

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 27**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2019

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, 2019. — Т. 27. — 110 с. — ISSN 1999-9127.

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

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

Редакционная коллегия:

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

УДК [577.21+575] (082)
ISSN 1999-9127

Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

<i>А. А. Яцкив, Т. Д. Куржир, Е. В. Сечко, А. М. Чичко, М. Г. Мысливец, И. Д. Чижевская, Н. Л. Бильская, А. В. Сукало, Р. И. Гончарова</i> Полиморфизм генов иммунного и воспалительного ответа у детей с суставным синдромом...	5
<i>Е. Н. Макеева, Е. П. Михаленко, С. В. Кубрак, Н. В. Савина, Е. И. Кузьминова, Л. В. Милько, К. А. Пантелей, А. П. Колбас, Н. М. Матусевич, О. С. Ежова, В. С. Люштык, А. В. Кильчевский</i> Технология ДНК штрихкодирования в Беларуси: перспективы и востребованность	17
<i>Е. С. Синявская, И. А. Козыро, А. В. Сукало, Р. И. Гончарова</i> Полиморфизм генов <i>STAT4</i> , <i>PD-1</i> , <i>PD-L1</i> у детей, страдающих системной красной волчанкой и люпус нефритом.....	25
<i>Т. Н. Гриневич, С. А. Ляликов, Т. Л. Степура, О. А. Дричиц</i> Изучение аллельного полиморфизма генов матриксной металлопротеиназы-2 (С-735 Т) и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-2 (G-418 С) у женщин с привычным невынашиванием беременности	33
<i>И. Ю. Бакутенко, И. Д. Гилевская, Н. В. Никитченко, Е. В. Сечко, А. М. Чичко, А. В. Сукало, Н. И. Рябоконт</i> Полиморфные варианты генов <i>PSMA6</i> и <i>PSMC6</i> как факторы предрасположенности к ювенильному идиопатическому артриту в белорусской популяции.....	39
<i>М. В. Спринджук, Л. П. Титов, А. Е. Скрягин, Е. М. Скрягина, А. П. Кончиц, О. М. Залуцкая, А. А. Гилеп, В. В. Слизень</i> Программный комплекс для практической обработки геномных данных микобактерий туберкулеза.....	46
<i>О. А. Орловская, Л. А. Соловей, Н. И. Дубовец, Л. В. Хотылёва</i> Оценка цитологической стабильности линий мягкой пшеницы с интрогрессией генетического материала <i>T. dicoccoides</i> , <i>T. dicocum</i> , <i>T. kiharae</i>	52
<i>Т. Н. Марцинкевич, Т. А. Гашенко, З. А. Козловская, Ю. Г. Кондратенко, С. К. Лозюк</i> Использование ITS-региона для идентификации патогенов рода <i>Venturia</i> Ces. et De Not	62
<i>Л. В. Можаровская, С. В. Пантелеев, О. Ю. Баранов, В. Е. Падутов</i> Идентификация и функциональная аннотация патоген-индуцированных генов проростков сосны обыкновенной.....	70
<i>Р. И. Шейко</i> Биотехнологические приемы и методы улучшения качественных показателей свинины	80
<i>М. Е. Михайлова, Р. И. Шейко, А. И. Киреева, Е. Л. Романишко, Н. А. Камыш, Н. И. Тиханович, О. А. Беляк, А. Н. Баяхов</i> ДНК-скрининг рецессивных мутаций, обуславливающих развитие наследственных дефектов (BLAD- и SVM-синдромов) в популяции КРС в Беларуси	90
<i>М. Д. Амелянович, И. Б. Моссэ</i> Молекулярно-генетические маркеры риска развития эндокринной патологии (Обзорная статья).....	97

CONTENTS

<i>H. A. Yatskiu, T. D. Kuzhir, E. V. Sechko, A. M. Tchitchko, M. G. Myslivets, I. D. Chyzheuskaya, N. L. Bilskaya, A. V. Sukalo, R. I. Goncharova</i> Polymorphism of immune and inflammatory response genes in children with articular syndrome... 5	5
<i>E. N. Makeyeva, E. P. Mikhalenko, S. V. Kubrak, N. V. Savina, E. I. Kuzminova, L. V. Milko, K. A. Panteley, A. P. Kolbas, N. M. Matusevich, O. S. Yezhova, V. S. Liushtyk, A. V. Kilchevsky</i> Dna barcoding technology in Belarus: prospects and needs 17	17
<i>E. S. Sinyavskaya, I. A. Kazyra, A. V. Sukalo, R. I. Goncharova</i> Polymorphisms of <i>STAT4</i> , <i>PD-1</i> , <i>PD-L1</i> in children affected with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis..... 25	25
<i>T. N. Grinevich, S. A. Lyalikov, T. L. Stepuro, O. A. Drichits</i> Study of the allelic gene polymorphism of matrix metalloproteinase-2 (C-735 T) and the tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (G-418 C) in women with recurrent miscarriages 33	33
<i>I. Y. Bakutenko, I. D. Hileuskaya, N. V. Nikitchenko, E. V. Sechko, A. M. Tchitchko, A. V. Sukalo, N. I. Ryabokon</i> Polymorphic variants of <i>PSMA6</i> and <i>PSMC6</i> genes as predisposition factors of juvenile idiopathic arthritis in belarusian population..... 39	39
<i>M. V. Sprindzuk, L. P. Titov, A. Y. Skrahin, A. M. Skrahina, A. P. Konchits, O. M. Zalutskaya, A. A. Gilep, V. V. Slizen</i> Software system for the practical genomic data processing of tuberculosis mycobacteria 46	46
<i>O. A. Orlovskaya., L. A. Solovey, N. I. Dubovets, L. V. Khotyleva</i> Evaluation of cytological stability of common wheat lines with <i>T. dicoccoides</i> , <i>T. dicoccum</i> , <i>T. kiharae</i> genetic material 52	52
<i>T. M. Martsinkevich, T. A. Hashenka, Z. A. Kazlouskaya, J. G. Kandratsenak, S. K. Laziuk</i> Using ITS region to identify pathogenes of the genus <i>Venturia</i> Ces.et De Not..... 62	62
<i>L. V. Mozharovskaya, S. V. Panteleev, O. Yu. Baranov, V. E. Padutov</i> Identification and functional annotation of pathogen-induced genes of scots pine seedlings. 70	70
<i>R. I. Sheiko</i> Biotechnological techniques and methods improving quality indicators of pork 80	80
<i>M. E. Mikhaylova, R. I. Sheiko, A. I. Kireyeva, E. L. Romanishko, N. A. Kamysh, N. I. Tikhanovich, O. A. Belyak, A. N. Bayakhov</i> DNA-screening of recessive mutations leading to the development of hereditary defects (BLAD and CVM syndromes) in the population of cattle in Belarus..... 90	90
<i>M. D. Ameliyanovich, I. B. Mosse</i> Molecular genetic risk markers of endocrine pathology development (Review Article) 97	97

А. А. Яцкив¹, Т. Д. Кужир¹, Е. В. Сечко², А. М. Чичко², М. Г. Мысливец³, И. Д. Чижевская⁴,
Н. Л. Бильская⁵, А. В. Сукало², Р. И. Гончарова¹

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ИММУННОГО И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У ДЕТЕЙ С СУСТАВНЫМ СИНДРОМОМ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

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

e-mail: a.yatskiv@igc.by

²УО «Белорусский государственный медицинский университет»

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

³УЗ «Гродненская областная детская клиническая больница»

Республика Беларусь, 230029, г. Гродно, ул. Островского, 22

⁴УО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки д. 3, к. 3

⁵УЗ «Гомельская областная детская клиническая больница»

Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Жарковского, 7

У детей с суставным синдромом (СС) — при патологии суставов различного генеза, за исключением ЮИА (n = 230), — и в контрольной группе (n = 320) проведено генотипирование по полиморфным локусам генов иммунного и воспалительного ответа: *STAT4* (rs7574865), *CTLA4* (rs231775), *PTPN2* (rs2542151, rs7234029), *IL6* (rs1800795), *IL6R* (rs2228145, rs4845618), *RUNX1* (rs9979383). В целом, распределение частот генотипов/аллелей по исследованным полиморфизмам в группе пациентов с СС не отличалось от контроля. Анализ парных сочетаний генотипов выявил 12 комбинаций, влияющих на восприимчивость белорусских пациентов к патологии суставов различного генеза, за исключением ЮИА, что имеет потенциальную практическую ценность для дифференциальной диагностики.

Ключевые слова: патология суставов, суставной синдром, ювенильный идиопатический артрит, иммунный и воспалительный ответы, генетический полиморфизм.

Введение

Согласно данным ВОЗ, от 20 до 33% населения земного шара имеет патологию опорно-двигательного аппарата [1], одним из характерных симптомокомплексов которой является суставной синдром (СС). Этим термином обычно обозначают клинические проявления поражения суставов, характеризующиеся артралгиями, местными признаками воспаления, ограничением движений и деформациями. Они могут наблюдаться в различных сочетаниях в зависимости от характера поражения, активности патологического процесса и стадии заболевания. Патогенетической основой СС являются изменения воспалительного или дегенеративно-дистрофического характера, локализованные в суставах и сухожильно-связочном аппарате [2].

На сегодняшний день известно более 200 болезней и синдромов, при которых может иметь

место СС. При этом он может отражать как первичные, так и вторичные поражения двигательного аппарата вследствие метаболических, эндокринных и других заболеваний [3, 4]. Разнообразие причин возникновения болей с вовлечением суставов и сходство клинической картины СС при многих заболеваниях, особенно на ранних стадиях их становления, значительно осложняют проведение дифференциальной диагностики и верификацию диагноза. Традиционно учитывают такие особенности СС, как распространенность, локализация, симметричность, интенсивность и характер болевого синдрома, а также его динамику. Для подтверждения диагноза применяют разнообразные стандартные и специфические лабораторные и инструментальные методы [5–7]. Тем не менее, по некоторым оценкам доля правильно диагностированного ревматоидного

артрита — самого частого ревматического заболевания — составляет около 36% [6].

Поражения суставов нередки в детском и подростковом возрасте. Среди ревматических болезней у детей наиболее распространены ювенильный идиопатический артрит (ЮИА), реактивные артропатии и системные заболевания соединительной ткани [8]. Ранняя диагностика ЮИА связана с некоторыми сложностями: дети младшего возраста зачастую могут не испытывать болевых ощущений в суставах, отек бывает трудноразличим, особенно в случае симметричного поражения, а рентгенологические признаки деструкции выявляются обычно через 1–1,5 года течения активного процесса. Как и при ревматоидном артрите взрослых, присутствие ревматоидного фактора является важным биомаркером серопозитивного ЮИА, однако его доля составляет всего около 5–10% [9]. Поскольку ключевым моментом для предотвращения прогрессирования патологического процесса и улучшения качества жизни пациента является своевременное начало адекватной патогенетической терапии, поиск новых специфических биомаркеров, которые могли бы служить вспомогательными диагностическими признаками при проведении дифференциальной диагностики суставного синдрома, не теряет актуальности.

Ранее, в рамках изучения генетической основы ЮИА в белорусской популяции, нами был проведен анализ образцов ДНК от пациентов с ЮИА, воспалительными поражениями суставов другой этиологии и контрольной группы по полиморфизму некоторых генов из перечня генов-кандидатов, повышающих риск развития ЮИА в европейских популяциях (*TNFA*, *PTPN22*, *MIF*, *CTLA4*, *STAT4*, *TRAF1/C5*) [10, 11] и выявлены некоторые ассоциации и закономерности влияния исследованных вариантов на развитие ЮИА и другой суставной патологии [12, 13].

В данной статье представлены результаты сравнительного анализа данных молекулярно-генетического типирования пациентов с СС в сравнении с контрольной группой детей без патологии опорно-двигательного аппарата по полиморфным локусам генов иммунного и воспалительного ответа: *STAT4* (rs7574865), *CTLA4* (rs231775), *PTPN2* (rs2542151,

rs7234029), *IL6* (rs1800795), *IL6R* (rs2228145, rs4845618), *RUNX1* (rs9979383) и их парным сочетаниям.

Материалы и методы

Исследуемая выборка, насчитывающая 550 человек, представлена двумя группами детей: 230 пациентов с патологией суставов различного генеза, за исключением ювенильного идиопатического артрита, и 320 детей без аутоиммунных и воспалительных заболеваний (контроль) со средним возрастом $8,8 \pm 4,93$ лет и $14,08 \pm 2,66$ лет соответственно.

Сбор биологического материала (образцы периферической венозной крови) проводился медицинскими работниками на базе четырех учреждений: УЗ «2-я городская детская клиническая больница» и УЗ «4-я городская детская клиническая больница» г. Минска, УЗ «Гомельская областная детская клиническая больница» и УЗ «Гродненская областная детская клиническая больница».

Тотальную геномную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Выбор маркеров для анализа обусловлен функциями продуктов генов — транскрипционных факторов, цитокинов и их рецепторов (табл. 1).

Для молекулярно-генетического анализа по полиморфизмам локусов *STAT4* (rs7574865), *CTLA4* (rs231775), *PTPN2* (rs2542151, rs7234029), *IL6* (rs1800795), *IL6R* (rs2228145, rs4845618), *RUNX1* (rs9979383) проводили ПЦР в реальном времени с флуоресцентно мечеными зондами на приборе CFX96 (Bio-Rad) с последующей визуализацией и интерпретацией результатов в программе Bio-Rad CFX Maestro 1.0. Последовательности олигонуклеотидов (ОДО «Праймтех») приведены в табл. 2.

Статистическую обработку данных проводили в программах STATISTICA 7.0 («StatSoftInc.») и MS Exel 2010 (Microsoft Corporation). Для установления различий в распределении частот аллелей/генотипов в исследуемых группах применяли критерий χ^2 или точный критерий Фишера. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Влияние каждого исследуемого локуса на вероятность развития суставного синдрома оценивались на основе показателя отношения шансов OR и 95% доверительного интервала CI.

Таблица 1

Функциональная характеристика исследуемых генов и их продуктов

Ген	Локализация	Функция	Ссылка
<i>STAT4</i>	2q32.2–2q32.3	Транскрипционный фактор, регулирует передачу цитокиновых сигналов ИЛ-12, ИЛ-23, приводя к дифференциации Th1 и Th17, активации моноцитов и продукции ИНФ- γ	[14]
<i>CTLA4</i>	2q33	Принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов, является негативным регулятором Т-клеточного ответа	[15]
<i>PTPN2</i>	18p11.21	Относится к семейству тирозинных фосфатаз, является негативным регулятором JAK-STAT сигнального пути, играющего важную роль в осуществлении иммунных реакций	[16]
<i>IL6</i>	7p15.3	Цитокин с широким спектром биологических функций, необходим для дифференциации В-клеток и реализации реакций острой фазы воспаления и иммунного ответа	[17]
<i>IL6R</i>	1q21.3	Субъединица рецепторного комплекса ИЛ-6. Участвует в активации тирозинных протеинкиназ семейства JAK с вовлечением в каскад реакций молекул семейства STAT и запуском MAPK-каскада.	[18]
<i>RUNX1</i>	21q22.12	Транскрипционный фактор, контролирует экспрессию генов цитокинов, обеспечивает процесс нормальной дифференцировки Т-лимфоцитов и регуляцию их иммунологической толерантности	[19, 20]

Таблица 2

Последовательности олигонуклеотидов, использованных для проведения молекулярно-генетического анализа

Локус	Последовательности праймеров и зондов (5'→3')	T отжига, °C
<i>STAT4</i> rs7574865	F: GCAAATCTTTGTA AAAAAGTCAA R: TTATGGAAAATTACATGAGTGTG T: CACTATTAACATTTTGGTCAC G: CACTATTCACATTTTGGTCAC	56
<i>CTLA4</i> rs231775	F: CCT-GAACACCGCTCCCAT R: GCTCCAAAAGTCTCACTCACCT A: FAM-AGCTGAACCTGGCTACCAGGACCT-BHQ1 G: HEX-AGCTGAACCTGGCTACCAGGACCT-BHQ1	60
<i>PTPN2</i> rs2542151	F: TCCTGTCTCCCAA ACTCT R: CAAGAAGGTGTGAAGTTAGTG G: FAM-AGTCTCAGGAAGCGCCCGAA-BHQ1 T: HEX-AGTCTCAGGAAGAGCCCGAACCA-BHQ1	56
<i>PTPN2</i> rs7234029	F: CCAGTTATGACACTAGCAGAT R: GTCAGCACSTTAGTTTATTC A: FAM-TGTAACATCAGATAAGTCACAACACT-BHQ1 G: HEX-TGTAACATCAGGTAAGTCACAACACT-BHQ1	56
<i>IL6</i> rs1800795	F: CGACCTAAGCTGCACTTTTCC R: GGGCTGATTGGA AACSTTATTAAGATTG G: FAM-CCTTTAGCATCGCAAGAC-BHQ1 C: ROX-CCTTTAGCATGGCAAGAC-BHQ2	60
<i>IL6R</i> rs2228145	F: TCTCCTCTTCTCCTCTATCT R: CAGGCTCCCTCCAGCAA C: FAM-AGCTTCTTCTCAGTACCACTG-BHQ1 A: ROX-AGATTCTTCTCAGTACCACTG-BHQ2	60

Продолжение табл. 2

Локус	Последовательности праймеров и зондов (5'→3')	T отжига, °C
<i>IL6R</i> rs4845618	F: CTGCACGGTGACAATTCAAC R: CTTCACACTTCCCTCTCACTTTA G: FAM-CTTATATCTGTCCCTTTTCGCC-BHQ1 T: ROX-CTTATATCTTTCCCTTTTCGCC-BHQ2	55
<i>RUNX1</i> rs9979383	F: GGACATAAGATCCTCAGTT R: GAGTGGCATCTTCTGATC C: FAM-CCATCACAATAAACAGGAGTAATACTGAT-BHQ1 T: HEX-TCACAATAAATAGGTGTAATACTGATACGA-BHQ1	57

Результаты и обсуждение

У пациентов с суставным синдромом (СС) при патологии суставов различного генеза, за исключением ЮИА, и в контрольной группе детей были определены генотипы по полиморфным локусам *STAT4* (rs7574865), *CTLA4* (rs231775), *PTPN2* (rs2542151, rs7234029), *IL6* (rs1800795), *IL6R* (rs2228145, rs4845618), *RUNX1* (rs9979383) (табл. 3). Ранее нами было показано, что полиморфизм некоторых из них, в том числе *STAT4* и *IL-6*, ассоциирован с повышенным риском развития ЮИА в белорусской популяции [13, 21].

В своем большинстве распределение частот генотипов/аллелей по исследованным локусам в группе пациентов с СС не отличалось от контроля. Статистически значимые разли-

чия наблюдались по частоте гомозиготного по минорному аллелю генотипа GG в локусе *IL-6R* rs4845618, тогда как различия по другому локусу этого гена, а также по локусу *RUNX1* rs9979383, обнаруживались только на уровне тенденций.

Как указывалось выше, СС характеризует гетерогенную группу патологии суставов, что может объяснять отсутствие значимых различий при анализе исследуемых генетических маркеров в общей выборке пациентов. Представляло интерес проанализировать результаты генотипирования в группах пациентов с различными (наиболее часто встречающимися) заболеваниями суставов. Структура общей выборки пациентов с СС представлена в табл. 4.

Таблица 3

Распределение частот аллелей и генотипов по изучаемым полиморфным локусам среди пациентов с СС и в группе контроля

SNP	СС		Контроль	
	n	%	n	%
<i>STAT4</i> rs7574865	230		320	
GG	134	58,3	194	60,6
GT	86	37,4	107	33,4
TT	10	4,3	19	6,0
G	354	77,0	495	77,3
T	106	23,0	105	22,7
<i>CTLA4</i> rs231775	230		320	
AA	77	33,5	97	30,3
AG	107	46,5	163	50,9
GG	46	20,0	60	18,8
A	261	56,7	357	55,8
G	199	43,3	283	44,2

Продолжение табл. 3

SNP	СС		Контроль	
	n	%	n	%
<i>PTPN2</i> rs2542151	230		320	
TT	165	71,7	246	76,9
TG	63	27,4	69	21,6
GG	2	0,9	5	1,6
T	393	85,4	561	87,7
G	67	14,6	79	12,3
<i>PTPN2</i> rs7234029	230		318	
AA	174	75,7	236	74,2
AG	51	22,2	78	24,5
GG	5	2,1	4	1,3
A	399	86,7	550	86,5
G	61	13,3	86	13,5
<i>IL-6</i> rs1800795	230		320	
GG	60	26,1	88	27,5
GC	114	49,6	169	52,8
CC	56	24,3	63	19,7
G	234	50,9	345	53,9
C	226	49,1	295	46,1
<i>IL-6R</i> rs2228145	230		316	
AA	105	45,7	139	44,0
AC	87	37,8	142	44,9
CC	38	16,5¹	35	11,1
A	297	64,6	420	66,5
C	163	35,4	212	33,5
<i>IL-6R</i> rs4845618	230		318	
GG	59	25,7	83	26,1
GT	101	43,9	163	51,3
TT	70	30,4²	72	22,6
G	219	47,6	329	51,7
T	241	52,4	307	48,3
<i>RUNX1</i> rs9979383	230		319	
TT	101	43,9	137	42,9
TC	110	47,8	140	43,9
CC	19	8,3³	42	13,2
T	312	67,8	414	64,9
C	148	32,2	224	35,1

Примечание. ¹p = 0,06 (AA + AC vs. CC); ²p = 0,04 OR 1,49 [1,02–2,20] (GG + GT vs. TT); ³p = 0,07 (TT + TC vs. CC)

Таблица 4

Структура группы пациентов с СС в зависимости от диагностированной патологии

Диагноз	Девочки, n	Мальчики, n	Всего, n (%)
Артралгии	19	22	4 (17,8)
Реактивные артропатии	13	14	27 (11,7)
Остеохондропатии	1	1	2 (0,9)
Постинфекционный артрит	43	38	81 (35,2)
Посттравматический артрит	16	12	28 (12,2)
Реактивный артрит	20	31	51 (22,2)
Всего	112	118	230 (100)

В исследуемой выборке наиболее распространены постинфекционный артрит (35,2%), реактивный артрит (22,2%), артралгии (17,8%) и посттравматический артрит (12,2%).

