

ISSN 1999-9127

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

# **МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА**

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ  
ТОМ 24**

Издается с 2005 года  
Выходит два раза в год

Минск  
2018

УДК [577.21 + 575] (082)

**Молекулярная и прикладная генетика:** сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2018. — Т. 24. — 110 с. — ISSN 1999-9127.

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

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

Редакционная коллегия:

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

УДК [577.21 + 575] (082)

ISSN 1999-9127

Институт генетики  
и цитологии НАН Беларуси, 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Н.В. Савина, С.В. Кубрак, Е.И. Кузьминова, Л.В. Милько, А.П. Колбас, Н.М. Матусевич, Е.П. Михаленко, Е.Н. Макеева, А.В. Кильчевский</i> Подбор маркеров для ДНК-баркодинга диких видов семейства <i>Orchidaceae</i> на примере <i>Anacamptis morio</i> L. ....	5
<i>С.И. Вакула, О.А. Орловская, Л.В. Хотылёва, И.Н. Леонова</i> Изменчивость хозяйственно-ценных признаков у интрогрессивных линий <i>T. aestivum</i> / <i>T. timopheevii</i> в агроэкологических условиях Республики Беларусь и Западно-Сибирского региона России .....	12
<i>Н.В. Савина, А.А. Яцкив, Н.В. Никитченко, Т.Д. Кужир, Е.В. Сечко, А.В. Чичко, А.В. Сукало, Р.И. Гончарова</i> Полиморфизм ряда генов иммунного и воспалительного ответа как фактор предрасположенности к ювенильному идиопатическому артриту .....	22
<i>Ю.В. Дюбо, Е.А. Николайчик</i> Модификация вирулентных свойств <i>Pectobacterium atrosepticum</i> конъюгативной плазмидой pРА21А.....	37
<i>М.А. Сасинович, А.М. Слуквин, А.В. Алехнович</i> Сравнительный генетический анализ популяций длиннопалого рака ( <i>Astacus leptodactylus</i> Esch.) в озерах Брестской области .....	45
<i>Т.Д. Кужир</i> Ревматоидный артрит: исторические и современные аспекты (Обзорная статья).....	55
<i>Н.И. Рябоконт</i> Генетическая предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям у детей (Обзорная статья).....	74
<i>К.В. Бакунович, И.Б. Моссэ, Е.В. Кобец, А.А. Гордеев, И.В. Головкова, С.П. Питомец, С.Л. Минин</i> Изменение экспрессии генов <i>HIF1A</i> , <i>UCP2</i> и <i>MTHFR</i> у профессиональных спортсменов в ответ на физическую нагрузку.....	94
Правила оформления статьи.....	105

## CONTENTS

<i>N.V. Savina, S.V. Kubrak, E.I. Kuzminova, L.V. Milko, A.P. Kolbas, N.M. Matusevich, E.P. Mikhalenko, E.N. Makeyeva, A.V. Kilchevskiy</i> Choosing of DNA-barcoding markers for wild species of the <i>Orchidaceae</i> family by the example of <i>Anacamptis morio</i> L.....	5
<i>S.I. Vakula, O.A. Orlovskaya, L.V. Khotyleva, I.N. Leonova</i> Variability of agronomically valuable traits in <i>T. aestivum</i> / <i>T. timopheevii</i> introgression lines in agroecological conditions of the Republic of Belarus and the West Siberian region of Russia .....	12
<i>N.V. Savina, H.A. Yatskiu, N.V. Nikitchenko, T.D. Kuzhir, E.V. Sechko, A.M. Tchitchko, A.V. Sukalo, R.I. Goncharova</i> Polymorphism of a set of genes involved in immune and inflammatory responses as a predisposing factor for juvenile idiopathic arthritis .....	22
<i>Y.V. Diubo, Y.A. Nikolaichik</i> Modification virulent properties of <i>Pectobacterium atrosepticum</i> by conjugative plasmid pPA21A.....	37
<i>M.A. Sasinovich, A.M. Slukvin, A.V. Alekhnovich</i> Comparative genetic analysis of populations of narrow-clawed crayfish ( <i>Astacus leptodactylus</i> Esch.) in the lakes of Brest region .....	45
<i>T.D. Kuzhir</i> Rheumatoid arthritis: historical and current aspects (Review Article).....	55
<i>N.I. Ryabokon</i> Genetic predisposition to pediatric autoimmune diseases (Review Article).....	74
<i>K.V. Bakunovich, I.B. Mosse, E.V. Kobets, A.A. Gordeev, I.V. Golovkova, S.P. Pitomiats, S.L. Minin</i> Changes in <i>HIF1A</i> , <i>UCP2</i> and <i>MTHFR</i> genes expression of professional athletes in response to physical exertion.....	94
Instructions to Authors .....	105

Н.В. Савина<sup>1</sup>, С.В. Кубрак<sup>1</sup>, Е.И. Кузьминова<sup>1</sup>, Л.В. Милько<sup>1</sup>, А.П. Колбас<sup>2</sup>, Н.М. Матусевич<sup>2</sup>,  
Е.П. Михаленко<sup>1</sup>, Е.Н. Макеева<sup>1</sup>, А.В. Кильчевский<sup>1</sup>

## ПОДБОР МАРКЕРОВ ДЛЯ ДНК-БАРКОДИНГА ДИКИХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА *ORCHIDACEAE* НА ПРИМЕРЕ *ANACAMPTIS MORIO* L.

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

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

<sup>2</sup>Брестский государственный университет им. А.С. Пушкина

Республика Беларусь, 224016, г. Брест, бул. Космонавтов, 21

Представители флоры Беларуси из семейства *Orchidaceae* известны своими декоративными и фармакологическими свойствами. Одним из способов контроля за состоянием их природных популяций является ДНК-идентификация. На примере ятрышника-дремлика (*Anacamptis morio* L.) продемонстрирована возможность успешного использования комбинации трех маркеров (*ITS2*, *rbcL* и *psbA-trnH*) для ДНК-штрихкодирования растений семейства *Orchidaceae*. Наиболее информативными оказались *ITS2* и *rbcL*, позволяющие с точностью 99,82–100% определить вид изучаемого растения. Использование маркерных последовательностей *ITS2*, *rbcL* и *psbA-trnH* позволит проводить массовый скрининг растений, произрастающих на охраняемых территориях.

**Ключевые слова:** ДНК-баркодинг, ДНК-штрихкод, Орхидные, ятрышник-дремлик.

### Введение

Семейство Орхидные (*Orchidaceae*), или Ятрышниковые, — одно из крупнейших среди цветковых растений, насчитывающее, по разным данным, от 20 до 35 тысяч видов. Орхидные широко распространены по всему земному шару вплоть до Северного Ледовитого океана, однако большинство видов произрастает в тропических лесах и высокогорьях. В составе флоры Беларуси встречается более 30 видов дикорастущих Орхидных. Из-за сложного и длительного цикла развития и чувствительности к изменениям окружающей среды число видов дикорастущих орхидей постепенно сокращается. В настоящее время в Красную книгу Беларуси внесено 24 представителя *Orchidaceae*, по степени риска исчезновения они относятся к 1–3 категориям национальной природоохранной значимости [1]. Представители семейства Орхидные в первую очередь известны как красивоцветущие декоративные растения. Помимо этого, *Orchidaceae* являются объектом пристального внимания в связи с изучением их фармакологических свойств. В народной медицине Орхидные издавна использовались в качестве тонизирующих, болеутоляющих,

иммуностимулирующих средств. В последнее время изучаются перспективы получения препаратов с противораковым действием на основе растений этого семейства.

Ятрышник-дремлик (*Anacamptis morio* L.) — один из представителей семейства *Orchidaceae*, произрастающий в дикой природе на территории Беларуси. С яркой окраской околоцветника, широко применяемый в народной медицине, этот вид взят под государственную охрану в 1964 г. как исчезающее растение (категория охраны 2). Основными факторами, влияющими на выживание и распространение этого вида, являются хозяйственная трансформация земель, осушительно-мелиоративные работы, чрезмерные рекреационные нагрузки (срыв цветущих растений). Помимо запрещения антропогенных воздействий на места произрастания вида, меры охраны предполагают постоянный контроль за состоянием известных популяций и поиск новых, а также сохранение генофонда вида в условиях культуры и расселение в естественные экотопы [2].

С появлением технологии ДНК-баркодинга задачи идентификации вида и контроля за природными популяциями решаются при

помощи молекулярно-генетического анализа стандартных небольших участков генома изучаемого вида (т. н. ДНК-штрихкодов). В исследованиях по ДНК-баркодингу представителей семейства *Orchidaceae* разными авторами предлагается до 11 маркеров (как по отдельности, так и комбинированных). В работе Tang H. и соавт. (2017) в качестве оптимальной предлагается комбинация маркеров *matK+psbA-trnH+ITS2* [3], в исследованиях Xu S. и соавт. (2015) показана высокая эффективность двух маркеров *ITS+matK* [4], в работе корейских авторов Kim H.M. и соавт. (2014) преимущество отдано трехкомпонентной комбинации маркеров *atpF-atpH+psbK-psbI+trnH-psbA* [5]. Таким образом, подбор мультилокусных комбинаций 2–3 маркеров для ДНК-идентификации диких видов семейства *Orchidaceae* является необходимым предварительным этапом перед массовым скринингом популяций, произрастающих на охраняемых территориях.

Цель данного исследования — установить возможность применения отдельных маркерных последовательностей, используемых в качестве ДНК-штрихкодов, для идентификации редких дикорастущих растений семейства *Orchidaceae*. В работе были использованы два пластидных маркера *rbcL* и *psbA-trnH* и один маркер ядерной последовательности *ITS2*.

### Материалы и методы

Сбор растительного материала ятрышника-дремлика (3 растения, апикальная часть листьев) проведен сотрудниками Национального парка «Беловежская пуца» без изъятия

растений из мест произрастания. Собранный растительный материал до изоляции ДНК хранился при 4° С. Перед выделением растительный материал замораживали в жидком азоте и растирали в фарфоровой ступке. Для выделения тотальной ДНК использовали набор *DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия)*. Оценку концентрации и чистоты полученных образцов нуклеиновых кислот выполняли с помощью спектрофотометра *Implen P360 (Implen, Германия)*. Для визуальной оценки качества полученных матриц ДНК проводили электрофоретический анализ в 2%-ном агарозном геле. Концентрацию образцов растительной ДНК выравняли путем разведения до 15 нг/мкл.

Аmplификацию маркерных последовательностей *rbcL*, *psbA-trnH* и *ITS2* проводили с использованием специфических праймеров (табл. 1) в финальном объеме реакционной смеси 10 мкл (термоциклер *C1000 Touch Thermal Cycler, BioRad, США*). Количество ДНК, вносимое в реакционную смесь, — 30 нг/мкл. Состав ПЦР-смеси — стандартный (буфер 10x, 25M MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTPs, 3% DMSO, 10μM каждого праймера, 5U/μl Hi-Fi ДНК-полимераза), все компоненты ОДО «Праймтех» [6]. Последовательности праймеров и базовые рекомендации по условиям проведения амплификации представлены в свободном доступе на сайте международного центра по ДНК-баркодингу — *CCDB (Canadian Centre for DNA Barcoding)* [7]. Результаты амплификации проверяли в 2%-ном агарозном геле.

После амплификации проводили ферментативную очистку полученных маркерных после-

Таблица 1

Праймеры для амплификации маркерных последовательностей (ДНК-штрихкодов)

ДНК-штрихкод	Последовательность праймеров	Размер ПЦР продукта, п. н.
<i>psbA-trnH</i>	5'- GTTATGCATGAACGTAATGCTC -3' 5'- CGCGCATGGTGGATTACAAATCC -3'	~509 (226–934) [8]
<i>rbcL</i>	5'- ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC -3' 5'- GTAAAATCAAGTCCACCGCG -3'	~654 [8]
<i>ITS2</i>	5'- ATGCGATACTTGGTGTGAAT -3' 5'- GACGCTTCTCCAGACTACAAT -3'	~494 (157–670) [9]

довательностей *ITS2*, *rbcL* и *psbA-trnH*. Терминирующая реакция выполнена с использованием коммерческого набора *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems*, США) согласно рекомендации производителя с последующей очисткой проб этанолом. Секвенирующую реакцию проводили в прямом (при необходимости и в обратном) направлении на генетическом анализаторе *ABI 3500 Applied Biosystems*. Хроматограммы сиквенсов просмотрены в *ChromasPro 13.3* и сохранены в формате *FASTA*. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями ДНК, хранящимися в международных базах данных при помощи программы *NCBI BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) для *ITS2* и *psbA-trnH* [10]; для анализа *rbcL* дополнительно использовали программу *BOLD Systems v.4* [11]. Обнаружение в *NCBI* нуклеотидной последовательности известного биологического вида, полностью совпадающей с анализируемой нами, являлось подтверждением видовой принадлежности изучаемого растения.

### Результаты и обсуждение

Для идентификации растений ятрышника были использованы три маркера, рекомендуемые для анализа растений семейства *Orchidaceae*. Маркер *ITS2* представляет собой участок ядерной последовательности, который входит в состав рибосомального кластера и локализуется между структурными генами

рибосомальной РНК 5.8S и 28S. Ген *rbcL* — наиболее подробно охарактеризованный хлоропластный ген растений. Участок пластидной ДНК *rbcL* кодирует большую субъединицу рибулозобисфосфаткарбоксилазы, ключевого фермента фиксации CO<sub>2</sub> в темновой фазе фотосинтеза [12]. Некодирующий участок пластидной ДНК *psbA-trnH* представляет собой межгенный спейсер (*psbA-trnH* от англ. *Intergenic spacer (IGS) regions of psbA-trnH*) и расположен между геном, контролирующим синтез белка *D1* фотосистемы II, и геном гистидиновой тРНК [13]. На рис. 1 представлены электрофореграммы результатов амплификации маркерных последовательностей с ДНК растений ятрышника (3 растения).

При амплификации ДНК растений ятрышника с маркером *ITS2* был получен фрагмент размером ~500 п. н., с *rbcL* ~600 п. н., с *psbA-trnH* получен продукт ~900 п. н.

Продукты амплификации, представляющие собой маркерные последовательности *ITS2*, *rbcL* и *psbA-trnH*, были секвенированы в прямом направлении, помимо этого для *ITS2* выполнено секвенирование в обратном направлении. Для трех растений ятрышника получено 4 качественных сиквенса участка *ITS2* (2 прямых/2 обратных), 3 качественных сиквенса (прямых) участка *rbcL* и 2 качественных сиквенса (прямых) участка *psbA-trnH*. В табл. 2 представлены результаты секвенирования ампликонов по одной последовательности для

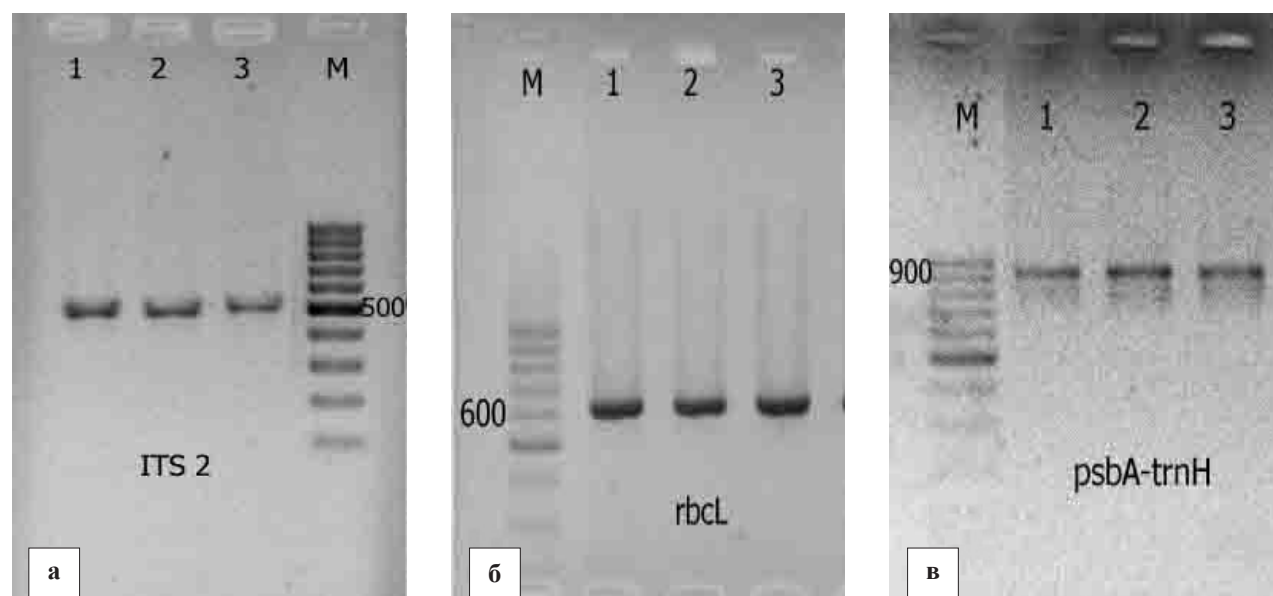


Рис. 1. Результаты амплификации ДНК растений ятрышника с маркерами *ITS2* (а), *rbcL* (б), *psbA-trnH* (в)



каждого ДНК-штрихкода, так как буквенные сиквенсы разных растений ятрышника по одному и тому же маркеру были идентичны.

Маркерная последовательность *rbcL* для ятрышника из Национального парка «Беловежская пуца» практически полностью (сходство 99%) совпала с представленной в *NCBI* последовательностью KF997322.1 для вида *Anacamptis morio* (ятрышник-дремлик) — из проанализированных 553 п. н. только 4 п. н. (выделены в табл. 2 серым) не совпадают с оригинальным сиквенсом из базы данных *BLAST*. Дополнительно мы сравнили полученную последовательность *rbcL* изучаемых растений ятрышника с данными информационной платформы *BOLD Systems v.4 (The Barcode of Life Data System)*, которая позволяет вести поиск маркерных последовательностей *rbcL* и *matK* по секвенированным участкам не менее 500 п. н. [11, 14]. Результаты сравнения

доказывают, что с вероятностью 99,82% изучаемые растения относятся к семейству Орхидные (*Orchidaceae*), род Анакампис (*Anacamptis*), вид *Anacamptis morio* L. (ятрышник-дремлик) (рис. 2).

Маркерная последовательность *ITS2* на 100% совпала с представленной в *NCBI* последовательностью Z940992.1 для вида *Anacamptis morio* (ятрышник-дремлик). Последовательность, представленная в *NCBI*, содержит 240 п. н., тогда как в нашем исследовании получен качественный сиквенс размером 424 п. н. В дальнейшем планируется зарегистрировать эту последовательность в базе *BLAST*.

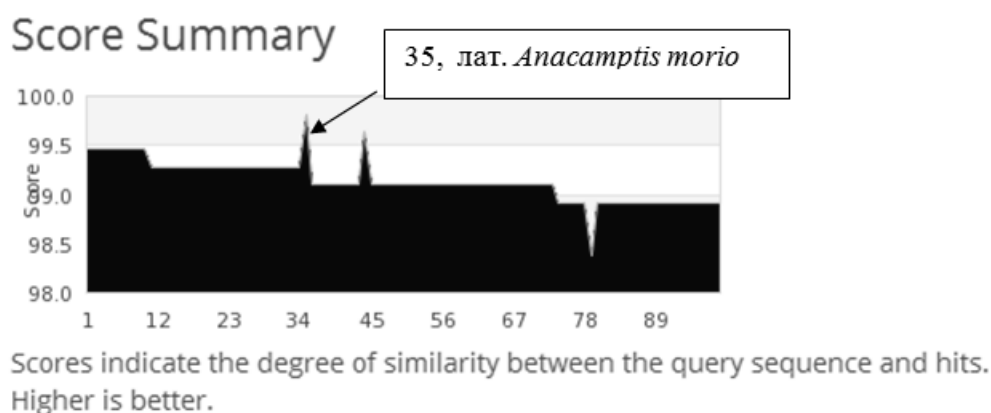
Использование маркера *psbA-trnH* для идентификации растений ятрышника-дремлика из Национального парка «Беловежская пуца» было для нас недостаточно информативным — а 126 представителей семейства Орхидные

Таблица 2

Результаты секвенирования маркерных последовательностей ДНК (*rbcL*, *ITS2* и *trnH-psbA*) у ятрышника-дремлика из Национального парка «Беловежская пуца»

ДНК-штрихкод	Последовательность
<i>rbcL</i>	CTGGGGTGTTTAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAACCAAGATA CTGATATCTTGGCAGCATCCGAGTAACCTCAACCGGGAGTTCCGCCTGAAGAAGC AGGCGTGCAGTAGCAGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACTGAT GGACTTACCAGTCTCGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGCCGTTGTG GGGAGGAAAATCAATATAATTGCTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTT CTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTTTTTGGTTTTCAAAGCTCTGCGAG CTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATCCCCCTGCTTATCCAAAACCTTTCCAAGGTCCG CCTCATGGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTTCGTCCTCCCTATTGG GATGTACTATTAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTAT GAATGTCTACGCGGTGGACTTGATK (553 п. н.)
<i>ITS2</i>	TCGACGCAAGTTGCGCCTGAGGCCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCA AGCATTGTGTCGCTCCATAGGACCTTCGCGGCCACGCGGCTGTCTCATCATGGATGCG GAGAATGGCCTGTCATGCGCTTATGTGTGGCTGGCTGAAGAGCGGGATGATACTCTCT TGGCAATGGCCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCCCGTTGATTCATCGTCCGGTTGCT CTGAGAAATTAATTGGATAATCCAGCTAACCCAAATACAGTTGTTCATCGCAAGACAATTG ACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATGACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCG GAGGAGAAGAACTTACGAGGATCCCCSTAGTAACGGCGAGCGAACCCGGGATTTGC CCAGCTTGGGAATCGGGCTGCTT (424 п. н.)
<i>psbA-trnH</i>	GAAGATATAAATCCCCAATATCTTGTCTAAGAACAAGATATTGGGGGATTGTTGAGC TACCACTTTTGGCTCTTTATCCGAATCCGAATTTTCGTTTTTTATCATAAAAAGAAAGTTC TCCCCTGCCAATGAATGATAAGTGTCTAGGTGAAGTATAGTATAAGATAAGTAAGAAAA GTCTAAGCTTAGTATACTAGAAAAAAGAAAAATACTATACCTATACTCTTACTCT AAGATAAAGACTCTTAAGTCTAATAAGATAAGACTTTTCACATGAATACTTAGCAGAA CGACTAACGACGAGATTTATTATCGTTTCTCGCATGTCTCACGAAAGTGAGAGTAGGT GCCAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTTTTATATAAATAGGTAATTTGTT CCTTTCCATTATGAATAGCGATTGTATGGGCAATCMTTGTGGGTATAATGGTAGATGCC CGARACCCAASTMCCTATTATTTCCYTTCCCTCCTCCCCTCCTGGTTGAGTTTTTTCATT TTTTCCCGGATAAATGATTA (690 п. н.)





Rank	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Subspecies	Score	Similarity
32	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	<i>Gymnadenia</i>	<i>conopsea</i>		544	99.28
33	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	<i>Platanthera</i>	<i>hologlottis</i>		544	99.28
34	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	<i>Platanthera</i>	<i>mandarinorum</i> var. <i>brachycentron</i>		544	99.28
35	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	<i>Anacamptis</i>	<i>morio</i>		543	99.82
36	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	<i>Habenaria</i>	<i>heyneana</i>		542	99.1
37	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	<i>Habenaria</i>	<i>fallicornis</i>		542	99.1

**Рис. 2.** Результат поиска в *BOLD Systems v.4* по маркерной последовательности *rbcl* для ДНК растений ятрышника из Национального парка «Беловежская пуца»

(*Orchidaceae*) из базы данных *NCBI* буквенный сиквенс исследуемого участка на 95–97% был идентичен полученному нами, что сузило идентификацию до определения семейства. Этот факт не противоречит исследованиям других авторов, которыми отмечена недостаточная вариабельность маркерной последовательности *psbA-trnH* для этого таксона [3–5, 12].

### Заключение

Таким образом, на примере образцов ДНК ятрышника-дремлика (*Anacamptis morio* L.) нами продемонстрирована возможность успешного использования комбинации трех маркеров (*ITS2*, *rbcl* и *psbA-trnH*) для идентификации растений семейства *Orchidaceae*. Наиболее информативными в качестве ДНК-штрихкода оказались фрагмент ядерДНК *ITS2* и фрагмент хплДНК *rbcl*. Использование *rbcl* в качестве самостоятельного маркера позволило достоверно определить вид изучаемого расте-

ния — сходство с существующими базами данных составило 99,82%, а в случае самостоятельного применения маркера *ITS2* — 100%. В то же время, участок хплДНК *psbA-trnH* показал недостаточную разрешающую способность для самостоятельного использования, однако для него в процессе работы показана высокая воспроизводимость результатов амплификации. Это сокращает время на отработку условий для получения целевых последовательностей, и, при совместном применении с другими маркерами, *psbA-trnH* будет полезен для проведения первичного скрининга растений.

### Список использованных источников

1. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / редкол.: И.М. Качановский [и др.]. — 4-е изд. — Минск: Беларус. энцыкл. ім. П. Броўкі, 2015. — 448 с.

2. Электронная версия Красной книги Республики Беларусь [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://redbook.minpriroda.gov.by>. — Дата доступа: 17.05.2017.
3. DNA barcoding identification of endangered medicinal plants of *Orchidaceae* / Tang H. [et al.] // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. — 2017. — Vol. 42, № 11. — P. 2058–2067. — doi:10.19540/j.cnki.cjcmm.2017.0090.
4. Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (*Orchidaceae*) from Mainland Asia / S. Xu [et al.] // *PLoS One*. — 2015. — Vol. 10, № 1: e0115168. — doi:10.1371/journal.pone.0115168.
5. DNA barcoding of *Orchidaceae* in Korea / Kim H.M. [et al.] // *Mol. Ecol. Resour.* — 2014. — Vol. 14 № 3. — P. 499–507. — doi: 10.1111/1755-0998.12207.
6. ОДО «Праймтех» — реагенты и материалы для молекулярной биологии [Интернет-сайт компании Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.primetech.by>. — Дата доступа: 07.06.2017.
7. CCDB [Electronic resource] / Canadian Centre for DNA Barcoding. — Mode of access: [http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB\\_PrimerSets-Plants.pdf](http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_PrimerSets-Plants.pdf). — Date of access: 12.04.2017.
8. Hollingsworth, P.M. Choosing and using a plant DNA barcode / P.M. Hollingsworth, S.W. Graham, D.P. Little // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6, № 5: e19254. — doi: 10.1371/journal.pone.0019254
9. Use of *ITS2* Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals / H. Yao [et al.] // *PLoS One*. — 2010. — Vol. 5, № 10: e13102. — doi: 10.1371/journal.pone.0013102
10. NCBI BLAST [Electronic resource] / National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool. — Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. — Date of access: 24.06.2017.
11. BOLD Systems [Electronic resource] / The Barcode of Life Data Systems / CCDB (The Canadian Centre for DNA Barcoding). — Mode of access: [http://ccdb.ca/http://boldsystems.org/index.php/Public\\_Primer\\_PrimerSearch](http://ccdb.ca/http://boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch). — Date of access: 24.06.2017.
12. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т. В. Матвеева [и др.] // *Экологическая генетика*. — 2011. — Т. IX, № 1. — С. 32–43.
13. Дегтярева, Г. В. Анализ соответствия молекулярных и морфологических данных при анализе филогении на примере семейств бобовые (*Leguminosae*) и зонтичные (*Umbelliferae*): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.03 / Г. В. Дегтярева. — 2007. — 212 с.
14. Ratnasingham, S. Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>) / S. Ratnasingham, P.D.N. Hebert // *Mol. Ecol. Notes*. — 2007. — Vol. 7. — P. 355–364. — doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.

N.V. Savina<sup>1</sup>, S.V. Kubrak<sup>1</sup>, E.I. Kuzminova<sup>1</sup>, L.V. Milko<sup>1</sup>, A.P. Kolbas<sup>2</sup>, N.M. Matusevich<sup>2</sup>,  
E.P. Mikhaleiko<sup>1</sup>, E.N. Makeyeva<sup>1</sup>, A.V. Kilchevsky<sup>1</sup>

**CHOOSING DNA-BARCODING MARKERS FOR WILD SPECIES  
OF THE *ORCHIDACEAE* FAMILY BY THE EXAMPLE OF  
*ANACAMPTIS MORIO* L.**

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

<sup>2</sup>Brest State University named after A.S. Pushkin  
Brest BY-224016, the Republic of Belarus

Representatives of Belarus flora belonging to the *Orchidaceae* family are known for their ornamental and pharmacological properties. DNA-identification is the method to monitor the state of their natural populations. By the *Anacamptis morio* L. example, we demonstrated that there is the possibility of effective use of three markers' (*ITS2*, *rbcL* and *psbA-trnH*) combination for DNA-barcoding of *Orchidaceae*. The most effective were *ITS2* and *rbcL*, allowing to determine the plant species under study with an accuracy of 99.82–100%. Use of *ITS2*, *rbcL* and *psbA-trnH* marker sequences will enable to perform mass screening of plants growing in protected areas.

**Key words:** DNA-barcoding, DNA-barcode, Orchids, Green-winged orchid.

*Дата поступления статьи: 26 декабря 2017 г.*

С.И. Вакула<sup>1</sup>, О.А. Орловская<sup>1</sup>, Л.В. Хотылёва<sup>1</sup>, И.Н. Леонова<sup>2</sup>

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ *T. AESTIVUM*/*T. TIMOPHEEVII* В АГРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ И ЗАПАДНО-СИБИРСКОГО РЕГИОНА РОССИИ

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
<sup>2</sup>ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»  
Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

Проведено изучение основных компонентов продуктивности и устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе 21 интрогрессивной линии мягкой пшеницы *T. aestivum*/*T. timopheevii* и их родительских форм в условиях Республики Беларусь и Западно-Сибирского региона. Анализ вклада генотипа, условий внешней среды (региона выращивания) и их взаимодействия в изменчивость хозяйственно важных признаков интрогрессивных линий показал преобладание роли эколого-географических условий выращивания в изменчивость признаков «продуктивная кустистость», «высота растения», «число колосков в колосе», «длина колоса». Выявлены интрогрессивные линии *T. aestivum*/*T. timopheevii*, превышающие исходные сорта мягкой пшеницы по устойчивости к мучнистой росе и бурой ржавчине в различных регионах испытаний, что позволяет использовать их в качестве источников генов иммунитета.

**Ключевые слова:** мягкая пшеница *T. aestivum*, тетраплоидная пшеница *T. timopheevii*, интрогрессивные линии, продуктивность, устойчивость к грибным патогенам, эколого-генетический эксперимент.

### Введение

Мягкая пшеница (*T. aestivum* L.) является одной из наиболее важных сельскохозяйственных культур во всем мире и основным продуктом питания для большинства населения земного шара. Селекция пшеницы с использованием узкого набора родительских форм привела к обеднению генетического разнообразия пшеницы по генам, контролирующим устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам, а также урожайности и качества зерна. Способом расширения генофонда по генам хозяйственно ценных признаков является интрогрессивная гибридизация, при этом в качестве эффективных источников и доноров генов устойчивости к возбудителям грибных болезней привлекаются дикие и культурные родичи мягкой пшеницы [1]. Эффективность использования интрогрессивных линий в качестве доноров полезных признаков зависит от уровня гомеологии геномов мягкой пшеницы и родственных видов. Большинство эффективных генов резистентности, перенесенные в ге-

ном мягкой пшеницы от отдаленных видов, не используются на практике, поскольку чужеродный генетический материал может оказывать негативный эффект на урожайность и хлебопекарные качества [2]. Урожайность пшеницы является комплексным признаком, который складывается из разных компонентов, таких как число колосков и зерен в колосе, масса зерна с колоса, масса 1000 зерен и продуктивная кустистость. Опосредованно на данный признак могут также влиять параметры архитектуры растения, включая длину соломины и длину колоса. Кроме генетического контроля, урожай и его компоненты находятся под значительным влиянием факторов внешней среды [3, 4].

Ранее нами было показано, что интрогрессивные линии *T. aestivum*/*T. timopheevii* характеризуются эффективной устойчивостью к бурой ржавчине и мучнистой росе, часть из них проявляет устойчивость к стеблевой ржавчине, септориозу и пыльной головне; ряд линий имеют групповую устойчивость к болезням [5]. Для использования линий в качестве

источников генов резистентности к грибным патогенам необходима их оценка по комплексу хозяйственно-ценных признаков и проявлению в различных агроэкологических условиях. В данной работе изучено проявление хозяйственно-ценных признаков у интрогрессивных линий *T. aestivum*/*T. timopheevii* в экологических условиях Республики Беларусь и Западно-Сибирского региона России.

### Материалы и методы

Объектами исследования являлись линии комбинаций, полученные от скрещивания сортов мягкой пшеницы Саратовская 29, Скала, Иртышанка 10, Целинная 20 и Новосибирская 67 с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* var. *viticulosum*, и их родительские формы. Коллекцию, состоящую из 21 интрогрессивной линии, высевали в 2015 г. на экспериментальных полях Института генетики и цитологии НАН Беларуси (Минск, Беларусь) и ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия).

Значения метеопараметров с апреля по август 2015 г. предоставлены сайтом «Расписание Погоды» [6]. Данные о среднесуточных температурах и количестве выпавших осадков использованы для расчета суммы активных температур (САТ) и гидротермического коэффициента Селянинова (ГТК) [7].

Регионы проведения испытаний по показателю «средняя температура воздуха» в 2015 г. различались несущественно, за исключением августа (табл. 1). Наиболее благоприятная температура для прорастания 12–15°C (май) была характерна для обоих регионов. Все фазы вегетации растений пшеницы протекали, как правило, при оптимальных температурах

воздуха. Можно отметить недостаток тепла в августе в Западно-Сибирском регионе (табл. 1), однако на первых этапах развития растений пшеницы скорость накопления суммы активных температур в данном регионе на 11–15% превышала метеопараметры г. Минска. Таким образом, САТ в Новосибирске за период май–июль превысила необходимые для созревания яровой пшеницы 1600°С [8], что способствовало ускорению протекания ростовых и репродуктивных процессов, сокращению вегетационного периода культуры. В 2015 году отмечено недостаточное количество осадков на протяжении всего периода роста и развития пшеницы (в условиях Беларуси дефицит осадков был выражен сильнее). Низкий уровень увлажнения наблюдался в период выхода в трубку, колошения (июнь). Известно, что недостаток влаги в период кушения–выхода в трубку увеличивает бесплодность колосков, значительно снижает урожайность яровой пшеницы. Невысокий ГТК также был отмечен в августе во время созревания зерна (табл. 1).

При уборке у изучаемых генотипов проводили учет следующих компонентов продуктивности: высота растения, длина главного колоса, количество продуктивных побегов на растение, число колосков и зерен главного колоса, масса зерна с колоса, а также масса 1000 зерен.

Для статистической обработки данных использовали программы MS Excel 2007 (описательная статистика), Statistica 10.0 (корреляционный, дисперсионный и дискриминантный методы анализа).

Оценку устойчивости к листовой ржавчине и мучнистой росе (возбудители — биотрофные грибные патогены *Puccinia triticina*

Таблица 1

Погодные условия в регионах исследования (2015 г.)

Месяц	Средняя температура воздуха, °С		Сумма активных температур, °С		Осадки, мм		Гидротермический коэффициент, мм/°С	
	Минск	Новосибирск	Минск	Новосибирск	Минск	Новосибирск	Минск	Новосибирск
Апрель	7,25	6,93	114,39	96,63	59,80	10,50	0,03	0,55
Май	12,65	12,9	350,24	390,34	65,50	70,80	1,57	0,91
Июнь	17,56	19,2	526,76	610,66	12,60	20,90	0,24	0,34
Июль	18,64	19,6	577,96	663,23	52,40	76,0	0,91	1,17
Август	21,23	17,1	658,28	496,00	6,20	40,2	0,09	0,68



Erikss. и *Blumeria graminis* DC. f. sp. *tritici* Marchal. соответственно) проводили на стадии взрослых растений в условиях естественного инфекционного фона в 2015 году на экспериментальных полях Института генетики и цитологии НАН Беларуси и Института цитологии и генетики СО РАН. В условиях Беларуси учет поражения проводили по проценту развития болезни на флаг-листе (фаза «молочно-восковая спелость») по шкале Гешеле [9]. В условиях Новосибирской области степень восприимчивости растений к бурой ржавчине определяли по 5-балльной шкале иммунности Майнса и Джексона на стадии выхода растения в трубку и стадии молочной спелости зерна [10]. Симптомы поражения мучнистой росой оценивались по модифицированной шкале Прескотта и Саери от 0 до 9 баллов [11]. Коэффициенты величины эффекта, основанные на проценте объясняемой дисперсии (средние квадраты, MS), рассчитаны по формуле, предложенной П.Ф. Рокицким [12].

### Результаты и обсуждение

Проведена оценка устойчивости 21 интрогрессивной линии мягкой пшеницы *T. aestivum*/*T. timopheevii* и их родительских форм к бурой ржавчине и мучнистой росе. Анализ показал, что вид *T. timopheevii* высокоустойчив к данным патогенам в обоих регионах проведения испытаний. Родительские сорта мягкой пшеницы были восприимчивы как к мучнистой росе, так и к бурой ржавчине в условиях Новосибирской области, но проявили устойчивость к грибным патогенам в условиях Беларуси (степень поражения флаг-листа не превышала 5%). Необходимо отметить, что погодные условия 2015 года не способствовали развитию высокого инфекционного фона грибных болезней в Республике Беларусь (высокие температуры воздуха и дефицит осадков).

Интрогрессивные линии проявили резистентность к мучнистой росе в условиях Беларуси (максимальная степень поражения составила только 10%), причем на 14 линиях из 21 патоген не обнаружен. Оценка восприимчивости данных линий к мучнистой росе в условиях Новосибирской области показала, что большая часть (10) продемонстрировала устойчивость к *B. graminis* (балл 9–8).

Для 6 линий выявлен среднеустойчивый тип реакции (балл 7–6), для 4 — средневосприимчивый (балл 5). Для одной линии поражение поверхности растения превышало 40%, что свидетельствует о восприимчивости к данному патогену. Для линий *T. aestivum*/*T. timopheevii* в условиях Новосибирской области отмечен высокий уровень устойчивости к листовой ржавчине: из 21 линии для 10 характерен иммунный тип реакции, для 11 — устойчивый. В условиях Республики Беларусь все изученные линии проявляли высокоустойчивый тип реакции к бурой ржавчине, что, по-видимому, связано с низким инфекционным фоном патогена.

Проведено изучение основных компонентов продуктивности 21 линии комбинаций Саратовская 29/*T. timopheevii*, Скала/*T. timopheevii*, Иртышанка 10/*T. timopheevii*, Целинная 20/*T. timopheevii*, Новосибирская 67/*T. timopheevii* и их родительских форм в условиях Республики Беларусь и Западно-Сибирского региона. Результаты анализа вклада генотипа, условий внешней среды (региона выращивания) и их взаимодействия в изменчивость хозяйственно важных признаков интрогрессивных линий представлены в табл. 2.

Показана высокая статистическая значимость вклада анализируемых факторов (генотипа, региона выращивания и их взаимодействия) в межгрупповую дисперсию всех изученных признаков. На основании средних квадратов дисперсионного анализа, объема выборки, числа наблюдений рассчитана доля влияния факторов на изменчивость показателей продуктивности (рис. 1).

Широкий диапазон установлен для эффекта фактора «регион» (2,2–81,2%). Показано преобладание роли эколого-географических условий выращивания (>42,7%) в изменчивости признаков «продуктивная кустистость», «высота растения», «число колосков в колосе», «длина колоса» (рис. 1). Вклад генотипа в изменчивость изученных признаков находился в более узком диапазоне 9,5–42,6%. Самая высокая доля изменчивости, обусловленная генотипом, обнаружена для «массы 1000 зерен» — 42,6%, однако необходимо отметить, что эффект взаимодействия генотип × среда для данного признака также был на высоком уровне и составил 42,3%. Число и масса зерен



Таблица 2

Факторный дисперсионный анализ признаков продуктивности образцов пшеницы, выращенных в условиях Беларуси и Западно-Сибирского региона

Признак	Параметры общей линейной модели						
	MS			Ошибка	F		
	df= 1	df= 26	df= 26		Регион	Генотип	Регион × генотип
Регион	Генотип	Регион × генотип	Регион	Генотип	Регион × генотип		
Высота растения	11309,71**	208,12**	247,71**	5,20	2176,79	40,06	47,68
Продуктивная кустистость	93,31**	1,27**	0,49**	0,05	1868,51	25,34	9,80
Длина колоса	60,41**	5,90**	1,48**	0,05	1172,05	114,49	28,66
Число колосков в колосе	279,50**	13,90**	2,45**	0,17	1668,42	82,94	14,62
Число зерен с колоса	71,25**	144,70**	93,07**	2,88	24,72	50,20	32,29
Масса зерен с колоса	0,42**	0,21**	0,20**	0,01	72,31	35,59	33,87
Масса 1000 зерен	174,87**	94,24**	47,92**	2,26	77,36	41,69	21,20

Примечание. MS — средние квадраты; F — критерий Фишера; df — число степеней свободы; \*\* — достоверно при  $p < 0,01$

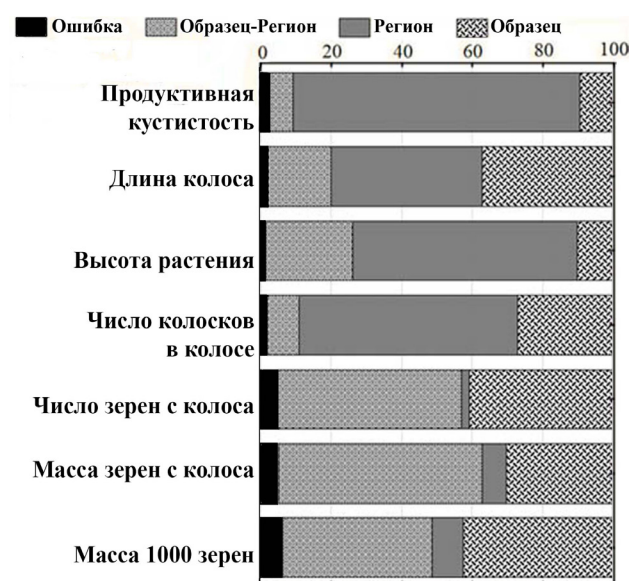


Рис. 1. Соотношение вклада факторов в изменчивость признаков продуктивности интрогрессивных линий пшеницы

с колоса в большей степени определялись взаимодействием «генотип × среда» и, в некоторой степени, — генотипом (рис. 1). Существенность вклада генотип-средового взаимодействия для признаков «урожай зерна», «масса зерна с колоса» отмечена в работах В.В. Сюкова и др. [13], В.Н. Никитиной [14]. Рассмотрение взаимодействия «генотип – среда» как эффекта, вызванного изменением работы генов при смене лимитирующих факторов среды [15], позволяет

предположить высокий вклад эпигенетических факторов в характер экспрессии признаков семенной продуктивности пшеницы.

Для обоих регионов испытаний диапазоны изменчивости признаков с высоким вкладом условий выращивания («продуктивная кустистость», «длина колоса», «высота растения», «число колосков в колосе») характеризуются низкой степенью перекрытия (рис. 2), что подтверждается результатами апостериорного теста Бонферрони (не представлено). Для этих четырех признаков результаты попарного сравнения, основанного на t-критерии Стьюдента (тест Бонферрони), генерируют от 16 до 28 гомогенных групп (значения признака в группе статистически не различаются), объединяющих преимущественно образцы, относящиеся к одному из регионов выращивания и перекрывающиеся только в центре распределения. В условиях Беларуси продуктивная кустистость исследованных генотипов была выше в 1,80 раза, чем при выращивании в Западно-Сибирском регионе, длина колоса — в 1,18 раза, количество формируемых колосков — в 1,20. Высота растения, напротив, была ниже в 1,18 раза. Коэффициент вариации показателей продуктивности, находящихся под высоким давлением условий выращивания, как в целом по опыту, так и по отдельным регионам, не превышает 17%. Исключение составляет только признак «продуктивная кустистость».

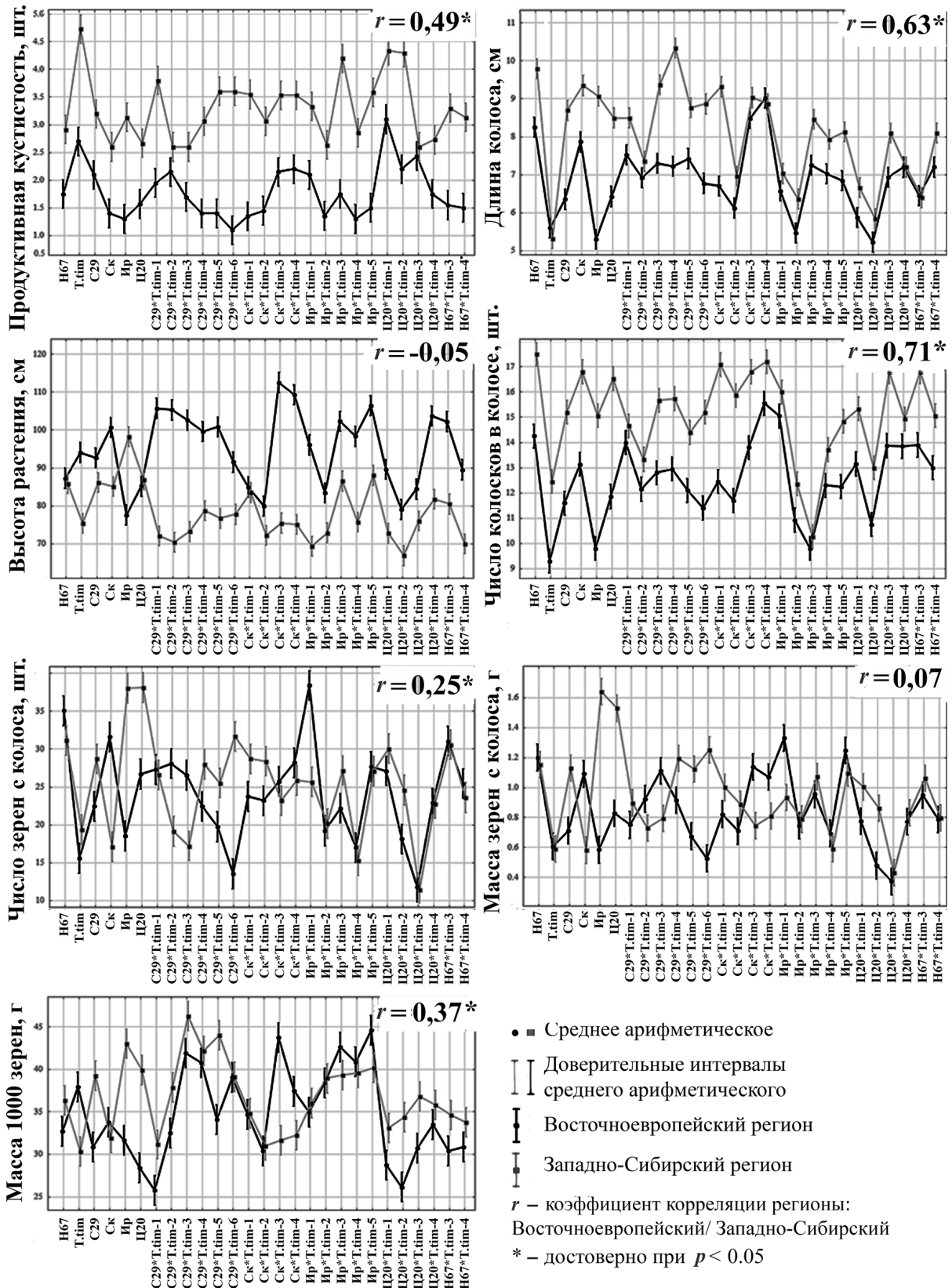


Рис. 2. Сравнение средних значений признаков продуктивности интрогрессивных линий *T. aestivum*/*T. timopheevii* и их родительских форм при выращивании в условиях Республики Беларусь (Восточноевропейский регион) и Западно-Сибирского региона

Признаки «число зерен с колоса», «масса зерен с колоса» и «масса 1000 зерен» более вариабельны как внутри генотипов, так и в пределах регионов исследования. Среднее значение данных показателей большинства образцов при выращивании в условиях Беларуси выше на 5–12%, однако *T. timopheevi*, Скала и гибридные линии Саратовская29 × *T. timopheevi*-2, Саратовская29 × *T. timopheevi*-3, Скала × *T. timopheevi*-3, Скала × *T. timopheevi*-4, Иртышанка × *T. timopheevi*-1, Иртышанка × *T. timopheevi*-4 и Иртышанка × *T. timopheevi*-5 более урожайны в условиях Западно-Сибирского региона. Исходя из результатов дисперсионного анализа и графика эффектов (рис. 2), доверительные интервалы трех признаков семенной продуктивности изученных генотипов, выращенных в условиях Минска и Новосибирска, перекрываются, а гомогенные группы теста Бонферрони

включают образцы из различных регионов испытания.

