот); 4) содержания запасных соединений фосфора (процентное содержание фосфора в золе семян, содержание фитина, неорганического фосфата (P<sub>i</sub>) и коэффициент фитин/P<sub>i</sub>).

Проведен анализ сходства сортов коллекции по характеру проявления выделенных комплексов признаков. Для решения задачи оптимального разбиения коллекции на группы фенотипически близких сортов использовали итеративный алгоритм кластеризации (метод *k*-средних) [14], реализованный в пакете Statistica 10.0. Количество *k*-кластеров для разбиения определяли по результатам усечения иерархии в графике объединения сортов агломеративного кластерного анализа. Из тринадцати признаков, описывающих морфологию семян и продуктивность,



**Рисунок.** Значимые коэффициенты корреляции, показанные для 25 хозяйственно-ценных признаков льна масличного

**Признаки продуктивности:** ПВП – продолжительность вегетационного периода, с; ТД – техническая длина стебля, см; КР – количество коробочек с растения, шт.; СВК – количество семян в коробочке, шт.; МСР – масса семян с растения, г; М1000 – масса 1000 семян, г; S – площадь семян, мм<sup>2</sup>; Р – периметр семян, мм; Дл – длина семян, мм; Шр – ширина семян, мм; ФФ – фактор формы; Уд – удлинение семян. **Состав семян, % от массы:** Зола (зольные вещества); Белок; Масло; РП (растворимые полисахариды). **Концентрации жирных кислот в масле, %:** АЛК –  $\alpha$ -линоленовой; ЛК – линолевой; ОК – олеиновой; СК – стеариновой; ПК – пальмитиновой; ЙЧ – йодное число масла. **Запасные соединения фосфора:** Фитин мг/г; Р<sub>1</sub> – неорганический фосфат мг/г; Р – фосфор зольного остатка, % массы.

итерировано 5 *k*-кластеров, объединяющих фенотипически близкие сорта льна (табл. 1). Наиболее дистантный *k*-кластер сформирован высокопродуктивным, мелкосемянным сортом Flanders. Анализ комплексов признаков состава семян и жирнокислотной композиции масла разбил коллекцию сортов на пять и семь групп, соответственно. Высокое содержание растворимых полисахаридов и масла определяют удаленность сорта Flanders от других *k*-кластеров, сформированных по сходству состава семян. На основании проведенной оценки выделен кластер, объединяющий сорта со средним накоплением масла 45%, а также кластер сортов, перспективных для селекции на повышение кормовой ценности семян (содержание белка – более 21,0%). Уникальное соотношение жирных кислот отмечено в семенах сортов McGregor (эквивалентный уровень линолевой и олеиновой кислот) и Gold Flax (низколиноленовый сорт). Согласно сходству профилей накопления запасных соединений фосфора в коллекции выделено 6 групп сортов. Низкие уровни фосфорсодержащих соединений накапливают семена сорта Gold Flax. В один *k*-кластер объединены и наиболее высокофитиновые сорта BlueChip и ЛМ-2.

С использованием *F*-критерия подтверждена достоверность различий среднекластерных значений (при  $\alpha \leq 0,05$ ) для 22 признаков. Для комплекса признаков продуктивности статистически не значим вклад признака «фактор формы». Средние величины содержания зольных компонентов и пальмитиновой кислоты в группах сортов, сгруппированных по признакам состава семян и композиции масла, соответственно, также достоверно не различаются. Исходя из значений евклидовых дистанций между центрами *k*-кластеров (ЕЕ), максимальной дивергенцией характеризуются группы сортов льна, раскластеризованные по сходству состава семян (ЕЕ<sub>мин</sub> = 1,62). Низкий уровень расхождения отмечен для *k*-кластеров, сгруппированных на основании признаков продуктивности и формы семян (ЕЕ<sub>мин</sub> = 0,83).

При генотипировании сортов коллекции с использованием маркерных систем RAPD и ISSR получено 218 ампликонов, 120 из которых полиморфны. Информационный индекс (PIC) 20 доминантных мультилокусных маркеров варьировал от 0,06 (ISSR 8a и ISSR 9) до 0,33 (Opaf16). В среднем, для анализируемой коллекции частота фиксированных рецессивных локусов составила 30%, что указывает на ее сравнительно высокое генетическое разнообразие [15, 16].

Таблица 1

## Структура рабочей коллекции льна масличного

№	Продуктивность		Состав семян		
	Сорта	$\bar{X}$	Сорта	$\bar{X}$	
Дистантные <i>k</i> -кластеры	1	ВП=95,1 с.; ТД=43,1 см, МСП=0,60 г, М1000= 7,22 г	1, 7, 13, 14, 23, 24, 25,	Зола 4,0%; Белок 20,5%; Масло 43,2%; РП 22,0%	6
	2	ВП=85,6 с., ТД=37,8 см, МСП=0,50 г, М1000= 6,8 г	3, 4, 11, 19, 21	Зола 4,1%; Белок 20,6%; Масло 41,9%; РП 14,3%	1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 20, 21, 22
	3	ВП=96 с., ТД=44,6 см, МСП=0,55 г, М1000= 5,8 г	2, 8, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 22	Зола 4,1%; Белок 21,2%; Масло 43,1%; РП 9,7%	8, 11, 14, 15, 16
	4	ВП=105 с., ТД=39,0 см, МСП=0,84 г, М1000= 5,5 г	6	Зола 4,0%; Белок 21,2%; Масло 39,8%; РП 9,5%	17, 18
	5	ВП=85,6 с., ТД=50,1 см, 6МСП=0,44 г, М1000= 5,3 г	5, 9	Зола 4,0%; Белок 21,4%; Масло 41,6%; РП 14,8%	4, 19, 23, 24, 25
	Жирнокислотная композиция масла		Содержание запасных соединений фосфора		
	Сорта	$\bar{X}$	Сорта	$\bar{X}$	
Дистантные <i>k</i> -кластеры	6	АЛК=3%; ЛК= 50,9; ЙЧ=130	8	Фитин=32,3 <sup>a</sup> ; P <sub>i</sub> =1,7 <sup>a</sup> ; Фитин/P <sub>i</sub> =18,6;	4, 17, 21, 25
	7	АЛК=52,7%; ЛК=14,0%; ОК=18,2%; ЙЧ=181	1, 6, 15, 16, 23	Фитин=32,7; P <sub>i</sub> =2,1; Фитин/P <sub>i</sub> =15,7;	5, 6, 7, 11, 16, 18, 19, 23
	8	АЛК=51,2%; ЛК= 14,2%; ОК=19,8; ЙЧ=179	2, 3, 4, 18, 19, 20, 24	Фитин=35,6; P <sub>i</sub> =2,33; Фитин/P <sub>i</sub> =16;	3, 24
	9	АЛК=46,6%; ЛК=14,5%; ОК=22,9%; ЙЧ=170	11, 21	Фитин=33,6; P <sub>i</sub> =1,8; Фитин/P <sub>i</sub> =18,5;	14, 15, 20, 22
	10	АЛК=49,3%; ЛК=13,9%; ОК=20,9%; ЙЧ=175	5, 13, 14, 25	Фитин=29,7; P <sub>i</sub> =1,6; Фитин/P <sub>i</sub> =18,4;	8
	11	АЛК=47,3%; ЛК=15,6%; ОК=21,4%; ЙЧ=173	7, 9, 12, 17, 22	Фитин=33,8; P <sub>i</sub> =1,8; Фитин/P <sub>i</sub> =14,5;	1, 2, 9, 10, 12, 13
	12	АЛК=49,2%; ЛК=ОК=17,2%; ЙЧ=177	10		

Примечание. Условные обозначения – смотри примечания к рисунку. 1 – Antares; 2 – Atalante; 3 – Blue Chip; 4 – Cyan; 5 – Deep Pink; 6 – Flanders; 7 – Glenelg; 8 – Gold Flax; 9 – Linota; 10 – McGregor; 11 – Mivast; 12 – Omega; 13 – Raluca; 14 – Sandra; 15 – Somme; 16 – SU-1-10; 17 – Воронежский; 18 – К-2398; 19 – К-5627; 20 – К-5827; 21 – К-6570; 22 – Л-6582; 23 – ЛМ-1; 24 – ЛМ-2; 25 – Небесный.

Данные молекулярно-генетического полиморфизма соотнесены со структурой фенотипической изменчивости. Сортовой состав *k*-кластеров по признакам продуктивности, состава семян, композиции масла и содержания запасных соединений фосфора рассматривали как градации четырех независимых факторов дисперсионного анализа АМОВА. Для оценки значимости каждого компонента изменчивости использовали процедуру перестановок (данные не приведены). Результаты оценки доли молекулярно-генетических различий, связанных с разбиением сортифта кол-

лекции на *k*-кластеры представлены в табл. 2.

Наиболее высокий процент молекулярно-генетических различий показан между *k*-кластерами, сгруппированными по сходству признаков жирнокислотного состава масла (19,65%), наиболее низкий – между *k*-кластерами состава семян (7,75%). На основании результатов АМОВА рассчитаны генетические расстояния между *k*-кластерами, так называемые *Fst* для пар популяций. За исключением дистанции между односортовыми *k*-кластерами по композиции масла (Gold Flax и McGregor), все *Fst* значимо отличались от нуля.

Таблица 2

Распределение изменчивости ДНК-локусов по  $k$ -кластерам сортов коллекции льна масличного

Фактор изменчивости	Между $k$ -кластерами, %	Внутри $k$ -кластеров, %	Межкластерные дистанции (среднее)		$r$
			EE	$F_{st}$	
Продуктивность	19,43	80,57	0,32	1,54	0,94**
Состав семени	7,75	92,25	3,78	0,35	0,81**
ЖК состав масла	19,65	80,35	2,76	0,24	0,17
Запасные соединения Р	17,46	82,54	0,26	2,66	0,84**

Проведена оценка зависимости генетических расстояний, выраженных в  $F_{st}$ , и соответствующих им евклидовых дистанций между центрами  $k$ -кластеров. Для оценки силы связи использовали коэффициенты корреляции Спирмена. Для факторов «продуктивность», «состав семян», «содержание запасных соединений фосфора» показана статистически значимая (при  $\alpha \leq 0,01$ ) зависимость между долей генетических различий ( $F_{st}$ ) и фенотипической удаленностью  $k$ -кластеров (EE) (табл. 2). Уровень количественных различий между  $k$ -кластерами сортов, дивергентных по жирнокислотной композиции масла, не отражен в их генетических дистанциях, что может быть связано с ограниченностью использованного набора ДНК-маркеров, влиянием условий среды на состав масла льна или другими факторами.

### Заключение

Проведена оценка связи между фенотипической структурой коллекции сортов льна масличного по комплексам признаков продуктивности, состава семян, содержания запасных соединений фосфора, жирнокислотной композиции масла и генетической гетерогенностью коллекции сортов, оцененной с использованием RAPD- и ISSR-маркеров. Доля генетической изменчивости, выявленная между четырьмя группами  $k$ -кластеров с использованием AMOVA, варьировала от 7,75% для фактора «состав семян» до 19,65% для фактора «композиция масла». Значимая корреляция межкластерных расстояний, выраженных в EE (фенотипическая дистанция) и  $F_{st}$  (генетическая дистанция), может свидетельствовать о накоплении в кластерах аллельных вариантов, связанных с фенотипическим проявлением комплексов признаков продуктивности, состава семян и содержания запасных соединений фосфора. Селекционная работа с

выделенными в структуре коллекции группами фенотипически и генотипически сходных сортов может способствовать дальнейшему накоплению благоприятных сочетаний аллелей, а включение их в скрещивания – созданию сортов льна масличного, отвечающих требованиям различных отраслей промышленности.

### Список использованных источников

1. Черноморская, Н.М. К вопросу о внутривидовой классификации льна обыкновенного (*Linum usitatissimum* L.) / Н.М. Черноморская, А.К. Станкевич // Селекция и генетика технических культур. – 1987. – Т. 113. – С. 53–64.
2. Diederichsen, A. Cultivated flax and the genus *Linum* L. Taxonomy and germplasm conservation / A. Diederichsen, K. Richards // Flax The genus *Linum*. – London, 2003. – P. 23–33.
3. Duguid, S.D. Flax / S.D. Duguid // Oil Crops. Handbook of Plant Breeding. – 4-th ed. – NY., 2009. – P. 233–256.
4. Методические указания по проведению полевых опытов со льном-долгунцом – Л: ВНИИЛ, 1978. – 72 с.
5. Комплексный анализ состава семян льна масличного – оптимизация подходов для селекционной практики / В.В. Титок [и др.] // Труды БГТУ: Химия, технология органических веществ и биотехнология. – 2014. – № 4, (168). – С. 187–193.
6. Welch, R.W. A Micro-method for the Estimation of Oil Content and Composition in Seed Crops / R.W. Welch // J. Sci. Food Agr. – 1977. – Vol. 28, № 4. – P. 635–638.
7. Kjeldahl, J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern (New method for the determination of nitrogen in organic substances) / J. Kjeldahl // Zeitschrift für analytische Chemie – 1883. – Vol. 22, № 1. – P. 366–383.

8. Оленников, Д.Н. Исследование процесса экстракции полисахаридов семян льна (*Linum usitatissimum* L.) / Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева // Химия растительного сырья. – 2007. – № 4. – С. 85–90.
9. Latta, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination / M. Latta, M. Eskin // J. Agr. Food Chem. – 1980. – Vol. 28, № 6. – P. 1313–1315.
10. Скулачев, В.П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи / В.П. Скулачев. – М.: Наука, 1962. – 153 с.
11. Термический анализ и сканирующая электронная микроскопия с электронно-зондовым микроанализом в комплексных исследованиях структуры биологических объектов: [для сельскохозяйственных культур] / В.Н. Леонтьев [и др.] // Материалы, технологии, инструменты. – 2005. – Т. 10, № 4. – С. 109–115.
12. Analysis of Structural and Qualitative Features of Phytin Deposition in Ripe Flax Seeds / V. Titok [et al.] // Cytology and Genetics. – 2015. – Vol. 49, № 1. – P. 40–44.
13. Excoffier, L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows / L. Excoffier, H.E.L. Lischer // Molecular Ecology Resources. – 2010. – № 10. – P. 564–567.
14. Боровиков, В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA / В.П. Боровиков. – М.: Горячая линия – Телеком, 2015. – 288 с.
15. RAPD Analysis of 54 North American Flax Cultivars / Y.-B. Fu [et al.] // Crop Sci. – 2003. – Vol. 43, № 4, – P. 1510–1115.
16. Лемеш, В.А. Молекулярные маркеры в изучении генетических ресурсов / В.А. Лемеш // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2008. – Т. 8. – С. 94–104.

S.I. Vakula<sup>1</sup>, N.V. Anisimova<sup>1</sup>, V.V. Titok<sup>2</sup>, V.N. Leontiev<sup>3</sup>, L.V. Khotyleva<sup>1</sup>, A.V. Kilcheuski<sup>1</sup>

## MULTIVARIATE STATISTICAL ANALYSIS OF THE FLAXSEED GENETIC VARIABILITY

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus  
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

<sup>2</sup>The Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus  
Minsk BY-220012, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Belarusian State Technological University  
Minsk BY-227006, Republic of Belarus

Four groups describing 1) the yield, 2) seed composition, 3) fatty acid ratio and 4) reserved phosphorus were identified based on their correlative relations in the collection of flaxseed varieties. These complexes were used for characterizing structure of k-means clusters for studied flaxseed varieties. For the estimation of molecular-genetic divergence level between k-clusters we estimated RAPD and ISSR variability between and among extracted groups with the use of AMOVA.

**Key words:** flaxseed, correlation pleiade, cluster analysis, AMOVA.

*Дата поступления статьи 23 февраля 2016 г.*

О.В. Дубровная, И.И. Лялько, А.В. Бавол, С.С. Воронова, А.Н. Гончарук

## АНАЛИЗ МЕЙОЗА У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* И *IN PLANTA*

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины  
03022, Украина, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17; e-mail: dubrovny@ukr.net

Исследовано прохождение мейоза у генетически модифицированных растений пшеницы сорта Зимоярка, полученных при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в культуре *in vitro* и методом *in planta*. Выявлено, что трансгенные формы характеризуются большей частотой нарушений мейоза по сравнению с не-трансгенными растениями. В результате сравнительного анализа течения мейоза установлено, что у трансгенных линий, полученных при использовании штамма AGLO с векторной конструкцией pVi2E, процент клеток с нарушениями на стадии метафазы I был значительно ниже, а мейотический индекс соответственно выше, чем у линий, полученных при использовании штамма AGLO с векторной конструкцией pVi-OAT. Показано, что наибольшее количество клеток с нарушениями – у трансгенных растений линий с пониженной фертильностью пыльцы и низкой семенной продуктивностью.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, мейоз.

### Введение

В последние десятилетия наблюдается широкое использование различных подходов для создания генетически модифицированных растений пшеницы, одним из которых является *Agrobacterium*-опосредованная трансформация. Данный метод позволяет вводить в геном реципиента ограниченное число копий генов и обеспечивает передачу относительно больших генетических конструкций с минимальными перестройками в кодирующих последовательностях переносимых генов [1, 2].

Основные способы получения генетически модифицированных растений при использовании метода *Agrobacterium*-опосредованной трансформации основаны на переносе T-ДНК в культивируемые *in vitro* клетки с последующей регенерацией трансформированных побегов [3]. Однако при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в культуре *in vitro* могут возникать генетические и эпигенетические изменения генома [4, 5]. Установлено, что встраивание T-ДНК может приводить к появлению всего спектра мутаций, описанных классической генетикой, – от точечных мутаций до значительных хромосомных перестроек, таких, как транслокации, инверсии, дупликации, и даже к изменению

уровня ploидности [6–8]. Кроме того, стрессы, связанные с различными аспектами трансформации растений, такие, как использование антибиотиков и инфекция *Agrobacterium*, также могут вызвать генетические и / или эпигенетические изменения в геноме [9]. В связи с этим, была начата разработка других подходов, позволяющих избежать культивирования *in vitro* и возможной соматической изменчивости, в частности, метод *in planta* [10]. Этот метод успешно используется у различных злаковых культур, в том числе и пшеницы [11, 12].

Известно, что при трансгенезе инсерция T-ДНК в функционально значимые области генома может негативно влиять на мейоз и фертильность пыльцы, а также на репродуктивные функции растений-трансформантов [13–17]. Описаны мутации, происходящие на различных стадиях микро- и макроспорогенеза, а также гаметогенеза [18]. Нарушения нормального течения мейоза у растений проявляются в изменениях синапсиса, замене первого мейотического деления на митотическое, преждевременном цитокинезе, изменении конденсации хроматина, слипании и фрагментации хромосом, неспособности хромосом к конъюгации, в образовании различного количества унивалентов, неодновремен-

менном и неравномерном расхождении хромосом к полюсам, формировании диад и тетрад с микроядрами, появлению полиад [16–19]. Наблюдаются также аномалии мейоза, связанные с аппаратом веретена деления [13]. В зависимости от встраивания Т-ДНК, инсерции могут стать причиной эмбриолетальности, мужской стерильности, а также часто приводят к снижению семенной продуктивности и стерильности растений [20]. В связи с этим, целью нашей работы был сравнительный анализ протекания мейоза у генетически модифицированных растений пшеницы, полученных методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации как клеток каллусных культур *in vitro* [21], так и методом *in planta* [22, 23].

### Материалы и методы

В исследованиях использовали растения мягкой пшеницы сорта Зимоярка (оригинатор – Институт физиологии растений и генетики НАН Украины). *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию проводили с использованием штамма AGLO и двух векторных конструкций, одна из которых несет ген синтеза, а другая – катаболизма пролина [21–23]. Векторная конструкция рВи2Е содержит двухцепочечный РНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы (*pdh*) и ген *nptII* – неомизинфосфотрансферазы II *E. coli*. Другая конструкция содержит бинарный вектор рВи-ОАТ с целевым геном орнитинаминотрансферазы *Medicago truncatula*, а также селективный ген неомизинфосфотрансферазы II (*nptII*) *E. coli*. Обе конструкции любезно предоставлены д.б.н. А.В. Кочетовым (Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск). Трансгенный статус регенерантов подтверждали методом ПЦР.

Материалом исследований служили трансгенные линии пшеницы сорта Зимоярка, полученные при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*: Зимоярка 32р, 74р, 86р – с использованием векторной конструкции рВи2Е, линии Зимоярка 93р, 126р, 134р – с использованием векторной конструкции рВи-ОАТ. Трансгенные линии Зимоярка 1, 11, 43, 59 получены методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в культуре *in vitro* с использованием векторной конструкции рВи2Е, тогда как линии Зимоярка 154, 161, 169, 175 получены с использованием векторной конструкции

рВи-ОАТ. Все исследуемые растения в поколении  $T_0$  имели нормальный хромосомный набор ( $2n = 6x = 42$ ) и были фертильными.

Цитологический анализ мейоза проводили на материнских клетках пыльцы (МКП) на временных давленных препаратах пыльников, окрашенных 2%-ным ацетокармином, приготовленных по общепринятой методике [24]. Для каждого варианта брали по 3–4 колоса, еще не вышедших из трубки. Анализировали все пыльники, МКП которых находились на стадиях профазы 1 (П1), метафазы 1 и 2 (М1, М2), анафазы 1 и 2 (А1, А2) и формирования тетрад. В диакинезе и метафазе 1 изучали по 15–20 четких метафазных пластинок на препарат, а на стадиях ана/телофаз – не меньше 50 клеток на колос. На последней стадии мейоза анализировали по 150–200 тетрад на одно растение, определяли мейотический индекс (количество МКП без нарушений на данной стадии), который является четким показателем как нормального прохождения мейоза, так и окончательным показателем уровня цитологической стабильности генотипов [25, 26]. В качестве контроля использовали растения исходного сорта Зимоярка (К1) и нетрансгенные растения  $R_1$  того же сорта, полученные в культуре *in vitro* (К2). Препараты анализировали с помощью микроскопа Amplival (Zeiss) с увеличением  $15 \times 40$  и  $15 \times 100$ . Фертильность пыльцы определяли по стандартной методике [24].

### Результаты и обсуждение

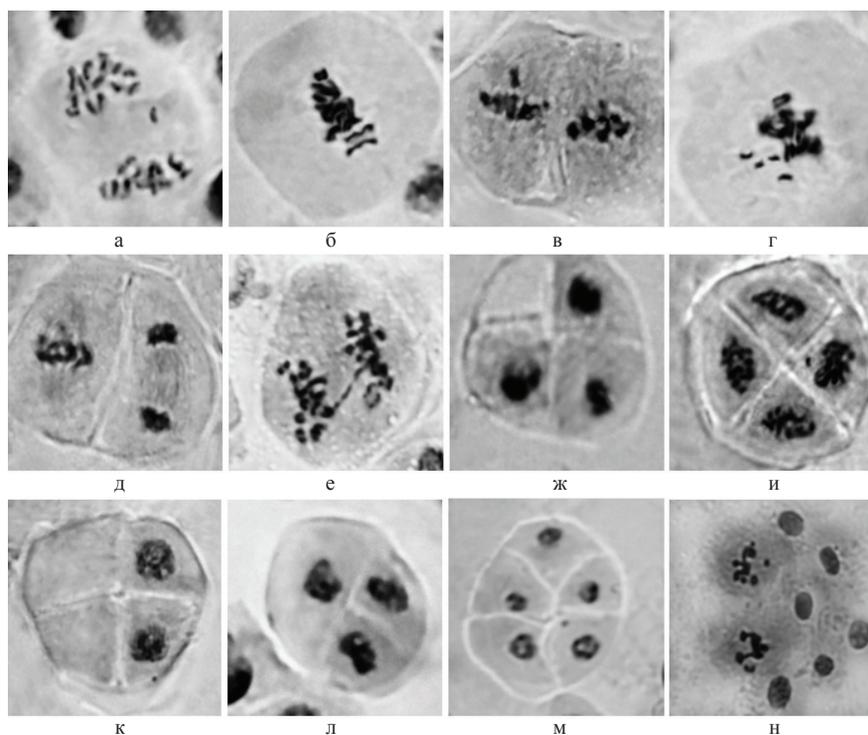
Цитологический анализ микроспорогенеза у контрольных растений сорта Зимоярка показал, что мейоз проходил практически без нарушений. Хромосомные ассоциации в метафазе мейоза 1 (М1) представлены, в основном, закрытыми бивалентами ( $21z^{II}$ ). У нетрансгенных растений  $R_1$  только в единичных клетках отмечены открытые биваленты ( $20_3^{II} + 1_{O_3}^{II}$ ;  $19_3^{II} + 2_{O_3}^{II}$ ). Все биваленты были расположены на экваторе микроспороцитов, а их центромеры ориентированы к полюсам веретена деления. Клеток с унивалентами у растений сорта не наблюдали, а у нетрансгенных растений  $R_1$  отмечена лишь одна клетка с унивалентами ( $20_3^{II} + 2^I$ ), что соответствует нормальному течению мейоза. На стадиях ана-телофаз обоих мейотических делений только в отдельных клетках отмечали присутствие еди-

ничных фрагментов, частота которых у сорта составляла 0,5%, а у нетрансгенных растений  $R_1$  была на уровне 1,7%, что в 3 раза выше по сравнению с растениями сорта, однако не превышает нормы для цитологически стабильных форм. Формирование нормальных тетрад происходило в гнездах пыльников синхронно, количество клеток с микроядрами не превышало 1,5%. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что мейоз у контрольных растений происходит без нарушений и они являются цитологически стабильными.

При изучении характера микроспорогенеза у трансгенных растений пшеницы, полученных как методом *in vitro*, так и методом *in planta*, наблюдали, в основном, однотипные отклонения от нормы. Установлено, что у всех линий формировались бивалентные ассоциации хромосом, представленные в основном закрытыми бивалентами ( $21^{II}$ ), что свидетельствует о высокой интенсивности конъюгации гомологичных хромосом. Практически у всех проанализированных растений встречалось от 1-го до 3-х открытых бивалентов:  $20^{II}_3+1^I_0$

или  $19^{II}_3+2^{II}_0$  (рис., б), появление которых свидетельствует о десинапсисе (ослаблении конъюгации), однако показано, что он не имеет негативного влияния на прохождение мейоза [25]. Мультивалентные ассоциации хромосом в наших исследованиях не обнаружены.

Основным типом нарушений на стадии М1 является асинапсис (отсутствие конъюгации) между гомологичными хромосомами, на что указывает наличие унивалентных хромосом. Асинапсис приводит к аномалиям мейоза на последующих стадиях [8]. Отсутствие конъюгации и образование разного количества унивалентов объясняется мутациями в генах, контролирующим синапсис [26]. В наших исследованиях наблюдались в основном микроспороциты с двумя унивалентами ( $20^{II} + 2^I$ ), только у линий Зимоярка 169 и 126р отмечены единичные клетки с четырьмя (рис., г) и тремя унивалентами ( $19^{II}+4^I$ ,  $20^{II}+3^I$ ) соответственно. Наличие трех унивалентов свидетельствует о присутствии в данном кариотипе анеуплоидных клеток. Считается, что одной из причин возникновения таких клеток может быть цитомиксис [13].



**Рисунок.** Нарушения мейоза в клетках генетически модифицированных растений пшеницы: а – анафаза 1 с выбросом хромосомы; б – открытые биваленты; в – метафаза 2 с выбросом хромосом; г – наличие 4-х унивалентов; д – анафаза 2 с асинхронным делением; е – множественные нарушения в анафазе 1 (мост, выброс хромосом и отстающая хромосома); ж – тетрада с отсутствующей микроспорой; з – тетрада с микроядром; к – тетрада с двумя отсутствующими микроспорами; л – триада; м – пентада; н – клампинг хромосом

Как правило, унивалентные хромосомы располагались за пределами метафазной пластинки и не принимали участия в ее формировании. Такие хромосомы оставались в цитоплазме (рис., а), а на стадии телофазы образовывали микроядра. Другим нарушением на стадиях метафазы 1 и 2 было наличие клеток с выбросом хромосом (рис., в). В мейоцитах, которые имеют униваленты, в основном происходит случайное расхождение хромосом в анафазе 1, что в дальнейшем может приводить к образованию неполноценных гамет. Количество клеток с унивалентами составляло от 3,8 до 22,4% у линий, полученных при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* и от 6,7 до 20,4% у линий, полученных при трансформации *in vitro*.

Нарушения, наблюдавшиеся на стадии А1, представлены отставшими хромосомами, фрагментами, мостами, выбросом хромосом (табл. 1). Количество таких клеток колебалось в пределах от 2,0 до 17,4% у линий, полученных при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in vitro*, и в пределах от 4,8 до 18,7% у линий, полученных при трансформации *in planta*. Однако следует отметить, что среди исследуемых линий нами обнаружена одна (Зимоярка 126р) со значительными системными нарушениями мейоза, которая характеризовалась высоким уровнем аномалий мейоза (18,7%). При цитологическом исследовании в поле зрения микроскопа часто выявляли клетки с множественными нарушениями (рис., е), а также наблюдали (одновременно) сразу несколько клеток с нарушениями.

Таблица 1

## Нарушения мейоза, отмеченные на стадиях А1 и А2

Генотип	Количество изученных клеток, шт.	Всего нарушений, %	Отстающие хромосомы, %	Фрагменты, %	Мосты, %	Выброс хромосом, %	Асинхронные деления, %
<b><i>Agrobacterium</i>-опосредованная трансформация <i>in vitro</i></b>							
Контроль 1	370	0,5±0,3	–	–	0,5±0,4	–	–
Контроль 2	350	1,7±0,7	–	1,7±0,7	–	–	–
Векторная конструкция рVi2E							
Зимоярка 1	250	2,0±0,8	–	1,2±0,7	–	–	0,8±0,4
Зимоярка 11	260	6,5±1,7	–	4,6±1,5	1,9±0,8	–	–
Зимоярка 43	290	7,2±1,8	1,0±0,4	3,1±1,4	1,4±0,7	–	1,7±0,6
Зимоярка 59	300	17,4±2,3	2,3±0,8	9,7±1,9	3,7±1,4	1,7±0,7	–
Векторная конструкция рVi-OAT							
Зимоярка 154	240	3,7±1,4	–	2,9±0,8	0,8±0,3	–	–
Зимоярка 161	250	11,6±2,1	2,4±0,8	5,6±1,2	3,2±0,9	0,4±0,2	–
Зимоярка 169	250	9,2±1,9	–	3,6±0,9	2,8±0,8	1,6±0,8	1,2±0,7
Зимоярка 175	230	10,4±2,0	0,4±0,2	4,4±0,9	2,2±0,8	–	3,4±0,8
<b><i>Agrobacterium</i>-опосредованная трансформация <i>in planta</i></b>							
Контроль	370	0,5±0,3	–	–	0,5±0,4	–	–
Векторная конструкция рVi2E							
Зимоярка 32р	260	4,8±1,3	0,6±0,5	1,7±0,8	0,9±0,6	–	1,6±0,8
Зимоярка 74р	300	9,7±1,7	1,6±0,7	3,6±1,1	2,6±1,9	–	1,9±0,8
Зимоярка 86р	310	11,6±1,8	2,6±0,9	3,5±1,0	2,9±0,9	1,9±0,8	0,7±0,5
Векторная конструкция рVi-OAT							
Зимоярка 93р	230	6,8±1,7	–	2,9±1,1	1,4±0,8	2,5±1,0	–
Зимоярка 126р	290	18,7±2,3	6,1±1,4	2,6±0,9	2,3±0,9	3,8±1,1	3,9±1,1
Зимоярка 134р	280	13,2±2,0	2,8±0,5	4,3±1,2	3,7±1,1	2,4±0,9	–

Из фрагментов и/или целых отставших хромосом, которые не отходили вместе с другими к полюсам и оставались в цитоплазме, в тетрадах на стадии T2 образовывались микроядра (рис., и). Основными нарушениями на стадии A2 также были отставание или выброс хромосом. Кроме того, на стадиях ана-телофазы отмечали клетки с асинхронным делением, когда в одной клетке проходила поздняя анафаза / ранняя телофаза, в то время как во второй – метафаза (рис., д). Частота таких клеток у линий была различной и варьировала в пределах от 0,7 до 3,9%. (табл. 1).

На стадии T1 происходит формирование диад. Показано, что к этому времени отставшие хромосомы и фрагменты, которые оставались в цитоплазме и не отходили к полюсам, могут

элиминироваться, включаться в одно из телофазных ядер или образовывать микроядра [27]. Одним из характерных нарушений на этой стадии были асимметричные деления, в результате которых к полюсам отходило разное количество хромосом. Тетрады с микроядрами отмечались с различной частотой у всех проанализированных линий (табл. 2). Наибольшее количество таких клеток (28,1%) отмечено у линии Зимоярка 175, наименьшее (0,7%) – у линии Зимоярка 1. Кроме того, у отдельных линий (Зимоярка 161 и 169) наблюдали тетрады, в которых одна или две микроспоры отсутствовали (рис., ж, к). Количество таких клеток не превышало 2%. Появление в тетрадах безъядерных микроспор некоторые исследователи объясняют наличием в M1 или M2

Таблица 2

## Анализ стадии тетрад и мейотический индекс

Генотип	Стадия тетрад				Мейотический индекс, %
	Количество изученных клеток, шт.	Из них			
		Норма	С микроядрами, %	Отсутствуют микроспоры, %	
<b><i>Agrobacterium</i>-опосредованная трансформация <i>in vitro</i></b>					
Контроль 1	563	561	0,3±0,2	–	99,6±0,2
Контроль 2	593	586	1,2±0,4	–	98,8±0,5
Векторная конструкция pVi2E					
Зимоярка 1	579	572	0,7±0,4	0,2±0,2	99,1±0,4
Зимоярка 11	498	455	7,6±1,2	1,0±0,4	91,4±1,3
Зимоярка 43	501	393	19,8±1,8	1,8±0,6	78,4 ±1,8
Зимоярка 59	495	376	21,2±1,8	2,8±0,7	75,9±1,9
Векторная конструкция pVi-OAT					
Зимоярка 154	505	459	8,3±1,2	0,8±0,4	90,9±1,3
Зимоярка 161	496	337	30,2±2,1	1,8±0,6	67,9±4,4
Зимоярка 169	537	387	26,1±1,9	1,9±0,6	72,1±1,9
Зимоярка 175	598	418	28,1±1,8	2,0±0,6	69,9±1,9
<b><i>Agrobacterium</i>-опосредованная трансформация <i>in planta</i></b>					
Контроль	563	561	0,3±0,2	–	99,6±0,2
Векторная конструкция pVi2E					
Зимоярка 32р	500	471	5,8±1,0	–	94,2±1,0
Зимоярка 74р	550	409	17,2±1,6	8,4±1,2	74,4±1,9
Зимоярка 86р	610	498	14,1±1,4	4,3±0,8	81,6±1,6
Векторная конструкция pVi-OAT					
Зимоярка 93р	550	503	8,6±1,2	–	91,4±1,2
Зимоярка 126р	560	332	25,5±2,1	15,2±1,5	59,3±2,1
Зимоярка 134р	560	399	24,8±1,8	3,9±0,8	71,2±1,9

автономного веретена, а также отсутствием кинетохорных фибрилл или аномальным преждевременным цитокинезом в профазе 2 [26].

В конечном итоге это может приводить к снижению фертильности или полной стерильности пыльцы. В ходе исследования отмечали и другие аномалии – триады (рис., л), пентады (рис., м), а иногда полиады.

Исследование показателей мейотического индекса у трансгенных растений, полученных путем *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in vitro*, показало, что три из проанализированных линий имеют высокий индекс – 90–99% (линии Зимоярка 1, 11, 154); две – сниженный – 75–78% (линии Зимоярка 43, 59) и три – низкий – 68–72% (линии Зимоярка 161, 169, 175).

Подобная картина наблюдалась и при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*: две линии – Зимоярка 32р и 93р – с высоким мейотическим индексом (94,2 и 91,4%, соответственно); одна – Зимоярка 86р – с пониженным – 81,6%, и три – с низким 59,3, 71,2 и 74,4% (соответственно линии Зимоярка 126р, 134р, 74р) (табл. 2).

Высокий мейотический индекс присущ цитологически стабильным формам с нормальным течением мейоза, формированием тетрад без нарушений и обуславливает в дальнейшем образование жизнеспособной пыльцы. По годам воспроизведения трансгенные растения этих линий по продолжительности фенологических стадий роста практически не отличались от контрольных растений сорта Зимоярка. Это свидетельствует в пользу стабилизации функционирования генома в целом у потомков первичных трансформантов уже в следующем поколении. Сниженный мейотический индекс характерен для стабильных форм, которые имеют определенное количество нарушений в метафазе. Низкий мейотический индекс свидетельствует о повышенном уровне нарушений на стадиях М1–А2 и является показателем нестабильности таких материалов.

Следует отметить, что кроме описанных нарушений у линий Зимоярка 86р и Зимоярка 126р наблюдали отдельные пыльники, в клетках которых происходил клампинг (слипание) хромосом (рис., н). В первой метафазе мейоза суперконденсированные хромосомы были тесно сближены, образуя «комки», в которых

практически невозможно различить отдельные хромосомы. В анафазе хромосомы «растягивались» и к полюсам отходило разное количество хроматина. Цитологическое проявление этой мутации практически не отличалось от описанного Соснихиной у ржи [28]. Микроспоры, образующиеся в конце мейоза, имеют неравное количество хроматина, различаются по размеру ядер и могут быть стерильными. Частота таких клеток была на уровне 2%.

Нами также проводилось определение фертильности пыльцы у исследуемых линий. На цитологических препаратах фертильная пыльца окрашивалась ярким карминно-красным цветом и имела зернистую цитоплазму с четко сформированными двумя спермиями и вегетативным ядром. Стерильные пыльцевые зерна почти не окрашивались кармином. Результаты анализа фертильности пыльцы подтверждают, что линии с низким мейотическим индексом характеризуются пониженной фертильностью пыльцы.

Показано, что интеграция Т-ДНК в геном растений при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации не является сайт-специфичной и носит случайный характер, что приводит к различного рода мутациям и хромосомным перестройкам генома растений, которые могут сказываться на репродуктивной способности растений-трансформантов [6, 7, 14, 15]. Встраивание в геном трансформантов пшеницы генетических конструкций с использованием *Agrobacterium*-опосредованной трансформации также неспецифично и может приводить к различным структурным изменениям хромосом. Эти изменения незначительно отражаются на морфологии растений, но в разной степени нарушают ход мейоза, что приводит к различной динамике снижения завязывания семян. Следует отметить, что у некоторых линий процент клеток с нарушениями в разы превышает контрольные. Кроме того, линии с низким мейотическим индексом характеризуются пониженной фертильностью пыльцы и, как следствие, низкой завязываемостью семян. У линий Зимоярка 74р, 86р, 126р, 134р она составляла 30–40% от контроля (растения сорта Зимоярка, завязывание семян которых принимали за 100%). Это может быть связано либо с прямым действием агробактерии на растительные клетки, либо с опосредованным влиянием, поскольку ино-

куляционная среда богата углеводами, биологически активными соединениями и может стимулировать рост сапрофитной микрофлоры, которая негативно влияет на процесс опыления и развитие завязи. В то же время у линий Зимоярка 32р и 93р завязываемость семян составляла 90% от контроля.

### Заключение

Таким образом, анализ хода мейоза у генетически модифицированных растений пшеницы показал, что трансгенные формы характеризуются большей частотой нарушений мейоза по сравнению с нетрансгенными. Нами не выявлено существенных отличий протекания мейоза у генетически модифицированных растений пшеницы, полученных как в культуре *in vitro*, так и методом *in planta*. Проанализированные линии различаются по уровню цитологической стабильности: среди трансгенных растений, полученных различными способами *Agrobacterium*-опосредованной трансформации появляются как генетически стабильные, так и генетически нестабильные формы, которые имеют значительные нарушения мейоза. Показано, что процент клеток с нарушениями мейоза был наибольшим у трансгенных растений из линий, которые характеризуются низкой семенной продуктивностью. Наши результаты показывают, что уровень цитологической стабильности у линий, полученных при использовании штамма AGLO с векторной конструкцией pVi2E, выше по сравнению с линиями, трансформированными штаммом AGLO с векторной конструкцией pVi-OAT. Возможно, это связано с неспецифическим встраиванием генетической конструкции в геном пшеницы, что может в разной степени нарушать ход мейоза, и является основной причиной неодинаковой воспроизводимости трансгенных линий.

### Список использованных источников

1. Bhalla, P.L. Wheat transformation—an update of recent progress / P.L. Bhalla, H.H. Ottenhof, M.B. Singh // *Euphytica*. – 2006. – Vol. 149. – P. 353–366.
2. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / G. Xia [et al.] // *Acta Physiol. Sin.* – 1999. – Vol. 25. – P. 22–28.

3. Mahalakshmi, A. *Agrobacterium*-mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.) / A. Mahalakshmi, P. Khurana // *J. Plant Biochem. Biotechnol.* – 1995. – Vol. 4. N 2. – P. 55–59.

4. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens* / M. Labra [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 2001. – Vol. 20. – P. 325–330.

5. Somaclonal variation in transgenic plants / F. Sala [et al.] // *Acta Horticulture*. – 2000. – Vol. 530. – P. 411–419.

6. Laufs, P. A chromosomal paracentric inversion associated with T-DNA integration in *Arabidopsis* / P. Laufs, D. Autran, J. Traas // *Plant J.* – 1999. – T. 18, N 2. – P. 131–139.

7. Дейнеко, Е.В. Т-ДНК-индуцированные мутации у трансгенных растений / Е.В. Дейнеко, А.А. Загорская, В.К. Шумный // *Генетика*. – 2007. – Т. 43, № 1. – С. 5–17.

8. Tax, F. T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*. Implications for mutant analysis and functional genomics / F. Tax, D. Vernon // *Plant Physiology*. – 2001. – Vol. 126, N 4. – P. 1527–1538.

9. Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana* / M. Bardini [et al.] // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 2003. – Vol. 72. – P. 157–162.

10. Чумаков, М.И. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta* / М.И. Чумаков, Е.М. Моисеева // *Биотехнология*. – 2012. – № 1. – С. 8–20.

11. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* / P. Supartana [et al.] // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2006. – Vol. 102. – № 3. – P. 162–170.

12. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling / T. Zhao [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2006. – Vol. 25. – P. 1199–1204.

13. Т-ДНК-индуцированные аномалии цветков и мужская стерильность у трансгенных растений табака: морфологический и цитологический анализ / Ю.В. Сидорчук [и др.] // *Цитология и генетика*. – 2000. – Т. 34, № 6. – С. 3–8.