Реактивный артрит (РеА) представляет собой воспалительное заболевание одного или более суставов, развивающееся в пределах 2–4 недель после перенесенной урогенитальной или энтероколитической инфекции, при этом возбудитель не выделяется обычными бактериологическими методами из тканей сустава и внутрисуставной жидкости [22, 23]. РеА относится к группе серонегативных спондилоартропатий, для которых характерна ассоциация с антигеном HLA-B27, развивается у 2–6% больных, перенесших кишечную инфекцию, и у 1–3% пациентов после мочеполовой инфекции *Chlamydia trachomatis* [24]. Для артритов, при которых в суставе детектируются микробные антигены, применяют термин «постинфекционные» [23]. В настоящее время, в связи с развитием высокочувствительных методов диагностики и обнаружением в синовиальной жидкости больных РеА бактериальных антигенов и даже способных к размножению микроорганизмов, границы между реактивным и постинфекционным артритом размыты.

Повреждения хряща в результате травмы могут приводить к посттравматическому артрит. Как правило, он поражает крупные суставы, на которые приходится большая нагрузка (коленные, голеностопные, локтевые, плечевые). При неблагоприятных условиях и повторных травмах посттравматический артрит может трансформироваться в остеоартроз (ОА). Это связано с ограниченной

способностью хряща к восстановлению — дифференцированные хондроциты не пролиферируют, и места повреждений заполняются менее устойчивым к нагрузкам волокнистым хрящом. Ведущими звеньями патогенеза при ОА являются катаболические и воспалительные процессы, регулируемые провоспалительными цитокинами IL-1 β и TNF- α , — повышение уровня их продукции активизирует специфические белки, разрушающие матрикс, и препятствует процессам его восстановления [25]. Показано, что локальное посттравматическое ингибирование IL-1 уменьшает вероятность развития артрита вследствие закрытого внутрисуставного перелома [26].

При артралгиях, в отличие от артритов, не наблюдается признаков воспаления и ограничения степени подвижности сустава, а причины болевого синдрома могут иметь различное происхождение [27].

Сравнение результатов генотипирования по исследованным локусам при наиболее распространенной в нашей выборке патологии суставов показано в табл. 5.

Деление группы СС в зависимости от типа патологии суставов не дало принципиально новых результатов. Распределение генотипов и аллелей по полиморфным локусам *STAT4* (rs7574865), *CTLA4* (rs231775), *IL6* (rs1800795) в рассматриваемых группах не отличалось от контрольного. Наблюдалась тенденция к различиям в частотах встречаемости минорных гомозигот по полиморфизмам генов *RUNX1* (rs9979383), *IL-6R* (rs2228145) и *PTPN2* (rs7234029) в группах постинфекционного, реактивного и посттравматического артритов соответственно.

Таблица 5

Частоты аллелей и генотипов по исследованным полиморфизмам у пациентов с СС
в зависимости от этиологии и в группе контроля

Полиморфизм	Анализируемая группа									
	Контроль		Постинфекционный артрит		Реактивный артрит		Посттравматический артрит		Артралгии	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
STAT4 rs7574865										
GG	194	60,6	46	56,8	30	58,8	17	60,7	23	56,1
GT	107	33,4	29	35,8	19	37,3	11	39,3	17	41,5
TT	19	6,0	6	7,4	2	3,9	0	0,0	1	2,4
G	495	77,3	121	74,7	79	77,5	45	80,4	63	76,8
T	105	22,7	41	25,3	23	22,5	11	19,6	19	23,1
CTLA4 rs231775										
AA	97	30,3	25	30,9	19	37,3	10	35,7	15	36,6
AG	163	50,9	43	53,1	22	43,1	13	46,4	15	36,6
GG	60	18,8	13	16,0	10	19,6	5	17,9	11	26,8
A	357	55,8	93	57,4	60	58,8	33	58,9	45	54,9
G	283	44,2	69	42,6	42	41,2	23	41,1	37	45,1
PTPN2 rs2542151										
TT	246	76,9	61	75,3	40	78,4	21	75,0	26	63,4⁴
TG	69	21,6	18	22,2	11	21,6	7	25,0	15	36,6
GG	5	1,6	2	2,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
T	561	87,7	140	86,4	91	89,2	49	87,5	67	81,7
G	79	12,3	22	13,6	11	10,8	7	12,5	15	18,3
PTPN2 rs7234029										
AA	236	74,2	61	75,3	39	76,5	25	89,3	31	75,6
AG	78	24,5	17	21,0	11	21,5	2	7,1	10	24,4
GG	4	1,3	3	3,7	1	2,0	1	3,6³	0	0,0
A	550	86,5	139	85,8	89	87,3	52	92,9	72	87,8
G	86	13,5	23	14,2	13	12,7	4	7,1	10	12,2
IL-6 rs1800795										
GG	88	27,5	21	25,9	14	27,5	8	28,6	12	29,3
GC	169	52,8	43	53,1	24	47,1	14	50,0	17	41,4
CC	63	19,7	17	21,0	13	25,4	6	21,4	12	29,3
G	345	53,9	85	52,5	52	51,0	30	53,6	41	50,0
C	295	46,1	77	47,5	50	49,0	26	46,4	41	50,0
IL-6R rs2228145										
AA	139	44,0	42	51,9	22	43,1	16	57,1	18	43,9

Продолжение табл. 5

Полиморфизм	Анализируемая группа									
	Контроль		Постинфекционный артрит		Реактивный артрит		Посттравматический артрит		Артралгии	
	n = 320		n = 81		n = 51		n = 28		n = 41	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
АС	142	44,9	29	35,8	19	37,3	7	25,0	14	34,1
СС	35	11,1	10	12,3	10	19,6²	5	17,9	9	22,0⁵
A	420	66,5	113	69,8	63	61,8	39	69,6	50	61,0
C	212	33,5	49	30,2	39	38,2	17	30,4	32	39,0
IL-6R rs4845618										
GG	83	26,1	26	32,1	12	23,5	9	32,1	8	19,5
GT	163	51,3	32	39,5	23	45,1	12	42,9	18	43,9
TT	72	22,6	23	28,4	16	31,4	7	25,0	15	36,6⁷
G	329	51,7	84	51,9	47	46,9	30	53,6	34	41,5
T	307	48,3	78	48,1	55	53,9	26	46,4	48	58,5⁶
RUNX1 rs9979383										
TT	137	42,9	39	48,1	25	49,0	13	46,4	13	31,7
TC	140	43,9	37	45,7	22	43,1	12	42,9	24	58,5
CC	42	13,2	5	6,2¹	4	7,9	3	10,7	4	9,8
T	414	64,9	115	71,0	72	70,6	38	67,9	50	61,0
C	224	35,1	47	29,0	30	29,4	18	32,1	32	39,0

Примечание. По сравнению с контролем: ¹p = 0,08 (CC vs. TT + TC); ²p = 0,08 (CC vs. AA+AC); ³p = 0,08; ⁴p = 0,08; ⁵p = 0,05 (CC vs. AA + AC), OR 2,26 [1,00–5,12]; ⁶p = 0,08; ⁷p = 0,05 (TT vs. TG + GG), OR 1,97 [0,99–3,92]

У детей с артралгиями имела место тенденция к снижению встречаемости гомозигот TT в локусе *PTPN2* (rs2542151) и возрастанию частоты минорных аллелей и генотипов по обоим полиморфизмам гена *IL-6R* (rs2228145, rs4845618).

Данные о влиянии генетической изменчивости на риск развития реактивных, постинфекционных и посттравматических артритов практически не представлены в литературе, а большинство работ, нацеленных на изучение молекулярных основ развития этих патологий, сконцентрированы на оценке уровня и динамики содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и их соотношений в пораженных тканях.

Для РеА, как представителя группы спондилоартропатий, характерна ассоциация с геном *HLA-B27*. Исследования роли генетического полиморфизма генов за пределами главного комплекса гистосовместимости ограничивают-

ся единичными случаями. При РеА преобладает Th2-паттерн цитокинов с небольшим количеством IFN γ и TNF α , но высоким уровнем IL-10 [28]. Продукция последних может модулироваться под влиянием генетического полиморфизма. Так, например, в финской популяции установлен протективный эффект аллелей G10 и G12 микросателлитных локусов в гене *IL10* и обнаружено, что аллель c1 в микросателлитном локусе гена *TNF α* , напротив, может служить независимым маркером предрасположенности к РеА [29, 30]. Вероятно, этот перечень можно пополнить генами предрасположенности к анкилозирующему спондилоартриту (*HLA-B27*, *ERAP1*, *IL-23R*, *KIF21B*, *IL-1R2*, *ANTXR2*, *STAT3*) ввиду их принадлежности к одной группе [31].

Влияние генетических особенностей организма на клинический исход болезни неоднократно показано *in vitro* и *in vivo*. В патогенезе посттравматического артрита, как и при ОА,

основная роль принадлежит цитокинам IL-1 и TNF- α [26], что подтверждается результатами, полученными при сравнении ответа на повреждение сустава у разных линий мышей: у мышей MRL/МрJ с пониженной экспрессией этих генов в синовиальной ткани внутрисуставное и системное воспаление менее выражено, чем у линии C57BL/6 [32]. Таким образом, однонуклеотидные замены, особенно те, что локализованы в регуляторных областях, могут вносить вклад в вероятность развития посттравматических осложнений. После единичной травмы от ОА страдают до 15% пациентов, в случае повторных повреждений их доля достигает 100%. Поиск генов предрасположенности к ОА

оказался достаточно успешным. Заслуживают упоминания гены, верифицированные как в европейских, так и в азиатских популяциях и показавшие функциональную значимость: *ASPN*, *SMAD3*, *GDF5*, *FRZB*. Они кодируют транскрипционные факторы, факторы дифференциации и лиганды, участвующие в формировании костной и хрящевой ткани [33].

Исходя из гипотезы об усилении небольших эффектов однонуклеотидных замен на риск возникновения заболевания при их совместном воздействии, была проведена попарная оценка вклада изученных вариантов в генетическую предрасположенность к развитию патологий суставов (табл. 6).

Таблица 6

Влияние парных комбинаций генотипов по локусам генов иммунного и воспалительного ответа на чувствительность к различным патологиям суставов и ЮИА

Комбинации генотипов	СС, n (%)	Контроль, n (%)	ЮИА, n (%)	OR ₁ [95% CI]	p ₁	p ₂	p ₃
rs231775 <i>CTLA4</i> / rs7234029 <i>PTPN2</i>							
<i>CTLA4</i> _{AA} / <i>PTPN2</i> _{GG}	4 (1,7)	0 (0,0)	2 (0,7)	NA	0,03	0,21	0,41
rs7574865 <i>STAT4</i> / rs2228145 <i>IL6R</i>							
<i>STAT4</i> _{GG} / <i>IL6R</i> _{CC}	28 (12,2)	20 (6,3)	13 (4,7)	2,05 [1,12–3,74]	0,02	0,47	0,003
rs7574865 <i>STAT4</i> / rs4845618 <i>IL6R</i>							
<i>STAT4</i> _{GG} / <i>IL6R</i> _{TT}	43 (18,7)	40 (12,6)	34 (12,4)	1,59 [1,00–2,55]	0,05	1,00	0,06
rs2228145 <i>IL6R</i> / rs4845618 <i>IL6R</i>							
<i>IL6R</i> _{AA} / <i>IL6R</i> _{TT}	9 (3,9)	4 (1,3)	10 (3,6)	3,17 [0,96–10,44]	0,051	0,1	1,00
rs2228145 <i>IL6R</i> / rs9979383 <i>RUNX1</i>							
<i>IL6R</i> _{CC} / <i>RUNX1</i> _{TT}	23 (10,0)	15 (4,7)	8 (2,9)	2,22 [1,13–4,37]	0,02	0,29	0,001
<i>IL6R</i> _{AC} / <i>RUNX1</i> _{TT}	33 (14,3)	70 (22,1)	49 (17,8)	0,58 [0,37–0,97]	0,02	0,21	0,33
<i>IL6R</i> _{AA} / <i>RUNX1</i> _{CC}	7 (3,0)	22 (6,9)	13 (4,7)	0,41 [0,17–0,99]	0,053	0,29	0,37
rs2542151 <i>PTPN2</i> / rs1800795 <i>IL6</i>							
<i>PTPN2</i> _{GT} / <i>IL6</i> _{CC}	19 (8,3)	13 (4,1)	16 (5,8)	2,1 [1,02–4,39]	0,04	0,34	0,29
rs2542151 <i>PTPN2</i> / rs4845618 <i>IL6R</i>							
<i>PTPN2</i> _{GT} / <i>IL6R</i> _{TT}	24 (10,4)	14 (4,4)	14 (5,1)	2,5 [1,27–5,00]	0,006	0,70	0,03
rs7234029 <i>PTPN2</i> / rs4845618 <i>IL6R</i>							
<i>PTPN2</i> _{AG} / <i>IL6R</i> _{GT}	18 (7,8)	44 (13,8)	37 (13,5)	0,52 [0,29–0,94]	0,03	0,90	0,045
rs2542151 <i>PTPN2</i> / rs9979383 <i>RUNX1</i>							
<i>PTPN2</i> _{GT} / <i>RUNX1</i> _{CT}	36 (15,7)	27 (8,5)	27 (9,8)	2,00 [1,18–3,4]	0,01	0,67	0,057
rs7234029 <i>PTPN2</i> / rs2542151 <i>PTPN2</i>							
<i>PTPN2</i> _{AA} / <i>PTPN2</i> _{GT}	25 (10,9)	18 (5,7)	19 (6,9)	2,03 [1,08–3,8]	0,03	0,61	0,15

Примечание. OR₁, p₁ — СС vs. Контроль; p₂ — ЮИА vs. Контроль; p₃ — СС vs. ЮИА

Выявлено 12 парных комбинаций генотипов по изученным локусам, влияющих на восприимчивость белорусских пациентов к патологии суставов различного генеза, за исключением ЮИА. Большинство из этих сочетаний, кроме rs2228145 *IL6R*_{AC} / rs9979383 *RUNX1*_{TT}, rs2228145 *IL6R*_{AA} / rs9979383 *RUNX1*_{CC} и rs7234029 *PTPN2*_{AG} / rs4845618 *IL6R*_{GT}, на основании показателя OR (от 1,59 до 3,17) может расцениваться как рискованный фактор. В пределах одной пары локусов — rs2228145 *IL6R* / rs9979383 *RUNX1* — сочетания разных генотипов имели противоположные эффекты, как повышающие, так и понижающие риск. Наиболее выражены статистические различия в частоте распространенности комбинации генотипов rs2542151 *PTPN2*_{GT} / rs4845618 *IL6R*_{TT} ($p = 0,006, 2,5 [1,27-5,00]$). Важно, что ни одна из обнаруженных комбинаций генотипов не оказывала влияния на риск возникновения ЮИА в исследованной выборке, что может быть обусловлено различиями патогенеза заболеваний суставов на генетическом уровне. Сравнение групп ЮИА и СС свидетельствует о статистически значимых различиях между ними по частотам ряда комбинаций генотипов, что также можно использовать при дифференциальной диагностике патологии суставов аутоиммунной (ЮИА) и иной (СС) природы.

Заключение

Исследовано влияние восьми полиморфных локусов (rs7574865, rs231775, rs2542151, rs7234029, rs1800795, rs2228145, rs4845618, rs9979383) шести генов иммунного и воспалительного ответа на риск развития суставного синдрома (СС) при различной патологии суставов, за исключением ювенильного идиопатического артрита (ЮИА). Среди пациентов с СС наиболее распространены постинфекционный артрит (35,2%), реактивный артрит (22,2%), артралгии (17,8%) и посттравматический артрит (12,2%). Как в общей группе детей с СС, так и при делении в зависимости от диагноза, частоты генотипов/аллелей по исследованным локусам статистически значимо не отличались от контрольного уровня.

При анализе парных комбинаций генотипов выявлено 12 сочетаний, оказывающих влияние на риск развития различной патоло-

гии суставов за исключением ЮИА у детей. Наиболее выраженный рискованный потенциал по отношению к СС установлен при межгенном взаимодействии полиморфных вариантов rs2542151 *PTPN2*_{GT} / rs4845618 *IL6R*_{TT} ($p = 0,006, 2,5 [1,27-5,00]$). Полученные данные могут служить основой для разработки дополнительных критериев дифференциальной диагностики заболеваний суставов.

Список использованных источников

1. World Health Organization [Electronic resource]: Musculoskeletal conditions. – Mode of access: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions> – Date of access: 20.06.2019.
2. Ковальчук, П. Н. Дифференциальный диагноз при поражении суставов. Особенности суставного синдрома при метаболических артритах и остеоартрозе. Остеопороз: учеб.-метод. пособие / П. Н. Ковальчук. – Гомель: ГомГМУ, 2014. – 100 с.
3. Болезни суставов: руководство для врачей / под ред. В. И. Мазурова. – СПб.: СпецЛит, 2008. – 397 с.
4. Триполка, С. А. Дифференциальная диагностика суставного синдрома в практике семейного врача / С. А. Триполка, А.В. Благовещенская // Украинський терапевтичний журнал. – 2011. – № 2. – С. 73–78.
5. Кузьмина, Н. Н. Ювенильный ревматоидный артрит: терминологические и классификационные аспекты / Н. Н. Кузьмина, А. В. Шайков // Научно-практическая ревматология. – 2000. – № 1. – С. 35–41.
6. Мазуров, В. И. Дифференциальная диагностика при остром суставном синдроме / В. И. Мазуров, А. М. Лиля, А. С. Повзун // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2012. – Т. 4, № 3. – С. 87–98.
7. Беляева, Л. М. Болезни суставов у детей : методическое пособие / Л. М. Беляева, И. Д. Чижевская. – Минск. : ДокторДизайн, 2015. – 112 с.
8. Заболевания суставов у детей / Р. И. Гріднева [и др.] // Вопросы организации и информатизации здравоохранения – 2016. – Приложение. – С. 103–105.
9. Baidam, E. Juvenile idiopathic arthritis / E. Baidam // Oxford Textbook of Rheumatology /

- ed.: R. A. Watts [et al.]. – Oxford University Press, 2013. – 4th edition. – Chapter 116. – P. 913–919.
10. 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. – doi: 10.1186/1546-0096-6-11.
11. 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.
12. Частота генотипов и аллелей полиморфных локусов генов воспалительного ответа *PTN22*, *TNFA* 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.
13. Полиморфизм ряда генов иммунного и воспалительного ответа как фактор предрасположенности к ювенильному идиопатическому артриту / Н. В. Савина [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика.* – 2018. – Т. 24. – С. 22–36.
14. Севостьянов, К. В. Ассоциация генов, не кодирующих компоненты главного комплекса гистосовместимости, с ювенильным идиопатическим артритом / К. В. Севостьянов, Е. И. Алексеева, Д. А. Чистяков // *Вестник РАМН.* – 2014. – Т. 69, № 9–10. – С. 83–94.
15. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation / T. Yokosuka [et al.] // *Immunity.* – 2010. – Vol. 33, № 3. – P. 326–339.
16. Sharp, R. C. Genetic Variations of PTPN2 and PTPN22: Role in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Crohn's Disease. / R. C. Sharp, M. Abdulrahim, E. S. Naser, S. A. Naser // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2015. – Vol. 5, № 95. – doi: 10.3389/fcimb.2015.00095.
17. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers / Xin Yao [et al.] // *Pharmacology & Therapeutics.* – 2014. – Vol. 141, № 2. – P. 125–139.
18. Интерлейкин 6 — от молекулярных механизмов передачи сигнала к физиологическим функциям и терапевтическим мишеням / М. С. Друцкая [и др.] // *Молекулярная биология.* – 2015. – Т. 49, № 6. – С. 937–943. – doi: 10.7868/S0026898415060063.
19. Wong, W. F. Down-regulation of Runx1 Expression by TCR Signal Involves an Autoregulatory Mechanism and Contributes to IL-2 Production / W. F. Wong, M. Kurokawa, M. Satake, K. Kohu // *The Journal Of Biological Chemistry.* – 2011. – Vol. 286, № 13. – P. 11110–11118.
20. An Essential Role for the Transcription Factor Runx1 in T Cell Maturation / Fan-Chi Hsu [et al.] // *Nat Scientific Reports.* – 2016. – № 6. – doi 10.1038/srep23533.
21. Влияние полиморфизма -174 G/C гена IL-6 на вероятность развития ревматоидного артрита у детского и взрослого населения Республики Беларусь / А. А. Яцкив [и др.] // *Доклады Национальной академии наук Беларуси.* – 2018. – Т. 62, № 5. – С. 608–614.
22. Реактивный артрит: критерии диагноза и подход к этиотропной терапии / А. В. Глазун [и др.] // *Клинич. геронтология.* – 2008. – № 2. – С. 41–42.
23. Болезни суставов в практике семейного врача. Пособие для врачей / под ред. Г. В. Дзяка. – Киев: Инкос, 2005. – 144 с.
24. HLA-B27-Associated Reactive Arthritis: pathogenetic and clinical considerations / I. Colmegna [et al.] // *Clinical Microbiology Reviews.* – 2004. – № 2. – P. 348–369.
25. John, T. Impact of the complement cascade on post-traumatic cartilage inflammation and degradation / T. John, P. F. Stahel, S. J. Morgan, G. Schulze-Tanzil // *Histol. Histopathol.* – 2007. – Vol. 22. – P. 781–790.
26. Targeting pro-inflammatory cytokines following joint injury: acute intra-articular inhibition of interleukin-1 following knee injury prevents post-traumatic arthritis / Furman [et al.] // *Arthritis Research & Therapy.* – 2014. – Vol. 16. – R134.
27. Plesca, D. A. Postinfectious Arthritis in Pediatric Practice / D. A. Plesca [et al.] // *Journal of Clinical Medicine.* – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. 164–169.
28. Crucial role of interleukin-10/interleukin-12 balance in the regulation of the type 2 T helper cytokine response in reactive arthritis / Z. Yin [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 1997. – Vol. 40, № 10. – P. 1788–1797.
29. IL10.G Microsatellites Mark Promoter Haplotypes Associated With Protection Against the Development of Reactive Arthritis in Finnish Patients / W. Kaluza [et al.] // *Arthr. Rheum.* – 2001. – Vol. 44, № 5. – P. 1209–1214.