Генетические связи, лежащие в основе корреляций между хозяйственно-ценными признаками пшеницы, могут по-разному проявляться при изменении условий выращивания. Кроме того, огромный видовой и сортовой материал пшеницы обнаруживает множество отклонений от установленных в прошлом связей между признаками [16–19]. В связи с этим требуется ограничение корреляций как для набора форм, к которым они применимы, так и для климатических условий, в которых они соблюдаются.

Проведена оценка сохранения структуры корреляционных связей между признаками продуктивности сортов пшеницы и созданных на их основе гибридных линий в условиях Беларуси и Западно-Сибирского региона и в объединенном по двум выборкам массиве данных (рис. 3).

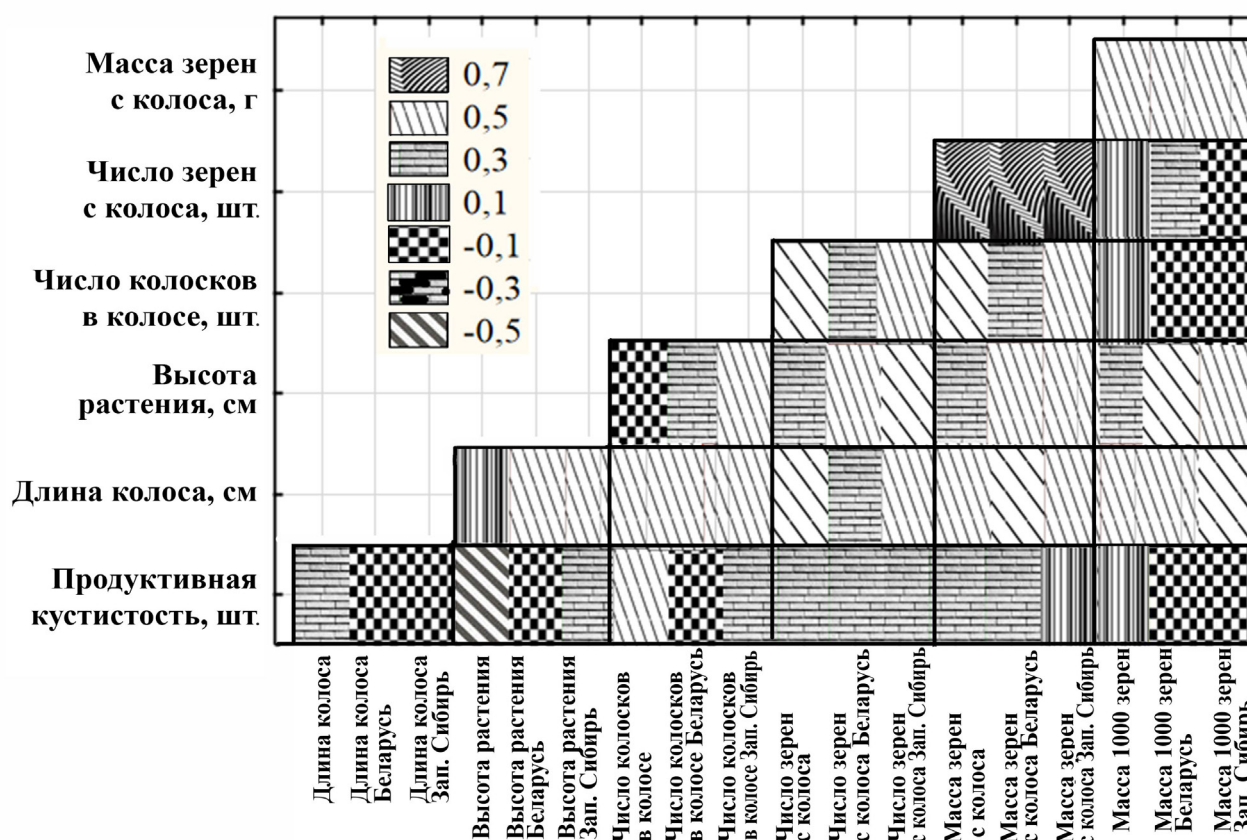


Рис. 3. Парные корреляции между признаками продуктивности интрогрессивных линий *T. aestivum*/*T. timopheevi*, их родительских форм при выращивании в условиях Республики Беларусь, Западно-Сибирского региона и в среднем по эксперименту (имя вертикального ряда соответствует корреляционной паре только для одного из вариантов эксперимента)



Все три варианта анализа показали наличие тесной корреляции в паре признаков «масса зерна» и «число зерен с колоса» ( $r = 0,7-0,9$ ), заметной ассоциации между показателями «число колосков в колосе» и «длина колоса», «длина колоса» и «высота растения» ( $r = 0,5-0,7$ ). Можно предположить, что выявленные зависимости между метрическими признаками могут быть обусловлены гормональным статусом растения, в частности, соотношением вырабатываемых цитокининов и гиббереллинов или чувствительностью к их воздействию. Так, растения пшеницы, нечувствительные к гибберелловой кислоте, характеризуются снижением не только высоты взрослых растений, но и длины coleoptиле, междоузлий и площади листа [20]. Вне зависимости от условий выращивания между признаком «масса 1000 зерен» и показателями «высота растения», «длина колоса» и «масса зерна с колоса» поддерживается корреляция умеренной силы ( $r = 0,3-0,5$ ). В то же время этот признак независим от вариации числа колосков и числа зерен с колоса, а также находится в обратной зависимости от продуктивной кустистости растений. Не исключено, что формирование большого числа колосьев приводит к перераспределению ассимилятов на большее количество зерен, снижению доли питательных веществ на каждое зерно и соответственно к снижению массы 1000 зерен. Отсутствие достоверной связи между признаком «масса 1000 зерен» и значением длины колоса и числа колосков в колосе наблюдается как в двух регионах выращивания, так и в среднем по опыту (рис. 3).

Средняя по двум регионам продуктивная кустистость — признак, находящийся в обратной зависимости от высоты растения, положительно коррелирующий с числом колосков в колосе, слабо ассоциированный с длиной колоса, числом и массой зерен с колоса и независимый от массы 1000 зерен. В результате опыта, поставленного в Новосибирске, достоверной корреляции признака «продуктивная кустистость» с другими хозяйственно-ценными показателями пшеницы не отмечено. Количество стеблей, формируемых растением пшеницы, в погодноклиматических условиях Беларуси слабо ассоциировано с числом зерен с колоса, слабые отрицательные зависимости

показаны между продуктивной кустистостью и длиной колоса, числом колосков в колосе, массой 1000 зерен. Таким образом, у образцов, выращенных в Западно-Сибирском регионе, отмечено ослабление ассоциаций признака «продуктивная кустистость» с показателями высоты растения, признаков продуктивности колоса относительно структуры генетических связей этих признаков в минском эксперименте. В целом по опыту более высокие растения пшеницы характеризуются снижением показателя «число колосков в колосе». Однако в различающихся условиях выращивания тенденция к снижению числа колосков в главном колосе при увеличении роста стебля не выявлена. В условиях Беларуси корреляция между признаками прямая, статистически недостоверная (при  $p < 0,05$ ), а в Западно-Сибирском регионе — значимая, положительная, умеренной силы. Прямой характер зависимости между признаками «высота растения» и «число колосков в колосе» более вероятен и согласуется с литературными данными [14], а отмеченный нами коэффициент обратной корреляции очень низок по модулю ( $r = -0,25$ ) и, скорее всего, обусловлен существенной разницей высоты растения в различных экологических условиях. При выращивании в регионе г. Минска корреляция в парах признаков «число зерен—длина колоса» и «масса зерна—число колосков» статистически недостоверна, при высокой значимости таких ассоциаций в условиях Западной Сибири и в среднем по опыту. Ослабление связей между признаками главного колоса и урожайностью в условиях Беларуси могут быть обусловлены погодноклиматическими условиями, сложившимися на этапе начала колошения (июнь), что привело к усыханию колосков, недоразвитию зерновок, снижению вклада урожая главного колоса в общую продуктивность растения пшеницы.

Для изучения классификационной роли семи признаков продуктивности пшеницы в различных эколого-географических регионах выращивания использована процедура линейного дискриминантного анализа. При пошаговом выполнении анализа с включением толерантности 0,01 и группирующей переменной «регион выращивания» дискриминантная модель включила пять признаков продуктивности. Признаки «число зерен с колоса» и «масса зерен с колоса»

с низким значением статистики «F-включить» исключены из анализа. Полученное для модели значение статистики «лямбда Уилкса» ( $\lambda$ ) высокозначимо ( $F(7,154) = 182,93$ ;  $p < 0,0000$ ) и составляет 0,11, что соответствует хорошему разделению образцов пшеницы мягкой, выращенных в Западно-Сибирском регионе и в условиях Беларуси. Высокие значения «лямбда Уилкса» соответствуют признакам «продуктивная кустистость» и «высота растения» ( $\lambda > 0,2$ ), присутствие которых в модели является наиболее желательным. Значения частной «лямбды Уилкса» характеризуют единичный вклад соответствующей переменной в разделительную силу модели. Чем меньше статистика, тем больше вклад в общую дискриминацию. «Высота растения» оказывает наибольший вклад, «продуктивная кустистость» — вторая по значению вклада, а «масса 1000 зерен» — третья. Значение меры избыточности (толерантности) для включенных в анализ переменных не превышает 0,89 (табл. 3).

По данным канонического анализа наша модель предполагает наличие только одной статистически значимой дискриминирующей функции (корневой функции с параметрами: собственное значение равно 7,81;  $R = 0,94$ ;  $\lambda = 0,11$ ;  $\chi^2 = 342,77$ ;  $df = 5$ ;  $p = 0,00$ ).

Полученная дискриминантная функция наиболее тяжело взвешивается переменными «высота растения», «продуктивная кустистость» и «масса 1000» (исходные коэффициенты канонического анализа по модулю превышают 0,59). Исходя из значений канонических переменных, дискриминантная функция отделяет высокорослые растения пшеницы с низкими

значениями продуктивной кустистости и массы 1000 зерен, определяя их как принадлежащие к региону Западная Сибирь. Контрастный набор признаков характеризует выборку, полученную в условиях Беларуси. Оценка функций классификации показала, что общий процент образцов, корректно отнесенных дискриминантной функцией к белорусскому региону выращивания, составляет 100%, к сибирскому региону — 98,8%.

### Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что условия региона выращивания в значительной степени влияли на параметры признаков продуктивности изученных генотипов пшеницы. Уровень различий по двум анализируемым регионам снижался в ряду «длина колоса», «число колосков в колосе», «масса 1000 зерен», «продуктивная кустистость», «высота растения». Доля различий образцов по переменным «масса зерна с колоса» и «число зерен с колоса» у образцов пшеницы, выращенных в различных эколого-географических условиях, не позволяет использовать эти признаки для классификации наблюдений. Низкая дискриминантная способность признаков семенной продуктивности колоса относительно условий региона выращивания, а также высокий вклад в изменчивость взаимодействия «генотип – среда», вероятно, обуславливают необходимость отбора по этим признакам вдоль специального экологического вектора.

Степень восприимчивости линий пшеницы с интрогрессией генетического материала *T. timopheevii* к грибным заболеваниям также

**Таблица 3**

Результаты анализа дискриминантных функций признаков продуктивности пшеницы для условий Западно-Сибирского региона и Беларуси

Признак	$\lambda$ Уилкса	$\lambda$ частная Уилкса	F-включить	$p$	Толерантность
Продуктивная кустистость	0,21	0,54	133,77	0,00	0,89
Высота растения	0,25	0,45	186,99	0,00	0,56
Длина колоса	0,12	0,92	13,42	0,00	0,46
Масса 1000 зерен	0,14	0,81	35,93	0,00	0,62
Число колосков в колосе	0,13	0,87	22,47	0,00	0,59
Число зерен с колоса	0,11	1,00	0,17	0,68	0,69
Масса зерна с колоса	0,11	1,00	0,01	0,91	0,55

существенно зависела от региона испытаний. Так, если в условиях Республики Беларусь все интродуктивные линии были устойчивы к возбудителю мучнистой росы, то в Новосибирской области резистентность проявили 10 генотипов из 21. Нельзя исключить, что это связано с региональными различиями как расового состава, так и вирулентности возбудителей болезней. Несмотря на различный уровень резистентности интродуктивных линий, тем не менее, большинство из них превышали исходные сорта мягкой пшеницы по устойчивости к мучнистой росе и бурой ржавчине в отношении различных популяций грибных патогенов, что позволяет использовать их в качестве источников генов иммунитета.

Авторы благодарны к. б. н. Булойчику А.А. (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси) за оценку уровня устойчивости линий пшеницы к грибным патогенам в полевых условиях Республики Беларусь. Исследование поддержано Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант №Б18Р-028), Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-516-00001), бюджетным проектом №0324-2018-0018 ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

#### Список использованных источников

1. Catalogue of Gene Symbols for Wheat 2013 [Electronic resource] / R.A. McIntosh [et al.] — Mode of access: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>.
2. Characterization of wheat-alien translocation conferring resistance to diseases and pests: current status / В. Friebe [et al.] // *Euphytica*. — 1996. — Vol. 91, № 1. — P. 59–87.
3. Стасюк, А.И. Проявление хозяйственно важных признаков у яровых гибридов мягкой пшеницы, отобранных с помощью MAS-технологии при скрещивании озимых сортов с яровыми донорами устойчивости к бурой ржавчине / А.И. Стасюк, И.Н. Леонова, Е.А. Салина // *Сельскохозяйственная биология*. — 2017. — Т. 52, № 3. — С. 526–534.
4. Dochev, V. Relationship between the structural elements and grain yield in winter wheat varieties, grown under various climatic conditions / V. Dochev, E. Penchev // *Растениеводство Науки (Болгария)*. — 2012. — Vol. 49, № 5. — P. 8–12.
5. *Triticum aestivum* — *Triticum timopheevii* introgression lines as a source of pathogen resistance genes / I.N. Leonova [et al.] // *Czech J. Genet. Plant Breed.* — 2011. — Vol. 47. — P. 49–55.
6. Расписание погоды [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://rp5.by> (ru).
7. Мамонтова, Л.И. Метеорологический словарь / Л.И. Мамонтова, С.П. Хромов. — Ленинград: Гидрометеиздат, 1974. — 568 с.
8. Карпук, В.В. Растениеводство: учеб. пособие / В.В. Карпук, С.Г. Сидорова. — Минск: БГУ, 2011. — 351 с.
9. Гешеле, Э.Э. Основы фитопатологической оценки в селекции растений / Э.Э. Гешеле. — М.: Колос, 1978. — 208 с.
10. Mains, E.V. Physiological specialization in the leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss / E.V. Mains, H.S. Jackson // *Phytopathology*. — 1926. — Vol. 16. — P. 89–120.
11. Методика по оценке устойчивости сортов полевых культур на инфекционных и провокационных фонах / В.А. Захаренко [и др.] — М.: Россельхозакадемия, 2000. — 88 с.
12. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. — М.: Высшая школа, 1973. — 320 с.
13. Сюков, В.В. Вклад генотип-средовых эффектов в формирование количественных признаков у инбредных и аутбредных растений / В.В. Сюков, Е.В. Медякин, Д.В. Кочетков // *Вестник ВОГиС*. — 2010. — Т. 14, №1. — С. 141–147.
14. Никитина, В.И. Изменчивость хозяйственно-ценных признаков яровой мягкой пшеницы и ячменя в условиях лесостепной зоны Сибири и ее значение для селекции: автореф. дис. ... д-ра. биол. наук: 06.01.05 / В.И. Никитина. — Санкт-Петербург, 2007. — 40 с.
15. Некоторые задачи агрофизического обеспечения селекционных технологий для генетического повышения продуктивности и урожая растений / В.А. Драгавцев [и др.] // *Агрофизика*. — 2011. — Т. 1. — С. 14–22.
16. Keyes, G.J. The effects of dwarfing genes *Rh1* and *Rh2* on cellular dimensions and rate of leaf elongation in wheat / G.J. Keyes, D.J. Paolillo, M.E. Sorrells // *Ann. Bot.* 1989. — Vol. 64. — P. 683–690.
17. Фоменко, М.А. Взаимосвязи урожайности озимой пшеницы с элементами



ее структуры на современном этапе в степной зоне Ростовской области / М.А. Фоменко, А.И. Грабовец // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2017. — №3 (65). — С. 22–24.

18. Сапега, В.А. Оценка параметров среды в пунктах сортоиспытания и адаптивной способности сортов яровой пшеницы в условиях Северного Зауралья / В.А. Сапега. — Сельскохозяйственная биология. — 2008. —

№1. — С. 55–59.

19. Wu, X. Genetic insight into yield-associated traits of wheat grown in multiple rain-fed environments / X. Wu, X. Chang, R. Jing // PLoS ONE. — 2012. — 7(2). — e31249.

20. Hadjichristodoulou, A. Environmental correlations among grain yield and other important traits of wheat in draylands / A. Hadjichristodoulou // Euphytica. — 1989. — Vol. 44, №1-2. — P. 143–150.

S.I. Vakula<sup>1</sup>, O.A. Orlovskaya<sup>1</sup>, L.V. Khotyleva<sup>1</sup>, I.N. Leonova<sup>2</sup>

## VARIABILITY OF AGRONOMICALLY VALUABLE TRAITS IN *T. AESTIVUM*/*T. TIMOPHEEVII* INTROGRESSION LINES IN AGROECOLOGICAL CONDITIONS OF THE REPUBLIC OF BELARUS AND THE WEST SIBERIAN REGION OF RUSSIA

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

<sup>2</sup>Institute of Cytology and Genetics of the SB RAS  
Novosibirsk, 630090, Russia

The main components of productivity and resistance to brown rust and powdery mildew of 21 introgressive lines of soft wheat *T. aestivum*/*T. timopheevii* were studied, including their parental forms, in the conditions of the Republic of Belarus and the West Siberian region. Analysis of the genotype contribution, environmental conditions (the growing region) and their interaction in the variability of economically valuable traits of introgressive lines showed the predominance of ecological and geographical conditions of growing in the variability of traits “productive bushiness”, “plant height”, “the number of spikelets in the ear”, “ear length”. The introgressive lines of *T. aestivum*/*T. timopheevii* were identified, surpassing the initial varieties of soft wheat by resistance to powdery mildew and brown rust in various test regions, which makes it possible to use them as sources of immunity genes.

**Key words:** bred wheat *T. aestivum*, tetraploid wheat *T. timopheevii*, introgression lines, productivity, resistance to fungal diseases, ecologo-genetic experiment.

Дата поступления статьи: 1 марта 2018 г.

Н.В. Савина<sup>1</sup>, А.А. Яцкив<sup>1</sup>, Н.В. Никитченко<sup>1</sup>, Т.Д. Кужир<sup>1</sup>, Е.В. Сечко<sup>2</sup>,  
А.В. Чичко<sup>2</sup>, А.В. Сукало<sup>2</sup>, Р.И. Гончарова<sup>1</sup>

## ПОЛИМОРФИЗМ РЯДА ГЕНОВ ИММУННОГО И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА КАК ФАКТОР ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ЮВЕНИЛЬНОМУ ИДИОПАТИЧЕСКОМУ АРТРИТУ

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

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

<sup>2</sup>УО «Белорусский государственный медицинский университет»

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

В статье представлены результаты сравнения группы пациентов с установленным диагнозом ювенильного идиопатического артрита (ЮИА) и детей без патологии суставов по клиническим и демографическим признакам, а также по распределению частот генотипов/аллелей пяти полиморфных локусов, контролирующих иммунный и воспалительный ответ. Установлено, что среди пациентов с ЮИА преобладают девочки (70%), а среди подтипов заболевания — олигоартрит (66%). Показано, что полиморфизм генов *TRAF1/C5* и *STAT4* вносит определенный вклад в предрасположенность к заболеванию в белорусской популяции. Частота генотипа GG локуса rs3761847 (*TRAF1/C5*) существенно повышена в общей выборке пациентов с ЮИА по сравнению с контролем. Кроме того, минорный аллель G увеличивает вероятность развития тяжелого подтипа заболевания — системного артрита. Полиморфизм гена *STAT4* (rs7574865) оказывает противоположные эффекты на развитие различных подтипов заболевания, при этом минорный аллель T защищает от олигоартрита, но повышает риск развития серонегативного полиартрита. Данные указывают на специфические молекулярные механизмы патогенеза различных подтипов заболевания.

**Ключевые слова:** ювенильный идиопатический артрит, иммунный и воспалительный ответы, генетический полиморфизм.

### Введение

Ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) наиболее распространен среди детских ревматических болезней, возникает в возрасте до 16 лет с частотой 16–113 случаев на 100 тыс. детского населения в разных странах [1]. В нашей республике заболеваемость ЮИА составляет около 30 случаев на 100 тыс. детей. Тяжелое течение, ранняя инвалидизация пациентов, вызванная быстро развивающейся деформацией суставов и ограничением двигательных функций, необходимость длительного экономически затратного лечения и реабилитации усиливают социальную значимость болезни и повышают актуальность исследований, способствующих профилактике и эффективному лечению ЮИА.

Этиология ЮИА до сих пор не ясна [2, 3], хотя очевидно, что болезнь связана с нару-

шением иммунного ответа на внешние воздействия, при котором системы врожденного и приобретенного иммунитета начинают работать против собственного организма. Эффективность лечения зависит от того, насколько своевременно и правильно поставлен диагноз. В то же время имеющиеся клинико-лабораторные методы диагностики недостаточно специфичны и информативны для раннего выявления этой патологии; они не позволяют зарегистрировать изменения, происходящие на досимптоматических стадиях болезни.

В последнее время доказана преобладающая роль генетических факторов в этиологии и патогенезе ЮИА [3–5]. Однако у пациентов с ЮИА отсутствуют мажорные мутации, всецело определяющие риск возникновения и течение болезни, поэтому ведется поиск ассоциаций патологического процесса с по-

лиморфными вариантами генов, контролирующими воспалительный и иммунный ответы. Доказательство диагностической либо клинической значимости таких ассоциаций в случае ЮИА сталкивается с большими трудностями из-за ограниченных выборок пациентов. Только благодаря использованию объединенной европейской когорты, включающей более 2800 человек, стало возможным уточнение генетической природы ЮИА в полногеномных исследованиях [3]. На современном этапе выявление приоритетных генетических вариантов риска возникновения и развития ЮИА является главной задачей молекулярной генетики в детской ревматологии, в том числе и в Республике Беларусь, для чего требуется расширение исследуемых когорт пациентов и накопление биологического материала.

Нами начато изучение генетических основ ЮИА в белорусской популяции. Проанализированы образцы ДНК от пациентов с ЮИА, воспалительными поражениями суставов другой этиологии и контрольной группы по полиморфизму ряда генов: *TNFA*, *PTPN22*, *MIF*, *CTLA4*, *STAT4*, *TRAF1/C5*, входящих в известный перечень генов-кандидатов, повышающих риск развития ЮИА в европейских популяциях [2, 3]. Несмотря на ограниченность выборки, выявлены некоторые ассоциации и закономерности влияния полиморфизма ряда проанализированных локусов на развитие ЮИА и другой суставной патологии [6]. В данной статье представлены результаты генотипирования расширенной выборки пациентов с ЮИА в сравнении с контрольной группой детей и подростков, не имеющих патологии суставов, по локусам *MIF* (rs755622 и rs5844572), *CTLA4* (rs5742909), *STAT4* (rs7574865), *TRAF1/C5* (rs3761847).

### Материалы и методы

Группы обследования включали пациентов 2-й городской детской клинической больницы г. Минска с клинически установленным диагнозом «ювенильный идиопатический артрит» (ЮИА — 118) и детей без острых воспалительных заболеваний и суставной патологии (контроль — 167).

Объект исследования — геномная ДНК, выделенная из образцов периферической цельной крови стандартным фенол-хлороформным методом [7].

Выбор генов для анализа обусловлен функциями их продуктов (табл. 1); среди них цитокины и сигнальные трансдукторы. Функции выбранных полиморфных вариантов в основном связаны с изменением экспрессии соответствующих белков.

Полиморфные варианты *MIF* (rs755622), *CTLA4* (rs5742909), *STAT4* (rs7574865) и *TRAF1/C5* (rs3761847) определялись с помощью ПЦР-ПДРФ метода согласно протоколам, разработанным в лаборатории на основе опубликованных рекомендаций [8–11]. Условия амплификации, использованные праймеры и рестрицирующие эндонуклеазы указаны в табл. 2.

Изменчивость микросателлитного локуса *MIF* -794 (rs5844572), содержащего тетраповторы  $CAT_{5-8}$ , изучена методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (*Applied Biosystems*, США). Определение размеров выявленных аллелей по локусу *MIF* -794 проводили с помощью программы *GeneMapper 4.1* (*Applied Biosystems*, США), результаты фрагментного анализа верифицировались секвенированием гомозигот для подтверждения соответствия между наблюдаемыми размерами меченых фрагментов и количеством составляющих их повторов. Полученная в результате секвенирования нуклеотидная последовательность анализировалась с использованием общедоступного пакета программ BLAST [13].

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета стандартных программ Excel 2000 и Statistica 7. Различия в частотах генотипов (аллелей) и других альтернативных показателей в группе пациентов по сравнению с контролем, а также между различными категориями пациентов определяли по критерию  $\chi^2$  или с помощью точного теста Фишера, различия по количественным признакам при нормальном распределении определяли по критерию t-Стьюдента. Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга анализировали с помощью критерия согласия Пирсона ( $\chi^2$ ). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Вычисляли показатель отношения шансов OR (*odds ratio*) с 95% доверительным интервалом CI (*confidence intervals*) [24], свидетельствующий о вероятности развития заболевания при наличии тех или иных генетических вариантов, контролируемых воспалительный и иммунный ответы.

Таблица 1

## Характеристика изучаемых полиморфных вариантов генов иммунного ответа

Ген	Локализация	Продукт	Функция	Полиморфизм, идентификационный номер SNP в базе данных NCBI (rs)
<i>MIF</i>	22q11.2	Фактор подавления миграции макрофагов	Провоспалительный цитокин и конститутивный элемент иммунитета хозяина; участвует в регуляции иммунной и воспалительной реакций организма (Renner, 2005) [14]	SNP -173*G/C rs755622 в промоторной области гена; повышает экспрессию белка, однако это может иметь локальный характер и зависеть от типа клеток (Alourfi et al., 2005) [15]
				Тетраповторы -794 САТТ <sub>5-8</sub> rs5844572 в промоторной области гена; модулируют активность <i>MIF</i> (Baugh et al., 2002) [16], увеличивая количество циркулирующего белка и усиливая воспалительный ответ (Adamali et al., 2012) [17]
<i>CTLA4</i>	2q33.2	Протеин 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами	Относится к суперсемейству иммуноглобулинов, участвует в нисходящей регуляции иммунного ответа, передает подавляющий сигнал Т-лимфоцитам	SNP -318С/Т (rs5742909) в промоторной области гена; повышает экспрессию <i>CTLA4</i> мРНК и белка на поверхности Т-лимфоцитов (Wang et al., 2002) [18]
<i>STAT4</i>	2q32.2–2q32.3	ДНК-связывающий белок — сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции 4	Является посредником в реакции лимфоцитов на интерлейкины и экспрессируется в активированных моноцитах, макрофагах и дендритных клетках при воспалении (Watford et al., 2004; Kaplan, 2005) [19, 20]	SNP <i>STAT4</i> rs7574865 (G/T). Функция неизвестна; по-видимому, может влиять на экспрессию и фосфорилирование <i>STAT4</i> (Dąbrowska-Żamojcin et al., 2016) [21]
<i>TRAF1/C5</i>	9q33–34	<i>TRAF1</i> — фактор 1, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли TNFR;  <i>C5</i> — компонент комплемента	Передает сигнал от рецепторов TNFR к компонентам различных сигнальных путей, в т. ч. MAPK8/JNK и NF-κB;  Отвечает за уничтожение чужеродных клеток (Gasque, 2004) [22]	SNP <i>TRAF1/C5</i> rs3761847 (A/G) локализован между генами, ассоциирован с измененным уровнем мРНК (Bek et al., 2017) [23]

Таблица 2

## Условия генотипирования изученных SNPs

Ген	Праймеры	Условия ПЦР	Рестриктаза	Продукты рестрикции (п. о.)
<i>MIF</i> -173*G/C rs755622	(F) 5'- ACT-AAG-AAA-GAC- CCG-AGG-C -3'	40 циклов: 94° С — 30 с 58° С — 30 с 71° С — 60 с	Alu I	GG (дикий тип): 268 GC (гетерозигота): 268+205+98+63 CC: 205+98+63
	(R) 5'- GGG-GCA-CGT-TGG- TGT-TTA-C -3'			
<i>CTLA4</i> -318C/T rs5742909	(F) 5'- AGTCTCCACTTAGTT ATCCAGATCCT -3'	35 циклов: 94° С — 30 с 63° С — 40 с 72° С — 60 с	Tru1 I	CC (дикий тип): 120 CT (гетерозигота): 120+94 TT: 94
	(R) 5'- AAAAGACAACCT CAAGCACTCA -3'			
<i>STAT4</i> rs7574865 (G/T)	(F) 5'- GCAAATCTTTGT AAAAAGTCAA -3'	35 циклов: 94° С — 30 с 56° С — 40 с 72° С — 60 с	Tru1 I	GG (дикий тип): 156 GT (гетерозигота): 93+63+156 TT: 63+93
	(R) 5'- TTATGGAAAATT ACATGAGTGTG -3'			
<i>TRAF1/C5</i> rs3761847 (A/G)	(F) 5'- CCTACCTGTTCCCTC CTTCC -3'	35 циклов: 94° С — 30 с 60° С — 30 с 72° С — 60 с	Msp I	AA (дикий тип): 262 AG (гетерозигота): 262+175+87 GG: 175+87
	(R) 5'- GGGATGATGATG GCAATACC -3'			

Таблица 3

## Демографическая характеристика групп обследования

Исследуемые параметры		Группа ЮИА (118)	Контроль (167)
Соотношение по полу (девочки/мальчики), %		69,5/30,5	41,9/58,1
Средний возраст, лет ( $m \pm SD$ )*	Вся выборка	8,36 $\pm$ 4,99	14,02 $\pm$ 2,63
	Девочки	7,56 $\pm$ 4,49	13,84 $\pm$ 2,9
	Мальчики	10,16 $\pm$ 5,64	14,15 $\pm$ 2,42
Максимальный/минимальный возраст (лет)		17/1	17/6

Примечание. \* —  $m \pm SD$  (среднее значение плюс стандартное отклонение)

## Результаты и обсуждение

## Демографическая и клиническая характеристика групп обследования

На выборке из 285 пациентов проанализированы демографические и клинические признаки, а также распределение частот генотипов/аллелей по выбранным полиморфным локусам. Демографическая характеристика групп обследования, а именно пациентов с клинически установленным диагнозом ЮИА и пациентов без воспалительных заболеваний и патологии суставов (контроль), представлена в табл. 3.

Из таблицы видно, что группы обследования различаются между собой по полу и среднему возрасту. В контрольной группе незначительно преобладают мальчики (41,9%/58,1%), тогда как в группе ЮИА доминируют девочки (69,5%/30,5%); последнее согласуется с общеизвестной статистикой [25]. Средний возраст пациентов с ЮИА ниже, чем у детей без суставной патологии ( $p < 0,001$ ). То же касается и медианы возраста, которая вдвое выше в контрольной группе по сравнению с группой ЮИА (15 и 7 лет соответственно).



Клиническая характеристика контрольной группы в соответствии с причиной обращения в клинику представлена в табл. 4.

Основную часть контрольной группы составляют пациенты с вегетативными дисфункциями (почти 81%). У мальчиков, кроме этого диагноза, наиболее распространенная причина обращения — варикоцеле (7,8%).

Вегетативная дисфункция — довольно распространенное патологическое состояние, характерное для любого возраста; наиболее часто диагностируется у школьников [26]; в нашем исследовании в равной степени встречалась у девочек (48,4%) и мальчиков (51,2%). Частота распространения варикоцеле у подростков достигает 16%; выявление этой пато-

логии, как правило, приурочено к пубертатному периоду [27]. Дети с патологией сердца (врожденными и приобретенными пороками и другой симптоматикой) составили 6,0%. Среди всех указанных причин обращения в клинику отсутствовали заболевания с аутоиммунным компонентом и острые либо хронические воспаления.

Пациенты с ЮИА классифицированы по подтипам заболевания в соответствии с критериями ILAR [28]. В табл. 5 дана количественная характеристика этой группы обследования, а в табл. 6 приведены результаты анализа наиболее часто встречающихся подтипов ЮИА по демографическим признакам и дебюту заболевания.

Таблица 4

Клиническая характеристика группы госпитального контроля

Причина обращения в клинику	Мальчики	Девочки	Всего	%
Артериальная гипертензия	1	0	1	0,6
Нарушение ритма сердца	0	1	1	0,6
Киста правого/левого яичка	1	0	1	0,6
Лабильная АГ	0	1	1	0,6
Варикоцеле	13	0	13	7,8
Брадикардия	1	0	1	0,6
Врожденный порок сердца, дефект межпредсердной перегородки	1	1	2	1,2
Коронарно-легочная фистула	1	0	1	0,6
Врожденный кардит	1	0	1	0,6
Пролапс митрального клапана 1 ст.	2	2	4	2,4
Недостаточность трикуспидального клапана	1	0	1	0,6
МАРС: ДХЛЖ (дополнительная хорда левого желудочка)	3	0	3	1,8
ВД, субклинический гипотиреоз	0	1	1	0,6
ВД (вегетативная дисфункция)	62	59	121	72,4
Нейроциркуляторная дистония	6	0	6	3,6
Вегетососудистая дистония	3	5	8	4,8
Субфебрилитет неуточненный	1	0	1	0,6
Включено в группу	97	70	167	100

**Примечание.** МАРС — малые аномалии развития сердца



Таблица 5

Характеристика пациентов группы ЮИА в соответствии с классификацией ILAR

Подтипы ЮИА	Количество человек (%)
Суставная форма, из них:	105 (89)
полиартрит серопозитивный (РФ <sup>+</sup> )	2 (2)
полиартрит серонегативный (РФ <sup>-</sup> )	19 (16)
олигоартрит	78 (66)
псориатический артрит	1 (1)
артрит, связанный с энтезитом	5 (4)
недифференцированный артрит	0 (0)
Системное заболевание	13 (11)

В табл. 6 охарактеризованы наиболее часто встречающиеся подтипы ЮИА по демографическим признакам и дебюту заболевания.

Олигоартикулярный (*Oligoarthritis*) вариант ювенильного артрита составляет до 60% всех случаев заболевания (в нашем исследовании — 66,1%). В зависимости от клинических проявлений он делится на: постоянный, или персистирующий (а) и распространенный, или прогрессирующий (б) [25, 28, 29]. Согласно критериям Американской коллегии ревматологов, олигоартрит подразделяется на три группы в зависимости от дебюта заболевания. Подтип с ранним началом составляет примерно 50% случаев; встречается преимущественно у девочек (до 85%), развивается в возрасте от 1 года до 5 лет. В нашем исследовании доля этого подтипа составила 65%; в 84% соответствующий диагноз установлен у девочек, дебют заболевания — около 3-х лет. Подтип с поздним началом заболевания наблюдается с частотой 10–15%, развивается в возрасте 8–15 лет. Болеют преимущественно мальчики (до 90% случаев), начало заболевания чаще всего совпадает с дебютом юношеского анкилозирующего спондилита. В нашем исследовании этот подтип составил 23%, диагноз установлен у 9-ти девочек и 9-ти мальчиков среднего возраста около 12 лет. Выделен подтип олигоартрита с дебютом в возрасте 6-ти лет, который встречается среди всех возрастных групп, но преимущественно у девочек. В нашем исследовании эти случаи составили 5% и наблюдались у 3-х девочек и одного мальчика.

Во всех классификациях, в том числе ILAR, полиартикулярный вариант ювенильного артрита разделяют на два подтипа: серопозитивный (РФ<sup>+</sup>, *Polyarthritis RF positive*) и серонегативный (РФ<sup>-</sup>, *Polyarthritis RF negative*) в зависимости от наличия или отсутствия ревматоидного фактора [28, 29]. РФ<sup>+</sup> артрит очень редко наблюдается у детей (менее 5% от всех случаев ЮИА), при этом намного чаще встречается у лиц женского пола (до 80%); начинается обычно после достижения ребенком десятилетнего возраста и часто протекает в тяжелой форме. В нашем исследовании РФ<sup>+</sup> полиартрит диагностирован только у двух пациентов, т. е. в 2% случаев.

На долю РФ-негативного полиартрита приходится от 10 до 30% всех случаев ЮИА; болезнь может развиваться у детей любого возраста. В нашем исследовании этот подтип установлен у 16% пациентов с ЮИА, из них 68% девочек и 32% мальчиков с дебютом заболевания около 5-ти и 8-ми лет, соответственно. Согласно статистике, до 10% ЮИА составляет суставно-висцеральный артрит с системным началом (*Systemic arthritis*), которому могут быть подвержены мальчики и девочки разного возраста, но особенно часто он выявляется у детей раннего возраста и дошкольников. В нашем исследовании такие случаи составили 11%; соотношение полов примерно равное, дебют заболевания — 3–4 года; средний возраст пациентов  $6,6 \pm 4,0$  лет. Из менее частых форм — артрит, связанный с энтезитом, на его долю обычно приходится до 20% всех

Таблица 6

Характеристика наиболее часто встречающихся подтипов ЮИА по полу, возрасту и дебюту заболевания

Соотношение по полу (жен/муж), %	Дебют болезни, лет	Возраст, лет
<i>Олигоартрит</i>		
74/26	4,88 ± 4,14	7,68 ± 4,78
Девочки	4,1 ± 3,40	7,25 ± 4,37
Мальчики	6,77 ± 5,29	8,50 ± 5,74
<i>Олигоартрит с ранним началом</i>		
84/16	2,46 ± 0,99	5,44 ± 3,52
Девочки	2,54 ± 0,91	2,79 ± 3,64
Мальчики	2,15 ± 1,31	4,0 ± 2,66
<i>Олигоартрит с началом в 6 лет</i>		
75/25	6,17 ± 0,35	11,5 ± 4,65
<i>Олигоартрит с поздним началом</i>		
50/50	11,44 ± 2,43	12 ± 3,87
Девочки	10,89 ± 2,2	10,92 ± 4,12
Мальчики	12 ± 2,64	13,66 ± 2,91
<i>Серонегативный (РФ) полиартрит</i>		
68/32	5,81 ± 3,58	9,63 ± 5,34
Девочки	4,81 ± 2,36	7,92 ± 4,33
Мальчики	8 ± 4,94	13,33 ± 5,82
<i>Системный артрит</i>		
54/46	3,62 ± 2,93	6,62 ± 4,03
Девочки	3,14 ± 1,59	5,43 ± 3,31
Мальчики	4,16 ± 4,11	8 ± 4,64
<i>Артрит, связанный с энтезитом</i>		
40/60	13,7 ± 2,19	14,6 ± 2,41

случаев ЮИА, чаще болеют мальчики в возрасте старше 6-ти лет. В нашем исследовании установлен у 5 человек (4,25% случаев), преимущественно у мальчиков (60%), с дебютом заболевания около 14-ти лет. Следует отметить, что поражение глаз наблюдалось у 7 человек, то есть в 5,93% случаев ЮИА. Выполненный нами анализ выборки пациентов с установленным диагнозом ЮИА свидетельствует, что в ней присутствуют все подтипы заболевания

за исключением недифференцированного артрита. Распределение подтипов ЮИА по полу, возрасту и дебюту в общих чертах соответствует известным критериям и частотам.

Характеристика обеих групп обследования по ряду фенотипических признаков выявила некоторые различия, которые обусловлены гендерными особенностями включенных в исследование патологических состояний и их манифестацией в разном возрасте. В отличие

от наиболее частых дисфункций, представленных в контрольной группе, ЮИА может проявляться очень рано, при этом особенно распространенные подтипы имеют пики дебюта между 1–3 годами и в 9–14 лет [30]. В препубертатном периоде и старше развиваются редкие подтипы ЮИА: серопозитивный полиартрит, псориатический либо энтезит-ассоциированный артрит [31–33]. Высокая частота встречаемости вегетативной дисфункции и варикоцеле в группе госпитального контроля, которые преимущественно диагностируются в среднем и старшем школьном возрасте, и низкая частота РФ<sup>+</sup> артрита и других редких форм ЮИА с более поздним дебютом, обуславливают возрастные различия между группами обследования. Особенности в соотношении полов (в пользу мальчиков в группе госпитального контроля и в пользу девочек в группе ЮИА) также вполне объяснимы. Контрольная группа представлена в основном детьми с вегетативной дисфункцией, которая, как известно, не имеет гендерного предпочтения. Варикоцеле — патология мальчиков, тогда как ЮИА — преимущественно развивается у девочек за исключением некоторых редких форм. Главный критерий исключения из контрольной группы соблюден, так как в ней

отсутствуют дети с патологией иммунитета и воспалительными заболеваниями.

#### *Результаты генотипирования ДНК пациентов по полиморфным локусам STAT4, CTLA4, TRAF1/C5 и MIF*

В группе пациентов с ЮИА изучено распределение частот генотипов/аллелей по ряду полиморфных локусов в сравнении с контролем; в табл. 7 представлены данные, касающиеся генов *STAT4* и *CTLA4*.

Представленные результаты показывают, что частота минорного аллеля rs7574865 гена *STAT4* в контрольной выборке укладывается в диапазон частот, характерных для европейских стран (20–23%) [34–36] и отличается от этих показателей у азиатов (31–33%) [37–39]. Наблюдаемая частота минорного аллеля rs574290 гена *CTLA4* также близка его частотам в странах Западной Европы (от 8% в Великобритании до 13,5% в Италии) и мало отличается от этого показателя в Польше (8,6%) [40–42].

Что касается влияния полиморфизма этих генов на предрасположенность к ЮИА, то статистически значимые различия найдены только для минорного аллеля (Т) гена *STAT4*, частота которого понижена при олигоартрите

**Таблица 7**

Распределение частот генотипов/аллелей полиморфных локусов rs7574865 и rs5742909 в группах пациентов с ЮИА по сравнению с контролем

Группа пациентов	n	STAT4 rs7574865; частоты, %				CTLA4 rs5742909; частоты, %			
		GG	GT	TT	Т аллель	CC	CT	TT	Т аллель
Контроль (выборка)	167	56,9	37,1	6	24,6	80,2	19,2	0,6	10,2
ЮИА (выборка)	118	64,4	30,5	5,1	20,3	82,2	17,8	0,0	8,9
Олигоартрит	78	69,2	28,2	2,6	<b>16,7</b>	83,3	16,7	0,0	8,3
РФ <sup>-</sup> полиартрит	19	36,8	47,4	15,8	<b>39,5</b>	84,2	15,8	0,0	7,9
Системный артрит	13	76,9	23,1	0,0	11,5	76,9	23,1	0,0	11,5
Контроль (мальчики)	97	54,6	40,2	5,2	25,3	82,5	16,5	1,0	9,3
ЮИА (мальчики)	36	72,2	25,0	2,8	15,3	88,9	11,1	0,0	5,6
Контроль (девочки)	70	60,0	32,9	7,1	23,6	77,1	22,9	0,0	11,4
ЮИА (девочки)	82	61	32,9	6,1	22,6	79,3	20,7	0,0	10,4

**Примечание.** Жирным шрифтом отмечены статистически значимые различия ( $p \leq 0,05$ ) с контролем

и повышена при РФ-негативном полиартрите. Показатели отношения шансов — OR = 0,61; 95% CI [0,38–1,00] ( $p = 0,05$ ) и OR = 2,00; 95% CI [1,00–4,02] ( $p = 0,047$ ) — свидетельствуют о протекторном эффекте аллеля Т против развития олигоартрита и его ассоциации с риском появления РФ-негативного полиартрита. Такие разнонаправленные эффекты могут указывать на различные молекулярно-генетические пути патогенеза этих двух наиболее распространенных подтипов заболевания.

Следует отметить, что масштабными исследованиями на популяциях разного этнического происхождения установлено, что *STAT4* относится к числу генов, полиморфизм которых модифицирует предрасположенность к ревматоидному артриту взрослых и ЮИА [34, 37, 43], при этом есть сведения как об отсутствии какого-либо эффекта [44], так и диаметрально противоположные данные о снижении риска развития ревматоидного артрита под влиянием мутантного аллеля Т (для азиатских популяций) [45]. Установленные нами на сравнительно небольших выборках ассоциации нуждаются в дальнейшем изучении, тем более что межгрупповые различия доказаны на границе статистической значимости ( $p = 0,047–0,05$ ). Нам не удалось выявить какое-либо влияние полиморфизма в локусе rs5742909 гена *CTLA4* на развитие ЮИА, что также требует подтверждения, так как известные из литературы данные противоречивы [46–48].

Результаты генотипирования по полиморфным локусам *MIF* -173 G/C (rs755622) и *TRAF1/C5* A/G (rs3761847), представленные в табл. 8, показали, что частоты минорных аллелей обоих генов находятся в пределах значений, характерных для европейских популяций [34, 49, 50].