14. Embryonic lethals and T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis* / D. Errampalli [et al.] // *Plant Cell*. – 1991. – Vol. 3, N 2 – P. 149–157.
15. Abnormalities of meiotic division caused by T-DNA tagget mutation in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) / N.V. Shamina [et al.] // *Cell Biol. Int.* – 2001. – Vol. 25, N 4. – P. 367–369.
16. Преждевременный цитокнез в материнских клетках пыльцы трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) / Ю.В. Сидорчук [и др.] // *Цитология*. – 2008. – Т. 50, № 5. – С. 447–451.
17. Peirson, B.N. A defect in synapsis causes male sterility in a T-DNA-tagged *Arabidopsis thaliana* mutant / B.N. Peirson, S.E. Bowling, Ch. Makaroff // *The Plant Journal*. – 1997. – Vol. 11, N 4. – P. 659–669.
18. Особенности развития мужской репродуктивной сферы инсерционного мутанта табака TPD1 с продолжительным периодом цветения / Э.Л. Миляева [и др.] // *Физиология растений*. – 2002. – Т. 42, № 4. – С. 526–534.
19. Особенности развития и репродукции трансгенных растений льна-долгунца / В.А. Лемеш [и др.] // *Онтогенез*. – 2014. – Т. 45, № 6. – С. 406–411.
20. Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis* / L.A. Castle [et al.] // *Mol. Gen. Genet.* – 1993. – Vol. 241. – N 5/6. – P. 504–514.
21. Бавол, А.В. Оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсів м'якої пшениці / А.В. Бавол, С.С. Воронова, О.В. Дубровная // *Физиология растений и генетика*. – 2015. – Т. 47, № 1. – С. 58–65.
22. Воронова, С.С. Генетична трансформація *in planta* м'якої пшениці з використанням штаму AGLO, який містить рВі2Е з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази / С.С. Воронова, А.В. Бавол, О.В. Дубровная // *Фактори експерт. еволюції організмів: зб.наук.праць*. – Київ: Логос, 2015. – Т. 17. – С. 126–130.
23. Гончарук, А.Н. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці *in planta* з використанням гена орнітинамінотрансферази / А.Н. Гончарук, А.В. Бавол, О.В. Дубровная // *Фактори експерт. еволюції організмів: зб.наук.праць*. – Київ: Логос, 2015. – Т. 17. – С. 131–135.
24. Паушева, З.П. Практикум по цитології растений / З.П. Паушева. – М.: Колос, 1988. – 280 с.
25. Цитологическое изучение коллекции синтетической пшеницы из национальной коллекции злаков США (National Small Grain Collection of USDA-AKS) в условиях нечерноземной зоны России / И.Ф. Лапочкина [и др.] // *Сельхоз. биология*. – 2014. – № 3. – С. 77–82.
26. Проявление и наследование десинаптической формы ржи с нарушением гомологичности синапсиса / С.П. Соснихина [и др.] // *Генетика*. – 2007. – Т. 43, № 10. – С. 1424–1433.
27. Создание тетраплоидных форм озимой ржи (*Secale cereale* L.) с использованием закиси азота и генетические эффекты дубликации генома / Н.Б. Белько [и др.] // *Факторы экспериментальной эволюции организмов*. – 2011. – Т. 10. – С. 15–20.

O.V. Dubrovna, I.I. Lyalko, A.V. Bovol, S.S. Voronova, A.N. Goncharuk

**THE ANALYSIS OF MEIOSIS IN TRANSGENIC WHEAT PLANTS  
OBTAINED BY *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION  
*IN VITRO* AND *IN PLANTA***

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
03022, Ukraine, Kyiv, str. Vasylykivska 31/17

Meiosis in genetically modified wheat plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of *in vitro* culture and *in planta* of bread wheat cv. Zimoyarka has been investigated. It was found that transgenic forms are characterized by a higher frequency of meiotic disorders compared to non-transgenic plants. Comparative analysis of meiosis showed that transgenic lines obtained using strain AGLO with a vector construct pBi2E have much lower percentage of cells with disorders at the metaphase stage 1, and meiotic index is respectively higher than in the lines obtained using strain AGLO with a vector construct pBi-OAT. It is shown that the percentage of cells with impaired meiotic was the largest in transgenic plants from lines from lines that are characterized by reduced pollen fertility and low seed productivity.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, meiosis.

*Дата поступления статьи 8 февраля 2016 г.*

О.П. Шатарнов, Т.М. Шатарнова, Т.А. Силкова, Н.С. Фомченко, О.Г. Давыденко

## ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ РОДИТЕЛЬСКИХ ЛИНИЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ ПРОДУКТИВНОСТИ ГИБРИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS L.*)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: shatarnov@tut.by

Получены данные по оценке показателей хозяйственно важных признаков 100 гибридов  $F_1$  подсолнечника, созданных на основе самоопыленных линий белорусской селекции, выделены перспективные комбинации скрещивания. Урожайность семян лучших гибридов  $F_1$  составила 20,4–25,9 ц/га, масличность семян – 50,7–53,9%. Выделены материнские линии М695(8)/07А, М753(3)/07А, М475(15)/07А, М543/1(6)/07А, и отцовская – М708/04Rf, характеризующиеся высокими положительными эффектами ОКС по урожаю, масличности семян и урожаю масла. Отцовские линии – М387/08Rf, М442/08Rf и М444/08Rf – характеризовались высокой вариансой СКС по признакам урожай семян и масла. Раннеспелый межлинейный гибрид подсолнечника  $F_1$  Белорусский ранний (М475(15)/07А × М442/08Rf) был районирован в 2015 году по Гродненской, Гомельской, Брестской и Минской областям Беларуси.

**Ключевые слова:** гибридный подсолнечник, цитоплазматическая мужская стерильность, инбредные линии, общая и специфическая комбинационная способность.

### Введение

Подсолнечник – одна из основных масличных культур в мире, которая получила широкое признание и распространение на постсоветском пространстве благодаря своим высоким пищевым и кормовым достоинствам.

Селекция новых гибридов, обладающих довольно высокой экологической пластичностью, позволила продвинуть районы возделывания этой культуры к более северным широтам.

Практическая работа по селекции подсолнечника в Беларуси, начатая еще в начале 90-х гг. с испытания гибридов и сортов зарубежной селекции, привела к созданию в лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН Беларуси ряда перспективных самоопыленных линий. Использование этих линий позволило получить отечественные гибриды  $F_1$  Поиск (2008) и  $F_1$  Агат (2010), что явилось подтверждением перспективности направления гетерозисной селекции подсолнечника для региона Беларуси.

Для развития гетерозисной селекции важно оценивать не только сами гибриды, но и самоопыленные линии подсолнечника. Ранняя

диагностика линий позволяет существенно снизить затраты труда селекционера, выбраковав заведомо бесперспективные линии [1]. Одним из способов такой диагностики является оценка комбинационной способности линий.

Комбинационная способность подразделяется на общую (ОКС) и специфическую (СКС). ОКС определяется средней величиной гетерозиса во всех изученных гибридных комбинациях с участием этой линии [1, 2]. СКС характеризует степень отклонения величины гетерозиса в конкретных комбинациях от средней и позволяет выявить отдельные наиболее удачные комбинации скрещивания определенных родительских форм.

Таким образом, учитывая возрастающий интерес к подсолнечнику в нашей стране, а также появление новых и совершенствование старых методов и направлений в мировой селекции масличных культур, представляет интерес дальнейшая селекционная работа с подсолнечником масличным в почвенно-климатических условиях Беларуси.

Целью данной работы являлась оценка комбинационной способности родительских линий подсолнечника по показателям продуктивности гибридов  $F_1$ .

## Материалы и методы

Исследования проводились на экспериментальном поле биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси в 2009–2010 годы. Почвы на территории станции дерново-подзолистые, легкосуглинистые, с нейтральной реакцией среды. В работе использовались 100 гибридных комбинаций подсолнечника  $F_1$ , полученных от скрещивания стерильных линий на цитоплазме *Helianthus petiolaris* L. с линиями-восстановителями фертильности пыльцы, выделенными нами из простых межлинейных гибридов на основе ЦМС зарубежной селекции, путем многократного инцухта фертильных растений.

Растения выращивали рендомизированными блоками в 3-кратной повторности. Площадь питания одного растения составляла  $70 \times 35$  см. Согласно общепринятым методикам [2], анализировали признаки: высота растений, диаметр корзинки, масса 1000 семян и с одной корзинки, урожай семян, масличность семян и сбор масла с единицы площади, количество растений, не пораженных *Sclerotinia sclerotiorum*, на стадии физиологической спелости корзинок. Стандартом служил районированный в Беларуси гибрид  $F_1$  Фермер (селекции Донского филиала ВНИИМК и ООО «Соя-Север Ко»).

Для создания самоопыленных линий использовали метод инбридинга – принудительного самоопыления растений. Для этих целей применяли пергаментные изоляторы размером  $45 \times 45$  см, которые одевали на корзинки до появления краевых цветков.

Для получения гибридных семян проводили опыление стерильных материнских линий восстановителями фертильности пыльцы. Для гибридизации использовали изоляторы в виде рукавов, сшитых из спанбонда (СУФ-42), размером  $80 \times 45$  см.

Комбинационную способность линий оценивали в системе линия  $\times$  тестер. Величину истинного и конкурсного гетерозиса, а также расчет эффектов ОКС, констант и вариантов СКС определяли по общепринятым формулам и методам [3–7]. Двухфакторный дисперсионный анализ и расчет эффектов общей (ОКС) и специфической комбинационной способности (СКС) проводили в модуле Grif1 программного пакета статистического анализа данных AB-Stat.

## Результаты и обсуждение

Ценность родительских линий, включенных в схему скрещивания, определяется не только присутствием у них интересующих исследователя признаков и свойств, но и способностью этих форм передавать такие признаки потомству и давать гибриды с высокой жизнеспособностью и продуктивностью. Поэтому изучению генетики количественных признаков и определению комбинационной способности родительских форм в селекционных и генетических исследованиях уделяется большое внимание. Создание высокогетерозисных гибридов у перекрестноопыляемых растений, в том числе и подсолнечника, достигается сочетанием приемов инбридинга, оценки комбинационной способности самоопыленных линий и направленного подбора родительских компонентов скрещиваний [2, 8–12].

В результате наших исследований дана оценка комбинационной способности для 16 родительских линий в двух схемах тестерных скрещиваний: раннеспелые ( $10 \times 2$ ) и среднеспелые ( $6 \times 3$ ). Дисперсионный анализ полученных данных показал наличие достоверных различий по основным показателям продуктивности между исследуемыми гибридами  $F_1$  подсолнечника (табл. 1 и 2).

При схеме скрещивания  $6 \times 3$  отмечены достоверные значения ОКС испытанных линий по всем анализируемым показателям продуктивности. Достоверные значения ОКС тестеров в данной схеме были получены для масличности семян и урожая масла полученных гибридов подсолнечника. При анализе компонентов генотипической вариации, а также отношения вариации ОКС к вариансе СКС было отмечено, что в наследовании масличности семян преобладали неаддитивные эффекты взаимодействия генов родительских линий, а в наследовании урожайности семян – аддитивные эффекты генов материнских линий, что согласуется с данными, полученными зарубежными исследователями.

При схеме скрещивания  $5 \times 2$  отмечены достоверные значения ОКС испытанных линий при двух уровнях вероятности по всем анализируемым показателям продуктивности. Для тестеров высокое достоверное значение ОКС в данной схеме было получено только по масличности семян, что дает возможность

использовать их для получения раннеспелых высокомасличных гибридов подсолнечника. В процессе анализа компонентов генотипической вариации в данной схеме, а также отношение

вариансы ОКС к вариансе СКС, нами было отмечено, что на урожай семян в сильной степени влияет генотип материнских линий, а на масличность – генотип отцовского компонента.

Таблица 1

Дисперсионный анализ комбинационной способности среднеспелых родительских линий подсолнечника (схема скрещиваний  $6 \times 3$ )

Источник варьирования	Степени свободы	Урожай семян	Масличность семян	Урожай масла
Повторности	2	3,6	0,1	0,9
Гибриды	17	<b>17,5*</b>	<b>2,6**</b>	<b>4,7**</b>
Случайные отклонения	34	7,5	0,04	1,8
ОКС линий	5	<b>6,7*</b>	<b>1,37**</b>	<b>1,7*</b>
ОКС тестеров	2	7,8	<b>1,43**</b>	<b>2,6*</b>
СКС	10	5,0	<b>0,52**</b>	<b>1,3*</b>
Случайные отклонения	34	2,5	0,01	0,6
Компоненты генотипической вариации				
$\sigma^2_{\text{gi}}$	–	0,56	0,28	0,13
$\sigma^2_{\text{gj}}$	–	0,47	0,15	0,21
$\sigma^2_{\text{s}}$	–	2,5	0,51	0,70
$\sigma^2_{\text{gi}} / \sigma^2_{\text{s}}$	–	0,22	0,54	0,19
$\sigma^2_{\text{gj}} / \sigma^2_{\text{s}}$	–	0,19	0,29	0,3

\* – значимо при  $P < 0,05$ ; \*\* – значимо при  $P < 0,01$

Таблица 2

Дисперсионный анализ комбинационной способности раннеспелых родительских линий подсолнечника (схема скрещиваний  $5 \times 2$ )

Источник варьирования	Степени свободы	Урожай семян	Масличность семян	Урожай масла
Повторности	2	1,7	0,06	0,37
Гибриды	9	<b>20,5*</b>	<b>7,36**</b>	<b>6,16*</b>
Случайные отклонения	18	7,9	0,04	1,97
ОКС линий	4	<b>7,77*</b>	<b>1,71**</b>	<b>2,38*</b>
ОКС тестеров	1	4,76	<b>8,28**</b>	0,50
СКС	4	6,42	1,74**	2,12*
Случайные отклонения	18	2,65	0,01	0,66
Компоненты генотипической вариации				
$\sigma^2_{\text{gi}}$	–	0,68	-0,02	0,13
$\sigma^2_{\text{gj}}$	–	-0,33	1,3	-0,32
$\sigma^2_{\text{s}}$	–	3,8	1,73	1,46
$\sigma^2_{\text{gi}} / \sigma^2_{\text{s}}$	–	0,18	-0,01	0,09
$\sigma^2_{\text{gj}} / \sigma^2_{\text{s}}$	–	-0,09	0,75	-0,22

\* – значимо при  $P < 0,05$ ; \*\* – значимо при  $P < 0,01$

В селекции на раннеспелость гибридов представляют большой интерес линии, имеющие отрицательные значения ОКС по признаку «период всходы-цветение», поскольку существует положительная корреляция между количеством дней от всходов до цветения и длиной вегетационного периода растений подсолнечника в целом.

В табл. 3 представлены эффекты ОКС и вариантов СКС родительских линий по урожаю, масличности семян и урожаю масла с единицы площади, из которых видно, что 2 материнские

формы (M695(8)/07A, M753(3)/07A) и отцовская (M708/04Rf) имели положительные эффекты ОКС по исследуемым признакам. Высокой вариансой СКС по урожаю семян характеризовались линии M753(3)/07A и M387/08Rf, поэтому при определенном сочетании они могут давать высокоурожайные гибриды, что представляет интерес для селекции на гетерозис.

В скрещивании пяти материнских линий с двумя восстановителями высокие эффекты ОКС имела материнская форма M475(15)/07A (табл. 4).

Таблица 3

Оценка эффектов ОКС и вариантов СКС родительских линий подсолнечника по продуктивности гибридов F<sub>1</sub> (схема 6 × 3)

Материнские линии	Урожай семян		Масличность		Урожай масла	
	$\hat{g}$	$\sigma_s^2$	$\hat{g}$	$\sigma_s^2$	$\hat{g}$	$\sigma_s^2$
M621(6)/07A	-0,11	1,74	<b>0,82</b>	0,71	0,05	0,23
M633/1(5)/07A	-2,12	-1,20	<b>0,37</b>	0,13	-0,99	-0,28
M695(8)/07A	1,03	2,47	<b>0,24</b>	0,04	<b>0,48</b>	0,75
M697(6)/07A	-0,83	-0,54	-0,26	0,55	-0,42	-0,25
M709(6)/07A	-0,17	2,8	-1,16	0,40	-0,26	0,86
M753(3)/07A	2,20	11,53	0,004	0,74	<b>1,14</b>	3,20
Стандартная ошибка	2,9	1,7	0,21	0,10	1,4	0,4
M708/04Rf	<b>1,05</b>	1,14	<b>0,52</b>	0,28	<b>0,62</b>	0,20
M780/04Rf	-1,22	1,24	-0,45	0,40	-0,68	0,37
M387/08Rf	0,17	3,5	-0,7	0,35	0,07	1,03
Стандартная ошибка	1,9	1,8	0,13	0,001	0,9	0,2

Таблица 4

Оценка эффектов ОКС и вариантов СКС родительских линий подсолнечника по продуктивности гибридов F<sub>1</sub> (схема 5 × 2)

Материнские линии	Урожай семян		Масличность		Урожай масла	
	$\hat{g}$	$\sigma_s^2$	$\hat{g}$	$\sigma_s^2$	$\hat{g}$	$\sigma_s^2$
M597(7)/06A	-1,33	1,61	-0,55	3,86	-0,76	1,09
M599(15)/06A	-1,53	2,99	-0,90	0,38	-0,91	1,04
M475(15)/07A	<b>3,20</b>	<b>17,06</b>	<b>1,25</b>	<b>0,74</b>	<b>1,79</b>	<b>5,47</b>
M543/1(6)/07A	0,57	-0,28	-0,50	1,84	0,19	-0,20
M685(1)/07A	-0,91	-0,99	0,70	0,13	-0,32	-0,24
Стандартная ошибка	3,9	2,6	0,3	0,01	1,9	0,7
M442/08Rf	0,69	2,15	-0,91	0,87	0,22	0,79
M444/08Rf	-0,69	2,15	0,91	0,87	-0,22	0,79
Стандартная ошибка	2,20	1,06	0,1	0,001	1,1	0,3

Линия М543/1(6)/07А имела положительные эффекты ОКС и отрицательные варианты специфической комбинационной способности (СКС) по урожаю семян и урожаю масла. В то время как по масличности у этой линии отмечалась высокая вариация СКС. Ни у одной из отцовских линий не были отмечены положительные эффекты ОКС по всем учитывавшимся параметрам. Однако у восстановителя фертильности М442/08Rf оказалась положительной ОКС по урожаю семян и масла, а у линии М444/08Rf – по масличности семян.

При исследовании комбинационной способности линий подсолнечника представляет интерес выяснение характера их поведения в определенных комбинациях скрещивания. Оценка констант СКС отражает отклонение от ОКС родительских линий в результате специфического взаимодействия генов, т.е. насколько та или иная комбинация скрещивания лучше или хуже предполагаемой на основе ОКС.

Анализ констант СКС по совокупности анализируемых признаков, определяющих продуктивность гибридов, позволил выделить 5 лучших комбинаций скрещивания в пределах линии и между линиями.

Это комбинации скрещивания М709(6)/07А × М780/04Rf, М753(3)/07А × М387/08Rf, М475(15)/07А × М442/08Rf, М597(7)/06А × М444/08Rf и М599(15)/06А × М444/08Rf. Гибриды М695(8)/07А × М708/04Rf и М621(6)/07А × М780/04Rf имели высокие положительные константы СКС по урожаю семян и сбору масла.

Важным этапом в анализе полученных данных является установление взаимосвязи показателей гетерозиса у исследуемых гибридов с эффектами ОКС и вариансами СКС родительских линий.

Из данных табл. 5 видно, что гетерозис по урожаю семян у 14 гибридов был положительным и находился в пределах 4,2–135,4%.

Таблица 5

Эффекты гетерозиса ( $H_{F_1}$ ) по урожаю и масличности семян, а также конкурсный гетерозис ( $H_{S_1}$ ) по урожаю масла у гибридов  $F_1$  подсолнечника

Гибридные комбинации	Урожай семян, ц/га	$H_{F_1}$ , %	Масличность, %	$H_{F_1}$ , %	Урожай масла, ц/га	$H_{S_1}$ , %*
М621(6)/07А × М708/04Rf	15,2	<b>43,4</b>	53,5	17,3	7,8	-9,3
М633/1(5)/07А × М708/04Rf	15,3	-4,7	52,0	5,5	7,6	-11,6
М695(8)/07А × М708/04Rf	20,4	<b>10,3</b>	51,7	7,5	10,1	<b>17,4</b>
М697(6)/07А × М708/04Rf	17,3	<b>17,7</b>	50,8	4,3	8,4	-2,3
М709(6)/07А × М708/04Rf	17,0	0	50,6	12,4	8,3	-3,5
М753(3)/07А × М708/04Rf	17,7	<b>24,6</b>	51,7	6,6	8,8	<b>2,3</b>
М621(6)/07А × М780/04Rf	16,3	<b>53,8</b>	51,2	12,3	8,0	-7,0
М633/1(5)/07А × М780/04Rf	12,4	-22,5	50,8	3,0	5,9	-31,4
М695(8)/07А × М780/04Rf	15,5	-17,8	51,1	6,2	7,5	-12,8
М697(6)/07А × М780/04Rf	13,7	-6,8	51,3	5,3	6,7	-22,1
М709(6)/07А × М780/04Rf	16,7	-1,76	50,2	11,6	8,0	-7,0
М753(3)/07А × М780/04Rf	14,8	<b>4,2</b>	49,9	2,9	7,1	-17,4
М621(6)/07А × М387/08Rf	16,2	<b>52,8</b>	51,3	12,5	8,0	-7,0
М633/1(5)/07А × М387/08Rf	14,3	-10,6	51,9	5,3	7,1	-17,4
М695(8)/07А × М387/08Rf	15,7	-15,1	51,5	7,1	7,5	-12,8
М697(6)/07А × М387/08Rf	14,7	0	50,7	4,1	7,3	-15,1
М709(6)/07А × М387/08Rf	12,7	-25,3	49,3	9,6	6,6	-23,3
М753(3)/07А × М387/08Rf	22,6	<b>59,1</b>	52,0	7,2	11,3	<b>31,4</b>
М597(7)/06А × М442/08Rf	17,2	-9,9	49,5	8,6	8,2	-4,7
М599(15)/06А × М442/08Rf	17,7	<b>25,5</b>	50,1	7,7	8,1	-5,8

## Продолжение табл. 5

Гибридные комбинации	Урожай семян, ц/га	$H_{F_1}$ , %	Масличность, %	$H_{F_1}$ , %	Урожай масла, ц/га	$H_{SI}$ , %*
M475(15)/07A × M442/08Rf	25,9	<b>135,4</b>	53,3	13,4	12,3	<b>54,7</b>
M543/1(6)/07A × M442/08Rf	19,6	-9,3	51,9	15,3	9,8	<b>14,0</b>
M685(1)/07A × M442/08Rf	19,0	<b>20,3</b>	52,4	9,2	9,6	<b>11,6</b>
M597(7)/06A × M444/08Rf	18,1	-5,2	54,1	18,6	9,4	<b>9,3</b>
M599(15)/06A × M444/08Rf	18,2	<b>29,1</b>	52,8	13,5	9,2	<b>7,0</b>
M475(15)/07A × M444/08Rf	18,5	<b>68,2</b>	53,9	14,7	9,4	<b>9,3</b>
M543/1(6)/07A × M444/08Rf	19,5	-9,7	51,8	15,1	9,7	<b>12,8</b>
M685(1)/07A × M444/08Rf	17,2	<b>8,9</b>	53,7	11,9	8,9	<b>3,5</b>
Стандарт F <sub>1</sub> Фермер	19,3	–	50,2	–	8,6	–

\* – отклонение от стандарта F<sub>1</sub> Фермер

По масличности семян гетерозис был положительным у всех комбинаций скрещивания и составлял 2,9–18,6%. «Конкурсный гетерозис» (превышение по отношению к стандарту) был положительным по всем трем признакам у гибридов M475(15)/07A × M442/08Rf, M543/1(6)/07A × M442/08Rf, M543/1(6)/07A × M444/08Rf, M695(8)/07A × M708/04Rf и M753(3)/07A × M387/08Rf. Урожай семян у лучших гибридов находился в пределах 20,4–25,9 ц/га, а масличность – 50,7–53,9%. По урожаю масла отклонение от стандарта у них составляло 12,8–54,7%. Материнские линии данных гибридов характеризовались или высокими эффектами ОКС обоих родителей, или высокими вариансами СКС одного из родителей. Все гибриды, полученные с участием отцовских линий-восстановителей фертильности пыльцы M442/08Rf и M444/08Rf, за исключением комбинаций скрещивания M597(7)/06A × M442/08Rf и M599(15)/06A × M442/08Rf, были выше по урожаю масла, по сравнению со стандартом.

Гибридная комбинация M475(15)/07A × M442/08Rf, полученная в процессе исследования, успешно прошла государственное сортоиспытание в 2015 году.

### Заключение

Таким образом, оценка комбинационной способности некоторых родительских форм позволила выделить материнские линии M695(8)/07A, M753(3)/07A, M475(15)/07A, M543/1(6)/07A, и отцовскую M708/04Rf, характеризующиеся высокими положительными

эффектами ОКС по урожаю, масличности семян и урожаю масла. Отцовские линии – M387/08Rf, M442/08Rf и M444/08Rf – с высокой вариансой СКС. У гибридов, полученных с участием указанных линий, превышение по сбору масла с единицы площади, по сравнению со стандартом, было разным, в зависимости от комбинации скрещивания, и составляло 3,5–54,7%. Урожай семян у лучших гибридов находился в пределах 20,4–25,9 ц/га, а масличность – 50,7–53,9%.

Гибрид подсолнечника F<sub>1</sub> Белорусский ранний (M475(15)/07A × M442/08Rf) был районирован в Беларуси и стал стандартом для ультраранней группы спелости на госсортоучастках и станциях страны.

### Список использованных источников

1. Fick, G.N. Sunflower breeding / G.N. Fick, J.F. Miller // Sunflower technology and production. Agronomy 35. – USA, Madison. – 1997. – P. 809–824.
2. Биология, селекция и возделывание подсолнечника / О.И. Тихонов [и др.]. – М.: Агропромиздат. – 1991. – 285 с.
3. Griffing, G.B. A generalized treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance / G.B. Griffing // Heredity. – 1956, № 10. – P.31–50.
4. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability / R.E. Comstock [et al.] // Agron. J. – 1949. – Vol. 41. – P. 360–367.
5. Kempthorne, O. An introduction of genetic statistics / O. Kempthorne. – N.-Y., 1957. – 545 p.

6. Турбин, Н.В. О принципах и методах селекции растений на комбинационную способность / Н.В. Турбин, Л.В. Хотылева // Гетерозис. – Минск, 1961. – С. 59–110.
7. Изменчивость эффекта гетерозиса у диаллельных гибридов кукурузы в различных условиях среды / Л.А. Тарутина [и др.] // Изменчивость и отбор. – Минск: Наука и техника. – 1980. – С. 20–28.
8. Пимахин, В.Ф. Методы и результаты селекции подсолнечника в Поволжье: автореф. дис. ... д-ра. с.-х. наук: 06.01.05 / В.Ф. Пимахин, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока. – Саратов, 2000. – 66 с.
9. Бурлов, В.В. Изучение реакций самоопыленных линий и сортов-популяций подсолнечника на ЦМС / В.В. Бурлов, С.В. Костюк // Научн.-техн. бюлл. ВСГИ. – Одесса. – 1979. – № 23. – С. 18–22.
10. Hanson, M.R. Plant organelle gene expression: altered by RNA editing / M.R. Hanson, C.A. Sutton, B. Lu // Trends Plant Sci. – 1997, № 1. – P. 57–64.
11. Havey, M.J. Molecular confirmation that sterile cytoplasm has been introduced into open-pollinated grano onion cultivars / M.J. Havey, O.H. Bark // J. Am. Soc. Hort. – 1994. – Vol. 119. – P. 90–93.
12. Horn, R. Molecular diversity of male sterility inducing and male-fertile cytoplasm in the genus *Helianthus* / R. Horn // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol. 104. – P. 562–570.

**O.P. Shatarnov, T.M. Shatarnova, T.A. Silkova, N.S. Fomchenko, O.G. Davydenko**

## **EFFECT OF COMBINING ABILITY OF PARENTAL LINES ON PRODUCTIVITY INDICATORS OF SUNFLOWER HYBRIDS (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)**

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus  
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

Here we report the data on evaluation of agronomic traits in 100 sunflower  $F_1$  hybrids developed on the basis of self-pollinated lines of Belarusian breeding. Seed yield of the best  $F_1$  hybrids was 2.0–2.6 t/ha, oil content – 50,7–53,9%. GCA and SCA effects of parental lines and heterosis effect of  $F_1$  hybrids have been evaluated for 3 parameters. Maternal lines: M695(8)/07A, M753(3)/07A, M475(15)/07A, M543/1(6)/07A with high positive effects of GCA on yield, oil content and oil yield were obtained. The high variances of SCA were demonstrated for M387/08Rf, M442/08Rf and M444/08Rf paternal line. The early-ripening interlinear  $F_1$  hybrid “Belorusski ranni” (M475(15)/07A × M442/08Rf) has been registered in 2015 for Brest, Grodno, Gomel and Minsk regions of Belarus.

**Key words:** hybrid sunflower, cytoplasmic male sterility, inbred lines, general and specific combining ability.

*Дата поступления статьи 26 февраля 2016 г.*

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ (*FRAGARIA ANANASSA*) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: olga.mezhnina@gmail.com

Для успешной реализации селекционных программ большое значение имеет идентификация генотипов, как сортов, так и гибридов и исходных форм. Сорты земляники садовой имеют значительное внешнее сходство, что затрудняет их идентификацию по фенотипическим признакам. В связи с этим, все большее значение приобретает разработка эффективных и надежных методов оценки генетического разнообразия сортов с использованием молекулярных маркеров.

Молекулярное исследование геномов сортов земляники садовой, выращиваемых в Беларуси, показало, что они характеризуются невысоким генетическим разнообразием. SSR-анализ выявил тесную генетическую связь изученных сортов селекции Беларуси, России, Германии, Польши и других стран. Предложен набор 8 SSR-маркеров, обладающий достаточной степенью информативности для идентификации сортов земляники садовой отечественной и зарубежной селекции, выращиваемых в Беларуси. Анализ по 8 SSR-маркерам позволил выявить 72 различных генотипа, 86 аллелей, в среднем 11 аллелей на маркер.

**Ключевые слова:** земляника садовая, генетическое разнообразие, SSR-маркеры, ДНК-типирование.

### Введение

Земляника (*Fragaria* L.) – род многолетних травянистых растений семейства розовых (Rosaceae Juss., надпорядок Rosanae). Род *Fragaria* характеризуется базовым числом хромосом  $n=7$  и четко выраженным полиплоидным рядом: 13 диплоидов ( $2n$ ), 5 тетраплоидов ( $4n$ ), 1 гексаплоид ( $6n$ ), 6 октоплоидов ( $8n$ ) [1] и 1 декаплоид ( $10n$ ) [2]. Вид *F. iturupensis* изначально был описан как октоплоид [1], позднее были выявлены его декаплоидные формы [2]. Таким образом, в настоящее время данный вид является единственным декаплоидом рода *Fragaria* L.

Самым распространенным культивируемым видом является земляника садовая (*Fragaria* × *ananassa*), относящаяся к октоплоидам ( $2n=8x=56$ ). Размер ее генома составляет 708–720 Мб [3]. По данным ФАО, мировое производство земляники садовой за последние годы увеличилось и составляет более 59% валового производства всех ягод. Интенсификация ягодоводства требует использования новых сортов, отвечающих возрастающим современным требованиям, среди которых скороплодность и высокая урожайность, отзывчивость на агротехнику, устойчивость к вредителям и болезням, пригодность для механизированного возделывания и уборки урожая, высокие товарные и

технологические качества ягод. Для успешной реализации селекционных программ большое значение имеет идентификация генотипов, как сортов, так и гибридов и исходных форм. Сорты земляники имеют значительное внешнее сходство, что затрудняет их идентификацию по фенотипическим признакам. В связи с этим все большее значение приобретает разработка эффективных и надежных методов оценки генетического разнообразия сортов с использованием молекулярных маркеров.

Для изучения генетического разнообразия земляники садовой исследователями разных стран были предложены несколько вариантов молекулярных маркеров: RAPD [4, 5, 6], AFLP [7], ISSR [8]. В 2000 году на основе данных, полученных с помощью RAPD-анализа, в суде была подтверждена сортовая принадлежность линий земляники садовой и защищены права селекционеров [9]. Однако каждая из перечисленных систем идентификации с неспецифическими праймерами имеет определенные проблемы с воспроизводимостью в различных лабораториях. Этому недостатка лишены SSR-маркеры. Результаты, полученные с их помощью, легко интерпретируются и воспроизводятся. Помимо этого, микросателлитные маркеры наследуются по кодоминантному принци-

пу и поэтому получили широкое применение для картирования генома и анализа генетической структуры популяции [10]. Первые работы в данном направлении проводились Sargent с сотрудниками, которые в 2003 году разработали и охарактеризовали набор SSR-маркеров для *Fragaria viridis*, диплоидного представителя рода *Fragaria* L. [11]. Позже эта же группа исследователей разработала генетическую карту для межвидового гибрида от скрещивания *F. vesca* × *F. nubicola*. В данном исследовании было картировано 78 маркеров, среди которых 68 SSR-маркеров [12].

В 2008 году Govan с сотрудниками разработали сет из 10 пар SSR-маркеров, характеризующихся высокой воспроизводимостью и информативностью. В исследовании этих авторов было охарактеризовано 60 различных генотипов земляники садовой селекции США, Канады, Японии, Германии, Англии и других европейских стран [13]. Дальнейшее изучение Brunings с сотрудниками генетического разнообразия элитных линий земляники садовой с использованием данного набора маркеров показало значительное снижение аллельного разнообразия селекционных линий по сравнению с родительскими формами [14]. В 2009 году Gil-Agiza с сотрудниками исследовали 92 сорта земляники садовой и показали, что сорта земляники, культивируемые в промышленных масштабах, обладают значительным генетическим сходством. Несмотря на это, данный метод позволил достоверно различить каждый сорт, а также выявить 3 основные группы в рамках исследуемой выборки [15].

В последние годы активно ведутся работы,

направленные на изучение генетического разнообразия земляники садовой, а также поиск ген-ассоциированных маркеров для селекции по хозяйственно-ценным признакам.

Однако к настоящему времени не существует универсальной методики ДНК-идентификации земляники садовой, на молекулярном уровне изучено ограниченное количество сортов. Сорта белорусской селекции остаются неисследованными. Не изучено, каким генетическим потенциалом они обладают, и какие наборы маркеров эффективны для их идентификации. В связи с этим, данное исследование направлено на изучение генетического потенциала сортов земляники садовой, культивируемых в Республике Беларусь, и выявление сета маркеров для их идентификации.

## Материалы и методы

Объектом исследования служили сорта земляники садовой, возделываемой в Республике Беларусь. Материал предоставлен РУП «Институт плодоводства» (Самохваловичи). Выделение тотальной ДНК из фрагмента листа отдельного растения осуществляли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва), согласно методике производителя. Для анализа полиморфизма по SSR-маркерам использовали мультиплексную ПЦР, позволяющую проводить реакцию одновременно для 4 пар праймеров в одной микропробирке. Каждая пара имела специфическую флуоресцентную метку (FAM, R6G, TAMRA, ROX). В исследовании использовали SSR-маркеры, специфичные для геномов *F. vesca* [16] и *F. nubicola* [12]. Названия праймеров приведены в табл. 1. Праймеры синтезированы компанией Праймтех (Беларусь).

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, длина и количество аллелей SSR-локусов в геноме *Fragaria*

Локус	Последовательность праймера	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер фрагментов, п.н.
FG7ab	F GCAGTGCTACATCGACTCAGGTCCAA R ACCAAGGAAGTGCCGAAGTGGGTTT	TCAAATAG	7	136–181
FG7cd	F AGGTGTCCAAAGAGGGTTGCTGTAGA R TCCCTCTCCCAATAACCCCTTTGCTTC	TAGGGA	8	228–312
FG2ab	F TGAAGTGGTCCATCGGTGCTGAAA R TGATCACACAATACGCATTACCAAGCCT	TATG	9	316–374
UFFa3-D11	F GCCTTGATGTCTCGTTGAGTAG R TACCTTCTGCATTACCATGAC	AGA	12	181–219

## Продолжение табл. 1

Локус	Последовательность праймера	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер фрагментов, п.н.
EMFn002	F GGAACCCCAAATACCAACTTT R AAAGCCTGAAGTTGTTCAATAAA	(AC)6	1	247
FxaH-GA02P13	F CCAGGCGCTTGGTCTTGTACTACT R CCCATTTCCCCCAAATCTAACAAT	–	–	–
Fx-aAGA21F11	F CAATTACAATGGCTGATGACGAT R GCACTCAGACATATTTTGGGAGGG	–	–	–
ChFaM23	F AGGAGAAGACCGGCTGTGTA R TGCCTATAGCTGTGGCTGTG	(GA)14	–	–
EMFn017	F TTTTCAAATGTTACCCCATCC R CTA AAAATCCCCCAAATTGTGA	(TC)14	–	–
EMFn034	F GCCTCAAAGATCACTCATTTCC R TCTTCATCTCTTCAACCTCAA	(AG)5	–	–
FG2cd	F GGTCACCAACAACACTCACAGATGGT R TCATACTACCACCATGAGGAGCAA	TTTG	7	387–427
EMFvi136	F GAGCCTGCTACGCTTTTCTATG R CCTCTGATTCGATGATTTGCT	(TC)11	16	121–265
EMFn121	F GGTCCCTAAGTCCATCATGC R GAGTGGATGCAAACATGAGC	(GT)12...(GA)9	15	217–265
EMFn170	F CAGTTTGCCCAACAACAAGG R TTGATGGCAACAATCACG	(CT)9	12	194–240

Состав реакционной смеси, конечным объемом 20 мкл, был следующий: 1×ПЦР буфер с  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 200 мкМ смеси dNTP, по 0,2 мкМ каждого из праймеров, 20–50 нг ДНК и 1 ед. Таq-полимеразы (Thermo scientific, Литва). Реакцию ПЦР проводили по следующей программе: 1 цикл продолжительностью 4 мин при 94 °С; 40 циклов, включающих: 40 с при 94 °С, 1 мин при 58 °С, 1 мин при 72 °С; заключительная элонгация – 7 мин при 72 °С.

Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы GeneMapper® Software v4.1 относительно стандартных образцов ДНК известной длины. В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 (Синтол, Россия).

Дискриминационная сила маркера (PD – Power of Discrimination) была рассчитана по формуле:

$$PD = 1 - \sum(g_i)^2$$

где  $g_i$  – частота встречаемости  $i$ -ого генотипа [16].

Дендрограмма генетического сходства сортов земляники садовой была получена с помощью программы Treemap методом UPGMA, основываясь на коэффициенте генетического сходства Nei и Li [18, 19].

### Результаты и обсуждение

Для анализа генетического разнообразия земляники садовой, выращиваемой в Республике Беларусь, была сформирована коллекция образцов, включающая различные сорта. В ней представлены как сорта белорусской селекции, так и сорта селекции России, Германии, Польши и других стран из коллекции РУП «Институт плодородия», Самохваловичи.

Для оценки генетического разнообразия 72 сортов земляники садовой было привлечено 14 SSR-маркеров. Для каждого маркера определялась длина аллелей и количество полиморфных фрагментов у каждого сорта. Не все рассматриваемые маркеры оказались полиморфны. Маркер EMF002 выявил только 1 аллель. Маркеры ChFaM23, EMFn017, FxaHGA02P13, EMFn034 и FxaAGA21F11 не показали четких воспроизводимых результа-

тов. При анализе продуктов амплификации с данными маркерами было выявлено большее число аллелей, чем количество возможных вариантов для октоплоидных организмов. Вероятно, это связано с тем, что для данных маркеров существует несколько возможных сайтов связывания в геноме земляники садовой. Было принято решение исключить их из дальнейшего исследования.

Маркеры FG7ab, FG7cd, FG2ab, UFFa3-D11, FG2cd, EMFvi136, EMFn121 и EMFn170 показали стабильно воспроизводимые результаты.

При этом количество аллелей, идентифицированных у сортов *F. ananassa* с их помощью, различалось. Наименее полиморфными оказались маркеры FG7ab и FG2cd. Количество обнаруженных в них аллелей составило 7. С помощью маркеров FG7cd и FG2ab выявлено 8 и 9 аллелей соответственно. Маркеры EMFn170 и UFFa3-D11 выявили равное число аллелей – 12. Максимальное количество аллелей было выявлено в локусах, ограниченных маркерами EMFvi136 и EMFn121 – 16 и 15 соответственно (табл. 1, 2).

Таблица 2

Количество и длина SSR-аллелей в геноме *Fragaria × ananassa*

Маркер	Детектируемые SSR-аллели в геноме земляники садовой, п.н.	PD
FG7ab	136, 148, 155, 164, 166, 173, 181	0,76
FG7cd	228, 240, 249, 257, 294, 299, 306, 312	0,82
FG2ab	316, 320, 322, 328, 334, 338, 342, 362, 374	0,83
UFFa3-D11	181, 186, 193, 196, 199, 201, 205, 207, 211, 215, 217, 219	0,87
FG2cd	387, 393, 399, 405, 419, 423, 427	0,71
EMFvi136	121, 129, 135, 137, 141, 143, 147, 149, 157, 159, 161, 163, 167, 169, 173, 181	0,91
EMFn121	217, 225, 229, 233, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 253, 255, 257, 265	0,89
EMFn170	194, 200, 204, 206, 208, 212, 218, 220, 228, 230, 234, 240	0,88

Частота распространения аллелей в изученных локусах представлена на рис. 1. Так, в локусе FG7ab с наибольшей частотой встречались аллели 136 п.н. (0,32), 148 п.н. (0,27). Частота встречаемости других аллелей составила от 0,01 до 0,2. В локусе FG7cd с одинаковой частотой (0,24) встречались аллели 240 п.н. и 249 п.н., аллель 257 п.н. встречался с частотой 0,28. Частота встречаемости остальных аллелей составила от 0,01 до 0,07. В локусе EMFn121 с наибольшей вероятностью встречались аллели 239 п.н. (0,17), 249 п.н. (0,14),

255 п.н. (0,18). Аллели 229 п.н. и 233 п.н. встречались с одинаковой частотой 0,1. Остальные аллели встречались с частотой от 0,01 (217, 225, 237, 257 п.н.) до 0,06 (245 п.н.).

С помощью данного набора маркеров были составлены уникальные генетические паспорта для сортов земляники садовой, выращиваемой в Беларуси. Пример генетического паспорта сорта Красный берег представлен в табл. 3. Система регистрации генотипов в виде паспорта отражает состав аллелей в локусах микросателлитных последовательностей.