30. Tumour necrosis factor microsatellites in reactive arthritis / J. Tuokko [et al.] // *Br J Rheumatol.* – 1998. – Vol. 37, № 11. – P. 1203–1206.
31. Reveille, J. D. The genetic basis of spondyloarthritis / J. D Reveille // *Ann Rheum Dis.* – 2011. – Vol. 70, Suppl 1. – P. – i44–i50. – doi:10.1136/ard.2010.140574.
32. Genetic and Cellular Evidence of Decreased Inflammation Associated With Reduced Incidence of Posttraumatic Arthritis in MRL/MpJ Mice / J. S. Lewis Jr. [et al.] // *Arthr Rheum.* – 2013. – Vol. 65, № 3. – P. 660–670. – doi: 10.1002/art.37796.
33. Rai, M. F. Genetic Variability in the Response to Injury / M. F. Rai, L. J. Sandell // *Post-Traumatic Arthritis: Pathogenesis, Diagnosis and Management* / ed.: S. A. Olson, F. Guilak. – Springer Science+Business Media New York, 2015. – Chapter 13. – P. 149–164.

H. A. Yatskiu¹, T. D. Kuzhir¹, E. V. Sechko², A. M. Tchitchko², M. G. Myslivets³, I. D. Chyzheuskaya⁴, N. L. Bilskaya⁵, A. V. Sukalo², R. I. Goncharova¹

POLYMORPHISM OF IMMUNE AND INFLAMMATORY RESPONSE GENES IN CHILDREN WITH ARTICULAR SYNDROME

¹Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University
Minsk, 220116, the Republic of Belarus

³Grodno Regional Children's Clinical Hospital
Grodno, 230029, the Republic of Belarus

⁴Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education
Minsk, 220013, the Republic of Belarus

⁵Gomel Regional Children's Clinical Hospital
Gomel, 246050, the Republic of Belarus

Children with articular syndrome (AS, n = 230) in cases of various joint pathology except juvenile idiopathic arthritis (JIA) and in the control group (n = 320) were genotyped on polymorphic loci of the immune and inflammatory response genes: *STAT4* (rs7574865), *CTLA4* (rs231775), *PTPN2* (rs2542151, rs7234029), *IL6* (rs1800795), *IL6R* (rs2228145, rs4845618), *RUNX1* (rs9979383). In general, the distribution of genotype and allele frequencies for the studied polymorphisms in the group of patients with AS did not differ from the control. Paired combinations analysis of genotypes revealed 12 variants affecting the susceptibility of Belarusian patients to joint pathologies of different etiology, but not to JIA. Our findings are of potential practical value for differential diagnostics.

Key words: articular pathology, articular syndrome, juvenile idiopathic arthritis, immune and inflammatory responses, gene polymorphism.

Дата поступления статьи: 8 июля 2019 г.

E. N. Makeyeva¹, E. P. Mikhalenko¹, S. V. Kubrak¹, N. V. Savina¹, E. I. Kuzminova¹, L. V. Milko¹, K. A. Panteley¹, A. P. Kolbas², N. M. Matusевич², O. S. Yezhova³, V. S. Liushtyk³, A. V. Kilchevsky¹

DNA BARCODING TECHNOLOGY IN BELARUS: PROSPECTS AND NEEDS

¹Institute of Genetics and Cytology of NASB

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

e-mail: E.Makeeva@igc.by

²Brest State A.S. Pushkin University

21, Kosmonavtov Boulevard, Brest, 224016, the Republic of Belarus

e-mail: ecocenter@brsu.brest.by

³State Nature Protection Establishment "Narochansky National Park"

11, Leninskaya Str., Narach, Myadelsky District, 222395, Minsk Region, the Republic of Belarus

e-mail: nauka@narochpark.by

The DNA identification of rare and endangered plant species started in 2017 at the Republican DNA Bank. DNA barcoding is the best approach and tool to study flora and fauna and organize the obtained data in a special database. At present, the database contains barcodes (*ITS2*, *rbcl*, *psbA-trnH*) of 35 wild plant species growing in the territory of the Republic of Belarus. This is the first effort Belarus has made in compiling a Reference DNA Barcode Library to provide for the identification of rare and endangered plant species in the protected areas and biological collections.

Keywords: taxonomic identification, *ITS2*, *rbcl*, *psbA-trnH*, the Red Book of the Republic of Belarus.

Introduction

The Republic of Belarus acceded to the Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity in 2014. To implement its Article 17 "Monitoring the Utilization of Genetic Resources", taxa verification of genetic resources should be conducted.

DNA barcoding is the best approach and tool to study flora and fauna and organize the obtained data in a special database. Scientific collaboration and training on the use of DNA barcoding techniques are in dire need for specialists in Belarus. The DNA identification of rare and endangered plant species started in 2017 at the Republican DNA Bank of a Human, Plants, Animals and Microorganisms with a view of being operational and closer to the use of DNA barcoding techniques to assess species diversity and their spread in the total gene pool of plants.

The Republican DNA Bank was established in 2013 at the Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus, and in 2016, it acquired a status of the National Heritage. DNA Bank is a full-

range and multifunctional structure. Its collections are depositories of biological material viable for the long-term scientific study. The nature protection activity of the DNA Bank is based on the study related to the genetic diversity of natural populations of wild species and the molecular genetic identification of species, including their taxonomic status verification.

Natural vegetation covers 67% of the territory of the Republic of Belarus and is represented by 230 types of plant communities formed by 12 thousand species of plants and fungi. From 4100 taxa of the higher plants registered in the Republic, about 1400 (34.15%) are representatives of the native fraction of flora and 2700 (65.85%) are adventive species [1]. Conservation of biological diversity is the national policy priority and is implemented through various mechanisms. The most effective among them is the development of a system of specially protected natural areas occupying 8.72% of the country's territory that corresponds to a national indicator of safety in the ecological sphere [2].

The necessary mechanism includes the inventory and mapping of rare and endangered species,

periodic monitoring of populations' state and determining the number of protected and resource-generating species [3]. Rare and endangered plant species are characterized by the lower ability to survive in the face of climate change and the pressure of anthropogenic factors, leading to the loss of valuable genotypes and a decrease in biodiversity in general. To date, the Red Book of the Republic of Belarus (4th edition, 2015) lists 303 species of wild-growing plants, including 189 vascular plant species falling under national nature conservation categories I, II, III and IV, which correspond to the following international categories: CR (critically endangered), EN (endangered), VU (vulnerable), NT (near threatened), respectively [4].

In our research, we aimed to perform the inventory of botanical resources using a DNA barcoding technique and establishing a Reference DNA Barcode Library of Rare and Endangered Plant Species.

Materials and Methods

DNA barcoding of rare plant species is carried out jointly with the National Coordination Centre on Access to Genetic Resources and Benefit-sharing.

Collecting biological material for molecular genetic research on especially protected natural areas was performed by the members of environmental institutions and specialists in botany without removing plants from their habitats. Special methodological recommendations regulating collection, storage and transport of plant material for high-quality DNA isolation with no signs of degradation and impurities have been developed. Along with DNA barcoding, ecological and geographical description of rare plant populations is verified and is together with the morphological plant description entered into the Rare Plant Collection Database [5].

We researched the biological material of 35 rare and endangered plant species collected in the National Park "Narochansky" and in Brest Region (including the National Park "Belovezhskaya Pushcha" and the Transboundary Biosphere Reserve "Western Polesie") in 2016–2018 (Table 1). When collecting plants for their subsequent transfer to the Republican Bank, employees were guided only by the "belonging" of a species to the Red Book of the Republic of Belarus giving no advantage to the members of any particular family.

Table 1

List of plants studied using the DNA barcoding method

No.	Plant species	Conservation category *
1	<i>Abies alba</i> Mill.	I (CR)
2	<i>Anacamptis morio</i> L.	II (EN)
3	<i>Anemone nemorosa</i> L.	**
4	<i>Anemone sylvestris</i> L.	IV (NT)
5	<i>Arnica montana</i> L.	IV (NT)
6	<i>Betula nana</i> L.	II (EN)
7	<i>Botrychium matricariifolium</i> (Retz.) A. Br. Ex W. D.J. Koch	II (EN)
8	<i>Botrychium multifidum</i> (S. G. Gmel.) Rupr.)	III (VU)
9	<i>Cardamine bulbifera</i> L.	IV (NT)
10	<i>Cephalanthera longifolia</i> (L.) Fritsh	III (VU)
11	<i>Cephalanthera rubra</i> (L.) Rich.	III (VU)
12	<i>Daphne cneorum</i> L.	II (EN)
13	<i>Digitalis grandiflora</i> Mill.	IV (NT)
14	<i>Dracocephalum ruyschiana</i> L.	III (VU)
15	<i>Gentiana cruciata</i> L.	I (CR)
16	<i>Gentiana pneumonanthe</i> L.	**

Continuation of table 1

No.	Plant species	Conservation category *
17	<i>Gladiolus imbricatus</i> L.	IV (NT)
18	<i>Hedera helix</i> L.	II (EN)
19	<i>Iris sibirica</i> L.	IV (NT)
20	<i>Laserpitium latifolium</i> L.	III (VU)
21	<i>Lathyrus laevigatus</i> (Waldst. & Kit.) Gren.	III (VU)
22	<i>Lathyrus palustris</i> L.	**
23	<i>Lilium martagon</i> L.	IV (NT)
24	<i>Melittis melissophyllum</i> auct. P.P.	III (VU)
25	<i>Nuphar lutea</i> (L.) Sm.	**
26	<i>Potentilla alba</i> L.	III (VU)
27	<i>Prunus spinosa</i> L.	III (VU)
28	<i>Pulmonaria mollis</i> Wulf. ex Hornem.	III (VU)
29	<i>Pulsatilla patens</i> (L.) Mill	IV (NT)
30	<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.	II (EN)
31	<i>Salvia pratensis</i> L.	IV (NT)
32	<i>Scorzonera austriaca</i> Willd.	I (CR)
33	<i>Thesium ebracteatum</i> Hayne	IV (NT)
34	<i>Trollius europaeus</i> L.	IV (NT)
35	<i>Tulipa sylvestris</i> L.	III (VU)

Footnote. * — I (CR) — critically endangered; II (EN) — endangered; III (VU) — vulnerable; IV (NT) — near threatened; ** — Plants No. 16, 22 and 25 not included in the 4th edition of the Red Book of the Republic of Belarus, but protected in the territories of adjacent States (Russia, Ukraine)

The plant material (leaves or their apical part, petals) was collected without removing plants from their habitats. For each species, DNA was isolated from three separately growing plants, except for the cases where a plant is currently represented by a single specimen (most often it is vulnerability category I or II) or cannot be collected for some other reasons. The collected plant material was stored before the DNA isolation at 4 °C. Before the DNA isolation, the samples were frozen in liquid nitrogen and comminuted in the porcelain mortar. Total DNA was extracted in line with the extraction protocol of the DNeasyPlant Mini Kit (Qiagen, Germany) as per producer's guidelines. DNA was normalized by adjusting its concentration to 12 ng/μL.

Three marker sequences were used to identify rare and endangered species of wild plants: *rbcL* (ribulose-bisphosphate carboxylase gene),

psbA-trnH (intergenic spacer (*IGS*) regions of *psbA-trnH*) and *ITS2* (internal transcribed spacer).

The *ITS2* marker is the nuclear sequence region that forms part of a ribosomal cluster and is localized between the structural genes of the 5.8S and 28S ribosomal RNA. The *rbcL* gene is the most extensively characterized chloroplast plant gene. The plastid DNA *rbcL* region encodes a large subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase — a key enzyme for fixing CO₂ in the dark phase of photosynthesis. The non-coding plastid DNA *psbA-trnH* region is the Intergenic Spacer (*IGS*) region and is located between the gene controlling the synthesis of the D1 protein of photosystem II and the histidine tRNA [6, 7].

Amplification of the marker sequences *rbcL*, *psbA-trnH* and *ITS2* was performed using specific primers (Table 2) in the final volume of the reaction mixture of 10μl (thermal cycler C1000 Touch Thermal Cycler, BioRad, USA).

Table 2

Primers for the marker sequence amplification

DNA barcode	Primer sequences	Expected PCR product size, bp
<i>ITS2</i>	5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3' 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'	~220-260 [9]
<i>psbA-trnH</i>	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3' 5'-CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC-3'	~509 [10]
<i>rbcL</i>	5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' 5'-GTAAAATCAAGTCCACCGCG-3'	~654 [10]

The number of DNA introduced into the reaction mixture constituted 12-20 ng/μl. The composition of the PCR mixture was standard (buffer 10x, 25M MgCl₂, 2mM dNTPs, 3% DMSO, 10μM of each primer, 5U/μl DNA polymerase). Primer sequences and basic recommendations for amplification conditions are freely available on the website of the International Center for DNA Barcoding — CCDB (Canadian Center for DNA Barcoding) [8]. The annealing temperature of primers to obtain the *ITS2* sequence was 58 °C, *rbcL* — 54 °C and *psbA-trnH* — 55 °C. The amplification results were checked in the agarose gel: 1% for *ITS2* and *rbcL* markers and 2% gel was used for the *psbA-trnH* marker due to the significant variability of amplification products by this marker.

Amplification products were purified using Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, USA) enzymes as per producer's recommendations. The terminator reaction was performed using the commercial kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) followed by purification of the reaction product with ethanol. Identification of the nucleotide sequence was performed on the automatic genetic analyzer ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA). The chromatograms of sequences were analyzed using ChromasPro 13.3 and saved in the FASTA format. The alignment of target (marker) individual sequences for each plant of the same species to obtain the resulting sequence was performed using the program *MEGA X* (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). The resulting nucleotide sequences were compared, using the National Center for Biotechnology Information, the Basic Local Alignment Search Tool (GenBank NCBI), with the DNA sequences stored in International Databases [11].

Results and Discussions

We based on the double loci genotyping scheme using *ITS2* and *rbcL* markers. If the data obtained are not sufficient for accurate plant species identification, then you can additionally use a *psbA-trnH* marker. As a result of amplification of the *ITS2* marker sequence, the product size in all the cases did not exceed 550 bp and in the case of *rbcL* amplification — 600–650 bp. This does not contradict the data of other authors [12]. It should be noted that as a result of using a pair of primers to the *ITS2* region recommended by the Canadian Center for DNA Barcoding (CCDB), not only *ITS2* is amplified, but also partially *5.8S* and *28S* regions. In this case, the size of the total product is most commonly 400–550 bp, which is twice the size of *ITS2* in angiosperms (220–240 nucleotides [9]). However, this does not interfere with further work.

The amplification products of *ITS2*, *rbcL* and *psbA-trnH* marker sequences were sequenced in the forward and reverse directions to obtain an individual nucleotide sequence of those markers for each plant. Individual sequences were aligned using *MEGA X*. As a result, two or three resulting marker sequences (*ITS2*, *rbcL* and *psbA-trnH*) were obtained for each of 35 species, which were compared with the similar ones recorded in the NCBI BLAST Database. Identification of a nucleotide sequence of a known biological species in NCBI completely coinciding with our sequence enables us to consider our sequence as a reference DNA barcode for a particular plant species in the territory of the Republic of Belarus.

The general scheme of the performed species identification is presented by *Scorzonera glabra* Rupr. (*austriaca*) used as an example, which belongs to category I of the national nature conservation significance. This is a relict boreal mountain taiga species occurring in Belarus in

an isolated locality — Myadzel District, Minsk Region. It grows as single specimens and in small groups in a very confined area. It is the only population, which includes several dozen well-developed flowering and fruiting individuals [4].

When amplifying DNA of *Scorzonera glabra* Rupr. (*austriaca*) (2 plants) using the *ITS2* marker, a fragment of ~450 bp in size was received; with *rbcL* ~600 bp. The amplification products of *ITS2* and *rbcL* were sequenced and 2 qualitative sequences of the *ITS2* region (reading length was 375 bp) and 2 qualitative sequences of the *rbcL* region (reading length was 536 bp) were obtained. The resulting *ITS2* marker sequence for *Scorzonera austriaca* from the National Park “Narochansky” by 97% coincided with the sequence AM117047.1 presented in NCBI for the species *Scorzonera austriaca*. Also, the *rbcL* marker sequence by 100% coincided with

the sequence GQ436482.1 represented in NCBI for the *Scorzonera austriaca* species.

In the course of the work performed, good replicability of amplification results was demonstrated for all three markers, which corresponds to the criterion of universality [6]. With regard to the sequences' quality, the *ITS2* and *rbcL* markers were better meeting the requirement. The independent application of each of three markers made it possible to identify species of 66% plants under study (23 species). In doing so, *ITS2* showed the maximum contribution — 20 plant species out of 35. Table 3 shows the species identification results of the plants listed in the Red Book of the Republic of Belarus using *ITS2* marker.

ITS sequences are considered as reference sequences due to a number of merits: they are localized in the nuclear genome and are highly

Table 3

Identification results of 20 rare and endangered plant species using the *ITS2* marker

No.	Plant species	Species identity, % *	Marker sequence code **
1	<i>Abies alba</i>	99	JN177292.1
2	<i>Anacamptis morio</i>	100	Z94092.1
3	<i>Anemone nemorosa</i>	91	KX167066.1
4	<i>Arnica montana</i>	99	FM177855.1
5	<i>Betula nana</i>	99	KX167561.1
6	<i>Cardamine bulbifera</i>	99	KX167752.1
7	<i>Cephalanthera longifolia</i>	99	AY146447.1
8	<i>Gentiana cruciata</i>	99	DQ398634.1
9	<i>Hedera helix</i>	99	AM50387.2
10	<i>Iris sibirica</i>	100	MF543721.1
11	<i>Laserpitium latifolium</i>	100	FJ415131.1
12	<i>Lathyrus laevigatus</i>	98	DQ311967.1
13	<i>Lathyrus palustris</i>	99	KX166469.1
14	<i>Lilium martagon</i>	99	AF088203.1
15	<i>Melittis melissophyllum</i>	99	KX165838.1
16	<i>Nuphar lutea</i>	100	KX165445.1
17	<i>Pulmonaria mollis</i>	99	KT737694.1
18	<i>Quercus petraea</i>	99	FM244114.1
19	<i>Salvia pratensis</i>	100	KX166755.1
20	<i>Scorzonera austriaca</i>	97	AM117047.1

Footnote. * — % Similarity of the received *ITS2* region sequence of the species under study and the sequence represented in NCBI BLAST; ** — Code of the *ITS2* marker sequence in NCBI BLAST

variable; the accumulation rate of nucleotide substitutions and rearrangements in them, that is the rate of their evolution, is higher in comparison with mitochondrial and chloroplast genes; they are highly copyable — there are cases of up to 30 000 copies per cell, which ensures successful amplification of the region even with a small amount of material; point mutations predominate in the *ITS* region of nuclear DNA and long InDel is rarely occurring, and therefore *ITS* sequences in different plants vary insignificantly in length, which is usable for comparing of different species' sequences [7, 13]. The resemblance by *ITS2* in the studied species using NCBI data varied from 91 to 100%; most often that marker sequence coincided with the database by 99%. The obtained results confirm the possibility of using the *ITS2* sequence to identify plants at different taxonomic levels: generic, species and possibly subspecies.