Обнаружены статистически значимые различия в частотах гомозиготного по минорному аллелю генотипа *TRAF1/C5* между группой контроля и выборкой пациентов с ЮИА. Эти различия касались, прежде всего, девочек ( $p = 0,000096$ ). Полиморфизм гена *MIF* rs755622 не изменял чувствительность популяции к ЮИА. Так, частоты минорного аллеля (С) этого гена практически одинаковы во всех исследованных группах.

Изучение распределения частот генотипов/аллелей по данным локусам в зависимости от подтипа заболевания (рис.) выявило ряд тенденций и закономерностей.

Несмотря на визуально определяемые различия между частотами некоторых генотипов и минорного аллеля *MIF* -173\* С в группах олигоартрита и системного артрита, а также в группах серонегативного полиартрита и системного заболевания, все они не достигли статистической значимости.

В отличие от этих данных генотипирование по локусу rs3761847 гена *TRAF1/C5* оказалось более результативным, так как сравнение олиго- и системного артрита продемонстрировало существенное снижение частоты аллеля дикого

Таблица 8

Распределение частот генотипов/аллелей полиморфных локусов *MIF* и *TRAF1/C5* в группах пациентов с ЮИА по сравнению с контролем

Группа пациентов	<i>MIF</i> rs755622; частоты, %					<i>TRAF1/C5</i> rs3761847; частота, %				
	n	GG	GC	CC	С аллель	n	AA	AG	GG	G аллель
Контроль/в	167	69	27	5	17,66	163	39	48	13	36,81
ЮИА/в	117	64	35	1	18,38	120	39	38	<b>23<sup>1</sup></b>	<b>42,08<sup>1</sup></b>
Контроль/м	97	71	26	3	15,98	94	39	46	15	37,72
ЮИА/м	37	73	24	3	14,86	38	34	37	<b>29<sup>2</sup></b>	47,37
Контроль/д	70	66	28	6	20,00	69	39	51	10	35,51
ЮИА/д	80	60	40	0	20,00	82	41	38	<b>21<sup>3</sup></b>	39,63

**Примечание.** в — вся выборка; м — мальчики; д — девочки. Жирным шрифтом отмечены статистически значимые различия с контролем: <sup>1,2</sup> —  $p < 0,05$ ; <sup>3</sup> —  $p < 0,0001$  согласно критерию  $\chi^2$

типа А при системном заболевании (42% по сравнению с 64%,  $p = 0,034$ ). И наоборот, минорный аллель G представлен с высокой частотой у пациентов с системным заболеванием (58% против 36%), а показатель отношения шансов  $OR = 2,43$ ;  $95\% CI [1,05-5,6]$   $p = 0,037$  указывает на более чем двукратное увеличение вероятности развития этого подтипа заболевания по сравнению с олигоарткулярной формой ЮИА. По-видимому, полученные данные отражают особенности влияния полиморфизма в локусе rs3761847 гена *TRAF/C5* на чувствительность белорусской популяции к ЮИА. Результаты позволяют также предположить, что минорный аллель затрагивает функционирование гена (экспрессию

или активность его продукта), что в свою очередь направляет патогенез заболевания по пути развития наиболее тяжелой формы заболевания.

Результаты генотипирования по локусу -794  $CATT_{5-8}$  гена *MIF* (rs755622) после их верификации, как указано выше (см. материалы и методы), представлены в табл. 9. Из литературы известно, что аллель -794  $CATT_5$  связан с наименьшей степенью экспрессии гена *MIF* [51]. С увеличением числа повторов функциональная активность гена повышается, что зачастую ассоциировано с ухудшением прогностических показателей и хронизацией патологического процесса при разных аутоиммунных заболеваниях [52–54].

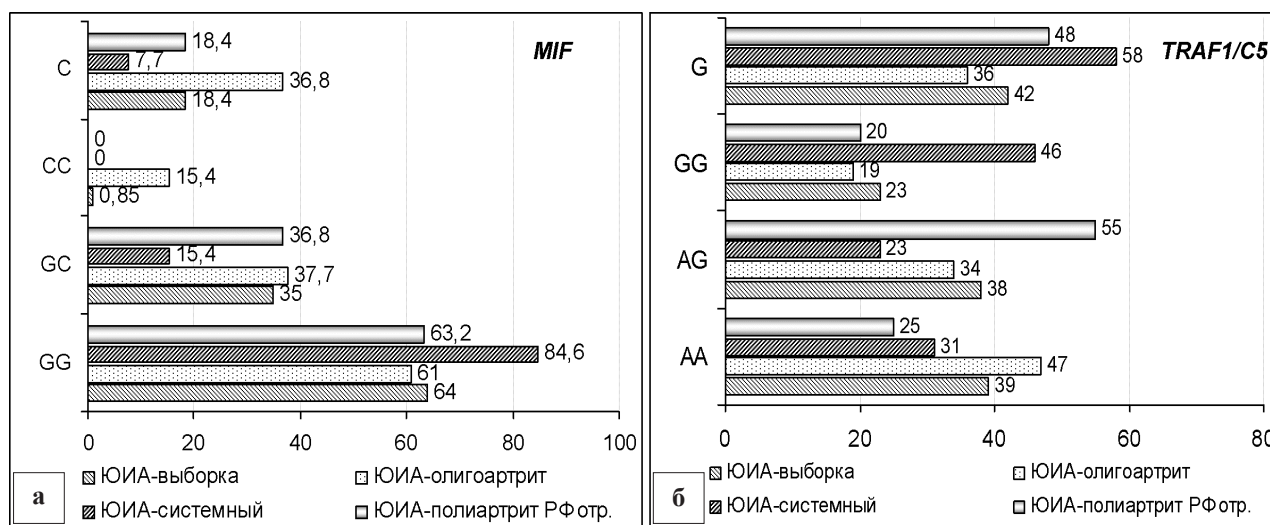


Рис. Распределение частот генотипов/аллелей по локусам rs755622 (а) и rs3761847 (б) в зависимости от подтипов ЮИА

Таблица 9

Частоты генотипов/аллелей по полиморфному локусу -794  $CATT_{5-8}$  гена *MIF* в разных группах обследования

Группа, человек	Частота генотипов -794 $CATT_{5-8}$ <i>MIF</i> , %						Частота аллелей, %		
	5,5	5,6	5,7	6,6	6,7	7,7	5	6	7
Контроль-выборка, 99	10	31	8	33	14	3	30	56	14
ЮИА-выборка, 94	10	41	5	24	19	0	33	55	12
Контроль-девочки, 65	9	29	8	35	14	5	28	57	15
ЮИА-девочки, 62	10	42	6	23	19	0	34	53	13
Контроль-мальчики, 34	12	35	9	29	15	0	34	54	12
ЮИА-мальчики, 32	9	41	3	28	19	0	31	58	11



Судя по данным табл. 9, аллели -794 САТТ<sub>5</sub>, САТТ<sub>6</sub> и САТТ<sub>7</sub> встречаются во всех обследованных группах с одинаковой частотой, а наиболее распространенным аллелем является -794 САТТ<sub>6</sub>, частота которого достигает 53–58%. В обеих выборках чаще выявляются гетерозиготные генотипы -794 САТТ<sub>5,6</sub> и гомозиготы САТТ<sub>6,6</sub>. Наблюдается тенденция к разнонаправленному изменению частоты встречаемости генотипов -794 САТТ<sub>5,6</sub> (к повышению) и САТТ<sub>6,6</sub> (к снижению) в группе ЮИА относительно контрольного уровня (41% против 31%,  $p = 0,157$ ; 24% против 33%,  $p = 0,174$ ), а также преобладание гетерозиготного генотипа -794 САТТ<sub>5,6</sub> среди девочек с ЮИА по сравнению с соответствующим контролем (42% против 29%,  $p = 0,134$ ). Однако статистически значимых отклонений от контрольных показателей в группе ЮИА либо каких-либо гендер-специфических особенностей установить не удалось. Отметим, что аллель -794 САТТ<sub>8</sub> в нашем исследовании не обнаружен ни в группе ЮИА, ни в контрольной группе.

Следовательно, результаты генотипирования по полиморфным локусам rs755622 и rs5844572 на имеющейся выборке пока не позволяют делать какие-либо однозначные выводы о влиянии однонуклеотидного полиморфизма и/или микросателлитной изменчивости гена *MIF* на риск развития ЮИА и отдельных его подтипов в белорусской популяции.

### Заключение

В работе дана клинико-демографическая характеристика исследованной выборки пациентов с установленным диагнозом «ювенильный идиопатический артрит» (ЮИА) в сравнении с группой госпитального контроля. В группе пациентов с ЮИА диагностированы все подтипы заболевания, среди которых наиболее представительную группу составляют пациенты с олигоартритом; 70% пациентов ЮИА — девочки. Демографические особенности и наблюдаемое распределение по подтипам заболевания соответствуют известным данным литературы.

Исследовано влияние пяти полиморфных локусов (rs755622, rs5844572, rs5742909, rs7574865 и rs3761847), контролирующих иммунный и воспалительный ответы, на риск развития ЮИА в целом и отдельных его под-

типов. Среди изученных полиморфных вариантов наиболее существенным эффектом обладал гомозиготный по минорному аллелю генотип GG *TRAF1/C5* (rs3761847), частота которого преобладала в группе ЮИА, особенно у девочек. При сравнении результатов генотипирования по этому локусу при различных подтипах заболевания оказалось, что у пациентов с системным заболеванием частота минорного аллеля G *TRAF1/C5* статистически значимо выше, чем у пациентов с олигоартритом. Показатель отношения шансов OR = 2,43; 95% CI [1,05–5,6] при  $p = 0,037$  указывал на более чем двукратное увеличение вероятности развития тяжелой формы заболевания у носителей этого аллеля.

Интересные, но неоднозначные данные получены относительно эффектов полиморфизма в локусе rs7574865 гена *STAT4*: минорный аллель T повышал риск развития РФ-негативного полиартрита (OR = 2,00; 95% CI [1,00–4,02];  $p = 0,047$ ), но снижал вероятность появления у детей олигоартрита (OR = 0,61; 95% CI [0,38–1,00];  $p = 0,05$ ). Полиморфизм других изученных локусов существенно не изменял чувствительность белорусской популяции к ЮИА. Полученные результаты свидетельствуют об индивидуальных (возможно, альтернативных) молекулярно-генетических путях патогенеза различных подтипов заболевания. Однако для доказательства наличия или отсутствия ассоциаций ЮИА с определенными генетическими вариантами необходимо расширение выборок и дальнейшие исследования с учетом гендерных, возрастных и других этиологически и патогенетически важных факторов.

### Список использованных источников

1. Adib, N. Outcome following onset of juvenile idiopathic inflammatory arthritis: I. frequency of different outcomes / N. Adib, A. Silman, W. Thomson // *Rheumatology (Oxford)*. — 2005. — Vol. 44, № 8. — P. 995-1001.
2. Pahalad, S. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis / S. Pahalad, D.N. Glass // *Pediatr. Rheumatol. Online J.* — 2008. — Vol. 6:11.
3. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis / A. Hinks



- [et al.] // *Nat. Genet.* 2013. — Vol. 45, № 6. — P. 664–669. — doi: 10.1038/ng.2614.
4. Angeles-Han, S. The genetics of juvenile idiopathic arthritis: what is new in 2010? / S. Angeles-Han, S. Prahalad // *Curr. Rheumatol. Rep.* — 2010. — Vol. 12, № 2. — P. 87–93. — doi: 10.1007/s11926-010-0087-0.
5. Independent confirmation of juvenile idiopathic arthritis genetic risk loci previously identified by immunochip array analysis / R.C. Chiaroni-Clarke [et al.] // *Pediatr. Rheumatol. Online J.* — 2014. — Vol. 12:53. — doi: 10.1186/1546-0096-12-53.
6. Частота генотипов и аллелей полиморфных локусов генов воспалительного ответа PTN22, TNF $\alpha$  и MIF у детского контингента Республики Беларусь / Н.В. Савина [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. трудов.* — 2016, Т. 22. — С. 14–24.
7. Sambrook, J. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press — 1989. — P. 9.14–9.23.
8. A genetic role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in adult-onset Still's disease / F.-F. Wang [et al.] // *Arthritis Research & Therapy.* — 2013. — Vol. 15, R65. — P. 2–8.
9. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location / K. Harper [et al.] // *J. Immunol.* — 1991. — Vol. 147, № 3. — P. 1037–1044.
10. Is there an association between two-STAT4 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Turkish population? / B. Yuksel [et al.] // *Arch. Rheumatol.* — 2014. — Vol. 29, № 1. — P. 20–27.
11. Susceptibility to childhood-onset rheumatoid arthritis: investigation of a weighted genetic risk score that integrates cumulative effects of variants at five genetic loci / S. Prahalad [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2013. — Vol. 65, № 6. — P. 1663–1667.
12. A MIF haplotype is associated with the outcome of patients with severe sepsis: a case control study / L.E. Lehmann [et al.] // *Journal of Translational Medicine.* — 2009. — 7:100. — doi:10.1186/1479-5876-7-100.
13. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [Electronic resource] // NCBI, National Center for Biotechnology Information. — Date of access: 15.02.2016.
14. Renner, P. Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases / P. Renner, T. Roger, T. Calandra // *Clin. Infect. Dis.* — 2005. — Vol. 41, Suppl. 7. — S513–519.
15. Glucocorticoids suppress macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in a cell-type-specific manner. / Z. Alourfi [et al.] // *J. Mol. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 34. — P. 583–595.
16. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. / J.A. Baugh [et al.] // *Genes Immun.* — 2002. — Vol. 3. — P. 170–176.
17. Macrophage migration inhibitory factor enzymatic activity, lung inflammation, and cystic fibrosis / H. Adamali [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2012. — Vol. 186, № 2. — P. 162–169.
18. A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. / X.B. Wang, [et al.] // *Genes Immun.* — 2002. — Vol. 3. — P. 233–234.
19. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4 / W.T. Watford [et al.] // *Immunol. Rev.* — 2004. — Vol. 202. — P. 139–156.
20. Kaplan, M.H. STAT4: a critical regulator of inflammation in vivo. / M.H. Kaplan // *Immunol. Res.* — 2005. — Vol. 31. — P. 231–242.
21. STAT4 gene polymorphism in patients after renal allograft transplantation // E. Dąbrowska-Żamojcin [et al.] // *Cent. Eur. J. Immunol.* — 2016. — Vol. 41, № 3. — P. 255–259.
22. Gasque, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. / P. Gasque // *Mol. Immunol.* — 2004. — Vol. 41, № 11. — P. 1089–1098.
23. Systematic review and meta-analysis: pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis / S. Bek [et al.] // *The Pharmacogenomics Journal.* — 2017. — Vol. 17. — P. 403–411.
24. Бабич, П.Н. Применение современных статистических методов в практике кли-

- нических исследований / П.Н. Бабич, А.В. Чубенко, С.Н. Лапач // Украинский медицинский часопис. — 2005. — №2(46). — С.113–119.
25. Oberle, E.J. Polyarticular juvenile idiopathic arthritis - epidemiology and management approaches / E.J. Oberle, J.G. Harris, J.W. Verbsky // Clin. Epidemiol. — 2014. — Vol. 6. — P. 379–393.
26. Заваденко, Н.Н. Клинические проявления и лечение синдрома вегетативной дисфункции у детей и подростков / Н.Н. Заваденко, Ю.Е. Нестеровский // Педиатрия. — 2012. — Т. 91, № 2 (доступ на сайте <http://medi.ru/doc/a1501118.htm>).
27. Waalkes, R. Varicocele in adolescents: a review and guideline for the daily practice / R. Waalkes, I.F. Manea, J.M. Nijman // Arch. Esp. Urol. — 2012. — Vol. 65, № 10. — P. 859–871
28. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001 / R.E. Petty [et al.] // J. Rheumatol. — 2004. — Vol. 31, № 2. — P. 390–392.
29. Алексеева, Е.И. Ювенильный артрит: возможности медикаментозного и немедикаментозного лечения на современном этапе / Е.И. Алексеева, Т.М. Бзарова // Лечащий Врач: научно-практический журнал. — М., 2011. — № 8. — С. 84–89 (доступ на сайте <http://www.lvrach.ru/2011/08/15435267>).
30. Oen, K. Epidemiology of juvenile rheumatoid arthritis in Manitoba, Canada, 1975–92: cycles in incidence / K. Oen, M. Fast, B. Postl // J. Rheumatol. — 1995. — Vol. 22, № 4. — P. 745–750.
31. Incidence and prevalence of juvenile idiopathic arthritis in Catalonia (Spain) / C. Modesto [et al.] // Scand. J. Rheumatol. — 2010. — Vol. 39, № 6. — P. 472–479.
32. Merino, R. Evaluation of ILAR classification criteria for juvenile idiopathic arthritis in Spanish children / R. Merino, J. De Inocencio, J. Garcia-Consuegra // J. Rheumatol. — 2001. — Vol. 28, № 12. — P. 2731–2736.
33. Prevalence and distribution of juvenile idiopathic arthritis in a region of Western France / E. Solau-Gervais [et al.] // Joint Bone Spine. — 2010. — Vol. 77, № 1. — P. 47–49.
34. Overlap of disease susceptibility loci for rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis / A. Hinks [et al.] // Ann. Rheum. Dis. — 2010. — Vol. 69, № 9. — P. 1049–1053.
35. Association of STAT4 with rheumatoid arthritis: A replication study in three European populations / G. Orozco [et al.] // Arthritis Rheum. — 2008. — Vol. 58, № 7. — P. 1974–1980.
36. Polymorphisms in STAT-4, IL-10, PSORS1C1, PTPN2 and MIR146A genes are associated differently with prognostic factors in Italian patients affected by rheumatoid arthritis / C. Ciccacc [et al.] // Clinical and Experimental Immunology. — 2016. — doi:10.1111/cei.12831.
37. STAT4 rs7574865 G/T and PTPN22 rs2488457 G/C polymorphisms influence the risk of developing juvenile idiopathic arthritis in Han Chinese patients / Z.-D. Fan [et al.] // PLoS One. — 2015. — Vol. 10:3.
38. Association of STAT4 with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Japanese population / S. Kaboyashi [et al.] // Arthritis Rheum. — 2008. — Vol. 58, № 7. — P. 1940–1946.
39. Association of STAT4 with rheumatoid arthritis in the Korean population / H.-S. Lee [et al.] // Mol. Med. — 2007. — № 9–10. — P. 455–460.
40. No evidence for allelic association of a human CTLA-4 promoter polymorphism with autoimmune thyroid disease in either population-based case-control or family-based studies / J.M. Heward [et al.] // Clin. Endocrinol. (Oxf). — 1998. — Vol. 49, № 3. — P. 331–334.
41. Association of -318 C/T and +49 A/G cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms with a clinical subset of Italian patients with systemic sclerosis / G. Balbi [et al.] // Clin. Exp. Immunol. — 2007. — Vol. 149, № 1. — P. 40–47.
42. Influence of CTLA-4/CD28/ICOS gene polymorphisms on the susceptibility to cervical squamous cell carcinoma and stage of differentiation in the Polish population / E. Pawlak [et al.] // Hum. Immunol. — 2010. — Vol. 71, № 2. — P. 195–200.
43. Independent replication analysis of genetic loci with previous evidence of association with juvenile idiopathic arthritis / J.A. Ellis [et al.] // Pediatric Rheumatology. — 2013. — Vol. 11:12.
44. Investigation of juvenile idiopathic arthritis susceptibility loci: Results from a Greek popula-

tion / D.G. Gimopoulou [et al.] // Human Immunology. — 2013. — Vol. 74, № 9. — P. 1194–1198.

45. An updated meta-analysis of the signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) rs7574865 G/T polymorphism and rheumatoid arthritis risk in an Asian population / X. Jiang [et al.] // Scand. J. Rheumatol. — 2014. — Vol. 43, № 6. — P. 477–480.

46. Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis / B. Milterski [et al.] // BMC Genetics. — 2004. — Vol. 5, № 2. — doi: 10.1186/1471-2156-5-2.

47. Lack of association of functional CTLA4 polymorphisms with juvenile idiopathic arthritis / S. Prahalad [et al.] // Arthritis Rheum. — 2008. — Vol. 58, № 7. — P. 2147–2152.

48. Study of the association between CD28/CTLA-4 expression and disease activity in juvenile idiopathic arthritis / L. Zhang [et al.] // Experimental and Therapeutic Medicine. — 2015. — Vol. 9, № 5. — P. 1733–1738.

49. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis / R. Donn [et al.] // Arthritis Rheum. — 2002. — Vol. 46. — P. 2402–2409.

50. Contribution of the -173 G/C polymorphism of macrophage migration inhibitory factor gene to the risk of inflammatory bowel diseases / K. Przybylowska [et al.] // Pol. Przegl. Chir. — 2011. — Vol. 83. — P. 76–80.

51. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis / J.A. Baugh [et al.] // Genes and Immunity. — 2002. — Vol. 3. — P. 170–176.

52. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): genetic evidence for participation in early onset and early stage rheumatoid arthritis / M.A. Llamas-Covarrubias [et al.] // Cytokine. — 2013. — Vol. 61. — P. 759–765.

53. Macrophage migration inhibitory factor: Association of -794 CATT and -173 G>C polymorphisms with TNF- in systemic lupus erythematosus / U. De la Cruz-Mosso [et al.] // Hum. Immunol. — 2014. — Vol. 75, № 5. — P. 433–439.

54. Роль фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, в хронизации патологического процесса (обзор литературы) / А.С. Водопьянов [и др.] // Медицинский вестник юга России. — 2013. — №3. — С. 4–7.

N.V. Savina<sup>1</sup>, H.A. Yatskiu<sup>1</sup>, N.V. Nikitchenko<sup>1</sup>, T.D. Kuzhir<sup>1</sup>, E.V. Sechko<sup>2</sup>, A.M. Tchitchko<sup>2</sup>,  
A.V. Sukalo<sup>2</sup>, R.I. Goncharova<sup>1</sup>

## **POLYMORPHISM OF A SET OF GENES INVOLVED IN IMMUNE AND INFLAMMATORY RESPONSES AS A PREDISPOSING FACTOR FOR JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS**

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the NAS of Belarus

Minsk BY-220072, Republic of Belarus

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

Minsk, BY-220116, Republic of Belarus,

The results of comparison between groups of patients with diagnosed juvenile idiopathic arthritis (JIA) and children without joint pathology with respect to clinical and demographic traits as well as the distribution of genotype/allele frequencies in five polymorphic loci controlling the inflammatory and immune responses are presented herein. It was established that girls prevailed among patients with JIA (70%), and oligoarthritis is the most common subtype of the disease (66%). Polymorphism of *TRAF1/C5* and *STAT4* genes was shown to contribute to JIA predisposition in the Belarusian population. The frequency of GG genotype in the rs3761847 locus (*TRAF1/C5*) was significantly increased in the total sample of JIA patients as compared to the control group. Besides, the G minor allele increased the chance of developing of a severe disease subtype — systemic arthritis. Polymorphism of the *STAT4* gene (rs7574865) oppositely affected different subtypes of JIA, the minor T allele protecting against oligoarthritis and increasing the risk of seronegative polyarthritis. Findings indicate specific molecular mechanisms of pathogenesis of different JIA subtypes.

**Key words:** juvenile idiopathic arthritis, immune and inflammatory responses, gene polymorphism.

*Дата поступления статьи: 20 февраля 2018 г.*

## МОДИФИКАЦИЯ ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ *PECTOBACTERIUM ATROSEPTICUM* КОНЬЮГАТИВНОЙ ПЛАЗМИДОЙ PPA21A

Белорусский государственный университет  
Республика Беларусь, 220045, г. Минск, ул. Курчатова 10

Криптическая плаزمида pPA21A *Pectobacterium atrosepticum* 21A является важным компонентом генома, нетипичным для представителей этого вида. Наиболее значимыми из обнаруженных генетических детерминант плазмиды являются *vir*-кластер, гены, кодирующие фосфолипазу D, H-NS-подобный и сиртуин-подобный белки. Для плазмиды также показан конъюгативный перенос (частота от  $2,1 \times 10^{-4}$  до  $6,5 \times 10^{-5}$ ). Показано влияние индукции SOS-ответа на частоту переноса плазмиды и влияние исследуемой плазмиды на вирулентность несущих ее бактерий.

**Ключевые слова:** плазмида, вирулентность, конъюгация, реакция гиперчувствительности.

### Введение

*Pectobacterium* spp. являются повсеместно распространенными энтеробактериальными фитопатогенами, поражающими широкий круг растений. Это довольно разнообразная группа бактерий с окончательной неустоявшейся классификацией, что во многом определяется различиями между штаммами, выделенными из разных растений-хозяев. Как правило, конкретный штамм пектобактерий способен успешно заражать лишь ограниченный круг растений-хозяев, а попытка заражения большинства растений приводит к развитию реакции сверхчувствительности, ограничивающей распространение патогена.

Среди штаммов пектобактерий можно выделить достаточно однородную группу специализированных патогенов картофеля, классифицируемых как *P. atrosepticum*. В литературе не описаны случаи выделения штаммов этого вида из растений, отличных от картофеля. Попытки искусственного заражения штаммами *P. atrosepticum* других растений обычно приводят к развитию реакции сверхчувствительности, однако, по нашим наблюдениям, для растений табака *Nicotiana tabacum* большинство штаммов *P. atrosepticum* являются относительно слабыми индукторами реакции сверхчувствительности. Исключением является выделенный в Беларуси штамм *P. atrosepticum* 21A, способный индуцировать у *N. tabacum* эту реакцию при использовании более низких плотностей клеточных суспензий. Поскольку в на-

стоящее время доступны полные геномные последовательности для нескольких штаммов *P. atrosepticum*, в том числе и для штамма 21A [1], мы попытались с помощью сравнительного геномного анализа выявить локусы, которые могут быть ответственными за особенности вирулентных свойств *P. atrosepticum* 21A.

Геномы пектобактерий имеют сходную структуру, представленную в большинстве случаев единственной кольцевой хромосомой размером около 5 млн н. п. Лишь некоторые штаммы пектобактерий содержат плазмиды, причем роль этих плазмид в физиологии пектобактерий в большинстве случаев не показана [2]. В частности, на сегодняшний день экспериментально не показана связь ни одной из плазмид пектобактерий, выявленных в более чем 50 геномных проектах, с вирулентными свойствами несущих их штаммов, хотя классические примеры плазмид фитопатогенных бактерий, абсолютно необходимых для заражения их носителями растений, хорошо известны [3–5]. Тем интереснее оказалось выявление в клетках штамма *P. atrosepticum* 21A крупной (32 444 н. п.) плазмиды. Поскольку хромосомные последовательности разных штаммов *P. atrosepticum* имеют минимальные отличия, представляется обоснованным предположение о том, что именно уникальная плазмида обеспечивает особенности реакции растений *N. tabacum* на контакт с клетками штамма 21A. Проверка этого предположения и являлась ос-



новой целью настоящей работы. Исследование взаимодействий фитопатогенов и их хозяев представляется важной областью фундаментальных исследований биологии растений. Подобные исследования на данном этапе имеют тенденцию фокусироваться в большей степени на одном из участников процесса: хозяине или патогене. Варьирует и степень внимания к ответным реакциям второго участника, их регистрации и последующем анализе.

### Материалы и методы

При проведении скрещиваний в качестве донора использовали *Escherichia coli* (штаммы XL-1 Blue, J62) или *Pectobacterium atrosepticum* (штамм 36А), несущую плазмиду рРА21А с геном гентамицинустойчивости. В качестве реципиентов в различных скрещиваниях использовали штаммы *E. coli* J62, *P. atrosepticum* (штамм SCRI1043, 36А). Характеристики использовавшихся в работе штаммов приведены в табл. 1.

Культуры выращивались в среде LB (триптон — 8 г/л, дрожжевой экстракт — 5 г/л, NaCl — 10 г/л) при 28° С (для штаммов *P. atrosepticum*) или 37° С (для штаммов *E. coli*). Также в работе были использованы селективные среды (минимальная среда: глюкоза — 10 г/л, NH<sub>4</sub>Cl — 2 г/л, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> — 0,4 г/л, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 10H<sub>2</sub>O — 0,8 г/л, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O — 1,57 г/л, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O — 0,56 г/л, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 0,04 г/л) с добавлениями антибиотиков (гентамицин, налидиксовая кислота, ампициллин, стрептомицин). Для получения твердых сред использовали бактериологический агар (15 г/л).

Скрещивание проводили на твердой среде LB. Смешивали свежие суточные культуры донора и реципиента в соотношении 1:1 и 50 мкл смеси переносили на стерильные фильтры (Владисарт, Ø ≈ 1 см), помещенные на поверхность среды. После инкубирования чашек при 37° С или 28° С в течение суток бактерии смывали физиологическим раствором (NaCl — 8,5 г/л). Для отбора трансконъюгантов полученную суспензию и ее последовательные разведения высевали на селективную среду LB с гентамицином.

Идентификацию плазмид осуществляли рестрикционным анализом после выделения по модифицированной методике (добавлением в нейтрализующие буферы РНКазы А, обработкой протеиназой К и последующей фенольной экстракцией с добавлением стадии с фенолом) щелочного [6] лизиса (для *P. atrosepticum*) или по стандартной методике (для *E. coli*).

Индукция SOS-ответа проводилась инкубацией клеток донора в жидкой питательной среде с аэрацией в течение 2-х часов при концентрации митомицина С 1 мкг/мл. Индукция SOS-ответа контролировалась по образованию филаментов клетками (окраска препарата водным фуксином).

Заражение растений осуществлялось методом инфильтрации бактериальных суспензий в листья растений *Nicotiana tabacum* линии Navana petit SR1. Плотности всех суспензий были приведены к OD<sub>600</sub> = 6 (суспензии меньшей плотности не индуцировали реакцию гиперчувствительности у этих растений).

Таблица 1

Штаммы, использованные в работе

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Происхождение
<i>Escherichia coli</i> XL-1	F <sup>-</sup> <i>proAB lacIq lacZ</i> .. M15 Tn10(Tetr)/ <i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96(Nal<sup>r</sup>) thi-1 hsdR17(r-k m+k)</i> <i>supE44 relA1 lac</i>	Коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
<i>Escherichia coli</i> J62	<i>strr F- lac pro his trp</i>	Коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> 21А	Природный изолят	Евтушенков А.Н.
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> 36А	Природный изолят	Евтушенков А.Н.
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043	Природный изолят	Scottish Crop Research Institute



Оценка результата производилась через 2 дня в соответствии с 5-балльной шкалой.

Растения табака культивировались при 20° С и 16-часовом освещении.

В ходе компьютерного анализа плазмиды использовались следующие программные пакеты: BLAST [7] (в частности blastn и blastp), Progressive Mauve (версия snapshot\_2015-02-13 build 0) [8], SigoID (2.0.0 build 234) [9], SQ (версия 2.0.0 beta 1 сборка 344) [10], Effective DB [11], базы данных GenBank, Swissprot и CDD [12–14]. Показатель средней нуклеотидной идентичности (ANI) рассчитывался с помощью сервиса JSpeciesWS [15].

### Результаты и обсуждение

Зачастую именно плазмиды штаммов определяют хозяйственно значимые свойства бактерий их содержащих, как, например, способность к деградации определенных классов веществ, детерминанты резистентности к антибиотикам, вирулентные и патогенные свойства бактерий. Предметом данного исследования является плазида, относимая нами к последней группе. Она резко отличается исследуемый штамм *P. atrosepticum* 21A от других штаммов вида *P. atrosepticum*. В целом для вида, особенно для штаммов происходящих из Беларуси, нетипично наличие плазмид, особенно таких крупных, как описанная в данном исследовании (32 444 н. п.) [2]. Кроме того, этот штамм обладает еще одним свойством, выделяющим его из группы близких штаммов: при инокуляции суспензии клеток *P. atrosepticum* 21A у растений табака развивается хорошо выраженная реакция гиперчувствительности. При инокуляции близкого исследуемому бесплазмидного штамма SCRI1043 (сходство нуклеотидной последовательности хромосом порядка 98%) подобная реакция не наблюдается. Кроме того, штамм 21A обладает значительно более выраженными вирулентными свойствами в отношении клубней картофеля в сравнении со сходным с ним штаммом *P. atrosepticum* 36A (для штамма *P. atrosepticum* SCRI1043 подобные исследования пока не проводились). Основываясь на этих наблюдениях, мы предположили, что данные отличия вирулентных свойств исследуемого штамма связаны именно с его плазмидой pPA21A.

Для планирования дальнейших экспериментов мы провели биоинформатический анализ имеющейся нуклеотидной последовательности плазмиды. Присутствующая в базе данных последовательность pPA21A аннотирована с использованием автоматического конвейера Prokka [16] и является малоинформативной. Во избежание ошибок при дальнейших манипуляциях с плазмидой в начале работы был выполнен тщательный анализ аннотации плазмиды с коррекцией ошибок и неточностей.

В первую очередь нами был проведен поиск сходных нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank с помощью программы Nucleotide BLAST [7]. В результате было обнаружено сходство с плазмидой p29930 *Yersinia enterocolitica* [17] и плазмидоподобным элементом в хромосоме штамма *P. atrosepticum* SCRI104 [18]. Обнаруженные сходные с pPA21A последовательности сравнивали друг с другом с помощью программы Mauve [8]. На рис. 1 представлены результаты выравнивания плазмид pPA21A, p29930 и плазмидоподобного элемента, интегрированного в хромосому штамма SCRI1043 *P. atrosepticum* (хромосомные координаты 1857204–1877617).

Как можно видеть, сходство генов, кодирующих систему секреции IV типа плазмиды у pPA21A, p29930 и плазмидоподобного элемента в хромосоме *P. atrosepticum* SCRI1043, прослеживается достаточно четко (зеленый цвет). Кроме того, у плазмид pPA21A и p29930 имеется еще один участок сходства — ген *res* pPA21A и неохарактеризованный белок *orf6* p29930 (красный цвет), отсутствующий в хромосоме *P. atrosepticum* SCRI1043 [18]. Сходство с плазмидой p29930 *Yersinia enterocolitica* интересно еще и тем, что для рода *Yersinia* показан вклад плазмид в вирулентность. Сходство же с интегрированным плазмидоподобным элементом в хромосоме SCRI1043 не менее любопытно и позволяет сделать предположение о том, что фенотипическое различие в реакции гиперчувствительности, вызываемой этими бактериями, обусловлено в первую очередь уникальными частями плазмиды, не имеющими сходства с плазмидоподобным элементом в хромосоме SCRI1043.

Далее был проведен сравнительный анализ предполагаемых продуктов генов плазмиды с уже аннотированными нуклеотидными по-

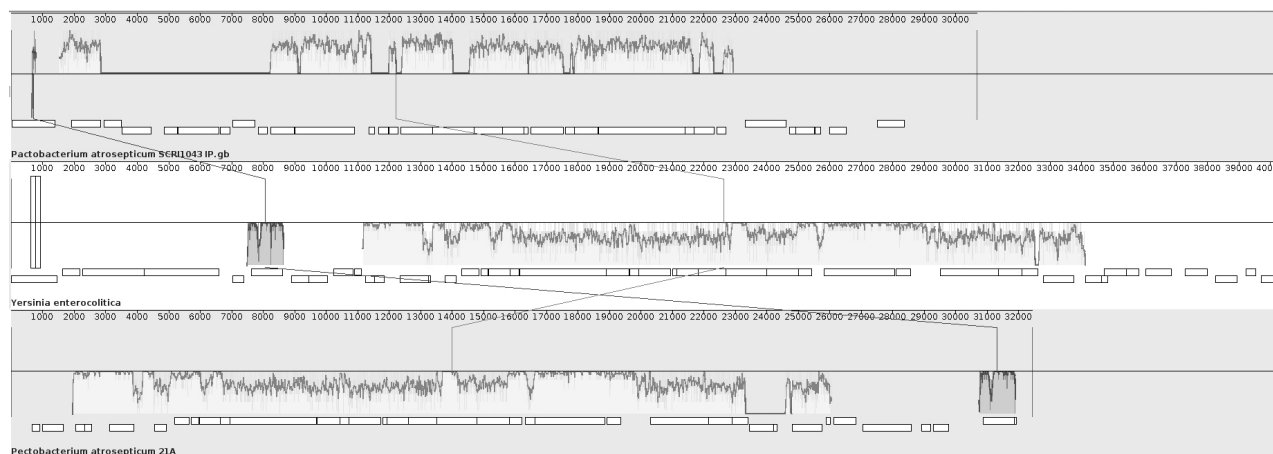


Рис. 1. Результат проведения сравнительного анализа плазмидоподобного элемента хромосомы *P. atrosepticum* SCR1043, плазмиды p29930 *Yersinia enterocolitica* и плазмиды pPA21A *Pectobacterium atrosepticum* 21A

следовательностями. Для этого использовался геномный браузер Sigmoid [9]. В качестве эталонных использовались последовательности, хранящиеся в базах данных GenBank, SwissProt и CDD [12–14]. В результате анализа составлена отредактированная аннотация, которая и использовалась в данной работе для планирования экспериментов.

Наиболее важными, на наш взгляд, из обнаруженных генетических детерминант можно считать следующие:

1. В первую очередь обращает на себя внимание *vir*-область плазмиды, весьма сходная с таковой плазмиды *Y. enterocolitica* p29930 [17]. Идентичность областей плазмид pPA21A и p29930 составляет 70%. Данная область имеет в своем составе 12 генов (*virB1–virB11* и *eex*, координаты кластера 5968–15828). Гомология между белками *vir*-области pPA21A и *tri*-области p29930 *Y. enterocolitica* достаточно высока. Сходны между собой как сами белки, так и порядок расположения на плазмидах. Кроме того, продукты генов *vir*-области сходны с таковыми системы секреции IV типа Ti-плазмид *A. tumefaciens*. Наличие в pPA21A достаточных для построения функциональной системы секреции IV типа генов позволяет предположить ее участие или в секреции факторов вирулентности, или в конъюгационном процессе. Это предположение подкрепляется данными по сходной плазмиде p29930 *Yersinia enterocolitica*, для которой показан конъюгативный перенос [17].

2. Интересен и H-NS-подобный белок. Сходные с обнаруженной на исследуемой плазми-

де генетические детерминанты встречаются у многих плазмид, влияющих на патогенность бактерий, [17]. Такие плазмиды часто кодируют белки, ассоциированные с нуклеоидом бактерий или их гомологи [19].

3. Следует отметить и рамку считывания, названную *pld*, продукт которой схож с фосфолипазой D. Этот белок (фосфолипаза D) может быть связан с реакцией гиперчувствительности [20]. Предполагается, что участие фосфолипазы D в реакции растений на контакт с патогеном может быть связано с тем, что реакция гиперчувствительности у резуховидки Таля на белки *Pseudomonas syringae* AvrRpm1 и AvrRpt2 индуцируется фосфатидной кислотой, являющейся продуктом расщепления клеточных липидов фосфолипазой D. При прямом введении фосфатидной кислоты в листья индуцируется защитная реакция растения и возникает проявление гиперчувствительности [21, 22]. Возможно, кодируемая плазмидой pPA21A фосфолипаза D проявляет себя как один из факторов запуска реакции гиперчувствительности в листьях *Nicotiana tabacum*. Для некротрофного патогена *P. atrosepticum* отмершие клетки могут являться субстратом. Косвенным свидетельством участия фосфолипазы D в индукции реакции гиперчувствительности может являться еще и то, что этот белок (именно у *Pectobacterium atrosepticum* 21A) имеет в своем составе сигнал системы секреции II типа, что говорит о возможности ее секреции за пределы бактериальной клетки.

4. Не менее интересной является и рамка считывания, названная *sir2*, которая кодирует

сиртуин-подобный белок. Данный белок схож с сиртуинами класса II, главным образом присутствующими в цитоплазме. Однако они также могут транспортироваться в ядро [23]. Сиртуины обнаружены и у представителей семейства пасленовых — томатах, картошке и табаке [24–27]. Функция сиртуинов в растениях все еще плохо изучена, хотя, являясь деацетилазами гистонов, они участвуют в глобальной регуляции транскрипции. Кроме того, сиртуины участвуют в развитии реакции гиперчувствительности и клеточной смерти у растений [27].

5. Кроме того, были обнаружены сайты связывания транскрипционных регуляторов LexA и FNR. Данные глобальные регуляторы метаболизма клетки включают плазмиду в общий ансамбль генома клетки.

Для удобства дальнейшей работы изначально криптоическая плаزمиды рРА21А была маркирована геном гентамицинустойчивости плазмиды рJQ200mp19 [28], что позволило контролировать ее наличие в клетках. Карта полученной конструкции приведена на рис. 2.

Дальнейшая работа проводилась с использованием этого производного плазмиды (скрещивания, проверка реакции гиперчувствительности).

В результате экспериментов удалось установить, что частота переноса в внутривидовом (*E. coli*) скрещивании составила  $2,1 \times 10^{-4}$  на клетку донора, частота переноса в межродо-

вом (*E. coli* и *P. atrosepticum*) скрещивании —  $6,5 \times 10^{-5}$ .

Поскольку один из сайтов связывания транскрипционного регулятора LexA находится перед *vir*-кластером, мы предположили, что индукция SOS-ответа у донора может увеличивать частоту конъюгативного переноса плазмиды. При проверке этой гипотезы мы выяснили, что при внутривидовом скрещивании *E. coli* частота переноса возрастала с  $3,7 \times 10^{-4}$  (при нормальных условиях культивирования донора) до  $2,8 \times 10^{-3}$  (при индукции у донора SOS-ответа митомицином С).

Для проверки влияния плазмиды рРА21А на вирулентность несущих ее бактерий было проведено заражение растений табака различными штаммами *P. atrosepticum*: бесплазмидным SCRI1043, клоном SCRI1043, содержащими плазмиду рРА21А::Gm, и штаммами 21А. На рис. 3 представлена фотография типичного фенотипического проявления реакции.

Можно ясно видеть, что версии штамма SCRI1043, несущие плазмиду рРА21А, вызывают более выраженную реакцию гиперчувствительности, чем тот же штамм, не несущий плазмиду. Тем не менее, реакция, вызываемая штаммом 21А, безусловно, более выражена. Это, предположительно, можно объяснить тем, что плазмиды рРА21А находится под контролем регуляторной системы клетки и функционирует в ней в составе единого ансамбля генома бактерии.

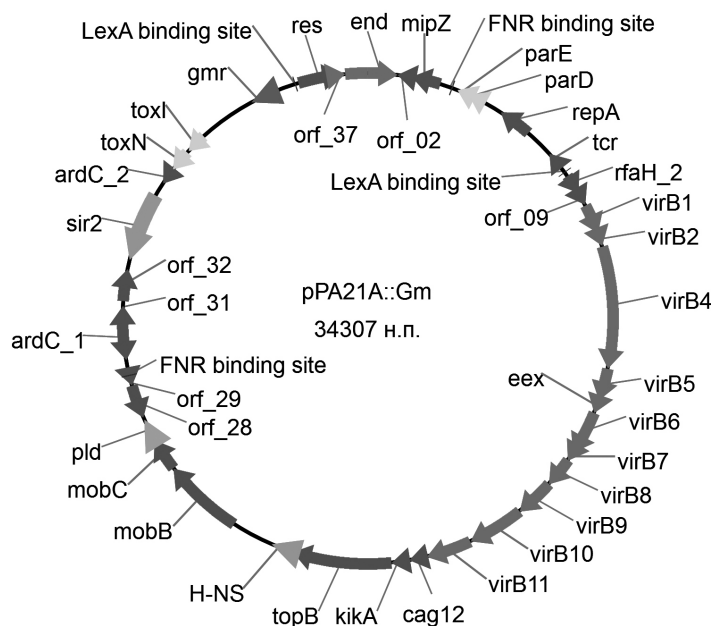


Рис. 2. Карта плазмиды рРА21А::Gm



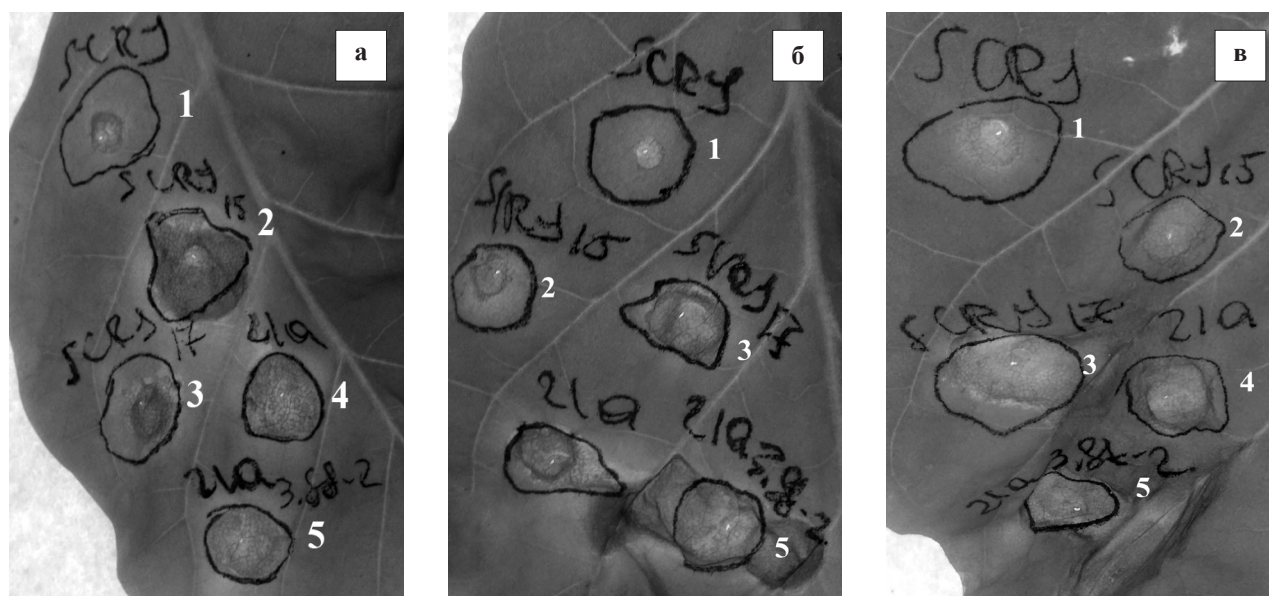


Рис. 3. Результаты заражения табака *P. atrosepticum*: 1 — бесплазмидный штамм SCR1043; 2, 3 — клоны SCR1043, содержащие pPA21A::Gm; 4, 5 — клоны 21A

### Заклучение

Таким образом, исходя из данных, полученных в ходе проделанной работы, можно сделать следующие выводы:

1. Плазмида pPA21A::Gm способна к конъюгативному переносу с частотой от  $6,5 \times 10^{-5}$  до  $2,1 \times 10^{-4}$ .

2. Индукция SOS-ответа увеличивает частоту конъюгативного переноса плазмиды.

3. Плазмида pPA21A связана с вирулентностью несущих ее бактерий. Она усиливает фенотипическое проявление реакции гиперчувствительности у несущих ее клонов по сравнению с бесплазмидными вариантами того же штамма *P. atrosepticum*.

### Список использованных источников

1. Genome Sequence of *Pectobacterium atrosepticum* Strain 21A / Y. Nikolaichik [et al.] // *Genome Announcements*. — 2014. — Vol. 2, № 5. — P. e00935-14-e00935-14.

2. Сергеева, Ж.Ю. Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora* / Ж.Ю. Сергеева, Ф.И. Товкач // *Доповіді Національної академії наук України*. — 2008. — № 12. — С. 149–153.