Таблица 3

Молекулярно-генетический паспорт земляники садовой Красный берег

Праймер	Детектируемые SSR-аллели в геноме сорта земляники садовой Красный берег, п.н.
FG7ab	136, 148, 164
FG7cd	240, 249, 257, 306
FG2ab	316, 322, 334, 342
UFFa3-D11	193, 196, 199, 205, 207, 215
FG2cd	399, 419
EMFvi136	137, 141, 159, 161, 167

Продолжение табл. 3

Праймер	Детектируемые SSR-аллели в геноме сорта земляники садовой Красный берег, п.н.
EMFn121	233, 239, 253, 255
EMFn170	194, 200, 204, 208, 228, 240

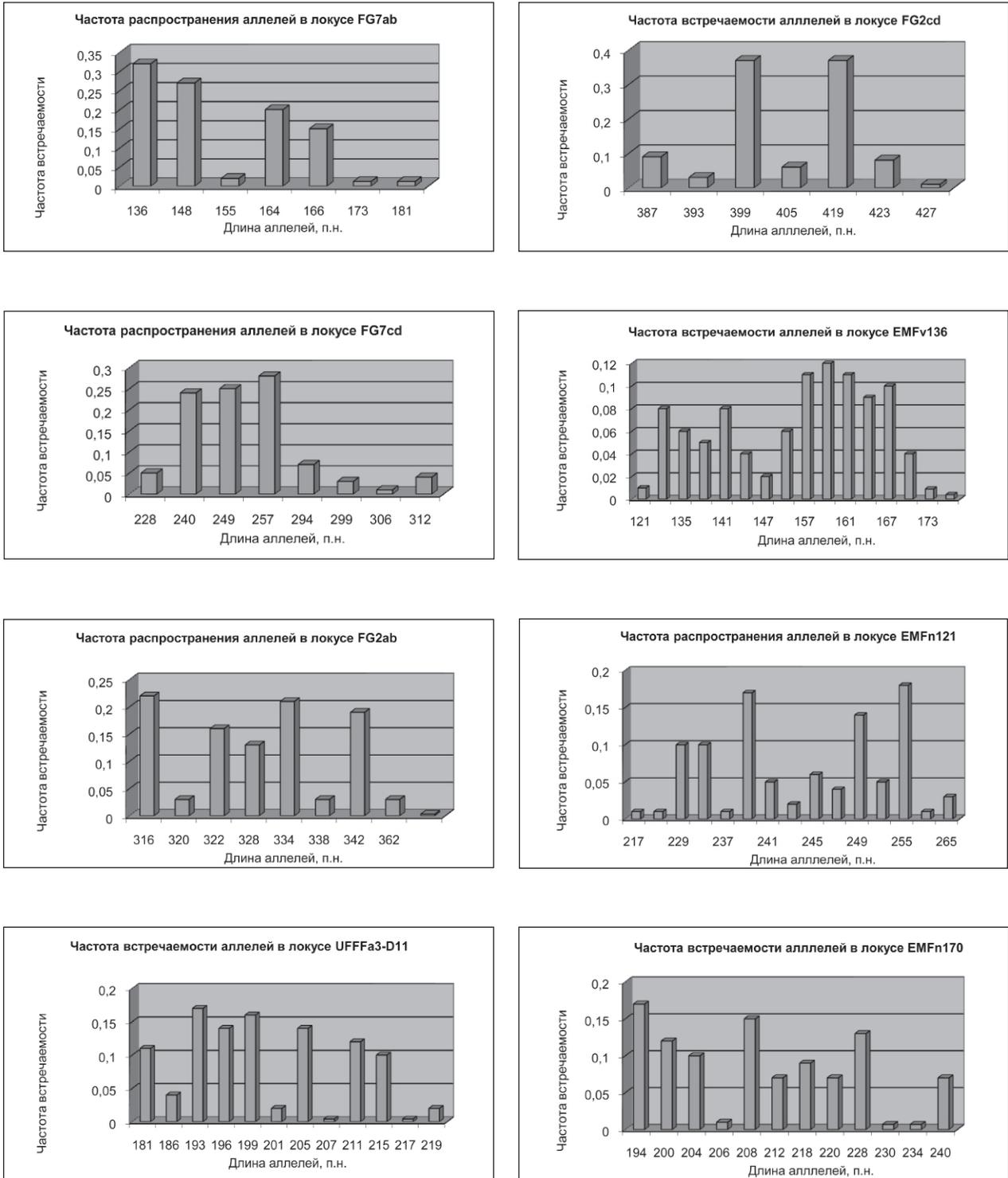
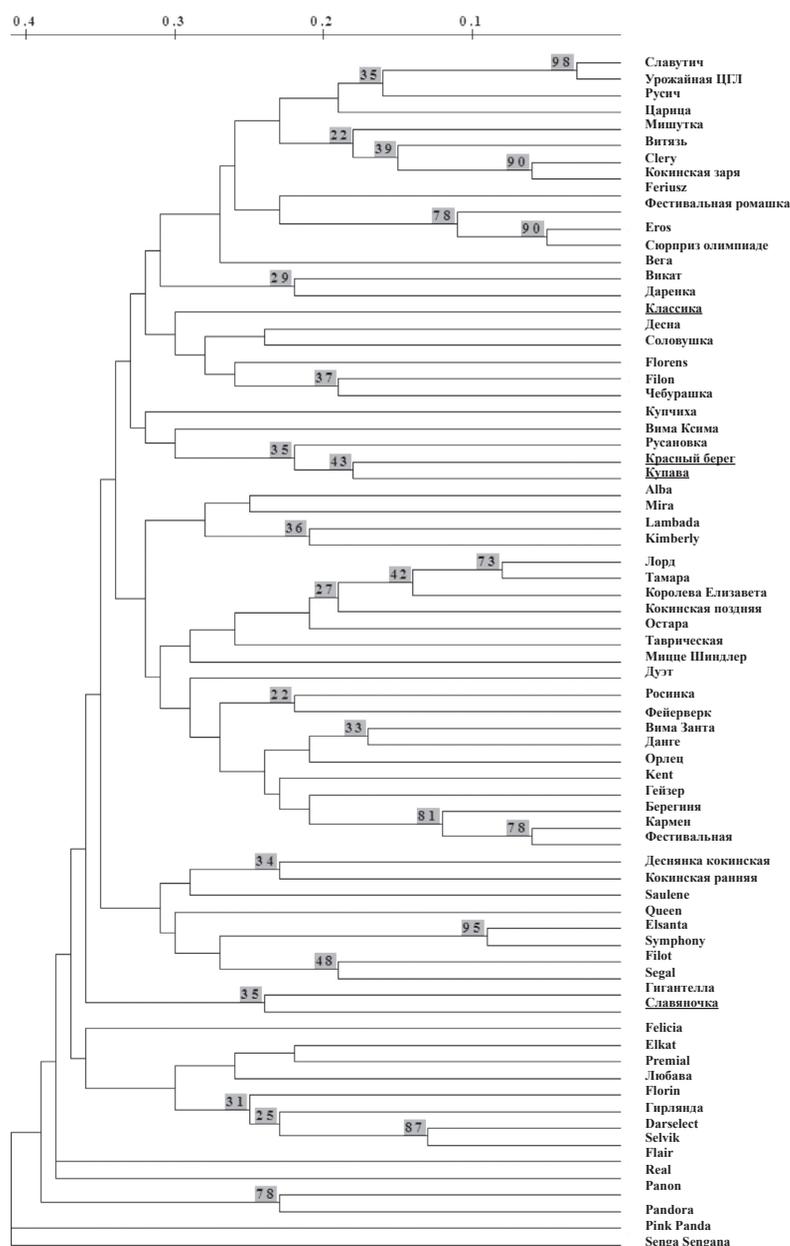


Рис. 1. Диаграмма распределения частот встречаемости аллелей в исследованных локусах

В связи с тем, что земляника садовая является октоплоидом, при исследовании ее генома нельзя использовать ряд показателей (например, индекс информативности (PIC), маркерный индекс (MI)), успешно применяемых для характеристики диплоидных видов. Поэтому в представленном исследовании каждый маркер был оценен с помощью такого показателя, как дискриминационная сила маркера (PD). Данные представлены в табл. 2. Значение PD, рассчитанное для каждого локуса, колебалось от 0,71 для локуса FG2cd до 0,91 для локуса EMFvi136. Среднее

значение PD для 8 SSR-локусов составило 0,83. Полученное значение дискриминационной силы маркера свидетельствует о достаточно высокой разрешающей способности данного набора маркеров. В общей сложности с применением 8 SSR-маркеров среди 72 сортов земляники садовой было выявлено 72 различных генотипа.

Данные о составе аллелей, выявляемых с помощью 8 SSR-маркеров, были использованы для построения дендрограммы филогенетического сходства сортов земляники садовой, результаты представлены на рис. 2.



**Рис. 2.** Дендрограмма генетического сходства образцов земляники, построенная на основе результатов SSR-анализа

Как видно из дендрограммы, сорта земляники садовой генетически разнородны и характеризуются уникальным составом аллелей, выявленным отобранными SSR-маркерами. Некоторые сорта, имеющие общую родословную, тесно связаны генетически. Например, генетическая близость наблюдается между сортами Elsanta и Symphony, в родословных которых имеется общий сорт Holiday. Сорта Panon и Pandora также генетически близки. Сорт Panon получен при скрещивании Pandora × Onebor. На наибольшем генетическом расстоянии расположены сорта Pink Panda и Senga Sengana. Сорт Pink Panda является межвидовым гибридом *Fragaria chiloensis* с *Potentilla palustris*, имеет значительные морфологические отличия от остальных сортов земляники садовой и чаще используется в декоративных целях. Сорт Senga Sengana получен при скрещивании сортов Markee × Sieger в 1954 году на территории Германии. Сорта, использованные при его создании, не встречались в родословной взятых для исследования образцов земляники садовой. Сорта белорусской селекции (на рис. 2 отмечены подчеркиванием) не образуют отдельного кластера и генетически тесно связаны с сортами иностранной селекции. Полученные результаты, как и результаты исследований Brunings [14] и Gil-Ariza [15], показывают, что сорта земляники садовой, культивируемые в промышленных масштабах, обладают значительным генетическим сходством.

Сорта культур, обладающих низким генетическим разнообразием, требуют большего количества маркеров для того, чтобы получить уникальную молекулярно-генетическую формулу. Так, количество маркеров, необходимых для ДНК-типирования пшеницы может достигать 24 [20]. Для идентификации плодовых культур, обладающих высоким генетическим разнообразием, достаточно набора из 6–9 маркеров [10]. По рекомендации Международного союза по охране новых сортов растений (UPOV) для генетической идентификации сортов земляники садовой предлагается использовать набор из 25 SSR-маркеров. Данный набор маркеров при исследовании выборки из 100 различных сортов позволил выявить 98 различных генотипов

и 188 аллелей, что составляет в среднем 8 аллелей на маркер. Такой набор маркеров может быть применен при проведении масштабных международных исследований, однако для практической деятельности по идентификации земляники садовой данный набор слишком усложнен и имеет высокую стоимость. В исследованиях Govan (2008) при изучении генетического разнообразия 60 представителей рода *Fragaria* с применением 10 SSR-маркеров было выявлено 166 аллелей [13]. В исследованиях Brunings при изучении выборки из 25 образцов при использовании тех же маркеров было обнаружено 74 аллеля [14]. В данном исследовании использовалась выборка из 72 сортов земляники садовой, которая при анализе по 8 SSR-маркерам позволила выявить 72 различных генотипа, 86 аллелей, в среднем 11 аллелей на маркер. Это свидетельствует о достаточно высоком полиморфизме отобранных SSR-маркеров. Предложенный набор маркеров достаточно информативен и позволяет идентифицировать сорта земляники садовой как белорусской, так и иностранной селекции, выращиваемые на территории Беларуси.

### Заключение

Молекулярное исследование геномов сортов земляники садовой, выращиваемых в Беларуси, показало, что они характеризуются невысоким генетическим разнообразием. SSR-анализ выявил тесную генетическую связь сортов селекции Беларуси, России, Германии, Польши и других стран. Предложен набор из 8 SSR-маркеров, обладающий достаточной степенью информативности для идентификации сортов земляники садовой отечественной и зарубежной селекции, выращиваемых в Беларуси. Анализ локусов микросателлитных последовательностей, выявляемых с помощью выбранных маркеров, позволил выявить 72 различных генотипа среди 72 сортов земляники садовой.

*Авторы выражают благодарность руководителю отдела ягодных культур Михайловой Алле Михайловне (ПУП «Институт плодородия», Самохваловичи) за предоставленный сортовой материал земляники садовой.*

### Список использованных источников

1. Staudt, G. Strawberry biogeography, genetics and systematics / G. Staudt // *Acta Hort.* – 2009. – Vol. 842. – P. 71–84.
2. Hummer, K.E. Strawberry genomics: botanical history, cultivation, traditional breeding and new technologies / K.E. Hummer, J. Hancock // *Genetics and genomics of Rosaceae.* – 2009. – P. 413–436.
3. Akiyama, Y. Estimation of the nuclear DNA content of strawberries (*Fragaria* spp.) compared with *Arabidopsis thaliana* by using dual system flow cytometry / Y. Akiyama [et al.] // *Cytologia.* – 2001. – Vol. 66. – P. 431–436.
4. DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers / C. Degani [et al.] // *Euphytica.* – 1998. – Vol. 102, № 2. – P. 247–253.
5. Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina / M. Garcia [et al.] // *Plant Breed.* – 2002. – Vol. 122, № 1. – P. 76–80.
6. Hancock, J. Randomly amplified polymorphic DNAs in the cultivated strawberry *Fragaria* × *ananassa* / J. Hancock, P. Callow, D.V. Shaw // *J Am Soc Hortic Sci.* – 1994. – Vol. 119, № 4. – P. 862–864.
7. Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) using AFLP mapping / E. Lerceteau-Köhler [et al.] // *Theor Appl Genet.* – 2003. – Vol. 107. – P. 619–628.
8. Arnau, G. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification / G. Arnau, J. Lallemant, M. Bourgoin // *Euphytica.* – 2002. – Vol. 129. – P. 69–79.
9. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application / L. Congiu [et al.] // *Mol Ecol.* – 2000. – Vol. 9, № 2. – P. 229–232.
10. Урбанович, О.Ю. Молекулярные маркеры идентификации и генотипирования яблони и груши: метод. рекомендации / О.Ю. Урбанович; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск: Право и экономика, 2013. – 210 с.
11. Sargent, D. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry / D. Sargent, A. Hadonou, D. Simpson // *Mol Ecol Notes.* – 2003. – Vol. 3, № 4. – P. 550–552.
12. A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria* / D. Sargent [et al.] // *Theor Appl Genet.* – 2004. – Vol. 109, № 7. – P. 1385–1391.
13. A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F.* × *ananassa* cultivars / C. Govan [et al.] // *Mol Breed.* – 2008. – Vol. 22, № 4. – P. 649–661.
14. Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties / A.M. Brunings [et al.] // *Euphytica.* – 2010. – Vol. 173. – P. 63–75.
15. Impact of plant breeding on the genetic diversity of cultivated strawberry as revealed by expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers / D.J. Gil-Ariza [et al.] // *J Am Soc Hortic Sci.* – 2009. – Vol. 134, № 3. – P. 337–347.
16. A genome-enabled, high-throughput, and multiplexed fingerprinting platform for strawberry (*Fragaria* L.) / A. Chambers [et al.] // *Mol Breeding.* – 2013. – Vol. 31. – P. 615–629.
17. PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis / A.D. Kloosterman, B. Budowle, P. Daselaar // *Int. J. Leg. Med.* – 1993. – Vol. 105, № 257–264.
18. Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W.H. Li // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – Vol. 76. – P. 5269–5273.
19. Van de Peer, Y. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees / Y. Van de Peer, R. De Wachter // *Comput. Applic. Biosci.* – 1993. – Vol. 9. – P. 177–182.
20. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers / X.Q. Huang [et al.] // *Theor Appl Genet.* – 2002. – Vol. 105, № 5. – P. 699–707.

О.А. Mezhnina, O.Yu. Urbanovich

## IDENTIFICATION OF STRAWBERRY (*FRAGARIA ANANASSA*) USING SSR-MARKERS

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus  
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

For the successful implementation of breeding programs the identification of genotypes as cultivars, as hybrids and original forms has a great importance. Varieties of strawberry have significant phenotypic similarity which complicates their identification by phenotypic characteristics. Thereby it is increasingly important to develop efficient and reliable methods of varieties genetic diversity assessing by using molecular markers.

Molecular study of strawberry varieties genomes grown in Belarus showed that they are characterized by low genetic diversity. SSR-analysis showed a close genetic relationship of studied varieties in Belarus, Russia, Germany, Poland and other countries. We suggest the set of 8 SSR markers with sufficient degree of informative value for the identification of domestic and foreign selection strawberry varieties grown in Belarus. The analysis of 8 microsatellite sequences allowed identifying 72 different genotypes, 86 alleles, with an average of 11 alleles per marker.

**Key words:** strawberry, genetic diversity, SSR markers, DNA-typing.

*Дата поступления статьи 10 февраля 2016 г.*

Н.В. Савина, Н.В. Никитченко, Т.Д. Кужир, Р.И. Гончарова

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ДНК-ГЕЛИКАЗЫ: ВЛИЯНИЕ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: T.Kuzhir@igc.by

Изучено влияние гомозиготности по аллелям дикого типа в полиморфных локусах генов, кодирующих XPD- и CSB-геликазы, на продолжительность жизни. С этой целью проанализирован полиморфизм генов *ERCC2/XPD Asp312Asn* и *Lys751Gln*, *ERCC6/CSB Met1097Val* и *Gly399Asp* у 354 клинически здоровых жителей Беларуси от 31 до 94 лет. Обнаружено повышение с возрастом частоты гомозигот дикого типа *ERCC2/XPD Asp312Asp* и *Lys751Lys*, а также их комбинаций, которое особенно ярко проявлялось в группе старше 80 лет. Показано возрастание гомозиготности по аллелям дикого типа всех изученных локусов после 60 лет, что указывает на связь продолжительности жизни и долголетия с нормальным функционированием этих генов и их продуктов. При учете статуса курения общие закономерности в большей степени проявлялись в группе некурящих лиц.

**Ключевые слова:** ДНК-геликазы, репарация ДНК, окислительный стресс, продолжительность жизни.

### Введение

ДНК подвергается постоянным атакам экзогенных и эндогенных генотоксикантов, что ежедневно приводит к образованию не менее 200 000 модификаций [1, 2]. Часть из них, оставаясь unrepaired, трансформируется в мутации и перестройки хромосом, дестабилизирует геном и вносит вклад в старение клеток [3, 4]. Репарация ДНК поддерживает целостность и стабильность генома и обеспечивает выживаемость и устойчивость клеток к стрессовым воздействиям. На начальных этапах этого процесса важную функцию выполняют ДНК-геликазы, которые раскручивают двойную спираль ДНК, переводя ее в одноцепочечное состояние и открывая доступ к поврежденному сайту другим компонентам репарационной машины. Кроме того, ДНК-геликазы необходимы для метаболизма ДНК и РНК, участвуют в других матричных процессах (репликации, рекомбинации, транскрипции), обеспечивая их полноценность и точность [5, 6]. Имеется два суперсемейства геликаз (SF1 и SF2). К SF2 принадлежат ДНК-геликазы, инактивация которых наблюдается при генетически детерминированных синдромах преждевременного старения (Вернера, Блюма) или сегментарных прогериях [7]. В рамках данного исследования нас интересовали гены *ERCC2/XPD* и *ERCC6/CSB*, мутации в которых вызывают пигментную

ксеродерму и синдром Коккейна [8]. Известно, что синдром Коккейна отличается признаками ускоренного старения [9], тогда как пигментная ксеродерма характеризуется высоким риском канцерогенеза с преимущественным поражением глаз и кожи [10]. Тем не менее, обе болезни относятся к сегментарным прогериям [11] и манифестируют симптомы, перекрывающиеся с патологией старческого возраста [12].

Продукты этих генов (протеины XPD и CSB) обладают геликазной активностью и участвуют в эксцизионной репарации нуклеотидов (NER): глобальной и связанной с транскрипцией. Кроме основных функций, показано их взаимодействие с компонентами эксцизионной репарации оснований (BER) [13] и способность удалять повреждения, индуцированные окислительным стрессом [14, 15], который вносит существенный вклад в старение. Все перечисленное делает обоснованным изучение влияния на продолжительность жизни функционирования этих генов у гомозиготных носителей аллелей дикого типа. Эта проблема в связи с эксцизионной репарацией ДНК затрагивалась нами в предыдущих публикациях [16, 17]. В данной работе представлены результаты более детального исследования полиморфизма генов, ответственных за ДНК-геликазы, на репрезентативной выборке жителей Беларуси среднего, пожилого и старческого возраста.

## Материалы и методы

Группа обследования состояла из 354 клинически здоровых жителей Беларуси. В нее вошли здоровые индивидуумы, принимавшие участие в донорстве крови в РНПЦ трансфизиологии и медицинских биотехнологий (Минск), и люди пожилого возраста, наблюдающиеся на кафедре геронтологии и гериатрии БелМАПО. Основным условием для отбора участников исследования являлось отсутствие в анамнезе онкологической патологии и острых заболеваний либо хронических в стадии обострения. Забор биологического материала (периферической венозной крови) проводился сотрудниками медицинских учреждений после подписания волонтерами информированного согласия. Всем участникам гарантировалась конфиденциальность сведений личного характера. Стерильно взятые образцы цельной крови в количестве 3–5 мл хранились в вакуутайнерах с распыленным ЭДТА при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до начала молекулярно-генетических исследований.

Объект исследования – геномная ДНК, выделенная из образцов цельной венозной крови стандартным фенол-хлороформным методом.

Анализ полиморфизма генов репарации ДНК *ERCC2/XPD* (rs1799793, rs13181) и *ERCC6/CSB* (rs2228526, rs2228528) проводили с помощью полимеразной цепной реакции с определением длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ-метод). Праймеры, условия ПЦР, рестрикционные эндонуклеазы и фрагменты ДНК, соответствующие определенным генотипам, подробно описаны ранее [18, 19].

Для статистической обработки данных использован пакет стандартных программ Excel 2000 и Statistica 6. Существенные различия в частотах тех или иных генотипов/аллелей, так же как и других альтернативных показателей, подтверждали с помощью критерия  $\chi^2$ , тогда как различия по количественным признакам определяли по критерию *t* Стьюдента. Для установления связи между параметрами применяли корреляционный анализ, для чего вычисляли средние частоты комбинаций гомозигот дикого типа для каждого возраста всей исследованной популяции или внутри подгрупп старше 60, 70 и 80 лет.

## Результаты и обсуждение

*Влияние полиморфизма генов ERCC2/XPD и ERCC6/SCB на продолжительность жизни.* В этом исследовании использованы образцы ДНК от клинически здоровых лиц в возрасте от 31 года до 94 лет. Проанализирован полиморфизм генов эксцизионной репарации *ERCC2/XPD* в кодонах 312 и 751 и *ERCC6/CSB* – в кодонах 1097 и 399 в зависимости от возраста обследуемых. Данные по полиморфизму этих генов во всей популяции и подгруппах, альтернативных по возрасту, представлены в табл. 1.

Благодаря этому сравнению, установлены статистически значимые различия по распределению вариантов гена *ERCC6 Gly399Asp*. При этом частота аллеля дикого типа увеличивалась в подгруппе лиц старше 80 лет относительно среднего возраста, тогда как частота минорного аллеля *ERCC6 399Asp* уменьшалась. Других статистически подтвержденных различий между группами не обнаружено.

Следует отметить, что этот подход имеет некоторые ограничения. Сопоставление результатов генотипирования в альтернативных по возрасту группах необязательно выявит существенные различия между ними, поскольку среди людей среднего возраста могут оказаться в будущем как долгожители, так и не дожившие до глубокой старости. Более информативным представляется корреляционный анализ, позволяющий проследить за изменениями в распределении генотипов по отдельным генам и их комбинациям в зависимости от возраста в группах пожилых людей (после 60 лет) и старческого возраста (после 80 лет) по сравнению со всей обследованной популяцией.

Корреляционный анализ выявил тенденцию к повышению с возрастом частоты встречаемости гомозигот дикого типа по гену *ERCC6 Gly399Asp* (rs2228528) у клинически здоровых лиц от 40 до 94 лет:  $r = 0,25$  при  $P = 0,077$ . Гомозиготы дикого типа по другому локусу *ERCC6 Met1097Val* (rs2228526) встречались примерно с одинаковой частотой у лиц разного возраста, что в принципе соответствовало данным табл. 1.

Статистически подтверждена зависимость от возраста частоты встречаемости гомозигот дикого типа по отдельным полиморфным локусам гена *XPD* (rs1799793 и rs13181)

в популяции, включающей клинически здоровых индивидуумов от 40 до 94 лет:  $r = 0,47$  при  $P = 0,0005$  для генотипа *XPD Asp312Asp* и  $r = 0,40$  при  $P = 0,0036$  – для генотипа *XPD Lys751Lys*. Коэффициенты корреляции увеличи-

вались в подгруппе старше 80 лет ( $r = 0,65$  при  $P = 0,016$  и  $r = 0,62$  при  $P = 0,024$ , соответственно), указывая на достаточно сильную связь между этими параметрами у людей старческого возраста и долгожителей.

Таблица 1

Распределение аллельных вариантов генов *ERCC2/XPD* и *ERCC6/CSB* в исследованной популяции жителей Беларуси

Генотипы/аллели	Альтернативные по возрасту группы		
	Вся популяция 31–94 г.: n (%)	31–50 лет: n, (%)	80–94 года: n, (%)
<b><i>ERCC2/XPD Asp312Asn</i></b> (rs1799793)	n = 354	n = 43	n = 74
Asp/Asp	125 (35,3)	14 (32,6)	30 (40,5)
Asp/Asn	160 (45,2)	20 (46,5)	30 (40,5)
Asn/Asn	69 (19,5)	9 (20,9)	14 (19,0)
Asp	410 (57,9)	48 (55,8)	90 (60,8)
Asn	298 (42,1)	38 (44,2)	58 (39,2)
<b><i>ERCC2/XPD Lys751Gln</i></b> (rs13181)	n = 354	n = 43	n = 74
Lys/Lys	130 (36,7)	16 (37,2)	28 (37,8)
Lys/Gln	154 (43,5)	21 (48,8)	33 (44,6)
Gln/Gln	70 (19,8)	6 (14,0)	13 (17,6)
Lys	414 (58,5)	53 (61,6)	89 (60,1)
Gln	294 (41,5)	33 (38,4)	59 (39,9)
<b><i>ERCC6/CSB Met1097Val</i></b> (rs2228526)	n = 354	n = 43	n = 74
Met/Met	176 (49,7)	19 (44,2)	33 (44,6)
Met/Val	148 (41,8)	18 (41,9)	36 (49,6)
Val/Val	30 (8,5)	6 (13,9)	5 (6,8)
Met	500 (70,6)	56 (65,1)	102 (68,9)
Val	208 (29,4)	30 (34,9)	46 (31,1)
<b><i>ERCC6/CSB Gly399Asp</i></b> (rs2228528)	n = 354	n = 43	n = 74
Gly/Gly	251 (70,9)	24 (55,8)	58 (78,4) <sup>1</sup>
Gly/Asp	98 (27,7)	18 (41,9)	15 (20,3) <sup>2</sup>
Asp/Asp	5 (1,4)	1 (2,3)	1 (1,3)
Gly	600 (84,7)	66 (76,7)	131 (88,5) <sup>3</sup>
Asp	108 (15,3)	20 (23,3)	17 (11,5) <sup>3</sup>

Примечание. Статистически значимые различия между альтернативными группами при  $P = 0,01^1$ ;  $0,012^2$ ;  $0,017^3$

Представлял интерес анализ распределения по возрасту комбинаций аллелей дикого типа в гомозиготном состоянии. Рис. 1 демонстрирует корреляцию между частотой встречаемости таких комбинаций по гену

*ERCC2/XPD* и возрастом обследованных лиц старше 40 лет ( $r = 0,40$  при  $P = 0,0036$ ). Эта зависимость существенно усиливалась после 80 лет ( $r = 0,62$  при  $P = 0,027$ ). Корреляция между частотами комбинаций го-

мозигот дикого типа по гену *ERCC6/CSB* и возрастом обследованных отсутствовала. Однако частоты комбинаций гомозигот дикого типа по всем исследованным локусам повышались с увеличением возраста, корреляция между этими параметрами становилась статистически значимой после 60 лет (рис. 2).

Таким образом, применение двух подходов, а именно сравнения распределения генотипов в альтернативных по возрасту группах (31–50 лет и 80–94 года) и корреляционного анализа взаимосвязи с возрастом частоты гомозигот по аллелям дикого типа, выявило следующие закономерности:

1) Наблюдались существенные различия между альтернативными по возрасту группами по гену *ERCC6/CSB* Gly399Asp.

2) Корреляционный анализ показал существенное повышение с возрастом частоты гомозигот дикого типа *ERCC2/XPD* 312 Asp/Asp и *ERCC2/XPD* 751 Lys/Lys, которое наблюдалось во всей исследованной популяции, начиная с 40 лет, но особенно заметно – в группе старческого возраста. Гомозиготность по нормальным аллелям всех изученных локусов увеличивалась с возрастом в группе лиц старше 60 лет. Показательно, что этот комплексный генотип выявлен у единственного 94-летнего долгожителя.

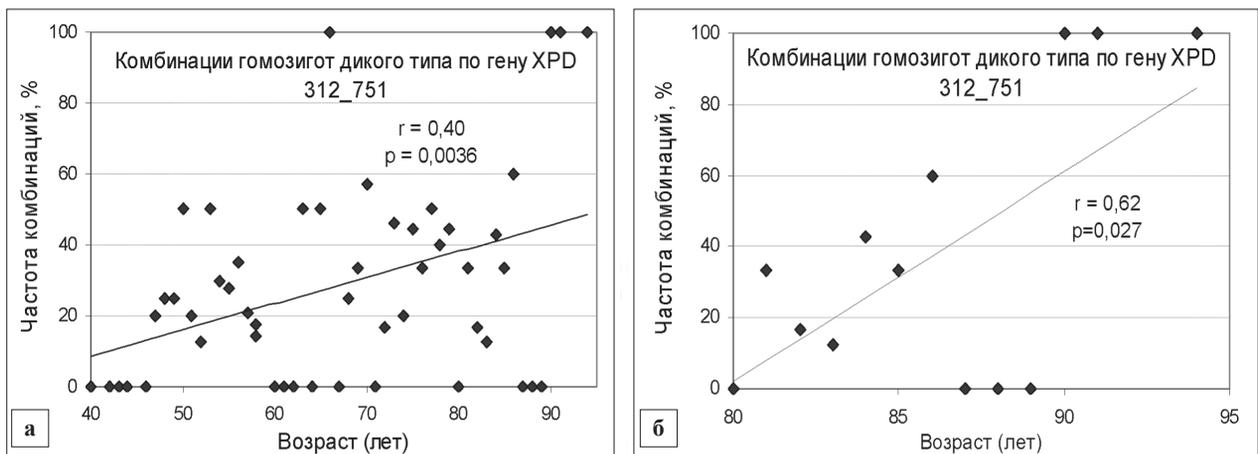


Рис. 1. Взаимосвязь между частотами встречаемости комбинированных гомозигот дикого типа по двум кодам гена *ERCC2/XPD* и возрастом клинически здоровых лиц: а – в группе от 40 лет; б – в подгруппе старше 80 лет

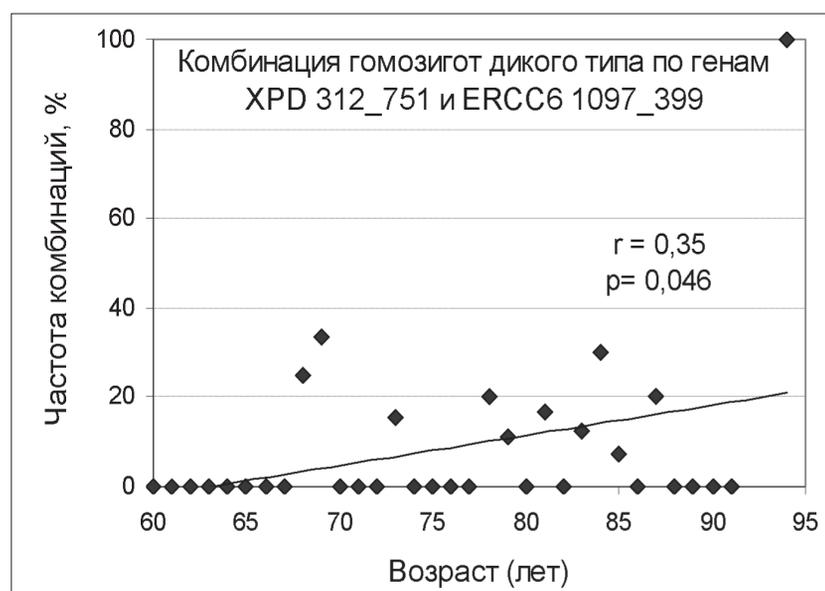


Рис. 2. Взаимосвязь между частотами встречаемости комплекса гомозигот дикого типа у клинически здоровых лиц старше 60 лет

Представленные результаты согласуются с ранее опубликованными данными относительно взаимодействия генов эксцизионной репарации [16, 17].

Участие XPD- и CSB-геликаз в эксцизионной репарации нуклеотидов [9, 20], которая элиминирует различные типы поврежденных ДНК, накапливающиеся с возрастом, предполагает их возможное влияние на продолжительность жизни. Недавние исследования на культурах клеток человека и млекопитающих продемонстрировали непосредственное взаимодействие ряда подобных ферментов с повреждениями в различных ядерных компартментах при окислительном стрессе [14, 15]. Установлено также, что CSB-геликаза может выступать в роли ловушки свободных радикалов, и ее дисфункция в митохондриях приводит к усилению окислительного стресса [21], а XPD-протеин, локализованный в мембране митохондрий, обеспечивает стабильность митохондриального генома, повышая эффективность репарации повреждений, индуцированных активными формами кислорода [22]. Учитывая перечисленные функции ДНК-геликаз, а также существенный вклад повреждений ДНК и окислительного стресса в старение, можно ожидать, что их оптимальная активность в течение всей жизни будет способствовать долголетию. Наши данные подтверждают эту идею.

*Зависимость распределения гомозигот по аллелям дикого типа от курения* представляла отдельный интерес, так как известен вклад этой вредной привычки в развитие различных патологий, в том числе болезни пожилого возраста. Табачный дым, частично через индукцию активных форм кислорода, способствует развитию атеросклероза коронарных сосудов, диабета II типа и злокачественных новообразований [23]. Так, курение является одним из важнейших этиологических факторов рака мочевого пузыря, который ассоциирован со старением [24].

Как следует из табл. 2, в исследовании принимали участие клинически здоровые взрослые индивидуумы с достаточно большой долей представителей пожилого и старого населения. Среди них 99 человек (28%) курит, 229 человек (64,7%) не курит. В 26 анкетах (7,3%) не указан статус курения. Процентное соотношение курящих и некурящих лиц в исследованной популяции в целом отражало картину потребления табака в Беларуси, так как по данным Министерства здравоохранения в последние годы этот показатель колебался в пределах 32,3–42,3%. Эти сведения сходны с данными глобального опроса взрослого населения о потреблении табака в России (39,1% курящих и 60,9% некурящих) [25]. Небольшие различия с официальными данными в сторону уменьшения процента курящих в нашей выборке можно объяснить отсутствием в ней лиц молодого возраста.

**Таблица 2**

Характеристика исследованной популяции по возрасту в зависимости от статуса курения

Возраст (лет)	Курящие (n = 99)	Некурящие (n = 229)	P
Средний (Mean ± SD)	58,35 ± 10,92	69,27 ± 13,13	< 0,0001
Медианный	56	72	–
Минимальный	32	38	–
Максимальный	91	94	–
Шаг ≈ 10 лет	Количество, %		–
32 (38)–50	17 (17,17)	17 (7,49)	0,085
51–60	61 (61,62)	70 (30,84)	< 0,000001
61–70	7 (7,07)	19 (8,37)	> 0,05
71–80	8 (8,08)	57 (25,11)	0,0004
81–91 (94)	6 (6,06)	64 (28,19)	0,000008

**Примечание.** Статистическая значимость различий между группами по среднему возрасту определена в соответствии с двухсторонним критерием *t* Стьюдента, тогда как распределения по возрастным группам сравнивались по критерию  $\chi^2$

Анализ исследованной популяции по возрасту в связи со статусом курения выявил, что средний возраст курящих оказался на 11 лет меньше, чем у некурящих лиц; медианный возраст также значительно различался в этих группах, хотя показатели минимального и максимального возраста были достаточно близки. В наиболее многочисленную группу курящих вошли лица от 51 до 60 лет, тогда как среди некурящих лица этого возраста, а также от 71 до 80 и старше 80 лет составили примерно одинаковые группы (от 25 до 30% выборки). Только группа от 61 до 70 лет была представлена равными долями среди курильщиков и лиц без этой вредной привычки. Видно, что с возрастом (старше 60 лет) количество курящих резко сокращается.

Поскольку в предыдущей части работы наиболее четкие зависимости касались комбинаций гомозигот дикого типа гена *ERCC2/XPD* (кодоны 312 и 751) и комплекса генов *ERCC2/XPD 312\_751* и *ERCC6/CSB 1097\_399*, их частоты проанализированы в связи с курением. Из данных табл. 3 вытекает, что гомозиготный генотип *XPD Asp312Asp* (в отличие от *XPD Lys751Lys*) существенно чаще встречается среди некурящих; такая же ассоциация свойственна комбинации нормальных генотипов при парном взаимодействии *XPD Asp312Asp* и *XPD Lys751Lys*, что, по-видимому, обусловлено доминирующим влиянием первого генотипа.

В связи с этим следует упомянуть результаты изучения эффектов полиморфизма некоторых генов эксцизионной репарации ДНК на формирование привычки к курению [17, 18]. Из четырех изученных генов тесную ассоциацию со статусом курильщика продемонстрировал только аллель *XPD 312Asn*. Частота

гомозиготных носителей аллелей дикого типа этого гена была существенно выше среди некурящих лиц.

В данной работе комбинация гомозиготных аллелей дикого типа по всем проанализированным локусам оказалась нейтральной по отношению к курению.

Далее изучено распределение гомозигот дикого типа в зависимости от возраста курящих и некурящих лиц. Следует сразу подчеркнуть, что результаты корреляционного анализа в группе некурящих лиц, как правило, повторяли общие закономерности: частота гомозиготных аллелей дикого типа по паре *ERCC2/XPD 312\_751* существенно увеличивалась в этой группе, начиная с 40 лет ( $r = 0,37$   $P = 0,012$ ), но особенно – в старческом возрасте ( $r = 0,61$   $P = 0,035$ ), а частота комплекса гомозигот по всем изученным вариантам повышалась не только в пожилом возрасте (после 70 лет), но и во всей обследованной популяции жителей Беларуси без этой вредной привычки (38 лет – 94 года) (рис. 3 а, б).

В группе курящих выявлялись те же тенденции: частота гомозигот дикого типа *XPD Asp312Asp* и *XPD Lys751Lys* коррелировала с возрастом в подгруппе старше 70 лет ( $r = 0,56$  при  $P = 0,058$  и  $r = 0,50$  при  $P = 0,098$ , соответственно). При их взаимодействии между собой коэффициент корреляции после 70 лет становился высоко значимым ( $r = 0,55$  при  $P = 0,015$ ). Наличие среди курящих всего 5 носителей комплекса гомозигот дикого типа по четырем локусам не позволяло проанализировать их распределение по возрасту.

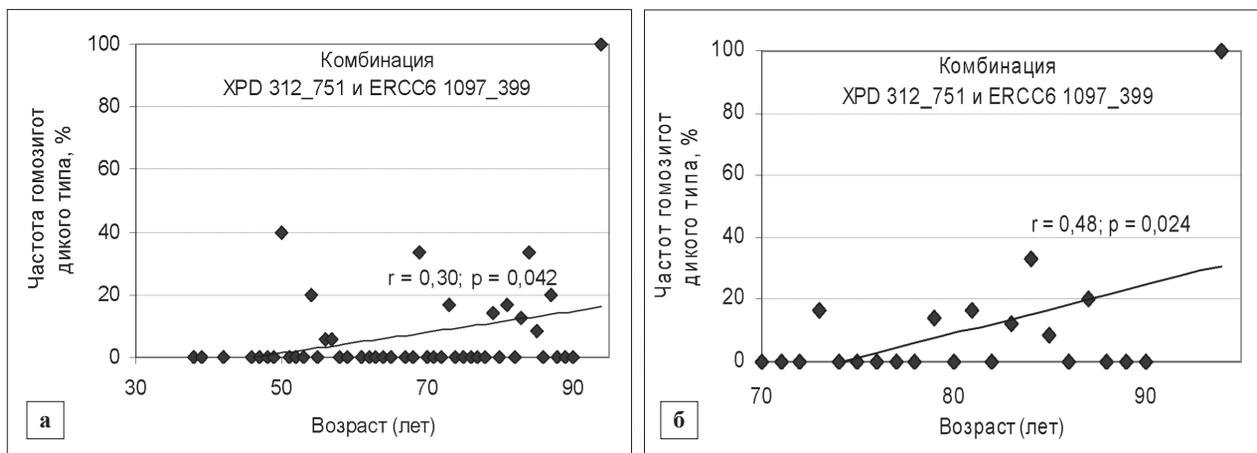
Некоторые различия между группами некурящих и курящих лиц по распределению гомозиготных носителей аллелей дикого типа могут быть связаны с почти трехкратным повышением доли людей более преклонного

Таблица 3

Гомозиготность по аллелям дикого типа генов *ERCC2/XPD* и *ERCC6/CSB*

Гомозиготные носители аллелей дикого типа	Курящие		Некурящие		P
	Количество	%	Количество	%	
<i>XPD Asp312Asp</i>	24/99	24,24	91/229	39,74	<b>0,007</b>
<i>XPD Lys751Lys</i>	33/99	33,33	87/299	37,99	> 0,05
<i>XPD 312_751</i>	21/99	21,21	73/229	31,88	<b>0,04986</b>
<i>XPD 312_751, ERCC6 1097_399</i>	5/99	5,05	18/229	7,86	> 0,05

Примечание. Статистически значимые различия установлены с помощью критерия  $\chi^2$ .



**Рис. 3.** Распределение комплекса гомозигот по аллелям дикого типа изученных генов: а – во всей популяции некурящих лиц; б – в подгруппе старше 70-ти лет

возраста (61–94 года) среди первых по сравнению со вторыми (62% и 21%, соответственно;  $P < 0,00001$ ). Отсюда следует, что курение является независимым фактором, сокращающим продолжительность жизни. С другой стороны, генотипы, обеспечивающие нормальное функционирование ДНК-геликаз, особенно XPD-протеина, способствуют увеличению продолжительности жизни в обеих группах, что может указывать на независимый характер их влияния на процесс старения и долголетия. Однако, что касается гена *XPD* (кодон 312), по-видимому, нельзя пренебрегать данными о вкладе полиморфизма этого гена в формирование привычки к курению (в данном случае, о повышении частоты гомозигот дикого типа среди некурящих лиц) [17]. Вероятно, самостоятельное положительное влияние гомозиготности по аллелю дикого типа этого гена на продолжительность жизни может усиливаться благодаря его защитному эффекту против склонности к курению.