The *rbcL* marker showed the maximum efficacy by the criterion “sequence quality”. It is characterized by the most qualitative sequencing: a high reading length, minor errors with the possibility of subsequent manual correction. The similarity of *rbcL* marker sequences in the species under study with the NCBI data was 99–100% in almost all cases, except for *Lathyrus laevigatus*, *Pulmonaria mollis* and *Quercus petraea* species. The result of their genotyping at the *rbcL* locus must be repeated.

The amplification results with Intergenic spacer *psbA-trnH* were not so unambiguous. The marker proved to be the most variable in length — the sizes of the received amplicons varied from 300 to 1000 bp, which corresponds to the literature data on its features [13]. As distinct from the *ITS* region of nuclear DNA, which is characterized by the predominant accumulation of point mutations, structural rearrangements characteristic of the chloroplast genome as a whole occur most frequently in the *psbA-trnH* region of chloroplast DNA. InDel regions found in the *psbA-trnH* spacer most often constitute small inversions. These are insertions and deletions, which determine the difference in size of the *psbA-trnH* spacer in the compared taxa [12, 13]. In the course of the *psbA-trnH* marker amplification, we obtained several products for three species of plants (*Cardamine bulbifera*, *Gentiana pneumonanthe*, *Thesium ebracteatum*) and the selection of another marker is required in such a case.

By the criterion “sequence quality”, the *psbA-trnH* marker significantly conceded *ITS2* and *rbcL* despite the optimal reading length up to 732 bp. When using the *psbA-trnH* marker, the sequences with unambiguous nucleotide reading were received, which is consistent with the opinion of other authors that for the *trnH-psbA* fragment the significant variability of this marker by length hampers a sequence alignment procedure [7, 10]. However, for the three species in our study, the resolving power of *psbA-trnH* as an independent marker proved to be quite high. *Arnica Montana*, *Iris sibirica*, *Tulipa sylvestris*, *Botrychium matricariifolium*, *Hedera helix* and *Potentilla alba* were identified with an accuracy of 99–100% (AM690567.1, MF543660.1, AJ585047.1, KF700595.1, HE966656.1 and GQ384976.1, respectively). However, in other cases (*Cardamine bulbifera*, *Anacamptis morio*, *Pulsatilla patens*) the *psbA-trnH* marker identified plants only to the genus. To efficiently identify rare wild plants, *psbA-trnH* should be used along with other marker sequences.

Thus, the used marker sequences (*ITS2*, *rbcL*, *psbA-trnH*) allow to perform the taxonomic identification of rare and endangered plant species. The convergence of DNA analysis with classical methods of botanical research makes it possible to accurately identify wild plants, which allows for the effective inventory of genetic resources. However, in order to increase the resolving power of DNA barcodes, they should be used in an integrated manner. A four-loci panel is planned for use in the future.

Conclusion

Direct analysis of DNA nucleotide sequences will allow to enhance the traditional systems of classification. In Belarus, this is the first effort to compile a Reference DNA Barcode Library with a view of identification of rare and endangered plant species in National Parks and detecting errors or any divergences in the taxa identification. Scientific collaboration and training on the use of DNA barcoding techniques are in dire need for specialists in Belarus.

The authors thank the lead translator of the National Coordination Centre on Access to Genetic Resources and Benefit-sharing, Maryia Pyzhova, for help in translation the Article into English.

References

1. Convention on biological diversity. Fifth National report. Belarus. 59p. (In Russ.) [Electronic resource]: – Mode of access: <https://www.cbd.int/doc/world/by/by-nr-05-ru.pdf> . – Date of access: 17.04.2019.
2. News of Belarus/Area of especially protected natural territories in Belarus in 2017 increased almost by 13 thousand hectares [Electronic resource]: – Mode of access: <http://www.belta.by/society/view/ploschad-osobo-ohranjaemyh-prirodnyh-territorij-v-belarusi-v-2017-godu-vozroslo-pochti-na-13-tys-ga-289996-2018>. (In Russ.). – Date of access: 22.10.2018.
3. Buchenkov, I.E. Vegetable resources of Belarus, rational use and protection: short course of lectures / I.E. Buchenkov. – Minsk, MGEU of A. D. Sakharov. – 2012. – 73 p. (In Russ.).
4. Red Book of Republic of Belarus. Plants: the rare and being under the threat of disappearance species of wild-growing plants / Main editorial board: I. M. Kachanovsky (chairman), M. E. Nikiforov, V. I. Parfyonov, etc. 4th edition. – Minsk: Belarusian encyclopedia, 2015. – 448 p. (In Russ.).
5. Studying of bioecological features of populations of rare plants in the Brest region, monitoring, sampling and development of cartographic web applications: report on research (final) / Brest State A. S. Pushkin University; head N. M. Matusevich. – Brest, 2018. – 69 p. – (In Russ.).
6. Kress, W. J. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region / W. J. Kress, D. L. Erickson. – 2007. – PLoS ONE. 2 (6). – e508. – doi:10.1371/journal.pone.0000508.
7. Molecular markers for plant species identification and phylogenetics of plants / T. V. Matveeva [et al.] // Ecological genetics. – 2011. – Vol. 9, № 1. – P. 32–43 (In Russ.).
8. CCDB [Electronic resource] / Canadian Centre for DNA Barcoding. – Mode of access: <http://ccdb.ca/>. – Date of access: 17.01.2018.
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. 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.
11. 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: 02.04.2018.
12. A DNA barcode for land plants / CBOL Plant Working Group // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, № 31. – P. 12794–12797. – doi: 10.1073/pnas.0905845106.
13. Identification of Amazonian Trees with DNA Barcodes / M. A. Gonzalez [et al.] // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, № 10. – e7483. – doi:10.1371/journal.pone.0007483.

Е. Н. Макеева¹, Е. П. Михаленко¹, С. В. Кубрак¹, Н. В. Савина¹, Е. И. Кузьминова¹, Л. В. Милько¹,
К. А. Пантелей¹, А. П. Колбас², Н. М. Матусевич², О. С. Ежова³, В. С. Люштык³, А. В. Кильчевский¹

ТЕХНОЛОГИЯ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ В БЕЛАРУСИ: ПЕРСПЕКТИВЫ И ВОСТРЕБОВАННОСТЬ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

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

²Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина

Республика Беларусь, 224016, г. Брест, б-р Космонавтов, 21

³Государственное природоохранное учреждение «Национальный парк Нарочанский»

Республика Беларусь, 222396, Минская область, Мядельский район, к. п. Нарочь, ул. Ленинская, 11

В 2017 году в Республиканском банке ДНК начата генетическая идентификация редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений. ДНК-штрихкодирование является наилучшим методом для изучения флоры и фауны и последующей систематизации результатов в специальной базе данных. В настоящее время база данных содержит штрихкоды (*ITS2*, *rbcl*, *psbA-trnH*) 35 диких видов растений, произрастающих на территории Республики Беларусь. Это первая попытка Беларуси составить справочную библиотеку штрихкодов ДНК для идентификации редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений на охраняемых территориях и в биологических коллекциях.

Ключевые слова: таксономическая идентификация, *ITS2*, *rbcl*, *psbA-trnH*, Красная книга Республики Беларусь.

Дата поступления статьи: 5 августа 2019 г.

Е. С. Синявская¹, И. А. Козыро^{2,3}, А. В. Сукало^{2,3}, Р. И. Гончарова¹

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *STAT4*, *PD-1*, *PD-L1* У ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ И ЛЮПУС НЕФРИТОМ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: e.siniauskaya@igc.by

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

³Республиканский центр детской нефрологии и заместительной почечной терапии
Республика Беларусь, 220020, г. Минск, ул. Нарочанская, 17

Исследована частота полиморфных вариантов генов *STAT4* (rs3821236), *PD-1* (rs11568821), *PD-L1* (rs2297136) в группе детей с системной красной волчанкой без поражения почек и с люпус нефритом ($n = 25$) по сравнению с контрольной группой детей ($n = 80$). Анализ распределения частот генотипов/аллелей по полиморфному локусу rs3821236 *STAT4* выявил статистически значимую ассоциацию гетерозиготного генотипа GA ($p = 0,043$; OR 2,82 [1,10–7,22]), а также генотипов, имеющих в своем составе хотя бы один минорный аллель (GA+AA vs. GG) с риском развития СКВ ($p = 0,04$ OR 2,54 [1,04–6,41]) для группы детей с СКВ без поражения почек и с наличием почечной патологии, что имеет потенциальную практическую ценность для диагностики. При анализе полиморфных локусов *PDCDI* (rs11568821) и *PD-L1* (rs2297136) не выявлено статистически значимых различий между исследованными группами.

Ключевые слова: системная красная волчанка, люпус-нефрит, дети, генетический полиморфизм, *PD-1*, *PD-L1*, *STAT4*.

Введение

Системная красная волчанка (СКВ) — хроническое системное аутоиммунное заболевание, в основе которого лежит гиперпродукция широкого спектра аутоантител и иммунных комплексов с развитием иммуновоспалительного повреждения многих органов. СКВ характеризуется широким спектром проявлений (включающих артрит и неврологические, почечные и ЖКТ манифестации), вариабельными течением и прогнозом [1].

Заболеваемость СКВ составляет 50–250 случаев на 100 тыс. населения. В основном СКВ болеют люди репродуктивного возраста, преимущественно женщины. Педиатрическая форма СКВ составляет 10–20% случаев [1]. В Республике Беларусь общая заболеваемость СКВ составляет от 12 до 64 случаев на 100 тыс. индивидов, однако точная частота возникновения для детского населения до сих пор не установлена [2]. В течение 20-летнего периода (1998–2018 гг.) в Республиканском Центре детской нефрологии и заместительной по-

чечной терапии УЗ «2-я детская клиническая больница» города Минска под наблюдением находился 61 ребенок с СКВ и морфологически верифицированным люпус нефритом.

Поражение почек при СКВ (люпус-нефрит, ЛН) является наиболее тяжелым осложнением этого заболевания, нередко приводящим к хронической почечной недостаточности уже в детском возрасте. В случайной выборке почти у половины пациентов СКВ в начале заболевания имеются признаки поражения почек, в дальнейшем они диагностируются до 60% у взрослых и до 80% у детей [3].

Крайне тяжелое течение заболевания и необходимость пожизненного экономически затратного лечения обуславливают социальную значимость болезни и большую актуальность изучения молекулярно-генетической природы СКВ. Существующие клиничко-лабораторные методы диагностики недостаточно специфичны и информативны для раннего выявления этой патологии, не позволяют зарегистрировать изменения, происходящие на

досимптоматических стадиях болезни и прогнозировать развитие ЛН.

В последние десятилетия интенсивно изучается генетическая природа многофакторных заболеваний почек, что позволило установить превалирующую роль генетических факторов в этиологии и патогенезе СКВ и ЛН [4, 5].

В настоящее время выявление приоритетных генетических вариантов риска возникновения и развития СКВ и ЛН является важной задачей молекулярной генетики в детской ревматологии и нефрологии, в том числе и в Республике Беларусь, для чего требуется расширение исследуемых когорт пациентов и накопление биологического материала.

Нами начато изучение генетической природы СКВ и ЛН у детского контингента Республики Беларусь. Для исследования выбраны гены иммунного и воспалительного ответа, среди них *STAT4* — сигнальный трансдуктор, *PD-1* и *PD-L1* — компоненты (рецептор и лиганд) регуляции Т-клеточного сигналинга. Их общая характерная особенность состоит в том, что они кодируют белки, которые задействованы в важных молекулярных сигнальных путях, которые, в свою очередь, изменяют работу иммунной системы (включая образование аутоантигенов и активацию врожденной и приобретенной иммунных систем) [3].

Так, продукт экспрессии гена *PD-1* (также *PDCD1*) является рецепторным белком, экспрессируется активированными Т-/В-лимфоцитами и миелоидными клетками. Относится к суперсемейству иммуноглобулинов, участвует в нисходящей регуляции иммунного ответа, передает подавляющий сигнал Т-лимфоцитам [6, 7]. *PD-L1* (также *CD274*) кодирует трансмембранный белок, который экспрессируется различными клетками (кроветворными, а также лимфоцитами и опухолевыми клетками). В качестве лиганда связывается с рецептором (*PDCD1*) и модулирует активацию (порог активации) Т-лимфоцитов и продукцию цитокинов [6, 8]. *STAT4* — это ДНК-связывающий белок, сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции. Является посредником в реакции лимфоцитов на интерлейкины и экспрессируется в активированных моноцитах, макрофагах и дендритных клетках при воспалении [9, 10].

Установлена ассоциация полиморфного варианта rs7574865 гена *STAT4* с риском разви-

тия и течением болезни [5, 11, 12]. Нами исследован другой полиморфный вариант этого гена rs3821236, для которого также имеются литературные данные о наличии ассоциации с развитием аутоиммунных заболеваний [10, 12, 13]. Гены *PD-1*, *PD-L1* задействованы в регуляции активности Т-лимфоцитов, их вклад в предрасположенность к СКВ представляется высоко вероятным.

В данной статье представлены результаты генотипирования выборки детей, страдающих СКВ и СКВ с ЛН, по локусам *STAT4* (rs3821236), *PD-1* (rs11568821), *PD-L1* (rs2297136) в сравнении с контрольной группой детей без каких-либо аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Материалы и методы

Группы исследования включали пациентов нефрологического (Республиканского Центра детской нефрологии и заместительной почечной терапии) и кардиологического отделений УЗ «2-я детская клиническая больница» г. Минска с установленными диагнозами СКВ (n = 7), СКВ с люпус нефритом (n = 18), а также госпитальный контроль (дети без аутоиммунных и острых воспалительных заболеваний [n = 67–80]). Для проведения исследования было получено согласие законных представителей пациентов.

Объект исследования — геномная ДНК, выделенная из образцов периферической цельной крови стандартным фенол-хлороформным методом [14].

Выбор генов для анализа обусловлен литературными данными о вовлеченности продуктов данных генов в функционирование и регуляцию иммунных реакций.

Полиморфные варианты *PD-1* (rs11568821), *PD-L1* (rs2297136), *STAT4* (rs3821236) определялись с помощью ПЦР-ПДРФ-метода согласно протоколам, разработанным в лаборатории молекулярных основ стабильности генома Института генетики и цитологии НАН Беларуси на основе опубликованных рекомендаций [6–9]. Условия амплификации, последовательности олигонуклеотидов (ОДО «Праймтех», Беларусь) и эндонуклеазы рестрикции (New England Biolabs®, США) указаны в табл. 1.

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета стандартных программ MS Excel 2010. Различия в распределении частот аллелей/генотипов в исследуемых

Таблица 1

Условия генотипирования изученных SNP

Локус	Праймеры	Условия ПЦР	Ферменты и продукты рестрикции (п. о.)
<i>PD-1</i> rs11568821	F: CAGGACTCACATTCTATTATAG	37 циклов: 95 °C — 30 с	PstI-HF, GG (дикий тип): 293 GA: 100+193+293 AA: 100+193
	R: AGATAAGAAATGACCAAGC	54,2 °C — 20 с 72 °C — 30 с	
<i>PD-L1</i> rs2297136	F: GGAGACGTAATCCAGCATTTGGAA	37 циклов: 95 °C — 20 с	PspOMI, CC (дикий тип):101+165 CT: 266+101+165 TT: 266
	R: TGTCACAGGCGTCGATGAG	53,2 °C — 20 с 72 °C — 30 с	
<i>STAT4</i> rs3821236	F: CCCTGAGATTAAATGCTG	37 циклов: 95 °C — 20 с	BanI, GG (дикий тип):157+161 GA: 318+157+161 AA: 318
	R: AGCAGGATAGAATTAAGAGG	54 °C — 20 с 72 °C — 30 с	

группах определяли с помощью критерия χ^2 или точного критерия Фишера. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Влияние каждого исследуемого локуса на вероятность развития СКВ определяли на основе показателя отношения шансов OR и 95% доверительного интервала CI.

Результаты и обсуждение

Демографическая характеристика групп исследования — пациентов с установленным диагнозом СКВ и СКВ с ЛН, а также индивидов без аутоиммунных и воспалительных заболеваний — представлена в табл. 2.

Статистически значимых различий по среднему возрасту между исследуемыми группами выявлено не было. В группе пациентов (с диагнозами «СКВ+ЛН» и «СКВ») доминируют девочки, что согласуется с общеизвестными данными по заболеваемости [15]. Контрольные группы были специально подобраны с

преобладанием девочек. Количество пациентов контрольной группы несколько различалось в случае каждого исследованного гена.

Клиническая характеристика контрольной группы и группы пациентов по особенностям диагноза представлена в табл. 3.

Основную часть контрольной группы составили пациенты с вегетативными дисфункциями (95%). Вегетососудистая дистония (нарушения функций вегетативной нервной системы) характерна для любого возраста, однако наиболее часто диагностируется у школьников [16].

Для постановки диагноза ЛН пациентам с СКВ выполняли биопсию почечной ткани, класс нефрита определяли в соответствии с критериями Международного общества нефрологов и Общества нефропатологов (ISN/RPS) 2004 года [17].

Исходя из характеристики группы обследованных пациентов с СКВ и СКВ с ЛН, самым частым вариантом поражения почек при СКВ

Таблица 2

Демографическая характеристика групп обследования

Исследуемые параметры	Группа пациентов (25)	Контроль rs3821236 <i>STAT4</i> (75)	Контроль rs11568821 <i>PD-1</i> (67)	Контроль rs2297136 <i>PD-L1</i> (80)
Соотношение по полу (девочки / мальчики), %	92 / 8	66,23 / 33,77	58,82 / 41,18	65 / 35
Средний возраст, лет ($m \pm SD$)*	13,9 \pm 3,8	14,27 \pm 6,72	14,37 \pm 6,29	14,37 \pm 6,29
Максимальный / минимальный возраст (лет)	17 / 10	17 / 6	17 / 6	17 / 6

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

Таблица 3

Клиническая характеристика исследуемых групп

Группа	Особенности диагноза	Количество человек
Группа госпитального контроля	Артериальная гипертензия	1
	Лабильная АГ	1
	Варикоцеле	1
	Пролапс митрального клапана 1 ст.	1
	Вегетативная дисфункция	76
Группа пациентов	СКВ без поражения почек	7
	СКВ с поражением почек (СКВ+ЛН)	18
	ЛН II кл.	3
	ЛН III кл.	1
	ЛН IV кл.	13
	ЛН V кл.	1

являлся люпус нефрит IV класса — диффузный пролиферативный гломерулонефрит (52% от общей выборки пациентов, 72,2% от числа пациентов с СКВ+ЛН), что также согласуется с данными литературы [1].

В группе пациентов с СКВ и СКВ с ЛН было изучено распределение частот генотипов/аллелей по ряду полиморфных локусов в сравнении с госпитальным контролем. В табл. 4 представлены данные, касающиеся полиморфизмов генов *PDCDI*, *PD-L1* и гена *STAT4*.

Для интронного полиморфизма rs11568821 (также PD1.3G/A или 7146 G/A) гена *PDCDI* по результатам ПЦР-ПДРФ-анализа для всех пациентов ($n = 25$) и проанализированной группы контроля ($n = 67$) был установлен один и тот же генотип — гомозигота GG по аллелю дикого типа. Тот факт, что полиморфный вариант PD1.3A не был обнаружен, можно объяснить небольшим размером исследованной нами выборки и меньшей относительно аллеля G частотой встречаемости (MAF) аллеля A в выборках других исследований [18]. Таким образом, осуществить поиск ассоциаций между аллелями/генотипами данного полиморфизма и СКВ у детей в рамках проведенного исследования не удалось. Тем не менее, имеется ряд исследований, где ассоциация полиморфного варианта гена *PDCDI* rs11568821 с СКВ подтверждается. Так, Prokunina с соавт. [7] пока-

зали, что аллель A этого локуса связан с развитием СКВ именно в европейской популяции. Он был обнаружен у 12% пациентов по сравнению с группой контроля — 5% ($p = 0,00001$; 95% CI 1,6–4,4). По результатам метаанализа, проведенного Liu с коллегами [19], среди европейцев неиспанского происхождения (совокупная выборка из 2909 пациентов и 3995 контрольных индивидов) наблюдалась статистически значимая ассоциация между аллелем A по локусу *PD-1* (rs11568821) и риском развития СКВ ($p = 0,002$; OR 1,290 [1,098–1,516]). Исследование, проведенное Johansson с соавт. [20] на популяции северного региона Швеции (размер выборки пациентов $n = 260$), выявило ассоциацию аллеля A с люпус-нефритом ($p = 0,005$; OR 2,71 [1,32–5,55]), но не с риском развития основного заболевания — СКВ.

Полиморфизм rs11568821 локализован в энхансер-подобном участке 4-го интрона гена *PD-1*, обогащенном сайтами связывания транскрипционных факторов. Аллель A предположительно нарушает сайт связывания транскрипционного фактора RUNX1, и подобное нарушение может приводить к изменениям в транскрипции гена [6].