3. Vergunst A.C. VirB/D4-Dependent Protein Translocation from *Agrobacterium* into Plant Cells / A.C. Vergunst // *Science*. — 2000. — Vol. 290, № 5493. — P. 979–982.

4. Distribution and Replication of the Patho-

genicity Plasmid pPATH in Diverse Populations of the Gall-Forming Bacterium *Pantoea agglomerans* / D.M. Weinthal [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2007. — Vol. 73, № 23. — P. 7552–7561.

5. Stachel, S.E. VirA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens* / S.E. Stachel, P.C. Zambryski // *Cell*. — 1986. — Vol. 46, № 3. — P. 325–333.

6. Евтушенко, А.Н. Генетическая инженерия. Методические рекомендации к лабораторным занятиям / А.Н. Евтушенко, Е.А. Николайчик. — Минск, 2003.

7. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. — 1990. — Vol. 215, № 3. — P. 403–410.

8. Darling, A.C.E. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence with Rearrangements / A.C.E. Darling // *Genome Research*. — 2004. — Vol. 14, № 7. — P. 1394–1403.

9. Nikolaichik, Y. SigmaID: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals / Y. Nikolaichik, A.U. Damienikan // *PeerJ*. — 2016. — Vol. 4. — P. e2056.

10. Николайчик, Е.А. SQ — компьютерная программа для редактирования и анализа биологических последовательностей / Е.А. Николайчик, Л.Н. Валентович // *Труды БГУ*. — 2010. — Т. 5, № 1. — С. 154–162.

11. EffectiveDB — updates and novel features for a better annotation of bacterial secreted proteins and Type III, IV, VI secretion systems / V. Eichinger [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — Vol. 44, № D1. — P. D669–D674.
12. Bairoch, A. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000 / A. Bairoch, R. Apweiler // *Nucleic Acids Research*. — 2000. — Vol. 28, № 1. — P. 45–48.
13. CDD: NCBI's conserved domain database / A. Marchler-Bauer [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2015. — Vol. 43, № D1. — P. D222–D226.
14. GenBank / D.A. Benson [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2013. — Vol. 41, № D1. — P. D36–D42.
15. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison / M. Richter [et al.] // *Bioinformatics*. — 2016. — Vol. 32, № 6. — P. 929–931.
16. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation / T. Seemann // *Bioinformatics*. — 2014. — Vol. 30, № 14. — P. 2068–2069.
17. Strauch, E. A cryptic plasmid of *Yersinia enterocolitica* encodes a conjugative transfer system related to the regions of CloDF13 Mob and IncX Pil / E. Strauch // *Microbiology*. — 2003. — Vol. 149, № 10. — P. 2829–2845.
18. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors / K.S. Bell [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2004. — Vol. 101, № 30. — P. 11 105–1110.
19. Distribution of Genes Encoding Nucleoid-Associated Protein Homologs in Plasmids / T. Takeda [et al.] // *International Journal of Evolutionary Biology*. — 2011. — Vol. 2011. — P. 1–30.
20. Wang, X. Plant phospholipases / X. Wang // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. — 2001. — Vol. 52, № 1. — P. 211–231.
21. Park, J. Phosphatidic Acid Induces Leaf Cell Death in Arabidopsis by Activating the Rho-Related Small G Protein GTPase-Mediated Pathway of Reactive Oxygen Species Generation / J. Park // *Plant Physiology*. — 2004. — Vol. 134, № 1. — P. 129–136.
22. Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana* / M.X. Andersson [et al.] // *The Plant Journal*. — 2006. — Vol. 47, № 6. — P. 947–959.
23. The role of sirtuins in cellular homeostasis / W. Kupis [et al.] // *Journal of Physiology and Biochemistry*. — 2016. — Vol. 72, № 3. — P. 371–380.
24. Identification and characterization of histone deacetylases in tomato (*Solanum lycopersicum*) / L. Zhao [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. — 2015. — Vol. 5.
25. Fertilization induces strong accumulation of a histone deacetylase (HD2) and of other chromatin-remodeling proteins in restricted areas of the ovules / M. Lagacé [et al.] // *Plant Molecular Biology*. — 2003. — Vol. 53, № 6. — P. 759–769.
26. Genome-wide analysis of histone modifiers in tomato: gaining an insight into their developmental roles / R. Aiese Cigliano [et al.] // *BMC Genomics*. — 2013. — Vol. 14, № 1. — P. 57.
27. Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants / S. Bourque [et al.] // *New Phytologist*. — 2011. — Vol. 192, № 1. — P. 127–139.
28. Quandt, J. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria / J. Quandt, M.F. Hynes // *Gene*. — 1993. — Vol. 127, № 1. — P. 15–21.

Y.V. Diubo, Y.A. Nikolaichik

**MODIFICATION OF VIRULENT PROPERTIES  
OF *PECTOBACTERIUM ATROSEPTICUM* BY CONJUGATIVE  
PLASMID PPA21A**

Belarusian State University  
Minsk BY-220045, the Republic of Belarus

Cryptic plasmid pPA21A *Pectobacterium atrosepticum* 21A is an important component of the genome atypical for representatives of this species. The most significant plasmid's genetic determinants are *vir*-cluster, coding genes of phospholipase D, H-NS-like & SIR-like proteins. We show conjugative transfer of this plasmid (from  $2,1 \times 10^{-4}$  to  $6,5 \times 10^{-5}$  per donor cell). We show that activation of SOS-response has influence on the rate of the conjugative transfer. The plasmid also influences the virulence of bacteria carrying it.

**Key words:** plasmid, virulence, conjugation, hypersensitive reaction.

*Дата поступления статьи: 1 сентября 2017 г.*



М.А. Сасинович<sup>1</sup>, А.М. Слуквин<sup>1</sup>, А.В. Алехнович<sup>2</sup>

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ ДЛИННОПАЛОГО РАКА (*ASTACUS LEPTODACTYLUS* ESCH.) В ОЗЕРАХ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ

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

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

e-mail: marina.sasinovich@yandex.ru; A.Slukvin@igc.by

<sup>2</sup>ГНПО «Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам»

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

e-mail: alekhnovichav@gmail.com

В статье рассматриваются результаты исследования видовой идентификации и генетического полиморфизма по двум митохондриальным генам в популяциях длиннопалого рака в озерах Соминское (Ивацевичский район, Брестской области) и Олтуш (Малоритского района, Брестской области). При оценке видовой принадлежности раков по гену *COI* мтДНК было установлено, что в обоих озерах обитает вид десятиногих раков — длиннопалый рак (*Astacus leptodactylus* Esch.) с вероятностью 99%. Показано, что в целом ген *COI* характеризуется достаточно низкой внутривидовой генетической вариабельностью. Установлено, что у раков из озера Олтуш она была в 1,44 раза ниже, чем у раков из озера Соминское (1,42% и 2,03%, соответственно). Относительно генетической вариабельности гена 16s рРНК был установлен очень высокий уровень полиморфизма в популяциях раков для обоих озер (25,6% для озера Соминское и 60,1% для озера Олтуш), что характерно для генов митохондриального генома среди гидробионтов при отборе на адаптацию к экстремальным условиям среды обитания.

**Ключевые слова:** длиннопалый рак, генетический полиморфизм, ген *COI*, ген 16s рРНК.

### Введение

Изучение генетического полиморфизма у десятиногих раков имеет важное теоретическое и практическое значение, как для оценки биологического разнообразия в популяциях десятиногих раков, определения видового состава, обнаружения гибридных особей, оценки устойчивости раков к болезням, так и для разработки мероприятий по сохранению вида и увеличению промысловых запасов длиннопалого рака в водоемах Беларуси [1].

Анализ литературы по генетическим исследованиям у длиннопалых раков показал, что при проведении работ, основанных на электрофорезе белков, были установлены низкие уровни вариаций в популяциях пресноводных раков [2, 3]. Ранее для проведения генетических исследований у десятиногих использовался RAPD-PCR-анализ, однако результаты такого анализа оказались малоинформативными при оценке генетической гетерогенности в популяциях раков [4–6]. В течение последнего десятилетия были разработаны новые молекулярные

методы, которые позволили обнаружить более высокую степень генетической изменчивости в популяциях пресноводных раков. В большинстве работ генетическая дифференциация популяций раков была оценена с использованием митохондриальной ДНК. Преимущества мтДНК как инструмента в генетических исследованиях популяций широко рассмотрены в литературе [8]. Так, было установлено, что в связи с материнским режимом наследования мтДНК, ее широко используют для исследования генетических различий и эволюционной истории между видами и внутри видов. Важным также является тот факт, что мтДНК способна сохранять историю прошлых изоляций, даже в случае современного привнесения чужеродных групп. Доказано, что мтДНК оказалась превосходным инструментом для изучения популяционной генетики животных, выше или ниже видового уровня [8]. Ряд исследователей считает, что в будущем мтДНК может помочь в определении таксономического своеобразия отдельных групп раков,

расставить приоритеты при реализации программ по сохранению видовой разнообразия [9]. В последнее время мтДНК стали использовать как генетический маркер, способный идентифицировать видовую и популяционную принадлежность изучаемых гидробионтов [10–17]. Польскими учеными было установлено, что для изучения генетической структуры в популяциях десятиногих раков наиболее информативными являются фрагменты генов мтДНК *COI* (680 п. н.) и 16S рРНК (530 п. н.) [18, 19].

Таким образом, для изучения генетического полиморфизма в популяциях длиннопалого рака в водоемах Брестской области были выбраны последовательности митохондриальной ДНК, а именно, фрагменты гена мтДНК *COI* (680 п. н.) и 16S рРНК (530 п. н.), которые являются наиболее информативными при проведении таких исследований.

Цель работы — оценка возможности использования двух митохондриальных генов (*COI* и 16S рРНК) для проведения работ по видовой идентификации и изучению генетического полиморфизма в популяциях длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.), обитающих в водоемах Брестской области.

### Материалы и методы

Для генетических исследований прижизненным способом отобраны пробы у длиннопалого рака из наиболее ракопродуктивных озер Брестской области: Олтуш (Малоритский рай-

он) — 16 проб; Соминское (Ивацевичский район) — 15 проб. Биологический материал отбирали у взрослых особей, помещали с помощью стерильного пинцета в небольшие по объему (1,5 мл) пробирки типа Эппендорф и заливали 96%-ным этанолом. Для выделения ДНК использовался стандартный фенол-хлороформный метод выделения ДНК у десятиногих раков [7, 19]. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли на спектрофотометре IMPLEN spectrophotometer Nanogram (Германия). Спектрофотометрический анализ степени загрязнения полученных препаратов ДНК белками проводился на основе соотношения коэффициентов поглощения A260/A280 (норма в диапазоне 1,8–2,0). Качество выделенной ДНК проверяли электрофоретически в 2%-ном агарозном геле. Для этого полученный раствор ДНК в количестве 4 мкл наносили на агарозный гель, содержащий бромистый этидий (0,5 мкг/мл). ДНК образца считалась пригодной для дальнейшего анализа, если фракция фрагментов ДНК размером 10–20 kb и более составляла как минимум 20% от общего количества выделенной ДНК.

Все праймеры были синтезированы в ОДО «Праймтех» (Беларусь). ПЦР осуществляли с использованием амплификатора C1000™ ThermalCycler (Bio-Rad, США). Для получения целевых фрагментов митохондриального гена цитохромоксидазы 1 субъединицы (*COI*) и гена 16S рРНК были использованы следующие пары праймеров и программы амплификации (табл. 1).

Таблица 1

Отобранные для анализа праймеры и протоколы ПЦР

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Программа амплификации
LCO1490 forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	1. Иниц. денатурация 95° С 90 с 2. Денатурация 95° С 30 с 3. Отжиг 45° С 60 с 5 циклов 4. Элонгация 72° С 90 с 5. Денатурация 95° С 30 с 6. Отжиг 55° С 45 с 27 циклов 7. Элонгация 72° С 60 с 8. Финальная элонгация 72° С 7 мин
HCO2198 reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA	
16S-F	CCTGTTTANCAAAAACAT	1. Иниц. денатурация 95° С 3 мин 2. Денатурация 95° С 40 с 3. Отжиг 53° С 50 с 30 циклов 4. Элонгация 72° С 60 с 5. Финальная элонгация 72° С 5 мин
16S-R	AGATAGAAACCAACCTGG	

Реакционная смесь для ПЦР составила 10 мкл: 5 мкл буфера DreamTaq PCR Master Mix (2X); 0,2 мкл каждого праймера; 3,6 мкл MiliQ и 1 мкл ДНК-матрицы.

Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в 2%-ном агарозном геле с добавлением флуоресцентного красителя этидиум бромид. Использовали метод горизонтального электрофореза в 1xTAE буфере с применением рабочей напряженности электрического поля 7 В/см. Длину амплифицированных фрагментов определяли путем сравнения со стандартом молекулярного веса ДНК Low Range DNA Ladder от 50 bp до 1 kb. Длины, получаемых в ходе реакции ампликонов (ПЦР-фрагментов) составили 680 п. н. и 530 п. н. для *COI* и 16S рРНК, соответственно (рис. 1 и 2).

Продукты ПЦР сразу после амплификации очищали с помощью ферментов, добавляя в каждый образец по 0,3 мкл экзонуклеазы (*Eco*1) и по 0,9 мкл фосфатазы (*FastAP*) и инкубировали при 37° С в течение 30 мин. Для остановки реакции смесь нагревали до 80° С в течение 15 мин.

Для подготовки образцов к секвенированию проводилась терминальная ПЦР. Реакционная смесь для ПЦР составляла 8 мкл: 1,6 мкл буфера BrightDye Terminator (*Nimagen*, Нидерланды);

0,8 мкл терминатора BrightDye Terminator (*Nimagen*, Нидерланды); 3,6 мкл MiliQ; 0,5 мкл прямого праймера и 1,5 мкл продуктов предыдущей ПЦР. Амплификацию терминальной ПЦР проводили с использованием следующей программы: 1 цикл — иниц. денатурация (96° С, 1 мин); 40 циклов — денатурация (96° С, 10 с), отжиг (55° С, 5 с), элонгация (60° С, 4 мин).

Заключительным этапом при подготовке образцов для секвенирования являлась очистка терминатора после ПЦР по следующему протоколу:

1. По 30 мкл 96%-ного спирта в каждую пробирку;
2. По 2 мкл 5М уксусной кислоты, смесь перемешивали на вортексе;
3. 30 мин смесь выдерживали в морозильной камере;
4. Центрифугирование 10 мин, супернатант сливали;
5. По 130 мкл 70%-ного спирта;
6. Центрифугирование 10 мин, супернатант отбирали дозатором;
7. Открытые пробирки помещали в термостат на 45° С до полного высыхания осадка.

Результаты секвенирования анализировали с помощью программы MEGA7.

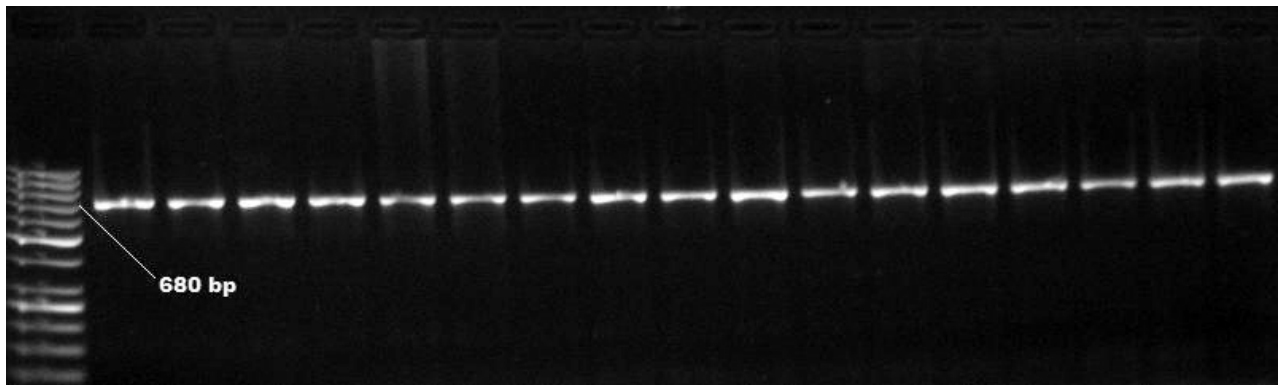


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *COI*

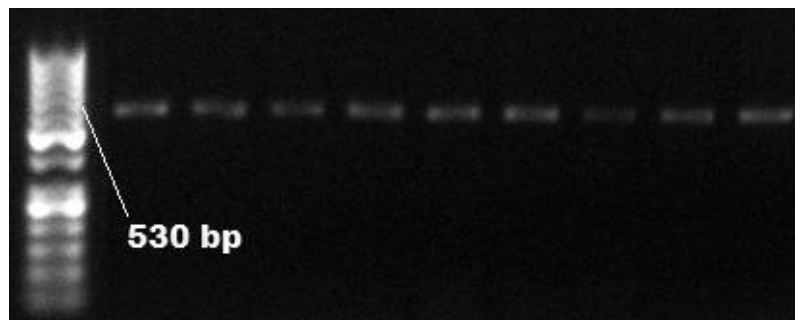


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена 16s рРНК



### Результаты и обсуждение

#### Сравнение популяций длиннопалого рака озера Олтуш и Соминское по гену COI

Первым этапом в анализе последовательностей было их сравнение с уже известной, имеющейся последовательностью гена *COI*, размещенной в GenBank. Все 31 экз. образцов были с 99%-ной вероятностью отнесены к исследуемому нами виду *Astacus leptodactylus* Esch.

Следующим этапом в анализе последовательностей было их выравнивание с помощью программы MEGA7 (рис. 3).

После выравнивания размер последовательности гена *COI* составил 639 нуклеотидов у популяции озера Соминское, а у озера Олтуш — 632 нуклеотида. После выравнивания последовательностей были рассчитаны парные генетические дистанции для каждой популяции.

При расчете внутривидовых генетических дистанций оказалось, что средние значения парных генетических дистанций в обеих популяциях, рассчитанные по белок-кодирующим областям гена *COI*, имеют невысокие значения и различаются несущественно (оз. Соминское — 0,003, Олтуш — 0,002). Также не наблюдалось зависимости значения генетиче-

ской дистанции от числа анализируемых последовательностей.

Затем был проведен расчет процентного содержания переменных сайтов нуклеотидов, а также расчет процентного содержания синонимичных и несинонимичных замен нуклеотидов. Все расчеты также производились в программе MEGA7. Как видно на рис. 4 в анализируемых последовательностях популяции озера Соминское было обнаружено 13 переменных сайтов нуклеотидов из 639.

Процентное содержание переменных сайтов рассчитывалось по формуле:  $I = V \times 100\% / D$ , где  $I$  — процент переменных сайтов;  $V$  — число переменных сайтов;  $D$  — общая длина последовательности. Таким образом, процент переменных сайтов нуклеотидов у раков по озеру Соминское составил 2,03%.

Так как в качестве маркера используется белок-кодирующий ген, необходимо было также рассчитать отдельно число синонимичных и несинонимичных замен. Следует отметить, что в данном случае синонимичные замены нуклеотидов не влияют на получаемый белок. Несинонимичные же замены влияют на структуру получаемого в процессе трансляции белка, поэтому данные мутации

#### До выравнивания

Species/Abbrev	Group Name	Sequence
1. 94		GRCATGATTTTCCTTACWTCAGSCKRAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
2. 95		AWTTTGAATTTTCCMCTTGACGCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
3. 96		BWVWSTTTTKCGGACCTGARGRRATAAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
4. 97		TGCATGCCCCCTGGTTCRCACWBSKSKTAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
5. 98		AWTKTTGATTTTGGMTTGAGCGGAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
5. 99		BWVWVWSTTTTKCGRMYCTGAGSCKRAWAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
7. 100		AKTWTGTTTTKCGMCTTGABSKKKAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
8. 101		CTTTGGKTTTTTTTKCGMYYTGAGCGGGAAWTAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
9. 102		TTTTKTTTTTTTGGMTTGAGCGGAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
10. 103		CTTTGCTTTTTTTGGACTTGACGGRATAAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
11. 104		ATTTTGTTTTTTGGACTTGACGGRATAAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
12. 105		AWTGAWKTTTTTKCGRMYCTGARSCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
13. 106		AAGTKTTTTTKCGMCTGARSCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
14. 107		GATGWAKKTTTTTKCGMCTGARSCKTAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA
15. 108		GASTTTGTTTTTGGACCTGAGGTCCTAGTGGGACCTCTTTAAGAAATAATTATTCGGGTTGAGCTAGGTCACCA

#### После выравнивания

Species/Abbrev	Group Name	Sequence
1. 94		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
2. 95		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
3. 96		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
4. 97		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
5. 98		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
5. 99		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
7. 100		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
8. 101		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
9. 102		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
10. 103		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
11. 104		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
12. 105		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
13. 106		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
14. 107		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT
15. 108		CCCTTTTCSTTTT-GATCTGTATTTATTACGGCAGTTCTTTTACTCTTATCTTTA--CCGGTGTTAGCAGGTGCTAT

Рис. 3. Выравнивание последовательностей гена *COI* популяции *Astacus leptodactylus* озера Соминское

в эволюционном плане более значимы. Необходимо было проверить, какое количество нуклеотидов в кодоне приводит к изменению аминокислоты. В нашем случае к изменению 3 аминокислот привело изменение 3 нуклеотидов в 3 различных кодонах, соответственно, число несинонимичных замен нуклеотидов — 3 из 639.

Расчет процентного содержания несинонимичных замен осуществляется по аналогичной формуле:  $N = Vn \times 100\% / D$ , где  $N$  — процент несинонимичных замен нуклеотидов;  $Vn$  — число несинонимичных замен нуклеотидов;  $D$  — общая длина последовательности. Число синонимичных замен рассчитывается по формуле:  $S = I - N$ , где  $S$  — процент синонимичных замен нуклеотидов. Таким образом, процент несинонимичных замен составил 0,47%, а число синонимичных — 1,57%.

При анализе данных, полученных для раков из популяции озера Олтуш, было установлено, что число переменных сайтов нуклеотидов составило 9 из 632 нуклеотидов и 6 аминокислот из 210. Таким образом, процент переменных нуклеотидов составил 1,42%, из

которых несинонимичных замен — 0,95%, а синонимичных — 0,47%. На основании полученных результатов можно заключить, что ген *COI* у *Astacus leptodactylus* характеризуется низкой внутривидовой вариабельностью. Внутривидовые генетические дистанции по отдельным участкам гена *COI* существенно не различаются. Нуклеотидные последовательности отдельных участков гена обладают высоким, иногда 100%-ным сходством. В то же время, наличие внутривидовой вариабельности, обеспеченное нуклеотидными заменами, подтверждает применимость этого гена для диагностики не только видов, но и внутривидовых форм. Число переменных сайтов нуклеотидов в последовательностях гена *COI* популяции раков озера Соминское в 1,44 раза выше, чем озера Олтуш, однако процентное содержание несинонимичных замен было в 2 раза выше в популяции рака в озере Олтуш, чем в озере Соминское. При оценке видовой принадлежности раков по гену *COI* было установлено, что в обоих озерах, обитает вид десятиногих раков — длиннопалый рак (*Astacus leptodactylus* Esch.) (с вероятностью 99%).

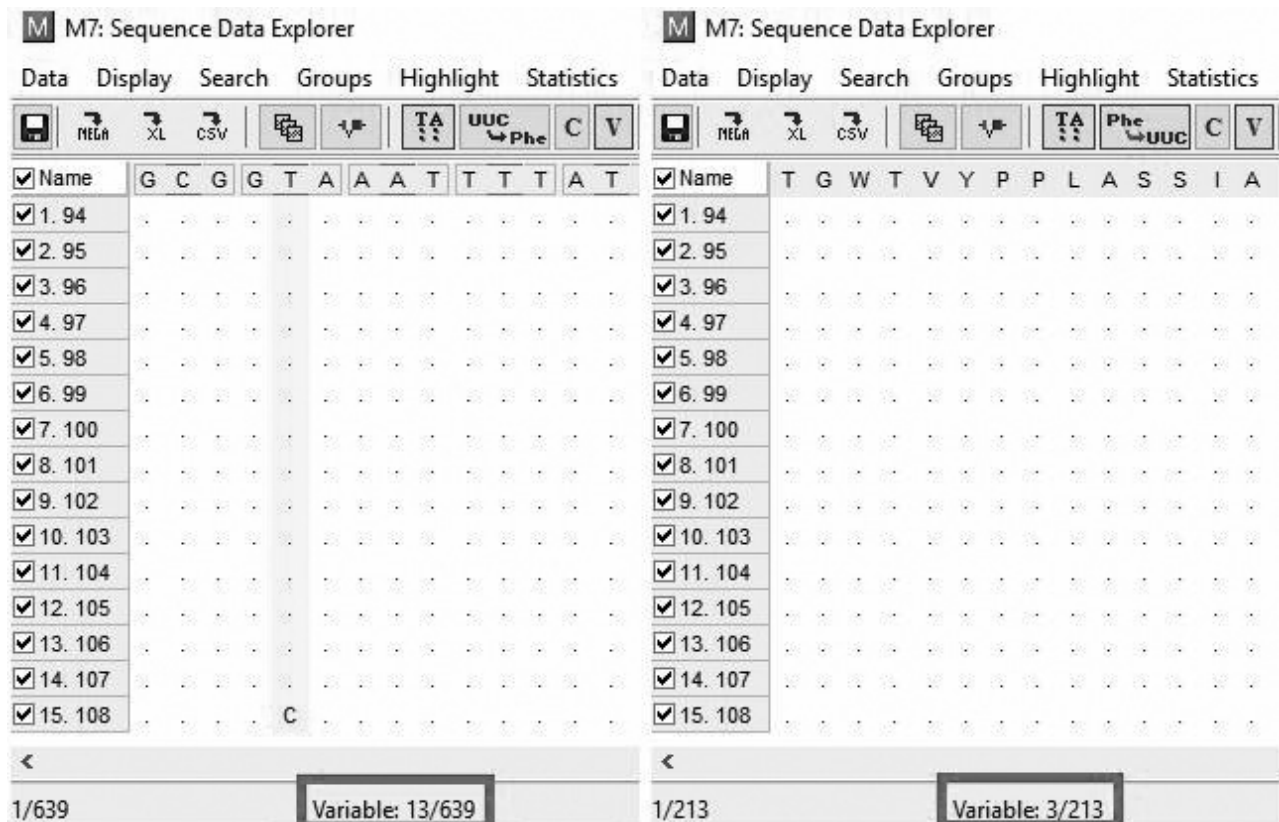


Рис. 4. Вариабельные сайты нуклеотидов (справа) и аминокислот (слева) в гене *COI* популяции озера Соминское



Сравнение популяций озер Олтуш и Соминское по гену 16s рРНК

Так же, как и для гена *COI*, первым этапом в анализе последовательностей было их сравнение с уже известной имеющейся последовательностью гена 16s рРНК, размещенной в GenBank. Все 31 экз. образцов были с вероятностью 83–95% отнесены к исследуемому виду длиннопалый рак (*Astacus*

*leptodactylus* Esch.), однако имелось также и большое сходство с близкородственным видом *Astacus astacus*. Следующим этапом в анализе последовательностей было их выравнивание с помощью программы MEGA7. Следует отметить, что уже на этом этапе было заметно большое количество нуклеотидных замен и вставок в последовательностях обеих популяций раков (рис. 5).

### До выравнивания

Species/Al	Group Name	
1. 94		TTATGACCGTGCCTAAGGTAGCRTAATCATTAGTCTTTTAATTGAAGGCTGGWATRAAT
2. 95		CCGGTATTATGACCGTGCCTAAGGTAGCGTAATCATTAGGCTTTTAATTGAAGGCTGGGA
3. 96		GCYGGTAGCGTAATCATGAGACAAGTAATGAAGGCTGGATAAATGGTTGGACAAGA
4. 97		GGTATTATGACCGTGCCTAAGGTAGCGTAATCATTAAAGAAAGAAAAKGAAGGCTGGAAAA
5. 98		AAGGTAGCGTAATCATTAGRCATAATTGAAGGCTGGAAATAAATGGTTGGACAAAGAAA
6. 99		GCCTCSGGTAGCGTAATATTAGGGCAAGTAATTGAAGGCTGGAAATAAATGGTTGGACAAA
7. 100		CCGGTATTATGACCGTGCCTAAGGTAGCGTAATCMTTASTCTTTTAATTGAAGGCTGGGA
8. 101		YATTATGACCGWGSTAAGGTAGCGTAATRGAAGGCCCTTAWAGGCTGGAAATAAATGGT
9. 102		ATTATGACCGTGCCTMAGGTAGCGTACCTACTATTCTTTTAATTGAAGGCTGGAAACCAT
10. 103		CCCGCGGTATTATGACCGTGCCTAAGGTAGCGTAATGAAAAGACTTTTAATTGAAGGCT
11. 104		ATGACCGTGCCTAAGGTAGCGTAATCATTAGTCTTTTAATTGAAGGCTGGAAATAAATGG
12. 105		TTATGACCGTGCCTAAGGTAGCRTAATCMTTAGTCTTTTAATTGAAGGCTGGWATRAAT
13. 106		ATGACCGTGCCTAAGGTAGCRTAATCMTTAKTCTTTTAATTGAAGGCTGGAAATRAATGG
14. 107		TATGACCGTGCCTAAGGTAGCGTAATCATTAGTCTTTTAATTGAAGGCTGGAAATAAATG
15. 108		TTATGACCGTGCCTAAGGTAGCRTAATCATTAGTCTTTTAATTGAAGGCTGGWATRAAT

### После выравнивания

Species/Abbrv	Group Name	
1. 94		TTTTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCTGTCTTAAATAAAAA
2. 95		TTTTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCTGTCTTAAATAAAAA
3. 96		AAGTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCTGGCTTAAATAAAAA
4. 97		AAAAAATTGAAGGCTGGAAAAAATGGTTGGACAGAATCCAAGCCTTCTTAAATAAAAA
5. 98		AATAAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCTGTCTTAAATAAAAA
6. 99		AAGTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCGGGCTTAAATAAAAA
7. 100		TTTTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCTGTCTTAAATAAAAA
8. 101		AGGCCCTTAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGGGAATAAAAA
9. 102		TTTTAATTGAAGGCTGGCAACCAATGGTCCSACAACAACCTAAGCTGTCTTAAATAAAAA
10. 103		TTTTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCTGTCTTAAATAAAAA
11. 104		TTTTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCTGTCTTAAATAAAAA
12. 105		TTTTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCTGTCTTAAATAAAAA
13. 106		TTTTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCTGTCTTAAATAAAAA
14. 107		TTTTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGTTGGACAAGAAATAAGCTGTCTTAAATAAAAA
15. 108		TTTTAATTGAAGGCTGGCAATAAATGGCTGGACAAGAAATAAGCTGTCTTAAATGAAA

Рис. 5. Выравнивание последовательностей гена 16s рРНК популяции *Astacus leptodactylus* озера Соминское

После выравнивания размер последовательности гена 16s рРНК составил 500 нуклеотидов у популяции озера Соминское, а у озера Олтуш — 487 нуклеотидов. После подготовки последовательностей были рассчитаны парные генетические дистанции для каждой популяции.

При расчете внутривидовых генетических дистанций оказалось, что средние значения парных генетических дистанций в обеих популяциях, рассчитанные по белок-кодирующим областям гена, имеют более высокие значения, чем рассчитанные для гена *COI*, и сильно раз-

личаются между двумя популяциями (оз. Соминское — 0,052, Олтуш — 0,269).

Следующим этапом анализа был расчет процентного содержания переменных сайтов нуклеотидов, а также расчет процентного содержания синонимичных и несинонимичных замен нуклеотидов (рис. 6 и 7).

Процентное содержание переменных сайтов рассчитывалось по той же формуле, что и для гена *COI*. Процент переменных сайтов нуклеотидов ДНК раков оказался высоким для обоих озер (25,6% и 60,1% для озер

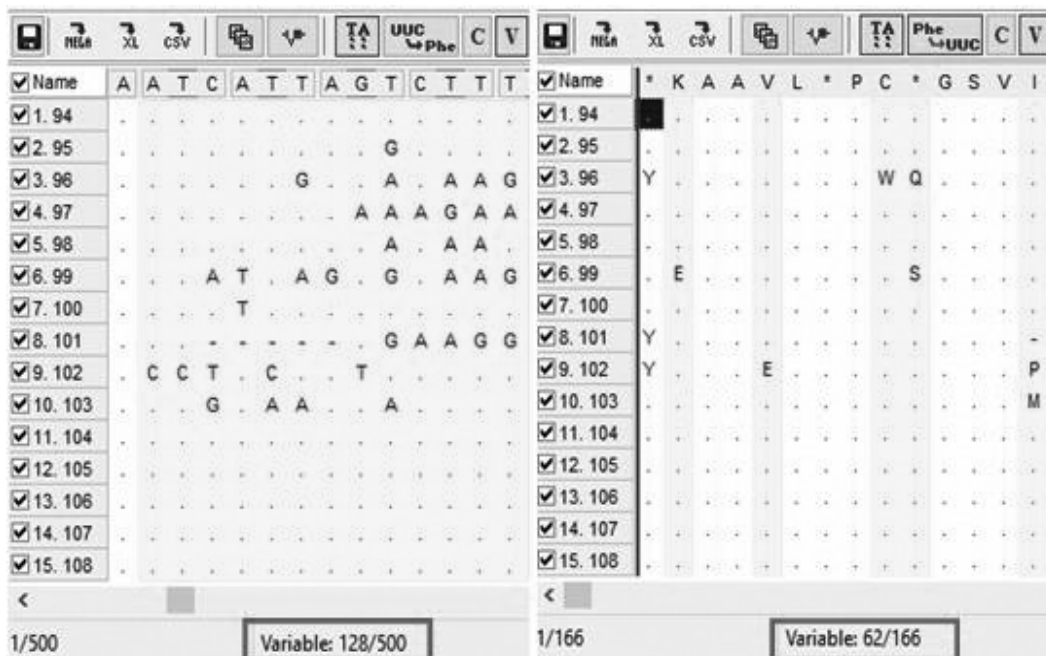


Рис. 6. Варибельные сайты нуклеотидов (справа) и аминокислот (слева) в гене 16s рРНК популяции озера Соминское

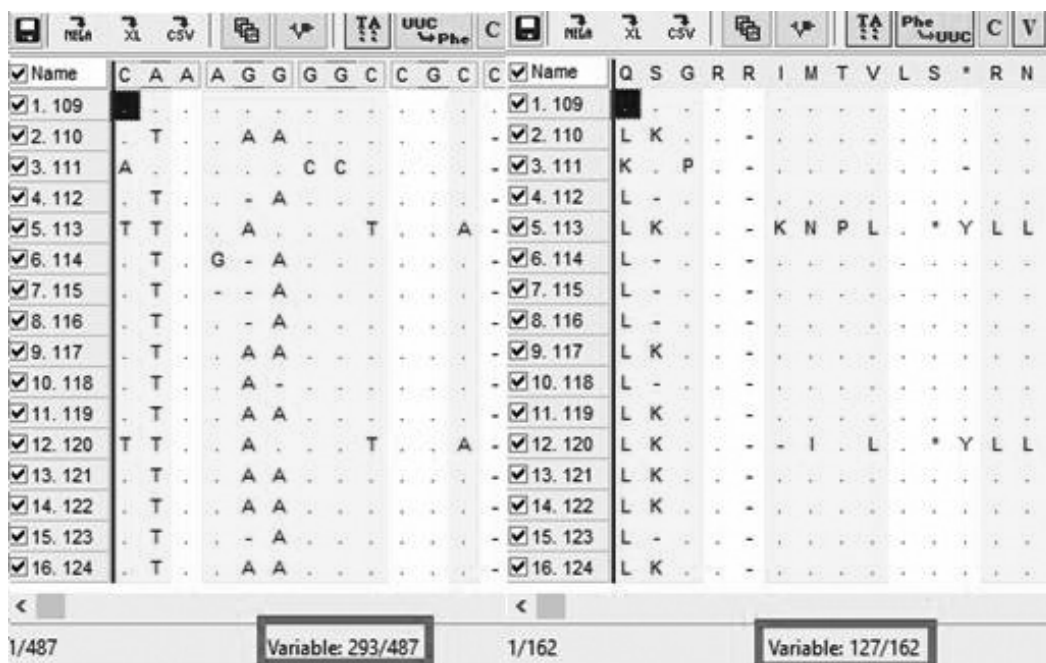


Рис. 7. Варибельные сайты нуклеотидов (справа) и аминокислот (слева) в гене 16s рРНК популяции озера Олтуш

Соминское и Олтуш, соответственно), что, согласно последним литературным данным, является характерным для генов митохондриального генома среди гидробионтов при отборе на адаптацию к экстремальным условиям среды обитания [20]. Дальнейшее вычисление синонимичных и несинонимичных замен ока-

залось уже невозможным, так как процент варибельности нуклеотидных сайтов оказался слишком высок для этого гена. Наибольшую варибельность по гену 16s рРНК показала популяция длиннопалого рака в озере Олтуш, что также согласуется с последними литературными данными.

### Заключение

При оценке видовой принадлежности раков по гену *COI* мтДНК было установлено, что в обоих озерах обитает вид десятиногих раков — длиннопалый рак (*Astacus leptodactylus* Esch.) (с вероятностью 99%). Продемонстрировано также, что в целом ген *COI* характеризуется достаточно низкой внутривидовой генетической вариабельностью. Установлено, что у раков из озера Олтуш она была в 1,44 раза ниже, чем у раков из озера Соминское (1,42% и 2,03%, соответственно). Относительно генетической вариабельности гена 16s рРНК был установлен очень высокий уровень полиморфизма в популяциях раков для обоих озер (25,6% и 60,1% для озер Соминское и Олтуш, соответственно), что характерно для генов митохондриального генома гидробионтов при отборе на адаптацию к экстремальным условиям среды обитания. Высокие уровни полиморфизма по гену 16s рРНК у длиннопалых раков из озер Соминское (Ивацевичский район) и озера Олтуш (Малоритский район) (при дополнительном исследовании раков из этих озер на наличие возбудителя рачьей чумы, других возбудителей инфекционной и паразитарной природы), дают нам основание полагать, что маточные стада из этих озёр обладают высокой степенью генетического полиморфизма и могут быть пригодны для интродукцирования в другие озера Брестской области, соответствующие оптимальным условиям для обитания длиннопалых раков.

В ходе исследований была адаптирована методика прижизненного отбора биологического материала у длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.), а также усовершенствована методика выделения ДНК из мышечной ткани длиннопалого рака.

Впервые в стране был создан банк ДНК и биологических образцов длиннопалого рака (акты от 21.11.2016 г. о передаче биологического материала и ДНК в Республиканский банк ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов).

*Работа выполнена в рамках задания 2.11 «Изучение генетического разнообразия водных и околоводных беспозвоночных» государственной программы научных исследований «Биотехнологии» 2016–2020 гг., подпрограммы «Структурная и функциональная Геномика».*

### Список использованных источников

1. Алехнович, А.В. Речные раки Беларуси в современных условиях. Распространение, динамика численности, продукционно-промысловый потенциал / А.В. Алехнович. — Минск: Беларуская навука, 2016. — 302 с.
2. Agerberg, A. Genetic variation in three species of freshwater crayfish, *Astacus astacus* L., *Astacus leptodactylus* Esch and *Pacifastacus leniusculus* (Dana), revealed by isozyme electrophoresis / A. Agerberg // Hereditas. — 1990. — Vol. 113. — P. 101–108.
3. Fevolden, S.E. Allozymic variation among populations of noble crayfish, *Astacus astacus* L., in southern Norway: implications for management / S.E. Fevolden, T. Taugbol, J. Skurdal // Aquat. Fish. Manag. — 1994. — Vol. 25 — P. 927–935.
4. Азизов, А.П. Популяционно-генетическая характеристика длиннопалых раков *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) Каспийского моря с применением RAPD техники / А.П. Азизов // Доклады НАН Азербайджана. — 2014. — № 1. — С. 1–7.
5. Assessment of genetic variation in wild populations of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens 1868) by means of allozyme and RAPD-PCR markers / J.M. Macaranas [et al.] // Mar. Freshwater Res. — 1995. — Vol. 46. — P. 1217–1228.
6. Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius palipes*, assessed using RAPD markers / N. Guoin [et al.] // Hereditas. — 2001. — Vol. 87. — P. 80–87.
7. Schulz, R. Status of the noble crayfish *Astacus astacus* (L.) in Germany: monitoring protocol and the use of RAPD markers to assess the genetic structure of populations / R. Schulz // Bull. Fr. Pêche Piscic. — 2000. — № 356. — P. 123–138.
8. Avise, J.C. Molecular Markers, Natural History, and Evolution / J.C. Avise. — New York: Chapman and Hall, 1994. — 511 p.
9. Moritz, C. Animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic / C. Moritz, T.E. Dowling, W.M. Brown // Annu. Rev. Eco. System. — 1987. — Vol. 18. — P. 269–292.
10. Слуквин, А.М. Генетическая идентификация стерляди (*Acipenser ruthenus* L.),



- выращенной в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области по микросателлитным маркерам / А.М. Слуквин, О.Ю. Конева, М.И. Лесюк // Молекулярная и прикладная генетика. — 2009. — Т. 9. — С. 146–152.
11. Billington, N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions / N. Billington, D.N. Hebert // Can. J. Fish. Aquat. Sci. — 1991. — Vol. 48. — P. 80–94.
12. Assessment of natural and artificial propagation of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* species complex) in the Alpine region with nuclear and mitochondrial markers / C.R. Largiader [et al.] // Mol. Eco. — 2000. — Vol. 9. — P. 25–37.
13. Liua, Z.J. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics / Z.J. Liua, J.F. Cordes // Aquaculture. — 2004. — Vol. 238. — P. 1–37.
14. Microsatellite DNA analysis of starlet (*Acipenser ruthenus* Brandt) from the five European river drainage areas / D. Fopp-Bayat [et al.] // Aktualny stan i aktywna ochrona naturalnych populacji ryb jesiotrowatych zagrożonych wyginięciem: Olsztyn. — 2008. — P. 223–234.
15. Барминцева, А.Е. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (*Acipenseridae*) и выявления особей гибридного происхождения / А.Е. Барминцева, Н.С. Мюге // Генетика животных. — 2013. — Т. 49, № 9. — С. 1093–1105.
16. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов / Н.С. Мюге [и др.] // Генетика. — 2008. — Т. 44, № 7. — С. 913–919.
17. Слуквин, А.М. Эффективный способ видовой идентификации и обнаружения гибридов у стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) / А.М. Слуквин // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. — 2015. — № 1. — С. 168–177.
18. Soroka, M. Application of mitochondrial DNA in the identification of diverse crayfish species / M. Soroka // Polish J. Nat. Sci. — 2008. — Vol. 23, № 3. — P. 624–634.
19. Skuza, L. Molecular characterization of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) population from Pomeranian lakes (north-western Poland) based on mitochondrial DNA / L. Skuza // Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems. — 2016. — № 13. — P. 417–422.
20. Consuegra, S. Patterns of natural selection acting on the mitochondrial genome of a locally adapted fish species / S. Consuegra, J. Elgan, E. Verspoor // Genetics Selection Evolution. — 2015. — P. 47–58.

М.А. Сасинович<sup>1</sup>, А.М. Слуквин<sup>1</sup>, А.В. Алехнович<sup>2</sup>

## COMPARATIVE GENETIC ANALYSIS OF POPULATIONS OF NARROW-CLAWED CRAYFISH (*ASTACUS LEPTODACTYLUS* ESCH.) IN THE LAKES OF BREST REGION

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

<sup>2</sup>The Scientific and Practical Center for Bioresources, NAS of Belarus  
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

The article deals with the study results related to species identification and genetic polymorphism in populations of narrow-clawed crayfish in Lakes Sominskoye (Ivatsevichi District, Brest Region) and Oltush (Malorita District, Brest Region) by two mitochondrial genes. When assessing the species of crayfish using the mtDNA *COI* gene, it was found that in both lakes the species of decapod are presented by narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch.) with a probability of 99%. It was shown that in general the *COI* gene is characterized by fairly low intraspecific genetic variability. It was found that in the crayfish population from Lake Oltush it was 1.44 times lower than that of the crayfish population from Lake Sominskoye (1.44% and 2.03% respectively). Concerning the genetic variability of the 16s rRNA gene, a very high level of polymorphism in the populations of crayfish was established for both lakes (25.6% for Lake Sominskoye and 60.1% for Lake Oltush), which, according to the latest literature, is characteristic of the genes of the mitochondrial genome among hydrobionts in the selection for adaptation to extreme environmental conditions.

**Key words:** narrow-clawed crayfish, genetic polymorphism, *COI* gene, 16 rRNA gene.

*Дата поступления статьи: 28 августа 2017 г.*



Т.Д. Кужир

## РЕВМАТОИДНЫЙ АРТРИТ: ИСТОРИЧЕСКИЕ И СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ

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

В обзоре кратко обобщены данные по происхождению, распространению, этиологии, патогенезу и клиническим признакам ревматоидного артрита (РА). Обсуждается влияние аллельных вариантов генов, участвующих в различных клеточных процессах, опосредованной цитокинами сигнальной трансдукции, воспалительном и иммунном ответе. Основная роль главного комплекса гистосовместимости и общего эпитопа, а также вклад не связанных с этим комплексом (non-*HLA*) генов рассмотрены с точки зрения этнической принадлежности пациентов и серологического статуса болезни. Также затронуты некоторые аспекты эпигенетики и сравнения генетических особенностей РА и ювенильного идиопатического артрита. Представленные в обзоре современные данные указывают на определяющее значение наследственных факторов в этиологии и патогенезе РА, а также на полигенную природу заболевания.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, ювенильный идиопатический артрит, иммунный и воспалительный ответы, генетический полиморфизм.

### Введение

Ревматоидный артрит (*rheumatoid arthritis*) — системное заболевание соединительной ткани неясной этиологии со сложным аутоиммунным патогенезом, которое преимущественно поражает мелкие суставы, протекая по типу эрозивно-деструктивного полиартрита. История заболевания уходит в глубокую древность, его следы обнаружены на остатках скелетов индейцев, относящихся к 4500 г. до н. э. Признаки, сходные с симптомами ревматоидного артрита, описаны еще во времена Гиппократы, а типичные проявления ревматоидного артрита изображены на картинах фламандских мастеров XV–XVII веков. Свое современное название заболевание получило в середине XIX века.

В настоящее время это заболевание достаточно широко распространено. Оно развивается в среднем и пожилом возрасте преимущественно у женщин, характеризуется болевым и воспалительным синдромом и прогрессирующим течением. Его социальная значимость неоспорима, так как болезнь быстро приводит к потере трудоспособности и инвалидности вследствие деформации и анкилозирования суставов, что крайне ухудшает качество жизни пациента. Несмотря на многовековую историю,

проблема ревматоидного артрита и сейчас стоит достаточно остро, так как до сих пор лечение, даже с учетом современных знаний о патогенетических механизмах, носит скорее симптоматический характер, не достигая своей конечной цели — излечения. Поэтому во всем мире продолжается интенсивный поиск причин ревматоидного артрита и факторов (экзогенных и эндогенных), способствующих его развитию, биологических маркеров ранней диагностики, прогноза клинического течения, индивидуальной чувствительности к терапии, что в комплексе должно способствовать успешной борьбе с этим недугом [1].