### Заключение

ДНК-геликазы XPD и CSB вносят существенный вклад в репарацию различных (включая индуцированные активными формами кислорода) повреждений ДНК, а подавление их активности приводит к развитию наследственных заболеваний (пигментной ксеродермы и синдрома Коккейна), в той или иной степени проявляющих прогероидные признаки. На этом основании изучено влияние полиморфизма соответствующих генов (*ERCC2/XPD* и *ERCC6/CSB*) на продолжительность жизни. На выборке из 354 клинически здоровых жителей Белору-

си среднего, пожилого и старческого возраста установлены статистически значимые различия по распределению генотипов полиморфного локуса *ERCC6/CSB Gly399Asp* в альтернативных по возрасту группах с увеличением частоты носителей аллеля дикого типа среди индивидов старше 80 лет. Корреляционный анализ показал зависимое от возраста накопление гомозиготных генотипов *ERCC2/XPD Asp312Asp* и *Lys751Lys*, их комбинаций, а также комплексных гомозиготных генотипов, содержащих нормальные аллели по всем изученным полиморфным локусам, что особенно ярко проявлялось в пожилом и старческом возрасте. При изучении распределения гомозигот дикого типа с учетом статуса курения общие закономерности, касающиеся полиморфизма гена *ERCC2/XPD*, проявлялись как в группах некурящих, так и курящих лиц, тогда как частота носителей комплексного гомозиготного генотипа по четырем изученным локусам существенно повышалась с возрастом в группе некурящих лиц, особенно после 70 лет. Анализ всех данных позволил выявить влияние гомозиготности по аллелям дикого типа с доминирующим эффектом гена *XPD* на продолжительность жизни, что может рассматриваться и как самостоятельный генетический фактор, способствующий долголетию, и в связи с курением.

*Авторы искренне благодарят доцента кафедры терапии Белорусской медицинской академии последипломного образования к.м.н. В.Э. Сушинского за помощь в организации сбора образцов биологического материала.*

**Список использованных источников**

1. Billen, D. Spontaneous DNA damage and its significance for the “negligible dose” controversy in radiation protection / D. Billen // *Radiat Res.* – 1990. – Vol. 124. – P. 242–245.
2. Ciccia, A. The DNA damage response: making it safe to play with knives / A. Ciccia, S.J. Elledge // *Molecular Cell.* – 2010. – Vol. 40. – P. 179–204.
3. Campisi, J. Cancer, aging and cellular senescence / J. Campisi // *In Vivo.* 2000. – Vol. 14. – P. 183–188.
4. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144. – P. 646–674.
5. Lohman, T.M. Non-hexameric DNA helicases and translocases: mechanisms and regulation / T.M. Lohman, E.J. Tomko, C.G. Wu // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 391–401.
6. Fairman-Williams, M.E. SF1 and SF2 helicases: family matters / M.E. Fairman-Williams, U.P. Guenther, E. Jankowsky // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2010. – Vol. 20. – P. 313–324.
7. Byrd, A.K. Superfamily 2 helicases / A.K. Byrd, K.D. Raney // *Front Biosci.* (Landmark Ed). – 2012. – Vol. 17. – P. 2070–2088.
8. Lehmann, A.R. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy / A.R. Lehmann // *Biochimie.* – 2003. – Vol. 85, № 11. – P. 1101–1111.
9. Andressoo, J.O. Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging / J.O. Andressoo, J.H. Hoeijmakers, J.R. Mitchell // *Cell Cycle.* – 2006. – Vol. 5, № 24. – P. 2886–2888.
10. Xeroderma pigmentosum: a case report and review of the literature / L.J. Feller [et al.] // *Prev. Med. Hyg.* – 2010. – Vol. 51, № 2. – P. 87–91.
11. Xeroderma pigmentosum and other diseases of human premature aging and DNA repair: molecules to patients / L.J. Niedernhofer [et al.] // *Mech Ageing Dev.* – 2011. – Vol. 132, № 6–7. – P. 340–347.
12. Coppède, F. DNA repair in premature aging disorders and neurodegeneration / F. Coppède, L. Migliore // *Curr Aging Sci.* – 2010. – Vol. 3, № 1. – P. 3–19.
13. Kuper, J. DNA helicases in NER, BER, and MMR / J. Kuper, C. Kisker // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – Vol. 767. – P. 203–224.
14. Menoni, H. Nucleotide excision repair-initiating proteins bind to oxidative DNA lesions in vivo / H. Menoni, J.H. Hoeijmakers, W. Vermeulen // *J. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 199, № 7. – P. 1037–1046.
15. The cross talk between pathways in the repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mouse and human cells / E. Parlanti [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol. 53, № 11. – P. 2171–2177.
16. Полиморфизм генов эксцизионной репарации *XPB*, *XRCC1* и *hOGG1* у населения Республики Беларусь и его влияние на канцерогенез / О.П. Романюк [и др.] // *Экологическая генетика.* – 2013. – Т. 11, №4. – С. 45–63.
17. Связь полиморфизма генов репарации ДНК *XPB*, *XRCC1*, *OGG1*, *ERCC6* с продолжительностью жизни и склонностью к курению / О.П. Романюк [и др.] // *Генетика.* – 2014. – Т. 50, № 8. – С. 1–11.
18. Polymorphism of DNA repair genes *OGG1*, *XRCC1*, *XPB*, and *ERCC6* in bladder cancer in Belarus / V.P. Ramaniuk [et al.] // *Biomarkers.* – 2014 – Vol. 19, № 6. – P. 509–516.
19. The cellular response to oxidatively induced DNA damage and polymorphism of some DNA repair genes associated with clinicopathological features of bladder cancer / N.V. Savina [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2015 (in press).
20. In *TFIIH*, *XPB* helicase is exclusively devoted to DNA repair / J. Kuper [et al.] // *PLoS Biol.* – 2014. – Vol. 12, № 9:e1001954.
21. Mitochondrial reactive oxygen species are scavenged by Cockayne syndrome B protein in human fibroblasts without nuclear DNA damage / J.E. Cleaver [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – Vol. 111, № 37. – P. 13 487–13 492.
22. *XPB* localizes in mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative DNA damage / J. Liu [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 43, № 11. – P. 5476–5488.
23. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? / A. Görlach [et al.] // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 372–385.
24. Gene polymorphisms in bladder cancer / M. Franekova [et al.] // *Urol. Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 1–8.
25. Глобальный опрос взрослого населения о потреблении табака (GATS): Российская Федерация // Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. – 2009. – 171 с. – Режим доступа: [http://www.who.int/tobacco/surveillance/ru\\_tfi\\_gatsrussian\\_countryreport.pdf](http://www.who.int/tobacco/surveillance/ru_tfi_gatsrussian_countryreport.pdf).

N.V. Savina, N.V. Nikitchenko, T.D. Kuzhir, R.I. Goncharova

## POLYMORPHISM OF GENES CODING DNA HELICASES: IMPACT ON THE LIFE SPAN

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus  
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

Impact of homozygosity by wild type alleles in the polymorphic loci of genes coding XPD and CSB helicases on lifespan was studied. For this purpose, polymorphisms of *ERCC2/XPD* Asp312Asn and Lys751Gln, *ERCC6/CSB* Met1097Val and Gly399Asp were analyzed in 354 clinically healthy residents of Belarus aged from 31 to 94 years. Age-dependent increase in the frequency of *ERCC2/XPD* Asp312Asp and Lys751Lys genotypes, as well as their combination, was found, especially in the group over 80 years. Homozygosity by wild type alleles in all studied loci was enhanced in individuals over 60 years that indicated association of lifespan and longevity with normal functioning of these genes and their products. Taking into account the smoking status, the common peculiarities were rather observed in the group of non-smokers.

**Key words:** DNA helicases, DNA repair, oxidative stress, lifespan.

*Дата поступления статьи 8 декабря 2015 г.*

Е.А. Аксенова<sup>1</sup>, Н.А. Мартусевич<sup>2</sup>, О.В. Сергейчик<sup>2</sup>, Н.П. Митьковская<sup>2</sup>

## ЧАСТОТА HLA-DRB1 АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ У ПАЦИЕНТОВ С АЦЦП-ПОЗИТИВНЫМ ВАРИАНТОМ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА И ИХ РОДСТВЕННИКОВ 1-Й И 2-Й СТЕПЕНЕЙ РОДСТВА

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: cytoplasmic@mail.ru

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет  
Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83

Исследование генотипов *HLA-DRB1* 51 пациента с АЦЦП-позитивным ревматоидным артритом (РА) показало, что 68,6% имели аллели общего эпитопа SE, обеспечивающие высокое сродство DRβ1 цепи ГКГС к цитруллинированным пептидам. Наиболее частым в изученной выборке (19,61%) был SE-аллель DRB1\*04:01:01, следующим по распространенности (15,69%) определен нейтральный аллель DRB1\*15:01:01 и с частотой 13,73% выявлен SE-аллель DRB1\*01:01:01. 15,7% пациентов имели в своем генотипе два SE-аллеля, причем три человека были гомозиготными по аллелю DRB1\*04:01:01. В 31,3% случаев РА встречались генотипы SE/XP4n, сочетающие аллель общего эпитопа и «протективный». Среди 61 родственника пациентов у 4,9% обнаружены SE/SE-генотипы и у большинства (29,5%) – SE/XP4n-генотипы. Достоверных различий между группами пациентов и родственников по частоте генотипов и аллелей не выявлено.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, *HLA-DRB1*, АЦЦП, общий эпитоп.

### Введение

Ревматоидный артрит (РА) – полигенное аутоиммунное заболевание, которое является серьезной проблемой современной ревматологии вследствие распространенности заболевания в популяции (до 1%), поражения лиц молодого трудоспособного возраста, быстрой инвалидизации пациентов [1]. Своевременная диагностика и терапия необходимы для благоприятного исхода лечения данного заболевания, также актуальными являются: разработка путей профилактики заболевания, выявление предикторов риска развития и неблагоприятного течения болезни.

В настоящее время пристальное внимание ревматологов всего мира приковано к изучению доклинической стадии ревматоидного артрита. В ряде исследований показано, что «субклинически» текущий иммунопатологический процесс развивается задолго до клинической манифестации артрита. В синовиальной ткани клинически «незатронутых» суставов обнаруживается активный воспалительный процесс с инфильтрацией макрофагами и гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, что свидетельствует о наличии определенного промежутка времени между развитием воспа-

лительного процесса в суставах и клинической манифестацией артрита [2]. Итогом работы экспертов по доклинической стадии ревматоидного артрита стали опубликованные в 2012 году Европейские рекомендации, которые определили специфические фазы, предшествующие развитию РА [3]. Большое значение в оценке развития и прогрессирования РА придается таким маркерам заболевания, как антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), ревматоидный фактор, С-реактивный белок и наличие аллелей общего эпитопа (SE+) гена *HLA-DRB1* [4].

Во многих исследованиях было отмечено выявление АЦЦП задолго до появления первых симптомов РА [5]. В настоящее время выделяют два основных подтипа ревматоидного артрита – позитивного по АЦЦП и негативного по этому иммунологическому маркеру, которые различаются по течению, прогнозу и ответу на проводимую терапию [6, 7].

При изучении влияния генотипа наиболее значимая роль в формировании подверженности к заболеванию доказана для *HLA-DRB1* аллелей общего эпитопа (shared epitope = SE) класса II главного комплекса гистосовмести-

мости (ГКГС) [8]. Эти аллели кодируют аминокислотные последовательности (QRRAA, QKRAA, RRRAA), локализованные в позиции 70–74 третьего гипервариабельного района бета цепи главного комплекса гистосовместимости класса II [9, 10]. Аминокислотная последовательность общего эпитопа SE расположена в кармане 4 (P4) сайта связывания HLA-DRB1 молекулы с пептидами и обеспечивает положительный заряд данной области [11]. Это существенно увеличивает сродство HLA-DRB1 к цитруллинированным пептидам, в которых в результате посттрансляционной модификации происходит преобразование аргинина боковой цепи в цитруллин (замена заряженной имино-группы боковой цепи на незаряженный карбонил), и это, соответственно, вызывает ауто-иммунный ответ CD4+ Т-лимфоцитов на эти пептиды [10]. Наличие SE-аллелей локуса HLA-DRB1 напрямую связано с тяжестью эрозивного поражения суставов [12]. В целом вклад генов главного комплекса гистосовместимости *HLA* в структуру генетической компоненты РА, на основании оценки данных популяционных и клинических исследований среди монозиготных близнецов и сиблингов, составляет 37% [13]. Наличие семейных случаев развития заболевания позволяет ревматологам изучить наиболее уязвимый контингент для выявления лиц с преคลินิกической стадией РА, а также разработать схемы фармакотерапии, позволяющие предотвратить развитие болезни.

Основной задачей, решаемой в нашем исследовании, было изучение спектра и частоты встречаемости аллелей гена *HLA-DRB1* у пациентов с АЦЦП-позитивным подтипом ревматоидного артрита и их родственников первой и второй степени родства. Результаты важны для разработки в Республике Беларусь комплексной программы профилактики развития ревматоидного артрита у лиц с отягощенным по заболеванию наследственным анамнезом.

### Материалы и методы

На базе отделения ревматологии УЗ «6-я городская клиническая больница г. Минска» было проведено клиническое обследование 51 пациента с достоверным диагнозом РА в соответствии с классификационными критериями Американской коллегии ревматологов (*ACR*) и Европейской лиги против ревматизма

(*EULAR*) 2010 года с продолжительностью суставного синдрома до года, без предшествующей базисной терапии, позитивные по наличию АЦЦП, а также для исследования были приглашены родственники этих пациентов 1-й и 2-й степени родства (61 человек).

Материалом исследования была тотальная ДНК, выделенная из сухих пятен крови. Генотипирование по аллелям гена *HLA-DRB1* было проведено с использованием набора SeCore® DRB1, DRB3, 4 & 5 Locus Sequencing Kit (RUO) от компании Life Technologies по протоколу к данному набору с нашими модификациями.

### Результаты и обсуждение

Специфичность ГКГС II класса обеспечивается, в первую очередь, полиморфными аминокислотными последовательностями в карманах (впадинах) этих молекул [11]. В третьем гипервариабельном районе β1 цепи ГКГС II класса аминокислотная последовательность Q/R-K/R-R-A-A в 70–74 позициях названа общим эпитопом (SE) предрасположенности к РА [9, 10]. Она находится в четвертом кармане (pocket 4 = P4) молекулы HLA-DR1 и обеспечивает положительный заряд на поверхности кармана [11]. Таким образом, молекула HLA-DR1 с SE обладает высоким сродством к пептидам, несущим нейтральный или отрицательный заряд. И поэтому при деиминировании положительно заряженной имино-группы аргинина боковой цепи ферментом пептидил-аргинин деиминазой (ПАД) на незаряженный карбонил с образованием цитруллина возрастает сродство таких цитруллин-содержащих белков к закориванию в P4 кармане с SE. При этом немаловажное значение имеет не только заряд на поверхности кармана с SE, но и его размер [10].

Аллели общего эпитопа SE главного комплекса гистосовместимости класса II HLA-DRB1 следующие: \*0101, \*0102, \*0401, \*0404, \*0405, \*0408, \*1001 и \*1402 (табл. 1). Аллели, которые не кодируют общий эпитоп (X-аллели), но отличаются по электрическому заряду на поверхности кармана P4, обозначают: 1) аллель XP4p – DRB1\*X, заряд кармана P4 положительный (+); 2) аллель XP4n – DRB1\*X, заряд кармана P4 нейтральный (N) или отрицательный (–) [14]. Аминокислотные последовательности и названия аллелей HLA-DRB1 представлены в табл. 1.



Таблица 2

Частота встречаемости аллелей гена *HLA-DRB1* у АЦЦП-положительных пациентов с диагнозом РА

Типы аллелей	Число пациентов, (n)	Гомозигот, (n, %)	Частота аллелей, (%)	Генотипов в сочетании с аллелями общего эпитопа, (n, %)			
				DRB1*04:01:01	DRB1*01:01:01	DRB1*10:01:01	DRB1*04:10:01
<b>Общий эпитоп</b>	<b>35</b>		<b>37,3</b>				
<b>DRB1*01:01:01</b>	14		13,73	4 (7,8)			
<b>DRB1*04:01:01</b>	17	3 (5,9)	19,61	3 (5,9)			
<b>DRB1*04:05:01</b>	1		0,98		1 (1,9)		
<b>DRB1*04:10:01</b>	1		0,98				
<b>DRB1*10:01:01</b>	2		1,96				
<b>XP4n</b>	<b>30</b>		<b>29,4</b>				
DRB1*04:02	2		1,96				
DRB1*07:01:01	10		9,8	3 (5,9)	2 (3,9)	1 (1,9)	
DRB1*08:01:01	2		1,96				1 (1,9)
DRB1*11:01:01	12		11,76	3 (5,9)	3 (5,9)	1 (1,9)	
DRB1*12:01:01	1		0,98	1 (1,9)			
DRB1*13:01:01	2		1,96				
DRB1*13:02:01	1		0,98	1 (1,9)			
<b>XP4p</b>	<b>28</b>		<b>33,3</b>				
DRB1*03:01:01	7	2 (3,9)	8,82	1 (1,9)			
DRB1*09:01:01	1		0,98				
DRB1*15:01:01	13	3 (5,9)	15,69	1 (1,9)	3 (5,9)		
DRB1*15:02:01	3		2,94		1 (1,9)		
DRB1*16:01:01	3	1 (1,9)	3,92				
DRB1*16:02:01	1		0,98				

Таблица 3

Частота встречаемости генотипов гена *HLA-DRB1* у пациентов с РА и их родственников

Генотип DRB1/DRB1	Пациенты		Родственники				
	n	%	Всего (n)	%	X/X пациентов		АЦЦП+ >5 Ед/мл (n, %)
					Пациентов (n)	Родственников (n)	
SE/SE	<b>8</b>	15,7	3	4,9	–	–	2 (11,8)
SE/X	22	–	28	–	–	–	<b>6</b>
SE/XP4p	6	11,8	10	16,4	3	3	2 (11,8)
SE/XP4n	16	31,3	18	29,5	1	1	4 (23,5)
X/X	<b>21</b>	–	30	–	–	–	<b>9</b>
XP4p/XP4p	11	21,6	6	9,8	5	8	3 (17,6)
XP4p/XP4n	6	11,8	13	21,3	3	4	4 (23,5)
XP4n/XP4n	4	7,8	11	18,1	5	6	2 (11,8)

## Заключение

Проведенное нами исследование генотипов 51 пациента с АЦЦП-позитивным ревматоидным артритом показало, что 68,6% имели аллели общего эпитопа SE, обеспечивающие высокое сродство DRβ1 цепи ГКГС к цитруллинированным пептидам. Наиболее частым (19,61%) в изученной выборке был SE-аллель DRB1\*04:01:01, следующим по распространенности (15,69%) определен нейтральный XP4p-аллель DRB1\*15:01:01 и с частотой 13,73% выявлен SE-аллель DRB1\*01:01:01 (табл. 1). 15,7% пациентов имели в своем генотипе 2 SE-аллеля, причем 3 человека были гомозиготными по аллелю DRB1\*04:01:01. В 31,3% случаев РА встречались генотипы SE/XP4n, сочетающие аллель общего эпитопа и «протективный». У 4,9% родственников пациентов обнаружены генотипы SE/SE и у большинства (29,5%) – генотипы SE/XP4n. Среди 61 родственника пациентов 17 были АЦЦП-позитивными (>5 Ед/мл) и имели разные генотипы HLA-DRB1, включая нейтральные (XP4p/XP4p и XP4p/XP4n) и «протективные» (XP4n/XP4n). Достоверных различий между группами пациентов и родственников по частоте генотипов и аллелей не выявлено. Дальнейшее изучение прогрессирования болезни и реакции на лечение у исследованных пациентов позволит оценить вклад генотипа и перспективы его применения в качестве прогностического маркера для ранней диагностики заболевания.

*Работа выполнена по заданию 1.2.109 ГПНИ «Медицина и фармацевция», подпрограмма «Фундаментальная и прикладная медицина».*

## Список использованных источников

1. Насонов, Е.Л. Почему необходима ранняя диагностика и лечение ревматоидного артрита? / Е.Л. Насонов // Русск. мед. журнал. – 2002. – Т. 10, № 22. – С. 1009–1015.
2. Asymptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis / M.C. Kraan [et al.] // Arthritis Rheum. – 1998. – Vol. 41, N 8. – P. 1481–1488.
3. EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis / D.M. Gerlag [et al.] // Ann Rheum Dis. – 2012. – Vol. 71. – P. 638–641. – doi:10.1136/annrheumdis-2011-200990.

4. Predicting arthritis outcomes – what can be learned from the Leiden Early Arthritis Clinic? / D.P.C. De Rooy [et al.] // Rheumatology. – Oxford, 2010. – N 51, Vol. 1. – P. 93–100.

5. The extent of the anti-citrullinated protein antibody repertoire is associated with arthritis development in patients with seropositive arthralgia / L.A. van de Stadt [et al.] // Ann Rheum Dis. – 2011. – Vol. 70, N 1. – P. 128–133. – doi: 10.1136/ard.2010.132662.

6. The association of treatment response and joint damage with ACPA-status in recent-onset RA: a subanalysis of the 8-year follow-up of the BeSt study / M. van den Broek [et al.] // Ann Rheum Dis. – 2012. – Vol. 71, N 2. – P. 245–248. – doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200379.

7. Bax, M. The pathogenic potential of auto-reactive antibodies in rheumatoid arthritis / M. Bax, T.W. Huizinga, R.E. Toes // Semin Immunopathol. – 2014. – Vol. 36, N 3. – P. 313–325. – doi: 10.1007/s00281-014-0429-5.

8. Validation of the reshaped shared epitope HLA-DRB1 classification in rheumatoid arthritis / L. Michou [et al.] // Arthritis Res Ther. – 2006. – Vol. 8, N 3. – R. 79.

9. Gregersen, P.K. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis / P.K. Gregersen, J. Silver, R.J. Winchester // Arthritis and Rheumatism. – 1987. – Vol. 30, N. 11. – P. 1205–1213.

10. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule / J.A. Hill [et al.] // J. Immunol. – 2003. – Vol. 171, N 2. – P. 538–541.

11. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide / L.J. Stern [et al.] // Nature. – 1994. – Vol. 368, N 6468. – P. 215–221.

12. Value of the HLA-DRB1 shared epitope for predicting radiographic damage in rheumatoid arthritis depends on the individual risk profile / A.C. Janssens [et al.] // J Rheumatol. – 2006. – Vol. 33. – P. 2383–2389.

13. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis / C.M. Deighton [et al.] // Clin Genet. – 1989. – Vol. 36, N 3. – P. 178–182.

14. Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis / D. Revirion [et al.] // Arthritis Rheum. – 2001. – Vol. 44, N 3. – P. 535–540.

**Е.А. Aksyonova<sup>1</sup>, N.A. Martusevich<sup>2</sup>, O.V. Sergeichik<sup>2</sup>, N.P. Mitkovskaya<sup>2</sup>**

## **THE FREQUENCY OF HLA-DRB1 ALLELES AND GENOTYPES IN PATIENTS WITH ACCP ANTIBODY-POSITIVE RHEUMATOID ARTHRITIS AND THEIR NEAREST RELATIVES**

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus

Minsk BY-220072, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University

Minsk BY-220116, Republic of Belarus

The *HLA-DRB1* genotyping of 51 patients with ACCP antibody-positive rheumatoid arthritis revealed the 68,6% frequency of shared epitope (SE) alleles which contribute to citrullinated peptide-binding specificity of DRβ1 chain of MHC. SE-allele DRB1\*04:01:01 was the most frequent (19,61%) in studied group. 15,69% patients had neutral DRB1\*15:01:01 allele and 13,73% – SE-allele DRB1\*01:01:01. The majority (31,3%) RA patients possessed SE/XP4n genotypes, combining SE and “protective” alleles. The occurrence of SE/SE genotypes in RA patients was 15,7%. Three patients had DRB1\*04:01:01 homozygote genotype. The frequency of SE/SE genotypes in 61 nearest relatives of RA patients were 4,9%. 29,5% relatives had SE/XP4n genotypes. We didn't find significant differences in alleles and genotypes frequencies between groups of patients and their relatives.

**Key words:** *HLA-DRB1*, ACCP, shared epitope.

*Дата поступления статьи 9 февраля 2016 г.*

Н.Н. Чакова<sup>1</sup>, С.С. Ниязова<sup>1</sup>, С.М. Комиссарова<sup>2</sup>

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СИМПАТОАДРЕНАЛОВОЙ И РЕНИН-АНГИОТЕНЗИН-АЛЬДОСТЕРОНОВОЙ СИСТЕМ ПРИ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: n.chakova@igc.by

<sup>2</sup>РНПЦ «Кардиология»  
220036, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Р. Люксембург, 110

С помощью метода сокращения многофакторной размерности (Multifactorial Dimensionality Reduction, MDR) изучен характер взаимодействия 9 полиморфных локусов генов симпатоадреналовой (*ADRB1*, *ADRB2*) и ренин-ангиотензин-альдостероновой систем (*ACE*, *AGTR1*, *CYP11B2*, *AGT*, *CMA1*) и дана оценка их независимого и суммарного вклада в патогенез гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП). Показано существование половых различий в установленных межгенных взаимосвязях и в их прогностической значимости для пациентов с ГКМП. Проведено моделирование взаимодействия аллельных вариантов перечисленных генов и определены комбинации полиморфных локусов с наибольшей рисковой значимостью в отношении реализации клинических проявлений ГКМП.

**Ключевые слова:** генетический полиморфизм, ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС), симпатоадреналовая система (САС), межгенные взаимодействия.

### Введение

Ренин-ангиотензин-альдостероновая (РААС) и симпатоадреналовая (САС) системы являются основными системами регуляции кровообращения, взаимно влияющими друг на друга [1]. Одним из наиболее значимых факторов РААС в отношении фенотипических проявлений гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП) является ангиотензин II (АП), повышенный уровень которого способствует гипертрофии кардиомиоцитов, пролиферации фибробластов в миокарде и избыточному синтезу коллагена [2]. При этом АП значительно усиливает действие САС на сердце и сосуды, увеличивая высвобождение норадреналина и повышая чувствительность адренергических рецепторов к агонистам (адреналину и норадреналину). Стимуляция же симпатических нервов, идущих к почке, сопровождается высвобождением ренина, расщепляющего ангиотензиноген с образованием неактивного АI, который под действием ангиотензин-превращающего фермента преобразуется в активный АII. Благодаря этим взаимным влияниям активация САС и РААС происходит независимо от того, какая система была первично активирована [1].

Одной из причин повышенного уровня ангиотензина II может быть аллельный полиморфизм различных генов РААС, в том числе кодирующих ангиотензиноген (*AGT*), ангиотензин-превращающий фермент (*ACE*), химазу (*CMA1*), рецептор ангиотензина II типа I (*AGTR1*) и альдостеронсинтазу (*CYP11B2*) [2]. В свою очередь функциональные свойства  $\beta$ 1- и  $\beta$ 2-адренорецепторов определяются полиморфизмом кодирующих их генов (*ADRB1* и *ADRB2*) [3]. Большое количество работ посвящено изучению полиморфизма генов, отвечающих за синтез белков РААС и САС, и его влиянию на возникновение и течение сердечно-сосудистых заболеваний различного генеза [3, 4], в т.ч. и ГКМП [2, 5, 6], однако практически отсутствуют исследования, где бы при этом учитывался суммарный вклад аллельных вариантов генов этих систем.

Целью данной работы являлась оценка характера взаимодействий полиморфных локусов генов симпатоадреналовой (*ADRB1*, *ADRB2*) и ренин-ангиотензин-альдостероновой систем (*ACE*, *AGTR1*, *CYP11B2*, *AGT*, *CMA1*) в патогенезе гипертрофической кардиомиопатии.

## Материалы и методы

В исследование были включены 285 пациентов с диагнозом ГКМП (100 женщин и 185 мужчин), проходивших лечение в РНПЦ «Кардиология», г. Минск. В контрольную выборку вошли 276 человек без фенотипических признаков данной патологии (103 женщины и 173 мужчины).

У всех обследованных индивидуумов методом ПЦР и ПЦР-ПДРФ-анализа изучали полиморфизм генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы: варианты T174M (rs4762) гена *AGT*, 1166A>C (rs5186) гена *AGTR1*, -1903A>G (rs1800875) гена *CMA1*, I/D- (rs4646994) гена *ACE* и -344C>T гена (rs1799998) *CYP11B2*, а также исследовали полиморфизм генов симптоадреналовой системы: замены 145A>G (Ser49Gly) (rs1801252), 1165C>G (Arg389Gly) (rs1801253) в гене *ADRB1* и 46A>G (Arg16Gly) (rs1042713), 79C>G (Gln27Glu) (rs1042714) в гене *ADRB2*. Последовательности праймеров, условия проведения ПЦР и используемые эндонуклеазы были описаны ранее [7, 8].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программного пакета Statistica for Windows 6.0. При сравнении частот генотипов применяли стандартный критерий  $\chi^2$  Пирсона. Если объем выборки не превышал 5 случаев, использовали точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при  $P < 0,05$ .

Для анализа суммарного вклада 9 исследуемых аллельных вариантов в фенотипическую реализацию ГКМП и построения моделей с наибольшим предсказательным потенциалом был использован метод сокращения многофакторной размерности (Multifactorial Dimensionality Reduction, MDR) в среде открытой программы MDR v. 2.0 beta 8.4 (<http://www.multifactordimensionalityreduction.org/>). Данный метод позволяет проводить оценку взаимодействий большого количества полиморфных локусов путем конструирования новых переменных на основе суммирования сочетаний генотипов как повышенного, так и пониженного риска развития болезни. Метод MDR был разработан для моделирования межгенных взаимодействий высокого порядка, которые не-

возможно оценить с помощью традиционно используемых в генетических исследованиях статистических методов [9].

## Результаты и обсуждение

ГКМП – тяжелое первичное заболевание миокарда, характеризующееся ассиметричной гипертрофией миокарда левого желудочка, развитием нарушений ритма и высоким риском внезапной смерти. Наиболее частой причиной развития данной патологии являются мутации в генах, кодирующих синтез сократительных белков миокарда. Однако на выраженность фенотипических признаков ГКМП, помимо этих мутаций, значительное влияние оказывает также полиморфизм генов-модификаторов, к которым, в первую очередь, относят гены, кодирующие белки РААС и САС [2, 5, 10]. Существует мнение, что мутации в генах саркомерных белков приводят к нарушению сократимости миокарда, при этом клинические признаки заболевания во многом обусловлены степенью активации нейрогуморальных систем, которые стремятся адаптировать сердечно-сосудистую систему к новым условиям функционирования [11].

На первом этапе работы нами был проведен сравнительный анализ распределений генотипов каждого из перечисленных выше аллельных вариантов генов *ACE*, *AGTR1*, *CYP11B2*, *AGT*, *CMA1*, *ADRB1* и *ADRB2* между группой пациентов с ГКМП и контрольной, как без учета половой принадлежности, так и в зависимости от пола. Результаты этого исследования подробно представлены в предыдущей статье [8]. В табл. 1 настоящего сообщения отражены данные, демонстрирующие достоверные различия в отношении встречаемости ряда генотипов в сравниваемых группах. Следует отметить, что распределение генотипов по генам *ACE*, *CMA1*, *CYP11B2*, кодирующим белки РААС, имело свои особенности в зависимости от пола. Достоверно большая частота аллеля D гена *ACE* по сравнению с контрольной группой (55,9% против 47,7%) наблюдалась только у пациентов мужского пола ( $\chi^2=4,89$ ,  $P=0,027$ ), при этом генотип II выявлялся в 1,4 раза реже, а генотип DD – в 1,4 раза чаще, чем у мужчин контрольной выборки ( $P=0,060$  и  $P=0,087$ , соответственно).

Таблица 1

Распределение частот встречаемости различных генотипов *ACE*, *СМА1*, *СУР11В2*, *АДРВ1* у пациентов с ГКМП и в контрольной группе

Генотип	Общая группа, n (%)		Мужчины, n (%)		Женщины, n (%)	
	Пациенты	Контроль	Пациенты	Контроль	Пациенты	Контроль
<i>ACE (I/D-полиморфизм)</i>						
II	62 (21,7)	73 (26,6)	<b>36 (19,5)</b>	<b>48 (27,9)</b>	26 (26,0)	25 (24,3)
ID	141 (49,5)	131 (47,6)	91 (49,2)	84 (48,8)	50 (50,0)	47 (45,6)
DD	82 (28,8)	71 (25,8)	<b>58 (31,3)</b>	<b>40 (23,3)</b>	24 (24,0)	31 (30,1)
Аллель I	265 (46,5)	277 (50,4)	<b>163 (44,1)</b>	<b>180 (52,3) *1</b>	102 (51,0)	97 (47,1)
Аллель D	305 (53,5)	273 (49,6)	<b>207 (55,9)</b>	<b>164 (47,7)</b>	98 (49,0)	109 (52,9)
<i>СМА1 (-1903A&gt;G полиморфизм)</i>						
AA	79 (27,7)	87 (31,5)	62 (33,5)	55 (31,8)	<b>17 (17,0)</b>	<b>32 (31,1)*2</b>
AG	146 (51,2)	137 (49,7)	85 (46,0)	86 (49,7)	61 (61,0)	51 (49,5)
GG	60 (21,1)	52 (18,8)	38 (20,5)	32 (18,5)	22 (22,0)	20 (19,4)
Аллель A	304 (53,3)	311 (56,3)	209 (56,5)	196 (56,6)	95 (47,5)	115 (55,8)
Аллель G	266 (46,7)	241 (43,7)	161 (43,5)	150 (43,4)	105 (52,5)	91 (44,2)
<i>СУР11В2 (-344С&gt;Т полиморфизм)</i>						
СС	71 (25,0)	60 (21,7)	43 (24,9)	43 (24,9)	<b>28 (28,0)</b>	<b>17 (16,5)*3</b>
СТ	140 (49,3)	143 (51,8)	88 (47,8)	92 (53,2)	52 (52,0)	51 (49,5)
ТТ	73 (25,2)	73 (26,5)	53 (28,8)	38 (21,9)	<b>20 (20,0)</b>	<b>35 (34,0)*4</b>
Аллель С	282 (49,6)	263 (47,6)	174 (47,3)	178 (51,4)	<b>108 (54,0)</b>	<b>85 (41,3)*5</b>
Аллель Т	286 (50,4)	289 (52,4)	194 (52,7)	168 (48,6)	<b>92 (46,0)</b>	<b>121 (58,7)</b>
<i>АДРВ1 (145А&gt;G (Ser49Gly) полиморфизм)</i>						
AA	<b>219 (76,8)</b>	<b>182 (65,9)*6</b>	<b>142 (76,8)</b>	<b>114 (65,8)*8</b>	<b>77 (77,0)</b>	<b>68 (66,0)</b>
AG	<b>59 (20,7)</b>	<b>88 (31,9)*7</b>	<b>38 (20,5)</b>	<b>55 (31,8)*9</b>	<b>21 (21,0)</b>	<b>33 (32,0)</b>
GG	7 (2,5)	6 (2,2)	5 (2,7)	4 (2,4)	2 (2,0)	2 (2,0)
Аллель A	<b>497 (87,2)</b>	<b>452 (81,9)*10</b>	<b>322 (87,0)</b>	<b>283 (81,8)</b>	175 (87,5)	169 (82,0)
Аллель G	<b>73 (12,8)</b>	<b>100 (18,1)</b>	<b>48 (13,0)</b>	<b>63 (18,2)</b>	25 (12,5)	37 (18,0)

Примечание. \*1 –  $\chi^2=4,89$ ,  $P=0,027$ ; \*2 –  $\chi^2=5,48$ ,  $P=0,019$ ; \*3 –  $\chi^2=3,89$ ,  $P=0,049$ ; \*4 –  $\chi^2=5,02$ ,  $P=0,025$ ; \*5 –  $\chi^2=6,60$ ,  $P=0,010$ ; \*6 –  $\chi^2=8,17$ ,  $P=0,004$ ; \*7 –  $\chi^2=9,07$ ,  $P=0,003$ ; \*8 –  $\chi^2=5,18$ ,  $P=0,023$ ; \*9 –  $\chi^2=5,89$ ,  $P=0,015$ ; \*10 –  $\chi^2=6,06$ ,  $P=0,014$ ; полужирный шрифт без звездочки – тенденция ( $P<0,09$ )

У женщин с ГКМП (табл. 1) значимыми для проявления клинических признаков заболевания оказались полиморфизмы двух других генов: частоты встречаемости генотипа AA полиморфизма -1903A>G гена *СМА1* и генотипа ТТ полиморфизма -344С>Т гена *СУР11В2* среди пациентов были ниже по сравнению с женщинами контрольной группы, что говорит о защитной роли данных генотипов. Генотип СС полиморфизма -344С>Т гена *СУР11В2*, напротив, достоверно чаще обнаруживался в группе женщин с ГКМП, чем в контроле, что указывает на его значимость в реализации фенотипа ГКМП у женщин.

При анализе полиморфизма генов *АДРВ1* и *АДРВ2*, кодирующих белки САС, существенные различия были обнаружены (табл. 1) только в отношении полиморфизма Ser49Gly гена *АДРВ1*, при этом распределение генотипов не зависело от пола: у пациентов с ГКМП генотип AA встречался в 1,2 раза чаще, а гетерозигота AG – в 1,5 раза реже, чем в соответствующих контрольных группах. В общей группе пациентов и у мужчин с ГКМП эти различия были достоверными, а у женщин с ГКМП – имели уровень тенденции ( $P=0,083$  и  $P=0,075$ , соответственно). Отсюда следует,

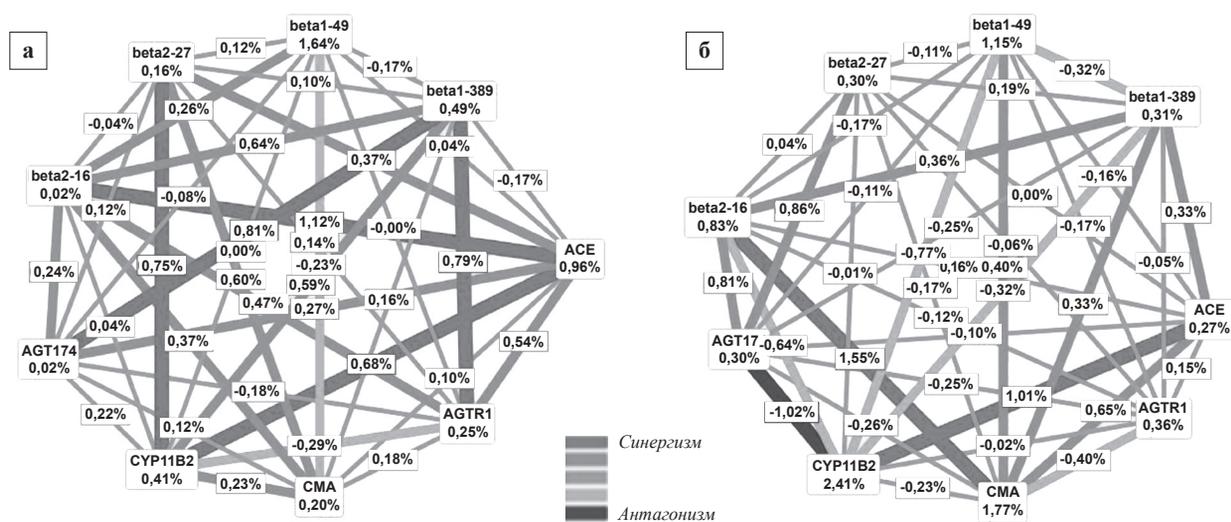
что наличие гомозиготного генотипа AA гена *ADRB1* (Ser49Gly) способствует реализации фенотипических проявлений ГКМП во всей исследованной популяции, однако в большей степени у мужчин.

В последние годы широко обсуждается существование полового диморфизма в протекании различных заболеваний, особенно сердечно-сосудистых (ССЗ), а также генетическая детерминация этого явления [12–14]. В распространенности и течении ГКМП также прослеживаются гендерные особенности. Так, мужчин среди заболевших больше, чем женщин, несмотря на то, что ГКМП относится к заболеваниям с аутосомно-доминантным типом наследования и теоретически его распространенность должна быть одинакова у обоих полов [15]. При этом средний возраст манифестации ГКМП у женщин статистически значимо выше, чем у мужчин с ГКМП.

Для ряда генов, участвующих в возникновении ССЗ, показано, что ассоциированный с риском развития заболевания аллель может проявляться либо у мужчин, либо у женщин [16]. Различия в распределении генотипов по некоторым полиморфным маркерам у мужчин и женщин в группах пациентов с ССЗ и контрольной группе объясняют различным влиянием половых гормонов на функционирование этих аллелей. Считается, что эстрогены обладают выраженными протектив-

ными свойствами при сердечно-сосудистых патологиях [17]. Возможным механизмом их защитного действия на сердечно-сосудистую систему является подавление экспрессии некоторых генов, ответственных за регуляцию кровяного давления, в том числе и ангиотензин-превращающего фермента [18]. С другой стороны, наблюдаемые различия в ассоциациях полиморфных вариантов генов РААС с фенотипической реализацией ССЗ, в том числе и ГКМП, по-видимому, могут указывать на то, что полиморфизм этих генов является одной из генетических причин полового диморфизма при ГКМП.

С помощью программы MDR нами была проведена оценка характера взаимодействия полиморфных локусов генов, кодирующих белки САС и РААС. Анализ данных этим методом также показал существование половых различий, как в самих взаимосвязях исследуемых полиморфных локусов, так и в их иерархии у пациентов ГКМП. На рисунке представлен граф межгенных взаимодействий, отражающий силу влияния отдельных факторов риска на реализацию клинической картины ГКМП в виде показателя энтропии  $I$ , которая выражается в % для каждого узла. Наибольшее влияние имеют полиморфизмы с максимальным процентом энтропии. В случае, если  $I=0\%$ , ген не оказывает влияния на развитие забо-



**Рисунок.** Графическое изображение взаимодействия полиморфных локусов изучаемых генов при ГКМП: а – у мужчин; б – у женщин.

**П р и м е ч а н и е.** На вершинах многогранника представлена информационная ценность каждого полиморфного локуса в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары локусов

левания. Анализ уровня энтропии показал, что наиболее весомыми факторами риска развития клинических проявлений ГКМП у мужчин являются полиморфизм Ser49Gly гена *ADRB1* (I=1,64%) и I/D полиморфизм гена *ACE* (I=0,96%) (рис., а); у женщин наибольшую значимость имел полиморфизм -344C>T гена *CYP11B2* (H=2,41%), на втором месте был полиморфизм -1903A>G гена *CMA1* (I=1,77%), а на третьем – полиморфизм Ser49Gly гена *ADRB1* (I=1,15%).