По результатам генотипирования полиморфного локуса rs2297136 (*PD-L1*) достоверных ассоциаций частот встречаемости аллелей/генотипов с риском развития СКВ выявить не уда-

Таблица 4

Распределение частот аллелей и генотипов по изучаемым полиморфным локусам среди пациентов с СКВ и СКВ+ЛН и в группе контроля

SNP	Пациенты		Контроль		
	Генотипы/аллели	n	%	n	%
<i>PD-1</i> rs11568821		25		67	
GG		25	100	67	100
GA		0	0	0	0
AA		0	0	0	0
G		50	100	134	100
A		0	0	0	0
<i>PD-L1</i> rs2297136		25		80	
CC		6	24,0	23	28,8
CT		6	20,0	31	38,8
TT		13	52,0	26	32,5
C		18	36,0	77	48,1
T		32	64,0	83	51,9
<i>STAT4</i> rs3821236		25		75	
GG		12	48,0	54	70,7
GA		12	48,0¹	19	24,0
AA		1	4,0	4	5,3
G		36	75,0	127	82,7
A		14	28,0	27	17,3
GA+AA		13	52,0²	23	29,9

Примечание. 1 — $p = 0,043$ OR 2,82 [1,10–7,22]; 2 — $p = 0,04$ OR 2,54 [1,01–6,41] (GG vs. GA+AA)

лось. Локус rs2297136 C/T расположен в 3'-UTR области гена *PD-L1*, содержащей сайты связывания микроРНК (miR-296-5p, miR-324-5p). Полиморфные варианты rs2297136, возможно, влияют на регуляцию экспрессии [21].

В работе Abelson с соавт. [8] также не было установлено ассоциации аллельных вариантов генов *PD-L1* и *PD-L2* с СКВ. Тем не менее тот факт, что паттерны экспрессии *PD-L1* в нелимфоидных тканях и его взаимодействие с *PD-1* могут определять интенсивность иммунного ответа, указывает на актуальность изучения вклада полиморфных локусов гена *PD-L1* в предрасположенность к СКВ [22].

Анализ распределения частот генотипов/аллелей по полиморфному локусу rs3821236

STAT4 выявил статистически значимую ассоциацию генотипа GA ($p = 0,043$; OR 2,82 [1,10–7,22]), а также суммы генотипов, имеющих в своем составе хотя бы один минорный аллель (GA+AA vs. GG), с развитием СКВ ($p = 0,04$; OR 2,54 [1,01–6,41]). Эти данные дают основания полагать, что минорный аллель A может являться рискованным аллелем для белорусской популяции.

Действительно, Abelson в 2008 г. выявила рискованную значимость минорного аллеля A rs3821236 *STAT4* при изучении шведской популяции. В дальнейших исследованиях, проведенных на больших когортах разного этнического происхождения, была подтверждена достоверная ассоциация локуса rs3821236

гена *STAT4* (рисковый аллель А, $p = 7,07 \times 10^{-8}$) с возникновением СКВ для нескольких популяций, но вместе с тем отмечены этнические различия [10, 13, 23]. В нашем исследовании ограниченной когорты белорусских пациентов частота минорного аллеля А составила 28,0% по сравнению с 17,3% в контрольной группе, что практически совпадает с данными для испанской когорты — 31% и 20% соответственно [10]. При изучении уровня экспрессии *STAT4* мРНК у носителей различных генотипов по локусу rs3821236, Abelson и соавт. [10] выявили статистически значимую ассоциацию минорного аллеля (А) с повышенным уровнем экспрессии *STAT4* ($p = 0,02$). Это дает основания предположить, что генотип, содержащий хотя бы один аллель А, участвует в формировании риска возникновения СКВ.

Известно, что маркеры риска многофакторных заболеваний могут в той или иной степени отличаться для этнически разных популяций. Что касается СКВ и ЛН, то взаимная связь между rs3821236 гена *STAT4* и СКВ была подтверждена несколькими исследовательскими группами для ряда европейских популяций [10, 12, 24], за исключением населения Германии [10]. В то же время Namjou с соавт. [23] отметили связь локуса rs3821236 с риском развития СКВ как у европейцев ($p = 3,41 \times 10^{-11}$), так и для корейской популяции ($p = 2,72 \times 10^{-7}$).

Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют, что ген *STAT4*, критический регулятор иммунных ответов, является геном предрасположенности для СКВ. Установлено, что несколько полиморфизмов гена *STAT4* являются генетическими вариантами риска возникновения и развития СКВ и ЛН, при этом полиморфные варианты rs3821236 и rs3024866 являются наиболее эффективными, за которыми следуют rs7574865 и rs1467199 [10]. Важно отметить, что rs3821236 и rs7574865 представляют собой два различных и независимых генетических варианта риска развития СКВ, роль которых, по-видимому, варьирует в разных популяциях [10]. Масштабное исследование Taylor с коллегами выявило связь между rs7574865 *STAT4* и наличием ЛН и анти-дцДНК антител у выборки пациентов с СКВ европейского происхождения [25]. Дальнейшие исследования белорусской когорты

позволят выяснить вклад различных полиморфизмов гена *STAT4* в формирование риска СКВ и ЛН для жителей Республики Беларусь.

Заключение

Исследовано влияние трех полиморфных локусов (rs11568821, rs2297136, rs3821236) генов иммунного и воспалительного ответа на риск развития СКВ. Среди пациентов с СКВ с поражением почек наиболее распространенным был люпус нефрит IV класса. В общей группе детей с СКВ без поражения почек и с наличием почечной патологии частоты генотипов/аллелей по полиморфным локусам *PDCDI* (rs11568821) и *PD-L1* (rs2297136) статистически значимо не отличались от соответствующих показателей контрольной группы. При анализе распределения частот генотипов/аллелей для rs3821236 (*STAT4*) была выявлена статистически значимая ассоциация генотипа GA ($p = 0,043$; OR 2,82 [1,10–7,22]), а также суммы генотипов, имеющих в своем составе хотя бы один минорный аллель (GG vs. GA+AA), с риском развития СКВ ($p = 0,04$ OR 2,54 [1,01–6, 41]). Результаты исследования планируется валидировать на больших выборках с привлечением в анализ полиморфных вариантов других генов иммунного и воспалительного ответа.

Список использованных источников

1. Systemic lupus erythematosus: Basic, applied and clinical aspects / edited by G. C. Tsokos. – Elsevier Academic Press, 2016. – 572 p.
2. Ревматические болезни: Руководство для врачей / Под ред. В. А. Насоновой, Н. В. Бунчука. – М.: Медицина. – 1997. – 520 с.
3. Thibault Flesher, D. L. Recent Advances in the Genetics of Systemic Lupus Erythematosus / D. L. Thibault Flesher [et al.] // Expert review of clinical immunology. – 2010.
4. Stojnev, S. Challenges of Genomics and Proteomics in Nephrology / S. Stojnev [et al.] // Renal Failure. – 2009.
5. Mohan, C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis / C. Mohan, C. Putterman // Nat Rev Nephrol. – 2015.
6. Keir, M. E. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity / M. E. Keir [et al.] // Annual Review of Immunology 2008.
7. Prokunina, L. A regulatory polymorphism in PDCDI is associated with susceptibility to systemic

- lupus erythematosus in humans / L. Prokunina [et al.] // *Nat Genet.* – 2002.
8. Abelson, A. K. No evidence of association between genetic variants of the PDCD1 ligands and SLE / A. K. Abelson [et al.] // *Genes Immun.* – 2007. – Vol.8. – P. 69–74.
9. Nishikomori, R. Activated STAT4 has an essential role in Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the maintenance of IL-12R beta 2 chain expression and signaling, *J Immunol* – 2002. – V.169. – P.4388–4398.
10. Abelson, A. K. STAT4 Associates with SLE Through Two Independent Effects that Correlate with Gene Expression and Act Additively with IRF5 to Increase Risk / Abelson [et al.] // *Annals of the rheumatic diseases.* – 2009.
11. Rhodes, B. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies / B. Rhodes, T. J. Vyse // *Rheumatology.* – 2008. – V. 47. – P. 1603–1611.
12. Abelson, A.-K. Genetic Risk Factors for Systemic Lupus Erythematosus From Candidate Genes to Functional Variants / A.-K. Abelson // *Acta Universitatis Upsaliensis.* – 2008.
13. Remmers, E. F. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus / E. F. Remmers [et al.] // *N Engl J Med.* – 2007. – Vol. 357, № 10. – P. 977–986.
14. 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.
15. Nasonov, E. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus (SLE) in selected cities from three Commonwealth of Independent States countries (the Russian Federation, Ukraine and Kazakhstan) / E. Nasonov [et al.] // *Lupus* – 2014. – V. 23, № 2.
16. 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.
17. Weening, J. J. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited / J. J. Weening [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology.* – 2004. – V. 15. – P. 241–250.
18. dbSNP [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> – Date of access: 12.07.2019.
19. Liu, J.-L. Association between the PD1.3A/G polymorphism of the PDCD1 gene and systemic lupus erythematosus in European populations: a meta-analysis / J.-L. Liu [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* – 2009. – V. 23. – P. 425–432.
20. Johansson, M. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus / M. Johansson [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2005.
21. Du, W. Variant SNPs at the microRNA complementary site in the B7-H1 3'-untranslated region increase the risk of non-small cell lung cancer / W. Du [et al.] // *Molecular Medicine Reports.* – 2017. – Vol. 16, № 3. – P. 2682–2690.
22. Dai, S. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases / S. Dai [et al.] // *Cell Immunol.* – 2014. – V. 290, № 1. – P. 72–79.
23. Namjou, B. High-density genotyping of STAT4 reveals multiple haplotypic associations with systemic lupus erythematosus in different racial groups / B. Namjou [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. – 60, № 4. – P. 1085–1095.
24. Thompson, S. D. 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. – V. 62. – P. 3265–3276.
25. Taylor, K. E. Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus / K. E. Taylor [et al.] // *PLoS genetics.* – 2008. – Vol. 4. – doi:10.1371/journal.pgen.1000084

E. S. Sinyavskaya¹, I. A. Kazyra², A. V. Sukalo^{2,3}, R. I. Goncharova¹

POLYMORPHISMS OF *STAT4*, *PD-1*, *PD-L1* IN CHILDREN AFFECTED WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND LUPUS NEPHRITIS

¹Institute of Genetic and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University
Minsk, 220116, the Republic of Belarus

³National Center of Paediatric Nephrology and Renal Replacement Therapy
Minsk, 220020, the Republic of Belarus

Frequency of *STAT4* (rs3821236), *PD-1* (rs11568821), *PD-L1* (rs2297136) gene polymorphisms was studied in children with systemic lupus erythematosus without renal manifestations and with nephritis (n = 25), as well as in the controls (n = 80). Analysis of the genotype/allele frequency distribution by the polymorphic locus rs3821236 *STAT4* revealed statistically significant association of the heterozygous genotype GA (p = 0.043; OR 2.82 [1.10–7.22]), as well as genotypes containing at least one minor allele (GA+AA) associated with SLE (p = 0.04 OR 2.54 [1.04–6.41]) risk for a group of children with SLE with no kidney damage and with a renal disease. Our findings are of the potential practical value for diagnostics. No differences of statistical significance between examined sets of patients and controls were found in our analysis of genotype and allele frequency distribution of *PDCD1* (rs11568821) and *PD-L1* (rs2297136) polymorphisms.

Key words: systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, children, genetic polymorphism, *PD-1*, *PD-L1*, *STAT4*.

Дата поступления статьи: 1 августа 2019 г.

Т. Н. Гриневич, С. А. Ляликов, Т. Л. Степура, О. А. Дричиц

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 (С-735 Т) И ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 (G-418 С) У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Гродненский государственный медицинский университет
Республика Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80
e-mail: mailbox@grsmu.by

Изучен аллельный полиморфизм генов матриксной металлопротеиназы-2 (С-735 Т) и тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-2 (G-418 С) в плацентарной ткани с помощью полимеразной цепной реакции с определением длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) у женщин с привычным невынашиванием беременности и женщин с физиологически протекающей беременностью.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, полиморфизм генов, полимеразная цепная реакция (ПЦР), плацента.

Введение

Формирование плаценты является инвазивным процессом и неотъемлемо связано с преобразованием базальной мембраны и экстрацеллюлярного матрикса, в котором принимают участие целый ряд ферментов, в том числе система матриксных металлопротеиназ (ММП). ММП представляют собой тип цинк-зависимых эндопротеиназ, способных расщеплять почти все компоненты внеклеточного матрикса соединительных тканей [1–3]. ММП участвуют во многих физиологических процессах, таких как рост клеток, пролиферация, дифференцировка, миграция, апоптоз, эмбриональное развитие, морфогенез, репродукция и ремоделирование ткани, а также в различных патологических процессах: артритах, злокачественном росте и сердечно-сосудистых заболеваниях [4–5]. ММП секретируются в виде неактивных проферментов и приобретают активность, когда расщепляются внеклеточными протеиназами [6–7].

ММП и их ингибиторы играют главную роль в инвазии трофобласта в стенку матки [8]. В свою очередь успешная инвазия трофобласта обеспечивает нормальное развитие тканей плаценты и эмбриона [9]. Глубокие изменения в микроархитектуре матки необходимы для трансформации спиральных

сосудов и создания оптимальной среды для эмбрионального развития [10]. Есть как минимум три клеточные линии в маточно-плацентарном интерфейсе, которые экспрессируют все ММП (за исключением ММП-20): клетки трофобласта, стромальные клетки эндометрия и естественные клетки-киллеры. Децидуальные стромальные клетки при контакте с трофобластом экспрессируют очень высокие количества ММП, оптимизируя инвазивный потенциал. На ранних стадиях беременности ММП подготавливают среду для последующего вторжения в плацентарное ложе. Экспрессия про-ММП-2 первые 6–8 недель доминирует над экспрессией ММП-9 с последующим снижением концентрации, тогда как экспрессия про-ММП-9 увеличивается на 8–11 неделе и остается преобладающей желатиназой до конца беременности [11]. Таким образом, ММП-2 играет главную роль в период имплантации, а ММП-9 — во время инвазии. Активность ММП в физиологических условиях регулируется рядом специфических ингибиторов, прежде всего тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМП). ТИМП-2 подавляет активность ММП-2 [12]. Нарушение регуляции секреции этих ферментов может препятствовать физиологической инвазии трофобласта [13]. Поэтому

оценка полиморфизма генов системы ММР/ТИМР может быть одним из важных прогностических факторов успешного формирования плаценты и развития гестации.

Известно большое количество способов определения генетического полиморфизма, в которых используются различные инструменты для анализа уникальной нуклеотидной последовательности ДНК человека. К широко используемым исследованиям генетики популяций относится метод полимеразной цепной реакции с определением длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Определение полиморфного сайта рестрикции методом ПДРФ заключается в амплификации определяемого ПЦР фрагмента и его последующем расщеплении соответствующим ферментом рестрикции [14].

Присутствующий в геноме исследуемого организма рестрикционный фрагмент ДНК определенной длины является генетическим маркером и одновременно фенотипическим признаком, тесно связанным с генотипом организма. Рестрикционный фрагмент — строго определенная последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая и расщепляемая рестриктазами. Полное расщепление анализируемой геномной ДНК отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции. А любая мутация, изменяющая последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, уничтожает этот сайт. Визуализация результатов рестрикции для оценки распределения фрагментов по длине может выполняться различными методами, в том числе с помощью электрофореза. Преимущества метода — простота и надежность [15].

Целью данной работы — исследование распределения частот генотипов генов С-735 Т матричной металлопротеиназы-2 и G-418 С тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2 в плацентарной ткани у женщин с привычным невынашиванием беременности и женщин с сохраненной репродуктивной функцией.

Материалы и методы

Работа выполнялась на базе учреждения здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи горо-

да Гродно». Изучение аллельного полиморфизма генов матричной металлопротеиназы-2 (С-735 Т) и тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2 (G-418 С) проведено на группе 58 пациенток с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) с ранними репродуктивными потерями (до 12 недель беременности) в анамнезе (основная группа).

Критериями включения в основную группу были детородный возраст и привычное невынашивание беременности, т. е. наличие в анамнезе женщины подряд трех и более самопроизвольных прерываний беременности (ВОЗ). Критериями невключения в исследование являлись: наличие анатомических дефектов матки, генетических и эндокринных нарушений, инфекций, передающихся половым путем, перенесенные в течение двух недель, предшествующих обследованию, острые заболевания или обострения хронической патологии и соматические и гинекологические заболевания, влияющие на репродуктивную функцию. Возраст женщин основной группы составил 20–43 года, медиана (Me) — 29,7 лет, нижняя квартиль (Q25) — 26,0 лет, верхняя квартиль (Q75) — 33,0 года. Всем женщинам основной группы осуществлялось комплексное обследование для установления причин невынашивания: исследовались гормональный и инфекционный статус, проводилось ультразвуковое исследование, определялись маркеры антифосфолипидного синдрома.

Контрольную группу составили 36 женщин с тремя и более физиологическими родами в анамнезе без существенных осложнений. У женщин этой группы был известен благоприятный акушерский анамнез, отсутствие самопроизвольных выкидышей и других акушерских осложнений. Возраст женщин контрольной группы составил от 24 до 48 лет, медиана (Me) — 37,2 лет, нижняя квартиль (Q25) — 28,0 лет, верхняя квартиль (Q75) — 42,0 года.

Все исследованные женщины основной и контрольной групп дали информированное согласие на участие в данном исследовании.

Выделение ДНК из плацентарной ткани

Геномную ДНК из срезов архивных тканей плаценты пациенток с ПНБ и женщин контрольной группы выделяли согласно инструкции производителя в асептических условиях с использованием набора комплекта реагентов для

выделения ДНК из тканей плаценты QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN, Германия).

Метод полимеразной цепной реакции с определением длин рестрикционных фрагментов

Выявление полиморфных вариантов генов *MMP-2* (С-735 Т) и *TIMP-2* (G-418 С) выполнялось методом полимеразной цепной реакции с определением длин рестрикционных фрагментов. Установлен следующий нуклеотидный состав праймеров: для выявления полиморфизма С-735 Т гена *MMP-2* — ATAGGGTAAACCTCCCCACATT-for, и GGTA AAATGACCCTGAGACCTG-rev; для выявления полиморфизма G-418 С гена *TIMP-2* — CGTCTCTTGGTGGCTGGTCA-for, CCTTCAGCTCGACTCTGGAG-rev.

Синтез олигонуклеотидов для проведения полимеразной цепной реакции осуществлялся в компании ОДО «Праймтех» (Беларусь). Полученные ПЦР-продукты подвергали рестрикционному анализу с использованием эндонуклеаз Aval (BsoBI) для полиморфизма *TIMP-2* (G-418С) и HinfI для полиморфизма *MMP-2* (С-735Т) (Jena Bioscience, Великобритания). Для реакции амплификации использовали универсальную готовую реакционную смесь Quick-load Taq 2X Master Mix (ОДО «Праймтех», Беларусь).

Реакционная смесь для ПЦР-амплификации содержала 50 мМ KCl, 1,75 мМ MgCl₂, 0,1% (масса/объем) Тритон X-100, 0,2 мг/мл BSA и 10 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 10 мМ каждого из четырех дНТФ, 1 U Taq ДНК-полимеразы (Promega, США). Температуру отжига для каждой пары праймеров определяли с помощью программы Oligo или заимствовали из литературных источников, а также определяли опытным путем.

Реакцию амплификации проводили в объеме 25 мкл, включая объем пробы ДНК — 2 мкл. Для приготовления реакционной смеси смешивали в отдельной пробирке из расчета на каждую реакцию по 1,5 мкл праймеров (прямой и обратный), по 12,5 мкл реакционной смеси Quick-load Taq 2X Master Mix («Праймтех», Беларусь) и по 7,5 мкл динитрированной воды (ddH₂O), (Jena Bioscience, Германия). Далее пробирки помещали в амплификатор-термоциклер «2720 Thermal Cycler» (Applied Biosystems, США) и задавали соответствующую программу амплификации.

Программа амплификации гена *MMP-2* (С-735 Т) представлена в табл. 1. Программа амплификации гена *TIMP-2* (G-418 С) представлена в табл. 2.

Таблица 1

Программа амплификации гена *MMP-2* (С-735 Т)

Этап	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	95	5 мин	1
2	94	45 с	35
	62	45 с	
	72	1 мин	
3	72	10 мин	1

Таблица 2

Программа амплификации гена *TIMP-2* (G-418 С)

Этап	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	94	2 мин	1
2	94	30 с	35
	59	30 с	
	72	30 с	
3	72	7 мин	1

Рестрикционный анализ ПЦР-продукта

ПЦР-продукты гена *MMP-2* (C-735 T) были подвергнуты рестрикционному анализу с использованием фермента рестрикции *Hinf I*, для гена *TIMP-2* (G-418 C) — *AvaI* (Jena Bioscience, Германия). Рестрикционный анализ проводился в соответствии с инструкцией изготовителя (Jena Bioscience, Germany). К 15 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл соответствующего 10-кратного буферного раствора, 12 мкл ddH₂O и 0,5 мкл 10 U рестрикционного фермента (*Hinf I/AvaI*), добавляли 10 мкл продукта ПЦР (общий объем 25 мкл). Реакционную смесь инкубировали при 37 °C 3 ч. Реакцию останавливали высокой температурой 80 °C в течение 20 мин (*Hinf I*) или 65 °C в течение 20 мин (*AvaI*).