### 1. Эпидемиологическая и клиническая характеристика ревматоидного артрита (РА)

#### 1.1. Эпидемиология РА

**Заболеваемость.** Ревматоидный артрит распространен по всему миру, и ему подвержены все этнические группы. Болезнь затрагивает от 0,5 до 1% населения планеты, у пожилых эта цифра возрастает до 5%, при этом от 5 до 50 человек на 100 тыс. заболевает ежегодно [2].

**Смертность.** В 2010 году от ревматоидного артрита в мире умерло около 49 тыс. человек

[3]. Хотя причины смерти у пациентов с РА такие же, как и в общей популяции, смертность этих пациентов в 1,5–1,6 раз выше [4]. РА уменьшает продолжительность жизни в среднем на 3–12 лет [5]. Это подтверждается на когортах разного этнического происхождения, включая австралийскую [6]. Последние данные, полученные на датской популяции, также показывают, что смертность у пациентов с РА на 54% выше, чем у всего населения после выравнивания выборки по возрасту, полу и некоторым другим показателям [7].

**Возраст.** РА возникает в любом возрасте, однако наиболее часто он проявляется у женщин 40–50-ти лет и несколько позже у мужчин [8].

**Гендерные особенности.** Женщины болеют РА в 3–5 раз чаще, чем мужчины. В исследовании гендер-специфичности РА на популяции Осло (Норвегия) обнаружено, что в возрасте 50-ти лет частота случаев РА у женщин превышает этот показатель у мужчин в 4–5 раз, тогда как отношение женщин к мужчинам среди пациентов с РА старше 60–70 лет составляет 2:1. Курение увеличивало склонность к РА у мужчин, но не влияло на частоту случаев РА у женщин [9]. Следовательно, такие факторы, как возраст и курение, отражаются на соотношении полов при РА. Наблюдаемые различия могут быть обусловлены половым диморфизмом аутоиммунных заболеваний, в том числе гормональными особенностями, различиями между мужчинами и женщинами в функционировании иммунных систем и др. [10]. По-видимому, «сглаживание» полового диморфизма после 60 лет может происходить за счет перестройки гормонального фона и соответствующих изменений гуморальной регуляции иммунитета.

## 1.2. Этиология и патогенез РА

**Этиология в свете эволюционной истории болезни.** Ответ на вопрос об этиологии РА обычно формулируется так: причины до сих пор не известны. По образному выражению W.M. Jefferies (1998), этиология РА иллюзорна (неуловима, призрачна), хотя ее можно объяснить комбинацией трех факторов: недостатком кортизона, весьма существенного для нормального функционирования иммунных систем; нехваткой ди-

гидроэпиандростерона; заражением такими микроорганизмами, как микопlasма, которая обладает относительно слабой вирулентностью, но вызывает воспаление и деструкцию тканей в периартикулярной и артикулярной областях [11]. На этом основании предлагалось включить в схему лечения адreno-кортикоидные гормоны и антибиотики.

Интересная статья, рассматривающая проблему этиологии РА с точки зрения эволюции болезни, вышла в 2011 г. [12]. Авторы возвращаются к истории РА, ссылаясь на первое детальное описание симптомов болезни в диссертации Augustin Jacob Landré-Beauvais, датированной 1800 г., где были указаны отличительные черты «ревматизма» и «остеоартрита». Вторым по значимости своего вклада в формирование представлений о РА оказался английский врач XIX века Alfred Garrod, который провел дифференциацию между подагрой и «ревматической подагрой», названной позже ревматоидным артритом (Garrod, 1858, 1890 — цитируется по Entezami et al., 2011 [12]).

Многие эксперты в этой области склоняются к тому, что упоминания о симптомах РА можно найти еще в трактатах со времен Гиппократ, они отображены на картинах знаменитых художников Ренессанса (особенно фламандской школы) [12]. Все эти свидетельства, включая палеонтологические находки, суммированные авторами (табл. 1), подтверждают существование и широкое распространение болезни со времен Древнего мира. Наиболее интригующей представляется гипотеза о переносе РА из Нового света в Старый, основанная на предположении, что, поскольку наиболее древние находки были сделаны в Америке, то РА передавался после открытия Колумбом Американского континента в страны Старого света посредством «неспецифического вектора». В связи с этой гипотезой серьезно обсуждалась проблема «эпидемии» ревматоидного артрита в Европе в XVI–XVII столетиях [13].

Что подразумевается под «неспецифическим вектором»? Возможно, это инфекционный агент, который и сейчас не исключается как один из экзогенных факторов, способствующих развитию РА [14]. Микробные патогены, такие как бактерии, различные вирусы (ретро-

Таблица 1

Опубликованные данные палеонтологических исследований ревматоидного артрита [12]

Время происхождения образца	Год находки	Место находки	Гипотетическое происхождение
4000–1000 до н. э.	1917	Египет	Древнее происхождение
3000–1000 до н. э.	1988	Алабама	От Нового света* в Старый свет **
2750–2625 до н. э.	1897	Египет	Древнее происхождение
2500–1900 до н. э.	1988	Швеция	Древнее происхождение
2290–2040 до н. э.	1990	Кентукки	Новый свет, старый свет
1300 до н. э.	1940	Нижний Египет	Древнее происхождение
800 до н. э.	1988	Огайо	Новый свет, старый свет
400–1 до н. э.	1985	Дания	Древнее происхождение
339–210 до н. э.	1979	Сицилия	Древнее происхождение
100 до н. э.	1983	Англия	Древнее происхождение
700–1450 н. э.	1989	Судан	Древнее происхождение
900–1536 н. э.	1992	Дания/Швеция	Древнее происхождение
1400 н. э.	1981	Англия	Древнее происхождение
1500 н. э.	2002	Италия	Древнее происхождение
1666 н. э.	2009	Италия	Древнее происхождение

**Примечание.** \* Новый свет — Американский континент; \*\* Старый свет — Евразия, Африка

вирусы, парвовирус В19, вирусы рубеллы, Эпштейн–Барра и другие возбудители герпеса) рассматриваются как потенциальные триггеры РА. Появляется все больше доказательств, что изменения в составе и функциях слизистых оболочек, особенно кишечная микробиота, тесно связаны с РА [15, 16].

Другим важным фактором окружающей среды, влияющим на развитие РА, считается курение, поскольку сигаретный дым может оказывать модулирующий эффект на врожденную и приобретенную иммунные системы [17]. Дополнительные аргументы в пользу этиологической значимости этого фактора найдены с применением современных биотехнологий. С помощью иммуночипов (Plumina), включающих 195 586 генетических маркеров, проанализировано более пяти тысяч образцов от пациентов с серопозитивным и серонегативным артритом [18]; полученные данные подтверждают комплексное взаимодействие генетических и средовых факторов

и регуляторную роль курения в развитии этого заболевания.

Таким образом, современные представления об этиологии РА отвечают следующим принципам [12]:

1. Ревматоидный артрит не является болезнью недавнего происхождения; заболевание имело место тысячи лет назад, но его распространение, по-видимому, отличалось от его нынешнего географического профиля.

2. Ревматоидный артрит возникает как ответ на стимулы окружающей среды и обусловлен генетически детерминированной чувствительностью индивида.

3. Подлинность и источники этих стимулов или иницирующие события все еще не полностью изучены; те или иные триггеры могут быть важными для различных подгрупп пациентов.

*Патогенез РА.* Поражение суставов при РА развивается в результате хронического воспаления синовиальной оболочки при взаимодействии рези-

дентных клеток, таких как фибробластоподобные синовиоциты, с клетками врожденного (макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки, нейтрофилы) и адаптивного иммунитета (например, В- и Т- лимфоциты).

Патологический процесс складывается из следующих этапов [19, 20]:

1. Синовиоциты приобретают черты макрофагов, выделяют провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли альфа, интерлейкины), становятся антиген-презентирующими клетками и вызывают активацию Т-хелперов 1 типа.

2. В клетках синовиальной жидкости и в синовиальной оболочке сустава появляется большое количество Т-хелперов, выделяющих гамма-интерферон и активирующих макрофаги.

3. Активированные макрофаги и моноциты продуцируют провоспалительные цитокины, которые, в свою очередь, повышают концентрацию нейтрофилов, активируют остеокласты, что способствует остеопорозу костной ткани и хроническому воспалению.

4. В крови и синовиальной жидкости значительно повышается концентрация плазматических клеток, продуцирующих иммуноглобулины.

5. Выделение эндотелиального фактора роста способствует разрастанию капилляров синовиальной ткани. Ангионеогенез и пролиферация активных фибробластоподобных синовиоцитов приводят к образованию паннуса — агрессивной ткани, имеющей признаки опухолевого роста.

6. Образование иммунных комплексов в крови способствует активации комплемента и повреждению микроциркуляторного русла, что объясняет висцеральные проявления ревматоидного артрита. На поздних этапах ревматоидного артрита пролиферативные процессы (рост паннуса) могут не зависеть от аутоиммунных механизмов и поддерживаются автономно.

К тому, что известно о патогенезе ревматоидного артрита, необходимо добавить, что в последние годы особый интерес вызывает формирование нейтрофильной внеклеточной «ловушки» (так называемый «NETosis») для разрушения иммунологической толерантности и поддержания аутоиммунной и воспалительной реакции при РА. NETosis представляет первичный защитный механизм, формиру-

ющийся на ранних ступенях воспалительного каскада [21]. При РА нейтрофилы из синовиальной жидкости и периферической крови проявляют повышенный NETosis после стимуляции сывороточными антителами, тогда как спонтанный — ассоциирован с увеличенной продукцией активных форм кислорода. Среди компонентов нейтрофильной ловушки описан ряд цитоплазматических и внеклеточных цитруллиновых антигенов, которые могут служить мишенями для аутоантител и действовать как индукторы последующего образования NET при ревматоидном и ювенильном идиопатическом артрите [22]. Показано, что 40% синовиальных В-клеток проявляют агрессивность против цитруллиновых гистонов, следовательно, нейтрофильные ловушки могли бы представлять источник цитруллиновых антигенов, обуславливая аутоиммунный ответ при РА [23].

Что касается адаптивной иммунной системы, то нарушенная регуляция ее ответа также существенно влияет на развитие РА, так как многие типы Т-лимфоцитов являются «активными игроками» на поле патологического процесса, поддерживая воспаление путем продукции ряда сигнальных молекул [21]. В этой цепи событий одно из ведущих мест занимает индукция цитокинов и хемокинов [20]. Установлено, что такие цитокины как TNF $\alpha$ , IL-1, IL-17 стимулируют воспаление и дегградацию кости и хряща. Дисбаланс между содержанием и активностью про- и противовоспалительных цитокинов приводит к мультисистемным осложнениям иммунитета. Кроме того, уровень цитокинов в сыворотке или плазме крови пациентов с РА позволяет судить о тяжести болезни.

Таким образом, в патогенезе РА участвуют различные процессы и множество компонентов. Нарушение регуляции врожденного и приобретенного иммунитета происходит на разных стадиях развития заболевания. Клетки иммунного ответа, растворимые медиаторы, адгезивные молекулы и аутоантитела вносят свой вклад в развитие воспаления и структурных изменений суставов и внутренних органов. Понимание механизмов, лежащих в основе патогенеза РА, будет содействовать разработке новых более эффективных средств и способов лечения заболевания.



### 1.3. Клиническая характеристика и диагностические критерии РА

Для диагностики ревматоидного артрита используются классификационные критерии, разработанные Американской ассоциацией ревматологов (ARA) и Европейской лигой ассоциаций ревматологов (ELAR). Классификация 1987 г. включает следующие критерии [24]: утренняя скованность; артрит 3-х или большего числа суставов; артрит суставов кисти; симметричный артрит; подкожные узелки; рентгенологические изменения; положительный ревматоидный фактор (РФ).

Однако клиническая практика показала недостаточную состоятельность этих критериев, чтобы провести отчетливое разграничение между пациентами, у которых развивается либо не развивается персистирующий (хронический) или эрозивный артрит. Это вызвало потребность в создании новой системы классификационных критериев, которая могла бы справиться с такими задачами, способствуя диагностике заболевания на ранних стадиях. Новая классификация, разработанная со-

вместными усилиями ARA и ELAR в 2010 г., сосредоточена на идентификации у пациентов с начинающимся синовитом факторов, указывающих на высокий риск развития персистирующего и/или эрозивного артрита [25]. Эта система предполагает установление баллов от 0 до 10 по основным диагностическим направлениям, в частности: вовлеченности суставов в воспалительный процесс, серологическим показателям, реактантам острой фазы воспаления, продолжительности артрита (табл. 2).

## 2. Генетические факторы патогенеза РА

### 2.1. Семейный РА

Часто РА имеет семейную историю. Об этом свидетельствуют исследования на близнецах и мониторинг заболеваемости в семьях. Так, на близнецовых когортах Финляндии и Великобритании доказано, что наследуемость этого заболевания составляет 65% [95% CI = 50–77] и 53% [95% CI = 40–65] соответственно [26]. Среди тайваньского населения ( $n = 23\ 658\ 577$ )

Таблица 2

Критерии диагностики РА [25]

Критерии	Баллы
<i>Критерий А. Поражение суставов:</i>	
1 крупный сустав	0
2–10 крупных суставов	1
1–3 мелких суставов (с и без поражения крупных суставов)	2
4–10 мелких суставов (с и без поражения крупных суставов)	3
>10 суставов (хотя бы 1 мелкий сустав)	5
<i>Критерий В. Аутоиммунная серология:</i>	
Отрицательный РФ или негативные АЦЦП/АСРА	0
Низко-положительный РФ или низко-положительные АЦЦП/АСРА	2
Высоко-положительный РФ или высоко-положительные АЦЦП/АСРА	3
<i>Критерий С. Острофазовые реактанты:</i>	
Нормальный СРБ и нормальная СОЭ	0
Повышенный СРБ и повышенная СОЭ	1
<i>Критерий D. Длительность симптоматики:</i>	
<6 недель	0
≥6 недель	1

**Примечание.** Сумма баллов меньше 6 позволяет исключить диагноз РА, однако такие пациенты нуждаются в повторном обследовании, в результате чего баллы могут быть набраны кумулятивно. АЦЦП — антитела к циклическому цитруллинированному пептиду; СРБ — С реактивный белок



было обнаружено 37 482 пациентов с РА и оценен семейный риск развития этого заболевания [27]. Относительный риск выявления РА составил: RR [95% CI] = 328,27 [135,95–795,63] для близнецов пациентов с РА; 11,97 [8,68–16,52] для сестер и братьев; 4,86 [4,16–5,67] для родителей; 4,65 [3,9–5,50] для потомства и 2,32 [1,83–2,95] для супругов. Данные свидетельствовали, что примерно 2/3 всех фенотипов РА обусловлены семейными факторами. Несколько раньше на шведской популяции путем оценки стандартизованного показателя заболеваемости (как аналога относительного риска) было установлено, что он составляет 3,02 в потомстве родителей пробандов РА, 4,64 — у братьев и сестер, 9,31 — в мультиплексных семьях, где у нескольких членов диагностировано заболевание, 6,48 — у близнецов и только 1,17 — у супругов [28]. Все перечисленные данные указывают на большой вклад наследственности в формирование чувствительности популяций к этому заболеванию.

## 2.2. Гены главного комплекса гистосовместимости

*Роль главного комплекса гистосовместимости в иммунитете.* Поскольку РА развивается как генетически детерминированный аутоиммунный ответ на внешние стимулы, то основу патогенеза этого заболевания образует триада из генетической предрасположенности, воздействия окружающей среды и аутоиммунитета, которую также справедливо называют «бермудским треугольником» [29]. В этой триаде перевес приходится на наследственность, вклад которой, по данным разных авторов, оценивается в 60–70%, при этом он примерно одинаков для серонегативного и серопозитивного артрита [26, 30].

Среди возможных генетических факторов, способствующих развитию заболевания, в первую очередь обратили внимание на гены главного комплекса гистосовместимости (МНС). Гены этого комплекса кодируют гликопротеиды, локализующиеся на клеточной мембране. Они обеспечивают презентацию фрагментов антигенов микроорганизмов, попадающих в организм, Т-лимфоцитам, которые уничтожают зараженные клетки или стимулируют другие клетки (В-клетки и ма-

крофаги), координируя действие различных компонентов иммунной системы в подавлении инфекции. У человека МНС исторически называется лейкоцитарным антигеном человека — HLA (*Human Leucocyte Antigen*), а кодирующие его гены находятся на хромосоме 6 (6p21) [31]. HLA-белки регулируют иммунный ответ на чужеродные антигены и сами являются сильными антигенами, которые подразделяются на классы I и II. Антигены I класса необходимы для распознавания трансформированных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами; антигены II класса обеспечивают взаимодействие между Т-лимфоцитами и макрофагами в процессе иммунного ответа.

*Рисковая значимость общего эпитопа.* Ранее установлено, что определенные аллели *HLA-DRB1\*01 (HLA-DR1)* и *HLA-DRB1\*04 (HLA-DR4)* ассоциированы с чувствительностью к РА. Тогда как QKRAA, QQRAA и KKRAA аминокислотный мотив цепи DRβ, известный как общий эпитоп (shared epitope, SE), повышает чувствительность к РА, DERAА мотив обеспечивает протекторные эффекты. На основе этих данных сформулирована SE гипотеза [32]. Существует сложная иерархия факторов риска, обусловленная различными *HLA-DRB1* генотипами. Как уже обсуждалось, SE аллели (*HLA-DRB1\*01, DRB1\*04, DRB1\*10*) проявляют наиболее строгую ассоциацию с чувствительностью к болезни; тем не менее, представляют интерес и другие, не относящиеся к общему эпитопу *HLA-DRB1* аллели. К таковым относятся *DRB1\*13 (HLA-DR13)* и *DRB1\*15 (HLA-DR15)* [29]. Оказалось, что *DRB1\*1301, \*1302* и *\*1304* аллели связаны с DERAА мотивом и могут снижать вероятность возникновения АСРА-положительного или АСРА-отрицательного полиартрита. Данные относительно *HLA-DRB1\*15* аллеля противоречивы, однако обнаружена его ассоциация с более высоким уровнем АЦЦП/АСРА [33]. Описана семья, у шести членов которой диагностирован РА в двух поколениях; интересно, что четверо из шести пациентов несли *DRB1\*15* генотип [34].

*Связь генов HLA с серологическими показателями.* Такие серологические показатели, как ревматоидный фактор (РФ) и антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП/АСРА), определяют клинический

диагноз ревматоидного артрита. В зависимости от наличия или уровня этих показателей РА относят либо к серопозитивному, либо к серонегативному; в процентном отношении они составляют 75–85% и 15–25% соответственно [35]. Применение современных молекулярных технологий указывает на отсутствие каких-либо фундаментальных различий между РФ-положительным и РФ-отрицательным артритами [36]. Однако изучение связи генов главного комплекса гистосовместимости с развитием серонегативного и серопозитивного артрита в шведской и североамериканской популяциях продемонстрировало альтернативное распределение генотипов/аллелей *HLA-DRB1* между двумя типами заболевания: так, эти аллели представляли существенный фактор риска для АСРА-положительного РА в отличие от АСРА-отрицательного артрита [37, 38].

Связь между определенными *HLA* аллелями и наличием или уровнем АЦЦП/АСРА в крови пациентов подтверждается тем, что из 2221 SNPs в пределах МНС района 229 тесно ассоциированы с серопозитивным артритом, и ни один из них не выявляется при серонегативном заболевании [37]. Данные могут свидетельствовать о том, что влияние аллелей/генотипов главного комплекса гистосовместимости на чувствительность к РА опосредовано их взаимодействием с другими генами и вмешательством в регуляцию продукции аутоантител [29].

В отличие от европейских, мета-анализ данных широкогеномных исследований японской популяции (670 случаев АСРА-отрицательного артрита и 16 891 контрольных образцов, протестированные по 1 948 138 маркерам) продемонстрировал ассоциацию этого типа заболевания с SNP rs6904716 в *LEMD2* сайте локуса *HLA* ( $p = 5,7 \times 10^{-8}$ ) [39]. Среди проанализированных вариантов, относящихся и не относящихся к главному комплексу гистосовместимости, найдено много перекрывающихся SNPs, что позволило авторам сделать вывод о большом вкладе генетических факторов риска серопозитивного РА в развитие серонегативного артрита.

*Этническая специфичность генетического влияния на развитие РА.* При изучении этого вопроса установлено фактическое отсутствие различий по частоте отдельных генотипов/

аллелей локуса *HLA* между субпопуляциями африканского происхождения и европеоидами, по крайней мере, в Великобритании [40]. Изучение генетической составляющей РА в Латинской Америке затруднено из-за большой гетерогенности народонаселения входящих стран [41]. Тем не менее, при обследовании популяций испанского происхождения и индейцев установлена строгая ассоциация РА с *HLA-DRB1* геном и валидизирована SE гипотеза для латиноамериканских популяций [42]. На основании обширного GWAS-исследования подтверждена ассоциация РА с районом *HLA* класса II и некоторыми другими генами, связь с которыми ранее показана в европейских и азиатских популяциях [43]. Азиатские этнические группы, в том числе населяющие Малайзию, по всей вероятности, проявляют аналогию с населением европейского происхождения: у них также отсутствует ассоциация ряда аллелей общего эпитопа с серонегативным полиартритом [44].

Анализ представленных данных литературы показывает, что от 30 до 50% наследственности при РА детерминированы генами главного комплекса гистосовместимости. Установлена высокая статистическая значимость полиморфного локуса *HLA* как фактора риска развития болезни [45]. Несмотря на долгую (с 1976 г. [46]) историю изучения вклада локуса *HLA* в предрасположенность к РА и современные данные полногеномных исследований, которые значительно расширили представления о генетической составляющей патогенеза этого заболевания, еще остаются «белые пятна» в этой области знаний. Так, до 2012 г. предполагалось, что *HLA* аллели ассоциированы исключительно с серопозитивным артритом, но позже появились работы, указывающие на связь SE с серонегативным РА. Среди них, кроме уже упомянутого исследования японских авторов, есть и другие, выполненные в европейских странах [47, 48]. Все это свидетельствует, что накопление научной информации открывает новые грани генетического влияния на возникновение и течение болезни. Поэтому дальнейшее изучение своеобразия эффектов генов главного комплекса гистосовместимости относительно РА в зависимости от этнической принадлежности пациентов и серологического подтипа заболевания по-прежнему

актуально и с точки зрения фундаментальной науки, и для практической медицины.

### 2.3. Гены, не относящиеся к главному комплексу гистосовместимости

*Non-HLA гены.* Дополнительно к *HLA-DR* аллелям выявлена роль других (так называемых «non-*HLA*») генов, не относящихся к главному комплексу гистосовместимости. Среди таких генов наиболее сильные ассоциации первоначально установлены для *PTPN22* и *IL23R* (цитируется по [29]). Особый интерес представлял ген *PADI4*, кодирующий пептидил-аргинин-деиминазу 4 — энзим, вовлеченный в образование цитрулинированных белков, — ключевое биохимическое событие в патогенезе РА. Ассоциация этого гена с РА показана на азиатских популяциях, но ее не удалось установить на европеоидах [49, 50]. Более поздние исследования с учетом молекулярных путей, задействованных в иммунном и воспалительном ответе, позволили выявить другие значимые для патогенеза РА локусы, такие как *TRAF1*, *CTLA4*, *IRF5*, *STAT4*, *FCGR3A*, *IL6ST*, *IL2RA*, *IL2RB*, *CCL21*, *CCR6*, *CD40* (табл. 3) [29, 51].

В ряде случаев варианты полиморфных локусов повышали риск развития РА в различных этнических группах, тогда как другие, наоборот, проявляли этническую специфичность. Например, обнаружена ассоциация *STAT4* rs7574865 Т аллеля с РА как в европейских, так и азиатских популяциях (OR [95% CI] = 1,3 [1,195–1,414]  $p < 0,001$ ; OR [95% CI] = 1,216 [1,135–1,303],  $p < 0,001$  соответственно) [52]. Стратификация пациентов по этнической принадлежности в другой работе показала, что *PTPN22* Т аллель, СТ+ТТ генотипы, *STAT4* Т аллель и *STAT4* GT+ТТ генотипы статистически значимо ассоциированы с РА у лиц европейского, азиатского и африканского происхождения, в то время как *PTPN22* ТТ генотип был связан с РА у европейцев, но не у азиатов и африканцев, а *STAT4* ТТ генотип — с РА у европейцев и азиатов, но не у африканцев [53].

Для *TRAF1/C5*, *CD40*, и *CCL21* SNPs не найдено каких-либо доказательств в пользу их ассоциации с РА в корейской популяции [54]. Установлена связь полиморфизма в локусе *PTPN22* для европейских популяций, а в локусе *PADI4* — для популяций азиатского про-

исхождения [55]. Что касается локусов *FCGR*, то хотя полиморфизм *FCGR3B* не влиял на чувствительность популяций к РА, *FCGR2A* и *FCGR3A* проявляли ассоциацию с заболеванием у европейцев, оставаясь нейтральными у азиатов [56].

Следовательно, в отличие от «перекрывания» или совпадения эффектов *HLA* генов в популяциях различного этнического происхождения, многие мета-анализы демонстрируют несходство между европеоидами и азиатами, а также другими этническими группами по влиянию non-*HLA* генов на их чувствительность к РА.

*GWAS: перспективы, ограничения, результаты.* В последнее время широко распространился полногеномный поиск ассоциаций (GWAS), основная цель которого заключается в идентификации генетических факторов риска, что позволяет глубже проникать в биологическую суть восприимчивости к болезни и на этой основе разрабатывать новые стратегии профилактики и лечения [70]. В таких исследованиях геномы группы пациентов с определенным заболеванием сравниваются с геномами контрольной группы, включающей в себя схожих по возрасту, полу и другим признакам здоровых людей. В отличие от методов, которые проверяют один или несколько конкретных участков генома, полногеномный поиск ассоциаций использует последовательность ДНК целиком, при этом не выявляются мутации, ставшие причиной заболевания, а лишь устанавливается более или менее значительная связь с заболеванием или его признаком единичных нуклеотидных замен в полиморфных локусах [71].

Следует отметить некоторые проблемы и ограничения GWAS. К ним относятся отсутствие во многих случаях четкого соответствия между тестовой и контрольной популяциями, недостаточный объем выборок, необходимость повторных испытаний в других популяциях для подтверждения выявленных ассоциаций. Кроме того, следует учитывать, что такой подход может быть проблематичным из-за возможных ложноположительных результатов [71]. Интерпретация результатов GWAS осложняется необходимостью картирования некоторых идентифицированных вариантов генов [72] и тем обстоятельством, что многие

Таблица 3

Локусы, не относящиеся к главному комплексу гистосовместимости, значимо влияющие на риск возникновения РА

Гены кандидаты	Локализация	Продукты и их функции	Связь с РА [ссылка]
<i>PTPN22</i>	1p13.2	Протеин-тирозин фосфатаза нерцепторного типа 22; действует как негативный регулятор Т-клеточного сигналинга	[53, 57]
<i>TRAF1/C5</i>	9q33-34	фактор 1, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли; участвует в сигнальной трансдукции	[58]
<i>STAT4</i>	2q32.2–2q32.3	Сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции 4, способствует активации внутриклеточной сигнальной сети цитокинами	[52, 53, 59]
<i>CTLA4</i>	2q33.2	Антиген 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами; относится к иммуно-глобулинам и передает ингибирующий сигнал Т-лимфоцитам	[60, 61]
<i>PADI4</i>	1p36.13	Пептидил-аргинин-деиминаза 4, превращает аргининовый остаток в цитрулиновый	[49*, 62]
<i>IRF5</i>	7q32.1	Фактор 5, связанный с интерфероном, — транскрипционный фактор, участвует в активации интерферона в ответ на заражение вирусом	[63, 64]
<i>FCGR</i>	1q23.3	Fc гамма-рецептор, связывается с Fc районом гамма-иммуноглобулина	[56*]
<i>IL2RA, IL2RB</i>	10p15.1	Рецепторы интерлейкинов 2 А и В — участвуют в сигнальной трансдукции при воспалении	[65]
<i>CD40</i>	20q13.12	CD40 — рецептор антиген-презентирующих клеток, играет существенную роль как посредник в иммунном и воспалительном ответах	[66, 67]
<i>CCL21</i>	9p13.3	С-С-мотив хемокинового лиганда 21, подавляет гемопоэз и стимулирует хемотаксис, эффективный хемоаттрактант для лимфоцитов	[54*, 68]
<i>CCR6</i>	6q27	С-С хемокиновый рецептор 6, регулирует миграцию и накопление дендритных и Т клеток при иммунном и воспалительном ответах.	[69]

**Примечание.** \*Найдены этнические различия между эффектами вариантов генов на предрасположенность к РА

ассоциации, установленные на сегодняшний день, касаются интронов и промоторных областей генов, что предполагает большую, чем заранее ожидалось, роль некодирующих SNPs в развитии широко распространенных заболеваний [73]. Тем не менее, результаты GWAS представляют огромный интерес, так как расширяют диапазон вовлеченных генов и углубляют наши знания о генетической природе заболевания.

Остановимся на наиболее значимых результатах GWAS последних лет. Перепроверка

установленных ранее в индивидуальных испытаниях локусов риска РА показала, что не все они преодолевают принятый для GWAS «порог» статистической значимости ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) [74]. Кроме известных, открыто еще семь локусов, ассоциированных с риском развития серопозитивного РА и верифицированных в независимых популяциях. По итогам этой работы выявлен 31 локус, детерминирующий генетическую предрасположенность европейского населения к РА. В 2012 г. опубликованы результаты исследования 11 475 индивидов



с РА и 15 870 контрольных субъектов европейского происхождения по 129 464 маркерам [75], в котором идентифицировано 14 новых локусов, что увеличило число подтвержденных локусов риска РА для европейского населения до 46. Девять из них ассоциированы с РА в целом, а пять — с АЦЦП/АСРА-позитивным артритом. В этом же году было выявлено 9 новых локусов для населения Японии и представлены доказательства их перекрытия с европейскими популяциями [76].

В 2014 г. опубликованы итоги исследования когорты, объединяющей более 100 тыс. лиц европейского и азиатского происхождения (29 880 случаев РА и 73 758 контрольных образцов), по 10 млн SNPs [77]. В рамках этой работы открыты 42 новых локусов риска РА, дополняющих уже имеющиеся до 101, и идентифицировано 98 генов-кандидатов, принадлежащих к разным патогенетическим путям. Характерно, что среди 42 новых локусов, ассоциированных с РА в общей выборке при  $p < 5 \times 10^{-8}$ , большая часть (27) проявляла такую же связь у европеоидов, а меньшая часть (6) — у азиатов. Остальные ассоциации установлены на более низком уровне значимости. Несомненным достоинством этой работы является классификация генов риска в зависимости от их участия в различных звеньях иммунитета. Показано, что большая часть аллелей риска ассоциирована с нарушениями регуляции иммунитета, комбинированным иммунно-дефицитом, а также относится к молекулярным путям В-, Т-клеточного иммунитета и опосредованной цитокинами сигнальной трансдукции. Продемонстрирована общность ассоциаций некоторых генов с раком крови, что вместе с предыдущими находками указывает на вклад вполне определенных генетических факторов, молекулярных путей и типов иммунных клеток в патогенез РА. Кроме того, обнаружено, что ряд генов может служить мишенями для улучшенной терапии РА, и подтверждена важность генетических исследований для развития таргетной терапии заболевания.

Мета-анализ 2016 г. результатов 22-х GWAS (14 361 случаев РА и 43 923 контрольных образцов из 18 исследований европеоидов, 4873 случаев РА и 17 642 контроля из 4 исследований азиатов) выявил 221 ген, ассоциированный

с РА [78]. Этот новый перечень включал 71 перекрывающийся ген, 76 — специфичных для европейцев и 74 — специфичных для азиатов генов, свидетельствуя, что этнические вариации должны учитываться в этиологии заболевания. Кроме того, было обнаружено, что свойственные лицам азиатского происхождения гены образуют кластеры в пределах хромосомы 6, тогда как для «европейских» генов характерно распределение по множеству хромосом, с чем, возможно, связана высокая генетическая гетерогенность РА у европейцев. Более половины вновь идентифицированных у азиатов аллельных вариантов относится к семейству гистоновых (1H) генов, которые составляют меньше 1/10 всех «европейских» генов. Общеизвестно, что гистоны играют центральную роль в регуляции транскрипции, репарации ДНК, репликации и стабильности хромосом, что в комплексе с новыми данными проливает свет на этнические различия в этиологии и патогенезе РА.

Полногеномный поиск ассоциаций и мета-анализ целого ряда таких исследований с каждым годом пополняет список генов, вносящих существенный вклад в генетическую предрасположенность к РА, вскрывая причины генетической гетерогенности заболевания и подтверждая актуальность изучения генетических факторов риска его развития в определенных этногеографических условиях. Предположительно для белорусской популяции представляют интерес гены, наиболее тесно связанные с РА у европеоидов. Из ранее установленных к таковым можно отнести: *HLA-DRB1* (rs6910071), подтвердивший ассоциацию на уровне  $p < 10^{-299}$ , *PTPN22* (rs2476601), связь которого с РА доказана при  $p = 9,1 \times 10^{-74}$ , *TNFAIP3* (rs6920220), ассоциированный с РА при  $p = 8,9 \times 10^{-13}$  [74]. Среди перекрывающихся вновь выделенных аллельных вариантов наиболее тесную ассоциацию у европеоидов проявляли: *HLA-F* (OMIM 143110) при  $p = 1,03E-31$ ; *HLA-DMA* (OMIM 142855) при  $p = 2,75E-133$ ; *HLA-G* (OMIM 142871) при  $p = 3,34E-34$ . Среди специфичных для европеоидов к таким относились: *PHTF* (putative homeodomain transcription factor 1, OMIM 604950) ассоциирован с РА при  $p = 1,74E-147$ ; *RPS18* (ribosomal protein S18, OMIM 180473) ассоциирован с РА при  $p = 9,49E-37$  [78].



Однако необходимо помнить, что указанные ассоциации установлены благодаря мета-анализу объединенных выборок, общая численность которых достигала нескольких десятков тысяч, тогда как проведение исследований в конкретных популяциях сталкивается с проблемой малых выборок, как правило, недостаточных для доказательства статистической значимости наблюдаемых отклонений в распределении генотипов/аллелей. Тем не менее, поскольку перечисленные генетические варианты обладают уже доказанной высокой рисковой значимостью, их присутствие укажет на предрасположенность носителей к РА, а включение таких лиц в группы тщательного медицинского мониторинга будет способствовать более эффективной профилактике и ранней диагностике заболевания. Другое ограничение вытекает из множества генов, вовлеченных в патогенез РА. При столь обширном спектре генетических вариантов риска их индивидуальный вклад, за исключением единичных (например, *HLA*), очень невелик. В большинстве случаев показатель отношения шансов (OR) не превышает 1,5, поэтому представляется целесообразной оценка влияния комбинированных генотипов, так как по аналогии с онкологическими заболеваниями можно ожидать значительное усиление небольших эффектов SNPs при их «коллективном» воздействии на риск возникновения болезни [79].

#### 2.4. Эпигенетика РА

За последние 10 лет существенно обогащены знания по генетике ревматоидного артрита; идентифицированы гены-кандидаты, ответственные за предрасположенность к заболеванию, среди которых доминирующее положение занимают множественные рисковые аллели в пределах *HLA-DRB1* локуса [32, 80]. Однако, кроме генетического полиморфизма, в развитие и проявление симптомов болезни весомый вклад вносит экспрессия тех или иных генов и их продуктов. Об этом свидетельствует создание лекарственных средств, направленных на прицельное подавление фактора некроза опухоли и других цитокинов, играющих центральную роль в воспалительном каскаде [81].

Естественным способом регулирования экспрессии генов является посттранскрипционная модификация гистона и метилирование

цитозинового оснований ДНК, что изменяет доступность хроматина и транскрипцию путем связывания транскрипционных факторов с промоторными сайтами [82]. Поэтому изучение эпигенетики РА помогает понять, почему генетически предрасположенные индивиды в одном случае поражаются болезнью, а в другом нет, и объяснить наблюдаемую гетерогенность как симптомов заболевания, так и его ответов на лечение [45, 83, 84].

Данные по эпигенетике РА пока ограничены, однако анализ метилирования ДНК Т-лимфоцитов и фибробласто-подобных синовиоцитов от пациентов с РА показал глобальное гипометилирование по сравнению с контролем [85]. Широкогеномное исследование фибробласто-подобных синовиоцитов от пациентов с РА или остеоартритом выявило изменения в метилировании множества локусов, связанных с движением, адгезией и транспортом клеток [86]. При исследовании паттерна метилирования в промоторе гена *IFNG*, кодирующего растворимый цитокин, принадлежащий к II классу интерферонов, обнаружено гипометилирование в  $CD4^+CD28^-$  Т клетках по сравнению с  $CD4^+CD8^+$  Т клетками, что сопровождалось продукцией повышенного уровня IFN- $\gamma$  после TCR (T-cell receptor) стимуляции, то есть стимуляции комплекса мембранных белков, участвующих в активации Т-лимфоцитов [87]. Более реалистичным для клинической практики представляется изучение процесса метилирования как терапевтической мишени [84]. Существует ряд эффективных медикаментозных средств против РА, однако часть пациентов положительно реагирует на лечение, тогда как другие невосприимчивы. В идеале было бы полезно идентифицировать тех, кто не отвечает на лечение, используя для этой цели паттерны метилирования как предикторы терапевтических ответов [84].

#### 2.5. Клинические и молекулярно-генетические особенности ревматоидного артрита в сравнении с ювенильным идиопатическим артритом

Различия между ревматоидным артритом и ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА), прежде всего, касаются сроков манифестации: ЮИА поражает детей от одного года до 16 лет; ревматоидный артрит развивается

у взрослых в любом возрасте от 18 лет и старше с преимущественным дебютом по разным оценкам от 40 до 70 лет. Различия отражены в классификации заболеваний. ЮИА по классификации ILAR имеет 7 подтипов, включая олигоартрит, серонегативный и серопозитивный полиартрит, системный, псориазический и энтезит-связанный артрит, а также недифференцированный артрит [88], тогда как ревматоидный артрит взрослых рассматривается отдельно и нуждается в дифференциальной диагностике от остеоартрита, псориазического артрита, подагры, реактивного артрита и других типов воспалительных заболеваний суставов [89]. В табл. 4 приведены некоторые клинические признаки трех основных типов артрита, которые позволяют дифференцировать их друг от друга.

Между РА и ЮИА больше сходства вследствие общности иммунно-патогенетических механизмов [19, 90]. Характерно одинаковое гендерное предпочтение, так как чаще болеют девочки и женщины. Тем не менее, наблюдаются различия по серологическим показателям: в детском и подростковом возрасте чаще диагностируется серонегативный артрит [88], тогда как у взрослых в 75–85% случаев — серопозитивный артрит [35].

Семейную историю имеют от 15% до 30% пациентов с ЮИА [91, 92], а доля наследственности у взрослых оценивается еще выше: 60–70% [26, 30], хотя последние исследования на близнецах и сибсах пробандов с ЮИА указали на больший, по-видимому, сравнимый с РА взрослых, вклад наследственности [93]. Значительная часть генетической компоненты у взрослых обусловлена генетической изменчивостью гена *HLA* в области общего эпитопа: до 70% пациентов с РА отличаются аллельным полиморфизмом этого локуса [32, 80]. До недавнего времени считалось, что эти аллели связаны исключительно с серопозитивным артритом. Вклад полиморфизма генов *HLA* в ЮИА существенно ниже (не более 13% [94]), что, по-видимому, объясняет значительно меньшую встречаемость серопозитивного артрита у детей. У пациентов с ЮИА идентифицированы варианты генов риска, перекрывающиеся с генами, увеличивающими предрасположенность к РА у взрослых [95]. К ним гарантированно можно отнести *HLA* DQB1-DQA2

(rs7775055), ассоциированный с ЮИА при  $p = 3,1 \times 10^{-174}$ , *PTPN22* (rs6679677), демонстрирующий связь с ЮИА при  $p = 3,2 \times 10^{-25}$ , *STAT4* (rs10174238), проявляющий ассоциацию при  $p = 1,3 \times 10^{-13}$  [93].

В связи с общностью иммунно-патогенетических механизмов, ряда клинических проявлений и генетических факторов, в современной литературе ставится под сомнение правильность и обоснованность деления первичного воспалительного поражения суставов в зависимости от возраста [96]. Авторами предлагается сгруппировать эти заболевания в 4 главных кластера, независимо от того, поражают они взрослых или детей, а именно: серопозитивный и серонегативный артрит (включая отдельную группу с дебютом в раннем детстве), спондилоартрит и системный артрит. В этом контексте представляют интерес данные о некоторой генетической специфичности разных подтипов ЮИА [93], что, по-видимому, указывает на разные молекулярные пути их патогенеза. Однако пока общепринятой остается точка зрения, что РА и ЮИА — это отдельные независимые болезни, и в качестве поддержки можно сослаться на различия во влиянии ряда генетических маркеров на предрасположенность к артриту взрослых и детей. Это, прежде всего, касается *HLA* генов, вклад которых значительно больше при ревматоидном артрите у взрослого населения, тогда как доленое участие генов, не относящихся к главному комплексу гистосовместимости, превалирует в формировании предрасположенности к ЮИА.

Нами начато изучение генетических основ патогенеза ЮИА на когорте белорусских пациентов. Проанализированы образцы ДНК от пациентов с ЮИА, воспалительными поражениями суставов другой этиологии и контрольной группы по полиморфизму ряда генов: *TNF $\alpha$* , *PTPN22*, *MIF*, *CTLA4*, *STAT4*, *TRAF1/C5*, входящих в известный перечень генов-кандидатов, повышающих риск развития ЮИА в европейских популяциях [94, 97]. Несмотря на ограниченность выборки, выявлены некоторые ассоциации и закономерности влияния полиморфизма ряда проанализированных локусов на развитие заболевания. Обнаружена ассоциация гетерозиготного генотипа и минорного аллеля *PTPN22* C1858T

Таблица 4

Сравнительная клиническая характеристика трех основных типов артрита  
(адаптировано из [90])

Признаки	Остеоартрит	Ревматоидный артрит	Подагра
Сроки манифестации	Месяцы	Недели, месяцы	Часы для развития атаки
Преимущественная локализация	Коленные, голеностопные суставы; позвоночник; суставы рук	Проксимальные межфаланговые суставы кистей рук, голеностопные, коленные, тазобедренные суставы	Большой палец стопы, голеностопный сустав, коленный, локтевой суставы
Воспаление	Может возникать, но умеренное по сравнению с ревматоидным артритом	Да	Да
Радиологические изменения	Остеофиты, местный остеосклероз	Сужение суставной щели, эрозии кости	Четко ограниченные повреждения кости («punched out» bone erosions)
Лабораторные параметры	Нет	Анемия, повышенные С-реактивный белок, ревматоидный фактор, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду	Кристаллы уратов в суставах
Другие признаки	Нет системных признаков; узелковые образования	Локтевое отклонение, S-образная деформация кистей, нарушение сгибания-разгибания	Тофи-узелки вследствие отложения уратов, камни в почках

(rs2476601) с патологией суставов, особенно у пациентов мужского пола. При анализе межгенного взаимодействия у мальчиков установлено повышение риска развития суставной патологии под влиянием комбинации этого генотипа с определенными генотипами гена *TNFA* [98]. Выявлена ассоциация минорного аллеля T и соответствующего гомозиготного генотипа *STAT4* (rs7574865) с риском развития РФ-негативного полиартрита у детского населения Беларуси [99]. Показано двукратное превышение частоты гомозиготного генотипа GG гена *TRAF1/C5* (rs3761847) у пациентов с ЮИА относительно контроля с наиболее значимыми различиями ( $p < 0,0001$ ) у девочек. Установлено существенное увеличение частоты минорного аллеля G у пациентов с системным заболеванием относительно олигоартрита, что свидетельствует о повышении риска развития тяжелого по клиническому течению

подтипа заболевания по сравнению с более легкой олигоартикулярной формой у носителей этого аллеля. Было бы интересно сравнить влияние данных генетических вариантов на развитие ЮИА и РА для выяснения общих и альтернативных молекулярно-генетических механизмов патогенеза ревматоидного артрита у взрослых и детей в белорусской популяции.

### Заключение

Ревматоидный артрит имеет древнюю (около 4–6 тыс. лет) историю, гипотетически был завезен в Европу из Нового света после открытия Колумбом Американского континента. В настоящее время РА распространен по всему миру, поражает примерно 1% населения планеты. Заболевание социально значимо, так как кардинально ухудшает качество жизни пациентов и приводит к инвалидизации из-за быстро развивающейся деструкции хрящевой

и костной ткани, деформации суставов и ограничения двигательных функций. Этиология болезни неизвестна, однако уже не вызывает сомнения преобладающий вклад наследственных факторов. Установлена наиболее значимая связь риска развития РА с генами главного комплекса гистосовместимости, включая общий эпитоп. Найдены гены вне этого комплекса, ассоциированные с РА.

У пациентов отсутствуют мажорные мутаций, всецело определяющие риск возникновения и течение болезни. Поэтому поиск ассоциаций касается SNPs и идет двумя путями: в индивидуальных исследованиях при проверке рискованности отдельных генов, ответственных за воспалительный и иммунный ответ, образование и функции цитокинов и другие клеточные процессы, а также с помощью инновационных биотехнологий, таких как полногеномный поиск ассоциаций (GWAS). Установлено множество верифицированных в независимых выборках ассоциаций РА с генами, которые задействованы в В- и Т-клеточном иммунитете и цитокиновом сигналинге, что указывает на полигенную природу данного заболевания. Показана этническая специфичность для ряда генов: по последним данным перечень из 221 генов-кандидатов включает 71 перекрывающийся ген, 76 — специфичных для европейцев и 74 — специфичных для азиатов генов, что свидетельствует о значительной роли этнических вариаций в этиологии заболевания.

Начаты исследования в области эпигенетики РА. Обнаружено глобальное метилирование генома Т-лимфоцитов и фибробласто-подобных синовиоцитов у пациентов с РА и изменение паттерна гипометилирования ДНК в промоторе гена интерферона гамма, а также других локусов, связанных с движением, адгезией и транспортом клеток. Изучение эпигенетических аспектов РА может объяснить неодинаковую реализацию восприимчивости к болезни у генетически предрасположенных индивидов, наблюдаемую гетерогенность симптомов заболевания и его ответов на лечение вариативностью экспрессии задействованных генов и их продуктов. Последнее представляет научную основу для разработки таргетной терапии РА.

Изучение генетических основ ревматоидного артрита является необходимой частью

современного подхода к совершенствованию мер профилактики, диагностики, прогноза и лечения данного заболевания. Сравнение вклада определенных генов в развитие ЮИА и РА актуально для дальнейшего познания молекулярно-генетических путей патогенеза аутоиммунной патологии суставов, их общности и различий у взрослых и детей.