На ребрах графа в процентах указаны значения межфакторной энтропии, а цветом отображен характер взаимосвязей внутри модели (синергизм, антагонизм). Наиболее существенные 2-х и 3-х-локусные комбинации полиморфизмов, для которых величина показателя информативности I была выше, чем для каждого полиморфизма в отдельности, представлены в табл. 2. Все представленные в таблице 2-х и 3-х-межлокусные комбинации вносят статистически значимый вклад в реализацию фенотипических признаков ГКМП, однако их уровень информативности различается в зависимости от пола. Максимальный синергетический эффект у мужчин для 2-х локусов наблюдался в комбинации «*ADRB1*(49) ×

*ACE*» (2,64%), для 3-х – «*ADRB1*(49) × *ACE* × *ADRB2*(16)» (4,04%), у женщин – «*CMA1* × *ADRB2*(16)» (4,14%) и «*CMA1* × *CYP11B2* × *ACE*» (5,88%), соответственно.

С использованием алгоритма всестороннего поиска (Exhaustive Search Algorithm), который оценивает значимость всех возможных комбинаций полиморфных вариантов, были установлены наиболее оптимальные модели взаимодействия аллелей генов: у мужчин – 2-х-локусная модель взаимодействия генов «*ADRB1*(49) × *ACE*» ( $P<0,0001$ ) с воспроизводимостью (Cross-validation Consistency) 80% и точностью предсказания (Testing Balanced Accuracy) 59,53%, у женщин – 4-х-локусная модель взаимодействия генов «*CMA1* × *CYP11B2* × *ACE* × *ADRB2*(16)» ( $P<0,0001$ ) с воспроизводимостью 80% и точностью предсказания 74,75%.

Последующая оценка характера распределения полиморфных вариантов генов в пределах каждой модели позволила выделить комбинации генотипов, которые достоверно чаще встречались в группе пациентов с ГКМП, по сравнению с контрольной, и имели наибольшую рисковую значимость в формировании клинической картины ГКМП (табл. 3).

Таблица 2

Комбинации генов САС и РААС, имеющих наибольший уровень информативности у пациентов с ГКМП

Число локусов в модели	Комбинации полиморфизмов	Показатель энтропии (I),%	
		Мужчины	Женщины
2	<i>ADRB1</i> (49) × <i>ADRB1</i> (389)	1,96	1,14
2	<i>ADRB1</i> (49) × <i>ACE</i>	<b>2,64*</b>	1,26
3	<i>ACE</i> × <i>ADRB1</i> (389) × <i>AGT</i>	2,69	0,86
3	<i>ADRB1</i> (49) × <i>ADRB1</i> (389) × <i>AGT</i>	3,02	1,08
3	<i>ADRB1</i> (49) × <i>ACE</i> × <i>ADRB2</i> (16)	<b>4,04**</b>	2,08
2	<i>CMA1</i> × <i>CYP11B2</i>	0,84	3,95
2	<i>CMA1</i> × <i>ADRB2</i> (16)	0,60	<b>4,14*</b>
3	<i>CMA1</i> × <i>CYP11B2</i> × <i>ADRB1</i> (49)	2,25	4,73
3	<i>CMA1</i> × <i>ADRB2</i> (16) × <i>ADRB1</i> (49)	2,26	5,53
3	<i>CMA1</i> × <i>CYP11B2</i> × <i>ADRB2</i> (16)	1,23	5,69
3	<i>CMA1</i> × <i>CYP11B2</i> × <i>ACE</i>	2,58	<b>5,88**</b>

\* – максимальный синергетический эффект для 2-х-локусной комбинации; \*\* – максимальный синергетический эффект для 3-х-локусной комбинации

Таблица 3

Наиболее значимые комбинации генотипов, ассоциированные с развитием фенотипических признаков ГКМП

Комбинации генотипов	Мужчины, n				Женщины, n			
	Пациенты n=179	Контроль n=168	$\chi^2$	P	Пациенты n=99	Контроль n=99	$\chi^2$	P
<i>ADRB1(49)</i> _AA × <i>ADRB1(389)</i> _CC	70	43	7,20	0,007	34	28	0,85	0,358
<i>ADRB1(49)</i> _AA × <i>ADRB1(389)</i> _CC × <i>AGT</i> _CC	<b>53</b>	<b>26</b>	<b>9,84</b>	<b>0,002</b>	22	18	0,50	0,479
<i>ADRB1(49)</i> _AA × <i>ACE</i> _аллель D	<b>112</b>	<b>76</b>	<b>10,49</b>	<b>0,001</b>	54	47	0,99	0,319
<i>ADRB1(389)</i> _CC × <i>ACE</i> _DD × <i>AGT</i> _аллель C	<b>33</b>	<b>14</b>	<b>7,55</b>	<b>0,006</b>	14	15	0,04	0,841
<i>ADRB1(49)</i> _AA × <i>ACE</i> _I ID × <i>ADRB2(16)</i> _GG	<b>29</b>	<b>11</b>	<b>7,919</b>	<b>0,005</b>	11	13	0,19	0,663
<i>ACE</i> _DD × <i>ADRB2(27)</i> _CC × <i>CMA1</i> _аллель G	<b>17</b>	<b>3</b>	<b>9,49</b>	<b>0,002</b>	7	8	0,07	0,788
<i>CYP11B2</i> _CC × <i>CMA1</i> _AG	22	18	0,21	0,646	<b>17</b>	<b>7</b>	<b>4,74</b>	<b>0,029</b>
<i>CYP11B2</i> _аллель C × <i>CMA1</i> _аллель G × <i>ADRB1(49)</i> _AA	63	60	0,01	0,920	<b>52</b>	<b>31</b>	<b>9,148</b>	<b>0,003</b>
<i>CMA1</i> _аллель G × <i>ADRB1(49)</i> _AA × <i>ADRB2(16)</i> _GA	41	32	0,78	0,378	<b>35</b>	<b>18</b>	<b>7,446</b>	<b>0,006</b>
<i>CMA1</i> _аллель G × <i>ADRB2(16)</i> _аллель G	96	94	0,19	0,665	<b>74</b>	<b>54</b>	<b>8,84</b>	<b>0,003</b>
<i>CMA1</i> _GG × <i>CYP11B2</i> _CT × <i>ACE</i> _II	6	3	0,84	0,504	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>6,19</b>	<b>0,029</b>

Примечание. Полу жирным шрифтом выделены достоверные различия между группой пациентов и контролем

Анализ данных (табл. 3) показал наличие значительного полового диморфизма в ассоциациях комбинаций исследуемых полиморфизмов с риском развития клинических проявлений ГКМП. Для мужчин с данным заболеванием неблагоприятными являются сочетание генотипа AA (Ser49Gly) и CC (Arg389Gly) гена *ADRB1*. Комбинации, включающие хотя бы один из этих генотипов *ADRB1*, и определенные варианты генов, кодирующих белки РААС (*ACE*, *CMA1*, *AGT*), увеличивали риск проявления фенотипа ГКМП у мужчин. У женщин полиморфные варианты генов РААС (*CYP11B2* и *CMA1*) оказывали определяющее влияние, которое усиливалось в комбинации с представлен-

ными в табл. 3 генотипами генов *ADRB1* (Ser49Gly), *ADRB2* (Arg16Gly) и *ACE*. В отношении гена *ACE* следует отметить, что для мужчин рисковую значимость имели комбинации с аллелем D, тогда как у женщин – с аллелем I. Сочетание генотипов «*CMA1*\_GG × *CYP11B2*\_CT × *ACE*\_II» было выявлено только у женщин с ГКМП и не встречалось в контрольной группе.

Наряду с рисковыми комбинациями были обнаружены сочетания полиморфных локусов генов САС и РААС, которые чаще встречались в контрольной группе по сравнению с группой пациентов и тем самым являлись протективными в отношении реализации клинических проявлений ГКМП (табл. 4).

Таблица 4

## Наиболее значимые протективные комбинации генотипов

Комбинации генотипов	Мужчины, n				Женщины, n			
	Пациенты n=179	Контроль n=168	$\chi^2$	<i>P</i>	Пациенты n=99	Контроль n=99	$\chi^2$	<i>P</i>
<i>ADRB1(49)_AG</i> × <i>ADRB1(389)_CG</i>	12	23	4,66	0,031	4	13	4,12	0,042
<i>ADRB1(49)_AG</i> × <i>ADRB1(389)_CG</i> × <i>ADRB2(16)_GG</i>	2	13	9,19	0,003	1	6	3,70	0,118
<i>ADRB1(49)_AG</i> × <i>ADRB1(389)</i> _аллель С	35	55	7,84	0,005	21	32	3,12	0,078
<i>ADRB1(49)_AG</i> × <i>CYP11B2)_CT</i>	13	28	7,36	0,007	10	15	1,15	0,285
<i>ADRB1(389)_CG</i> × <i>ADRB2(16)_GG</i> × <i>AGTR1)_AA</i>	8	23	9,06	0,003	5	8	0,33	0,566
<i>ADRB1(389)_CG</i> × <i>ADRB2(16)_GG</i> × <i>CMA1)_AG</i>	11	25	7,11	0,008	7	7	0	1
<i>ACE)_аллель I</i> × <i>ADRB2(27)_CC</i> × <i>CMA1)_AG</i>	10	30	12,79	0,0004	9	12	0,48	0,489
<i>CMA1)_AA</i> × <i>CYP11B2)_T</i>	44	38	0,19	0,667	11	25	6,65	0,010
<i>CYP11B2)_аллель T</i> × <i>CMA1)_AA</i> × <i>ACE)_II</i>	6	10	1,33	0,248	0	7	7,26	0,014
<i>CMA1)_AA</i> × <i>ADRB2(16)_аллель G</i>	49	41	0,39	0,528	12	27	7,18	0,007
<i>CMA1)_AA</i> × <i>ADRB1(49)_аллель A</i> × <i>ADRB2(16)_аллель G</i>	46	41	0,08	0,781	11	26	7,48	0,006
<i>CYP11B2)_аллель T</i> × <i>CMA1)_AA</i> × <i>ADRB2(16)_аллель G</i>	35	29	0,30	0,582	8	22	7,7	0,006

Примечание. Полужирным шрифтом выделены достоверные различия между группой пациентов и контролем

Независимо от пола было выявлено статистически значимое уменьшение в 2,3 раза частоты встречаемости двойной гетерозиготы «*ADRB1(49)\_AG* × *ADRB1(389)\_CG*» у пациентов с диагнозом ГКМП по сравнению с контрольной группой. Усиление протективной значимости этого гаплотипа наблюдалось в сочетании его с гомозиготным генотипом GG полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2*: комбинация «*ADRB1(49)\_AG* × *ADRB1(389)\_CG* × *ADRB2(16)\_GG*» еще реже (достоверно в 6 раз) встречалась у пациентов с ГКМП обоих полов по сравнению с контролем.

У мужчин защитная роль комбинации одного из перечисленных генотипов *ADRB1* увеличивалась также в присутствии генотипа CT гена *CYP11B2*, генотипа AA гена *AGTR1* и генотипа CC гена *ADRB2* (Gln27Glu). В группе женщин с ГКМП протективная значимость генотипа AA гена *CMA1* и аллеля T гена *CYP11B2* усиливалась в комбинации с определенными вариантами гена *ADRB2* и генотипом II гена *ACE*. Сочетание генотипов «*CYP11B2)\_аллель T* × *ACE)\_II* × *CMA1)\_AA*» было обнаружено только в контрольной группе женщин и не выявлено у пациенток с ГКМП.

Надо сказать, что некоторые генотипы входили в состав как «благоприятных», так и «неблагоприятных» комбинаций. Например, у мужчин генотип СС гена *ADRB2* (полиморфизм Gln27Glu) в сочетании с II генотипом гена *ACE* имел протективное значение, а в комбинации с генотипом DD этого же гена повышал риск проявления фенотипа ГКМП. Можно предположить, что в данном случае определяющее значение имеют варианты гена *ACE*, однако эффект его наиболее ярко проявляется у носителей генотипа СС гена *ADRB2*. Аналогичная картина наблюдалась у женщин в отношении генотипа АА полиморфизма Ser49Gly гена *ADRB1*, прогностическая значимость которого существенно зависела от генотипов *CMA1* и *CYP11B2*.

Следует подчеркнуть, что различия в частоте встречаемости генотипов II и DD гена *ACE* в исследуемых группах в целом были не значимы или имели характер тенденции (в группе мужчин) (табл. 1), в то время как при сочетании данных генотипов с определенными полиморфными вариантами других генов эти различия становились статистически значимыми. Из данных литературы известно, что аллель D ассоциирован с почти двукратным увеличением содержания ангиотензин-превращающего фермента, а также с повышенным риском развития кардиомиопатии у индусов и европейцев [2, 19, 20]. В нашем исследовании показано, что генотип DD или аллель D являлись рисковыми при наличии определенных генотипов других генов, кодирующих белки РААС и САС.

### Заключение

В результате проведенного анализа с использованием метода MDR был установлен сложный характер межгенных взаимодействий САС и РААС, которые, по-видимому, оказывают существенное влияние на реализацию клинических проявлений ГКМП, а также на проявление полового диморфизма в патогенезе этого заболевания. Выявлены рискованные и протективные комбинации определенных аллелей и генотипов с учетом половой принадлежности пациентов. Построены наиболее оптимальные модели взаимодействия аллелей генов: наибольшую прогностическую значимость в формировании фенотипа ГКМП у мужчин имела 2-х-локусная модель

взаимодействия генов «*ADRB1(49) × ACE*» ( $P < 0,0001$ ), у женщин – 4-х-локусная «*CMA1 × CYP11B2 × ACE × ADRB2(16)*» ( $P < 0,0001$ ).

Показано также, что прогностическая значимость генотипа *ACE* в патогенезе ГКМП зависит от пола пациента и модифицируется присутствием определенных генотипов других генов, кодирующих белки РААС и САС.

### Список использованных источников

1. Коваленко, В.Н. Ренин-ангиотензиновая система в кардиальной патологии / В.Н. Коваленко, Т.В. Талаева, В.В. Братусь // Укр. кардіол. журн. – 2012. – № 3. – С. 105–129.
2. Impact of polymorphisms In the renin-angiotensin-aldosterone system on hypertrophic cardiomyopathy / E. Orenes-Piñero [et al.] // J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst. – 2011. – Vol. 12, № 4. – P. 521-530.
3. Brodde, O.E. Beta-1 and beta-2 adrenoceptor polymorphisms: functional Importance, Impact on cardiovascular diseases and drug responses / O.E. Brodde // Pharmacol. Ther. – 2008. – Vol. 117. – P. 1-29.
4. Wang, J.G. Genetic polymorphisms In the renin-angiotensin system: relevance for susceptibility to cardiovascular disease / J.G. Wang, J.A. Staessen // Eur. J. Pharmacol. – 2000. – Vol. 410. – P. 289–302.
5. Khullar, M. Role of modifier genes In Idiopathic cardiomyopathies / M. Khullar, B. Hooda, A. Bahl // Atherosclerotic Cardiovascular Disease. – InTech, 2011. – Ch. 3 – P. 57–70.
6. Osadchii, O.E. Cardiac hypertrophy Induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects / O.E. Osadchii // Heart. Fail. Rev. – 2007. – Vol. 12, № 1. – P. 66–86.
7. Влияние полиморфизма генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы на выраженность клинических признаков гипертрофической кардиомиопатии / С.С. Ниязова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2013. – Т. 16. – С. 16–23.
8. Гендерные особенности распределения полиморфных вариантов генов *ADRB1*, *ADRB2*, *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *CYP11B2* и *CMA1* у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией / С.С. Ниязова [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2014. – № 4. – С. 44-50.

9. Moore, J.H. New strategies for Identifying gene-gene Interactions In hypertension / J.H. Moore, S.W. Williams // *Ann. Med.* – 2002. – Vol. 34. – P. 88–95.
10. Maron, M.S. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives / B.J. Maron, M.S. Maron, C. Semsarian // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2012. – Vol. 60, № 8. – P. 705–715.
11. Seidman, J.G. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation Identification to mechanistic paradigms / J.G. Seidman, C. Seidman // *Cell.* – 2001. – Vol. 104, № 4. – P. 557–567.
12. Pinsonneault, J. Pharmacogenomics of multigenic diseases: sex-specific differences In disease and treatment outcome / J. Pinsonneault, W. Sadée // *AAPS PharmSci.* – 2003. – Vol. 5, № 4. – E 29.
13. The sex-specific genetic architecture of quantitative traits In humans / L.A. Weiss [et al.] // *Nat Genet.* – 2006. – Vol. 38, № 2. – P. 218–222.
14. Ober, C. Sex-specific genetic architecture of human disease / C. Ober, D.A. Loisel, Y. Gilad // *Nat Rev Genet.* – 2008. – Vol. 9, № 12. – P. 911–922.
15. Gender-related differences In the clinical presentation and outcome of hypertrophic cardiomyopathy / I. Olivotto [et al.] // *JACC.* – 2005. – Vol. 46, № 3. – P. 480–487.
16. Heng, O.K. Lack of association of apolipoprotein E polymorphism with plasma Lp(a) levels In the Chinese / O.K. Heng, N. Saha, J.S. Toy // *Clin. Genetics.* – 1995. – Vol. 48, № 3. – P. 113–119.
17. Гормональный континуум женского здоровья: эволюция сердечно-сосудистого риска от менархе до менопаузы / Н.М. Подзолкова [и др.] // *Сердце.* – 2004. – № 6. – С. 276–279.
18. Reckelhoff, J.F. Sex steroids, cardiovascular disease, and hypertension: unanswered questions and some speculations / J.F. Reckelhoff // *Hypertension.* – 2005. – Vol. 45, № 2. – P. 170–174.
19. Lechin, M. Angiotensin-I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy In patients with hypertrophic cardiomyopathy / M. Lechin // *Circulation.* – 1995. – Vol. 92. – P. 1808–1812.
20. The effect of polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes on the phenotypic expression of Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy / J. Lopez-Haldon [et al.] // *Med. Clin.* – 1999. – Vol. 113. – P. 161–163.

N.N. Chakova<sup>1</sup>, S.S. Niyazova<sup>1</sup>, S.M. Komissarova<sup>2</sup>

## INTERGENIC INTERACTION OF SYMPATHOADRENAL AND RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERONE SYSTEMS GENES POLYMORPHISM IN HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus

Minsk BY-220072, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Scientific and Practical center of Cardiology

Minsk BY-220036, Belarus

The multifactor-dimensionality reduction (MDR) method was used to identify gene-gene interactions between genetic variants in the renin-angiotensin-aldosterone system (*AGT* (T174M), *AGTR1* (1166A>C), *CMA1* (–1903A>G), *ACE* (I/D), *CYP11B2* (–344C>T)) and the sympathetic nervous system (*ADRB1* (Ser49Gly, Arg389Gly), *ADRB2* (Arg16Gly, Gln27Glu)) in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Gender differences in the interaction of genes studied and their different prognostic significance for HCM patients were found. The modeling of these genes intergenic polymorphisms interactions has been carried out. Combinations of polymorphic loci with the most pathogenetic significance in HCM realization were identified.

**Key words:** genetic polymorphism, renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), sympathoadrenal system (SAS), intergenic interaction.

Дата поступления статьи 9 февраля 2016 г.

Н.В. Савина<sup>1</sup>, Н.В. Никитченко<sup>1</sup>, Т.Д. Кужир<sup>1</sup>, С.Л. Поляков<sup>2</sup>, А.И. Ролевич<sup>2</sup>, С.А. Красный<sup>2</sup>,  
Р.И. Гончарова<sup>1</sup>

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК: ВЛИЯНИЕ НА РЕЦИДИВИРОВАНИЕ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ У БЕЛОРУССКИХ ПАЦИЕНТОВ

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: R.Goncharova@igc.by

<sup>2</sup>РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова

Республика Беларусь, 223040, Минский р-н, а/г Лесной

Представлены результаты генотипирования образцов ДНК, полученных от пациентов с установленным диагнозом рак мочевого пузыря (РМП), по полиморфизму генов эксцизионной репарации нуклеотидов *XPД* (Asp312Asn и Lys751Gln), *ERCC6* (Met1097Val и Gly399Asp) и оснований *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys). Проанализировано распределение частот генотипов и аллелей перечисленных генов у пациентов с первичным и рецидивным раком. Обнаружено влияние полиморфизма гена *XPД* Lys751Gln на рецидивирование РМП в группе курящих пациентов. У носителей гетерозиготного генотипа этого гена, курящих 30 и более лет, риск развития рецидивов повышался в 3–5 раз при его сочетании с гетерозиготами в других локусах: *XRCC1* (кодон 399), *ERCC6* (кодоны 1097 и 399). Выявлена ассоциация аллеля *XPД* 312Asn с рецидивными опухолями высокой степени злокачественности.

**Ключевые слова:** эксцизионная репарация ДНК; полиморфизм генов *XPД*, *XRCC1*, *OGG1*, *ERCC6*; рак мочевого пузыря, рецидивирование.

### Введение

Рак мочевого пузыря (РМП) относится к распространенным онкологическим заболеваниям, ежегодно диагностируется примерно у 1200 жителей Республики Беларусь и уносит жизни более 400 человек [1]. Приблизительно 90% опухолей мочевого пузыря представлены уротелиальной карциномой. По клинико-морфологическим признакам РМП делится на 2 основные группы: без мышечной инвазии (РМП БМИ) и мышечно-инвазивный (МИ РМП) [2, 3]. Около 75% опухолей на момент постановки диагноза являются неинвазивными (T<sub>a</sub>/T<sub>1</sub>). Мышечно-инвазивный рак (T ≥ 2) регистрируется у 25% пациентов, которые обычно подвергаются цистэктомии и для которых характерен неблагоприятный прогноз: 50%-я смертность в течение пяти лет вследствие прогрессии и метастазирования опухоли. У 70–80% пациентов с РМП БМИ в течение пяти лет развиваются рецидивные опухоли, которые в 10–20% случаев прогрессируют в мышечно-инвазивную форму.

В настоящее время уделяется большое внимание разработке критериев, позволяющих прогнозировать прогрессию и рецидивирование рака у отдельного пациента. Выбор метода лечения и прогнозирование дальнейшего течения РМП базируются на его принадлежности к определенной классификационной категории, включающей стадию распространения (T) и степень дифференцировки (G) опухоли, а также ряд клинических и морфологических признаков [4, 5]. Однако отдаленные результаты лечения пациентов, относящихся к одним и тем же классификационным подгруппам и получавших одинаковое лечение, существенно различаются. Очевидно, что для полноценного прогноза клинического исхода необходима дополнительная информация, прежде всего, об индивидуальных генетически детерминированных факторах, определяющих как чувствительность клеток и организма к канцерогенезу, так и свойства самой опухоли.

Изучение молекулярной природы РМП привело к выделению ключевых мутаций, запускающих патогенез заболевания по двум аль-

тернативным путям [6]. Установлена также важная роль эпигенетической изменчивости некоторых генов [7]. Однако следует учитывать вклад в развитие РМП полиморфизма генов, участвующих в детоксикации ксенобиотиков и поддержании целостности и стабильности генома [8]. Среди таких – гены репарации ДНК [9]. Ранее нами изучено влияние полиморфизма некоторых генов эксцизионной репарации ДНК на чувствительность белорусских пациентов к РМП, а также выявлены ассоциации некоторых аллелей полиморфных локусов с клинико-патологическими характеристиками опухоли [10–13]. Обнаружено, что аллельные варианты гена *XPД* (кодоны 312 и 751) ассоциированы с риском развития заболевания и степенью злокачественности мышечно-инвазивных опухолей. Показана ассоциация *ERCC61097 Val/Val* генотипа с  $T \geq 2$  опухолями, распространяющимися на мышечный слой, подлежащие ткани и органы малого таза. Гетерозиготный генотип гена *OGG1* (кодон 326), наоборот, снижал риск развития РМП и был ассоциирован с неоплазмами с низким злокачественным потенциалом.

Цель данного исследования – изучить влияние полиморфизма генов эксцизионной репарации нуклеотидов *XPД* (rs1799793, rs13181), *ERCC6* (rs2228526, rs2228528) и эксцизионной репарации оснований *OGG1* (rs1052133), *XRCC1* (rs25487) на рецидивирование РМП. Выбор генов обусловлен их функциями, и в первую очередь, участием соответствующих продуктов в репарации повреждений ДНК, вызванных окислительным стрессом, который расценивается как важнейший фактор инициации и прогрессии рака [14, 15].

### Материалы и методы

Группа обследования состояла из 418 пациентов, подлежащих диагностической или лечебной трансуретральной резекции мочевого пузыря на базе отделения онкоурологической патологии РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова. Отбор биологического материала (периферической венозной крови) проводился сотрудниками медицинского учреждения после подписания участниками исследования информированного согласия; всем участникам гарантирова-

лась конфиденциальность сведений личного характера. На каждого пациента оформлялся протокол, содержащий такие данные как пол, возраст, статус курильщика и длительность курения, а также клинические и морфологические данные, включая макроскопическое и микроскопическое описание опухоли. Стерильно взятые образцы цельной крови в количестве 3–5 мл хранились в вакуутайнерах с распыленным ЭДТА при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до начала молекулярно-генетических исследований.

*Объект исследования* – геномная ДНК, выделенная из образцов цельной венозной крови стандартным фенол-хлороформным методом.

*Анализ полиморфизма генов репарации ДНК* *XPД* (rs1799793, rs13181), *ERCC6* (rs2228526, rs2228528), *OGG1* (rs1052133), *XRCC1* (rs25487) проводили с помощью полимеразной цепной реакции с определением длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ-метод). Праймеры, рестрикционные эндонуклеазы, условия и продукты ПЦР подробно описаны ранее [10–13].

Для статистической обработки данных использован пакет стандартных программ Microsoft Excel 2000 и Statistica 6. Различия в частотах тех или иных генотипов (аллелей), так же, как и других альтернативных показателей, определяли по критерию  $\chi^2$ , тогда как для выявления различий по количественным признакам применяли *t-тест* Стьюдента. Для определения вероятности (риска) развития рецидивов рака, а также более агрессивного течения заболевания вычисляли отношение шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) в соответствии с известными рекомендациями.

### Результаты и обсуждение

*Характеристика группы пациентов с гистологически установленным РМП* представлена в табл. 1. Эта группа состояла преимущественно из мужчин (82%) и пожилых людей (средний и медианный возраст – 67 лет). Курящие составляли 68% выборки. Эти особенности укладывались в известную демографическую картину РМП как болезни, зависимой от возраста, пола и курения [16].

По данным морфологического и гистологического исследования удаленных при трансуретральной резекции опухолей, наиболее часто выявлялась уротелиальная карцинома Та/

T1 (около 70%); опухоли T2 составляли 17%; T3/T4 – 13%. По степени дифференцировки опухолей, в соответствии с классификацией 1973 г., 33% относились к G1, 45% – G2 и чуть более 20% – G3. В соответствии с классификацией 2004 г., 58% были представлены low grade, а 37% – high grade опухолями. CIS (карцинома *in situ*) занимала 0,2%; в 0,4% случаев не указана стадия T и в 1,4–2,2% – степень дифференцировки и злокачественности опухолевой ткани (G, low/high grade). Рецидивы РМП встречались примерно в 36% случаев.

Таким образом, в данной проспективной когорте пациентов, насчитывающей 418 человек, наиболее часто диагностировались опухоли на стадии T1 G1–G2 (высоко- и умеренно дифференцированный рак без мышечной инвазии). Однако почти у трети пациентов выявлены опухоли на стадии T2–T4 (мышечно-инвазивный рак и опухоль, распространяющаяся на околопузырные ткани и органы малого таза), что свидетельствовало о необходимости совершенствования методов ранней диагностики и прогноза клинического течения заболевания.

Таблица 1

Характеристика группы пациентов с установленным диагнозом РМП;  
клинико-морфологические параметры опухоли

Признаки		Пациенты		
		n	Частота, %	
Пол	Мужской	344	82,3	
	Женский	74	17,7	
Возраст (лет)	Min	31	–	
	Max	93	–	
	Mean ± SD	–	66,7±10,9	
	Median	67	–	
Курение	Курит	283	67,7	
	Не курит	117	28,0	
	Нет данных	18	4,3	
Стадия опухоли	TIS	1	0,2	
	Ta	91	21,8	
	T1	198	47,4	
	T2	72	17,2	
	T3	27	6,5	
	T4	27	6,5	
	Нет данных	2	0,4	
Степень дифференциации	1973	CIS	1	0,2
		G1	139	33,3
		G2	186	44,5
		G3	86	20,6
		Нет данных	6	1,4
	2004	PUNLMP	11	2,6
		CIS	1	0,2
		Low	241	57,7
		High	156	37,3
		Нет данных	9	2,2
Первичные/ рецидивные опухоли	Первичные	268	64,1	
	Рецидивные	150	35,9	

Анализ полиморфизма генов репарации ДНК *OGG1*, *XRCC1*, *XPB* и *ERCC6* при первичных и рецидивных опухолях. Функциональная характеристика генов и описание аллельных вариантов дана в предыдущих публикациях [10–13]. Результаты генотипирования представлены в табл. 2. Установлено, что генотипы по всем изученным вариантам распределены одинаково в группах пациентов с первичными и рецидивными опухолями. При учете таких этиологически важных факторов, как пол и курение, не обнаружено существенных различий между первичными и рецидивными опухолями у мужчин, тогда как у курящих пациентов с рецидивами РМП частоты гомозигот дикого типа и гетерозигот по гену *XPB* (кодон 751) существенно отли-

чались от этих показателей при первичных опухолях. Вероятность появления рецидивов на фоне гетерозиготного генотипа *XPB* 751 Lys/Gln почти удваивалась (OR [95%IC] = 1,77 [1,07–2,94]  $P = 0,026$ ). Суммарная частота генотипов, содержащих вариант *XPB* 751 Gln, у пациентов с рецидивными опухолями также оказалась существенно выше: 80,4% по сравнению с 68% при первичных опухолях ( $P = 0,028$ ) (данные представлены на рис. 1). Сходные, но статистически не доказанные ассоциации отмечены для полиморфизма *XRCC1* Arg 399Gln. У носителей гетерозиготных комбинаций по этим двум локусам выражена тенденция к увеличению риска развития рецидивных опухолей: OR [95%IC] = 1,69 [0,99–2,91] ( $P = 0,055$ ).

Таблица 2

Распределение генотипов по изученным генам репарации ДНК у пациентов с первичными и рецидивными опухолями

Генотипы	РМП (вся выборка)		Пол (мужчины)		Курение (вся выборка)	
	Первичные	Рецидивные	Первичные	Рецидивные	Первичные	Рецидивные
<b><i>OGG1</i> 326</b> rs1052133	n = 269	n = 149	n = 222	n = 121	n = 180	n = 103
Ser/Ser, %	67,7	67,1	69,4	66,9	70,0	66,0
Ser/Cys, %	28,6	28,2	27,5	28,1	26,1	28,2
Cys/Cys, %	3,7	4,7	3,2	5,0	3,9	5,8
<b><i>XRCC1</i> 399</b> rs25487	n = 269	n = 150	n = 222	n = 121	n = 180	n = 103
Arg/Arg, %	42,0	40,0	41,0	36,4	41,7	35,9
Arg/Gln, %	46,8	48,7	48,2	52,1	45,6	53,4
Gln/Gln, %	11,2	11,3	10,8	11,6	12,8	10,7
<b><i>XPB</i> 312</b> rs1799793	n = 269	n = 149	n = 222	n = 121	n = 180	n = 103
Asp/Asp, %	30,5	31,5	31,0	30,6	28,9	27,2
Asp/Asn, %	52,8	51,7	52,3	50,4	53,9	52,4
Asn/Asn, %	16,7	16,8	16,7	19,0	17,2	20,4
<b><i>XPB</i> 751</b> rs13181	n = 265	n = 144	n = 220	n = 115	n = 178	n = 97
Lys/Lys, %	30,9	27,1	30,5	25,2	<b>32,0</b>	<b>19,6*</b>
Lys/Gln, %	50,6	56,9	51,8	58,3	<b>47,75</b>	<b>61,9*</b>
Gln/Gln, %	18,5	16,0	17,7	16,5	20,2	18,6
<b><i>ERCC6</i> 1097</b> rs2228526	n = 269	n = 150	n = 222	n = 121	n = 180	n = 103
Met/Met, %	49,5	49,3	48,2	46,3	50,0	45,6
Met/Val, %	43,1	44,0	44,1	46,3	42,2	46,6

## Продолжение табл. 2

Генотипы	РМП (вся выборка)		Пол (мужчины)		Курение (вся выборка)	
	Первичные	Рецидивные	Первичные	Рецидивные	Первичные	Рецидивные
Val/Val, %	7,4	6,7	7,7	7,4	7,8	7,8
<b>ERCC6 399</b> rs2228528	n = 268	n = 145	n = 221	n = 118	n = 179	n = 102
Gly/Gly, %	65,7	73,1	67,4	72,0	67,0	73,5
Gly/Asp, %	30,6	25,5	29,4	26,3	29,6	24,5
Asp/Asp, %	3,7	1,4	3,2	1,7	3,4	2,0

Примечание. Существенные различия между группами курящих пациентов с первичными и рецидивными опухолями при  $P = 0,028$  для гомозигот дикого типа и  $P = 0,025$  для гетерозигот по локусу rs13181.

Результаты дальнейшего исследования эффектов продолжительного курения на рецидивирование РМП на фоне тех или иных изученных генотипов показаны на рис. 2. У пациентов, курящих 30 и более лет, как и во всей

группе курящих, наблюдались существенные различия между рецидивными и первичными опухолями по гену *XPB* (кодон 751), и сходная тенденция намечалась по гену *XRCC1* (кодон 399) (рис. 2 а).

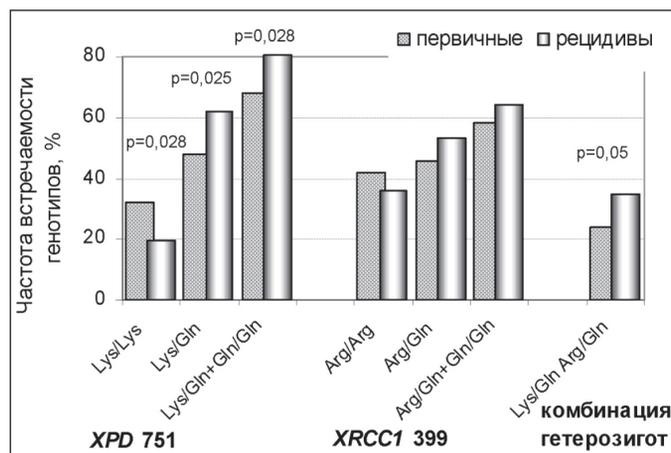


Рис. 1. Распределение генотипов по генам *XPB* (кодон 751) и *XRCC1* (кодон 399) у курящих пациентов с первичными и рецидивными опухолями

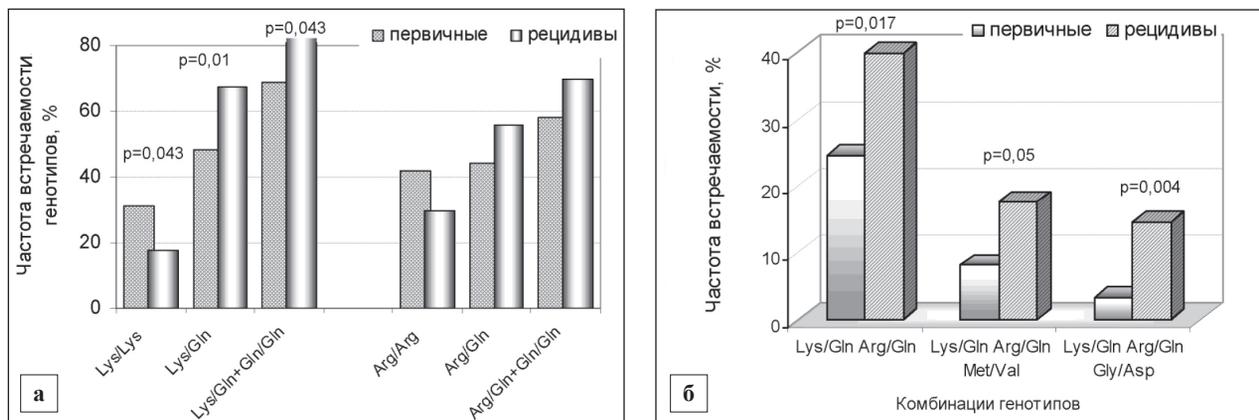


Рис. 2. Распределение некоторых генотипов и их комбинаций у пациентов с первичными и рецидивными опухолями при курении более 30 лет: а – частоты генотипов *XPB* Lys751Gln и *XRCC1* Arg399Gln; б – комбинации гетерозигот *XPB* 751 Lys/Gln, *XRCC1* 399 Arg/Gln, *ERCC6* 1097Met/Val, *ERCC6* 399 Gly/Asp

Характерно, что комбинация, содержащая гетерозиготы по этим двум локусам (рис. 2 б), была ассоциирована с рецидивными опухолями при OR [95%CI] = 2,15 [1,14–4,05] ( $P = 0,018$ ) – для Lys/Gln Arg/Gln. Значение OR значительно увеличивалось при сочетании этой комбинации с гетерозиготой *ERCC6* 1097 Met/Val: OR [95%CI] = 2,92 [1,18–7,23] ( $P = 0,02$ ) – для Lys/Gln Arg/Gln Met/Val, и особенно – с гетерозиготой *ERCC6* 399 Gly/Asp: OR [95%CI] = 5,09 [1,53–16,91] ( $P = 0,008$ ) – для Lys/Gln Arg/Gln Gly/Asp. Данные позволяют предположить, что полиморфизм гена *ERCC6*, который сам по себе не связан с рецидивными опухолями (в том числе и при курении), может увеличивать вероятность появления рецидивов у носителей двух других гетерозигот, курящих 30 и более лет.

Подтверждено определяющее влияние гетерозиготы *XPB* 751 Lys/Gln на опухолеобразование в мочевом пузыре, которое проявлялось не только в отношении инициации рака [13], но и возникновения рецидивов, как во всей группе курящих пациентов, так и при длительном ( $\geq 30$  лет) курении. Риск значимости этого генотипа повышалась при его комбинации с гетерозиготами по некоторым другим локусам.

*Распределение аллельных вариантов генов эксцизионной репарации ДНК у пациентов с первичными и рецидивными опухолями в зависимости от их распространенности и степени злокачественности.* Принципиальное значение для прогноза имеет стадия заболевания, которая определяется в соответствии с международной системой TNM (Tumor, Nodus, Metastasis). По этой классификации различают опухоли Та (неинвазивная папиллярная карцинома), Т1 (опухоль распространяется на субэпителиальную соединительную ткань), Т2 (опухоль инвазия мышечного слоя), Т3 (опухоль распространяется на паравезикальную клетчатку), Т4 (опухоль распространяется на органы малого таза) [2]. Стадии Та/Т1 характеризуют РМП БМИ, тогда как стадии  $T \geq 2$  свойственны инвазивному раку. Дифференциация опухолевой ткани отражает степень ее злокачественности. По классификации ВОЗ 1973 г., различают 3 степени (G1, G2, G3), соответствующие высоко-, умеренно- и низкодифференцированным

карциномам [2]. По классификации 2004 г., уротелиальные карциномы делятся на папиллярные опухоли с низким злокачественным потенциалом (PNLMP), опухоли низкой степени злокачественности (low grade), в категорию которых попадают все G1 и частично G2, и опухоли высокой степени злокачественности (high grade), поглощающие все G3 и частично G2 [2]. Мы проанализировали распределение генотипов/аллелей изученных генов в зависимости от этих категорий отдельно при первичных и рецидивных опухолях.

У пациентов с первичным РМП, так же, как и во всей выборке [13], существенные различия относительно инвазивности опухоли найдены только по гену *ERCC6* 1097: частота гомозигот по варианту *ERCC6* 1097Val при опухолях  $T \geq 2$  (12,9%) в 3 раза превосходила их частоту (4,2%) при неоплазмах Та/Т1 ( $P = 0,008$ ). При стратификации выборки пациентов с первичным РМП на категории Та/Т1 low grade, Та/Т1 high grade,  $T \geq 2$  low grade и  $T \geq 2$  high grade подтверждена рискованная значимость гомозиготного генотипа *ERCC6* 1097 Val/Val, частота которого составляла 12,3% у пациентов с МИ РМП высокой степени злокачественности и 4,6% – при РМП БМИ низкой степени злокачественности ( $P = 0,037$ ). Частота этого же генотипа была выше (но статистически не значимо) у пациентов с рецидивами РМП: 11,5% при инвазивных опухолях и 5,8% при РМП БМИ, соответственно. Возможно, наблюдаемые в этом случае различия не достигли статистической значимости из-за размера выборки (150 пациентов).

У пациентов с рецидивными опухолями гетерозиготы и генотипы, содержащие хотя бы один аллель *XPB* 312Asn, превалировали при высокой степени злокачественности (47,4% и 73,7%, соответственно) по сравнению с неоплазмами низкой степени злокачественности (27,7% и 49,2%, соответственно). Рис. 3 демонстрирует статистически значимые различия между low и high grade опухолями, касающиеся гена *XPB* (кодон 312), и сходные тенденции относительно другого полиморфного локуса этого гена (кодон 751), а также гена *OGG1* (кодон 326).

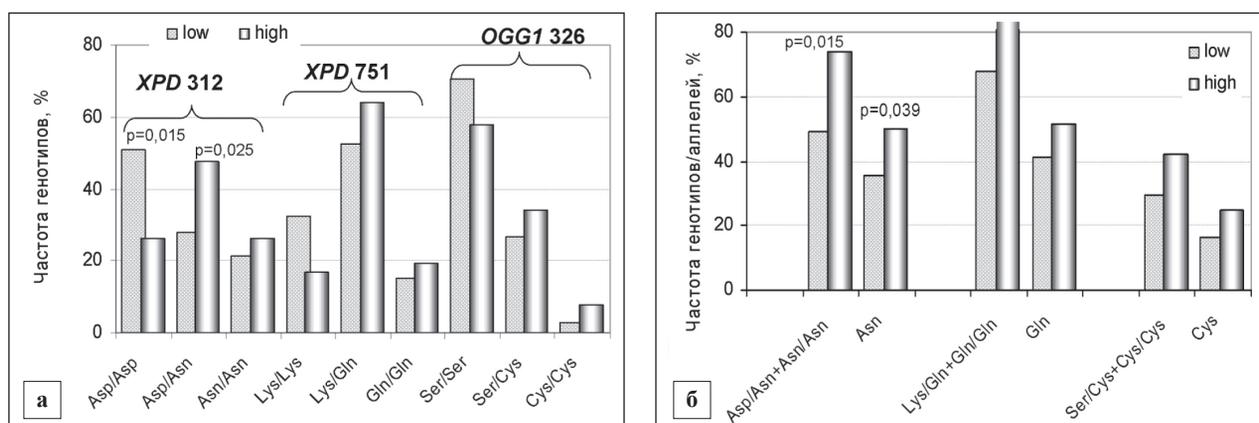
Таким образом, вариант гена *ERCC6* 1097Val в гомозиготном состоянии влиял на инвазивность и степень злокачественности первичных

опухолей: OR [95%CI] = 3,40 [1,31–8,83]  $P = 0,012$ ) при  $T \geq 2$  по сравнению с Ta/T1; OR [95%CI] = 2,93 [1,02–8,41] ( $P = 0,045$ ) при  $T \geq 2$  high grade по сравнению с Ta/T1 low grade карциномами. Наличие полиморфного аллеля Asn увеличивало вероятность развития рецидивных опухолей высокой степени злокачественности (high grade) по сравнению с опухолями низкой степени злокачественности (low grade): OR [95%CI] = 2,35 [1,02–5,43] ( $P = 0,045$ ) для гетерозиготного генотипа *XPD* 312 Asp/Asn и OR [95%CI] = 1,83 [1,03–3,25] ( $P = 0,040$ ) для варианта *XPD* 312Asn.