Продукты ферментации подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле, приготовленном на десятикратном трис-боратном буфере, с окрашиванием бромидом этидия с помощью системы гель-электрофореза «Sub-Cell GT Agarose Gel» (Bio-Rad, США). Пробы (по 10 мкл) вносили в лунки геля. По окончании электрофореза и окрашивания геля бромистым этидием на основании размеров фрагментов и расстояний их пробегов в геле вычисляли размеры исследуемых фрагментов. Для оценки молекулярного веса фрагментов использовали маркеры молекулярного веса ДНК DNA Ladder 20 bp, 50 bp (Jena Bioscience, Германия). Результаты электрофореза визуализировали на трансиллюминаторе «Sub-Cell GT Agarose Gel» (Bio-Rad, США).

При анализе гена *MMP-2* (C-735 T) выявили три фрагмента длиной 300 bp, 254 bp, 46 bp, соответствующие разным генотипам. Генотипу C/C соответствует фрагмент длиной 300 bp, генотипу C/T — три фрагмента длиной 300 bp, 254 bp, 46 bp, генотипу T/T — фрагменты длиной 254 bp и 46 bp.

При анализе гена *TIMP-2* (G-418 C) выявили четыре фрагмента длиной 253 bp, 230 bp, 51 bp, 23 bp, соответствующие разным генотипам. Генотипу C/C соответствует фрагмент длиной 253 bp и 51 bp, генотипу G/C — четыре фрагмента длиной 253 bp, 230 bp, 51 bp, 23 bp, генотипу G/G — фрагменты длиной 230 bp, 51 bp и 23 bp.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q). Для характеристики частоты изучаемых признаков использовались относительные (%) показатели. Для относительных показателей определялись 95% доверительный интервал (ДИ).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q). Для характеристики частоты изучаемых признаков использовались относительные (%) показатели. Для относительных показателей определялись 95% доверительный интервал (ДИ).

Результаты и обсуждение

Результаты определения частот генотипов генов матричной металлопротеиназы-2 (C-735 T) и тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2 (G-418 C) в тканях плаценты у женщин с ПНБ и у женщин с физиологически протекающей беременностью представлены в табл. 3.

Таблица 3

Распределение частот генотипов генов *MMP-2* (C-735 T) и *TIMP-2* (G-418 C) в тканях плаценты у женщин с ПНБ и у женщин с физиологически протекающей беременностью

Полиморфизм	Частоты генотипов исследованных полиморфизмов, %	
	Женщины с ПНБ	Контрольная группа
	n = 56	n = 36
<i>MMP-2</i> (C-735 T)		
C/C	70,97 (54,99–86,95)	83,33 (71,15–95,51)
C/T	19,35 (5,45–33,30)	16,67 (3,87–29,47)
T/T	9,68 (0–20,09)	0
<i>TIMP-2</i> (G-418 C)		
C/C	33,93 (21,53–46,33)	72,22 (57,59–86,85)
G/C	53,57 (40,51–66,63)	19,44 (6,51–32,37)
G/G	12,5 (3,84–21,16)	8,33 (0–17,36)

При анализе частоты полиморфизма С-735 Т гена *MMP-2* частота генотипа Т/Т («минорный» гомозиготный) у женщин с ПНБ составила 9,68%, тогда как в контрольной группе мутантный гомозиготный генотип Т/Т не встречался ($p = 0,05$). У женщин с ПНБ частота гетерозиготного генотипа С/Т составила 19,35%, генотипа С/С (гомозиготный вариант по «дикому» аллелю) — 70,97%, в контрольной группе — 16,67% и 83,33% соответственно.

Распределение частот генотипов гена *TIMP-2* (G-418 С) у женщин с ПНБ и представительниц контрольной группы было следующим: генотип G/G («минорный»-гомозиготный) обнаружен у 12,5% и 8,33% соответственно, генотипы С/С (гомозиготный вариант по «дикому» аллелю) — у 33,93% и 72,22% ($p = 0,004$), G/C (гетерозиготный генотип) — у 53,57% и 19,44% ($p = 0,008$).

Заключение

При изучении аллельного полиморфизма генов С-735 Т матричной металлопротеиназы-2 и G-418 С тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2 в плацентарной ткани у женщин с ПНБ и женщин с сохраненной репродуктивной функцией выявлено, что генотип ТТ гена *MMP-2* (С-735 Т) и носительство аллеля С гена *TIMP-2* (G-418 С) сопряжены с повышенным риском невынашивания беременности.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (проект № М17-184 от 18.04.2017).

Список использованных источников

1. Chambers, A. F. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis / A. F. Chambers, L. M. Matrisian // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1997. – Vol. 89. – P. 1260–1270.
2. Nagase, H. Matrix metalloproteinases / H. Nagase, J. F. Woessner // *J Biol Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 21491–21494.
3. Parsons, S. L. Matrix metalloproteinases / S. L. Parsons [et al.] // *Br J Surg.* – 1997. – Vol. 84. – P. 160–166.
4. Inoue, T. Circulating matrix metalloproteinase-1 and -3 in patients with an acute coronary syndrome / T. Inoue [et al.] // *Am J Cardiol.* – 2003. – Vol. 92. – P. 1461–1464.

5. Kruidenier, L. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease / L. Kruidenier [et al.] // *J. Pathol.* – 2003. – Vol. 201, № 1. – P. 7–16.

6. Лайнен, Г. Р. Матриксные металлопротеиназы и фибринолитическая активность клеток / Г. Р. Лайнен // *Биохимия.* – 2002. – Т. 67, № 1. – С. 107–115.

7. Яровая, Г. А. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза. Распространение, классификация и основы механизма действия протеиназ. // *Лабораторная медицина.* – 2001. – № 4. – С. 75–80.

8. Nishino, E. Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts / E. Nishino [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metabolism.* – 1990. – Vol. 71. – P. 436–441.

9. Потеряева, О. Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы) // *Медицина и образование в Сибири.* 2010. – № 5. – С. 7–17.

10. Evrosimovska, B. Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases) / B. Evrosimovska, B. Velickovski // *Journal of Cell and Animal Biology.* – 2011. – Vol. 5, № 7. – P. 113–120.

11. Fazleabas, A. T. Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy / A. T. Fazleabas [et al.] // *Biol Reprod.* – 1997. – Vol. 56. – P. 348–356.

12. Hampton, A. L. Tissue inhibitors of metalloproteinases in endometrium of ovariectomized steroid-treated ewes and during the estrous cycle and early pregnancy / A. L. Hampton [et al.] // *Biol. Reprod.* – 1995. – Vol. 53. – P. 302–311.

13. Hulboy, D. L. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function / D. L. Hulboy [et al.] // *Human Reprod.* – 1997. – Vol. 3, № 1. – P. 27–45.

14. Pawel, K. Family based association study of DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, DAT, COMT gene polymorphism in schizophrenia / K. Pawel [et al.] // *Psychiatr Pol.* – 2010. – Vol. 443, № 3. – P. 405–413.

15. Yao, C. T. The role of ALDH2 and ADH1B polymorphism in alcohol consumption and stroke in Han Chinese / C. T. Yao [et al.] // *Hum Genomics.* – 2011. – Vol. 5, № 6. – P. 569–576.

T. N. Grinevich, S. A. Lyalikov, T. L. Stepuro, O. A. Drichits

STUDY OF THE ALLELIC GENE POLYMORPHISM OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (C-735 T) AND THE TISSUE INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (G-418 C) IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGES

Grodno State Medical University
Grodno, 230009, the Republic of Belarus
e-mail: mailbox@grsmu.by

We studied the allelic gene polymorphism of matrix metalloproteinases-2 (C-735 T) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-2 (G-418 C) in the placental tissue using polymerase chain reaction with determination of restriction fragment lengths (PCR-RFLP) in women with recurrent miscarriages and women with a physiological pregnancy.

Keywords: matrix metalloproteinases, gene polymorphism, polymerase chain reaction (PCR), placenta.

Дата поступления статьи: 15 июля 2019 г.

И. Ю. Бакутенко¹, И. Д. Гилевская¹, Н. В. Никитченко¹, Е. В. Сечко², А. М. Чичко², А. В. Сукало²,
Н. И. Рябоконт¹

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ *PSMA6* И *PSMC6* КАК ФАКТОРЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ЮВЕНИЛЬНОМУ ИДИОПАТИЧЕСКОМУ АРТРИТУ В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: bakutenko_ivan@mail.ru

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

Представлены результаты исследования частоты встречаемости генотипов/аллелей четырех полиморфных вариантов генов протеасомной системы деградации белков *PSMA6* (rs2277460, rs1048990) и *PSMC6* (rs2295826, rs2295827) у детского населения Беларуси: в группе пациентов (177 чел.) с установленным диагнозом ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) и группе сравнения (контроль из 227 детей без суставной патологии, аутоиммунных и воспалительных процессов). Впервые установлено, что генотип GC *PSMA6* (rs1048990) ассоциирован с риском развития ЮИА в целом (OR = 1,96; 95% CI 1,25–3,08; p = 0,004), а также с наиболее распространенной олигоартикулярной формой данного заболевания (OR = 2,01; 95% CI 1,21–3,34; p = 0,007). Не выявлены различия по частоте встречаемости генотипов и аллелей гена *PSMC6* (rs2295826 и rs2295827), а также локуса rs2277460 гена *PSMA6* при сравнении группы ЮИА и контроля. Установлено сцепление полиморфных вариантов локусов rs2295826 и rs2295827 гена *PSMC6* (коэффициент корреляции $r = 1$; показатель неравновесности $D' = 1$), что, очевидно, обусловлено их тесной локализацией.

Ключевые слова: ювенильный идиопатический артрит, протеасомные гены, *PSMA6*, *PSMC6*, генетический полиморфизм.

Введение

Ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) — наиболее распространенное хроническое аутоиммунное заболевание соединительной ткани у детей (32,6 заболеваний на 100 тыс. населения среди европейцев [1]), имеющее многофакторную, до конца не выясненную природу, сочетающую генетическую предрасположенность и влияние среды (инфекции, травмы, стресс и др.). Диагноз ЮИА является собирательным для ряда состояний, объединенных поражением суставов по типу эрозивно-деструктивного артрита, повышением температуры и уровня провоспалительных цитокинов, отсутствием явных причин и манифестацией до 16 лет. Выделяют 7 подтипов ЮИА, различающихся широтой воспалительных проявлений и клинико-биохимическими маркерами (по классификации Международной лиги ассоциаций по ревматологии — ILAR): олигоартрит, полиартрит серонегативный по ревматоидно-

му фактору, полиартрит серопозитивный по ревматоидному фактору, системный артрит, псориатический артрит, энтезит-ассоциированный артрит и недифференцированный артрит. Из них олиго- и полиартриты (или олиго- и полиартикулярный ЮИА) являются наиболее распространенными формами заболевания. Среди заболевших преобладают девочки [2, 3].

В патогенезе ЮИА одну из ведущих ролей предположительно играют вариации последовательности генов (однонуклеотидные полиморфизмы, вариации числа копий) как главного комплекса гистосовместимости (*HLA*), так и не-*HLA* генов-кандидатов предрасположенности к заболеванию. По причине плеiotропных эффектов этих генов, они нередко выступают факторами предрасположенности для нескольких аутоиммунных заболеваний: аутоиммунного тиреоидита, целиакии, ЮИА, системной красной волчанки, диабета первого типа и др. [4, 5].

Имеются доказательства значительной роли убиквитин-протеасомной системы (УПС) деградации внутриклеточных белков в иммунном ответе и, в частности, в процессинге, протекающем в протеасомах антигенпрезентирующих клеток, где патогены разрушаются до пептидов, которые экспонируются наружу клеток молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса. В процессинге антигенов могут принимать участие как нативные протеасомы, так и специализированные иммунопротеасомы. Экспрессия иммунопротеасом запускается интерфероном γ , индуцирующим экспрессию регуляторных белков PA28 α и PA28 β — совместно с 19S регуляторной и 20S коровой частицами они формируют иммунопротеасому. При ее участии продукты протеолиза эффективнее экспонируются антигенпрезентирующими клетками. Другая важная функция протеасом заключается в активации транскрипционного фактора NF κ B при развитии воспаления путем протеолиза ингибиторного белка I κ B. Показано повышение уровня коровых 20S частиц протеасом в крови пациентов с системными аутоиммунными заболеваниями (системной красной волчанкой и ревматоидным артритом), и, что наиболее важно, они являются мишенью для гуморального аутоиммунного ответа при этих заболеваниях [6].

Протеасома как мультибелковый комплекс кодируется семейством протеасомных генов, насчитывающим 44 члена, часть из которых имеет ассоциированные с различными заболеваниями полиморфизмы [7]. Описанные в литературе данные показывают ассоциацию генов УПС (*PSMA6*, *PSMB5*, *PSMC6*, *PSMA3* и др.) с риском возникновения таких аутоиммунных заболеваний, как анкилозирующий спондилит (*PSMD7* rs17336700, *PSMB8* LMP-Q/Q), сахарный диабет 1 типа (*PSMB8*), болезнь Грейвса (*PSMB9* rs17587) [7], а также ЮИА [8, 9]. Помимо перечисленных аутоиммунных заболеваний показана связь полиморфизма генов протеасомного комплекса с риском развития других заболеваний: инфаркта миокарда, ишемической болезни, диабета 2 типа, деменции, злокачественных новообразований (обзор в работах [7, 10, 11]).

Целью данного исследования было пилотное изучение частот четырех однонуклеотидных полиморфизмов генов УПС — *PSMA6* (rs2277460, rs1048990) и *PSMC6* (rs2295826, rs2295827) — и их связи с предрасположенностью к ЮИА в

белорусской популяции. Ген *PSMA6* кодирует белок α 1, важный компонент для формирования внешних α -колец коровой частицы 20S протеасомы. Известно, что промотор и 5'-некодирующая область гена *PSMA6* имеют однонуклеотидные полиморфизмы rs2277460 C>A и rs1048990 C>G соответственно. Показано, что минорный аллель G rs1048990 повышает транскрипцию *PSMA6* и активность белка α 1, что может усиливать воспаление путем протеасомной активации транскрипционного фактора NF κ B, центрального регулятора экспрессии генов цитокинов и адгезинов [12]. Ген *PSMC6* кодирует белок Rpt4 26S протеасом [7]. Его полиморфизмы rs2295826 и rs2295827, по литературным данным [8], ассоциированы с некоторыми подтипами ЮИА. Однако имеющиеся сведения показывают недостаточную степень изученности генов этого комплекса, что делает их исследование важным не только для понимания генетической структуры белорусской популяции и знания рисков аллелей ЮИА, но и для определения структурно-функциональных особенностей семейства протеасомных генов.

Материалы и методы

Исследование «случай – контроль»

Группы обследования формировались в период 2012–2019 гг. на клинической базе 1-й кафедры детских болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет» — в УЗ «2-я городская детская клиническая больница» — после получения информированного согласия от родителей пациентов.

Группа пациентов состояла из 177 детей с диагнозом ЮИА, из них 115 — девочки. Диагностику ЮИА проводили в соответствии с критериями ILAR [2]. Для исследования пациенты с диагнозами сероположительный по ревматоидному фактору и серонегативный по ревматоидному фактору полиартрит были объединены в подгруппу пЮИА из 27 пациентов. Группу олигоартрита (оЮИА) составили 113 пациентов. Оставшиеся 37 пациентов имели диагнозы: системная форма ЮИА (сЮИА) — 18 пациентов, энтезит-ассоциированный ЮИА (эЮИА) — 13 пациентов, псориатический артрит — 1 пациент, недифференцированная форма ЮИА — 5 пациентов. Возраст пациентов находился в интервале 11 месяцев – 17 лет. Медианное значение составило 9 (1-й квартиль — 4,75; 3-й квартиль — 13)

лет, медианный возраст дебюта заболевания — 4 (1-й квартиль — 2; 3-й квартиль — 11) года.

Группа сравнения (клинического контроля) состояла из 227 детей (145 девочек), поступивших в клинику без суставной патологии, аутоиммунных, острых и хронических воспалительных заболеваний. Возраст в группе сравнения находился в диапазоне от 5 до 17 лет. Медианный возраст в группе сравнения составил 15 (1-й квартиль — 13; 3-й квартиль — 16) лет. Распределение по полу в контрольной группе было выравнено с группой ЮИА.

Выделение ДНК и генотипирование

Образцы венозной крови, собранные в группах обследования в стерильные пробирки с ЭДТА, хранились до выделения ДНК при -20°C . Тотальная ДНК выделена из образцов крови стандартным фенол-хлороформным методом с преципитацией этанолом [13]. Оценка концентрации и чистоты тотальной ДНК проведена с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, США). Образцы ДНК до начала работ хранились в Республиканском банке ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов при -80°C , а также в лабораторных коллекциях Института генетики и цитологии НАН Беларуси при -20°C .

Для генотипирования концентрация ДНК в образцах доведена до 100 нг/мкл.

Генотипирование всех образцов ДНК выполнено с использованием методов ПЦР-ПДРФ (rs1048990, rs2295826, rs2295827) и аллель-специфичной ПЦР (rs2277460) (табл. 1), как описано ранее в работе Т. Sjakste с соавторами [8]. В случае аллель-специфичной ПЦР про-

водились две параллельные реакции, различающиеся прямыми праймерами, специфичными к разным аллелям (С и А). Синтез и поставка праймеров и реактивов для ПЦР осуществлялась ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь). Стандартная ПЦР проводилась в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 100 нг геномной ДНК, аммонийный буфер для ДНК-полимеразы с магнием, смесь дНТФ, праймеры (в конечной концентрации 0,2 пмоль/мкл), 1 ед. PrimeTaq ДНК-полимеразы, 3% ДМСО и воду (mQ). Были использованы амплификаторы C1000 (*BioRad*, США) и QuantStudio 5 (*Thermo Fisher Scientific*, США). После аллель-специфичной амплификации локуса rs2277460 продукт амплификации подвергался рестрикции для генотипирования локуса rs1048990. Рестрикция ДНК (табл. 1) проводилась с помощью ферментов *RsaI* и *DdeI* (*New England Biolabs*, США). Разделение фрагментов ДНК проводилось в 1,5–2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Визуализация продуктов амплификации и рестрикции проводилась с помощью системы гель-документирования Quantum St4 (*Vilber Lourmat*, США).

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием следующих тестов: χ^2 , точный критерий Фишера для таблиц 2×2 и сравнение пропорций — с помощью программного пакета MS Excel 2013, онлайн-ресурсов Ген-Эксперт [14] и MedCalc [15]. Ассоциацию аллелей/генотипов с заболеваниями оценивали по отношению шансов (OR — odd ratio), значения которого

Таблица 1
Праймеры, размеры продуктов ПЦР и рестрикции полиморфных аллелей

Локус	Метод / фермент рестрикции	Последовательность праймеров	Литературный источник	Размер продукта, п. н.
rs2277460	АС–ПЦР	F–ATGCAAGAGCGGAAGAAAC	[8]	С или А — 253
rs1048990	ПЦР–ПДРФ / <i>RsaI</i>	F–ATGCAAGAGCGGAAGAAA R–TACCATGACAGGGCAATTCA		G — 225 A — 132 + 121
rs2295826	ПЦР–ПДРФ / <i>DdeI</i>	F–GCTTAAACAAGTATTGCCGATCA	[8]	G — 411 A — 133 + 276
rs2295827		R–AAGGAAGAAAATAAAAAGCATTA		T — 411 C — 194 + 215

Примечание. АС–ПЦР — аллель-специфическая ПЦР, ПЦР–ПДРФ — полиморфизм длин рестриционных фрагментов продуктов ПЦР

представлены с 95%-доверительным интервалом (CI — confidence interval). Анализ неравновесного сцепления проводился с использованием веб-инструмента SNPStats [16].

Результаты и обсуждение

Распределение генотипов и минорных аллелей в контрольной группе

Проверка распределения частот генотипов показала их соответствие закону Харди-Вайнберга для двух (rs2295826 и rs2295827) из четырех исследуемых локусов. Для локуса rs2277460 гена *PSMA6* не выявлено ни одного носителя генотипа AA как в контрольной группе, так и среди пациентов с ЮИА, что подтверждает опубликованные данные по европейской и азиатской популяциям [17]. Данные по локусу rs1048990 показывают статистически значимое ($p = 0,03$) отклонение распределения генотипов в контрольной группе от равновесия Харди-Вайнберга. Однако частоты минорных аллелей (табл. 2) всех исследуемых локусов в группе контроля соответствуют европейской выборке базы данных dbSNP [18] и статистически значимо не отличаются от данных по литовской популяции, а в случае гена *PSMC6* — от латвийской [17].