### Список источников

1. Ягур, В.Е. Ревматоидный артрит: проблемы диагностики и лечения. 20 лет спустя / В.Е. Ягур, В.Г. Апанасович // Гродно: ГрГУ, 2017. — 606 с.
2. Smolen, J.S. Rheumatoid arthritis / J.S. Smolen, D. Aletaha, I. B. McInnes // *Lancet*. — 2016. — Vol. 388, № 10055. — P. 2023–2038.
3. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 / I.R. Lozano [et al.] // *Lancet*. — 2012. — Vol. 380, № 9859. — P. 2095–2128.
4. Mortality in Rheumatoid Arthritis (RA): factors associated with recording RA on death certificates / E. Molina [et al.] // *BMC Musculoskeletal Disord*. — 2015. — Vol. 16: 277.
5. Wasserman, A.M. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis / A.M. Wasserman // *American Family Physician*. — 2011. — Vol. 84, № 11. — P. 1245–1252.
6. How many life years are lost in patients with rheumatoid arthritis? Secular cause-specific and all-cause mortality in rheumatoid arthritis, and their predictors in a long-term Australian cohort study / M.N. Lassere [et al.] // *Intern. Med. J.* — 2013. — Vol. 43, № 1. — P. 66–72.
7. Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study / J. van den Hoek [et al.] // *Rheumatol. Int.* — 2017. — Vol. 37, № 4. — P. 487–493.
8. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review / Y. Alamanos [et al.] // *Semin. Arthritis Rheum.* — 2006. — Vol. 36, № 3. — P. 182–188.
9. Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio / T.K. Kvien // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2006. — Vol. 1069. — P. 212–222.
10. Ngo, S.T. Gender differences in autoimmune disease / S.T. Ngo, F.J. Steyn, P.A. Mc-



- Combe // *Frontiers in Neuroendocrinology*. — 2014. — Vol. 35, № 3. — P. 347–369.
11. Jefferies, W.M. The etiology of rheumatoid arthritis / W.M. Jefferies // *Med. Hypotheses*. — 1998. — Vol. 51, № 2. — P. 111–114.
12. Historical perspective on the etiology of rheumatoid arthritis / P. Entezami [et al.] // *Hand. Clin. Clin.* — 2011. — Vol. 27, № 1. — P. 1–10.
13. Appelboom, T. Hypothesis: Rubens — one of the first victims of an epidemic of rheumatoid arthritis that started in the 16th-17th century? / T. Appelboom // *Rheumatology (Oxford)*. — 2005. — Vol. 44, № 5. — P. 681–683.
14. Mathew, A.J. Infections and arthritis / A.J. Mathew, V. Ravindran // *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* — 2014. — Vol. 28, № 6. — P. 935–959.
15. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis / J. Chen [et al.] // *Genome Med.* — 2016. — Vol. 8: 43.
16. Coit, P. The human microbiome in rheumatic autoimmune diseases: A comprehensive review / P. Coit, A.H. Sawalha // *Clin. Immunol.* — 2016. — Vol. 170. — P. 70–79.
17. Associations of smoking and age with inflammatory joint signs among unaffected first-degree relatives of rheumatoid arthritis patients: results from studies of the etiology of rheumatoid arthritis / J.A. Sparks [et al.] // *Arthritis Rheumatol.* — 2016. — Vol. 68. — P. 1828–1838.
18. An ImmunoChip-based interaction study of contrasting interaction effects with smoking in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis / X. Jiang [et al.] // *Rheumatology (Oxford)*. — 2016. — Vol. 55. — P. 149–155.
19. Firestein, G.S. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis / G.S. Firestein, I.B. McInnes // *Immunity*. — 2017. — Vol. 46, № 2. — P. 183–196.
20. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / S. Maateen [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2016. — Vol. 55. — P. 161–171.
21. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis / F. Angelotti [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* — 2017. — Vol. 35, № 3. — P. 368–378.
22. Giaglis, S. “The NET Outcome”: Are Neutrophil Extracellular Traps of Any Relevance to the Pathophysiology of Autoimmune Disorders in Childhood? / S. Giaglis, S. Hahn, P. Hasler // *Front Pediatr.* — 2016. — Vol. 4:97.
23. Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs / E. Corsiero [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2016. — Vol. 75, № 10. — P. 1866–1875.
24. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis / F.C. Arnett [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 1988. — Vol. 31. — P. 315–324.
25. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative / D. Aletaha [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2010. — Vol. 62, № 9. — P. 2569–2581.
26. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins / A.J. MacGregor [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2000. — Vol. 43, № 1. — P. 30–37.
27. Familial aggregation of rheumatoid arthritis and co-aggregation of autoimmune diseases in affected families: a nationwide population-based study / C.F. Kuo [et al.] // *Rheumatology (Oxford)*. — 2017. — Vol. 56, № 6. — P. 928–933.
28. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions / K. Hemminki [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2009. — Vol. 60, № 3. — P. 661–668.
29. Genetics of rheumatoid arthritis — a comprehensive review / J. Kurkó [et al.] // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* — 2013. — Vol. 45, № 2. — P. 170–179.
30. Van der Helm-van Mil, A.H. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis / A.H. van der Helm-van Mil, J.Z. Wesoly, T.W. Huizinga // *Curr. Opin. Rheumatol.* — 2005. — Vol. 17, № 3. — P. 299–304.
31. Choo, SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications / S.Y. Choo // *Yonsei Med. J.* — 2007. — Vol. 48, № 1. — P. 11–23.
32. Holoshitz, J. The Rheumatoid Arthritis HLA-DRB1 Shared Epitope / J. Holoshitz // *Curr. Opin. Rheumatol.* — 2010. — Vol. 22, № 3. — P. 293–298.
33. Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheuma-



- toid arthritis / A. Kapitany [et al.] // *Isr. Med. Assoc. J.* — 2008. — Vol. 10, № 1. — P. 32–36.
34. HLA-DR genotypes in familial rheumatoid arthritis: increased frequency of protective and neutral alleles in a multicase family / S. Zsila [et al.] // *J. Rheumatol.* — 2005. — Vol. 32, № 12. — P. 2299–2302.
35. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis / K. Nishimura [et al.] // *Ann. Intern. Med.* — 2007. — Vol. 146, № 11. — P. 797–808.
36. Bovin, L.F. Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis. Discriminative genes and effect of rheumatoid factor / L.F. Bovin, K. Rieneck, C. Workman // *Immunol. Lett.* — 2004. — Vol. 93, № 2-3. — P. 217–226.
37. Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region / B. Ding [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2009. — Vol. 60, № 1. — P. 30–38.
38. A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis / L. Padyukov [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2011. — Vol. 70, № 2. — P. 259–265.
39. Anti-citrullinated peptide/protein antibody (ACPA)-negative RA shares a large proportion of susceptibility loci with ACPA-positive RA: a meta-analysis of genome-wide association study in a Japanese population / C. Terao [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* — 2015. — Vol. 17:104.
40. Traylor, M. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis in a UK African ancestry population: the GENRA case-control study / M. Traylor, C. Curtis, H. Patel // *Rheumatology (Oxford)*. — 2017. — Vol. 56, № 8. — P. 1282–1292.
41. Castro-Santos, P. Genetics of rheumatoid arthritis: a new boost is needed in Latin American populations / P. Castro-Santos, R. Díaz-Peña // *Rev. Bras. Reumatol. Engl. Ed.* — 2016. — Vol. 56, № 2. — P. 171–177.
42. Delgado-Vega, A.M. Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin American patients with rheumatoid arthritis / A.M. Delgado-Vega, J.M. Anaya // *Autoimmun. Rev.* — 2007. — Vol. 6. — P. 402–408.
43. Rheumatoid arthritis in Latin Americans enriched for Amerindian ancestry is associated with loci in chromosomes 1, 12, and 13, and the HLA class II region / D. López Herráez [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2013. — Vol. 65. — P. 1457–1467.
44. Shared Epitope Alleles Remain A Risk Factor for Anti-Citrullinated Proteins Antibody (ACPA) — Positive Rheumatoid Arthritis in Three Asian Ethnic Groups. / T. Chun-Lai [et al.] // *PLoS ONE*. — 2011. — Vol. 6:e21069.
45. Viatte, S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis / S. Viatte, D. Plant, S. Raychaudhuri // *Nat. Rev. Rheumatol.* — 2013. — Vol. 9, № 3. — P.141–153.
46. Stastny, P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis / P. Stastny // *Clin. Invest.* — 1976. — Vol. 57, № 5. — P. 1148–1157.
47. Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients / S. Viatte [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2012. — Vol. 71. — P. 1984–1990.
48. A spectrum of susceptibility to rheumatoid arthritis within HLA-DRB1: stratification by autoantibody status in a large UK population / S.L. Mackie [et al.] // *Genes Immun.* — 2012. — Vol. 13. — P. 120–128
49. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis / A. Suzuki [et al.] // *Nat. Genet.* — 2003. — Vol. 34, № 4. — P. 395–402.
50. Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels with PADI4 haplotypes in early rheumatoid arthritis and with shared epitope alleles in very late rheumatoid arthritis / S. Cha [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2007. — Vol. 56, № 5. — P. 1454–1463.
51. Korcowska, I. Rheumatoid arthritis susceptibility genes: An overview / I. Korcowska // *World J. Orthop.* — 2014. — Vol. 5, № 4. — P. 544–549.
52. Association between the rs7574865 polymorphism of STAT4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis / Y.H. Lee [et al.] // *Rheumatol. Int.* — 2010. — Vol. 30, № 5. — P. 661–666.
53. Elshazli, R. Association of PTPN22 rs2476601 and STAT4 rs7574865 polymorphisms with rheumatoid arthritis: A meta-analysis update / R. Elshazli, A. Settin // *Immunobiology*. — 2015. — Vol. 220, № 8. — P. 1012–1024.
54. Genetic risk factors for rheumatoid arthritis differ in Caucasian and Korean populations /

- H.S. Lee [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2009. — Vol. 60, № 2. — P. 364–371.
55. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences / Y. Kochi [et al.] // *J. Autoimmun.* — 2009. — Vol. 32, № 3–4. — P. 158–162.
56. Lee, Y.H. FCGR2A, FCGR3A, FCGR3B polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis / Y.H. Lee, S.C. Bae, G.G. Song // *Clin. Exp. Rheumatol.* — 2015. — Vol. 33, № 5. — P. 647–654.
57. Contribution of PTPN22 1858T, TNFR11 196R and HLA-shared epitope alleles with rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies to very early rheumatoid arthritis diagnosis / V. Goëb [et al.] // *Rheumatology (Oxford)*. — 2008. — Vol. 47, № 8. — P. 1208–1212.
58. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis—a genomewide study. / R.M. Plenge [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2007. — Vol. 357, № 12. — P. 1199–1209.
59. Association of STAT4 rs7574865 polymorphism with autoimmune diseases: a meta-analysis / Y.L. Liang [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* — 2012. — Vol. 39, № 9. — P. 8873–8882.
60. Perricone, C. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story / C. Perricone, F. Ceccarelli, G. Valesini // *Autoimmun. Rev.* — 2011. — Vol. 10. — P. 599–608.
61. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis / X. Li [et al.] // *J. Clin. Immunol.* — 2012. — Vol. 32. — P. 530–539.
62. PADI4 polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis / Y.H. Lee [et al.] // *Rheumatol. Int.* — 2007. — Vol. 27. — P. 827–833.
63. IRF5 rs2004640 single nucleotide polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in South Indian Tamils / V.S. Negi [et al.] // *Tissue Antigens.* — 2014. — Vol. 84, № 5. — P. 465–470.
64. A Combination of CD28 (rs1980422) and IRF5 (rs10488631) Polymorphisms Is Associated with Seropositivity in Rheumatoid Arthritis: A Case Control Study / L.Vernerova [et al.] // *PLoS One.* — 2016. — Vol. 11, № 4:e0153316.
65. Associations between interleukin-23 receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis / G.G. Song [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* — 2012. — Vol. 39, № 12. — P. 10655–10663.
66. Association of a single-nucleotide polymorphism in CD40 with the rate of joint destruction in rheumatoid arthritis / M.P. Song [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2009. — Vol. 60, № 8. — P. 2242–2247.
67. Study of association of CD40-CD154 gene polymorphisms with disease susceptibility and cardiovascular risk in Spanish rheumatoid arthritis patients / M. García-Bermúdez [et al.] // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7, № 11:e49214.
68. Caucasian and Asian specific rheumatoid arthritis risk loci reveal limited replication and apparent allelic heterogeneity in north Indians / P. Prasad [et al.] // *PLoS One.* — 2012. Vol. 7, № 2:e31584.
69. Kochi, Y. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility // Y. Kochi, Y. Okada, A. Suzuki / *Nat. Genet.* — 2010. — Vol. 42, № 6. — P. 515–519.
70. Bush, W.S. Chapter 11: Genome-wide association studies / W.S. Bush., J. H. Moore // *Public Library of Science for Computational Biology.* — 2012. — Vol. 8, № 12: e1002822
71. Pearson, T.A. How to interpret a genome-wide association study / T.A. Pearson, T. A. Manolio // *JAMA.* — 2008 — Vol. 299, № 11. — P. 1335–1344.
72. Ioannidis, J.P. Validating, augmenting and refining genome-wide association signals / J.P. Ioannidis, G. Thomas, M.J. Daly // *Nat. Rev. Genet.* — 2009. — Vol. 10, № 5. — P. 318–329.
73. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits / L.A. Hindorff [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — Vol. 106. — P. 9362–9367.
74. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci / EA, Stahl [et al.] // *Nat. Genet.* — 2010. — Vol. 42. — P. 508–514.
75. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis / S. Eyre [et al.] // *Nat. Genet.* — 2012. — Vol. 44, № 12. — P. 1336–1340.
76. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population / Y. Okada, [et al.] // *Nat. Genet.* — 2012. — Vol. 44. — P. 511–516.
77. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery / Y. Oka-

- da [et al.] // *Nature*. — 2014. — Vol. 506, № 7488. — P. 376–381.
78. Gene-Based Genome-Wide Association Analysis in European and Asian Populations Identified Novel Genes for Rheumatoid Arthritis / H. Zhu [et al.] // *PLoS One*. — 2016. — Vol. 11, № 11:e0167212.
79. Genetic variants in urinary bladder cancer: collective power of the “wimp SNPs” / K. Golka [et al.] // *Arch. Toxicol.* — 2011. — Vol. 85, № 6. — P. 539–554.
80. Van Drongelen, V. Human Leukocyte Antigen-Disease Associations in Rheumatoid Arthritis / V. van Drongelen, J. Holoshitz // *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* — 2017. — Vol. 43, № 3. — P. 363–376
81. Adalimumab, etanercept, infliximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: a systematic review and economic evaluation / Malotki K. [et al.] // *Health Technol. Assess.* — 2011. — Vol. 15, № 14. — P. 1–278.
82. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types / J. Ernst [et al.] // *Nature*. — 2011. — Vol. 473. — P. 43–49.
83. Oppermann, U. Why is epigenetics important in understanding the pathogenesis of inflammatory musculoskeletal diseases? / U. Oppermann // *Arthritis Res. Ther.* — 2013. — Vol. 15. — P. 209–218.
84. Cribbs, A. Towards an understanding of the role of DNA methylation in rheumatoid arthritis: therapeutic and diagnostic implications / A. Cribbs, M. Feldmann, U. Oppermann // *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* — 2015. — Vol. 7, № 5. — P. 206–219.
85. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts / E. Karouzakis [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2009. — Vol. 60. — P. 3613–3622.
86. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis / K. Nakano [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2013. — Vol. 72. — P. 110–117.
87. Peripheral and site-specific CD4(+) CD28(Null) T cells from rheumatoid arthritis patients show distinct characteristics / J. Pieper [et al.] // *Scand. J. Immunol.* — 2014. — Vol. 79. — P. 149–155.
88. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001 / R.E. Petty [et al.] // *J. Rheumatol.* — 2004. — Vol. 31, № 2. — P. 390–392.
89. Agabegi, E.D. Step-Up to Medicine. Step-Up Series. 4<sup>th</sup> Edition / E.D. Agabegi, S.S. Agabegi. // Walter Kluwer: 2016. — 593 p. (table 6–6 P. 257).
90. Hahn, Y.S. Pathogenesis and clinical manifestations of juvenile rheumatoid arthritis / Y.S. Hahn, J.G. Kim // *Korean J. Pediatr.* — 2010. — Vol. 53, № 1. — P. 921–930.
91. Quantification of the familial contribution to juvenile idiopathic arthritis / S. Prahalad [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2010. — Vol. 62, № 8. — P. 2525–2529.
92. Familial autoimmunity in the Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance registry / Prahalad S. [et al.] // *Pediatr. Rheumatol. Online J.* — 2016. — Vol. 14, № 1:14
93. Hersh, A.O. Immunogenetics of juvenile idiopathic arthritis: A comprehensive review / A.O. Hersh, Prahalad S. // *J. Autoimmun.* — 2015. — Vol. 64. — P. 113–124.
94. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis / A. Hinks [et al.] // *Nat. Genet.* 2013. — Vol. 45, № 6. — P. 664–669
95. Overlap of disease susceptibility loci for rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis / A. Hinks [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2010. — Vol. 69, № 9. — P. 1049–1053.
96. Nigrovic, P.A. Genetics and the classification of arthritis in adults and children / P.A. Nigrovic, S. Raychaudhuri, S.D. Thompson // *Arthritis Rheumatol.* — 2017. — doi: 10.1002/art.40350.
97. Prahalad, S. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis / S. Prahalad, D.N. Glass // *Pediatr. Rheumatol. Online J.* — 2008. — Vol. 6:11.
98. Частота генотипов и аллелей полиморфных локусов генов воспалительного ответа PTN22, TNF $\alpha$  и MIF у детского контингента Республики Беларусь / Н.В. Савина [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: Сб. науч. трудов.* — 2016. — Т. 22. — С. 14–24.
99. Полиморфизм генов STAT4 и CTLA4 у населения Беларуси в связи с предрасположенностью к заболеванию ювенильным идиопатическим артритом / А.А. Яцкив [и др.] // *Медицинская генетика.* — 2016. — Т. 15, № 8. — С. 46–48.

T.D. Kuzhir

## RHEUMATOID ARTHRITIS: HISTORICAL AND CURRENT ASPECTS

Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus  
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

The data on origin and epidemiology, etiology, pathogenesis and clinical traits of rheumatoid arthritis (RA) are briefly summarized in this review. Influence of allelic variants involved in different cellular process, cytokine-mediated signal transduction, immune and inflammatory responses is discussed. The principal role of the major histocompatibility complex and a shared epitope, as well as contribution of non-*HLA* genes to susceptibility to RA has been considered in terms of patients' ethnicity and the serological status of the disease. Some aspects of epigenetics and comparison of RA and juvenile idiopathic arthritis genetic features have been also referred. The current findings reported indicate the defining value of hereditary factors in RA etiology and pathogenesis as well as a polygenic nature of this disease.

**Key words:** rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, immune and inflammatory responses, gene polymorphism.

*Дата поступления статьи: 26 декабря 2017 г.*



Н.И. Рябоконт

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К АУТОИММУННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ У ДЕТЕЙ (Обзорная статья)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

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

Представлен обзор литературных данных по генетическим локусам, ассоциированным с возникновением и развитием моногенных и полигенных (многофакторных) аутоиммунных заболеваний у детей и подростков. Полигенные заболевания рассмотрены на примере наиболее изученных в молекулярно-генетических аспектах ювенильного ревматоидного артрита и системных заболеваний соединительной ткани (системной красной волчанки, системной склеродермии и синдрома Кавасаки). Обзор сфокусирован в основном на работах с использованием полногеномного поиска ассоциаций и мета-анализов, охватывающих большой объем генома и большие выборки детей, что позволило авторам работ получить наиболее статистически значимые результаты, которые обладают максимальным потенциалом для практического использования с целью выявления генетической предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям у детей. Обсуждается проблема неспецифичности генетических локусов и генетического перекрытия (совпадения) среди полигенных аутоиммунных заболеваний.

**Ключевые слова:** аутоиммунные заболевания у детей, моногенные аутоиммунные заболевания, системные заболевания соединительной ткани, генетическая предрасположенность, генетический полиморфизм.

### Введение

Аутоиммунные заболевания представляют гетерогенную группу, состоящую, по данным Национального института здоровья США, из более чем 80 заболеваний и синдромов [1]. Они включают в себя ряд патологий, при которых иммунная система проявляет аутореактивность, поражая клетки, ткани и органы собственного организма и часто являясь причиной инвалидизации и преждевременной смерти. Общая частота этих заболеваний может составлять 8% для таких экономически развитых стран, как США, при этом количество заболевших достигает 14,7–23,5 млн человек [1], а каждые 5 лет регистрируется более 1 млн новых случаев [2].

Многие аутоиммунные заболевания возникают в детском и подростковом возрасте (до 16 лет), что усиливает их социальную значимость. Особенностью детского организма является процесс активного роста и наличие критических физиологических периодов, способствующих появлению пограничных состояний, а также иммунопатологических отклонений [3]. Раннее (в детском и подростковом возрасте) возникновение различных аутоим-

мунных заболеваний рассматривается некоторыми исследователями как проявление первичного иммунодефицита [4].

Аутоиммунные заболевания, несмотря на разнообразие вовлеченных в процесс систем организма и сложный патогенез, на первых этапах возникновения часто имеют схожую клиническую картину и в той или иной степени общую этиологию с обязательным участием генетической компоненты [1]. Схожесть симптомов усложняет раннюю постановку диагноза и своевременное назначение эффективного лечения. Немаловажной также является профилактика заболеваемости, которая требует знаний о наличии генетической предрасположенности. Таким образом, выявление генетических маркеров риска возникновения аутоиммунных заболеваний позволит осуществить идентификацию генетически предрасположенных детей, составляющих группы риска, с целью проведения профилактических мероприятий, улучшения диагностики, а также индивидуализации лечебного подхода [1]. Высказывается предположение, что некоторые генетические маркеры могут использоваться не только для диагностики аутоиммунных заболеваний, но

и оказывать помощь в классификации их нозологических форм [5].

Подавляющее большинство аутоиммунных заболеваний являются мультифакторными. Точная причина их возникновения остается неизвестной. Среди факторов риска находятся множественные факторы окружающей среды, включая инфекционное (бактериальное и/или вирусное) заражение [1]. В то же время предполагается, что основной вклад (в среднем около 30%) в заболеваемость вносит генетический фактор, определяющий генетическую предрасположенность [1]. Для различных аутоиммунных заболеваний генетическая компонента разными авторами исследований определяется как сильная, средняя или слабая. При этом отмечается, что усиление эффектов генетической (наследственной) предрасположенности может происходить под воздействием внешних факторов и множественных эпигенетических модификаций генома, которым также отводится немаловажная роль в этиологии аутоиммунных заболеваний [6–8]. Предполагается, что детские аутоиммунные заболевания имеют более сильную генетическую составляющую, поскольку дети имели меньше времени, чем взрослые, на то, чтобы другие факторы (внешняя среда и образ жизни) повлияли на риск развития заболеваний [9].

Определены сотни генов и геномных локусов ДНК человека, ассоциированных с аутоиммунными заболеваниями, подтверждая тем самым полигенный характер предрасположенности к этим заболеваниям. Установлено, что большинство этих участков генома вовлечено в возникновение нескольких аутоиммунных заболеваний — явление, описываемое как генетическое перекрытие (genetic overlap) [10]. Этот факт вполне согласуется со схожей этиологией и патофизиологией аутоиммунных заболеваний, а также с одновременным развитием нескольких заболеваний из этой группы у отдельных лиц. Отмечается плейотропный эффект генов, и предлагаются подходы с использованием полногеномного поиска ассоциаций (GWAS — genome-wide association studies) с целью выявления таких генов [11]. Таким образом, обнаруженные генетические маркеры в своем подавляющем большинстве не являются специфическими (уникальными) для каждого конкретного заболевания, отно-

сятся к локусам риска возникновения многих заболеваний из этой группы [10, 12, 13] и могут использоваться лишь в определенных комбинациях для определения индивидуальной предрасположенности к заболеванию [13].

Предполагается, что определенные подгруппы (кластеры) аутоиммунных заболеваний имеют общие механизмы возникновения. Для каждой отдельно взятой подгруппы выделяют как общие, так и отдаленные генетические локусы. Однако накопленных данных недостаточно, чтобы построить генетическую архитектуру (сеть), отражающую генетическое сходство и отдаленность отдельных аутоиммунных заболеваний внутри группы [10, 14, 15]. Это в наибольшей степени справедливо для ювенильных аутоиммунных заболеваний [10], в т. ч. у населения Беларуси, т. к. генетические исследования аутоиммунных заболеваний в белорусской популяции только начинаются [16, 17 и др.].

Имеются немногочисленные аутоиммунные заболевания (аутоиммунный полиэндокринный синдром 1-го типа, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром и X-сцепленный синдром иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии), возникновение которых, как правило, определяется мутациями в одном гене, нарушающими функцию T-регуляторных клеток. Эти редкие заболевания характерны для детского и подросткового возраста. Им отводится особая роль в понимании патофизиологии аутоиммунных заболеваний в целом [18, 19].

## 1. Моногенные аутоиммунные заболевания

### 1.1. Аутоиммунный полиэндокринный (полигландулярный) синдром 1-го типа (АПС-1)

АПС-1 — эндокринное аутоиммунное заболевание, проявляющееся в одновременной или последовательной дисфункции двух и более эндокринных желез и имеющее широкое разнообразие фенотипических проявлений. Основные симптомы АПС-1 (два из трех) — хроническая клиническая надпочечниковая недостаточность, гипопаратиреоз и хронический кожно-слизистый кандидоз. Поражение эндокринной системы при АПС-1 может сопровождаться неэндокринными заболеваниями. Возникает в детском и подростковом воз-

расте, но в более легкой форме может также обнаружиться у взрослых, что часто не сразу диагностируется как АПС-1 [20, 21].

Считается генетическим (моногенным) заболеванием, ассоциированным с возникновением мутаций в гене аутоиммунной регуляции *AIRE*, продукт которого относится к факторам транскрипции, регулирующим экспрессию гена, участвующего в негативной селекции аутореактивных Т-лимфоцитов или, другими словами, в контроле аутоolerантности. Мутации подавляют работу *AIRE* с различным фенотипическим проявлением. Известно более 100 мутаций этого гена, связанных с АПС-1 [22]. Предполагается, что подавляющее большинство из них имеет аутосомно-рецессивный тип наследования (классическая рецессивная форма АПС-1). Таким образом, гетерозиготные носители не проявляют нарушения аутоиммунитета [18]. Наиболее частые мутации — R257X, R139X, Y85C, L323Sfsx51 и др. Их обнаружение и частоты связаны с той или иной популяцией, что дает основание для предположения об «эффекте основателя» [18, 23]. Для жителей России наиболее частой является мутация R257X, которая обнаружена в гомо- или гетерозиготном состоянии у более чем 60% пациентов с АПС-1 [24, 25]. Не установлена специфическая корреляция между анализируемым генотипом и фенотипическим проявлением заболевания [23]. Поиск новых мутаций продолжается. Выявлены новые миссенс-мутации этого гена в домене PHD1, которые в гетерозиготном состоянии приводят к частичному ингибированию функции гена и широкому спектру симптомов с органоспецифическими аутоиммунными эффектами, наследующихся по аутосомно-доминантному принципу. При этом наблюдается позднее проявление АПС-1 с более легким фенотипом (неклассическая доминантная форма). В случае диаллельных мутаций в PHD1 домене происходит классическое проявление АПС-1 [22]. У пациентов с диаллельными мутациями в домене HSR/CARD полностью подавлена работа гена *AIRE* и наследование заболевания осуществляется по аутосомно-рецессивному принципу [22, 26]. Кроме того, в SAND и PHD1 доменах также обнаружено 5 аутосомно-доминантных мутаций [27].

Одновременно накапливается все больше данных о ключевой роли транскрипционного фактора *AIRE* и его активности в предотвращении развития аутоиммунитета [27, 28]. Также предполагается, что некоторые мутации гена *AIRE* могут приводить к распространенным формам аутоиммунных заболеваний, таким как аутоиммунный тиреодит и др. [29]. Показано, что *AIRE* менее активно экспрессируется у девочек, чем у мальчиков после пубертатного периода, что описано авторами как эстроген-зависимое явление, которое, вероятно, приводит к последующему увеличению чувствительности женщин (в отличие от мужчин) к ряду аутоиммунных заболеваний [30]. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о возможном вовлечении гена *AIRE* в этиологию не одного, а нескольких аутоиммунных заболеваний.

## 1.2. X-сцепленный синдром иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии (IPEX)

IPEX — наследственное аутоиммунное заболевание с эндокринными нарушениями, диареей, поражением кожи и другими симптомами. Проявляется у мальчиков на первом году жизни и является летальным без иммуносупрессии и/или пересадки костного мозга. Обусловлено мутациями в гене *FOXP3*, локализованном на X-хромосоме и кодирующем транскрипционный фактор семейства Forkhead, контролирующий развитие и функции Т-клеток и таким образом участвующий в негативной регуляции иммунного ответа. Мутации гена *FOXP3* приводят к дисфункции и дефициту регуляторных Т-клеток и тяжелым аутоиммунным расстройствам [18, 20, 31]. Обнаружено 63 мутации данного гена в связи с IPEX [32]. Девочки, являющиеся носителями мутаций гена *FOXP3*, не проявляют признаков заболевания и в целом здоровы. Мутации *FOXP3* выявлены приблизительно у 25% мальчиков с фенотипическим проявлением данного заболевания. Обнаружено, что мутации других генов (*CD25*, *STAT5b*, *ITCH*, *STAT1*), локализованных на аутосомах и затрагивающих функционирование Т-регуляторных клеток (понижающих или повышающих их активность), могут вызывать схожее фенотипическое проявление [19, 31], ставя под сомнение моногенную природу IPEX.

### 1.3. Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС)

Аутоиммунное заболевание кроветворной ткани, относящееся к первичным иммунодефицитам и характеризующееся нарушением апоптоза лимфоцитов и, соответственно, накоплению аутореактивных лимфоцитов. Может дебютировать у детей и взрослых с широким разнообразием фенотипических проявлений. Возникает при гетерозиготных мутациях в гене *TNFRSF6* рецептора FAS (CD95), инициирующего апоптоз. Однако у пациентов с АЛПС также обнаружены мутации и в других генах, участвующих в FAS-регулируемом апоптозе. При этом различают следующие фенотипические формы заболевания: тип Ia — основное заболевание с мутациями гена *TNFRSF6*, тип Ib — с мутациями гена *TNFSF6*, кодирующего лиганд FAS-рецептора, тип IIa — с мутациями в гене каспазы 10, тип IIc — с мутациями в гене каспазы 8 [18]. У пациентов с АЛПС встречаются с низкой частотой также мутации в протоонкогенах семейства RAS (*NRAS* и *KRAS*), которые регулируют клеточное деление и рост [33].

Таким образом, накопленные данные свидетельствуют о том, что аутоиммунные заболевания, ранее отнесенные к моногенным, имеют сложную молекулярно-генетическую основу. Их возникновение определено не одним специфическим для каждого заболевания, а несколькими генами, как установлено для АЛПС и предполагается для IPЕХ. Кроме того, на примере АПС-1 видно, что ключевой ген данного заболевания может быть вовлечен в возникновение ряда других аутоиммунных заболеваний.

### 2. Полигенные (мультифакторные) аутоиммунные заболевания на примере системных заболеваний соединительной ткани

Особое место среди полигенных аутоиммунных заболеваний у детей и подростков занимает ювенильный ревматоидный (или идиопатический) артрит (ЮРА или ЮИА) — хроническое заболевание с прогрессирующим поражением преимущественно периферических суставов, — а также системные заболевания соединительной ткани, характеризующиеся полиорганым иммуновоспалительным поражением, затрагивающим кожу, суставы, почки, сердце и т. д.

Среди системных заболеваний соединительной ткани у детей наиболее распространена системная красная волчанка (СКВ), а также не менее значимы системная склеродермия (ССк) и системные васкулиты, включая синдром Кавасаки. Частота системных заболеваний у детей является достаточно высокой. Так, оценка административных баз данных Канады показала, что распространенность системных аутоиммунных заболеваний у детей в различных провинциях этой страны составляет от 15,9 до 23 случаев на 100 тыс. человек в возрасте до 18 лет с преобладанием у девочек и детского населения урбанизированных районов [34].

Сильную ассоциацию с аутоиммунными заболеваниями, в т. ч. с ЮРА, имеют гены главного комплекса гистосовместимости, известные у человека как *HLA*-гены, которые кодируют антигены HLA типа (Human Leucocyte Antigen — лейкоцитарный антиген человека) [5, 35]. *HLA* представляют собой гликопротеиды, локализованные на клеточных мембранах и отвечающие за развитие иммунного ответа на чужеродные антигены, в т. ч. за иммунитет к инфекциям. Сами *HLA* также являются сильными антигенами, играющими существенную роль в развитии аутоиммунных заболеваний. Известно более 250 *HLA*-генов и более 1000 их аллельных вариантов, располагающихся на 6-й хромосоме. Такое разнообразие *HLA*-генов обеспечивает, с одной стороны, эффективную защиту против множества антигенов, а, с другой стороны, может быть причиной предрасположенности к развитию аутоиммунных патологий [1].

Однако их генетическая компонента в предрасположенности к этой группе заболеваний не является решающей и по отношению к ЮРА оценивается в 13% [35]. Поэтому представляет интерес поиск других (не-*HLA*) генов, ассоциированных с аутоиммунными заболеваниями.

В этом отношении полногеномное ассоциативное исследование (GWAS), а также метаанализ нескольких исследований — оба подхода, основанные на мощных методических приемах, преодолевающих проблемы малых выборок, — предоставляют наиболее статистически значимые результаты и позволяют выявлять новые генетические локусы, связанные с заболеваниями, а также прояснять глубокие молекулярно-генетические механизмы их этиологии. Однако до настоящего времени



широкогеномные исследования аутоиммунных заболеваний не имеют системного характера для детского населения и сосредоточены чаще всего на аналогичных заболеваниях у взрослых, рассеяны между этническими группами, широким спектром самих заболеваний и их подтипов, разнятся по используемым методическим подходам и объему исследуемых групп. Наибольшее количество таких исследований ювенильных заболеваний проведено для ЮРА как наиболее распространенного детского ревматоидного заболевания с сильной геномной компонентой [36].

### 2.1. Ювенильный ревматоидный артрит (ЮРА, ювенильный идиопатический артрит — ЮИА)

ЮРА (ЮИА) — комплексное генетическое заболевание, характеризующееся воспалительными процессами суставов и соединительных тканей других частей тела, включая такие жизненно важные органы, как сердце, почки, печень и т. д. Часто имеет симптоматическую картину, схожую с другими заболеваниями. Клиническая гетерогенность самого заболевания позволяет предполагать разнообразие факторов, которые инициируют ЮРА [3]. В соответствии с Международной лигой ассоциаций по ревматологии (International League of Associations for Rheumatology), ЮРА включает 7 подтипов (форм) заболевания [37]: олигоартикулярная, полиартикулярная серонегативная по ревматоидному фактору (РФ отрицательный), полиартикулярная серопозитивная по ревматоидному фактору (РФ положительный), системная, псориазическая, энтезит-ассоциированная и неклассифицированная форма.

ЮРА регистрируется с частотой 12 случаев на 100 тыс. населения США [10]. Для сравнения ревматоидный артрит у взрослых (РА) встречается с частотой от 500 до 1,1 тыс. на 100 тыс. населения (США и северной Европы) [10]. В Беларуси частота ЮРА составляет 28,8 случаев на 100 тыс. детского населения (согласно отчетам внештатных специалистов Министерства здравоохранения Республики Беларусь). Большинство пациентов имеют олигоартикулярную и полиартикулярную формы ЮРА. Среди заболевших преобладают девочки.

В 2017 г. с использованием GWAS и мета-анализа проведено самое крупное исследование

«случай-контроль» для детей с ЮИА: собрана группа из 2751 пациентов европеоидной расы с олиго- и полиартикулярной (РФ отрицательный) формами заболевания и контрольная группа из 15 886 детей [36]. С использованием Affymetrix Genome-Wide Human SNP, Array 6.0, а также Illumina HumanCoreExome-12+ Array (Exome Array) выявлены 9 участков генома, ассоциированных с ЮИА, из них 4 (*PRR9\_LOR*, *ILDR1\_CD86*, *RNF215* и *LINC00951*) были обнаружены впервые, представлены рисковыми аллелями и предположительно являются специфичными для ЮИА (табл. 1). Однако последнее предположение нуждается в дальнейших исследованиях. Оставшаяся часть новых локусов, ассоциированных с ЮИА, перекрывалась с локусами других аутоиммунных заболеваний: целиакией (глутеновой энтеропатией), рассеянным склерозом, аутоиммунным тиреоидитом, диабетом II типа, СКВ [36].

В ранее проведенном (2013 г.) полногеномном исследовании ассоциаций Hinks с соавторами [35] была собрана выборка из 2816 детей с олигоартикулярным и полиартикулярным (РФ отрицательный) ЮИА и 13 056 детей контрольной группы. Генотипирование выполнено с использованием Illumina ImmunoChip. Были подтверждены сведения по ассоциации с заболеванием 3-х ранее известных локусов: *HLA*, *PTPN22* и *PTPN2*. Последние два гена кодируют белки из семейства тирозинных фосфатаз, являющихся регуляторами иммунной системы, и ассоциированы с рядом аутоиммунных заболеваний [38, 39]. Кроме этого, в работе Hinks с соавторами [35] идентифицированы 14 новых локусов, с высокой степенью достоверности ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) ассоциированных с ЮИА. Из них только 5 были ассоциированы с риском возникновения заболевания (табл. 1). Также обнаружены 11 локусов, которые предположительно могут быть связаны с ЮИА и нуждаются в дальнейшем изучении. При этом все обнаруженные не-*HLA* аллели оказались ассоциированы с другими аутоиммунными заболеваниями. Тем не менее, было отмечено, что некоторые наиболее значимые полиморфизмы (топ-полиморфизмы) одних заболеваний не совпадали с топ-полиморфизмами других [35].

В 2012 г. была опубликована работа Thompson et al. [9] по результатам исследований (с ис-

**Таблица 1**

**Области генома, имеющие статистически существенную ассоциацию с возникновением ЮИА у детей европейского происхождения по результатам полногеномного поиска ассоциаций**

Генетический локус	Хромосома	Наиболее значимый SNP	Минорный аллель	Частота минорного аллеля, случай/контроль	Лучшее значение P	OR	Позиция SNP	Форма ЮИА	Публикация
<i>HLA-DQB1/HLA-DQA2</i>	6	rs7775055	G	0,12/0,02	$3,4 \times 10^{-174}$	6,01	Межгенная	Олиго- и полиартикулярный	[35]
<i>PTPN22</i>	1	rs6679677	A	0,14/0,1	$3,19 \times 10^{-25}$	1,59	Межгенная	Олиго- и полиартикулярный	[35]
<i>STAT4</i>	2	rs10174238	G	0,28/0,23	$1,28 \times 10^{-13}$	1,29	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[35]
<i>PTPN2</i>	18	rs2847293	A	0,2/0,17	$1,44 \times 10^{-12}$	1,31	Межгенная	Олиго- и полиартикулярный	[35]
<i>SH2B3/ATXN2</i>	12	rs3184504	A	0,54/0,49	$2,60 \times 10^{-9}$	1,2	Кодирующая (не синонимичная)	Олиго- и полиартикулярный	[35]
		rs7137828	C	0,54/0,49	$1,61 \times 10^{-9}$	1,20	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[35]
<i>ERAP2/LNPEP</i>	5	rs27290	G	0,47/0,44	$7,5 \times 10^{-9}$	1,32	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[35]
		rs27293	A	0,47/0,44	$7,37 \times 10^{-9}$	1,31	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[35]
<i>UBE2L3</i>	22	rs2266959	A	0,22/0,19	$6,2 \times 10^{-9}$	1,24	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[35]
<i>ATP8B2/IL6R</i>	1	rs11265608	A	0,12/0,1	$2,75 \times 10^{-8}$	1,33	Межгенная	Олиго- и полиартикулярный	[35]
		rs72698115	C	0,12/0,1	$1,26 \times 10^{-8}$	1,36	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[35]
<i>FAS</i>	10	rs7069750	C	0,48/0,44	$2,93 \times 10^{-8}$	1,18	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[35]
<i>PRR9_LOR</i>	1	rs873234 ☼	A	0,40/0,37	$5,12 \times 10^{-8}$	1,43	Межгенная	Олиго- и полиартикулярный	[36]
<i>PTH1R</i>	3	rs1138518	T	0,42/0,37	$1,87 \times 10^{-7}$	1,23	Кодирующая (синонимичная)	Олиго- и полиартикулярный	[36]

Продолжение табл. 1

Генетический локус	Хромосома	Наиболее значимый SNP	Минорный аллель	Частота минорного аллеля, случай/контроль	Лучшее значение P	OR	Позиция SNP	Форма ЮИА	Публикация
<i>ILDRI_CD86</i>	3	rs111700762☼	A	0,08/0,06	$6,73 \times 10^{-8}$	1,45	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[36]
<i>LINC00951</i>	6	rs10807228☼	T	0,36/0,33	$5,80 \times 10^{-7}$	1,42	Межгенная	Олиго- и полиартикулярный	[36]
<i>AHLI_LINC00271</i>	6	rs9321502	C	0,43/0,40	$3,48 \times 10^{-7}$	1,18	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[36]
<i>WDFY4</i>	10	rs1904603	G	0,29/0,25	$1,79 \times 10^{-7}$	1,27	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[36]
<i>RNF215</i>	22	rs5753109☼	C	0,31/0,28	$3,09 \times 10^{-7}$	1,19	Интрон	Олиго- и полиартикулярный	[36]
<i>C3orf1</i>	3	rs4688011	T	0,24/0,19	$3,60 \times 10^{-7}$	1,37	Межгенная	Все ЮИА	[9]
<i>JMJD1C</i>	10	rs6479891	T	0,19/0,13	$5,39 \times 10^{-5}$	1,59	Межгенная	Все ЮИА	[9]

☼ — авторами работ отмечена специфичность данного варианта локуса для ЮИА

пользованием Affymetrix SNP 6.0 Array) группы детей европеоидной расы с ЮИА всех подтипов (814 случаев) и контрольной группы (658 человек). В работе впервые описаны 2 локуса, заслуживающих внимания: *C3orf1*, расположенного около гена *CD80*, и локус, прилегающий к гену *JMJD1C*. Минорные T-аллели выявленных локусов были статистически значимо ассоциированы в данном исследовании с риском возникновения ЮИА (табл. 1).

Ранее, в 2010 г., Thompson с соавторами [40] выполнена работа по поиску среди известных локусов аутоиммунных заболеваний тех, которые ассоциированы с ЮИА. Для этого использованы результаты GWAS по 10 заболеваниям: РА, диабет 1-го типа, анкилозирующий спондилит, СКВ, воспалительное заболевание кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит, целиакия, рассеянный склероз, псориаз и псориатический артрит, тиреодит. Идентифицированы 233 локуса, содержащих 519 однонуклеотидных полиморфизма (SNPs — single nucleotide polymorphisms). Из них только 425 SNPs из не-*HLA* локусов прошли кон-

троль качества генотипирования и выбраны для работы. Эти выбранные полиморфизмы протестированы на 809 пациентах с ЮИА (олиго- и полиартикулярной формы, РФ отрицательный) и 531 человек из контрольной группы (все европейцы не испанского происхождения). Для генотипирования использованы чипы того же производства, что и в работе, описанной выше. Проведенные исследования позволили найти 7 локусов, чувствительных к возникновению ЮИА, из них 4 были известны ранее для данного заболевания: *PTPN22*, *STAT4*, *C12orf30* и *ADAD1-IL2-IL21*. Три новых локуса включали *PTPN2*, *COG6* и *ANGPT1*, из них только *PTPN2* является рисковым (табл. 1).

В целом, описанные выше и другие широкогеномные исследования позволили выявить ряд локусов, ассоциированных с ЮРА. Из них только часть составляют локусы риска возникновения заболевания (наиболее значимые перечислены в табл. 1), остальные обладают протекторными эффектами в отношении данного заболевания. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что генетическая предрасположенность к ЮРА определяется

многими локусами ДНК, общими с другими аутоиммунными заболеваниями, что говорит о генетическом перекрытии ЮРА и широкого спектра аутоиммунных заболеваний и предполагает общие патофизиологические механизмы. Все описанные локусы риска развития ЮРА в той или иной степени вовлечены в аутоиммунитет и, в частности, затрагивают Т-клеточный и цитокиновый сигналинг, а также другие процессы внутри клеток. Как и при других аутоиммунных заболеваниях, большинство ЮРА-ассоциированных генетических полиморфизмов локализованы не в кодирующей области генома. Это подтверждает предположение о том, что ЮРА является заболеванием, возникающим вследствие нарушения регуляции генов. Для некоторых выявленных SNPs показано влияние на экспрессию генов [36].

## 2.2. Системная красная волчанка (СКВ)

СКВ является диффузным заболеванием соединительных тканей с широким полиорганным спектром эффектов, что усиливает клиническую гетерогенность заболевания и дает основание для предположения о том, что СКВ может служить прототипом системных заболеваний, в т. ч. с генетической точки зрения [10, 41]. Главными органами-мишенями аутоиммунитета и воспалительных процессов при СКВ являются кожа, кровеносные сосуды и почки. Почечная недостаточность (волчаночный нефрит) — одна из наиболее сложных форм проявления СКВ — наблюдается у 25–60% взрослых пациентов в зависимости от этнической принадлежности, с наименьшей частотой у европейцев [42]. При СКВ происходит хроническая стимуляция врожденного и адаптивного (приобретенного) иммунитета. Наиболее обычными и специфичными для СКВ антителами являются антитела к двойным нитям ДНК, при этом в различных тканях образуются иммунные комплексы, приводящие к локальным повреждениям и воспалению [42].

Эпидемиологические исследования СКВ, проведенные в США, Европе, Азии и Австралии за период 1950-е – начало 2006 г. [43], показывают существенные гендерные, возрастные, расовые, временные и региональные вариации в частоте заболевания. Значительно

более высокие частоты возникновения и распространения СКВ наблюдаются у лиц женского пола, а также в неевропеоидных расовых группах. Частоты распространения варьируют от 7 до 159 случаев на 100 тыс. населения [43].

Традиционно считалось, что СКВ — детское заболевание, поражающее в основном девочек. Однако заболевают СКВ как дети, так и взрослые [42]. Заболеваемость в детском возрасте (до 16–18 лет) составляет 15–20% от всех случаев СКВ [44]. В детских популяциях СКВ является самым распространенным системным аутоиммунным заболеванием [34]. Сравнительный анализ, проведенный исследовательскими группами Испанского общества по ревматологии (the Spanish Society of Rheumatology), двух когорт из 3428 человек с диагнозом СКВ, поставленным в возрасте после 18 лет (взрослая когорта, средний возраст — 38 лет), и 484 человек с первичной постановкой диагноза в возрасте до 18 лет (детская когорта, средний возраст — 16,6 лет) позволили установить следующие особенности. Детская форма заболевания отличалась от взрослой большим количеством клинических и иммунологических проявлений, большим семейным анамнезом, более длительной постановкой диагноза, а также тяжестью протекания с более частой необходимостью диализа и трансплантации почек [45]. Схожие результаты были получены при сравнительном изучении СКВ в турецкой популяции (выборка из 719 пациентов со взрослой формой СКВ и 216 — с ювенильной) [46], в Великобритании (413 и 511 человек со взрослой и ювенильной СКВ) [47], а также у жителей США (выборка из 48 пациентов, имеющих взрослую форму СКВ, и 31 человек — с ювенильной СКВ) [48], Кореи (соответственно 979 и 133 человека) [49] и других стран.