*Влияние полиморфных вариантов некоторых генов эксцизионной репарации ДНК на клиническое течение рака мочевого пузыря.* Ранее упоминалось, что существуют мутации, запускающие опухолевый процесс по альтернативным путям патогенеза. Обнаружено, что активирующие мутации в гене *FGFR3* приводят к развитию РМП без мышечной инвазии, тогда как мутации гена-супрессора *TP53* – к мышечно-инвазивному раку. Однако значительная часть опухолей (38%) имеет «дикий» генотип по этим мутациям, и, следовательно, может развиваться по иному молекулярно-генетическому пути [17]. С помощью полногеномного секвенирования установлена роль в развитии РМП мутационной изменчивости некоторых других генов (*RBI*, *PIK3CA*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *CDKN2A*, *TSC1*) [18]. Известно

об определенном вкладе эпигенетической изменчивости в патогенез этого заболевания [7], что подтверждается высокой частотой метилирования промоторной области гена *RUNX3* при РМП, а также наличием обратной корреляции между статусом метилирования этого гена и мутационной изменчивостью *FGFR3* при отсутствии ассоциации с частотой мутаций в гене *TP53* [19]. Кроме того, показано, что эпигенетическая изменчивость *RUNX3* является независимым фактором риска в отношении прогрессирования и онкоспецифической выживаемости пациентов с РМП без мышечной инвазии.

В отличие от известных ключевых мутаций, генетический полиморфизм не оказывает столь значительного и специфического действия на процесс канцерогенеза. Однако его существенная роль в онкопатологии доказывается многочисленными работами, в том числе и широкогеномным исследованием (GWAS), в ходе которого идентифицировано более 300 доказанных ассоциаций между генетическими вариациями и 70 общими болезнями [8]. Следует отметить, что функции генов, имеющих отношение к раку мочевого пузыря, сфокусированы на детоксикации ксенобиотиков, сохранении целостности и стабильности генома, контроле клеточного деления и апоптоза. Целостность и стабильность генома поддерживаются системами репарации ДНК и зависят от эффективности и точности этого



**Рис. 3.** Распределение генотипов/аллелей у пациентов с рецидивными опухолями в зависимости от дифференциации и степени злокачественности опухолевой ткани: а – частота гетерозигот *XPD* 312 Asp/Asn составляла 47,4% при низкодифференцированных (high grade) и 27,7% при высокодифференцированных (low grade) опухолях: OR [95%CI] = 2,35 [1,02–5,43] ( $P = 0,045$ ); б – аллель *XPD* 312Asn при high grade опухолях встречался с частотой 50%, тогда как при low grade неоплазмах его частота составляла 35,4%: OR [95%CI] = 1,83 [1,03–3,25] ( $P = 0,040$ ). Частоты аллеля *XPD* 751Gln составляли 51,4% и 41,4%, а *OGG1* 326Cys – 25,0% и 16,2%, соответственно

процесса. Поэтому изменчивость в полиморфных локусах генов эксцизионной репарации в связи с канцерогенезом и, в частности, с уротелиальной карциномой, представляет научный и практический интерес.

Наши предыдущие результаты подтверждают влияние полиморфизма генов *ERCC2/XPD*, *ERCC6/CSB*, *OGG1* на инициацию и прогрессирование РМП [10–13]. Модификация функций и/или активности этих генов сказывается и на рецидивировании рака. Отмечается, что все известные однонуклеотидные замены (SNP) ассоциированы с онкологическими заболеваниями при отношении шансов не более 1,5 [8], что характерно и для наших исследований. Однако, взаимодействуя друг с другом, они могут повышать риск развития РМП, и, по-видимому, изменять его клиническое течение. Так, гетерозиготное носительство минорных аллелей гена *ERCC6/CSB* (кодоны 1097 и 399) существенно не влияло на рецидивирование РМП. Однако сочетание этих гетерозигот с комбинацией гетерозиготных генотипов *ERCC2/XPD* 751 Lys/Gln и *XRCC1* 399 Arg/Gln на фоне длительного курения увеличивало риск развития рецидивов в 3–5 раз.

Изучение прогностической значимости полиморфизма генов репарации ДНК другими авторами привело к неоднозначным (зачастую противоположным) результатам. При исследовании этой проблемы в связи с эффективностью химиотерапии и выживаемостью пациентов показано, что варианты генов *XPD* 751Gln, *XRCC1* 399Gln, *OGG1* 326Cys при определенных условиях улучшают эти показатели [20–24]. Однако анализ генетического полиморфизма в связи с клинико-патологическими параметрами выявил повышение частоты рецидивов РМП у пациентов-носителей хотя бы одного аллеля *ERCC6* 1097Val [25] и влияние полиморфизма гена *APE1* на инвазивность опухоли при нейтральности других изученных вариантов (*XRCC1*, *XRCC3*, *XPD*, *XPG*, *hOGG1*) [26]. Сравнение наших результатов с данными литературы позволяет предположить, что изменение репарационных функций благодаря полиморфизму генов эксцизионной репарации ДНК, с одной стороны, повышает чувствительность опухолевых клеток к химио- или радиотерапии, но с другой, – может способствовать агрессивности РМП.

Полученные результаты дают основание полагать, что, хотя варианты изученных генов эксцизионной репарации ДНК не относятся к мутациям, ответственным за молекулярный патогенез РМП, они модифицируют риск развития и клиническое течение рака. Подтверждена целесообразность изучения полиморфизма этих генов в связи с клинико-патологическими параметрами опухолей для выявления дополнительных прогностических маркеров. К таковым можно отнести варианты *ERCC6/CSB* Met1097Val, *ERCC2/XPD* Asp312Asn, *ERCC2/XPD* Lys751Asp, преимущественно ассоциированные с распространенностью опухоли, степенью дифференциации опухолевой ткани и/или рецидивированием рака. Следует также обратить внимание на взаимодействие генов, которое в некоторых случаях существенно увеличивает рисковую значимость отдельных SNP. Чтобы повысить практическую ценность выявленных маркеров, целесообразно в будущем оценить их влияние на такие медицинские показатели как общая и онкоспецифическая выживаемость, выживаемость до прогрессирования и безрецидивная выживаемость пациентов, страдающих РМП.

### Заключение

Генотипировано 418 образцов ДНК от пациентов с гистологически установленным раком мочевого пузыря (РМП) и проанализировано распределение частот генотипов и аллелей генов эксцизионной репарации *ERCC2/XPD* (Asp312Asn и Lys751Gln), *ERCC6/CSB* (Met1097Val и Gly399Asp), *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys) в зависимости от клинико-патологических и этиологических факторов. Рецидивные опухоли наблюдались у 36% пациентов. Выявлены статистически значимые различия между группами курящих пациентов с рецидивными и первичными опухолями по полиморфизму гена *XPD* 751. У пациентов, курящих 30 и более лет, вероятность развития рецидивных опухолей значимо повышалась под влиянием гетерозиготного генотипа *XPD* 751 Lys/Gln и увеличивалась в 3–5 раз при сочетании этого генотипа с гетерозиготами в других изученных локусах (*XRCC1* Arg399Gln, *ERCC6* Met1097Val, *ERCC6* Gly399Asp). Установлена ассоциация аллеля *XPD* 312Asn и

гетерозиготного генотипа *XPB* 312 Asp/Asn с риском развития рецидивных опухолей высокой степени злокачественности. В отличие от полиморфных вариантов гена *XPB*, минорный аллель *ERCC6* 1097Val в гомозиготном состоянии ассоциирован с первичными мышечно-инвазивными опухолями высокой степени злокачественности. Указанные ассоциации свидетельствуют о возможном влиянии изученных аллельных вариантов генов эксцизионной репарации ДНК (отдельно и при их взаимодействии с этиологически важным фактором или между собой) на рецидивирование и более агрессивное течение РМП.

### Список использованных источников

1. Океанов, А.Е. Статистика онкологических заболеваний / А.Е. Океанов, П.И. Моисеев, Л.Ф. Левин; под ред. О.Г. Суконко. – Минск, 2013. – 373 с.
2. Рак мочевого пузыря TaT1 (без мышечной инвазии) / М. Vabjuk [et al.]; пер. М.Ю. Федянина, науч. ред. О.Б. Карякин. – Европейская ассоциация урологов, 2010. – С. 1–20.
3. Инвазивный и метастатический рак мочевого пузыря / А. Stenzl [et al.]; пер. О.В. Антонова, науч. ред. И.Г. Русаков – Европейская ассоциация урологов, 2010. – С. 1–63.
4. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage TaT1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials / R.J. Sylvester [et al.] // *Eur Urol.* – 2006. – Vol. 49, № 3. – P. 466–477.
5. Ather, M.H. Predicting recurrence and progression in non-muscle-invasive bladder cancer using European organization of research and treatment of cancer risk tables / M.H. Ather, M. Zaidi // *Urol. J.* – 2009. – Vol. 6, № 3. – P. 189–193.
6. FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma / B.W. van Rhijn [et al.] // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, No. 6. – P. 1911–1914.
7. Kim, Y.K. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer / Y.K. Kim, W.J. Kim // *Int. J. Urol.* – 2009. – Vol. 16, No. 1. – P. 17–22.
8. Genetic variants in urinary bladder cancer: collective power of the “wimp SNPs” / K. Golka [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2011. – Vol. 85, No. 6. – P. 539–554.
9. Полиморфизмы генов эксцизионной репарации ДНК при раке мочевого пузыря / Н.В. Савина [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр.* – 2011. – Т. 12. – С. 64–74.
10. Полиморфизм генов эксцизионной репарации *XPB*, *XRCC1* и *hOGG1* у населения Республики Беларусь и его влияние на канцерогенез / О.П. Романюк [и др.] // *Экологическая генетика.* – 2013. – Т. 11, № 4. – С. 45–63.
11. Polymorphism of DNA repair genes *OGG1*, *XRCC1*, *XPB*, and *ERCC6* in bladder cancer in Belarus / V.P. Ramaniuk [et al.] // *Biomarkers.* – 2014 – Vol. 19, No. 6. – P. 509–516.
12. Полиморфизм генов эксцизионной репарации ДНК как дополнительный фактор прогрессии рака мочевого пузыря: исследование на пациентах Беларуси / Н.В. Савина [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр.* – 2014. – Т. 18. – С. 44–52.
13. The cellular response to oxidatively induced DNA damage and polymorphism of some DNA repair genes associated with clinicopathological features of bladder cancer / N.V. Savina [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2016: 5710403. doi 10.1155/2016/5710403
14. Klaunig, J.E. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis / J.E. Klaunig, L.M. Kamendulis, B.A. Hocevar // *Toxicol. Pathol.* – 2010. – Vol. 38, No. 1. – P. 96–109.
15. The role of oxidative stress in bladder cancer / E. Sawicka [et al.] // *Postepy Hig Med Dosw (Online).* – 2015. – Vol. 69. – P. 744–752.
16. Janković, S. Risk factors for bladder cancer / S. Janković, V. Radosavljević // *Tumori.* – 2007. – Vol. 93. – P. 4–12.
17. FGFR3 and TP53 mutations in a prospective cohort of Belarusian bladder cancer patients / M.P. Smal [et al.] // *Exp. Oncol.* – 2014. – Vol. 36, No. 4. – P. 246–251.
18. Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome / D. Lindgren [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70, No. 9. – P. 3463–3472.
19. Статус метилирования гена *RUNX3* как фактор прогноза при раке мочевого пузыря без мышечной инвазии / М.П. Смаль [и др.] // *Доклады НАН Беларуси.* – 2015. – Т. 59, № 5. – С. 85–90.

20. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes might be prognostic factors in muscle-invasive bladder cancer patients treated with chemoradiotherapy / S. Sakano [et al.] // Br. J. Cancer. – 2006. – Vol. 95, No. 5. – P. 561–570.
21. DNA repair gene polymorphisms may be associated with prognosis of upper urinary tract transitional cell carcinoma / M. Sasaki [et al.] // Neoplasia. – 2008. – Vol. 10. – P. 255–265.
22. Polymorphisms in *XPB*, *XPC* and the risk of death in patients with urinary bladder neoplasms / S. Sanyal [et al.] // Acta Oncol. – 2007. – Vol. 46. – P. 31–41.
23. Polymorphisms in the *XRCC1* gene modify survival of bladder cancer patients treated with chemotherapy / C. Sacerdote [et al.] // Int. J. Cancer. – 2013 – Vol. 133. – P. 2004–2009.
24. Tissue hOGG1 genotype predicts bladder cancer prognosis: a novel approach using a peptide nucleic acid clamping method / Y.S. Ha [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2011. – Vol. 18. – P. 1775–1781.
25. Nucleotide excision repair gene polymorphisms and recurrence after treatment for superficial bladder cancer / J. Gu [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 1408–1415.
26. Bladder cancer and polymorphisms of DNA repair genes (*XRCC1*, *XRCC3*, *XPB*, *XPG*, *APE1*, *hOGG1*) / K.F. Narter [et al.] // Anticancer Res. – 2009. – Vol. 29. – P. 1389–1393.

N.V. Savina<sup>1</sup>, N.V. Nikitchenko<sup>1</sup>, T.D. Kuzhir<sup>1</sup>, S.L. Polyakov<sup>2</sup>, A.I. Rolevich<sup>2</sup>, S.A. Krasny<sup>2</sup>,  
R.I. Goncharova<sup>1</sup>

## POLYMORPHISM OF EXCISION REPAIR GENES: IMPACT ON BLADDER CANCER RECCURENCIES IN BELARUSIAN PATIENTS

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus  
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

<sup>2</sup>N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus  
Lesnoy, Minsk District BY-223040, Republic of Belarus

The results of genotyping DNA samples collected from patients with verified diagnosis of bladder cancer (BC) for polymorphism of nucleotide excision repair genes *XPB* (Asp312Asn and Lys751Gln), *ERCC6* (Met1097Val and Gly399Asp) and base excision repair genes *XRCC1* (Arg399Gln), *OGG1* (Ser326Cys) are presented. The distribution of genotypic/allelic frequencies for the listed genes has been analyzed in patients with primer and recurrent tumors. The impact of the *XPB* Lys751Gln polymorphism on cancer recurrence was found in smokers. In *XPB* Lys751Gln heterozygous genotype carriers smoking over 30 years, the recurrence risk was increased in 3–5 times by combining that with heterozygotes in other loci (*XRCC1* 399, *ERCC6* 1097 and 399). The association between *XPB* 312Asn allele and high grade recurrent tumors was revealed.

**Key words:** DNA excision repair, *XPB*, *XRCC1*, *OGG1*, *ERCC6* gene polymorphisms, bladder cancer, recurrence.

Дата поступления статьи 8 декабря 2015 г.

О.Д. Левданский<sup>1</sup>, М.С. Родькин<sup>1</sup>, Д.Е. Данилов<sup>2</sup>, В.С. Панкратов<sup>1</sup>, А. Около-Кулак<sup>3</sup>,  
А.В. Гроян<sup>3</sup>, И.А. Карпов<sup>2</sup>, О.Г. Давыденко<sup>1</sup>

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *IL28B* И *TNF-α* СРЕДИ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ БЕЛАРУСИ, А ТАКЖЕ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; e-mail: cytoplasmic@mail.ru

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

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет

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

<sup>3</sup>Белорусский государственный университет

220030, Республика Беларусь, г. Минск, пр-т Независимости, 4

Было проанализировано распределение генотипов *IL28B* и *TNF-α* среди этнических белорусов из шести этногеографических регионов, а также у пациентов с хроническим гепатитом С. Полученные распределения частот для гена *IL28B* незначительно различались между регионами, в то время как для гена *TNF-α* было выявлено отличие юго-западного региона от северного и центрального. Показано, что среди пациентов генотипы СТ и ТТ, а также аллель Т гена *IL28B* встречаются достоверно чаще, чем у коренных белорусов.

**Ключевые слова:** *IL28B*, *TNF-α*, белорусы, хронический гепатит С.

### Введение

Вирус гепатита С является одной из наиболее распространенных причин развития хронических заболеваний печени, включая цирроз и онкологические заболевания. По некоторым данным, около 2% населения мира страдает от хронического гепатита С [1], что обуславливает высокую значимость исследования факторов, влияющих на вероятность спонтанной элиминации вируса, а также эффективности применения различных лекарственных препаратов и их комбинаций, назначаемых при терапии данного заболевания.

Как показывают исследования, полиморфный локус rs12979860 в гене *IL28B*, кодирующем интерферон лямбда-3, представляет собой важный предиктор как спонтанной элиминации вируса, так и эффективности терапии пегилированным интерфероном в сочетании с рибавирином [2–4]. В настоящее время аллельное состояние гена *IL28B* является одним из важнейших критериев при назначении интерферонотерапии пациентам с хроническим вирусным гепатитом С [5].

Ген *IL28B* картирован на длинном плече 19 хромосомы (19p13.13). Было показано, что замена С на Т (rs12979860) в нетрансли-

руемой области гена не оказывает прямого воздействия на его экспрессию. Позже был обнаружен полиморфный локус ss469415590 (ТТ/ΔG), в значительной степени сцепленный с rs12979860. Замена двух ТТ на G в данной позиции приводит к возникновению новой рамки считывания (*IFNL4*) и таким образом оказывает влияние на экспрессию *IL28B*. Наибольшая степень сцепления данных локусов описана для представителей азиатских, а также европейских этносов [6]. Выявление частот встречаемости аллельных состояний по локусу rs12979860 в различных, в том числе этнических популяциях, может объяснять отличия в эффективности лечения среди европейских, африканских и азиатских пациентов [7, 8].

Несмотря на весомый вклад полиморфизма гена *IL28B*, продолжается поиск дополнительных предикторов эффективности терапии хронического гепатита С. В частности, одним из генов-кандидатов является ген *TNF-α*. Данный ген картирован на хромосоме 6p21.3 и кодирует цитокин фактор некроза опухолей альфа. Однонуклеотидная замена -308G/A (rs1800629) в промоторной области способна приводить к значительному возрастанию уровня экспрессии *TNF-α*. В ряде исследований было проде-

монстрировано влияние полиморфного локуса rs1800629 на эффективность терапии хронического гепатита С [9], а также на вероятность спонтанной элиминации вируса [10].

В рамках данной работы был проанализирован полиморфизм генов *IL28B* (rs12979860) и *TNF-α* (rs1800629) среди этнических белорусов из шести этногеографических регионов, а также у пациентов с хроническим гепатитом С.

### Материалы и методы

В исследовании использовались образцы тотальной ДНК 106 пациентов с диагностированным хроническим вирусным гепатитом С (1 генотип), а также 390 образцов этнических белорусов. В выборку этнических белорусов включались представители мужского пола, коренные жители в третьем поколении из пяти этногеографических регионов Беларуси, не состоящие в близком родстве.

Генотипирование по локусу rs12979860 гена *IL28B* проводилось методом ПЦР-ПДРФ-анализа с использованием рестриктазы *Bsh1236I*. Объем ПЦР-смеси составлял 15 мкл, состав смеси был следующим: 1х буфер для ДНК-полимеразы *Taq* без  $MgCl_2$  (Праймтех), по 0,25 мМ каждого из 4 дезоксириботрифосфатнуклеотидов, 1,3 мМ  $MgCl_2$ , по 0,4 мкМ каждого из двух праймеров (F-5'-CGCTTATCGCATACGGCTAGG-3' и R-5'-CAGGGTCAATCACAGAAGGGAG-3'), 0,07 ед./мкл ДНК-полимеразы *Taq*. Амплификация включала в себя следующие стадии: 4 мин при 95 °С, затем 36 циклов, каждый из которых состоял из денатурации при 95 °С в течение 30 с, отжига праймеров при 60 °С – 20 с и элонгации при 72 °С в течение 30 с, после чего следовала финальная элонгация при 72 °С – 3 мин. Инкубирование продуктов амплификации с рестриктазой *Bsh1236I* проводилось при 37 °С в течение 16 ч.

В результате ПЦР амплифицировался фрагмент ДНК размером в 238 п.н. Замена С на Т в локусе rs12979860 приводит к исчезновению сайта узнавания рестриктазы *Bsh1236I*. Кроме того, амплифицируемый фрагмент содержал дополнительный инвариантный сайт узнавания данной рестриктазы, который использовался как внутренний контроль рестрикции. Таким образом, при наличии аллеля С после рестрикции образовывались фрагменты дли-

ной 136, 77 и 25 п.н., при наличии аллеля Т – 161 и 77 п.н. Размер рестрикционных фрагментов определялся путем их разделения в 8%-ном полиакриламидном геле.

Генотипирование по локусу rs1800629 гена *TNF-α* также осуществлялось методом ПЦР-ПДРФ-анализа. Объем ПЦР-смеси на 1 образец составлял 15 мкл, смесь включала в себя следующие компоненты: 1х буфер для ДНК-полимеразы *Taq* без  $MgCl_2$ ; по 0,25 мМ каждого из 4 дезоксириботрифосфатнуклеотидов; 1,5 мМ  $MgCl_2$ ; по 0,5 мкМ каждого из двух праймеров (F-5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3', R-5'-TCCTCCCTGCTCCGATCCG-3'); 0,07 ед./мкл ДНК-полимеразы *Taq*. ПЦР осуществлялась по следующей программе: 95 °С в течение 4 мин; 31 цикл, каждый из которых включал денатурацию при 95 °С в течение 30 с, отжиг праймеров – 40 с при 58 °С, 40 с элонгации при 72 °С; финальная элонгация при 72 °С – 5 мин. Размер амплифицированного продукта – 108 п.н. Инкубирование ампликонов с рестриктазой *NcoI* проводилось при 37 °С в течение 16 ч. Размер рестрикционных фрагментов определялся путем их разделения в 8%-ном полиакриламидном геле. При наличии аллеля А после рестрикции образуются фрагменты длиной 87 и 20 п.н., при наличии аллеля G остается один фрагмент размером 107 п.н. Присутствие на электрофореграмме фрагментов всех перечисленных размеров свидетельствовало о гетерозиготности.

Статистический анализ проводился с использованием программного пакета MS Excel 2007 и Doctorstat.

### Результаты и обсуждение

Аллельное состояние гена *IL28B* было определено у 390 этнических белорусов. Генотип СС был выявлен у 169 из них, что составило 43,3% общей выборки. Гетерозиготный генотип СТ был обнаружен у 170 индивидов (43,6%), носителями аллеля Т в гомозиготном состоянии оказались 51 человек (13,1%). Распределение генотипов не противоречило закону Харди-Вайнберга ( $P = 0,1$ ). Частота аллеля Т составила 34,9%.

Помимо этнических белорусов, генотип по локусу rs12979860 гена *IL28B* был также определен у 106 пациентов с диагностированным

хроническим гепатитом С. Генотип СС был выявлен среди них у 20 индивидов (18,9%), генотип СТ – у 61 (57,5%), а носителями генотипа ТТ оказались 25 человек (23,6%). Выявленная частота аллеля Т составила 52,4%. Распределение генотипов соответствовало закону Харди-Вайнберга ( $P = 0,11$ ). Для более наглядного сравнения полученные частоты и соответствующие показатели, выявленные у этнических белорусов, представлены на рис. 1.

Из рисунка видно, что аллель Т, равно как и содержащие его генотипы, со значительно большей частотой представлен среди пациентов с хроническим гепатитом С. Так, в рас-

пределении генотипов в группе пациентов заметно преобладали носители сочетаний СТ и ТТ и с гораздо меньшей частотой встречались индивиды с генотипом СС ( $P < 0,001$ ). Также достоверно различались и частоты аллелей: неблагоприятный Т аллель был выявлен среди пациентов с частотой, в полтора раза превышавшей таковую в группе этнических белорусов (52,4% против 34,9%,  $P < 0,001$ ). Такие различия подтверждают описанное в литературе влияние полиморфного локуса rs12979860 на вероятность спонтанной элиминации вируса.

Выявленное распределение генотипов среди белорусов в исследованных этногеографических регионах представлено в табл. 1.

Таблица 1

Распределение генотипов по локусу rs12979860 среди этнических белорусов

Регион	Количество человек	Генотипы			Аллели	
		СС	СТ	ТТ	С, %	Т, %
Север	50	22 (44,0)	21 (42,0)	7 (14,0)	65,0	35,0
Центр	64	27 (42,2)	30 (46,9)	7 (10,9)	65,6	34,4
Восток	50	29 (58,0)	18 (36,0)	3 (6,0)	76,0	24,0
Запад	97	38 (39,2)	44 (45,3)	15 (15,5)	61,9	38,1
Юго-запад	79	30 (38,0)	38 (48,1)	11 (13,9)	62,0	38,0
Юго-восток	50	23 (46,0)	19 (38,0)	8 (16,0)	65,0	35,0
Всего	390	169 (43,3)	170 (43,6)	51 (13,1)	65,1	34,9

Примечание. Здесь и далее в таблицах в скобках указана частота в процентах

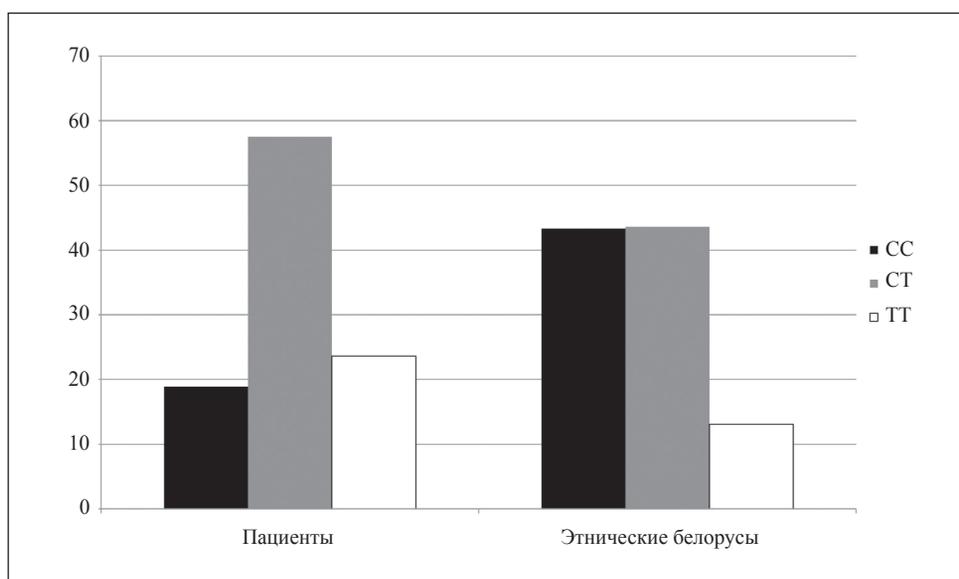


Рис. 1. Распределение генотипов *IL28B* (rs12979860) у пациентов с хроническим гепатитом С и этнических белорусов, %

Как видно из таблицы, существенных различий между отдельными популяциями белорусов не наблюдалось. Различия между всеми группами не достигали уровня достоверных, а сами частоты генотипов не противоречили закону распределения Харди-Вайнберга. Из всех регионов несколько выделялся восточный ( $P = 0,12$ ), коренное население которого отличалось максимальной частотой генотипа СС (58,0%), а также минимальными долями носителей генотипов СТ и ТТ. В этом же регионе была выявлена минимальная частота аллеля Т. С наиболее низкой частотой генотип СС был обнаружен среди белорусов юго-западного региона, где его носители составили 38,0% выборки. Генотип ТТ оказался наиболее распространенным среди коренного населения юго-восточного региона, где 16,0% популяции являются носителями данной комбинации аллелей. Максимальные частоты аллеля Т были получены для коренных жителей западного (38,1%) и юго-западного регионов (38,0%). Исходя из полученных данных, можно сделать предположение о том, что коренные жители восточного этногеографического региона Беларуси относительно менее предрасположены к развитию заболеваний, ассоциированных с аллелем Т гена *IL28B* (rs12979860), а белорусы, населяющие западный и юго-западный регионы, наоборот, имеют более высокий риск их развития.

Полученные нами частоты для коренных белорусов были сравнены с соответствующими показателями, описанными для соседних украинской и польской выборок [11, 12]. Как видно из табл. 2, белорусы занимают промежуточную позицию по частотам генотипов СС и СТ и лидируют по частоте генотипа ТТ (13,1% против 11,0% и 9,0% у поляков и украинцев, соответственно). Максимальная частота ал-

леля Т была обнаружена также в белорусской популяции. Данные различия, однако, не достигают уровня достоверных:  $P = 0,39$  – при сравнении белорусов с поляками и  $P = 0,32$  – при сравнении белорусской и украинской выборок. Таким образом, популяционные частоты генотипов по локусу rs12979860 гена *IL28B*, полученные для белорусов, незначительно отличаются от показателей, выявленных в соседних государствах.

По локусу rs1800629 гена *TNF-α* было прогенотипировано 304 образца ДНК этнических белорусов. Носителями генотипа GG оказались 234 индивида (77,0%), гетерозиготный генотип GA был выявлен у 62 человек (20,4%), у 8 белорусов был обнаружен генотип AA (2,6%). Распределение генотипов не противоречило закону Харди-Вайнберга ( $P = 0,12$ ). Частота аллеля А составила 12,8%.

Среди 106 пациентов с хроническим гепатитом С различные генотипы гена *TNF-α* были выявлены со следующими частотами: GG – 71,7%, GA – 27,4%, AA – 0,9%; распределение генотипов соответствует закону Харди-Вайнберга ( $P = 0,32$ ). Сравнение распределения частот генотипов по гену *TNF-α* среди этнических белорусов и пациентов с хроническим гепатитом С представлено на рис. 2.

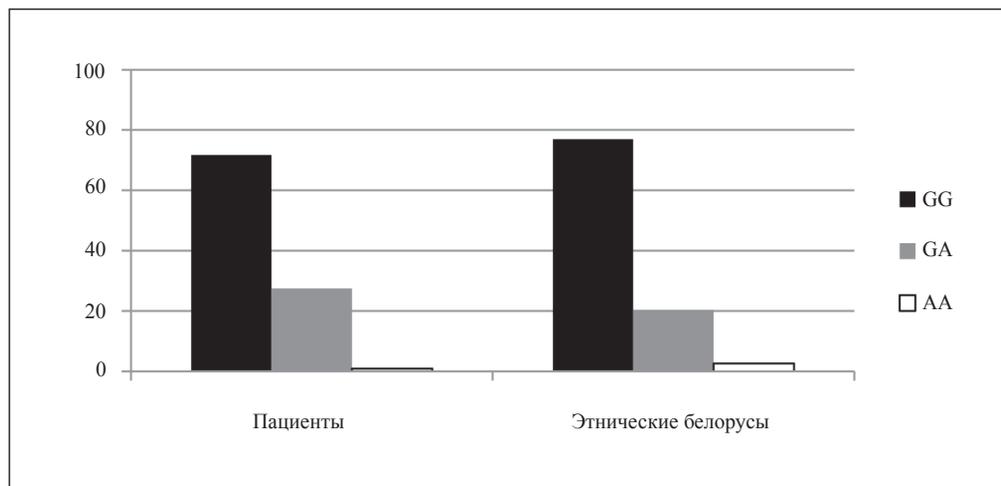
Как видно из рисунка, удалось выявить небольшое превышение частоты генотипа GG среди этнических белорусов, то же оказалось характерно и для генотипа AA. Гетерозиготный генотип GA с большей частотой встречался среди лиц с диагностированным хроническим гепатитом С. Данные различия не достигают уровня достоверно значимых ( $P = 0,26$ ).

Распределение частот генотипов по исследованным этногеографическим регионам представлено в табл. 3. В результате стати-

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей гена *IL28B* у белорусов, украинцев и поляков

Выборка	Количество образцов	Генотипы			Аллели		Ссылка
		СС	СТ	ТТ	С, %	Т, %	
Белорусы	390	169 (43,3)	170 (43,6)	51 (13,1)	65,1	34,9	–
Поляки	538	255 (47,4)	224 (41,6)	59 (11,0)	68,2	31,8	[12]
Украинцы	100	40 (40,0)	51 (51,0)	9 (9,0)	65,5	34,5	[11]



**Рис. 2.** Распределение генотипов *TNF-α* (rs1800629) между пациентами с хроническим гепатитом С и этническими белорусами, %

стической обработки было выявлено достоверное отличие юго-западного региона от северного ( $P = 0,002$ ), а также от центрального ( $P = 0,002$ ). В северном и центральном регионах наблюдались одни из самых низких частот аллеля А (11,1% и 9,0% соответственно), в то время как в юго-западном она оказалась самой высокой (18,0%). Также в юго-западном регионе была выявлена максимальная частота генотипа GA (36,0%), что в полтора раза превышало долю данного генотипа в идущем по этому показателю вторым западным регионе (24,0%). Кроме того, в центральном и северном регионе были выявлены достоверные различия в распределении генотипов по сравнению с ожидаемым в соответствии с законом Харди-Вайнберга ( $P = 0,037$  и  $P = 0,011$ ). Причиной данных отличий в частотах может являться недо-

статочный объем выборок для каждого из регионов.

Полученные нами частоты генотипов были сравнены с соответствующими показателями, описанными для соседних популяций поляков и русских (табл. 4) [13, 14]. Доли носителей различных генотипов в русской и белорусской популяции отличались незначительно ( $P = 0,49$ ), в то время как разница между белорусами и поляками достигла уровня достоверности ( $P = 0,012$ ). Следует отметить, что наиболее близкое к польскому распределение было выявлено среди белорусов юго-западного региона, непосредственно прилегающего к Польше. Вполне вероятно, что отличия коренного населения юго-западного региона Беларуси определяются вкладом польской популяции.

**Таблица 3**

Распределение генотипов по локусу rs1800629 среди этнических белорусов

Регион	Количество человек	Генотипы			Аллели	
		GG	GA	AA	G, %	A, %
Север	54	45 (83,3)	6 (11,1)	3 (5,6)	88,9	11,1
Центр	50	43 (86,0)	5 (10,0)	2 (4,0)	91,0	9,0
Восток	50	38 (76,0)	10 (20,0)	2 (4,0)	86,0	14,0
Запад	50	37 (74,0)	12 (24,0)	1 (2,0)	86,0	14,0
Юго-запад	50	32 (64,0)	18 (36,0)	0 (0,0)	82,0	18,0
Юго-восток	50	39 (78,0)	11 (22,0)	0 (0,0)	89,0	11,0
Всего	304	234 (77,0)	62 (20,4)	8 (2,6)	87,2	12,8

Таблица 4

Сравнение частот генотипов и аллелей гена *TNF-α* между польской, русской и белорусской популяциями

Выборка	Количество образцов	Генотипы			Аллели		Ссылка
		GG	GA	AA	G, %	A, %	
Белорусы	304	234 (77,0)	62 (20,4)	8 (2,6)	87,2	12,8	–
Поляки	261	178 (68,2)	80 (30,7)	3 (1,1)	83,5	16,5	[13]
Русские	129	93 (72,1)	33 (25,6)	3 (2,3)	84,9	15,1	[14]

### Заключение

Таким образом, в рамках данного исследования были впервые определены частоты встречаемости аллелей полиморфных локусов rs12979860 (ген *IL28B*) и rs1800629 (ген *TNF-α*) у коренного населения из шести этногеографических регионов Беларуси. Полученные распределения частот для гена *IL28B* незначительно различались между регионами, в то время как для гена *TNF-α* было выявлено достоверное отличие юго-западного региона от центрального и северного. Также было обнаружено, что среди больных хроническим гепатитом С частоты генотипов, содержащих аллель Т гена *IL28B*, равно как и частота самого аллеля, значительно превышают среднепопуляционный показатель, что еще раз подтверждает важную роль, которую данный локус играет в определении вероятности спонтанной элиминации вируса.

### Список использованных источников

1. Shepard, C.W. Global epidemiology of hepatitis C virus infection / C.W. Shepard, L. Finelli, M.J. Alter // *Lancet Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 5. – P. 558–567.
2. Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C / Y. Tanaka [et al.] // *Nature Genetics.* – 2009. – Vol. 41. – № 10. – P. 1105–1109.
3. Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance / D. Ge [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 461. – P. 399–401.
4. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus / D.L. Thomas [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 461. – № 7265. – P. 798–801.

5. Genetics of *IL28B* and HCV-response to infection and treatment / C.N. Hayes [et al.] // *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology.* – 2012. – Vol. 9. – № 7. – P. 406–417.

6. A variant upstream of *IFNL3* (*IL28B*) creating a new interferon gene *IFNL4* is associated with impaired clearance of hepatitis C virus / L. Prokunina-Olsson [et al.] // *Nature genetics.* – 2013. – Vol. 45. – № 2. – P. 164–171.

7. Two *IL28B* polymorphisms are associated with the treatment response of different genotypes of hepatitis C in different racial populations: A meta-analysis / L.S. Wu, H. Wang, X.P. Geng // *Experimental and Therapeutic Medicine.* – 2012. – Vol. 3. – № 2. – P. 200–206.

8. Association of genetic variation in *IL28B* with hepatitis C treatment-induced viral clearance in the Chinese Han population / X.W. Liao [et al.] // *Antiviral Therapy.* – 2011. – Vol. 16. – № 2. – P. 141–147.

9. Cytokines genes polymorphisms in chronic hepatitis C: Impact on susceptibility to infection and response to therapy / H.F. Pasha [et al.] // *Cytokine.* – 2013. – Vol. 61. – № 2. – P. 478–484.

10. Polymorphism of tumor necrosis factor-α and interleukin-10 gene promoter region in chronic hepatitis C virus patients and their effect on pegylated interferon-α therapy response / G. Dogra [et al.] // *Hum Immunol.* – 2011. – Vol. 72. – № 10. – P. 935–939.

11. Kucherenko, A.M. Study on the *IFNL4* gene ss469415590 variant in Ukrainian population / A.M. Kucherenko, V.M. Pampukha, L.A. Livshits // *Biopolymers and Cell.* – 2014. – Vol. 30. – № 5. – P. 400–402.

12. *IL28B* polymorphism (rs12979860) associated with clearance of HCV infection in Poland: Systematic review of its prevalence

in chronic hepatitis C patients and general population frequency / M.P. Kaczor [et al.] // Pharmacological Reports. – 2015. – Vol. 67. – P. 260–266.

13. –308 G/A *TNF-α* gene polymorphism influences the course of basal cell carcinoma in

a Polish population / M. Sobjanek [et al.] // Arch Med Sci. – 2015. – Vol. 11. – № 3. – P. 599–604.

14. *TNF* gene polymorphisms in cystic fibrosis patients: contribution to the disease progression / G. Shmarina [et al.] // Journal of Translational Medicine. – 2013. doi: 10.1186/1479-5876-11-19.

A.D. Liaudanski<sup>1</sup>, M.S. Rodzkin<sup>1</sup>, D.E. Danilau<sup>2</sup>, V.S. Pankratov<sup>1</sup>, A. Okolo-Kulak<sup>3</sup>, N.V. Trayan<sup>3</sup>,  
I.A. Karpov<sup>2</sup>, O.G. Davydenko<sup>1</sup>

## ***IL28B* AND *TNF-α* GENE POLYMORPHISM IN NATIVE BELARUSIANS AND PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C**

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus  
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University  
Minsk BY-220116, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Belarusian State University  
Minsk BY-220030, Republic of Belarus

*IL28B* and *TNF-α* genotypes in Belarusians from six ethnographic regions and patients with chronic hepatitis C were analyzed. The frequencies obtained for *IL28B* gene were not significantly different between regions, but it was found that south-western region is different from central and northern regions in *TNF-α* genotypes distribution. CT and TT genotypes and T allele of *IL28B* gene were found in patients with significantly higher frequencies in comparison with native Belarusians.

**Key words:** *IL28B*, *TNF-α*, Belarusians, chronic hepatitis C.

*Дата поступления статьи 26 февраля 2016 г.*

Н.Г. Седляр, А.Л. Гончар, М.Д. Амелянович, И.Б. Моссе

## РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К НЕВЫНАШИВАНИЮ БЕРЕМЕННОСТИ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Исследована ассоциация 8 полиморфных вариантов генов, ответственных за нарушения системы гемостаза, с невынашиванием беременности. Сравнение генотипов женщин с патологией беременности (1631 человек) и контрольной группы случайной выборки жителей г. Минска (663 человека) позволило выявить наиболее информативные маркеры риска нарушения беременности – это полиморфные варианты 4G/4G гена *PAI-1*, Leu/Leu гена *F13*, а также аллель Ala гена *F1*. Анализ частоты сочетаний факторов риска в группе пациенток показал, что чаще всего встречаются комбинации следующих факторов риска: *F13 + PAI* (41,9%), *eNOS ab + PAI* (30,4%) и *eNOS ab + F13* (20,4%). Нередко встречается также комбинация из трех факторов риска: *PAI + MTHFR* (C677T + A1298C), *F13 + MTHFR* (C677T + A1298C), *eNOS ab + F13 + PAI*. Выявление носительства данных мутаций и полиморфных вариантов является актуальным и важным, поскольку коррекция эффектов выявленных неблагоприятных вариантов генов с помощью соответствующей терапии обеспечивает нормальное протекание беременности.

**Ключевые слова:** невынашивание беременности, генетическое тестирование, ПЦР.

### Введение

Одним из приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований в Беларуси определены новые репродуктивные технологии, здоровье беременной женщины и плода, матери и ребенка. И это неслучайно: проблема бесплодия и невынашивания беременности становится все более актуальной. В условиях неблагоприятной демографической ситуации, когда каждые пять лет на 20% уменьшается число женщин, способных родить ребенка, особенно важно сохранение и развитие беременности у супружеских пар, желающих иметь детей.

По данным Министерства здравоохранения Беларуси, в нашей стране 10–25% беременностей оканчивается неудачно, причем этот показатель с 1998 года вырос на 8%. Согласно определению Всемирной организации здравоохранения, спонтанным аборт (самопроизвольным выкидышем) называется прерывание беременности сроком до 22 недель или рождение плода с массой менее 500 г. Привычное невынашивание беременности (потеря трех и более последовательных беременностей) – относительно редко встречающаяся патология (у 1% супружеских пар) [1]. В настоящее

время считается, что генетическое тестирование должно проводиться не позже, чем после 2-х выкидышей, т.к. риск повторного невынашивания в этом случае составляет 24%, после 3-х выкидышей – 30%, а после 4-х – 40% [2].

В противоположность этому, однократный выкидыш встречается довольно часто (у 25% женщин). Более 80% всех прерываний беременности (спорадических, повторных) происходит в первом триместре.