Распределения генотипов и аллелей в группе с ЮИА

Результат анализа неравновесного сцепления аллелей в группе пациентов с ЮИА позволил выявить очень тесное сцепление полиморфизмов rs2295826 и rs2295827 гена *PSMC6* (коэффициент корреляции $r = 1$ и показатель неравновесности $D' = 1$), что, очевидно, обусловлено

близким физическим расстоянием между локусами (в 61 п. н.). При этом аллель А rs2295826 сцеплен с аллелем С rs2295827, а минорные варианты — друг с другом. Так как попарное сравнение полиморфизмов rs2277460, rs1048990 и rs2295826 не выявило статистически значимой неравновесной сцепленности (рисунок), наиболее вероятно, что эффекты замен в этих полиморфных локусах проявляются независимо.

	rs1048990	rs2295826	rs2295827
rs2277460	-9.34e-03 0.540679 -8.27e-02 2.42e+00 0.120 177	1.79e-06 0.000022 1.86e-05 1.22e-07 1.000 176	1.79e-06 0.000022 1.86e-05 1.22e-07 1.000 176
rs1048990		1.29e-03 0.012690 1.00e-02 3.53e-02 0.851 176	1.29e-03 0.012690 1.00e-02 3.53e-02 0.851 176
rs2295826	D D' r χ^2 P-value n		1.09e-01 0.999534 1.00e+00 3.52e+02 <2e-16 176

Рис. Карта неравновесного сцепления изученных полиморфизмов по результатам генотипирования группы пациентов с ЮИА

D — коэффициент неравновесности, D' — нормализованный коэффициент неравновесности, r — коэффициент корреляции, χ^2 — критерий согласия Пирсона, P — уровень значимости, n — число проанализированных образцов между парами анализируемых маркеров, e — основание десятичного логарифма

Таблица 2

Сравнение частот минорных аллелей исследованных локусов в контрольной группе белорусской популяции с данными по европейским популяциям

Ген, локус	Минорный аллель	Частота минорного аллеля, %				p	
		Беларусь (данное исследование)	Европа [18]	Литва [17]	Латвия [17]		
<i>PSMA6</i>	rs2277460	A	13,4	9,6–10,94	9,3	6,5*	>0,05
	rs1048990	G	14,4	15,4–16,4	15,3	8,9	>0,05
<i>PSMC6</i>	rs2295826	G	11,9	9,6–13,6	17,0	10,7	>0,05
	rs2295827	T	11,9	9,6–13,6	17,0	10,7	>0,05

Примечание. * — статистически значимое различие частоты встречаемости минорного аллеля ($p = 0,021$) по сравнению с данными по белорусской популяции

Результаты сравнительного анализа распределения генотипов и аллелей в контрольной группе и группе с ЮИА представлены в табл. 3. Из четырех исследованных полиморфизмов статистически значимую связь генотипа с заболеванием ЮИА показал только локус rs1048990 гена *PSMA6*. Так, генотип GC, а также сочетание генотипов GC+GG *PSMA6* чаще встречаются у детей с ЮИА, чем в контроле (OR = 1,96; 95%

CI 1,25–3,08; $p = 0,004$ и OR = 1,68; 95% CI 1,09–2,59; $p = 0,019$ соответственно). Таким образом, генотип GC, по результатам нашего исследования, является фактором риска для возникновения ЮИА. Эта зависимость показана впервые и отличается от данных, полученных в работе [8], в которой rs1048990 является нейтральным с точки зрения риска возникновения ЮИА у детей в латвийской популяции.

Таблица 3

Распределение частот встречаемости минорных генотипов/аллелей полиморфных локусов генов *PSMA6* и *PSMC6* у детей с ЮИА по сравнению с клиническим контролем

Ген, локус	Генетическая модель	Минорные аллели и генотипы	ЮИА (n = 177), %	Контроль (n = 227), %	OR (95% CI)	p
<i>PSMA6</i> , rs2277460	Доминантная	CA	18,5	26,0	0,65 (0,40–1,05)	>0,05
	Мультипликативная	A	9,3	13,4	0,68 (0,44–1,07)	>0,05
<i>PSMA6</i> , rs1048990	Доминантная	GG+GC	35,0	24,3	1,68 (1,09–2,59)	0,019
	Сверхдоминантная	GC	32,8	19,9	1,96 (1,25–3,08)	0,004
	Мультипликативная	G	18,6	14,4	1,36 (0,94–1,99)	>0,05
<i>PSMC6</i> , rs2295826	Доминантная	GG+GA	23,3	23,3	1,0 (0,63–1,59)	>0,05
	Мультипликативная	G	12,5	11,9	1,06 (0,69–1,62)	>0,05
<i>PSMC6</i> , rs2295827	Доминантная	TT+CT	23,3	23,3	1,0 (0,63–1,59)	>0,05
	Мультипликативная	T	12,5	11,9	1,06 (0,69–1,62)	>0,05

Данных по локусу rs2277460 гена *PSMA6*, полученных нами на белорусской популяции (табл. 3), оказалось недостаточно для корректных выводов, что требует дальнейшего проведения работ. В то же время оба полиморфных локуса (rs2295826 и rs2295827) гена *PSMC6* проявили очень высокое сходство частот и распределения генотипов и аллелей в группе с ЮИА и в контроле (табл. 3) при высоком уровне сцепления аллелей (рисунок), что свидетельствует об отсутствии ассоциации этих локусов с риском возникновения ЮИА в белорусской популяции и делает нецелесообразным дальнейшее их изучение в этом направлении. Отсутствие связи *PSMC6* (rs2295826 и rs2295827) с ЮИА в нашем исследовании не соответствует данным по латвийской популяции [8], что в сумме с результатами исследований rs1048990 гена *PSMA6*, описанными выше, может свидетельствовать о значимом генетическом различии популяций Латвии и Беларуси. Подтверж-

дением этого предположения может служить существенно более низкая частота минорного аллеля гена *PSMA6* (rs2277460) в латвийской популяции по сравнению с белорусской и данными по Европе (табл. 2).

Проведенный анализ различий предрасположенности к ЮИА в зависимости от пола позволил обнаружить, что в случае полиморфного локуса rs1048990 рискованный эффект генотипа GC статистически значим у девочек (OR = 2,25; 95% CI 1,27–3,98; $p = 0,005$), в то время как у мальчиков эта связь не существенна, вероятно, вследствие малого количества пациентов мужского пола.

Анализ распределения генотипов протексомных генов по подтипам ЮИА показал статистически значимые связи rs1048990 с олигоартритом. Для него показан рискованный эффект генотипа GC на предрасположенность к олигоартикулярному ЮИА (OR = 2,0; 95% CI 1,21–3,34; $p = 0,007$).

Заключение

Впервые изучены частоты генотипов и аллелей полиморфных локусов протеасомных генов *PSMA6* и *PSMC6* в белорусской популяции, а также их ассоциация с возникновением ЮИА. Установлено, что частоты минорных аллелей всех исследуемых локусов (rs2277460, rs1048990, rs2295826, rs2295827) в группе контроля соответствуют европейским популяциям. Выявлено, что генотип GC гена *PSMA6* (rs1048990) ассоциирован с риском возникновения ЮИА в целом, особенно у девочек, а также с олигоартрикулярной формой ЮИА в частности. Локусы rs229582 и rs2295827 гена *PSMC6* являются нейтральными по отношению к ЮИА и проявляют высокую степень сцепления полиморфных вариантов. Таким образом, полученные результаты дают новую информацию о генетической структуре белорусской популяции, а также о рисковом генотипе для возникновения ЮИА.

Представленная работа выполнена в рамках раздела «Разработка ДНК-технологии определения риска возникновения ювенильных аутоиммунных заболеваний» задания 6.4 «Молекулярно-генетическая оценка риска аутоиммунных заболеваний» НТП Союзаного государства «ДНК-идентификация» (2017–2021 гг.). Авторы выражают благодарность сотрудникам Республиканского банка ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов за оказанную услугу по депонированию и выдаче образцов ДНК из хранилищ банка для выполнения научного исследования; сотрудникам лаборатории молекулярных основ стабильности генома Института генетики и цитологии НАН Беларуси, принимавших участие в 2012–2017 гг. в создании лабораторной коллекции ДНК для научных исследований.

Список использованных источников

1. Prevalence and incidence of juvenile idiopathic arthritis: A systematic review / S. Thierry, B. Fautrel, I. Lemelle, F. Guillemain // *Joint Bone Spine*. – 2013. – Vol. 81, № 2. – P. 112–117.
2. 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.
3. Juvenile idiopathic arthritis / K. Barut [et al.] // *Balkan Med. J.* – 2017. – Vol. 34, № 2. – P. 90–101.
4. Susceptibility to JRA/JIA: complementing general autoimmune and arthritis traits / D. J. Phelan, S. D. Thompson, D. N. Glass // *Genes and Immunity*. – 2006. – Vol. 7, № 1. – P. 1–10.
5. Immunogenetics of juvenile idiopathic arthritis: a comprehensive review / A. O. Hersh, S. Prahald // *J. of Autoimmunity*. – 2015. – Vol. 67, № 11. – P. 113–124.
6. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases / J. Wang, M. A. Maldonado // *Cell. Mol. Immun.* – 2006. – Vol. 3, № 4. – P. 255–261.
7. Gomes, A. V. Genetics of proteasome diseases / A. V. Gomes. – Scientifica. – 2013. – ID 637629.
8. Juvenile idiopathic arthritis subtype- and sex-specific associations with genetic variants in the *PSMA6/PSMC6/PSMA3* gene cluster / T. Sjakste [et al.] // *Pediat. Neonat.* – 2014. – Vol. 55, № 5. – P. 393–403.
9. Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8⁺ T-cells / K. Sasaki [et al.] // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6, № 7484.
10. The ubiquitin proteasome system in neuropathology / N. J. Lehman // *Acta Neuropathol.* – 2009. – Vol. 118, № 3. – P. 329–347.
11. Proteotoxicity: an underappreciated pathology in cardiac disease / M. Sandri, J. Robbins // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2014. – Vol. 71, № 6. – P. 3–10.
12. Association between functional variant of inflammatory system gene (*PSMA6*) and end-stage kidney disease / M. Buraczynska [et al.] // *Int. Urol. Nephrol.* – 2016. – Vol. 48, № 12. – P. 2083–2087.
13. 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. 914–923.
14. Калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай – контроль» [Электронный ресурс] // Гос. науч. центр РФ «ГосНИИ генетика». – Москва, 2013. – Режим доступа: http://gen-exp.ru/calculator_or.php. – Дата доступа: 18.07.2019.
15. Free statistical calculators [Electronic resource] // *MedCalc Software*. – Ostand, 2019. – Mode of access: <https://www.medcalc.org/calc/>. – Date of access: 18.07.2019.

16. SNPStats: your web-tool for SNP analysis [Electronic resource] // Catalan Institute of Oncology. – Barcelona, 2006. – Mode of access: <https://www.snpstats.net/start.htm>. – Date of access: 18.07.2019.
17. *PSMA6* (rs2277460, rs1048990), *PSMC6* (rs2295826, rs2295827) and *PSMA3* (rs2348071) genetic diversity in Latvians, Lithuanians and Taiwanese / T. Sjakste [et al.] // *Meta Gene*. – 2014. – Vol. 2. – P. 283–298.
18. The single nucleotide polymorphism database (dbSNP) of nucleotide sequence variation [Electronic resource] // National Center for Biotechnology Information. – Bethesda, 2006. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. – Date of access: 18.07.2019.

I. Y. Bakutenko¹, I. D. Hileuskaya¹, N. V. Nikitchenko¹, E. V. Sechko², A. M. Tchitchko², A. V. Sukalo²,
N. I. Ryabokon¹

POLYMORPHIC VARIANTS OF *PSMA6* AND *PSMC6* GENES AS PREDISPOSITION FACTORS FOR JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS IN BELARUSIAN POPULATION

¹Institute of Genetic and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus
²Belarusian State Medical University
Minsk, 220116, the Republic of Belarus

The study results of the genotypes/alleles frequency of four polymorphic variants of proteasomal degradation system genes — *PSMA6* (rs2277460, rs1048990) and *PSMC6* (rs2295826, rs2295827) — among children of Belarus are presented: in the group of patients (177 children) with juvenile idiopathic arthritis (JIA) and the comparison group (a control group of 227 children without any joint pathologies, autoimmune and inflammatory processes). The association was found for the first time between the GC genotype of the *PSMA6* gene (rs1048990) and the risk of JIA (OR = 1.96; 95% CI 1.25–3.08; p = 0.004) in general, as well as with the most common oligoarticular type of this disease (OR = 2.01; 95% CI 1.21–3.34; p = 0.007). There were no differences between JIA and control groups by the genotype and allele frequency of the *PSMC6* gene (rs2295826 and rs2295827), as well as in rs2277460 locus of *PSMA6* gene. The linkage was established between polymorphic variants of rs2295826 and rs2295827 loci of the *PSMC6* gene (correlation coefficient $r = 1$; $D' = 1$), apparently due to their close localization.

Key words: juvenile idiopathic arthritis, proteasomal genes, *PSMA6*, *PSMC6*, genetic polymorphism.

Дата поступления статьи: 5 августа 2019 г.

М. В. Спринджук¹, Л. П. Титов², А. Е. Скрягин^{3,6}, Е. М. Скрягина³, А. П. Кончиц⁴, О. М. Залуцкая³, А. А. Гилеп⁵, В. В. Слипень⁶

ПРОГРАММНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ГЕНОМНЫХ ДАННЫХ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

¹Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова 6
e-mail: stepanenkomatvei@yandex.by

²РНПЦ Микробиологии и эпидемиологии
Республика Беларусь, 220114, Минск, ул. Филимонова, 23

³РНПЦ Пульмонологии и фтизиатрии
Республика Беларусь, 220053, Минск, ул. Долгиновский тракт, 157

⁴Институт леса НАН Беларуси
Республика Беларусь, 246001, Гомель, ул. Пролетарская, 71

⁵Институт биоорганической химии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220141, Минск, ул. Академика Купревича, 5, корп. 3

⁶Белорусский государственный медицинский университет
Республика Беларусь, 220116, Минск, пр-т Дзержинского, 83

Разработана новая версия программного комплекса для выполнения практического биоинформатического анализа геномных данных *Mycobacterium tuberculosis* с целью получения индивидуального мутационного профиля, необходимого для поддержки принятия решений о назначении адекватной антимикробной химиотерапии и развития фундаментальных исследований в сфере бактериологии и эпидемиологии. Статья и разработанное программное обеспечение могут быть интересны как начинающим, так и опытным биоинформатикам, биологам, микробиологам и эпидемиологам, а также врачам и инженерам, занимающимся научной деятельностью.

Ключевые слова: геномика возбудителя туберкулеза, устойчивость к антибиотикам, биоинформатика, программное обеспечение.

Введение

Внедрение в клиническую бактериологию и эпидемиологию подходов и методов полногеномного секвенирования патогенных бактерий обеспечило быстрый прогресс в накоплении данных о первичной структуре генов и геномов микроорганизмов, представляющих огромный потенциал для анализа и применения в молекулярной бактериологии и эпидемиологии [1, 2, 3]. Среди клинически значимых для человека бактерий *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) является основным патогеном, вызывающим ежегодно 10 млн новых случаев туберкулеза и около 3 млн смертей. Геном МБТ был секвенирован одним из первых в 1998 году [4]. Ежегодно накапливается большой объем геномных данных, которые остаются недостаточно проанализированными и, соответственно, недоступными для специ-

алистов в области микобактериологии, эпидемиологии и клиницистов.

Информация о геномах патогенных микроорганизмов в первую очередь необходима для поиска эффективных методов, направленных на преодоление резистентности микробов к химиотерапии. Тема поиска и анализа мишеней устойчивости к антибиотикам наиболее актуальна и приоритетна по разным критериям. Туберкулез по-прежнему уносит жизни миллионов людей и животных, поэтому возбудитель этого заболевания является важной мишенью для биоинформатических геномных исследований [5—11]. Современная техника позволяет секвенировать ДНК и РНК из различных объектов и получать файлы коротких и длинных прочтений в стандартном FASTQ формате. С обработки и анализа этих данных и начинается практически любой конвейер применения

биоинформатических алгоритмов и моделей [12]. Известны программное обеспечение и веб-сервисы, предназначенные для определения мутационного профиля образцов полных геномов микобактерии туберкулеза, — Mykrobe-Predictor [13, 14], KvarQ [15], TGS-TB [16], PhyResSE [17], CASTB [18], TBProfiler [19, 20], а также программные комплексы для анализа и обработки биоинформатических данных следующего поколения: NextGene Softgenetics, Ugene, Conveerge, CLC Workbench, NIH Workbench, CodonCode, веб-платформа Galaxy [21].

Материалы и методы

Программный комплекс был разработан в двух версиях: настольной-десктоп (рис. 1) и с веб-интерфейсом (рис. 2, 3). Для разра-

ботки программного комплекса применялся язык программирования Python 3.7 и Linux Shell. Модули, которые были использованы в данном программном обеспечении (рис. 4),

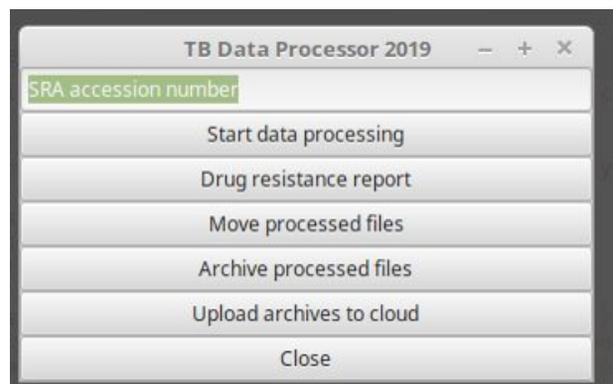


Рис. 1. Интерфейс десктоп Linux версии программного комплекса

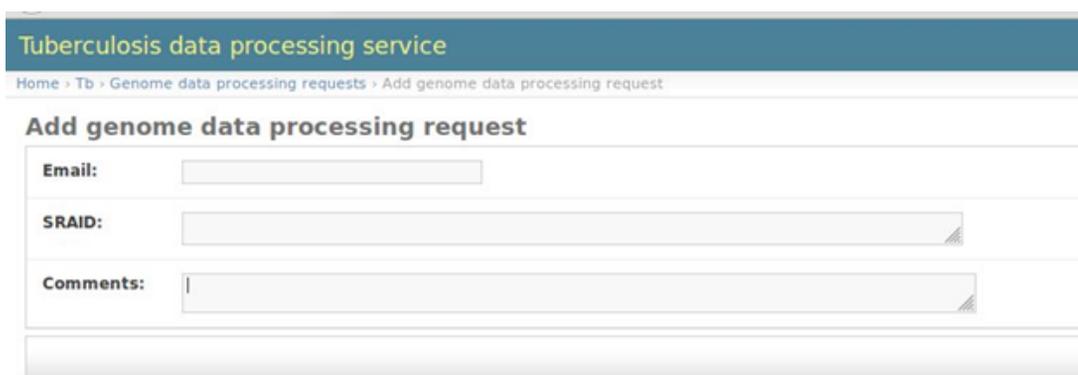


Рис. 2. Фрагмент интерфейса Python-Django веб версии программного комплекса

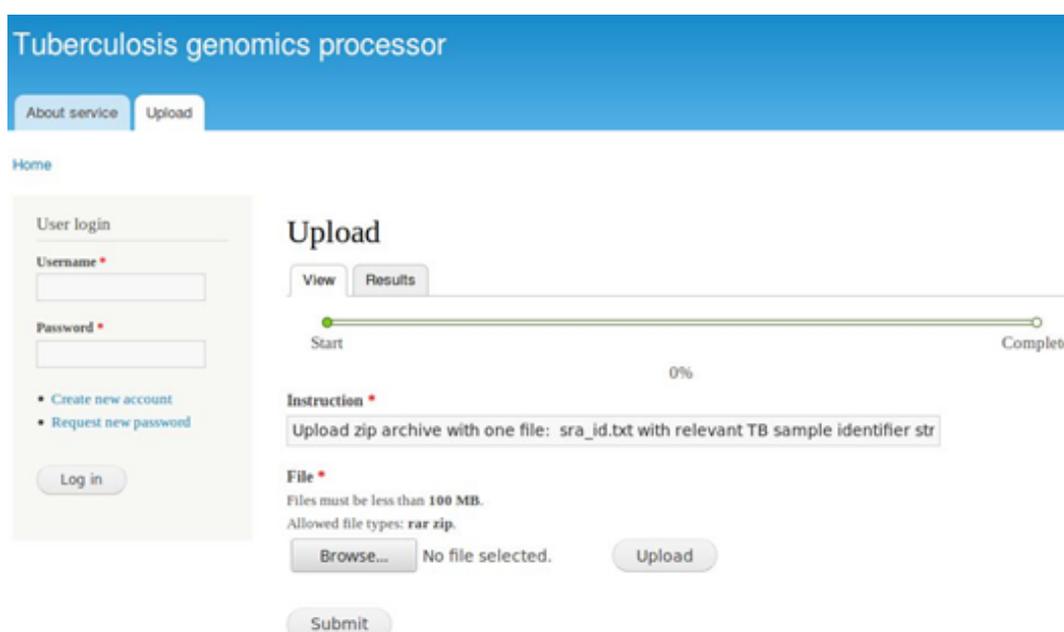


Рис. 3. Интерфейс Django веб версии программного комплекса

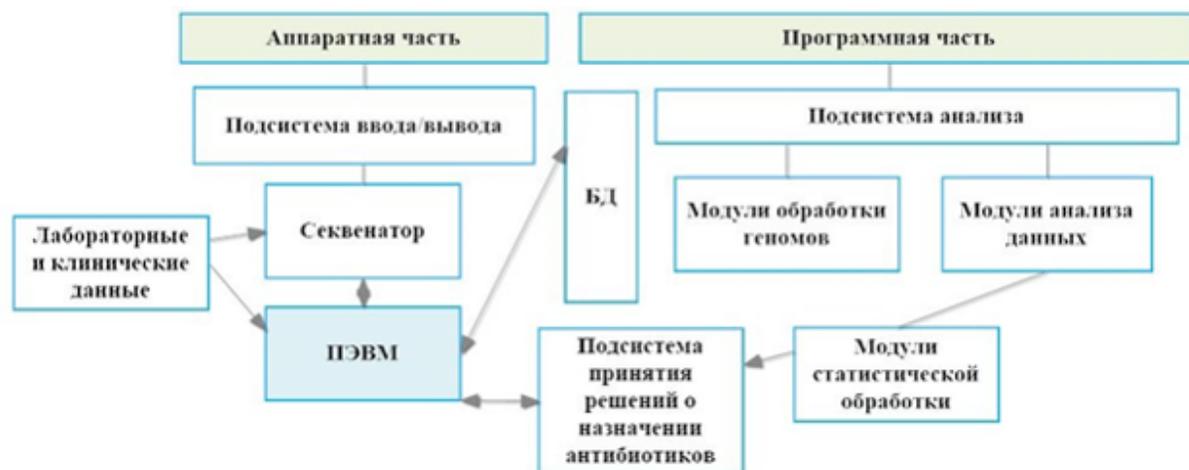


Рис. 4. Архитектура разработанной системы обработки геномных данных микобактерий туберкулеза

содержали коды языков программирования Java, Perl, Javascript, HTML, Ruby, C++, SQL. В отличие от предыдущих версий программного комплекса, которые были описаны в публикациях [22, 23, 24], в данной версии применялась аннотация файла мутационного профиля удаленной онлайн системой RAST и в веб-версии была добавлена функция *de novo* сборки исходных геномных данных сборщиком геномов A5-miseq (<https://chipster.csc.fi/manual/a5-miseq.html>).