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что раннее (ювенильное) возникновения СКВ есть особая и более агрессивная форма заболевания и что имеются две подгруппы СКВ: взрослая и ювенильная [44], которые могут различаться и на молекулярно-генетическом уровне. Однако ранее не придавалось значения этому факту, и, следовательно, количество исследований по установлению молекулярно-генетических особенностей ювенильной формы СКВ ограничено.



В международных базах обнаружена лишь одна публикация с использованием большого массива данных и мета-анализа с целью выявления значимых генетических ассоциаций с ювенильной СКВ. В этой публикации описаны результаты проведения мета-анализа данных по 10 педиатрическим заболеваниям, включая СКВ и ЮИА [14]. Идентифицированы 27 известных геномных локусов, которые статистически значимо ассоциированы с тем или иным ювенильным заболеванием. Из них только аллель С (rs10822050) гена *ZNF365* (цинк-фингерного протеина 365) был ранее известен в связи с риском возникновения ювенильной СКВ, а также другого аутоиммунного заболевания — целиакии. Кроме того, выявлено 5 новых локусов-кандидатов риска возникновения аутоиммунных заболеваний у детей — *ADGRL2*, *TENM3*, *ANKRD30A*, *ADCY7* и *CD40LG*, — из которых только аллель А (rs7660520) гена *TENM3*, кодирующего трансмембранный белок, был ассоциирован с СКВ, а также с рядом других аутоиммунных заболеваний у детей (тироидитом, анкилозирующим спондилоартритом, целиакией, общим иммунодефицитом и ЮРА). Также в представленной работе [14] была построена генетическая архитектура (сеть) исследуемых ювенильных заболеваний, которая отражает плейотропный эффект генов.

В то же время молекулярно-генетические исследования объединенной группы СКВ (без выделения подгрупп с юношеским и взрослым периодом возникновения заболевания) проводились достаточно активно, в том числе с привлечением полногеномного поиска ассоциаций между генетическими вариантами и фенотипическими проявлениями заболевания. Эти исследования предполагают возможность использования обнаруженных локусов в качестве генетических маркеров предрасположенности к заболеванию, а также для генетической диагностики СКВ и персонализированного лечения [41].

К настоящему времени обнаружено более 80 генетических локусов, ассоциированных с возникновением СКВ, которые объясняют более чем на 50% генетическую природу заболевания. Из них более 70 локусов не принадлежат к *HLA*-типу, разбросаны по всему геному (не обнаружены только на 21-й

и Y-хромосоме). Около 90% рискованных локусов СКВ локализованы вне кодирующих областей генома. Список выявленных локусов риска возникновения СКВ представлен в работе [50], объединяя данные по 7 полногеномным исследованиям, проведенным на одной европейской популяции, 6 — азиатских и одной — индоамериканской, а также по серии последующих мета-анализов, выполненных с 2008 г. Для части локусов ассоциация с СКВ до настоящего времени изучена только на азиатских популяциях. Для европейской популяции ассоциация с СКВ установлена для более чем 50 не-*HLA*-локусов. В подавляющем большинстве минорные варианты этих локусов являются обычными во многих популяциях с частотой более 0,1% [50].

Кроме того, локусы риска СКВ, обнаруженные в европейской популяции, перекрываются с таковыми в других популяциях. Однако каждая популяция имеет свои уникальные генетические факторы риска на уровне локуса и аллелей [50]. Так, проведенный мета-анализ [51] результатов трех полногеномных ассоциативных исследований, выполненных на китайской и европейской популяции, показал, что СКВ-ассоциированные локусы более чем на 50% присутствуют во всех популяциях. В то же время сравнительный анализ частот этих аллелей в популяциях позволил сделать вывод о том, что в несколько (до 4-х) раз более повышенный риск СКВ в неевропейских популяциях и у выходцев из Африки и Азии как давно известный факт имеет генетическую основу [51].

Самое крупное полногеномное исследование ассоциаций с СКВ выполнено на группах, состоящих из лиц европейского происхождения: 7219 случаев СКВ и 15 991 чел. в контроле [52]. Генотипирование выполнено с использованием Illumina HumanOmni1-Quad BeadChip и Illumina HumanOmni2.5 BeadChip. Большой объем выборки позволил с максимальной статистической значимостью выделить генетические локусы, ассоциированные с СКВ. Среди них 10 были новыми и демонстрировали повышенную экспрессию транскрипционных факторов, что позволило предполагать их регуляторную роль в заболевании. Эти данные вошли в обзор, обсуждаемый выше [50].

СКВ-ассоциированные локусы вовлечены в различные сигнальные пути [50], включая:

- иммунный комплекс и фагоцитоз;
- деградацию ДНК и апоптоз, очистку от клеточного дебриса;
- нейтрофильный и моноцитарный сигналинг;
- сигналинг Toll-подобных рецепторов и интерферона 1;
- активацию ядерного фактора каппа-би (NF- $\kappa$ B);
- В- и Т-клеточные функции и сигналинг.

Некоторые локусы вовлечены в несколько сигнальных путей [50]. Однако все они могут быть также систематизированы на 4 более крупные категории: локусы, вовлеченные в лимфоцитарный сигналинг, сигналинг врожденного иммунитета, внутрипочечный сигналинг и в систему удаления иммунных комплексов [53]. Самое крупное полногеномное исследование европейской популяции [52], о котором упоминалось выше, позволило выделить ключевые локусы риска СКВ, вовлеченные в систему врожденного и приобретенного иммунитета.

Большинство генетических вариантов, ассоциированных с СКВ, показывают также связь с другими аутоиммунными заболеваниями. Однако имеются данные, свидетельствующие о том, что некоторые полиморфные варианты генов ассоциированы с ограниченным количеством заболеваний, включая СКВ.

Так, показано, что аллель А (rs1143679) гена *ITGAM*, несущего информацию о субъединице гетеродимерного рецептора интегрина (рецептора комплемента 3), играющего важную роль в фагоцитозе, ассоциирован с СКВ [54] и в меньшей степени с системной склеродермией (ССк) [55] и не показывает связи с такими заболеваниями, как ревматоидный артрит у взрослых (РА), а также ЮРА, диабет 1-го типа, рассеянный склероз, глютеновая болезнь и синдром Шегрена [54, 55]. Это предполагает, что описанный генетический вариант может быть специфически ассоциирован с СКВ и ССк [55].

Аналогичная закономерность установлена для аллеля Т (rs2004640) гена *IRF5*, кодирующего семейство регуляторных факторов интерферона и таким образом участвующего в ряде сигнальных путей (активации воспалительных цитокинов, активности иммунного

ответа, модуляции клеточного роста, дифференциации и апоптозе). Имеется множество публикаций, в т. ч. по результатам мета-анализа, включающего 22 исследования разных этнических групп [56], свидетельствующих о высокой ассоциации указанного аллеля с СКВ, ССк и рассеянным склерозом, но не с РА и ЮРА. При этом имеются сведения, дающие основание предполагать, что данный полиморфизм может приводить к усилению экспрессии и альтернативному сплайсингу экзона 1В этого гена [56].

Также выдвигается гипотеза о том, что мутации в гене *TREX1* приводят к дисфункции его продукта — 3'-5' экзонуклеазы, самой обычной внутриклеточной эндонуклеазы, играющей ключевые роли в репарации ДНК и деградации фрагментов ДНК [57], — и тем самым являются триггерами СКВ [58] и редких аутоиммунных заболеваний (синдром Айкарди-Готье, *chilblain lupus*, ретикулярная васкулопатия с церебральной лейкодистрофией), проявляющихся, как правило, в детском возрасте [59].

### 2.3. Системная склеродермия (ССк)

ССк — одно из наиболее сложных хронических аутоиммунных заболеваний, затрагивающих соединительные ткани, главным образом, кожу, но могут быть вовлечены артерии и внутренние органы (пищеварительный тракт, сердце, легкие, почки и др.). Протекает с воспалительными процессами, усиленной продукцией коллагена и образованием фиброзов (разрастаний соединительной ткани). Около 15–25% заболевших ССк имеют симптомы других аутоиммунных заболеваний (РА, СКВ и т. д.) [60], свидетельствуя о необходимости ранней постановки диагноза.

Ювенильная ССк, возникающая в возрасте до 16 лет, является достаточно редким заболеванием с ограниченным количеством эпидемиологических данных. В Соединенном королевстве Великобритании и Северной Ирландии частота появления ювенильной ССк в период с 2005 по 2007 г. оценивается в 0,27 случаев на 1 млн детей в год [61]. Среди взрослых пациентов с диагнозом ССк примерно 3–10% случаев возникли в детском возрасте [62, 63]. Межнациональный опрос, проведенный в 2002–2003 гг. рабочей группой по ювенильной склеродермии Европей-

ского общества педиатрической ревматологии (the Juvenile Scleroderma Working Group of the Pediatric Rheumatology European Society) с участием 55 педиатрических ревматологических центров по всему миру, включая Европу, Азию, Северную и Южную Америку, показал, что средний возраст первичной постановки диагноза равен 8,1 года, а среди заболевших 78,4% составляют девочки (соотношение полов — 3,6:1) [64].

Как и большинство детских ревматических заболеваний, ювенильная ССк отличается от взрослых эквивалентных форм заболеваний. Ювенильная ССк характеризуется несколько другими и часто перекрывающимися симптомами, клиническими и иммунологическими проявлениями, а также лучшим прогнозом, однако быстрым прогрессированием в тяжелых случаях [62, 63].

Молекулярно-генетические исследования ювенильной ССк только начинаются и в настоящий момент носят отрывочный характер.

Как и при других аутоиммунных заболеваниях, по-видимому, молекулы HLA вносят прямой вклад с патогенез ювенильной ССк, а HLA-локусы определяют значительную долю генетической предрасположенности к заболеванию. Анализ ассоциации с заболеванием аллелей HLA II-го класса (DRB1, DQA1 и DQB1), которые, как известно, в большой степени связаны с ССк у взрослых, проведен на группе детей европеоидной расы из трех педиатрических центров США (76 человек с ювенильной ССк и 581 человек в контроле) [65]. По мнению авторов, одним из важных наблюдений этой работы является то, что частоты самых значимых рисков HLA-аллелей для пациентов со взрослой формой ССк — аллели DRB1\*11 (DRB1\*11:01 и DRB1\*11:04) — не были существенно повышены при ювенильной ССк. Более того, аллель риска для взрослых DRB1\*01 не был обнаружен у детей с диагнозом ювенильная ССк в возрасте до 6 лет, однако наблюдался рост его частоты у детей старшего возраста (подгруппы 6–11 и 11–16 лет). Что касается других рисков аллелей, характерных для взрослых пациентов, то ассоциация с ССк у детей установлена для аллелей DRB1\*03 и DRB1\*10 (соответственно  $OR = 1,76$ ,  $P = 0,027$  и  $OR = 1,79$ ,  $P = 0,031$ ). Важной частью работы является

также обнаружение новой и значительно более сильной ассоциации с ювенильной ССк аллеля DRB1\*10 ( $OR = 7,48$ ,  $P = 0,0002$ ), который наблюдался у 10,5% пациентов и только у 1,5% детей в контроле [65]. Таким образом, результаты этого пилотного молекулярно-генетического исследования подтверждают особый, отличный от взрослых форм, статус ювенильной ССк.

По ССк у взрослых получен значительный прогресс в понимании генетической природы данного заболевания. Идентифицированы более 40 генов, существенно ассоциированных со склеродермией и аутоиммунитетом. Обсуждаются генетические и эпигенетические изменения, играющие важную роль в возникновении заболевания [66].

В начале 2018 г. опубликованы результаты первой работы по полногеномному поиску ассоциаций при ССк у взрослых [67]. Выборки составили 1833 случая и 3466 контроля для европеоидной расы, состоящей из жителей США и Испании, и 291 случай и 260 человек в контроле для афроамериканцев. Генотипирование проведено с использованием Illumina Infinium SNP microarray-ImmunoChip. В выборке европеоидной расы установлена существенная ассоциация с ССк 16 генов (*STAT4*, *TNPO3*, *IRF5*, *TNIP1*, *IL12RB2*, *BLK*, *ITGAM*, *IL12RB1*, *TNFAIP3*, *IL12A*, *TYK2*, *ATG5*, *CSK*, *JAZF1*, *PXK*, *DNASE1L3*), которые ранее были известны в связи с этим, а также другими аутоиммунными заболеваниями. У афроамериканцев из 19 изученных генов только *TNFAIP3* показал существенную ассоциацию с ССк. Кроме этого, идентифицированы 4 новых гена-кандидата, существенно ассоциированных с ССк (*STAT1*, *FCGR2C*, *NIPSNAP3B* и *SCT*), и 4 гена (*SERBP1*, *PINX1*, *TMEM175* и *EXOC2*), которые потенциально могут быть ассоциированы с данным заболеванием в популяции европеоидной расы. Некоторые из этих генов (*FCGR2C*, *SERBP1* и *EXOC2*), как известно, напрямую вовлечены в иммунный ответ [67].

Несмотря на существенный прогресс в изучении молекулярно-генетических основ ССк, гетерогенность заболевания, множественность факторов, задействованных в патогенезе, оставляют ССк одним из трудно понимаемых и сложно поддающихся лечению заболеваний [12, 68, 69].



#### 2.4. Системные васкулиты (СВ). Синдром Кавасаки

СВ — это группа заболеваний соединительной ткани, общим признаком которых является воспаление кровеносных сосудов с последующими ишемией и некрозом тканей. Классификация СВ у детей строится в основном на учете размера (калибра) пораженных сосудов [70]. В эту группу входит не менее 14 заболеваний. Однако из всех ювенильных СВ наибольший интерес представляет синдром Кавасаки, имеющий место почти исключительно у детей [70].

Синдром (болезнь) Кавасаки, или слизисто-кожно-лимфонодулярный синдром, характеризуется острым протеканием иммунного воспаления и деструктивных процессов в преимущественно средних и мелких сосудах, включая коронарные, с изменениями в слизистой оболочке, коже и лимфатических узлах. Коронарные дилатация и аневризм обнаруживаются у 15–25% заболевших синдромом Кавасаки без терапевтического лечения и являются основной причиной приобретенных заболеваний сердца у детей в различных странах, включая Северную Америку, Европу, Японию. Заболевание преобладает у мальчиков в возрасте до 5 лет [71–73]. Чаще обнаруживается в восточноазиатских популяциях. С наибольшей частотой встречается в Японии, Корее и Тайване, соответственно 239 [71], 133 [72] и 69 случаев [74] на 100 тысяч детей до 5 лет. В европейских популяциях заболеваемость значительно ниже, чем в азиатских: 11, 7 и 5 случаев на 100 тысяч детей в возрасте до 5 лет соответственно в Финляндии, Швеции и Норвегии [75]. Регистрируется ежегодный рост новых случаев возникновения этого заболевания во многих странах, включая Австралию [71, 72, 76].

Этиология и генетическая предрасположенность к синдрому Кавасаки недостаточно изучены, хотя работы в данном направлении ведутся очень активно. Так, в 2013 г. Международный генетический консорциум по синдрому Кавасаки (International Kawasaki Disease Genetics Consortium) провел крупное молекулярно-генетическое исследование данного заболевания [77] с использованием результатов двух широкогеномных работ, выполненных на когортах, проживающих в Тайване

(выходцы из Китая) [78] и Японии [79], и репликативных исследований, проведенных на группах из Кореи [80] и выходцев из Европы [81]. Общая выборка из азиатских популяций (Тайвань, Япония и Корея) составила 2539 пациентов с синдромом Кавасаки и 7021 человек контрольной группы, а выходцев из Европы — 405 пациентов с заболеванием и 6252 человек в контроле. В работе использованы чипы Affymetrix 6.0, Illumina Human Nap550v3 BeadChip, Illumina Human 610K Quad BeadChip и прямое секвенирование. Были получены убедительные доказательства ( $P = 4,74 \times 10^{-31}$ ) ассоциации аллеля rs2736340 гена В-лимфоидной тирозинкиназы *Blk* с заболеванием (табл. 2). Кроме того, у пациентов с рисковым аллелем в острой фазе заболевания установлена пониженная экспрессия гена *Blk* в В-лимфоцитах, свидетельствующая о ее функциональной роли в развитии предрасположенности к заболеванию [77]. В отношении других SNPs данного гена мета-анализ азиатской этнической группы дал менее значимые результаты: для rs6993775 и rs1382566 соответственно  $P = 9,21 \times 10^{-12}$  и  $P = 1,40 \times 10^{-5}$ . Ассоциация этих и других генетических вариантов с заболеванием в европейской группе была не доказана ( $P > 5 \times 10^{-8}$ ) [77].

В работах [78–81], включенных в исследование Международного генетического консорциума по полногеномному анализу ассоциаций [77], были выявлены и другие локусы, которые могут быть генетическими маркерами риска возникновения синдрома Кавасаки (табл. 2). Так, в японской когорте из 428 пациентов с синдромом Кавасаки и 3379 человек в контроле были установлены [79] значимые ассоциации с локусами *FAM167A-BLK* (rs2254546,  $P = 8,2 \times 10^{-21}$ ), *HLA-DQB2-HLA-DO* (rs2857151,  $P = 4,6 \times 10^{-11}$ ) и *CD40* (rs4813003,  $P = 4,8 \times 10^{-8}$ ), а также подтверждена ассоциация с заболеванием локуса *FCGR2A* (rs1801274,  $P = 1,6 \times 10^{-6}$ ), ранее выявленная Международным генетическим консорциумом по синдрому Кавасаки в 5 независимых коллекциях ДНК выходцев из Европы и Азии (2173 человека с синдромом Кавасаки и 9383 — из контрольной группы;  $P = 7,35 \times 10^{-11}$ ) [81]. Известно, что ген *FCGR2A* кодирует один из рецепторных белков иммуноглобулинов на поверхности клеток иммунного ответа, в т. ч. макрофагов и нейтрофилов и,



Таблица 2

Области генома, наиболее значимо ассоциированные с возникновением синдрома Кавасаки по результатам полногеномного поиска ассоциаций

Ген или локус	Хромосома	Наиболее значимый SNP	Минорный аллель (риска)	Частота минорного аллеля, случай/контроль	Лучшее значение P	Позиция	OR	Популяция	Публикация
<i>BLK</i>	8	rs2736340	T	~0,8/~0,7	4,74E-31	Промотор	1,58	Мета-анализ данных по Азии (Япония, Корея, Тайвань)	[77]
				0,290/0,251	3,66E-2		1,19		
<i>FAM167A-BLK</i>	8	rs2254546	G	~0,82/~0,72	8,2 E-21	Межгенная	1,85	Япония	[79]
<i>MIA-RAB4B</i>	19	rs2233152	A	~0,13/~0,09	2,51E-12	Межгенная	1,42	Выходцы из Европы и Азии	[81]
<i>ITPKC</i>	19	rs28493229	C	~0,10/~0,09	1,68E-12	Интрон	1,52	Выходцы из Европы и Азии	[81]
<i>HLA-DQB2-HLA-DO</i>	6	rs2857151	G	~0,82/~0,76	4,6E-11	Межгенная	1,47	Япония	[79]
<i>FCGR2A</i>	1	rs1801274	A	~0,71/~0,62	7,35E-11	Интрон	1,32	Выходцы из Европы и Азии	[79]
				-	1,6E-6				
<i>CD40</i>	20	rs1569723	A	~0,64/~0,56	5,67E-9	Интрон	1,42	Тайвань (выходцы из Китая)	[78]
		rs4813003	C	~0,71/~0,67	4,8 E-8		1,41		
<i>PEL1</i>	2	rs7604693	C	-	2,00E-6	Интрон	2,70	Корея	[80]
<i>lp31</i>	1	rs527409	T	-	1,46E-6	Межгенная	2,90	Корея	[80]
<i>NMNAT2</i>	1	rs2078087	T	-	8,93E-6–5,24E-8	Интрон	1,33	Корея	[88]
<i>HLA-C</i>	6	rs9380242	A	-		Межгенная	1,33–1,51	Корея	[88]
<i>HLA-B</i>		rs9378199	C	-		Межгенная		Корея	[88]
<i>MICA</i>		rs9266669	A	-		Межгенная		Корея	[88]
<i>HCP5</i>		rs6938467	G	-		Межгенная		Корея	[88]
<i>KCNN2*</i>		5	rs17136627	A		-		1,96E-8	Интрон
<i>CRP**</i>	1	rs12068753	A	-	1,11E-13	Межгенная	beta = 3,97	Корея	[87]

\*Ассоциация только с возникновением крупных аневризм коронарных артерий

\*\* Ассоциация только с повышенным уровнем С-реактивного белка в плазме крови

следовательно, вовлечен в фагоцитоз и очистку иммунных комплексов. Известно также, что SNP rs1801274 гена *FCGR2A* является несинонимичным (His167Arg), что подтверждает предположение о его значимой роли в дисрегуляции иммунного ответа. Корейский генетический консорциум по синдрому Kawasaki (The Korean Kawasaki Disease Genetics Consortium) провел стратифицированное по полу полногеномное ассоциативное исследование с последующим мета-анализом (всего изучено 1461 случая заболевания и 5302 человека в контроле) и установил статистически значимую ассоциацию синдрома Kawasaki с данным несинонимичным полиморфизмом у мальчиков ( $OR = 1,48$ ,  $P = 1,43 \times 10^{-7}$ ), но не у девочек, что согласуется с преобладанием заболевания среди детей мужского пола [82]. В одной из первых работ по влиянию эпигенетических факторов на риск возникновения синдрома Kawasaki показано, что заболевание также ассоциировано с гипометилированием гена *FCGR2A* [83].

В работе [81] с применением полногеномных исследований и мета-анализа были обнаружены еще 2 рискованных аллеля синдрома Kawasaki в локусе 19q13: *MIA-RAB4B* (rs2233152,  $OR = 1,42$ ,  $P = 2,51 \times 10^{-9}$ ) и *ITPKC* (rs28493229,  $OR = 1,52$ ,  $P = 1,68 \times 10^{-12}$ ) (табл. 2). Установлена функциональная значимость данного полиморфизма гена *ITPKC* (инозитол-1,4,5-трифосфат 3-киназы): показана его ассоциация с возникновением заболевания и риском повреждений коронарных артерий в японской когорте [84] и детей из различных этнических групп США [85], а также с низкой эффективностью сплайсинга мРНК. Это дает основание предполагать негативный эффект С-аллеля *ITPKC* на Т-клеточную активацию (повышение иммунной гиперактивности) через сигнальные пути  $Ca^{+2}/NFAT$  (ядерный фактор транскрипции активированных Т-клеток) [73].

В исследованиях по полногеномному анализу ассоциаций [78], проведенных на китайской когорте, проживающей на Тайване (622 случая заболевания и 1107 человек в контроле), обнаружен рискованный аллель (rs1569723,  $OR = 1,32$ ,  $P = 5,67 \times 10^{-9}$ ) гена *CD40*, кодирующего рецепторный белок из семейства TNF клеток иммунной системы

и таким образом вовлеченного в иммунные и воспалительные процессы.

В работе [80] при изучении корейской популяции (186 пациентов с заболеванием и 600 здоровых доноров) выявлены 2 новых локуса, ассоциированные с синдромом Kawasaki: 1p31 (rs527409,  $OR = 2,90$ ,  $P = 1,46 \times 10^{-6}$ ) и *PEL1I* на хромосоме 2p13.3 (rs7604693,  $OR = 2,70$ ;  $P = 2,00 \times 10^{-6}$ ). Дальнейшие исследования этой популяции позволили установить ассоциацию SNP гена *KCNN2* одной из субъединиц калиевого канала на поверхности клеток с появлением в коронарных артериях пациентов с синдромом Kawasaki аневризм крупных размеров (диаметр более 5 мм) [86]. Показано также, что один из трех выявленных полиморфизмов гена С-реактивного белка (*CRP*, rs12068753) имеет наиболее существенную ассоциацию с повышенным уровнем этого воспалительного белка в плазме крови пациентов с синдромом Kawasaki [87]. Позднее в этой же популяции широкогеномные исследования позволили обнаружить два новых локуса (табл. 2), ассоциированных с заболеванием: *NMNAT2* и *HLA*-область на хромосоме 6p21.3 [88].

Таким образом, GWAS позволили выделить несколько генов и локусов (табл. 2), определяющих предрасположенность к синдрому Kawasaki. Этот список расширен проведенным мета-анализом результатов 164 ассоциативных исследований [89]. Выделено 23 полиморфизма, которые значимо ассоциированы с заболеванием и обнаруживаются в следующих генах: *ACE*, *BLK*, *CASP3*, *CD40*, *FCGR2A*, *FGF $\beta$* , *HLA-E*, *IL1A*, *IL6*, *ITPKC*, *LTA*, *MPO*, *PDI*, *SMAD3*, *CCL17* и *TNF*. Кроме того, отмечено 10 вариантов генов *BTNL2*, *CASP3*, *FCGR2A*, *FGF23*, *FGF $\beta$* , *GRIN3A*, *HLA-E*, *IL10*, *ITPKC* и *TGFBR2*, которые могут быть биомаркерами риска возникновения аневризма коронарных сосудов при синдроме Kawasaki [89].

Несмотря на то, что существует острая необходимость в дополнительных методах ранней постановки диагноза и что часть генетических локусов предрасположенности к синдрому Kawasaki уже известна, их роль в патогенезе еще не совсем выяснена, а объем данных молекулярно-генетического анализа остается недостаточным для применения их в клинической практике [90, 91].

### Заключение

Представленный обзор литературных данных проведен с целью сбора и систематизации результатов исследований по генетическим локусам, ассоциированным с возникновением и развитием аутоиммунных заболеваний у детей и, следовательно, определяющих генетическую предрасположенность к ним. Обобщены данные по моногенным (АПС-1, IPEX и АЛПС) и полигенным аутоиммунным заболеваниям, включая ЮРА и системные заболевания соединительной ткани (СКВ, ССк и синдромом Кавасаки). Показано, что большинство выявленных локусов риска возникновения аутоиммунных заболеваний у детей не являются специфическими для конкретного заболевания, а характерны для нескольких из них. Тем не менее, некоторые топ-локусы одного заболевания не совпадают с топ-локусами других заболеваний, что может быть использовано при выборе комплексов ключевых маркеров отдельных заболеваний. Подавляющее большинство выявленных локусов риска аутоиммунных заболеваний у детей не апробированы на различных популяциях, несмотря на имеющиеся популяционные особенности. В целом, поиск локусов риска аутоиммунных заболеваний у детей представляет активно развивающееся направление молекулярно-генетических исследований.

*Обзор подготовлен в ходе выполнения задания 6.4 научно-технической программы Союзного государства «ДНК-идентификация» (2017–2021 гг.).*

### Список использованных источников

1. Progress in Autoimmune Diseases Research. Report to Congress / U.S. Department of Health and Human Services, National Institute of Health, The Autoimmune Diseases Coordinating Committee. — NIH publication No. 05-5140. — 2005. — 127 p.
2. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States / D.L. Jacobson [et al.] // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1997. — Vol. 84, № 3. — P. 223–243.
3. Козыро, И.А. Клиническая иммунология в практике врача-педиатра: учеб.-метод. пособие / И.А. Козыро, Г.М. Батян, А.В. Сукало. — Минск: БГМУ, 2011. — 32 с.
4. Carnerio-Sampaio, M. Early-onset autoimmune disease as a manifestation of primary immunodeficiency / M. Carnerio-Sampaio, A. Coutinho // Frontiers in Immunology. — 2015. — Vol. 24, № 6. — doi: 10.3389/fimmu.2015.00185.
5. Fine-mapping the MHC locus in juvenile idiopathic arthritis (JIA) reveals genetic heterogeneity corresponding to distinct adult inflammatory arthritic diseases / A. Hinks [et al.] // Ann. Rheum. Dis. — 2017. — Vol. 76, № 4. — P. 765–772.
6. Epigenetic alterations underlying autoimmune diseases / S. Aslani [et al.] // Autoimmunity. — 2016. — Vol. 49, № 2. — P. 69–83.
7. Epigenetic modifications and epigenetic based medication implementations of autoimmune diseases / M. Ahmadi [et al.] // Biomed. Pharmacother. — 2017. — Vol. 87. — P. 596–608.
8. Wang, Z. Epigenetic alterations in cellular immunity: new insights into autoimmune diseases / Z. Wang, Q. Lu, Z. Wang // Cell Physiol. Biochem. — 2017. — Vol. 41, № 2. — P. 645–660.
9. Genome-wide association analysis of juvenile idiopathic arthritis identifies a new susceptibility locus at chromosomal region 3q13 / S.D. Thompson [et al.] // Arthritis Rheum. — 2012. — Vol. 64, № 8. — P. 2781–2791.
10. Richard-Miceli, C. Emerging patterns of genetic overlap across autoimmune disorders / C. Richard-Miceli, L.A. Criswell // Genome Medicine. — 2012. — Vol. 4, № 1. — 6. — doi: 10.1186/gm305/
11. Zheng, W. Knowledge-based analysis of genetic associations of rheumatoid arthritis to inform studies searching for pleiotropic genes: a literature review and network analysis / W. Zheng, S. Rao // Arthritis Res. Ther. — 2015. — Vol. 17. — 202. — doi: 10.1186/s13075-015-0715-1.
12. Korman, B.D. Recent advances in the genetics of systemic sclerosis: toward biological and clinical significance / B.D. Korman, L.A. Criswell // Curr. Rheumatol. Rep. — 2015. — Vol. 17, № 3. — 21. — doi: 10.1007/s11926-014-0484-x.
13. Kochi, Y. Genetics of autoimmune diseases: perspectives from genome-wide association studies / Y. Kochi // Int. Immunol. — 2016. — Vol. 28, № 4. — P. 155–161.

14. Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases / Y.R. Li [et al.] // *Nat. Med.* — 2015. — Vol. 21, № 9. — P. 1018–1027.
15. Genetic architecture distinguishes systemic juvenile idiopathic arthritis from other forms of juvenile idiopathic arthritis: clinical and therapeutic implications / M.J. Ombrello [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2017. — Vol. 76, № 5. — P. 906–913.
16. Полиморфные варианты генов TNF $\alpha$ -308 G→A, XPD Asp312Asn и XRCC1 Arg-399Gln у детей с ювенильным ревматоидным артритом/О.П.Романюк[и др.]//Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр./Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2014. — Т. 17. — С. 12–18.
17. Polymorphism of some genes involved in immune and inflammatory responses in Belarusian patients with juvenile idiopathic arthritis and other articular pathology / H.A. Yatskiu [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2017. — Vol. 76, Suppl. 2. — P 389.
18. Su, M.A. Monogenic autoimmune diseases: insights into self-tolerance/ M.A. Su, M.S. Anderson // *Pediatr. Res.* — 2009. — Vol. 65, № 5, Pt. 2. — 20R–25R. — doi: 10.1203/PDR.0b013e31819dc55c.
19. Verbsky, J.W. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) and IPEX-related disorders: an evolving web of heritable autoimmune diseases / J.W. Verbsky, T.A. Chatila // *Curr. Opin. Pediatr.* — 2013. — Vol. 6. — P. 708–714.
20. Peculiarities of autoimmune polyglandular syndromes in children and adolescents / G. Ziriili [et al.] // *Acta Biomed.* — 2017. — Vol. 88, № 3. — P. 271–275.
21. The immunobiology and clinical features of type 1 autoimmune polyglandular syndrome (APS-1) / C.J. Guo [et al.] // *Autoimmun. Rev.* — 2017. — doi: 10.1016/j.autrev.2017.11.012.
22. Dominant mutations in the autoimmune regulator AIRE are associated with common organ-specific autoimmune diseases / B.E. Oftedal [et al.] // *Immunity.* — 2015. — Vol. 42, № 6. — P. 1185–1196.
23. Fierabracci, A. Type 1 diabetes in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome (APECED): a “rare” manifestation in a “rare” disease / A. Fierabracci // *Int. J. Mol. Sci.* — 2016. — Vol. 12, № 17 (7) — pii: E1106. doi: 10.3390/ijms17071106/.
24. Орлова Е.М. Генетические основы и клинические варианты аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.03 / Е.М. Орлова; Эндокринологический научный центр РАМН. — Москва, 2005. — 23 с.
25. Autoimmune polyglandular syndrome type 1 in Russian patients: clinical variants and autoimmune regulator mutations / E.M. Orlova [et al.] // *Horm. Res. Paediatr.* — 2010. — Vol. 73, № 6. — P. 449–457.
26. Anderson, M.S. More than meets the eye: monogenic autoimmunity strikes again / M.S. Anderson, J.L. Casanova // *Immunity.* — 2015. — Vol. 42. — P. 986–988.
27. Su, M.A. AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond / M.A. Su, M.S. Anderson // *Nat. Rev. Immunol.* — 2016. — Vol. 16, № 4. — P. 247–258.
28. Chan, A.Y. Central tolerance to self revealed by the autoimmune regulator / A.Y. Chan, M.S. Anderson // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2015. — Vol. 1356. — P. 80–89.
29. AIRE-mutations and autoimmune disease // Ø. Bruserud [et al.] // *Curr. Opin. Immunol.* — 2016. — Vol. 43. — P. 8–15.
30. Dragin, N. Autoimmune disease predisposition: Aire «protects» men / N. Dragin, R. Le Panse, S. Berrih-Aknin // *Med. Sci. (Paris).* — 2017. — Vol. 33, № 2. — P. 169–175.
31. Hannibal, M.C. IPEX Syndrome / M.C. Hannibal, T. Torgerson // *GeneReviews® [Internet]* / M.C. Hannibal, T. Torgerson; editors: M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya — Seattle (WA): University of Washington, 2004. — PMID: 20301297.
32. Barzaghi, F. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity / F. Barzaghi, L. Passerini, R. Bacchetta // *Front. Immunol.* — 2012. — Vol. 3, article 211. — 25 p. — doi: 10.3389/fimmu.2012.00211. eCollection 2012.
33. Updated understanding of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) / P. Li [et al.] // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* — 2016. — Vol. 50, № 1. — P. 55–63.
34. The prevalence of systemic autoimmune



- rheumatic diseases in Canadian pediatric populations: administrative database estimates / N.J. Schiff [et al.] // *Rheumatol. Int.* — 2015. — Vol. 35, № 3. — P. 569–573.
35. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis / A. Hinks [et al.] // *Nat. Genet.* — 2013. — Vol. 45, № 6. — P. 664–669.
36. Genome-wide association meta-analysis reveals novel juvenile idiopathic arthritis susceptibility loci / L.A. McIntosh [et al.] // *Arthritis Rheumatol.* — 2017. — Vol. 69, № 11. — P. 2222–2232.
37. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997 / R.E. Petty [et al.] // *J. Rheumatol.* — 1998. — Vol. 25, № 10. — P. 1991–1994.
38. Stanford, S.M. PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene / S.M. Stanford, N. Bottini // *Nat. Rev. Rheumatol.* — 2014. — Vol. 10, № 10. — P. 602–611.
39. Mining the complex family of protein tyrosine phosphatases for checkpoint regulators in immunity / C. Penafuerte [et al.] // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* — 2017. — Vol. 410. — P. 191–214.
40. The susceptibility loci juvenile idiopathic arthritis shares with other autoimmune diseases extend to PTPN2, COG6, and ANGPT1 / S.D. Thompson [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2010. — Vol. 62, № 11. — P. 3265–3276.
41. Cui, Y. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS / Y. Cui, Y. Sheng, X. J. Zhang // *Autoimmun.* — 2013. — Vol. 41. — P. 25–33.
42. Eilertsen, G.Ø. Clinical epidemiology of systemic lupus erythematosus with emphasis on nephritis and autoantibody production: a dissertation for the degree of Philosophiae Doctor / G.Ø. Eilertsen; University of Tromsø, Faculty of Health Science, Department of Clinical Medicine. — 2011. — 73 p.
43. Danchenko, N. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of world wide disease burden / N. Danchenko, J.A. Sattia, M.S. Anthony // *Lupus.* — 2006. — Vol. 15, № 5. — P. 308–318.
44. Children and adolescents with SLE: not just little adults / T.A. Morgan [et al.] // *Lupus.* — 2013. — Vol. 22, № 12. — P. 1309–1319.
45. Juvenile- and adult-onset systemic lupus erythematosus: a comparative study in a large cohort from the Spanish Society of Rheumatology Lupus Registry (RELESSER) / V. Torrente-Segarra [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* — 2017. — Vol. 35, № 6. — P. 1047–1055.
46. Comparison of disease characteristics, organ damage, and survival in patients with juvenile-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus in a combined cohort from 2 tertiary centers in Turkey / B. Artim-Esen [et al.] // *J. Rheumatol.* — 2017. — Vol. 44, № 5. — P. 619–625.
47. Differences in disease phenotype and severity in SLE across age groups / N. Ambrose [et al.] // *Lupus.* — 2016. — Vol. 25, № 14. — P. 1542–1550.
48. Adolescent onset of lupus results in more aggressive disease and worse outcomes: results of a nested matched case-control study within LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LVII) / L.B. Tucker [et al.] // *Lupus.* — 2008. — Vol. 17, № 4. — P. 314–322.
49. Differences in clinical features and mortality between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus: a prospective single-center study // Y.B. Joo [et al.] // *J. Rheumatol.* — 2016. — Vol. 43, № 8. — P. 1490–1497.
50. Chen, L. Genetic advances in systemic lupus erythematosus: an update / L. Chen, D.L. Morris, T.J. Vyse // *Curr. Opin. Rheumatol.* — 2017. — Vol. 29, № 5. — P. 423–433.
51. Genome-wide association meta-analysis in Китайская and Европейская individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus // D.L. Morris [et al.] // *Nat. Genet.* — 2016. — Vol. 48, № 8. — P. 940–946.
52. Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus / J. Bentham [et al.] // *Nat. Genet.* — 2015. — Vol. 47, № 12. — P. 1457–1464.
53. Mohan, C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis / C. Mohan, C. Putterman // *Nat. Rev. Nephrol.* — 2015. — Vol. 11, № 6. — P. 329–341.
54. Lee, Y.H. Association between the functional ITGAM rs1143679 G/A polymorphism and systemic lupus erythematosus/lupus nephritis or rheumatoid arthritis: an update meta-analysis / Y.H. Lee, S.C. Bae // *Rheumatol. Int.* — 2015. — Vol. 35, № 5. — P. 815–823.

55. Evaluation of genetic association between an ITGAM non-synonymous SNP (rs1143679) and multiple autoimmune diseases / J.M. Anaya [et al.] // *Autoimmun. Rev.* — 2012. — Vol. 11, № 4. — P. 276–280.
56. Association between IRF5 polymorphisms and autoimmune diseases: a meta-analysis / L. Tang [et al.] // *Genet. Mol. Res.* — 2014. — Vol. 16, № 13(2). — P. 4473–4485.
57. Dominant mutations in the TREX1 exonuclease gene in lupus and Aicardi-Goutières syndrome / J.M. Fye // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286, № 37. — P. 32373–32382.
58. Typing TREX1 gene in patients with systemic lupus erythematosus / M. Fredi [et al.] // *Reumatismo.* — 2015. — Vol. 67, № 1. — P. 1–7.
59. Rice, G.I. Human disease phenotypes associated with mutations in TREX1 / G.I. Rice, M.P. Rodero, Y.J. Crow // *J. Clin. Immunol.* — 2015. — Vol. 35, № 3. — P. 235–243.
60. Systemic scleroderma [Electronic resources] // National Institute of Health, US National Library of Medicine. — Mode of access: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/systemic-scleroderma/>. — Date of access: 27.03.2018.
61. Incidence of childhood linear scleroderma and systemic sclerosis in the UK and Ireland / A.L. Herrick [et al.] // *Arthritis Care Res. (Hoboken).* — 2010. — Vol. 62, № 2. — P. 213–218.
62. Denton, C.P. Juvenile-onset systemic sclerosis: children are not small adults / C.P. Denton, E.C. Derrett-Smith // *Rheumatology (Oxford).* — 2009. — Vol. 48, № 2. — P. 96–97.
63. Foeldvari, I. Juvenile systemic sclerosis / I. Foeldvari // *Scleroderma: from pathogenesis to management.* / I. Foeldvari; J. Vagra, C.P. Denton, F.M. Wigley. — Boston, MA: Springer. — 2012. — P. 93–100.
64. Systemic sclerosis in childhood: clinical and immunologic features of 153 patients in an international database / G. Martini [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2006. — Vol. 54, № 12. — P. 3971–3978.
65. Brief Report: HLA-DRB1, DQA1, and DQB1 in juvenile-onset systemic sclerosis / A.M. Stevens [et al.] // *Arthritis Rheumatol.* — 2016. — Vol. 68, № 11. — P. 2772–2777.
66. Broen, J.C. The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis / J.C. Broen, T.R. Radstake, M Rossato // *Nat. Rev. Rheumatol.* — 2014. — Vol. 10, № 11. — P. 671–681.
67. Gene-level association analysis of systemic sclerosis: a comparison of African-Americans and white populations / O.Y. Gorlova [et al.] // *PLoS One.* — 2018. — Vol. 13, № 1. — e0189498. — doi: 10.1371/journal.pone.0189498.
68. Ramos, P.S. Genetics of systemic sclerosis: recent advances / P.S. Ramos, R.M. Silver, C.A. Feghali-Bostwick // *Curr. Opin. Rheumatol.* — 2015. — Vol. 27, № 6. — P. 521–529.
69. Ma, Y. Multiple genes, especially immune-regulating genes, contribute to disease susceptibility in systemic sclerosis / Y. Ma, X. Zhou // *Curr. Opin. Rheumatol.* — 2016. — Vol. 28, № 6. — P. 595–605.
70. EULAR/PReS endorsed consensus criteria for the classification of childhood vaculitides / S. Ozen [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2006. — Vol. 65, № 7. — P. 936–941.
71. Epidemiologic features of Kawasaki disease in Japan: results of the 2009-2010 nationwide survey / Y. Nakamura [et al.] // *J. Epidemiol.* — 2012. — Vol. 22, № 3. — P. 216–221.
72. Epidemiologic features of Kawasaki disease in South Korea: data from nationwide survey, 2009–2011 / G.B. Kim [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 2014. — Vol. 33, № 1. — P. 24–27.
73. Singh, S. The epidemiology of Kawasaki disease: a global update / S. Singh, P. Vignesh, D. Burgner // *Arch. Dis. Child.* — 2015. — Vol. 100, № 11. — P. 1084–1088.
74. Epidemiologic features of Kawasaki disease in Taiwan, 2003-2006 / W.C. Huang [et al.] // *Pediatrics.* — 2009. — Vol. 123, № 3. — e401–405.
75. Incidence of Kawasaki disease in northern European countries / E. Salo [et al.] // *Pediatr. Int.* — 2012. — Vol. 54, № 6. — P. 770–772.
76. The epidemiology and clinical features of Kawasaki disease in Australia / J. Saundankar [et al.] // *Pediatrics.* — 2014. — Vol. 133, № 4. — e1009–1014.
77. Replication and meta-analysis of GWAS identified susceptibility loci in Kawasaki disease confirm the importance of B lymphoid tyrosine kinase (BLK) in disease susceptibility / C.J. Chang [et al.] // *PLoS One.* — 2013. — Vol. 8, № 8. — e72037.
78. Two new susceptibility loci for Kawasaki disease identified through genome-wide association analysis / Y.C. Lee [et al.] // *Nat. Genet.* —

2012. — Vol. 44, № 5. — P. 522–525.

79. A genome-wide association study identifies three new risk loci for Kawasaki disease / Y. Onouchi [et al.] // *Nat. Genet.* — 2012. — Vol. 44, № 5. — P. 517–521.

80. A genome-wide association analysis reveals 1p31 and 2p13.3 as susceptibility loci for Kawasaki disease / J.J. Kim [et al.] // *Hum. Genet.* — 2011. — Vol. 129, № 5. — P. 487–495.

81. Genome-wide association study identifies FCGR2A as a susceptibility locus for Kawasaki disease / C.C. Khor [et al.] // *Nat. Genet.* — 2011. — Vol. 43, № 12. — P. 1241–1246.

82. Male-specific association of the FCGR2A His167Arg polymorphism with Kawasaki disease / Y.C. Kwon [et al.] // *PLoS One.* — 2017. — Vol. 12, № 9. — e0184248. — doi: 10.1371/journal.pone.0184248.

83. Identification of an association between genomic hypomethylation of FCGR2A and susceptibility to Kawasaki disease and intravenous immunoglobulin resistance by DNA methylation array / H.C. Kuo [et al.] // *Arthritis Rheumatol.* — 2015. — Vol. 67, № 3. — P. 828–836.

84. ITPKC functional polymorphism associated with Kawasaki disease susceptibility and formation of coronary artery aneurysms / Y. Onouchi [et al.] // *Nat. Genet.* — 2008. — Vol. 40, № 1. — P. 35–42.

85. Family-based association analysis implicates IL-4 in susceptibility to Kawasaki disease / J.C. Burns [et al.] // *Genes Immun.* — 2005. — Vol. 6, № 5. — P. 438–444.

86. Identification of KCNN2 as a susceptibility locus for coronary artery aneurysms in Kawasaki disease using genome-wide association analysis / J.J. Kim [et al.] // *J. Hum. Genet.* — 2013. — Vol. 58, № 8. — P. 521–525.

87. Common variants in the CRP promoter are associated with a high C-reactive protein level in Kawasaki disease / J.J. Kim [et al.] // *Pediatr. Cardiol.* — 2015. — Vol. 36, № 2. — P. 438–444.

88. A genome-wide association analysis identifies NMNAT2 and HCP5 as susceptibility loci for Kawasaki disease / J.J. Kim [et al.] // *J. Hum. Genet.* — 2017. — Vol. 62, № 12. — P. 1023–1029.

89. Xie, X. The roles of genetic factors in Kawasaki disease: a systematic review and meta-analysis of genetic association studies / X. Xie, X. Shi, M. Liu // *Pediatr. Cardiol.* — 2017. — Vol. 39, № 2. — P. 207–225.

90. Yoon, K.L. Update of genetic susceptibility in patients with Kawasaki disease // *Korean J. Pediatr.* — 2015. — Vol. 58, № 3. — P. 84–88.

91. Onouchi, Y. The genetics of Kawasaki disease // *Int. J. Rheum. Dis.* — 2017. — Vol. 21, № 1. — P. 26–30.

**N.I. Ryabokon**

**GENETIC PREDISPOSITION TO PEDIATRIC AUTOIMMUNE  
DISEASES  
(Review Article)**

Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus  
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

The review of data published concerning genetic loci associated with the emergence and development of monogenic and polygenic (multifactorial) autoimmune diseases in children and adolescents is presented. Polygenic diseases are discussed on the example of juvenile rheumatoid arthritis and systemic connective tissue diseases (systemic lupus erythematosus, systemic scleroderma and Kawasaki syndrome), the most extensively studied in molecular genetic aspects. The review mainly focuses on genome-wide association studies and meta-analyses covering a large volume of the genome and large samples of children, which allowed the authors of the research to obtain the most statistically significant results that have the maximum potential for practical use in order to identify the genetic predisposition to autoimmune diseases in children. The problem of non-specificity of genetic loci and genetic overlap (coincidence) among polygenic autoimmune diseases is discussed.