Причины выкидыша, как эпизодического (однократного или повторного), так и привычного (потеря трех и более последовательных беременностей) сходны. Их можно объединить в следующие группы: генетические, инфекционные, эндокринные, анатомические, иммунологические, идиопатические [3].

В последнее время одной из главных причин выкидышей стали считать наследственную тромбофилию – патологическое состояние организма, характеризующееся повышенной склонностью к тромбообразованию. Изменения генов, ответственных за систему гемостаза, одной из основных функций которой является поддержание нормальных реологических свойств крови, могут приводить к тромбофилии и быть причиной невынашивания беременности.

С точки зрения нарушения плодно-плацентарного кровотока как одного из патогенетических механизмов, приводящих к развитию патологии беременности, большой интерес представляет изучение генетических полиморфных вариантов, при которых происходят те или иные изменения в процессах свертывания крови.

Исследования последних лет показали, что наличие генетической предрасположенности к тромбофилии сопряжено с повышенным риском развития осложнений во время беременности (привычное невынашивание, плацентарная недостаточность, задержка роста плода, поздний токсикоз и др.). Один из механизмов, приводящих к этим осложнениям, – неправильное прохождение процессов имплантации и плацентации, важную роль в которых играют системы свертывания крови и фибринолиза (процесса растворения тромбов и сгустков крови).

Генетические нарушения системы гемостаза часто проявляются только при дополнительных условиях, одним из которых как раз и является беременность. Беременность сама по себе является состоянием, в 5–6 раз увеличивающим риск тромбозов, поскольку даже при физиологическом ее течении происходит повышение тромбогенного потенциала и снижение тромборезистентности. Однако эти процессы не сопровождаются появлением в крови прямых маркеров внутрисосудистого свертывания крови, прижизненной внутрисосудистой агрегацией тромбоцитов и повышением содержания в крови маркеров дисфункции эндотелия, поэтому клинико-биохимические анализы не выявляют отклонений от нормы. При наследственной тромбофилии происходит нарушение одного или нескольких звеньев в системе фибринолиза, что в конечном итоге приводит к неадекватному обеспечению растущего плода кислородом и питательными веществами вследствие образования микротромбов в плаценте, в результате чего беременность прекращает развиваться, что приводит к самопроизвольному выкидышу или «замершей» беременности.

Среди причин наследственных тромбофилий широко обсуждается связь между мутацией фактора V Leiden, мутацией G20210-A в гене протромбина, полиморфизмами C677-T в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), 4G/5G – в гене ингибитора активатора плазми-

ногена I (*PAI-I*), G/A 455 – в гене фибриногена и развитием тяжелого гестоза, задержки внутриутробного развития плода, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты и другими осложнениями беременности [4–12].

Выявление носительства данных мутаций и полиморфных вариантов имеет важную и неоспоримую значимость, поскольку профилактика и своевременная коррекция эффектов неблагоприятных вариантов генов обеспечивает нормальное протекание беременности. Большое значение в формировании генетической предрасположенности к невынашиванию имеет не только носительство аллелей риска по отдельности, но и их комбинации.

В этой связи целью данной работы являлось изучение и сопоставление частот встречаемости вариантов генов-кандидатов риска у пациенток с патологией беременности по сравнению с контрольной группой и оценка взаимосвязи носительства комбинаций выявленных факторов риска с формированием генетической предрасположенности к нарушениям беременности, а также выявление аллельных вариантов, обладающих наибольшей прогностической ценностью.

### Материалы и методы

В исследовании были проанализированы образцы ДНК 1631 пациента с привычным невынашиванием беременности. Контрольная группа состояла из случайной выборки населения г. Минска (663 человека).

Для определения генетической предрасположенности к невынашиванию беременности были отобраны 8 полиморфных вариантов генов, ассоциированных с тромбообразованием или повышенной гомоцистеинемией.

В гене метилентетрагидрофолатредуктазы были проанализированы два полиморфизма – C677T и A1298C. Необходимость анализа обоих полиморфных вариантов этого гена обусловлена тем, что гетерозиготность по одному из полиморфных вариантов не приводит к повышению уровня гомоцистеина, однако в компаунде они являются фактором риска даже в гетерозиготном состоянии.

Гены-кандидаты, отобранные для анализа, и описание их функций в отношении беременности (по литературным данным) приведены в табл. 1.

Таблица 1

## Генетические факторы предрасположенности к патологиям беременности

№	Аббревиатура, название гена и полиморфный вариант	Функции гена
1	<i>F1</i> (ген I фактора свертывания крови) Thr312Ala	I фактор свертывания крови регулирует последний этап коагуляционного каскада, влияет на образование «белого» тромба. Связан с риском возникновения сердечно-сосудистых заболеваний.
2	<i>F2</i> (ген II фактора свертывания крови) G20210A	Мутация гена протромбина является фактором риска многих осложнений (невынашивание беременности, фетоплацентарная недостаточность, внутриутробная гибель плода, гестозы, задержка развития плода, отслойка плаценты). Риск потери плода в I триместре.
3	<i>F5</i> (ген V фактора свертывания крови) G1691A (мутация Лейдена)	У женщин с мутацией <i>F5</i> обнаруживают тромбозы в плаценте, что повышает риск развития осложнений беременности: невынашивания беременности на ранних сроках (риск повышается в 3 раза), отставания развития плода, позднего токсикоза, фетоплацентарной недостаточности.
4	<i>F13A1</i> (ген XIII фактора свертывания крови) Val34Leu	У носителей аллеля 34Leu количество фибриназы соответствует показателям нормы, но активность этого фермента повышена в 2–3 раза. Аллель 34Leu наблюдается у женщин с привычным невынашиванием беременности. Риск привычного невынашивания беременности еще выше у лиц-носителей аллеля в сочетании с вариантом 4G/4G в гене <i>PAI-1</i> .
5	<i>PAI-1</i> (ген ингибитора активатора пламиногена) 4g/5g	Регулирует процесс фибринолиза. Повышение уровня <i>PAI-1</i> при гипоксии приводит к снижению фибринолиза. Аллель 4G или генотип 4G/4G связаны с привычным невынашиванием беременности, увеличением риска тяжелого гестоза, гипоксии, задержки развития и внутриутробной гибели плода.
6	<i>eNOS</i> (ген эндотелиальной синтазы окиси азота) 4a/4b	Выявлена ассоциация данного полиморфизма с привычным невынашиванием беременности, частота аллеля 4a была значимо выше при привычном невынашивании, чем в контрольной группе. Генотипы 4b/4a рассматриваются как нежелательные варианты.
7	<i>MTHFR</i> (ген метилентетрагидрофолатредуктазы) C677T	Фермент играет ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты, необходимой для роста и развития кровеносной и иммунной систем. У лиц, гомозиготных по данному полиморфизму (генотип Т/Т), происходит снижение активности фермента примерно до 35% от среднего значения и развитие гипергомоцистеинемии. Генотип ТТ является фактором риска при сердечно-сосудистых заболеваниях, осложнениях протекания беременности. Данные эффекты можно корректировать дополнительным приемом препаратов фолиевой кислоты.
8	<i>MTHFR</i> (ген метилентетрагидрофолатредуктазы) A1298C	При замене аденина (А) на цитозин (С) снижается активность гена. Такое носительство приводит к гипергомоцистеинемии только при совместном носительстве с аллелем 677Т того же гена. При отсутствии аллеля 677Т гомозиготность по полиморфизму 1298С не сопровождается ни повышением концентрации общего гомоцистеина, ни снижением уровня фолата в плазме, но является фактором риска спонтанного аборта (снижение активности фермента до 60% в связи с изменением регуляции ингибитором S-аденозилметионином).

В качестве биологического материала для исследования использовали ДНК, выделенную из клеток буккального эпителия или лейкоцитов периферической крови. Концентрацию образцов ДНК измеряли с помощью флюори-

метра Qubit (Invitrogen, USA).

Генотипирование по полиморфизмам 4G/5G гена *PAI*, G20210A гена *F2*, G1691A гена *F5*, C677T и A1298C гена *MTHFR* осуществляли методом количественной ПЦР с использованием

праймеров и флюоресцентно-меченых зондов и набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени (Maxima Probe qPCR Master Mix, Thermo Scientific, Литва).

Детекция флюоресценции, а также первичная обработка результатов осуществлялись программным обеспечением прибора CFX96 (BIO-RAD, США) в автоматическом режиме. Исследования генов *F2* и *F5*, а также полиморфных вариантов С677Т и А1298С гена *MTHFR* осуществлялись методом мультиплексной ПЦР в реальном времени (попарно в одной пробирке), что значительно ускоряет и удешевляет проведение анализа.

Для выявления вставок/делеций гена *eNOS* (4a/4b) использовали двухпраймерную систему, для определения полиморфизма в гене *F1* (Thr312Ala) применяли методику на основе RFLP PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism), для генотипирования образцов по гену *F13* (Val34Leu) применяли собственную методику на основе Tetra-primer ARMS PCR (Amplification Refractory Mutation System), с использованием отдельных стандартных компонентов реакционной смеси и аллель-специфичных праймеров. Разделение

продуктов амплификации и рестрикции проводили с помощью электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле и визуализировали в проходящем УФ-свете после окраски в растворе бромистого этидия.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью непараметрического критерия  $\chi^2$  с учетом поправки Йетса с использованием пакета Microsoft Office Excel. Оценку влияния полиморфных вариантов на риск развития заболевания проводили с помощью отношения шансов (OR) с учетом 95% доверительного интервала (95% CI). Результаты анализа считали статистически значимыми при уровне  $P < 0,05$ . Характер распределения наблюдаемых частот генотипов в популяции оценивали на соответствие уравнению Харди-Вайнберга.

### Результаты и обсуждение

Проведена оценка информативности генотипов риска невынашивания беременности среди белорусских женщин. Результаты генотипирования основной и контрольной групп по анализируемым генам предрасположенности к невынашиванию беременности представлены в табл. 2.

Таблица 2

Сравнение частот генотипов и аллелей изученных полиморфных вариантов генов в группе пациенток и в контрольной группе

Ген, полиморфизм	Генотипы, аллели	Частота, %		$\chi^2$	<i>P</i>	OR (95% CI)
		Пациенты	Контроль			
<i>eNOS</i> 4b/4a  $n_1 = 1592$ $n_2 = 663$	4b/4b	62,8	64,3	0,46	0,790	0,94 (0,78–1,13)
	4b/4a	32,5	31,1			1,07 (0,88–1,30)
	4a/4a	4,8	4,7			1,02 (0,67–1,57)
	4b	79,0	79,8	0,36	0,550	0,95 (0,81–1,12)
	4a	21,0	20,2			1,05 (0,90–1,23)
<i>PAI-1</i> 4G/5G  $n_1 = 1623$ $n_2 = 403$	5G/5G	19,2	25,1	8,99	<b>0,010</b>	0,71 (0,55–0,92)
	4G/5G	49,6	49,4			1,01 (0,81–1,25)
	4G/4G	31,2	25,6			<b>1,32 (1,03–1,69)</b>
	5G	44,0	49,8	8,74	<b>0,003</b>	0,79 (0,68–0,92)
	4G	56,0	50,2			<b>1,26 (1,08–1,47)</b>
<i>F1</i> Thr312Ala  $n_1 = 1336$ $n_2 = 350$	Thr/Thr	53,5	61,1	6,86	<b>0,030</b>	0,73 (0,58–0,93)
	Thr/Ala	40,6	33,1			1,38 (1,07–1,76)
	Ala/Ala	5,9	5,7			1,04 (0,63–1,72)
	Thr	73,8	77,7	4,48	<b>0,030</b>	0,81 (0,66–0,98)
	Ala	26,2	22,3			<b>1,24 (1,02–1,51)</b>

## Продолжение табл. 2

Ген, полиморфизм	Генотипы, аллели	Частота, %		$\chi^2$	P	OR (95% CI)
		Пациенты	Контроль			
F5 G1691A  n <sub>1</sub> = 1622 n <sub>2</sub> = 610	G/G	97,7	97,4	0,05	0,820	1,12 (0,62–2,03)
	G/A	2,3	2,6			0,89 (0,49–1,61)
	A/A	0,0	0,0			–
	G	98,8	98,7	0,15	0,700	1,12 (0,62–2,02)
	A	1,2	1,3			0,89 (0,50–1,61)
F13 Val34Leu  n <sub>1</sub> = 1623 n <sub>2</sub> = 299	Val/Val	47,3	45,8	6,59	<b>0,040</b>	1,06 (0,83–1,36)
	Val/Leu	43,7	49,2			0,80 (0,63–1,03)
	Leu/Leu	9,0	5,0			<b>1,87 (1,08–3,23)</b>
	Val	69,2	70,4	0,36	0,550	0,94 (0,78–1,14)
	Leu	30,8	29,6			1,06 (0,88–1,28)
F2 G20210A  n <sub>1</sub> = 1622 n <sub>2</sub> = 335	G/G	98,2	98,8	0,37	0,540	0,64 (0,22–1,83)
	G/A	1,8	1,2			1,56 (0,55–4,46)
	A/A	0,0	0,0			–
	G	99,1	99,4	0,36	0,550	0,64 (0,23–1,83)
	A	0,9	0,6			1,55 (0,55–4,43)
MTHFR C677T  n <sub>1</sub> = 1631 n <sub>2</sub> = 246	C/C	49,0	46,3	2,00	0,370	1,11 (0,85–1,46)
	C/T	41,9	46,3			0,84 (0,64–1,09)
	T/T	9,0	7,3			1,25 (0,75–2,09)
	C	70,0	69,5	0,05	0,820	1,02 (0,83–1,26)
	T	30,0	30,5			0,98 (0,79–1,20)
MTHFR A1298C  n <sub>1</sub> = 1631 n <sub>2</sub> = 246	A/A	45,7	46,7	0,51	0,770	0,96 (0,73–1,26)
	A/C	43,4	43,9			0,98 (0,75–1,28)
	C/C	10,9	9,3			1,18 (0,75–1,86)
	A	67,4	68,7	0,31	0,580	0,94 (0,77–1,16)
	C	32,6	31,3			1,06 (0,86–1,30)

Примечание. n<sub>1</sub> – количество пациенток; n<sub>2</sub> – контрольная группа

Наиболее выраженные различия между частотами генотипов и аллелей в исследуемых выборках наблюдались для полиморфных вариантов 4G/5G гена *PAI-1*, Thr312Ala гена *FI* и Val34Leu гена *F13*.

Ген *PAI-1* регулирует процесс фибринолиза. По нашим данным, наличие генотипа 4G/4G гена *PAI-1* увеличивает риск патологии беременности в 1,32 раза (OR = 1,32 95% CI 1,03–1,69), а наличие аллеля риска 4G увеличивает риск в 1,26 раза (OR = 1,26 95% CI 1,08–1,47). Вместе с тем, не получено подтверждения негативного вклада генотипа 4G/5G гена *PAI-1* в невынашивание беременности, в то время как, согласно литературным

данным, этот генотип также считается фактором риска [13].

По литературным данным, аллель 34Leu гена *F13* наблюдается у 51% женщин с привычным невынашиванием беременности. Риск привычного невынашивания беременности еще выше у носителей аллеля в сочетании с вариантом 4G/4G в гене *PAI-1* [14]. При анализе распределения частот генотипов полиморфизма Val/Leu гена *F13* в группе пациенток и контрольной группе нами выявлены значимые различия ( $\chi^2 = 6,59$ ,  $P = 0,04$ ). Согласно полученным нами результатам, наличие генотипа Leu/Leu увеличивает риск невынашивания беременности в 1,87 раза (OR = 1,87 95% CI 1,08–3,23).

По нашим данным, наличие аллеля Ala полиморфного варианта Thr312Ala гена *F1* увеличивает риск невынашивания беременности в 1,24 раза (OR = 1,24 95% CI 1,02–1,51)

В то же время нами не обнаружено статистически значимых отличий в распределении частот генотипов и аллелей среди пациенток с невынашиванием беременности и в контрольной группе по мутациям G20210A гена *F2* и G1691A гена *F5*, несмотря на то, что эти мутации известны как факторы, существенно повышающие риск тромбообразования [10]. Согласно нашим данным, частота встречаемости мутации Лейдена в контрольной группе составила 2,60%, а мутации гена *F2* (G20210A) – 1,20%, что ниже среднеевропейских частот, описанных в литературе [10].

Также нами не выявлено статистически значимых различий в распределении частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов C667T и A1298C гена *MTHFR* в исследованных группах. Согласно литературным данным, факторами риска являются гомозигота T/T по полиморфизму C667T, гомозигота C/C по полиморфизму A1298C, а также комплекс гетерозигот C/T и A/C [15].

Таким образом, по результатам полученных нами данных, наибольший вклад в генетическую предрасположенность к невынашиванию беременности среди белорусских женщин вносят следующие аллельные варианты генов: 4G/4G гена *PAI-1*, Leu/Leu гена *F13*, а также аллель Ala гена *F1*.

Поскольку в формировании генетической предрасположенности к невынашиванию беременности имеет значение не только носительство аллельных вариантов риска по отдельности, но и их комбинации, нами проанализирована частота ряда сочетаний факторов риска в группе пациенток.

Анализ группы пациентов проводился по трем параметрам:

- комбинации гетерозиготных аллельных вариантов риска;
- комбинации гомозиготных аллельных вариантов риска;
- комбинации гомозиготных и гетерозиготных аллельных вариантов риска.

Результаты анализа представлены на рисунке. Для полиморфных вариантов, у которых гетерозиготные варианты не являются факторами рис-

ка, анализ по первому из параметров не проводился – частота встречаемости приравнивалась к нулю. Объемы выборок для каждого сравнения варьировались от 1310 до 1627 пациентов.

По полученным результатам можно сделать вывод, что чаще всего встречаются комбинации ассоциированных с невынашиванием вариантов следующих генов: *FXIII + PAI* (41,9%), *eNOS ab + PAI* (30,4%), *eNOS ab + F13* (20,4%). Нередко встречается также комбинация из трех факторов риска: *PAI + MTHFR* (C677T + A1298C) (31,2%), *F13 + MTHFR* (C677T + A1298C) (20,9%), *eNOS ab + F13 + PAI* (16,6%).

Обращает на себя внимание то, что несмотря на различия между частотами неблагоприятных вариантов полиморфизмов 4b/4a гена *eNOS*, C677T и A1298C гена *MTHFR* у пациенток и в контрольной группе нами не были выявлены – эти варианты часто встречаются в сочетании с другими факторами риска. Возможно, они усиливают эффекты других генов и поэтому также вносят существенный вклад в предрасположенность к невынашиванию беременности.

Комбинации в сочетании с мутацией Leiden (*F5* G1691A) или мутацией гена протромбина (*F2* G20210A) встречаются редко, что связано с низкой частотой встречаемости этих мутаций, как в группе пациенток, так и в контрольной группе.

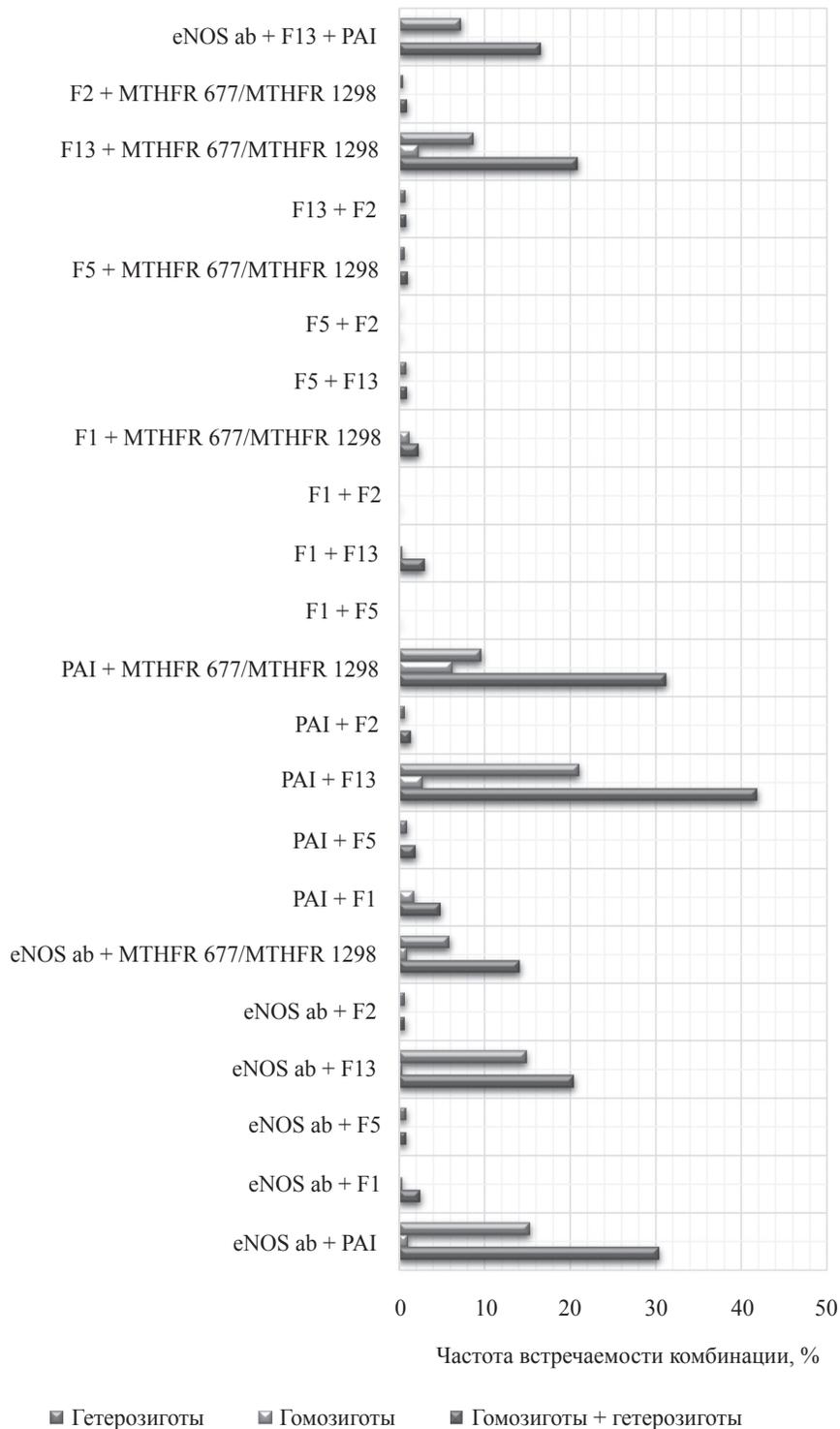
## Заключение

Проведено исследование ассоциации 8 полиморфных вариантов генов, ответственных за нарушения системы гемостаза, с невынашиванием беременности. Сравнение генотипов 1631 пациентки с патологией беременности и контрольной группы случайной выборки жителей г. Минска (663 человека) позволило выявить наиболее информативные маркеры риска нарушения беременности – это полиморфные варианты 4G/4G гена *PAI-1*, Leu/Leu гена *F13*, а также аллель Ala гена *F1*.

Поскольку в формировании генетической предрасположенности к невынашиванию беременности имеет значение носительство не только отдельных аллельных вариантов риска, но и их комбинации, проанализирована частота сочетаний факторов риска в группе пациенток. Показано, что чаще всего встре-

чались комбинации связанных с невынашиванием вариантов генов *F13 + PAI*, *eNOS ab + PAI*, *eNOS ab + F13*. Кроме того, довольно часто встречалась комбинация из трех факторов риска: *PAI + MTHFR*, *F13 + MTHFR*, *eNOS ab + F13 + PAI*.

Выявление носительства данных мутаций и полиморфных вариантов является актуальным и важным, поскольку коррекция эффектов выявленных неблагоприятных вариантов генов с помощью соответствующей терапии обеспечивает нормальное протекание беременности.



**Рисунок.** Распределение частот встречаемости комбинаций генотипов, связанных с невынашиванием беременности

**Список использованных источников**

1. Study on potential role of apolipoprotein E in recurrent pregnancy loss / E. Korkmaz [et al.] // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2013. – Vol. 5, № 5. – С. 1408–1410.
2. Тихомиров, А.Л. Привычное невынашивание беременности: причины, диагностика и современные подходы к терапии / А.Л. Тихомиров, Д.М. Лубнин // *Фарматека*. – 2004. – Т. 1. – С. 28–39.
3. Серов, В.Н. Привычное невынашивание беременности: современные представления о патогенезе, диагностике и лечении / В.Н. Серов, В.М. Сидельникова, Е.В. Жаров // *Журнал РОАГ*. – 2008. – № 3. – С. 28–41.
4. Alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism / A.M. Carter // *Blood*. – 2000. – Vol. 96. – P. 1177–1179.
5. Ассоциация наследственных факторов тромбофилии с невынашиванием беременности у женщин в русской популяции: отчет о НИР / ГУ Медико-генетический научный центр РАМН; Е.А.Калашникова, С.Н. Кокаровцева. – Москва, 2005. – 3 с. – № ГР 115478.
6. P05121 (*PAI1\_HUMAN*) [Electronic resource] / The Universal Protein Resource (UniProt). – 2014. – Mode of access: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05121>. – Date of access: 17.03.2014.
7. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy [Electronic resource] / The National Center for Biotechnology Information. – 2001. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=11745998>. – Date of access: 18.03.2014.
8. NOS3 nitric oxide synthase 3 [Electronic resource] / The National Center for Biotechnology Information. – 2014. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846>. – Date of access: 17.03.2014.
9. Leclerc, D. Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) and overview of mutations/polymorphisms [Electronic resource] / The National Center for Biotechnology Information. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6561/>. – Date of access: 18.03.2014.
10. Бескоровайная Т.С. Влияние некоторых генетических факторов на нарушение репродукции у человека: дис. канд. мед. наук: 03.00.15 / Т.С. Бескоровайная. – Москва, 2005. – 89 с.
11. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening / P.M. Ridker // *JAMA*. – 1997. – Vol. 277 (16). – P. 1305–1307.
12. Rodeghiero, F. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism / F. Rodeghiero, A. Tosetto // *Ann Intern Med*. – 1999. – Vol. 130. – P. 643–650.
13. The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic plasminogen activator inhibitor type 1 gene: an independent risk factor for serious pregnancy complications / C.J. Glueck [et al.] // *Metabolism*. – 2000. – Vol. 49. – № 7. – P. 845–852.
14. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val-34Leu polymorphism: imPAIred fibrinolysis and early pregnancy loss / A. Dossenbach-Glaninger [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2003. – Vol. 49. – № 7. – P. 1081–1086.
15. Isotalo, P.A. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations / P.A. Isotalo, G.A. Wells, J.G. Donnelly // *The American Journal of Human Genetics*. – 2000. – Vol. 67. – № 4. – P. 986–990.

N.G. Sedlyar, A.L. Gonchar, M.D. Ameliyanovich, I.B. Mosse

## ROLE OF GENETIC FACTORS IN PREDISPOSITION TO PREGNANCY LOSS

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus  
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

Association of 8 genetic polymorphisms responsible for hemostasis disorders with pregnancy loss was investigated. Genotypes of women who had recurrent miscarriages were compared with those of control group. It allowed identifying the most informative polymorphisms – 4G\4G of gene *PAI-1*, Leu/Leu of gene *F13* and allele Ala of gene *F1*. Some combinations of two risk polymorphisms were found to be prevalent: *F13* + *PAI* (41,9%), *eNOS* ab + *PAI* (30,4%) and *eNOS* ab + *F13* (20,4%). The combinations of three risk polymorphisms: *PAI* + *MTHFR* (C677T + A1298C), *F13* + *MTHFR* (C677T + A1298C), *eNOS* ab + *F13* + *PAI* are also common. Molecular-genetic investigation of women with recurrent miscarriages is very urgent because therapeutic correction of effects of detected negative genes provides successful childbirth.

**Key words:** pregnancy loss, genetic testing, PCR.

*Дата поступления статьи 1 февраля 2016 г.*

Л.В. Кухтинская, А.В. Зураев, В.А. Будевич, И.Б. Моссе

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТАХ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЧЕЛОВЕКА (Обзорная статья)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; e-mail: I.Mosse@igc.by  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Данная обзорная статья освещает современное состояние исследований в области генетики стрессоустойчивости. Рассмотрены основные механизмы и пути развития эмоционального стресса, связанные с функционированием систем транспортеров и рецепторов ряда О-катехоламинов и нейропептидов, таких как серотонин, дофамин, норадреналин, окситоцин и вазопрессин. Взаимодействие множества генов, ассоциированных с психологическими особенностями человека, а также влияние факторов среды на разных этапах онтогенеза обуславливают индивидуальные различия стрессоустойчивости индивидуума.

**Ключевые слова:** стрессоустойчивость, генетические механизмы, система серотонина, система норадреналина, система окситоцина.

### Введение

Многие особенности современного мира способствуют повышению уровня психоэмоционального напряжения, возникновению таких психических состояний, как тревога, неудовлетворенность жизнью, раздражительность, агрессивность, депрессия и др. [1]. В 1990-х гг. началось изучение молекулярно-генетических основ отдельных свойств характера личности и темперамента, и на сегодняшний день неоспоримо значение генетических факторов в формировании индивидуальной вариативности отдельных психологических характеристик личности.

В формировании индивидуальных вариаций психодинамики в целом и психоэмоциональной устойчивости в частности вовлечено множество генов, как правило, с небольшим вкладом каждого из них, что делает задачу выявления роли конкретного гена чрезвычайно сложной. К примеру, вклад наследственности в формирование черт темперамента составляет 30–60% [2]. Посредством ряда семейных, близнецовых и эпидемиологических исследований установлено, что наследуемость, например, тревожности составляет около 45% (чрезмерной тревожности – 70–90% для монозиготных близнецов), депрессии в качестве психоэмоционального расстройства – 38%, а в качестве клиническо-

го заболевания – 48–76% [3–5]. При этом тревога и депрессия генетически гетерогенны [5]. Депрессивно-маниакальный психоз (биполярное расстройство) на 68%, а шизофрения на 34% генетически детерминированы [5]. Также в близнецовых исследованиях показана высокая наследуемость социальных фенотипов [6].

Выявление генетических маркеров стрессоустойчивости является весьма значимым и представляет огромный интерес как для понимания молекулярно-генетических механизмов психологической устойчивости в отдельном этносе, так и для создания программ, выявляющих успешность в профессиональной деятельности, для формирования групп риска по развитию пограничных состояний и психических заболеваний, для разработки программ профилактики и коррекции девиантного поведения и создания эффективных лекарственных препаратов.

### Концепции, связывающие психологические свойства личности с биологическими характеристиками

В современном понимании наследственные особенности черт личности обусловлены генетической детерминированностью нейронных систем мозга. Такому подходу предшествовал

ряд теорий эмоций, сосуществующих параллельно либо сменяющих друг друга («Классическая», «Таламическая», «Биологическая», «Вегетативно-гуморальная» и др.) [7]. Согласно анатомо-физиологической теории эмоций Дж. Грэя, все виды эмоций порождаются тремя нейронными системами, которые, в свою очередь, определяют появление трех основных групп эмоций. А индивидуальные особенности эмоциональности человека зависят от баланса этих эмоциональных систем. Повышенная активация одной из систем Дж. Грэя (система В/5) предопределяет склонность человека к высокой тревожности [7]. Позже С.Р. Клонингер выдвинул гипотезу о взаимосвязи функционирования нейромедиаторных систем мозга с особенностями темперамента (психобиологическая модель индивидуальности) [8]. Затем Д.Е. Коминг (2000) уточнил, что формирование личностных черт происходит при взаимодействии генов различных нейромедиаторных систем мозга, т.е. нейродинамикой мозга в целом [9]. При изучении психодинамики часто используется размерный подход Г. Айзенка, выделившего три основных измерения личности (темперамента): экстраверсия, нейротизм, психотизм, и Р. Кэттела, чья модель темперамента включает уже 16 личностных факторов, которые, по мнению В.Б. Павленко, сводятся к трем, отчетливо представляющим экстраверсию, нейротизм и, частично, психотизм [10]. В настоящее время все большее распространение получают идеи Д.Е. Коминга.

### **Психоэмоциональная устойчивость и механизм развития эмоционального стресса**

Важными этапами становления понятия психоэмоциональной устойчивости является разработка Г. Селье (1936) учения о стрессе и Р. Лазарусом (1966) когнитивной теории стресса и копинга (в рамках которой рассматривается системный (физиологический) и психический (эмоциональный) стресс, а также копинговые (когнитивные, эмоциональные и поведенческие) стратегии осознанного поведения для совладания со стрессом) [11]. В настоящее время под психоэмоциональной устойчивостью понимается стрессоустойчивость к эмоционально окрашенным факторам.

При эмоциональном стрессе неблагоприятные факторы воздействуют на организм опосредованно, через включение отношения человека к ситуации, т.е. первостепенным является восприятие ситуации как угрожающей. По мнению В.Э. Мильмана, психический стресс можно представить в качестве функции двух факторов: величины потребности в достижении и субъективной оценки вероятности достижения [12].

Физиологические механизмы развития стресс-реакции на психологический стресс типичны. После воздействия стресс-фактора информация от рецепторов поступает в неокортекс, ретикулярную формацию, лимбическую систему и гипоталамус, где подвергается эмоциональной оценке с формированием вывода о значимости информации для организма в самом неокортексе [13, 14]. Если ситуация воспринимается как угрожающая, то по сигналу от гипоталамуса посредством медиатора норадреналина и норадренергических элементов лимбико-ретикулярной системы происходит быстрая активация симпатoadреналовой системы (САС) и более медленная – гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (ГГАС), приводящая к высвобождению гормонов стресса (катехоламины, кортикостероиды и др.) [14, 15], что запускает каскад специфических реакций, характерных для стресса. Многие физиологические и биохимические реакции на психологический и физиологический стресс являются общими (активация стресс-реализующей (САС и ГГАС) и стресс-лимитирующей (эндогенная опиоидная и ГАМК) систем, подавление репродукции, изменение поведения, снижение аппетита и умеренная гипертермия и др.) [14]. Однако при некоторой типичности физиологических проявлений стресса после запуска защитных механизмов, на этапе оценки уровня угрозы наблюдается большое разнообразие психологических реакций [16].

В ряде исследований показано, что длительный, чрезмерный или повторяющийся стресс оказывает влияние на развитие и проявление психических расстройств, включая беспокойство, депрессию, посттравматическое стрессовое расстройство и шизофрению, при наличии наследственной предрасположенности [17], а также посредством эпигенетической регуляции активности генов [18].

## **Проблематика исследования молекулярно-генетических основ психоэмоциональной устойчивости**

Противоречивость данных при поиске генетических детерминант стрессоустойчивости обусловлена рядом проблем, возникающих на пути исследователя. Это и межгенные взаимодействия, и сложности определения вклада социокультурной среды на всех этапах онтогенеза, и сложности методического плана.

1. Уровень психоэмоциональной устойчивости, как и другие черты темперамента, зависит от суммарного взаимодействия многих генов. Вклад отдельного гена составляет порядка 1–4% [19]. На сегодняшний день, обнаружены хромосомные регионы, сцепленные с определенными психотипами либо психическими заболеваниями [20], что частично объясняет некоторые спорные результаты, полученные разными группами исследователей, поскольку ассоциация гена с определенной психологической чертой может быть обусловлена его локализацией.

2. Проявление генов модифицируется в зависимости от условий среды (при различном уровне стресса). Огромное значение имеет предшествующий опыт индивида. Влияние социокультурной среды особенно важно на ранних этапах формирования личности (до 3–6 лет), что сказывается на особенностях проявления индивидуальных черт, детерминируемых каким-либо полиморфным вариантом гена [20]. Индивидуальные особенности психодинамики зависят от ряда факторов окружающей среды, таких как стиль воспитания, насилие и наличие стрессовых ситуаций в детстве, воспитание в неполной семье, сезон рождения, порядок рождения, социально-экономический статус [21, 22, 23, 24].

3. Поскольку на проявление генов психоэмоциональной устойчивости (и психодинамики в целом) воздействуют социально-средовые факторы, в целях успешности и валидности исследования требуется проведение большого объема дополнительных психологических и клиничко-лабораторных тестов. К примеру, изменение уровня глюкозы в крови в ответ на умеренный стресс-тест может служить хорошим диагностическим критерием [25].

4. В настоящее время подавляющее большинство работ по поиску ассоциаций генетических полиморфизмов с личностными характеристиками проводится на людях, страдающих различными психическими расстройствами в целях поиска генетических основ заболеваний. Таких исследований явно недостаточно для формирования полноценного представления о наследуемости такой психологической характеристики, как психоэмоциональная устойчивость. Назрела необходимость идентификации устойчивых психотипов и их генетических маркеров.

5. В человеческой популяции существует большая когорта индивидов, сохраняющих относительную психологическую стабильность в условиях чрезмерной эмоциональной нагрузки. К психологическим чертам, способствующим формированию психоэмоциональной устойчивости личности, можно отнести тип темперамента (сангвинический по Гиппократу, экстравертный по Г. Айзенку, аффективно-экзальтированный по К. Леонгарду), адекватный уровень самооценки, тревожности и личной ответственности (в большей мере присущей интерналам), мотивацию на достижение цели [11, 26, 27].

6. Большинство отделов мозга формируются полностью к 20–25 годам, и в течение жизни наблюдаются изменения экспрессии ряда генов [28, 29]. В работах ряда авторов выявлены возрастные отличия функционирования дофаминергической, серотонинергической и норадренергической систем. Существует некоторая вариабельность личностных черт с возрастом, обусловленная процессами социокультурного развития (снижается уровень нейротизма, зависимости от вознаграждения, мотивации [21, 30, 31] и все более значимым становится опыт социального взаимодействия [32]).

7. При оценке стрессоустойчивости необходимо учитывать уровень навыка психологической саморегуляции (эмоционального интеллекта) и тот факт, что в полной мере оценка стрессоустойчивости возможна только в экстремальных условиях [1].

### **Гены серотонинергической системы**

Серотонин является одним из модуляторов реакций гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси на острый и хронический стресс.

С нарушением функции серотонинергической системы связывают развитие психических нарушений, проявляющихся депрессией и тревогой. Снижение уровня серотонина усиливает агрессивное поведение и импульсивность, тогда как повышение серотонинергической активности такие проявления нивелирует [33].

**Ген транспортера серотонина (5-HTT, SL-C6A4).** Транспортер серотонина отвечает за активный транспорт серотонина в нейронах головного мозга, а также во многих периферических тканях [34]. Кодирующий его ген имеет размер 37,8 Кб, локализован в хромосоме 17q11.2 и состоит из 14 экзонов [35]. Функциональный инсерционно-делеционный **полиморфизм 5-HTTLPR (SHTTLPR)** включает 14 (аллель S) или 16 (аллель L) повторяющихся последовательностей в районе промотора гена [19, 31]. Показано, что при наличии короткого аллеля S экспрессия гена снижается на 60–70% в головном мозге и на 30–40% – в лимфоцитах по сравнению с носителями только аллеля L [34, 36]. Влияние полиморфизма 5-HTTLPR проявляется в модулировании реакции человека на стресс. Носители аллеля L отличаются агрессивностью и импульсивностью, асоциальным поведением [35, 37, 38], а аллель S связан с большей вероятностью развития психоэмоциональных нарушений (депрессии, посттравматического стрессового расстройства) в неблагоприятной среде (стресс, усталость) и алкогольной зависимости [39, 40, 41].

**Рецепторы транспортера серотонина.** Все рецепторы серотонина, за исключением 5-HT<sub>3</sub>, сопряжены с G-белком. 5-HT<sub>3</sub> относится к рецепторам ионного канала [42, 43]. **Ген рецептора серотонина 5-HT<sub>1A</sub>** расположен в регионе 5q12.3 хромосомы и не имеет интронов. Полиморфизм C-1019G (rs 6295), представляющий собой замену в промоторной области гена, существенно влияет на степень его экспрессии. Генотип CC ассоциирован с более высоким риском возникновения депрессии [44], развитием мигрени [45, 46]. В свою очередь, носители аллеля G отличаются повышенным нейротизмом и имеют высокие показатели по шкале избегания ущерба [44]. Имеются данные о связи аллеля G с паническим расстройством [47]. Полиморфные варианты **гена рецептора серотонина 5-HT<sub>2A</sub>** связаны с развитием психических, поведенческих расстройств, ней-

родегенеративных заболеваний, нарушением ритма сна. Ген **5-HT<sub>2A</sub>** локализован в 13q14–q21 области хромосомы, имеет 2 интрона и 3 экзона. На сегодняшний день достаточно активно исследуется **полиморфизм T102C (rs 6313)**. Аллель T ассоциирован с усилением экспрессии гена [48–50]. Носители генотипа TT отличаются повышенным уровнем агрессивности [51] и стрессогенным ухудшением глубины и длительности сна. У гетерозигот CT отмечен высокий уровень профессионального стресса [52]. Наличие в генотипе одного аллеля C ассоциировано с алкогольной зависимостью, склонностью к депрессиям и тревожностью [53, 54]. В работе В.Е. Голибета, проводившего исследование двух полиморфных маркеров T102C и A-1438G у здоровых индивидов русской популяции, показано, что генотипы 5-HT<sub>2A</sub> TC и 5-HT<sub>2A</sub> AG, в отличие от гомозиготных генотипов, отличаются пониженным уровнем социальной интроверсии и тревожности, что может свидетельствовать о большей социальности и активности гетерозигот [55]. **Гены рецепторов 5-HT<sub>3A</sub> и 5-HT<sub>3B</sub>** локализованы в регионах 11q23.1 и 11q23.2 соответственно. В последнее время публикуется большое число работ, описывающих влияние данного типа рецепторов на процессы, лежащие в основе систем памяти [56]. Также имеются данные о связи **полиморфного варианта C178T (rs 1062613)** со склонностью к тревожности у лиц, не страдающих заболеваниями психиатрического профиля [57] и с лабильностью настроения при биполярном расстройстве [58].

### Гены дофаминергической системы

Функциональное разнообразие эффектов дофаминергической системы определяется наследственными различиями в структуре и уровне экспрессии белков DAT, COMT, DRD1, DRD2, DRD3, TH1, DBH, MAOB и др. Синтез медиатора дофамина в мозге постепенно возрастает от рождения до трехлетнего возраста, имея при этом характерное онтогенетическое распределение в различных зонах мозга [59]. Полиморфизмы генов дофаминергической системы связаны с уровнем тревожности и обуславливают проявление таких черт личности, как экстраверсия, импульсивность, стремление к новизне [8, 21, 60]. Дан-

ная система, совместно с миндалевидным комплексом, является ведущей в развитии тревожно-депрессивных расстройств [61, 62]. Повышенная тревожность ассоциирована с увеличением площади базолатеральной группировки миндалевидного комплекса, что может служить диагностическим критерием [61].

**Ген транспортера дофамина (*DAT1*, *SLC6A3*)** кодирует синтез белка-переносчика дофамина (*DAT1* или *SLC6A3*), который играет важную роль в нейротрансмиссии, ограничивая активность дофаминергической системы в синапсах. *DAT1* принадлежит к семейству  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -зависимых переносчиков нейромедиаторов, интегрирован в мембрану клетки и осуществляет обратный захват нейромедиатора в пресинаптические терминалы. Ген *DAT1* человека, длиной 52,6 т.п.н., локализован на 5-ой хромосоме в регионе p15.33 и содержит 15 экзонов [63,64]. Одним из наиболее изученных является полиморфизм числа tandemных повторов (*VNTR*) гена *DAT1* в 3'-нетранслируемой области гена (3'-UTR) с числом копий от 3 до 13 (длина одной копии 40 п.н.) [65]. Поскольку полиморфный сайт лежит вне открытой рамки считывания *DAT*, полиморфизм *VNTR* может влиять на уровень экспрессии *DAT* [66] в зависимости от числа копий повторов. Носители генотипа с 9 единицами повтора обладают повышенной тревожностью по сравнению с носителями других генотипов [67]. Имеются данные о связи полиморфизма *VNTR* с уровнем эмоциональности, эмпатии у взрослых индивидуумов [24]. В свою очередь носители генотипа 9R9R склонны к агрессивному и асоциальному поведению [68]. Обнаружена также ассоциация полиморфизма *VNTR* с синдромом дефицита внимания (СДВГ), болезнью Паркинсона, шизофренией, алкоголизмом, курением, употреблением наркотиков [69, 70].

**Ген рецептора дофамина 2 (*DRD2*)** является наиболее значимым среди генов-рецепторов дофамина. Дофаминовые рецепторы типа 2 экспрессируются преимущественно в стриатуме (полосатом теле), коре головного мозга, среднем мозге, и особенно широко распространены в лимбической системе [21, 62]. У человека ген, кодирующий рецептор дофамина 2 *DRD2*, расположен на участке 11q22.3–23.1 и содержит ряд полиморфных маркеров. Известен полиморфизм *TaqIA* (Glu-

713Lys, C939T, rs 1800497), локализованный в экзоне 8, который оказывает функциональное влияние на уровень экспрессии рецептора. Полиморфизм *TaqIA* ассоциирован с долговременной памятью у психически здоровых людей, расстройствами эмоциональной сферы при маниакально-депрессивном психозе, шизофрении [62, 71, 72]. Минорный аллель (Т, или А1) характеризуется более низким уровнем экспрессии в сравнении с аллелем (С, или А2) [21, 71] и ведет к снижению плотности рецепторов в стриатуме. Носители аллеля А1 (Т), частота встречаемости которого в европейской популяции составляет 18%, обладают повышенной тревожностью [67].

**Ген фермента катехол-О-метилтрансферазы (*COMT*)** кодирует фермент, участвующий в обмене нейропептидов (окситоцина, вазопрессина и др.), в том числе и катаболизме дофамина в межклеточном пространстве, в связи с недостатком в префронтальной коре переносчика дофамина [71, 72]. Динамика данных нейропептидов в разных участках мозга регулирует социальное поведение [72]. Ген *COMT* расположен на участке 22q11.1–q11.2. Существуют 2 изоформы данного фермента: S-COMT (растворимая изоформа, обнаружена в крови и периферических тканях) и MB-COMT (мембран-связанный протеин, основная часть которого локализована в префронтальной коре) [73, 74]. Наиболее известен **полиморфизм G472A** (rs 4680), представляющий собой однонуклеотидную замену в экзоне 4 гена с замещением аминокислоты Val на Met в кодоне 158 для изоформы MB-COMT и в 108 кодоне – для S-COMT [73]. Аллель Met связан с низкой дофаминергической активностью и термостабильностью, что сопровождается повышением уровня дофамина в префронтальной коре, а аллель Val – с высокой дофаминергической активностью (в 3–4 раза превышает таковую у носителей аллеля Met) [71, 73]. Носители аллеля Val отличаются более выраженным чувством сострадания и имеют преимущество в решении задач с эмоциональным компонентом [75]. Полиморфизм гена связан с когнитивными функциями [71, 73, 75], восприятием боли, психическими расстройствами, склонностью к самоубийству, агрессивностью [76], экстраверсией [77] и поиском новизны [74, 78].

## Гены норадренергической системы

Согласно современным представлениям, гены адренергических рецепторов связаны с мотивацией [31], тревожностью, склонностью к депрессии и суициду [79], а также с формированием раздражительности и враждебности [9]. Гиперфункция норадренергической системы вызывает возбуждение и усиление поисковой активности [59, 80].

Среди генов норадренергической системы можно выделить 4 наиболее значимых гена, ответственных: за синтез норадреналина (ген дофамин-3-гидроксилазы *DBH*), за его транспорт (ген переносчика норадреналина *NET1*), за рецепцию (ген альфа-2А-адренорецептора *ADRA2A*) и за метаболизм (ген моноаминоксидазы *MAOA*).

**Ген транспортера норадреналина *NET*** (*NET1*, *SLC6A2*) локализован на хромосоме 16q12.2 и состоит из 14 экзонов [81], протяженностью 45 Кб [79]. Транспортер норадреналина осуществляет обратный захват в пресинаптические терминалы 80–90% норадреналина, секретированного из синапсов в межсинаптическое пространство, оставшиеся 10–20% попадают в кровь и экстранейрональные ткани. Транспортер норадреналина принимает участие и в транспорте дофамина [82]. Ген *NET1* связан с депрессией [79, 83, 84], увеличением риска асоциального поведения у взрослых и токсикоманией, а также СДВГ [59, 80].

**Ген альфа-2А-адренорецептора (*ADRA2A*)** кодирует бета 2 адренергический рецептор, локализован в хромосоме 10q25.2, охватывает 3876 п.н. и состоит из 1 экзона [85]. Наиболее изучен **полиморфизм –1291C>G (rs 1800544)**. Носители аллеля G отличаются предрасположенностью к СДВГ [59, 85], шизофрении и алкоголизму [86], невнимательностью [87], замедленным восприятием [88]. В то же время, ряд авторов указывают на отсутствие связи гена *ADRA2A* с уровнем норадреналина плазмы и эмоциональной устойчивостью [89, 90].

## Система окситоцина

**Система окситоцина (гены *OXT*, *OXTR*)** играет ключевую роль в выраженности психологической и физиологической реакции на стресс при наличии либо отсутствии психологической поддержки [74].

**Ген *OXT*** – ген прогормона, кодирующий синтез предшественника окситоцина и нейрофизина I (НФ1), локализован в хромосоме 20p13, охватывает 3647 п.о. и содержит 4 экзона. Окситоцин – нейропептид с гормональной функцией, синтезируется в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса и транспортируется в секреторных гранулах совместно с НФ1 к задней доле гипофиза [91]. Окситоцин снижает секрецию адренокортикотропного гормона (АКТГ) и кортизола, соответственно, тем самым угнетая ответ ГАС [92]. Имеются данные о влиянии социально-средовых факторов на экспрессию гена и ее изменение посредством эпигенетической регуляции [93].

Окситоцин играет ключевую роль в регуляции сложных социальных когний и в социальном поведении, в том числе в формировании привязанности [94], нравственных качеств, тревоги и страха [95]. Нейропептид окситоцин сопряжен со сниженным гормональным ответом на стресс и сниженной тревожностью у пациентов с депрессией [74, 96]. При поступлении сигнала из окружающей социальной среды и его интерпретации в качестве «безопасного», окситоцин способствует формированию просоциального поведения, в случае поступления «небезопасных» сигналов формируется антисоциальное поведение [97]. Поскольку экспрессия окситоцина у женщин выше, чем у мужчин, окситоцин обуславливает половые различия в реакции на стресс.

**Ген рецептора окситоцина (*OXTR*)** локализован в хромосоме 3p25–3p26.2, охватывает 17 Кб и имеет 4 экзона и 3 интрона [95, 98]. Синтезируемый полипептид содержит 389 аминокислот и принадлежит к IG-рецепторам [95]. В последние годы проведено много исследований, которые показали связь гена *OXTR* с аутизмом [98], шизофренией, психопатиями [99].

На сегодняшний день **полиморфный вариант rs 53576 (G/A)**, локализованный в третьем интроне *OXTR*, рассматривают как особенно перспективный в исследовании социально-ориентированного поведения [94]. В сравнении с носителями гомозиготного варианта по аллелю G rs 53576 (GG), индивиды с одним или двумя копиями аллеля A (AG/AA) проявляют более низкую поведенческую

и диспозиционную эмпатию [91], отличаются пониженным уровнем оптимизма и чувства собственного достоинства [100]. Носители генотипа GG характеризуются повышенным доверием к окружающим [101]. У лиц с одной или двумя копиями G аллеля (rs 53576) при наличии социальной поддержки уровень кортизола в ответ на стресс ниже, в сравнении с людьми с таким же генотипом, но не получавших никакой социальной поддержки [73]. Носители аллеля G являются более чуткими, чувствуют себя менее одинокими в социальном окружении, применяют более эмоциональные методы воспитания, имеют более низкие показатели развития аутизма и склонны к сопереживанию [102].

Таким образом, исследования последних лет показывают, что генетические полиморфизмы генов системы окситоцина, оказывая влияние на эффективность позитивного социального взаимодействия, выступают в роли защитного фактора в стрессовой ситуации.

### Система аргинин-вазопрессина

**Ген предшественника аргинин-вазопрессина (AVP)** локализован в хромосоме 20p13 и содержит 4 экзона. Кодировает белок, который является предшественником нескольких белковых продуктов: нейропептидного гормона аргинин-вазопрессина, нейрофизина 2 и копептина [104, 105, 106, 107]. Копептин и вазопрессин выделяются в кровотоки в эквивалентных концентрациях, но, в отличие от вазопрессина, копептин имеет больший размер и большее время жизни (20 минут). В связи с этим его рекомендуют использовать для определения количества выделившегося вазопрессина [108]. Необходимо отметить, что психологический стресс приводит к увеличению уровня копептина [105].

Аргинин-вазопрессин – нейропептид, принимающий участие в активации ГГАС, в процессах обучения и в регуляции социального поведения (привязанности, агрессии, тревожности и т.д.) [96]. Синтез аргинин-вазопрессина связан с циркадными ритмами [106]. Усиление генной экспрессии наблюдается при выраженном стрессе и самозащите [109]. В отличие от гена *OXT*, *AVP* в большей

степени регулирует социальное поведение у мужчин. Функциональные исследования указывают на высокую концентрацию аргинин-вазопрессина в плазме крови у пациентов с депрессией, суицидальным поведением [110] и при аутизме [111].

**Ген аргинин-вазопрессинового рецептора 1A (AVPR1A)** локализован в хромосоме 12q14.2 и имеет 3 экзона, продукт гена состоит из 418 аминокислот [112]. Промоторный регион гена *AVPR1A* (12q14–15) характеризуется наличием трех функциональных микросателлитных повторов ((GT)<sub>25</sub>, RS1 и RS3). Локус RS3 в промоторном регионе гена связан с формированием доминантного типа социального поведения у шимпанзе [113], склонностью к моногамному поведению у полевок и качеством отношений в паре у человека [96, 114]. Полиморфизм RS1 ассоциирован со склонностью к поиску новизны и «избеганию ущерба» [115].

**Ген аргинин-вазопрессинового рецептора 1B (AVPR1B)** протяженностью 8008 п.о. локализован в хромосоме 1q32.1 и состоит из 2 экзонов [116]. Рецептор 1B аргинин-вазопрессина опосредует стимуляторные эффекты аргинин-вазопрессина на синтез адренокортикотропного гормона (АКТГ) [117]. Ассоциативные исследования также выявили вовлеченность гена *AVPR1B* в развитие агрессивного поведения [118], аффективных и панических расстройств [117, 119].

### Изучение половых особенностей стрессоустойчивости

Половые различия психодинамики объясняются дифференцированным влиянием андрогенов, прогестина и эстрогена на реализацию эффектов нейромедиаторных систем у мужчин и женщин [120]. Имеются данные о половой специфичности ассоциаций многих генов с различными психическими признаками и заболеваниями [30, 121]. В ряде работ отмечается повышение тревожности (нейротизма) у женщин в сравнении с мужчинами [21]. Важную роль в формировании гендерных особенностей социального поведения играют системы окситоцина и аргинин-вазопрессина, а также сами половые гормоны и их рецепторы.

## Заключение

Многочисленные данные о наследуемости психологических черт личности создают предпосылки к дальнейшему поиску молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к психоэмоциональной устойчивости. Создание психобиологической модели С.Р. Клонингера и концепции Д.Е. Коминга, послужило началом широкомасштабных исследований генетических основ психодинамики. Все формы поведения человека детерминированы большим числом генов, которые влияют на психологические особенности индивидуума, но не определяют их, а обуславливают определенный тип реакции организма на те или иные условия среды. И хотя вклад аллелей отдельных генов в формирование психоэмоциональной устойчивости невелик, суммирование эффектов аллелей многих генов, а также учет эпигенетических факторов помогут в поиске генов предрасположенности к психологической стрессоустойчивости. Только комплексное исследование взаимосвязи генетических факторов, с психологическими и физиологическими показателями, с учетом социальных факторов, позволит выявить ключевые молекулярно-генетические маркеры, ассоциированные с проявлением психоэмоциональной устойчивости.

## Список использованных источников

1. Аболин, Л.М. Эмоциональная устойчивость и пути ее повышения / Л.М. Аболин // Вопросы психологии. – 1989. – № 4 – С. 141–149.
2. Saudino, K.J. Behavioral genetics and child temperament / K.J. Saudino // J. Dev. Behav. Pediatr. – 2005. – Vol. 26, № 3. – P. 214–223.
3. Increased amygdala activation to angry and contemptuous faces in generalized social phobia / M.B. Stein [et al.] // Arch. Gen. Psychiatry. – 2002. – Vol. 59, № 11. – P. 1027–1034.
4. Uher, R. Gene-environment interactions in severe mental illness / R. Uher // Front. Psychiatry. – 2014. – Vol. 5, № 48. – P. 1–9.
5. Joint analysis of psychiatric disorders increases accuracy of risk prediction for schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder / R. Maier [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2015. – Vol. 96, № 2. – P. 283–294.
6. Genetics of human social behavior / R.P. Ebstein [et al.] // Neuron. – 2010. – Vol. 65, № 6. – P. 831–844.
7. Глотова, Г.А. Интерсубъективность бессознательного / Г.А. Глотова, Н.С. Минаева. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2005. – 456 с.
8. Cloninger, C.R. A psychobiological model of temperament and character / C.R. Cloninger, D.M. Svrakic, T.R. Przybeck. // Arch. Gen. Psychiatry. – 1993. – Vol. 50, № 12. – P. 975–990.
9. Comings, D.E. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders / D.E. Comings, K. Blum // Prog. Brain Res. – 2000. – Vol. 126. – P. 325–341.
10. Павленко, В.Б. Роль аминергических нейронных систем мозга в формировании индивидуальных особенностей поведения / В.Б. Павленко // Таврический медико-биологич. вестн. – 2003. – Т. 6, № 3. – С. 245–248.
11. Водопьянова, Н.Е. Психодиагностика стресса / Н.Е. Водопьянова. – СПб.: Издат. дом «Питер», 2013. – 338 с.
12. Мильман, В.Э. Стресс и личностные факторы регуляции деятельности / В.Э. Мильман // Стресс и тревога в спорте: сб. ст. / сост.: Ю.Л. Ханин. – М., 1983. – С. 24–46.
13. Charmandari, E. Endocrinology of the stress response / E. Charmandari, C. Tsigos, G. Chrousos // Annu. Rev. Physiol. – 2005. – Vol. 67. – P. 259–284.
14. Chrousos, G.P. Stress and disorders of the stress system / G.P. Chrousos // Nat. Rev. Endocrinol. – 2009. – Vol. 5, № 7. – P. 374–381.
15. Throusos, G.P. Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders / G.P. Throusos, T. Kino // Stress. – 2007. – Vol. 10, № 2. – P. 213–219.
16. Психофизиологические и нейрохимические механизмы стресса и шока: эксперимент и модель / С.Б. Парин [и др.] // Вестн. Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского. – 2007. – № 4. – С. 190–196.
17. Luethi, M. Stress effects on working memory, explicit memory, and implicit memory for neutral and emotional stimuli in healthy men / M. Luethi, B. Meier, C. Sandi // Front. Behav. Neurosci. – 2009. – Vol. 2, № 5 – P. 1–9.

18. Genetic variation in FKBP5 associated with the extent of stress hormone dysregulation in major depression / A. Menke [et al.] // *Genes Brain Behav.* – 2013. – Vol. 12, № 3. – P. 289–296.
19. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region / K.P. Lesch [et al.] // *Science.* – 1996. – Vol. 274, № 5292. – P. 1527–1531.
20. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis / Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium // *Lancet.* – 2013. – Vol. 381, № 9875. – P. 1371–1379.
21. Казанцева, А.В. Молекулярно-генетические основы черт темперамента и личности : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.15 / А.В. Казанцева; РАН, Ин-т биохимии и генетики – Уфа, 2008. – 23 с.
22. The socio-economic status of communities predicts variation in brain serotonergic responsivity / S.B. Manuck [et al.] // *Psychol. Med.* – 2005. – Vol. 35, № 4. – P. 519–528.
23. The association between conduct problems and maltreatment: Testing genetic and environmental mediation / R.J. Schulz-Heik [et al.] // *Behav. Genet.* – 2010. – Vol. 40, № 3. – P. 338–348.
24. Gene-Environment Correlation Between the Dopamine Transporter Gene (DAT1) Polymorphism and Childhood Experiences of Abuse / W. Rehan [et al.] // *J. Interpers. Violence.* – 2016. – P. 1–14.
25. The change in blood glucose level after a moderate stress as a parameter of stress reactivity in anxiety and depression: a pilot translational study / S.V. Freiman [et al.] // *Neurochemical J.* – 2015. – Vol. 9, № 2. – P. 146–148.
26. Русалов, В.М. О природе темперамента и его месте в структуре индивидуальных свойств человека / В.М. Русалов // *Вопросы психологии.* – 1985. – № 1. – С. 19–32.
27. Ильин, Е.П. Мотивация и мотивы / Е.П. Ильин. – СПб: Издат. дом «Питер», 2013. – 512 с.
28. Association study between the novel functional polymorphism of the serotonin transporter gene and suicidal behaviour in schizophrenia / V. De Luca [et al.] // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 2006. – Vol. 16, № 4. – P. 268–271.
29. Low self-esteem is related to aggression, antisocial behavior, and delinquency / M.B. Donnellan [et al.] // *Psychol. Sci.* – 2005. – Vol. 16, № 4. – P. 328–335.
30. Вовлеченность полиморфных маркеров гена рецептора эстрогена альфа (ESR1) в вариации черт личности / Ю.Ю. Кутлумбетова [и др.] // *Вестн. Башкирского ун-та.* – 2014. – Т. 19, № 1. – С. 49–53.
31. Полиморфизм генов серотонинового обмена и мотивационно-потребностная сфера личности / Л.А. Рядовая [и др.] // *Вестн. Томского гос. пед. ун-та.* – 2009. – Т. 81, № 3. – С. 49–53.
32. Барский, В.И. Анализ ассоциаций полиморфных маркеров генов дофаминергической (DRD2/ANKK1) и серотонинергической (HTR2A) систем мозга с личностными характеристиками подростков / В.И. Барский, М.Г. Аксенова, О.Б. Козлова // *Эколог. генетика.* – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 9–17.
33. A polymorphism in the serotonin receptor 3A (HTR3A) gene and its association with harm avoidance in women / J. Melke [et al.] // *Arch. Gen. Psychiatry.* – 2003. – Vol. 60, № 10. – P. 1017–1023.
34. Crabbe, J.C. Genetic contributions to addiction / J.C. Crabbe // *Annu. Rev. Psychol.* – 2002. – Vol. 53. – P. 435–462.
35. Kendler, K.S. Genetic and environmental pathways to suicidal behavior: reflections of a genetic epidemiologist / K.S. Kendler // *Eur. Psychiatry.* – 2010. – Vol. 25, № 5. – P. 300–303.
36. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression / A. Heils [et al.] // *J. Neurochem.* – 1996. – Vol. 66, № 6. – P. 2621–2624.
37. Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala / A.R. Hariri [et al.] // *Science.* – 2002. – Vol. 297, № 5580. – P. 400–403.
38. Holmes, A. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression / A. Holmes, D.L. Murphy, J.N. Crawley // *Biol. Psychiatry.* – 2003. – Vol. 54, № 10. – P. 953–959.
39. Ассоциация полиморфизма 5-HTTLPR гена SLC6A4 с показателями простой и сложной зрительно-моторных реакций и критической частоты световых мельканий у спортсменов под влиянием физической нагрузки / Е.В. Трушкин [и др.] // *Бюл. экспер. биол.* – 2010. – Т. 150, № 10. – С. 446–449.
40. Поликанова, И.С. Связь серотонинового транспортера (5HTT) с развитием утомления / И.С. Поликанова, О.В. Сысоева, А.Г. Тоневицкий // *Психологические исслед.* – 2012. – Т. 5, № 24. – С. 7.

41. Alcohol dependence and serotonin transporter functional polymorphisms 5-HTTLPR and rs25531 in an Italian population / E. Pascale [et al.] // *Alcohol Alcohol.* – 2015. – Vol. 50, № 3. – P. 259–265.
42. Перспективы изучения полиморфизмов ключевых генов нейромедиаторных систем. Сообщение II. Серотонинергическая система / М.А. Тимофеева [и др.] // *Физиология человека.* – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 114–124.
43. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes / M. Cardill [et al.] // *Nat. Genet.* – 1999. – Vol. 22, № 3. – P. 231–238.
44. Попова, Н.К. Роль серотонина мозга в экспрессии генетически детерминированного защитно-оборонительного поведения / Н.К. Попова, Л.И. Корочкин, Н.Н. Кудрявцева // *Генетика.* – 2004 – Т. 40, № 6. – С. 770–778.
45. Polymorphic variants of the serotonin receptor, 5-HT1A, and the serotonin transporter, 5-HTTLPR, and adverse pregnancy outcomes: a pilot study / H. Taube [et al.] // *J. Reprod. Health Med.* – 2015. – Vol. 1, № 2. – P. 96–102.
46. Genetic association of 5-HT1A and 5-HT1B gene polymorphisms with migraine in a Turkish population / O. Ates [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2013. – Vol. 326, № 1–2. – P. 64–67.
47. Колесникова, Л.И. Гены нейромедиаторных систем и психоэмоциональные свойства человека: серотонинергическая система / Л.И. Колесникова, В.В. Долгих, А.С. Гомбоева // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.* – 2011. – № 5. – С. 212–215.
48. Reif, A. Toward a molecular architecture of personality / A. Reif, K.P. Lesch // *Behav. Brain Res.* – 2003. – Vol. 139, № 1–2. – P. 1–20.
49. Genomic structure and expression of the human serotonin 2A receptor gene (HTR2A) locus: identification of novel HTR2A and antisense (HTR2A-AS1) exons / C.L. Ruble [et al.] // *BMC Genet.* – 2016. – Vol. 17, № 1. – P. 16.
50. Association of the serotonin transporter and receptor gene polymorphisms in neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease / F. Aszal [et al.] // *Arch. Neurol.* – 2004. – Vol. 61, № 8. – P. 1249–1253.
51. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease / K.E. Lohmueller [et al.] // *Nat. Genet.* – 2003. – Vol. 33, № 2. – P. 177–182.
52. Effect of 5-HT2A receptor polymorphisms and occupational stress on self-reported sleep quality: a cross-sectional study in Xinjiang, China / Y. Jiang [et al.] // *Sleep Med.* – 2016. – Vol. 20. – P. 30–36.
53. The International HapMap Project / International HapMap Consortium // *Nature.* – 2003. – Vol. 426, № 6968. – P. 789–796.
54. The CC genotype in the T102C HTR2A polymorphism predicts relapse in individuals after alcohol treatment / A. Jakubczyk [et al.] // *J. Psychiatr. Res.* – 2013. – Vol. 47, № 4. – P. 527–533.
55. Голимбет, В.Е. Полиморфные варианты гена рецептора серотонина (5-HTR2A) и особенности личности / В.Е. Голимбет, М.В. Алфимова, Н.Г. Митюшина // *Молекулярная биология.* – 2004. – Т. 83, № 3. – С. 404–412.
56. The HTR3A polymorphism c. –42C>T is associated with amygdala responsiveness in patients with irritable bowel syndrome / L.A. Kilpatrick [et al.] // *Gastroenterology.* – 2011. – Vol. 140, № 7. – P. 1943–1951.
57. Outcome definitions and clinical predictors influence pharmacogenetic associations between HTR3A gene polymorphisms and response to clozapine in patients with schizophrenia / A.P. Rajkumar [et al.] // *Psychopharmacology.* – 2012. – Vol. 224, № 3. – P. 441–449.
58. Niesler, B. 5-HT 3 receptors: potential of individual isoforms for personalised therapy / B. Niesler // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 81–86.
59. Григоренко, Е.Л. Генетические основы синдрома дефицита внимания с гиперактивностью / Е.Л. Григоренко // *Вестн. Сев. (Арктического) федерального ун-та. Сер.: Естественные науки.* – 2010. – № 1. – С. 43–54.
60. Benjamin, J. Molecular genetics and human personality / J. Benjamin, R.P. Ebstein, R.H. Belmaker. – Washington; London: American Psychiatric Publishing Inc., 2002. – 356 p.
61. Калимуллина, Л.Б. Анализ ассоциаций по сочетаниям генотипов полиморфных ДНК-локусов (TAG 1A и NCOI) DRD2, 256A/G гена SLC6A3 и объемных характеристик миндалевидного комплекса мозга с повышенной тревожностью / Л.Б. Калимуллина, А.В. Ахмадеев, А.Я. Ханнанова // *Успехи современного естествознания.* – 2011. – № 11. – С. 9–11.

62. Леушкина, Н.Ф. Исследование влияния фактора пола на поведение крыс с различиями аллельной структуры гена рецептора дофамина второго типа (DRD2) в тесте приподнятый крестообразный лабиринт и морфометрические характеристики миндалевидного комплекса мозга / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина // *Успехи современного естествознания*. – 2010. – № 10. – С. 9–13.
63. Response to methylphenidate is not influenced by DAT1 polymorphisms in a sample of Brazilian adult patients with ADHD / V. Contini [et al.] // *J. Neural. Transm.* – 2010. – Vol. 117, № 2. – P. 269–276.
64. Interactions between early parenting and a polymorphism of the child's dopamine transporter gene in predicting future child conduct disorder symptoms / B.B. Lahey [et al.] // *J. Abnorm. Psychol.* – 2011. – Vol. 120, № 1. P. 33–45.
65. Association of maternal dopamine transporter genotype with negative parenting: evidence for gene x environment interaction with child disruptive behavior / S.S. Lee [et al.] // *Mol. Psychiatry*. – 2010. Vol. 15, № 5. – P. 548–558.
66. The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression / S. Fuke [et al.] // *Pharmacogenomics J.* – 2001. – Vol. 1, № 2. – P. 152–156.
67. Куликова, М.А. Полиморфизмы генов дофаминергической системы – маркеры проявления тревожности и у спортсменов : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 14.00.51 / М.А. Куликова ; Федеральное гос. учреждение «Всерос. научн.-исслед. ин-т физич. культуры и спорта» – М., 2009. – 25 с.
68. Allelic association of a dopamine transporter gene polymorphism with antisocial behavior in heroin-dependent patients / G. Gerra [et al.] // *Addict. Biol.* – 2005. – Vol. 10, № 3. – P. 275–281.
69. Beaver, K.M. The interaction between genetic risk and childhood sexual abuse in the prediction of adolescent violent behavior / K.M. Beaver // *Sex. Abuse*. – 2008. – Vol. 20, № 4. – P. 426–443.
70. Рудых, Н.А. Применение аутомомных ДНК маркеров для описания структуры генофонда популяций человека / Н.А. Рудых, В.И. Евдокимов // *Научн. ведомости Белгородского гос. ун-та. Серия: Медицина. Фармация*. – 2013. – Т. 22, № 11. – С. 172–178.
71. Голимбет, В.Е. Молекулярно-генетические исследования познавательных нарушений при шизофрении / В.Е. Голимбет // *Молекулярная биология*. – 2008. Т. 42 – № 5. – С. 830–839.
72. Ассоциация генов COMT и DRD2 со способностью больных шизофренией к пониманию психического состояния других людей / М.В. Алфимова [и др.] // *Журн. неврологии и психиатрии*. – 2013. – № 8. – С. 50–56.
73. Look beyond Catechol-O-Methyltransferase genotype for catecholamines derangement in migraine: the BioBIM rs4818 and rs4680 polymorphisms study / M.L. De Marchis [et al.] // *J. Headache Pain*. – 2015. – Vol. 16, № 520. – P. 1–8.
74. Common oxytocin receptor gene (OXTR) polymorphism and social support interact to reduce stress in humans / F.S. Chen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2011. – Vol. 108, № 50. – P. 19 937–19 942.
75. Witte, A.V. Effects of COMT polymorphisms on brain function and behavior in health and disease / A.V. Witte, A. Floel // *Brain Res. Bull.* – 2012. – Vol. 88, № 5. – P. 418–428.
76. Association study of a brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val58Met polymorphism and personality trait and intelligence in healthy young females / S.J. Tsai [et al.] // *Neuropsychobiology*. – 2004. – Vol. 49, № 1. – P. 13–16.
77. Reuter, M. Association of the functional catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism with the personality trait of extraversion / M. Reuter, J. Hennig // *Neuroreport*. – 2005. – Vol. 16, № 10. – P. 1135–1138.
78. Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia / D.R. Weinberger [et al.] // *Biol. Psychiatry*. – 2001. – Vol. 50, № 11. – P. 825–844.
79. Халилова, З.Л. Влияние нейромедиаторных систем на развитие суицидального поведения / З.Л. Халилова, Ф.Х. Бикташева // *Современная наука: теоретический и практический взгляд: материалы Третьей междунар. науч.-практ. конф.* / Башкирский гос. ун-т; ред. Б.Е. Аверин [и др.] – Уфа, 2014. – С. 17–19.
80. Attention deficit hyperactivity disorder: genetic association study in a cohort of Spanish children / C.I. Gomez-Sanchez [et al.] // *Behav. Brain Funct.* – 2016. – Vol. 12, № 1. – P. 1–10.

81. Norepinephrine transporter and catecholamine-O-methyltransferase gene variants and attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in adults / W. Retz [et al.] // *J. Neural. Transm.* – 2008. – Vol. 115, № 2. – P. 323–329.
82. Madras, B.K. The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder / B.K. Madras, G.M. Miller, A.J. Fischman // *Biol. Psychiatry.* – 2005. – Vol. 57, № 11. – P. 1397–1409.
83. Novel and functional norepinephrine transporter protein variants identified in attention-deficit hyperactivity disorder / M.K. Hahn [et al.] // *Neuropharmacology.* – 2009. – Vol. 57, № 7–8. – P. 694–701.
84. Differential internalization rates and postendocytic sorting of the norepinephrine and dopamine transporters are controlled by structural elements in the N-termini / A. Vuorenpaa [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2016. – P. 1–25.
85. Experimental evidence of a link between the  $\alpha$ 2A-adrenergic receptor gene, early life stress, and ethanol drinking / E. Comasco [et al.] // *Alcohol Alcohol.* – 2015. – Vol. 50, № S1. – P. 1–67.
86. Preliminary evidence for association between schizophrenia and polymorphisms in the regulatory Regions of the ADRA2A, DRD3 and SNAP-25 Genes / J. Lochman [et al.] // *Psychiatry Res.* – 2013. – Vol. 205, № 1–2. – P. 7–12.
87. Clinical pharmacokinetics of metformin / G.G. Graham [et al.] // *Clin. Pharmacokinet.* – 2011. – Vol. 50, № 2. – P. 81–98.
88. Tamm, G. Perception of emotion in facial stimuli: The interaction of ADRA2A and COMT genotypes, and sex / G. Tamm, K. Kreegipuu, J. Harro // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2016. – Vol. 64. – P. 87–95.
89. ADRA2A polymorphisms and ADHD in adults: possible mediating effect of personality / C.C. de Cerqueira [et al.] // *Psychiatry Res.* – 2011. – Vol. 186, № 2–3. – P. 345–350.
90. No association between MspI allele of the ADRA2A polymorphism and ADHD: meta-analysis of family-based studies / N.D. Shiffrin [et al.] // *Psychiatr. Genet.* – 2013. – Vol. 23, № 4. – P. 174–175.
91. OXT oxytocin/neurophysin I prepropeptide (Homo sapiens (human)) [Electronic resource] / National Center for Biotechnology Information. – Bethesda M.D, USA. – Mode of access: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list\\_uids=5020](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=5020). – Date of access: 09.03.2016.
92. Oxytocin receptor genetic variation relates to empathy and stress reactivity in humans / M. Rodrigues [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106, № 50. – P. 21437–21441.
93. Feldman, R. The cross-generation transmission of oxytocin in humans / R. Feldman, I. Gordon, O. Zagoory-Sharon. // *Horm. Behav.* – 2010. – Vol. 58, № 4. – P. 669–676.
94. Poulin, M. J. The neurogenetics of nice receptor genes for oxytocin and vasopressin interact with threat to predict prosocial behavior / M.J. Poulin, E.A. Holman, A. Buffone // *Psychol. Sci.* – 2012. – Vol. 23, № 5. – P. 446–452.
95. Kumsta, R. Adolescent callous-unemotional traits and conduct disorder in adoptees exposed to severe early deprivation / R. Kumsta, E. Sonuga-Barke, M. Rutter // *Br. J. Psychiatry.* – 2012. – Vol. 200, № 3. – P. 197–201.
96. Genetic variants in AVPR1A linked to autism predict amygdala activation and personality traits in healthy humans / A. Meyer-Lindenberg [et al.] // *Mol. Psychiatry.* – 2009. – Vol. 14, № 10. – P. 968–975.
97. The role of oxytocin in social bonding, stress regulation and mental health: An update on the moderating effects of context and interindividual differences / M. Olf [et al.] // *Psychoneuroendocrinology.* – 2013. – Vol. 38, № 9. – P. 1883–1894.
98. Cuartas Arias, J.M. Potential interactions between oxytocin receptor system (OXTR) and candidate genes associated to psychopathy / J.M. Cuartas Arias, C.A. Lopez Jaramillo // *Int. J. Psychol. Res.* – 2013. – Vol. 6, № SPE. – P. 109–116.
99. Oxytocin receptor (OXTR) does not play a major role in the aetiology of autism: genetic and molecular studies / K.E. Tansey [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2010. – Vol. 474, № 3. – P. 163–167.
100. Polymorphisms in the oxytocin receptor gene are associated with the development of psychopathy / M.R. Dadds [et al.] // *Dev. Psychopathol.* – 2014. – Vol. 26, № 1. – P. 21–31.
101. Oxytocin receptor gene (OXTR) is related to psychological resources / S. Saphire-Bernstein [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108, № 37. – P. 15 118–15 122.
102. Oxytocin selectively increases perceptions of harm for victims but not the desire to punish offenders of criminal offenses / F. Krueger [et al.] // *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. 494–498.

103. Culture, distress, and oxytocin receptor polymorphism (OXTR) interact to influence emotional support seeking / H.S. Kim [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107, № 36. – P. 15 717–15 721.
104. AVP Gene (Protein Coding) – Arginine Vasopressin. [Electronic resource] / The GeneCards human gene database. – Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel. – Mode of access: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AVP&keywords=avp>. – Date of access: 09.03.2016.
105. Copeptin as a stress marker prior and after a written examination – the CoEXAM study / S.A. Urwyler [et al.] // *Stress.* – 2015. – Vol. 18, № 1. – P. 134–137.
106. Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide / H.K. Caldwell [et al.] // *Prog. Neurobiol.* – 2008. – Vol. 84, № 1. – P. 1–24.
107. Heterogeneity in clinical manifestation of autosomal dominant of neurohypophyseal diabetes insipidus caused by a mutation encoding Ala-1-> Val in the signal peptide of the arginine vasopressin/neurophysin II/copeptin precursor / D.R. Repaske [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1997. – Vol. 82, № 1. – P. 51–56.
108. Katan, M. The stress hormone copeptin: a new prognostic biomarker in acute illness / M. Katan, M. Christ-Crain // *Swiss Med. Wkly.* – 2010. – Vol. 140, № 13101.
109. Goodson, J.L. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates / J.L. Goodson, A.H. Bass // *Brain Res. Brain Res. Rev.* – 2001. – Vol. 35, № 3. – P. 246–265.
110. Fox, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress / C. Fox, Z. Merali, C. Harrison // *Behav. Brain Res.* – 2006. – Vol. 175, № 1. – P. 1–8.
111. Reduced plasma apelin levels in patients with autistic spectrum disorder / M. Boso [et al.] // *Arch. Med. Res.* – 2007. – Vol. 38. – P. 70–74.
112. Association between the arginine vasopressin 1a receptor (AVPR1a) gene and autism in a family-based study: mediation by socialization skills / N. Yirmiya [et al.] // *Mol. Psychiatry.* – 2006. – Vol. 11, № 5. – P. 488–494.
113. Hopkins, W.D. A polymorphic indel containing the RS3 microsatellite in the 5' flanking region of the vasopressin V1a receptor gene is associated with chimpanzee (*Pan troglodytes*) personality / W.D. Hopkins, Z.R. Donaldson, L.J. Young // *Genes Brain Behav.* – 2012. – Vol. 11, № 5. – P. 552–558.
114. Genetic variation in the vasopressin receptor 1a gene (AVPR1A) associates with pair-bonding behavior in humans / H. Walum [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105, № 37. – P. 14 153–14 156.
115. Zink, C.F. Human neuroimaging of oxytocin and vasopressin in social cognition / C.F. Zink, A. Meyer-Lindenberg // *Horm. Behav.* – 2012. – Vol. 61, № 3. – P. 400–409.
116. AVPR1B Gene (Protein Coding) – Arginine Vasopressin Receptor 1B [Electronic resource] / The GeneCards human gene database. – Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel. – Mode of access: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AVPR1B>. – Date of access: 09.03.2016.
117. A complex selection signature at the human AVPR1B gene / R. Cagliani [et al.] // *BMC Evol. Biol.* – 2009. – Vol. 9, № 123. – P. 1–14.
118. Possible genetic association between vasopressin receptor 1B and child aggression / C.C. Zai [et al.] // *Psychiatry Res.* – 2012. – Vol. 200, № 2–3. – P. 784–788.
119. Family-based study of AVPR1B association and interaction with stressful life events on depression and anxiety in suicide attempts / Y.J. Ben-Efraim [et al.] // *Neuropsychopharmacology.* – 2013. – Vol. 38, № 8. – P. 1504–1511.
120. Parker, G.B. From diathesis to dimorphism: the biology of gender differences in depression / G.B. Parker, H.L. Brotchie // *J. Nerv. Ment. Dis.* – 2004. – Vol. 192, № 3. – P. 210–216.
121. Эстрогены и головной мозг / Е.Н. Карева [и др.] // *Вестн. Российской акад. мед. наук.* – 2012. – № 2. – С. 48–59.

**L.V. Kukhtinskaya, A.V. Zuraev, V.A. Budevich, I.B. Mosse**

**MODERN CONCEPTS OF HUMAN PSYCHOEMOTIONAL SUSTAINABLE  
GENETIC DETERMINANTS  
(Review article)**

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus  
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

This review article highlights current research state in field of stress resistance genetics. Mechanisms of emotional stress based on functioning of the transporter and receptor systems, such as serotonin, dopamine, noradrenaline, oxytocin and vasopressin systems are discussed. The interaction of genes, which are associated with human psychoemotional peculiarities and the influence of environmental factors on different steps of ontogenesis are responsible for individual differences of human psychic stress resistance.

**Key words:** psychic stress resistance, genetic mechanisms, serotonin system, noradrenaline system, oxytocin system.

*Дата поступления статьи 11 февраля 2016 г.*

## ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ

Статьи должны быть написаны в сжатой и ясной форме и содержать:

- соответствующий индекс универсальной десятичной классификации литературы (УДК);
- название на русском и английском языках;
- инициалы и фамилии авторов на русском и английском языках;
- полное название учреждений, в которых выполнялось исследование и их почтовые адреса;
- ключевые слова (3...5 слов);
- аннотацию на русском и английском языках. Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи;
- текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки «Введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение»);
- список использованных источников (оформляется в соответствии с Правилами ВАК, Приложение 2);
- дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10–12 страниц. Рекомендуемый средний объем аннотации – 500 знаков с пробелами. После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентичного содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на дискете) и на бумажном носителе в 2 экз. В виде отдельного документа представляются краткие сведения о каждом из авторов, включающие фамилию, имя, отчество, год рождения, сведения об образовании, служебные адреса, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность, область научных интересов. Необходимо представить АКТ ЭКСПЕРТИЗЫ о возможности опубликования открытой печати (для статей).

1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS-Word. Название файлов – фамилия первого автора латинскими буквами.

2. Формат бумаги А4 (210×297 мм), ориентация – книжная.

3. Поля: верхнее – 2,5 см, нижнее – 2,5 см, левое – 2,5 см, правое – 2,5 см.

4. Основной текст статьи набирается шрифтом Times New Roman, размером 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.

5. Автоматическая расстановка переносов обязательна.

6. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.

7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS-Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).

8. Вставка в текст символов (например,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ) производится только через опцию «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз ( $C^2$ ,  $C_4$ ) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются *курсивом*. Математические формулы ( $\lim$ ,  $\sum$ ,  $\sin$ , и т.д.) и цифры набираются прямым начертанием.

9. Печатать в сложных словах дефис (минерал-индикатор, К-пространство). Тире отбивают с обеих сторон неразрывным пробелом как знак препинания между словами: система «человек — машина», «май — июнь». Тире между цифрами, напр., 20–30 чел. — не отбивается.

10. Кавычки по всему тексту должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбивают от заключенных в них слов.

11. При подготовке к печати графиков, блок-схем, диаграмм, файлы должны быть поименованы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и какими по порядку рисунками статьи являются. Графики должны иметь толщину всех линий не менее 0,2 пункта для четкого воспроизведения. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, не допускается использование сканированного текста.

12. Необходимо предоставить электронные файлы фотоматериалов, а также распечатки лазерным принтером всех иллюстраций на листе формата А4. Отсканированные фотоиллюстрации серой, черно-белой цветовой модели должны иметь разрешение 600 dpi и формат TIFF.

13. Список цитированных источников располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок д.б. написаны внутри квадратных скобок. (напр.: [1]).

Научное издание

## **МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА**

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 20

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*  
Верстка *Е.А. Клевец*  
Корректор *И.В. Широкая*  
Технический редактор *Е.А. Клевец*  
Переводчик *А.А. Абметко*

Подписано в печать 16.03.2016. Формат 60×84 <sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная. Гарнитура Times.  
Печать цифровая. Усл. печ. л. 13,02. Уч.изд. л. 8,38. Тираж 100 экз. Заказ № 99  
Отпечатано в типографии ЧУП «Альгиора».

Оригинал-макет подготовлен в Государственном научном учреждении «Институт генетики  
и цитологии НАН Беларуси»

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/51 от 08.10.2013 г.  
220072, г. Минск, ул. Академическая, 27