**Key words:** pediatric autoimmune diseases, monogenic autoimmune diseases, systemic diseases of connective tissue, genetic predisposition, genetic polymorphism.

*Дата поступления статьи: 1 марта 2018 г.*



К.В. Бакунович<sup>1</sup>, И.Б. Мосез<sup>1</sup>, Е.В. Кобец<sup>1</sup>, А.А. Гордеев<sup>2</sup>, И.В. Головкова<sup>3</sup>,  
С.П. Питомец<sup>3</sup>, С.Л. Минин<sup>4</sup>

## ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *HIF1A*, *UCP2* И *MTHFR* У ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ СПОРТСМЕНОВ В ОТВЕТ НА ФИЗИЧЕСКУЮ НАГРУЗКУ

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

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

<sup>2</sup>Республиканский центр олимпийской подготовки по легкой атлетике

Республика Беларусь, 220119, г. Минск, ул. Калиновского, 111

<sup>3</sup>Республиканский научно-практический центра спорта

Республика Беларусь, 220007, г. Минск, ул. Воронянского, 50/1

<sup>4</sup>Городской центр олимпийского резерва по ледовым дисциплинам

Республика Беларусь, 220095, г. Минск, пр-кт Рокоссовского, 44

При исследовании влияния физической нагрузки на экспрессию ассоциированных со спортивной успешностью генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* показано, что для каждого спортсмена характерен свой индивидуальный начальный и индуцированный физической нагрузкой уровень активности исследованных генов. Выявлена закономерность, что запуск процессов долговременной адаптации к физическим нагрузкам сопровождается повышением экспрессии генов *UCP2* и *MTHFR*, в то время как активация процессов экстренной адаптации характеризуется снижением их активности. В то же время экспрессия гена *HIF1A* снижается только в результате запуска процессов долговременной адаптации при выполнении тренировок в условиях гипоксии и не изменяется в условиях нормоксии.

**Ключевые слова:** спортивная успешность, ПЦР-анализ, ДНК-полиморфизмы, экспрессия генов, гипоксия.

### Введение

Результативность атлетов лимитируется физиологическими возможностями организма, вследствие чего увеличение объема и интенсивности тренировочных нагрузок не приводит к дальнейшему росту спортивных результатов. Актуальным становится поиск новых эффективных методов подготовки спортсменов и оценки их функционального состояния для своевременной корректировки тренировочного процесса. Одним из таких перспективных подходов является анализ активности работы генов, способствующих достижению высоких спортивных результатов.

Известно, что каждый этап подготовки атлета характеризуется существенными физиологическими, двигательными и психологическими изменениями. Следовательно, активность генов, обеспечивающих адаптацию к физическим нагрузкам, должна отличаться на различных этапах спортивной подготовки.

Цель нашей работы — определить влияние физической нагрузки на активность генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR*, ассоциированных со спортивной успешностью.

Выбор генов обусловлен тем, что их продукты вносят большой вклад в адаптацию спортсменов к интенсивным физическим нагрузкам [1–5]. Кроме того, гены *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* экспрессируются в лейкоцитах крови, что делает забор биологического материала более доступным и менее болезненным по сравнению с биопсией мышечной ткани. Известно, что клетки крови — первые после клеток легочной ткани испытывают гипоксию, и, согласно исследованию австрийских ученых, профиль экспрессии генов в крови коррелирует с экспрессией этих же генов в мышечной ткани [6].

Ген *HIF1A* кодирует субъединицу гетеродимерного фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией 1 — ведущего транскрипционного регулятора генов, ответственных за реакцию на недостаток кислорода. Продукт гена *HIF1A*

обеспечивает быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс, активизирует гены, регулирующие процесс ангиогенеза, вазомоторный контроль, энергетический метаболизм и эритропоэз [1, 4].

Продукт гена *UCP2* принадлежит к семейству разобщающих белков и принимает участие в многочисленных биологических процессах, включая термогенез, регуляцию обмена жиров, защиту от реактивных форм кислорода, секрецию инсулина, нейропротекцию, развитие дегенеративных, неврологических, сосудистых, иммунологических заболеваний и др [2, 7].

Фермент метилентетрагидрофолатредуктаза, кодируемый геном *MTHFR*, катализирует восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, который является активной формой фолиевой кислоты, необходимой для образования метионина из гомоцистеина и далее — S-аденозилметионина, играющего ключевую роль в процессе метилирования ДНК. Метилирование ДНК контролирует активность генов, в том числе задействованных в процессе адаптации к физическим нагрузкам и к гипоксии, а также ответственных за рост мышечной ткани и синтез митохондрий [3, 5].

Нами была поставлена задача сравнить, как изменяется экспрессия генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* в ответ на регулярные физические нагрузки на различных этапах подготовки спортсменов, а также в ответ на выполнение разовой физической нагрузки. Особый интерес представлял анализ активности исследуемых генов при выполнении физических нагрузок в условиях пониженного содержания кислорода. Известно, что гипоксические тренировки оказывают существенное влияние на организм спортсменов, способствуют формированию долговременной адаптации к кислородному голоданию и являются одним из самых эффективных средств повышения физической работоспособности [8].

### Материалы и методы

Протестировано 59 высококвалифицированных атлетов (12 КМС, 37 МС, 7 МСМК; 3 ЗМС), представителей циклических и комбинированных видов спорта. Для 24-х спортсменов, членов сборной команды Республики Беларусь по пожарно-спасательному спорту (средний возраст —  $24,8 \pm 3,4$  года) сравнение

активности генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* проводили на различных этапах тренировочного процесса: в период базовой общефизической подготовки (период низкоинтенсивной работы) и в соревновательном периоде (период высокоинтенсивной работы).

Для 20-ти спортсменов, представителей беговых дисциплин легкой атлетики (средний возраст —  $21,6 \pm 4,6$  года) проводили анализ экспрессии исследуемых генов в ответ на выполнение разовой физической нагрузки. Спортсмены выполняли беговую тренировку: 11 атлетов — бег высокой (90 мин. бега, ЧСС до 180 уд/мин) и средней интенсивности (60 мин., ЧСС от 140 до 160 уд/мин) и 9 спортсменов — бег низкой интенсивности (45–50 мин., ЧСС до 140 уд/мин). Забор крови для определения уровня мРНК исследуемых генов осуществляли непосредственно перед выполнением физической нагрузки и сразу после тренировки.

Для 15-ти высококвалифицированных спортсменов национальной команды Республики Беларусь по конькобежному спорту (средний возраст —  $22,3 \pm 0,8$  года) проводили анализ изменения активности генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* в ответ на физическую нагрузку в условиях нормобарической гипоксии. Спортсмены тренировались в условиях гипоксии (моделируемая высота — до 3200 м) ежедневно по два часа на протяжении 14 дней с постоянным контролем насыщаемости крови кислородом. Создание и поддержание основных параметров горного климата осуществляли с помощью установки Low Oxygen Systems (Германия). Забор крови для определения уровня мРНК исследуемых генов осуществляли в первый день гипоксической тренировки (1-й день) и в первый день отдыха после выполнения 14-дневного блока гипоксических тренировок (15-й день). Команда спортсменов-конькобежцев после блока тренировок в условиях гипоксии участвовала в соревнованиях, где показала пиковую работоспособность: большинство атлетов установили персональные рекорды (11 спортсменов из 15), кроме того был установлен национальный рекорд на дистанции 3 км.

В качестве биологического материала для исследования использовали ДНК и РНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови с помощью наборов соответствующих реагентов

(Синтол, Россия). Тестирование полиморфизмов генов *HIF1A* C1772T (rs11549465), *MTHFR* C677T и A1298C (rs1801133, rs1801131), *UCP2* Ala55Val (rs660339) осуществляли методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зондов собственного дизайна согласно ранее описанным методикам [9].

Относительный количественный анализ экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с ген-специфичными праймерами TaqMan Gene Expression Assays (Hs00153153\_m1, Hs01075227\_m1, Hs00195560\_m1 (Applied Biosystems)) в соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Нормализацию уровня экспрессии изучаемых генов проводили относительно экспрессии гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* (Hs03929097\_g1 (Applied Biosystems)). Уровень мРНК исследованных генов (mean  $\pm$  SEM) представлен в условных единицах (у. е.).

Детекцию флюоресценции, а также первичную обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения CFX96 Manager 3.1 прибора CFX96, BIO-RAD (США) в автоматическом режиме. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

*Особенности экспрессии генов у спортсменов при разных типах физической нагрузки*

Проанализирована активность генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* у спортсменов на различных этапах подготовки, различающихся составом, интенсивностью и длительностью тренировок, а также при выполнении атлетами физической нагрузки в условиях нормального или пониженного содержания кислорода.

Установлено, что у спортсменов пожарно-спасательного спорта в соревновательном периоде (период оптимальной соревновательной формы) экспрессия генов *UCP2* и *MTHFR* ( $0,94 \pm 0,08$  и  $0,44 \pm 0,07$  у. е. соответственно) статистически достоверно выше по сравнению с их активностью на этапе базовой общефизической подготовки ( $0,70 \pm 0,04$  и  $0,22 \pm 0,03$  у. е. соответственно). Для гена *HIF1A* статистически достоверных различий в активности выявлено не было. Результаты представлены на рис. 1.

Так как основная задача базового этапа — обеспечение всесторонней физической подготовки атлета, данный период характеризуется преобладанием низкоинтенсивной работы. На этом этапе большое внимание уделяется развитию как общей, так и специальной мышечной силы. К соревновательному периоду объем высокоинтенсивных тренировок постепенно возрастает, в организме спортсмена запускаются

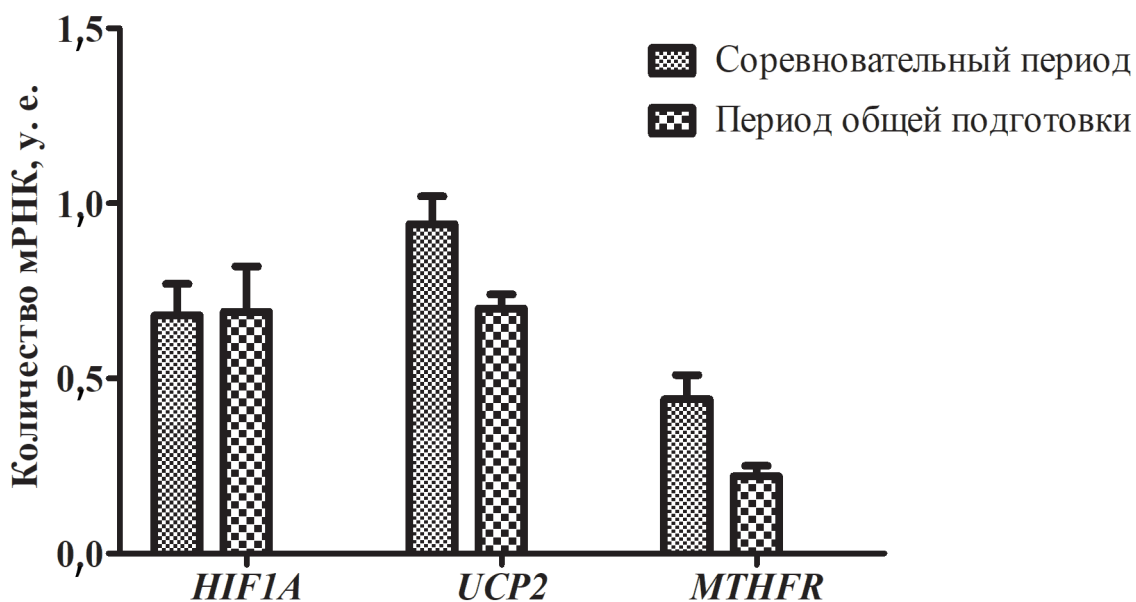


Рис. 1. Среднегрупповые уровни мРНК генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* в соревновательный период и период общей подготовки спортсменов пожарно-спасательного спорта

процессы долговременной адаптации, обеспечивая оптимальную спортивную форму атлета.

Можно предположить, что высокая активность гена *UCP2* у спортсменов пожарно-спасательного спорта в соревновательном периоде обусловлена переходом организма на более эффективное энергообеспечение — окислительное фосфорилирование свободных жирных кислот [10], что повышает выносливость и работоспособность атлета. Данный механизм отличается наибольшей производительностью: при полном окислении молекулы пальмитиновой кислоты образуется 130 молекул АТФ, тогда как при окислении молекулы глюкозы — 38 молекул АТФ, а при анаэробном гликолизе — только 2 молекулы АТФ.

Повышение экспрессии гена *UCP2* также способствует более активному митохондриальному разобщению тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, что приводит к снижению образования реактивных форм кислорода (уменьшает оксидативный стресс), уменьшает приток митохондриального кальция, увеличивает локальную температуру, и в результате способствует концентрации клеточной АТФ через активацию митохондриального биогенеза [11, 12]. Известно, что увеличение количества свободных радикалов вследствие интенсивной физической нагрузки вызывает нарушение функций митохондрий, клеточных мембран, биохимических реакций и препятствует полноценному восстановлению спортсмена [13].

В свою очередь повышение экспрессии гена *MTHFR* способствует активации генов, задействованных в процессе адаптации к физическим нагрузкам и к гипоксии, а также ответственных за рост мышечной ткани и синтез митохондрий [3, 5].

Таким образом, более высокая активность генов *UCP2* и *MTHFR* в соревновательном периоде свидетельствует об активации вышеперечисленных процессов, то есть о запуске механизмов долговременной адаптации к физической нагрузке.

Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов, которые показали, что экспрессия гена *UCP2* активируется в ответ на тренировку аэробной направленности [14], диету с высоким содержанием жиров [15, 16], а также в ответ на повышение содержания свободных радикалов. Кроме того, активность гена *UCP2* положительно коррелирует с такими показателями аэробной работоспособности, как максимальное потребление кислорода ( $r = 0,71$ ) и общая метаболическая мощность ( $r = 0,76$ ) [17].

Анализ изменения активности генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* у спортсменов-легкоатлетов в ответ на выполнение беговой тренировки выявил, что разовая физическая нагрузка приводит к статистически значимому снижению активности гена *UCP2* с  $1,06 \pm 0,12$  до  $0,75 \pm 0,08$  у. е. (рис. 2). Различия в экспрессии гена сохранялись и при разделении

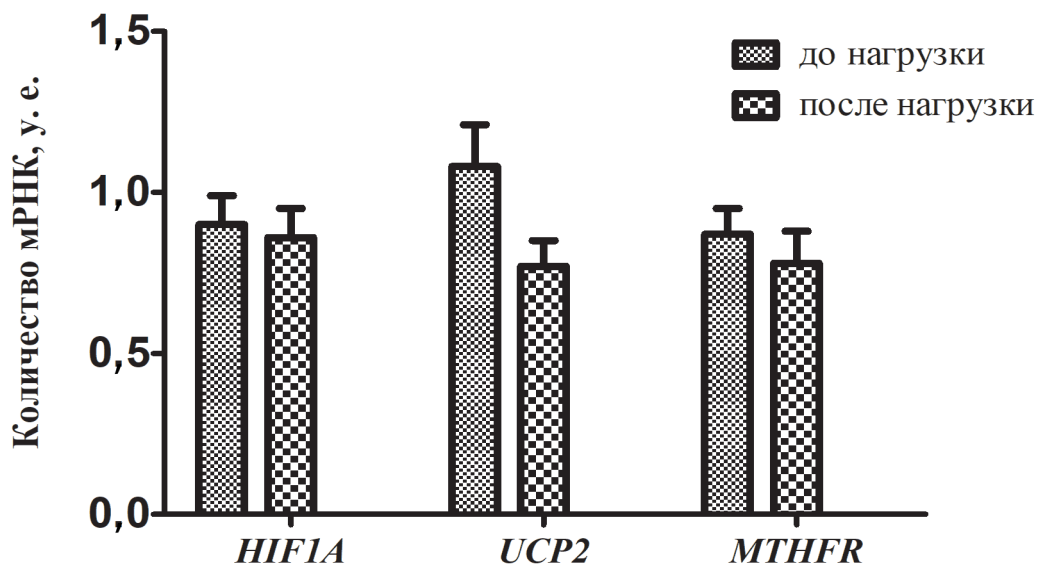


Рис. 2. Среднегрупповые уровни мРНК генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* до и непосредственно после выполнения физической нагрузки у спортсменов легкоатлетов



спортсменов на группы в зависимости от интенсивности выполняемого бега: для группы спортсменов, выполняющих нагрузку высокой и средней интенсивности, уровень мРНК гена *UCP2* снизился с  $0,82 \pm 0,11$  до  $0,65 \pm 0,08$  у. е., для группы спортсменов, выполняющих нагрузку низкой интенсивности, — с  $1,40 \pm 0,21$  до  $0,92 \pm 0,14$  у. е. Для гена *MTHFR* установлена тенденция к снижению уровня мРНК с  $1,03 \pm 0,13$  до  $0,79 \pm 0,16$  у. е. в группе спортсменов, выполняющих физическую нагрузку низкой интенсивности, в то время как для гена *HIF1A* статистически значимых различий в экспрессии до и после выполнения беговой тренировки выявлено не было (рис. 2).

Можно предположить, что в ответ на беговую тренировку запускаются механизмы экстренной адаптации к гипоксии нагрузки. Снижение экспрессии гена *UCP2* подавляет процесс митохондриального разобщения тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования. В результате уменьшается выделение энергии в виде тепла и увеличивается производство АТФ [18] — энергии, которая необходима организму для выполнения упражнения и восстановления. Кроме того, снижение активности гена *UCP2* способствует секреции инсулина, который совместно с гормоном роста и половыми гормонами запускает процес-

сы восстановления организма после выполнения физической тренировки [19, 20].

Таким образом, анализ активности исследуемых генов на различных этапах спортивной подготовки, а также при выполнении разовой физической нагрузки, показал, что запуск механизмов долговременной адаптации спортсменов к физическим нагрузкам (в соревновательном периоде) сопровождается повышением активности генов *MTHFR* и *UCP2*, в то время как запуск процессов экстренной адаптации (в ответ на выполнение разовой физической нагрузки) характеризуется снижением экспрессии этих генов.

Анализ изменения активности генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* у спортсменов-конькобежцев в ответ на двухнедельную тренировку в условиях гипоксии показал, что на 15-й день тренировки уровень активности генов *UCP2* и *MTHFR* значительно выше ( $1,55 \pm 0,09$  и  $0,66 \pm 0,05$  у. е. соответственно) по сравнению с их активностью в 1-й день ( $0,39 \pm 0,05$  и  $0,20 \pm 0,02$  у. е. соответственно), в то время как экспрессия гена *HIF1A* в 1-й день была значительно выше, чем на день окончания тренировки ( $3,04 \pm 0,25$  и  $1,61 \pm 0,13$  у. е. соответственно). Результаты представлены на рис. 3.

При выполнении физических нагрузок в условиях дефицита кислорода, атлеты испы-

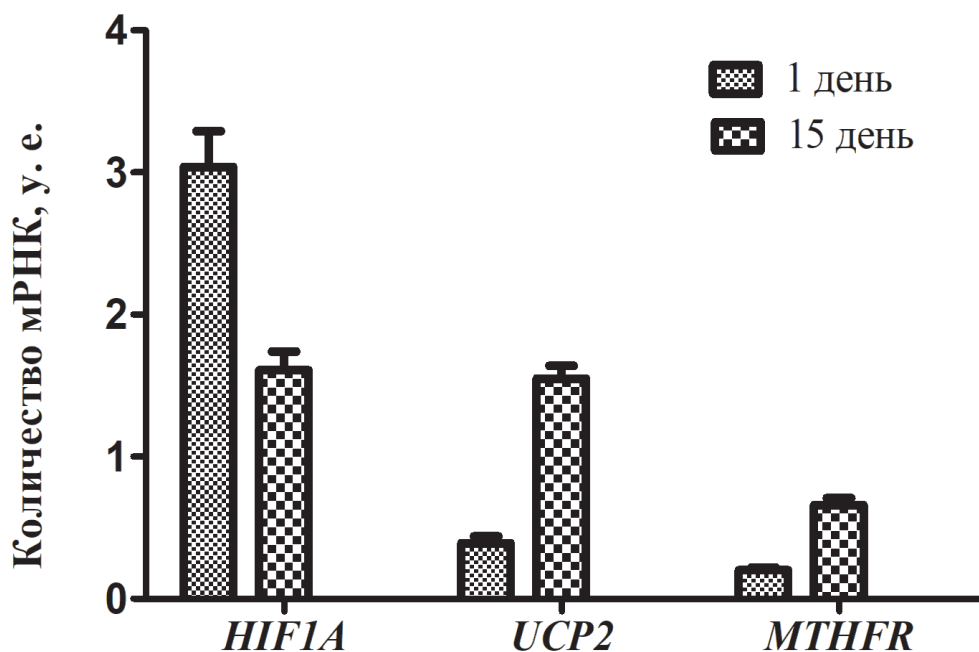


Рис. 3. Среднегрупповые уровни мРНК генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* в 1-й и 15-й день тренировки спортсменов конькобежцев в условиях гипоксии

тывают его недостаток не только вследствие выполнения физической нагрузки, но и под воздействием нормобарической экзогенной гипоксии. В результате запускаются процессы экстренной адаптации организма к дефициту кислорода и, соответственно, к дефициту энергии. Низкая активность гена *UCP2* повышает сопряженность процессов окисления и фосфорилирования [21, 22], способствует меньшему рассеиванию энергии в виде тепла и большему синтезу АТФ. Кроме того, дефицит энергии подавляет биосинтез нуклеиновых кислот и белков [22], вследствие чего мы наблюдаем более низкую активность гена *MTHFR*, контролирующего вышеперечисленные процессы.

В результате повторного воздействия гипоксии на протяжении 14-ти дней активируются механизмы долговременной адаптации к недостатку кислорода [22]. Ключевым условием запуска процессов долговременной адаптации к гипоксии является активация синтеза необходимых нуклеиновых кислот и белков, а также существенное повышение эффективности процессов биологического окисления [21–23]. Установленное нами повышение активности генов *UCP2* и *MTHFR* у атлетов после блока гипоксических тренировок, очевидно, связано с запуском вышеперечисленных процессов.

Что же касается исследования экспрессии гена *HIF1A*, снижение его активности в результате воздействия гипоксии на протяжении 14-ти дней можно объяснить тем, что продукт гена является ведущим транскрипционным регулятором генов, ответственных за реакцию на недостаток кислорода. Он обеспечивает быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс, активизирует гены, регулирующие процесс ангиогенеза, вазомоторный контроль, энергетический метаболизм и эритропоэз [24, 25]. Следовательно, в ответ на гипоксию уровень экспрессии гена *HIF1A* изначально возрастает для запуска комплекса генов, ответственных за вышеперечисленные процессы, а затем снижается (возвращается к норме), поскольку краткосрочные механизмы адаптации могут быть эффективны только в течение непродолжительного времени, и биологическая система не может длительное время находиться в состоянии перенапряжения.

Полученные нами данные не противоречат результатам других исследователей, которые также не обнаружили каких-либо изменений в активности гена *HIF1A*, индуцированного физической нагрузкой [1, 14, 26]. Французскими учеными установлено, что в ответ на трехнедельную тренировку в условиях гипоксии уровень мРНК гена *HIF1A* статистически значимо снизился, в то время как для спортсменов, тренирующихся по такому же протоколу в условиях нормоксии, изменений в активности гена не обнаружено [27]. Коллектив авторов из Дании обнаружил, что в ответ на разовую физическую нагрузку уровень мРНК гена *HIF1A* возрастает у физически нетренированных людей, в то время как у тренированных такого эффекта не наблюдается [4].

Ранее считалось, что активность гена *HIF1A* проявляется преимущественно на уровне белка за счет его стабилизации в условиях гипоксии и не проявляется на уровне мРНК [28]. При нормальной концентрации кислорода субъединица *HIF-1* альфа подвергается протеасомной деградации, а в состоянии гипоксии остается стабильной, накапливается и запускает экспрессию ряда генов [28]. Современные исследования показывают, что кислород-чувствительные системы устроены значительно сложнее, активность *HIF* может регулироваться множеством других механизмов на уровне транскрипции, трансляции и посттрансляционных модификаций, и механизмы эти могут быть зависящими или не зависящими от кислорода [29].

#### *Индивидуальные особенности экспрессии генов*

Необходимо отметить, что для каждого спортсмена характерен свой индивидуальный как начальный, так и индуцированный физической нагрузкой уровень активности генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* (рис. 4). Тренировка одинаковой интенсивности изменяет экспрессию генов у разных спортсменов в разной степени и даже порой в различных направлениях. Соответственно, процессы, обеспечивающие адаптацию к выполняемой физической нагрузке, запускаются с разной степенью эффективности, что доказывает необходимость индивидуального подхода к составлению программы тренировок и фармакологического обеспечения.

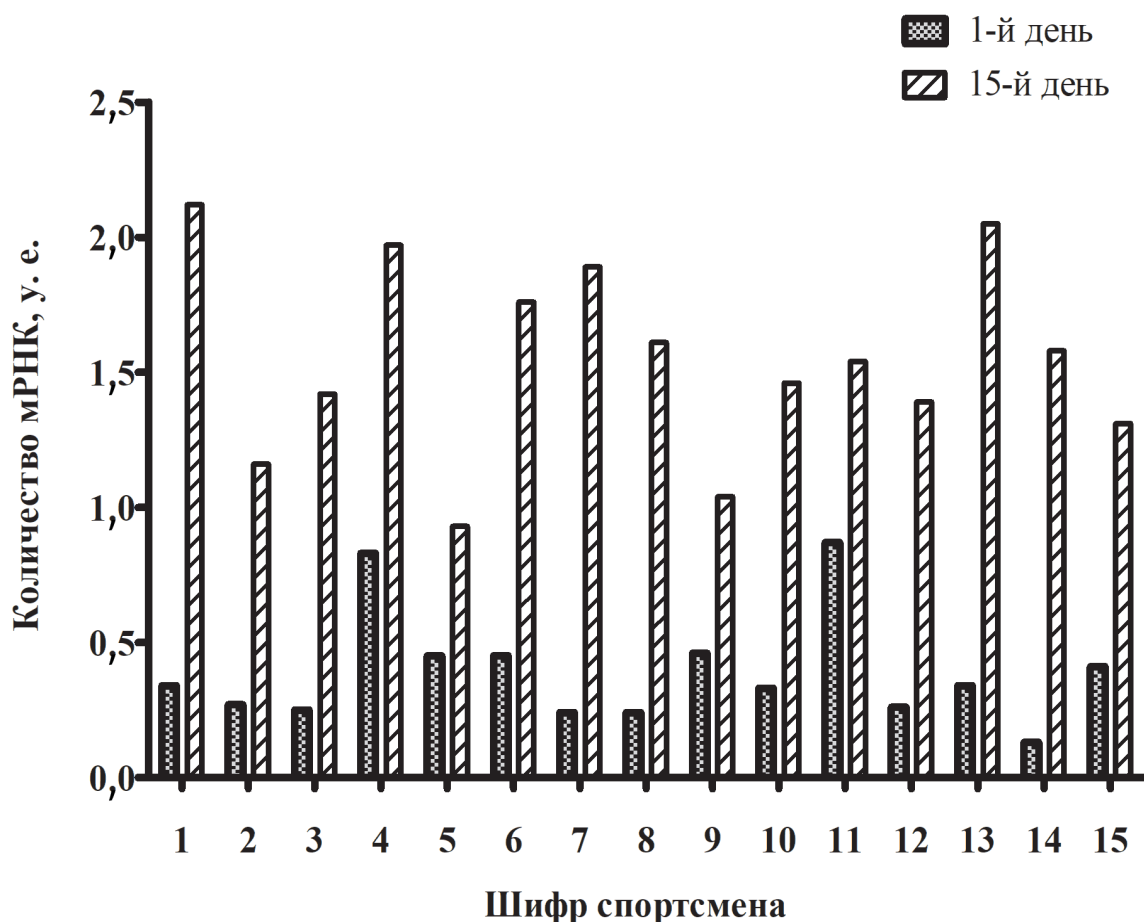


Рис. 4. Изменение индивидуальных уровней экспрессии гена *UCP2* у спортсменов- конькобежцев в ответ на гипоксическую тренировку

Таким образом, анализ изменения экспрессии генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* может использоваться в качестве информативного показателя степени адаптированности атлета к программе тренировок.

Известно, что аллельные варианты генов могут влиять на уровень и стабильность мРНК [12]. Нами проведено сравнение экспрессии аллельных вариантов Ala55Val гена *UCP2*, C1772T гена *HIF1A*, C677T и A1298C гена *MTHFR*. Установлено, что у носителей вариантов Val/Ala и Ala/Ala гена *UCP2* экспрессия гена ниже, чем у обладателей гомозиготы Val/Val ( $0,33 \pm 0,06$  и  $0,30 \pm 0,03$  у. е. против  $0,71 \pm 0,13$  у. е. соответственно). Результаты представлены на рис. 5.

В научной литературе имеется лишь незначительное количество информации о том, как экспрессируются гены в гетерозиготном состоянии — при наличии благоприятного и неблагоприятного полиморфных аллелей

в одном генотипе. Считается, что фенотип гетерозиготы является промежуточным по сравнению с гомозиготами. Нами обнаружено, что экспрессия гетерозиготного варианта Val/Ala гена *UCP2* практически не отличается от активности гомозиготы Ala/Ala и существенно отличается от экспрессии гомозиготы Val/Val, что позволяет корректно оценивать вклад данной гетерозиготы в спортивную успешность атлета (рис. 5). Более высокая активность гена *UCP2* у носителей варианта Val/Val обуславливает повышенную способность использовать жирные кислоты в качестве источника энергии, увеличивая работоспособность и выносливость организма, что подтверждается высокой частотой встречаемости аллеля 55Val у спортсменов видов спорта, тренирующих выносливость [10].

При сравнении активности гена *HIF1A* у легкоатлетов с различной квалификацией установлено, что у спортсменов с квалификацией КМС

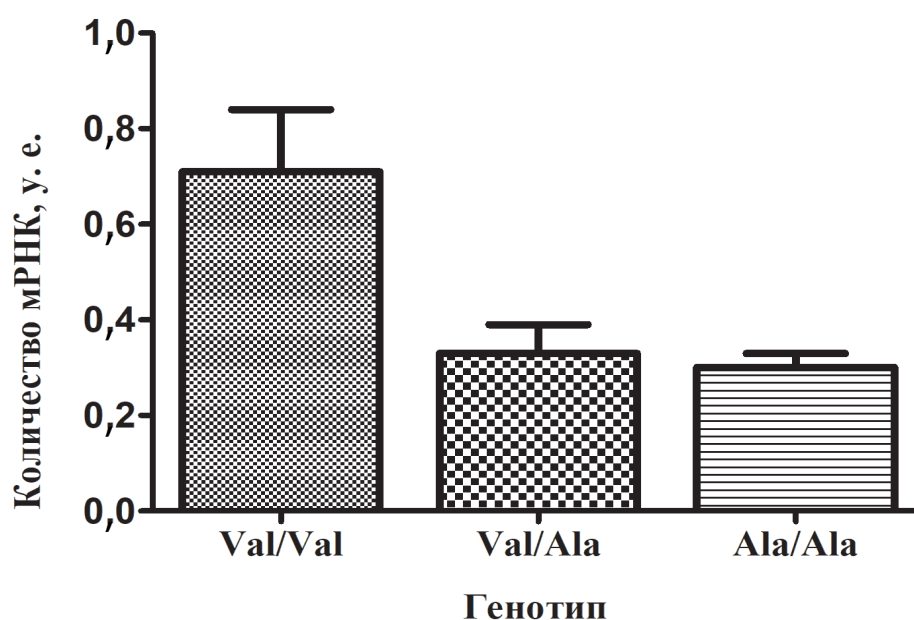


Рис. 5. Экспрессия гена *UCP2* у спортсменов — носителей различных аллельных вариантов полиморфизма Ala55Val.

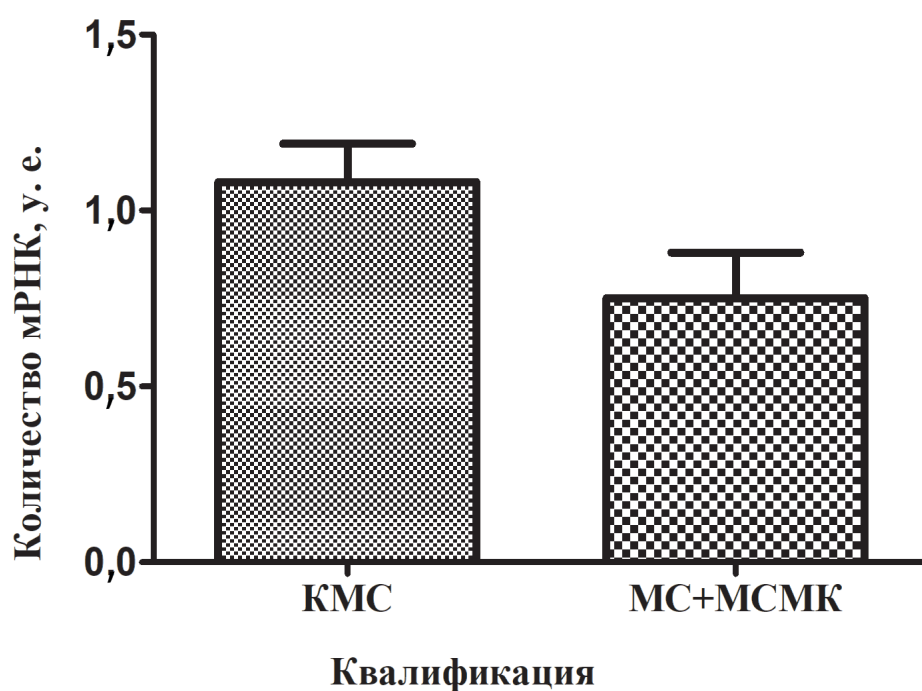


Рис. 6. Уровень мРНК гена *HIF1A* у спортсменов легкоатлетов с различной квалификацией (mean  $\pm$  SEM)

уровень мРНК гена *HIF1A* был в 1,4 раза выше по сравнению с аналогичным показателем у атлетов с квалификацией МС и МСМК (рис. 6).

Можно предположить, что менее тренированные спортсмены в большей степени испытывают гипоксию в ответ на интенсивные тренировки. Дефицит кислорода приводит к активизации гена *HIF1A*, в результате чего

запускаются гены, кодирующие ключевые ферменты для анаэробного гликолиза и подавляется экспрессия генов, кодирующих ферменты аэробного гликолиза. Происходит переключение на менее производительный анаэробный механизм энергообеспечения, преобладание которого приводит к накоплению лактата и снижению работоспособности спортсмена.



### Заключение

При исследовании влияния физической нагрузки на экспрессию ассоциированных со спортивной успешностью генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* показано, что для каждого спортсмена характерен свой индивидуальный начальный и индуцированный физической нагрузкой уровень активности исследованных генов.

Анализ экспрессии генов *HIF1A*, *UCP2* и *MTHFR* на различных этапах спортивной подготовки, характеризующихся различной интенсивностью, а также при выполнении разовой физической нагрузки, установил, что запуск механизмов долговременной адаптации спортсменов к физическим нагрузкам (в соревновательном периоде) сопровождается повышением активности генов *MTHFR* и *UCP2*, в то время как запуск процессов экстренной адаптации (в ответ на выполнение разовой физической нагрузки) характеризуется снижением активности этих генов.

В то же время экспрессия гена *HIF1A* снижается только в результате запуска процессов долговременной адаптации при выполнении тренировок в условиях гипоксии и не изменяется в условиях нормоксии.

Для гена *UCP2* показаны статистически значимые различия уровней экспрессии гена у носителей разных аллельных вариантов полиморфизма Ala55Val: у носителей гомозиготы Val/Val установлена более высокая активность гена по сравнению с носителями аллельных вариантов Val/Ala и Ala/Ala. Полученные данные позволяют ответить на вопрос о том, как экспрессируются гены при наличии в гетерозиготе благоприятного и неблагоприятного полиморфных аллелей, что необходимо учитывать для корректной оценки вклада гетерозиготного варианта в спортивный потенциал спортсмена.

Установлено, что для атлетов с квалификацией кандидат в мастера спорта экспрессия гена *HIF1A* статистически значимо выше, чем у спортсменов с квалификацией мастер спорта и мастер спорта международного класса.

Следовательно, комплексный подход, включающий в себя как генотипирование атлетов, так и анализ экспрессии генов, ответственных за адаптацию к интенсивным физическим нагрузкам, обеспечивает более эффективный отбор перспективных спортсменов, а также

позволяет составлять программу тренировок для каждого спортсмена индивидуально с целью сохранения здоровья и повышения результативности.

*Проведение исследования одобрено заседанием комитета по этике ГУ «Республиканский научно-практический центр спорта».*

### Список использованных источников

1. Ameln, H., Gustafsson, T., Sundberg, C.J., Okamoto, K., Jansson, E., Poellinger, L., Makino, Y. Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle // *FASEB J.* — 2005. — Vol. 19, № 8. — P. 1009–1011.
2. Brand, M.D., Esteves, T.C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3 // *Cell Metab.* — 2005. — Vol. 2, № 2. — P. 85–93.
3. Barres, R., Zierath, J.R. DNA methylation in metabolic disorders // *Am J Clin Nutr.* — 2011. — Vol. 93, № 4. — P. 897–900.
4. Lundby, C., Gassmann, M., Pilegaard, H. Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions // *Eur J Appl Physiol.* — 2006. — Vol. 96, № 4. — P. 363–369.
5. Terruzzi, I., Senesi, P., Montesano, A., La Torre, A., Alberti, G., Benedini, S., Caumo, A., Fermo, I., Luzi, L. Genetic polymorphisms of the enzymes involved in DNA methylation and synthesis in elite athletes // *Physiol Genomics.* — 2011. — Vol. 43, № 16. — P. 965–973.
6. Zeibig, J., Karlic, H., Lohninger, A., Damsgaard, R., Smekal, G. Do blood cells mimic gene expression profile alterations known to occur in muscular adaptation to endurance training? // *Eur J Appl Physiol.* — 2005. — Vol. 95, № 1. — P. 96–104.
7. Ricquier, D., Bouillaud, F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance // *J Physiol.* — 2000. — Vol. 529, Pt 1. — P. 3–10.
8. Vogt, M., Hoppeler, H. Is hypoxia training good for muscles and exercise performance? // *Prog Cardiovasc Dis.* — 2010. — Vol. 52, № 6. — P. 525–533.
9. Mosse, I.B., Kilchevsky, A.V., Kundas, L.A., Gonchar, A.L., Minin, S.L., Zhur, K.V.

Some aspects of gene association with high sport achievements // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. — 2017. — Vol. 21, № 3. — P. 296–303.

10. Buemann, B., Schierner, B., Toubro, S., Bibby, B.M., Sorensen, T., Dalgaard, L., Pedersen, O., Astrup, A. The association between the val/ala-55 polymorphism of the uncoupling protein 2 gene and exercise efficiency // *Int J Obes Relat Metab Disord*. — 2001. — Vol. 25, № 4. — P. 467–471.

11. Andrews, Z.B., Diano, S., Horvath, T.L. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival // *Nat Rev Neurosci*. — 2005. — Vol. 6, № 11. — P. 829–840.

12. Diano, S., Matthews, R.T., Patrylo, P., Yang, L., Beal, M.F., Barnstable, C.J., Horvath, T.L. Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning // *Endocrinology*. — 2003. — Vol. 144, № 11. — P. 5014–5021.

13. Кулиненко, О. Медицина спорта высших достижений / О Кулиненко. — ЛитРес, 2018. — 324 с.

14. Ookawara, T., Suzuk, K., Haga, S., Ha, S., Chung, K.S., Toshinai, K., Hamaoka, T., Katsumura, T., Takemasa, T., Mizuno, M., Hitomi, Y., Kizaki, T., Suzuki, K., Ohno, H. Transcription regulation of gene expression in human skeletal muscle in response to endurance training // *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. — 2002. — Vol. 111, № 1–4. — P. 41–54.

15. Surwit RS, W.S., Petro AE, Sanchis D, Raimbault S, Ricquier D, Collins S. Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1998. — Vol. 95. — P. 4061–4065.

16. Thompson, M.P., Kim, D. Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs // *FEBS Lett*. — 2004. — Vol. 568, № 1–3. — P. 4–9.

17. Жур, К. В., Кундас, Л.А., Головова, И. В., Питомец, С. П., Моссэ, И. Б. Анализ ассоциации результатов молекулярно-генетических исследований с показателями работоспособности атлетов (на примере команды спортсменов пожарно-спасательного спорта) // *Прикладная спортивная наука*. — 2017. — № 2. — С. 72–81.

18. Holdys, J., Gronek, P., Krysciak, J., Stanislawski, D. Genetic variants of uncoupling proteins-2 and -3 in relation to maximal oxygen uptake in different sports // *Acta Biochim Pol*. — 2013. — Vol. 60, № 1. — P. 71–75.

19. Chan, C.B., Kashemsant, N. Regulation of insulin secretion by uncoupling protein // *Biochem Soc Trans*. — 2006. — Vol. 34, № 5. — P. 802–805.

20. Zhang, C., Krauss, S., Baffy, G., Hagen, T., Peroni, O., Grujic, D., Vidal-Puig, A. J., Boss, O., Kim, Y., Shulman, G. I., Chan, C. B. Uncoupling Protein-2 Negatively Regulates Insulin Secretion and Is a Major Link between Obesity, Cell Dysfunction and Type 2 Diabetes // *Cell*, Vol. — 2001. — Vol. 105. — P. 745–755.

21. Friso, S., Girelli, D., Trabetti, E., Olivieri, O., Guarini, P., Pignatti, P.F., Corrocher, R., Choi, S.W. The MTHFR 1298A>C polymorphism and genomic DNA methylation in human lymphocytes // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. — 2005. — Vol. 14, № 4. — P. 938–943.

22. Litvitsky, P.F. Hypoxia // *Current pediatrics*. — 2016. — Vol. 15, № 1. — P. 45–58.

23. Emre, Y., Hurtaud, C., Nübel, T., Criscuolo, F., Ricquier, D., Cassard-Doulcier, A.M. Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages // *Biochemical Journal*. — 2007. — Vol. 402, № 2. — P. 271–278.

24. Doring, F., Onur, S., Fischer, A., Boulay, M.R., Perusse, L., Rankinen, T., Rauramaa, R., Wolfarth, B., Bouchard, C. A common haplotype and the Pro582Ser polymorphism of the hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF1A) gene in elite endurance athletes // *J Appl Physiol* (1985). — 2010. — Vol. 108, № 6. — P. 1497–1500.

25. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy // *Nat Rev Cancer*. — 2003. — Vol. 3, № 10. — P. 721–732.

26. Gustafsson, T., Knutsson, A., Puntschart, A., Kaijser, L., Nordqvist, A.C., Sundberg, C.J., Jansson, E. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training // *Pflugers Arch*. — 2002. — Vol. 444, № 6. — P. 752–759.

27. Mounier, R., Pialoux, V., Roels, B., Thomas, C., Millet, G., Mercier, J., Coudert, J., Fell-

mann, N., Clottes, E. Effect of intermittent hypoxic training on HIF gene expression in human skeletal muscle and leukocytes // *Eur J Appl Physiol.* — 2009. — Vol. 105, № 4. — P. 515–524.

28. Myllyharju, J., Koivunen, P. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylases: common

and specific roles // *Biol Chem.* — 2013. — Vol. 394, № 4. — P. 435–448.

29. Agani, F., Jiang, B.H. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer // *Curr Cancer Drug Targets.* — 2013. — Vol. 13, № 3. — P. 245–251.

K.V. Bakunovich<sup>1</sup>, I.B. Mosse<sup>1</sup>, E.V. Kobets<sup>1</sup>, A.A. Gordeev<sup>2</sup>, I.V. Golovkova<sup>3</sup>,  
S.P. Pitomiats<sup>3</sup>, S.L. Minin<sup>4</sup>

## CHANGES IN *HIF1A*, *UCP2* AND *MTHFR* GENES EXPRESSION OF PROFESSIONAL ATHLETES IN RESPONSE TO PHYSICAL EXERTION

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

<sup>2</sup>Republican Center for Olympic Training in Athletics  
Minsk BY-220119, the Republic of Belarus

<sup>3</sup>Republican Scientific and Practical Sports Center  
Minsk BY-220007, the Republic of Belarus

<sup>4</sup>City Center of the Olympic Reserve for Ice Disciplines  
Minsk BY-220095, the Republic of Belarus

During the study of the effect of physical activity effect on the expression of *HIF1A*, *UCP2* and *MTHFR* genes associated with athletic success it was shown that each athlete is characterized by his individual initial and exercise-induced activity levels of the investigated genes. It was revealed that activation of long-term adaptation processes to physical activity is accompanied by an increase in the expression of the *UCP2* and *MTHFR* genes, while the activation of emergency adaptation processes is characterized by a decrease in their activity. At the same time, the *HIF1A* gene expression of the *HIF1A* gene only decreases as a result of the initiation of long-term adaptation processes during training under hypoxic conditions and does not change under normoxia conditions.

**Key words:** athletic performance, PCR analysis, DNA polymorphisms, gene expression, hypoxia.

Дата поступления статьи: 5 марта 2018 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) на русском и английском языках;
- аннотацию на русском и английском языках (рекомендуемый средний объем аннотации — 500 знаков с пробелами). 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»), обзорная статья может содержать подзаголовки: «Введение», «Заключение» и названия подразделов;
- список использованных источников;
- дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10–12 страниц. 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 флеш-накопителе) 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.

Рукописи авторства сторонних организаций предоставляются вместе с сопроводительным письмом, в структуре которого должны содержаться сведения о том, что:

- рукопись не находится на рассмотрении в другом издании;
- не была ранее опубликована;
- автор (авторы) несет ответственность за достоверность представленных в рукописи материалов.

Также необходимо представить акт экспертизы о возможности опубликования в открытой печати. Научная статья должна иметь 2 рецензии от специалистов, имеющих ученую степень доктора или кандидата наук.

1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS Word. Название файлов — фамилия первого автора латинскими буквами.
2. Формат бумаги А4 (297 × 210 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. Запрещается ручная расстановка принудительных переносов.
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. Сложные слова набираются через 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 названы 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. Фотоматериалы предоставляются в виде отдельных электронных файлов, также необходимы распечатки на лазерном принтере 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 должны быть написаны внутри квадратных скобок. (напр.: [1]).









Научное издание

## **МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА**

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 24

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*  
Корректор *А.Л. Богданова*  
Технический редактор *А.Л. Богданова*  
Переводчик *М.Г. Пыжова*

Подписано в печать 13.03.2018. Формат 60 × 84 <sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная. Гарнитура Times.  
Печать цифровая. Усл. печ. л. 12,79. Уч.-изд. л. 7,52. Тираж 100 экз. Заказ № 102.  
Отпечатано в типографии ЧУП «Альтиора».

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