Результаты и обсуждение

Разработанное программное обеспечение позволяет в полуавтоматическом режиме обрабатывать поединично запрос на обработку полногеномных данных микобактерии туберкулеза. Фактически алгоритм обработки данных состоит из следующих последовательных шагов:

1) прием и обработка введенной строки SRA идентификатора в форму интерфейса;

2) загрузка файлов генома;

3) тримминг данных;

4) картирование-выравнивание на ссылочный референсный геном;

5) *de novo* сборка исходных геномных данных;

6) предобработка файла выравнивания генома и запрос вариантов;

7) оптимизация (постобработка файла запроса вариантов, т. е. мутационного профиля микроба;

8) аннотация файла мутационного профиля модулями SNPEff [25] (рис. 5), RAST и Prokka;

9) поиск мутаций в отобранных генах путем выполнения операции пересечения множеств;

10) перенос по директориям, отбор и архивирование файлов результатов вычислительного эксперимента;

11) загрузка результатов на облачное хранилище.

В отличие от предыдущих версий программного комплекса в веб-версии была добавлена функция *de novo* сборки исходных парных коротких прочтений, необходимая для изучения

Chromosome	Length	Variants	Variants rate
AL123456	4,411,532	1,735	2,542
Total	4,411,532	1,735	2,542

Type	Total
SNP	1,062
MNP	1
INS	90
DEL	101
MIXED	1
INV	0
DUP	0
IND	0
INTERVAL	0
Total	1,735

Type (alphabetical order)	Count	Percent
HIGH	117	6.7%
LOW	535	3.06%
MODERATE	677	5.02%
MODIFIER	15,940	91.24%

Type (alphabetical order)	Count	Percent
MISSENSE	835	47.8%
NONSENSE	16	1.154%
SILENT	525	30.0%

Missense / Silent ratio: 1.5607

Рис. 5. Фрагмент отчета, сгенерированного модулем программного комплекса, использующим программу SNPEff

геномной структуры и филогенеза микроба, факторов его вирулентности и резистентности, а также дополнительная аннотация файла мутационного профиля модулями Prokka [26] и RAST [27]. Расширен список координат генов-мишеней, в который были добавлены гены, ответственные не только за резистентность к химиотерапии инфекции, но и за вирулентность, патогенность, Р450 и липидный метаболизм микроба.

Программное обеспечение было протестировано на пяти образцах полных геномов возбудителя туберкулеза, которые были отобраны по критерию минимальных размеров полных геномов.

Заключение

Разработана новая версия программного комплекса для анализа и обработки геномных данных микобактерии туберкулеза. Код программного обеспечения доступен бесплатно по письменному запросу у авторов. Перспективным направлением для дальнейших улучшений системы являются добавление новых модулей аннотации как результатов *de novo* сборки, так и мутационных профилей образцов микробов, применение операций исправления ошибок, конденсации и элонгации данных, эксперименты с новыми модулями для картирования прочтений, использование более длинных прочтений для вычисления мутационных профилей, разработка модулей для подбора и назначения эффективных antimicrobных средств, а также интеграция с ресурсами языков R и Javascript для визуализации данных.

Исследование поддержано грантами ОИПИ и CRDF.

Список использованных источников

1. Tassios, P.T., Moran-Gilad, J. Bacterial next generation sequencing (NGS) made easy // Clin Microbiol Infect. – 2018. – Vol. 24, № 4. – P. 332–334.
2. Chiner-Oms, A., Comas, I. Large genomics datasets shed light on the evolution of the Mycobacterium tuberculosis complex // Infect Genet Evol. – 2019. – P. 1–10.
3. Seto, J., Otani, Y., Wada, T., Suzuki, Y., Ikeda, T. Nosocomial Mycobacterium tuberculosis

transmission by brief casual contact identified using comparative genomics // J Hosp Infect. – 2019. – Vol. 102, № 1. – P. 116–119.

4. Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence // Nature. – 1998. – Vol. 393, № 6685. – P. 537–544.

5. Arjomandzadegan, M., Nazari, R., Zolfaghari, M., Taherahmadi, M., Sadrnia, M. Performance Assessment of the Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Method for Rapid Detection of Susceptibility to Ethambutol and Molecular Prediction of Extensively Drug-resistant Tuberculosis in Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis // West Indian Med J. – 2015. – Vol. 64, № 4. – P. 325–332.

6. Sarmadian, H., Nazari, R., Zolfaghari, M.R., Pirayandeh, M., Sadrnia, M. Study of *carD* gene sequence in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis // Acta Microbiol Immunol Hung. – 2014. – Vol. 61, № 1. – P. 1–10.

7. Ianovich, O.O., Nosova, E.S., Titov, L.P. [Polymorphism of the genes IL-1RA and TNF-alpha in patients with gastritis and duodenal ulcer associated with Helicobacter pylori] // Mol Gen Mikrobiol Virusol. – 2013. – № 1. – P. 31–34.

8. Hashemi-Shahraki, A., Bostanabad, S.Z., Heidarieh, P., Titov, L.P., Khosravi, A.D. Species spectrum of nontuberculous mycobacteria isolated from suspected tuberculosis patients, identification by multi locus sequence analysis // Infect Genet Evol. – 2013. – Vol. 20. – P. 312–324.

9. Surkova, L., Horevich, H.L., Titov, L.P., Sahalchuk, E., Arjomandzadegan, M. A study on demographic characteristics of drug resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Belarus // Int J Mycobacteriol. – 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 75–81.

10. Khrustalev, V.V., Arjomandzadegan, M., Barkovsky, E.V., Titov, L.P. Low rates of synonymous mutations in sequences of Mycobacterium tuberculosis GyrA and KatG genes // Tuberculosis (Edinb). – 2012. – Vol. 92, № 4. – P. 333–344.

11. Arjomandzadegan, M., Titov, L.P., Surkova, L.K., Farnia, P., Sheikholeslami, F. Determination of principal genotypic groups among susceptible, MDR and XDR clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis in Belarus and Iran // Tuberk Toraks. – 2012. – Vol. 60, № 2. – P. 153–159.

12. Lynch, T., Petkau, A., Knox, N., Graham, M., Van Domselaar, G. A Primer on Infectious Disease Bacterial Genomics // *Clin Microbiol Rev.* – 2016. – Vol. 29, № 4. – P. 881–913.
13. Bradley, P., Gordon, N.C., Walker, T.M., Dunn, L., Heys, S. Corrigendum: Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis* // *Nat Commun.* – 2016. – Vol. 7, – P. 11465.
14. Bradley, P., Gordon, N.C., Walker, T.M., Dunn, L., Heys, S. Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis* // *Nat Commun.* – 2015. – Vol. 6. – P. 10063.
15. Steiner, A., Stucki, D., Coscolla, M., Borrell, S., Gagneux, S. KvarQ: targeted and direct variant calling from fastq reads of bacterial genomes // *BMC Genomics.* – 2014. – Vol. 15. – P. 881.
16. Sekizuka, T., Yamashita, A., Murase, Y., Iwamoto, T., Mitarai, S. TGS-TB: Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* Using Short-Read Whole-Genome Sequencing // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 11. – P. e0142951.
17. Feuerriegel, S., Schleusener, V., Beckert, P., Kohl, T.A., Miotto, P. PhyResSE: a Web Tool Delineating *Mycobacterium tuberculosis* Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data // *J Clin Microbiol.* – 2015. – Vol. 53, № 6. – P. 1908–1914.
18. Iwai, H., Kato-Miyazawa, M., Kirikae, T., Miyoshi-Akiyama, T. CASTB (the comprehensive analysis server for the *Mycobacterium tuberculosis* complex): A publicly accessible web server for epidemiological analyses, drug-resistance prediction and phylogenetic comparison of clinical isolates // *Tuberculosis (Edinb).* – 2015. – Vol. 95, № 6. – P. 843–844.
19. Ngo, T.M., Teo, Y.Y. Genomic prediction of tuberculosis drug-resistance: benchmarking existing databases and prediction algorithms // *BMC Bioinformatics.* – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 68.
20. Phelan, J., O’Sullivan, D.M., Machado, D., Ramos, J., Whale, A.S. The variability and reproducibility of whole genome sequencing technology for detecting resistance to anti-tuberculous drugs // *Genome Med.* – 2016. – Vol. 8, № 1. – P. 132.
21. Schleusener, V., Koser, C.U., Beckert, P., Niemann, S., Feuerriegel, S. *Mycobacterium tuberculosis* resistance prediction and lineage classification from genome sequencing: comparison of automated analysis tools // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, – P. 46327.
22. Спринджук, М., Сергеев, Р., Демидчик, Ю., Залуцкая, О., Скрыгин, А. Программное обеспечение для обработки данных полногеномного секвенирования микроорганизмов // *Туберкулез и болезни легких.* – 2016. – Vol. 94, № 2. – P. 47–54.
23. Спринджук, М., Титов, Л., Залуцкая, О., Скрыгин, А., Скрыгина, А. Новое программное обеспечение для обработки данных полных геномов микобактерий туберкулеза // *Туберкулез и болезни легких.* – 2017. – Vol. 95, № 6. – P. 41–44.
24. Спринджук, М., Титов, Л., Слизень, В., Скрыгин, А., Скрыгина, Е. Программно-вычислительный комплекс «Окунь-2» для оценки мутационного профиля генов резистентности и вирулентности секвенированных геномов микобактерии туберкулеза // *Доклады Белорусского государственного университета информатики и радиоэлектроники.* – 2018. – № 6 (116). – P. 40–45.
25. Cingolani, P., Platts, A., Wang le, L., Coon, M., Nguyen, T. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3 // *Fly (Austin).* – 2012. – Vol. 6, № 2. – P. 80–92.
26. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // *Bioinformatics.* – 2014. – Vol. 30, № 14. – P. 2068–2069.
27. Davis, J.J., Boisvert, S., Brettin, T., Kenyon, R.W., Mao, C. Antimicrobial Resistance Prediction in PATRIC and RAST // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 27930.

**M. V. Sprindzuk¹, L. P. Titov², A. Y. Skrahin^{3,6}, E. M. Skrahina³, A. P. Konchits⁴, O. M. Zalutskaya³,
A. A. Gilep⁵, V. V. Slizen⁶**

SOFTWARE SYSTEM FOR PRACTICAL PROCESSING OF MYCOBACTERIA TUBERCULOSIS GENOMIC DATA

¹United institute for informatics problems of NASB

Minsk, 220012, the Republic of Belarus

²RSPC of Microbiology and Epidemiology

Minsk, 220114, the Republic of Belarus

³RSPC for Pulmonology and TB

Minsk, 220053, the Republic of Belarus

⁴Forest Institute of NASB

Gomel, 246001, the Republic of Belarus

⁵Institute of Bioorganic Chemistry of NASB

Minsk, 220141, the Republic of Belarus

⁶Belarusian State Medical University

Minsk, 220116, the Republic of Belarus

A new software has been developed for the practical bioinformatic analysis of genomic *Mycobacterium tuberculosis* data to obtain an individual target mutational profile required to support decision-making on adequate antimicrobial therapy and for the goals of fundamental research in bacteriology and epidemiology. The developed software can be useful both to beginners and experienced bioinformaticians, biologists, microbiologists, epidemiologists, as well as clinical doctors and engineers engaged in scientific research.

Key words: tuberculosis agent genomics, antibiotic resistance, bioinformatics, software.

Дата поступления статьи: 24 июня 2019 г.

О. А. Орловская, Л. А. Соловей, Н. И. Дубовец, Л. В. Хотыльёва

ОЦЕНКА ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ИНТРОГРЕССИЕЙ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА *T. DICOCOIDES*, *T. DICOCUM*, *T. KIHARAE*

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

Проведено изучение поведения хромосом в мейозе линий F_7 и F_{10} мягкой пшеницы с генетическим материалом *T. dicoccoides*, *T. dicocum*, *T. kiharae*. Установлено, что наибольшим количеством нарушений на всех стадиях цикла характеризуются линии, созданные с участием наименее цитологически стабильной синтетической пшеницы *T. kiharae*. В процессе анализа микроспорогенеза показано, что у интрогрессивных линий к седьмому поколению произошла существенная стабилизация мейотического цикла, которая обеспечивает формирование у них полноценных гамет и, как следствие этого, успешное воспроизведение в ряду последующих поколений.

Ключевые слова: мягкая пшеница *T. aestivum*, тетраплоидные (*T. dicoccoides*, *T. dicocum*) и гексаплоидный (*T. kiharae*) виды рода *Triticum*, интрогрессивные линии пшеницы, микроспорогенез.

Введение

Современные требования к высокой продуктивности и выравненности сортов значительно снизили генетическое разнообразие мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.). Дикие и родственные виды пшеницы часто используются для обогащения ее генома ценными генами. Например, большая часть эффективных генов устойчивости к грибным патогенам перенесена в геном мягкой пшеницы от видов рода *Aegilops*, *Thinopyrum* и от некоторых диплоидных и тетраплоидных видов рода *Triticum* [1–3]. Дикорастущие сородичи и синтетические пшеницы также являются источниками устойчивости к неблагоприятным факторам среды и признаков высокого качества зерна [4, 5].

С целью обогащения генофонда мягкой пшеницы в скрещиваниях с сортами *T. aestivum* нами были привлечены виды рода *Triticum* различного уровня ploидности [6]. Характер структурных преобразований отдаленных гибридов был изучен ранее с помощью методов С-бэндинга и SSR-анализа [7, 8]. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что интрогрессия чужеродного генетического материала в геном *T. aestivum* осуществляется как в виде небольших участков, выявляемых лишь с помощью молекулярных

маркеров, так и в виде целых хромосом (межгеномные замещения) и их фрагментов (центрические и терминальные транслокации). Наиболее высокая частота интрогрессий показана для хромосом 1A, 1B, 2A, 5B, 6A. Рекомбинационные события, произошедшие у интрогрессивных линий пшеницы с участием чужеродных хромосом или их фрагментов, оказывают влияние как на стабильность мейоза, так и на формирование ряда признаков (продуктивность, устойчивость к заболеваниям, адаптивность к абиотическим стрессам и т. п.). Цель данной работы заключалась в изучении поведения хромосом в мейозе и оценке цитологической стабильности линий F_7 и F_{10} мягкой пшеницы с генетическим материалом *T. dicoccoides*, *T. dicocum*, *T. kiharae*.

Материалы и методы

В работе были использованы 12 линий, полученных в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси от скрещивания сортов мягкой пшеницы *T. aestivum* (Рассвет, Саратовская 29, Фестивальная) с тетраплоидными (*T. dicoccoides*, *T. dicocum*) и гексаплоидным (*T. kiharae*) видами рода *Triticum*.

Особенности микроспорогенеза у линий F_7 и F_{10} изучали на временных давленных препа-

ратах, изготовленных по общепринятой методике [9]. Для каждой комбинации скрещивания и исходных форм анализировали по 30 пластинок метафазы I и 50–80 пластинок следующих стадий мейоза: анафазы I и II, метафазы II, тетрады. Исследование препаратов проводили на микроскопе Ампливал (Карл Цейс, Йена) с объективом Апохромат 100x апертура 1,32 МИ. Для оценки признаков продуктивности использовали методические рекомендации ВИР им. Н. И. Вавилова [10]. Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью методов описательной статистики программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Одной из проблем гибридных форм злаков является нарушение правильного прохождения процессов мейоза с образованием унивалентных и мультивалентных ассоциаций. У сортов мягкой пшеницы также иногда наблюдается присутствие унивалентных, однако их содержание в норме не превышает 5%. Изучение мейоза в материнских клетках пыльцы (МКП) у сортов, использованных при создании интрогрессивных линий, показало их высокую цитологическую стабильность: среднее число унивалентных варьировало в зависимости от сорта от 0 до 0,07 (табл. 1). У сородичей пшеницы данный показатель был несколько выше и находился в пределах 0,07–0,6, что также указывает на их высокую стабильность. При этом больше всего унивалентных обнаружено у искусственно синтезированного вида *T. kiharae* (табл. 1).

Проведенный анализ стадии метафазы I выявил высокий уровень бивалентного спаривания хромосом и у всех гибридных линий — у большинства линий F_7 и F_{10} он приближался к 100% (табл. 1). Следует отметить, что у изученных нами ранее гибридов F_2 комбинаций *T. kiharae* × Фестивальная, *T. kiharae* × Саратовская 29, *T. dicoccum* K45926 × Фестивальная и *T. dicoccoides* × Фестивальная также был установлен достаточно высокий уровень синапсиса хромосом — количество хромосом, входивших в биваленты, составляло 90,8–96,2% [11]. Однако негативный эффект интрогрессии чужеродного генетического материала у гибридов F_2 был более выраженным: количество МКП с нарушениями на

этой стадии мейоза составило 60–96,7%, в то время как у гибридов F_7 и F_{10} этот показатель варьирует от 0 до 73,3%. Данные различия, вероятнее всего, являются следствием разного количества и протяженности чужеродных фрагментов интрогрессии в гибридных геномах разных поколений.

Основным типом нарушений на этой стадии мейоза является наличие унивалентных хромосом (рис. 1а). В большинстве случаев наблюдалось отсутствие спаривания двух хромосом как в F_7 , так и в F_{10} . Частота клеток с двумя унивалентами в F_{10} варьировала в широких пределах — от 3,33% (линии 1-3, 31, 29) до 60,0% (линия 34-2). У трех интрогрессивных линий (25-2, 34-1, 34-2) из 12 изученных встречаются клетки с четырьмя унивалентами в МI. Все эти линии созданы с участием образца *T. kiharae*. Следует отметить, что среди родительских форм только у данного вида рода *Triticum* были клетки с четырьмя унивалентами, но частота встречаемости таких клеток незначительна (3,33%). Максимальное число унивалентных, обнаруженное для исследованного материала, равно шести и выявлено в небольшом количестве (3,33% клеток) у линии 34-2 *T. kiharae* × Фестивальная. Для данной линии характерно также наибольшее количество МКП с двумя (60%) и четырьмя (13,3%) унивалентами.

При сравнении гибридов F_2 и более поздних поколений F_7 и F_{10} наблюдали значительное сокращение числа открытых бивалентов. У гибридов F_2 их среднее количество было на уровне 1,0–5,4 [11], а в F_{10} данный показатель составил 0,96–2,87 (рис. 1б). Наибольшее число открытых бивалентов характерно для линий с генетическим материалом синтетического вида *T. kiharae* (табл. 1).

Таким образом, больше всего нарушений в метафазе I мейоза обнаружено у линий, созданных с участием *T. kiharae*, как в F_2 , так и в более поздних поколениях. В ранних поколениях гибридных форм это обусловлено, скорее всего, структурными различиями между хромосомами геномов АВ *T. aestivum* и А'G *T. kiharae*. Известно, что *T. kiharae* (А'А'GGDD) — искусственно синтезированный вид, выделенный в ВИРе из созданного в Японии амфидиплоида *T. timopheevii* × *Ae. taushii*, относится к группе Timopheevi,

Таблица 1

Конъюгация хромосом в метафазе I интрогрессивных линий мягкой пшеницы F₇, F₁₀ и их родительских форм

Генотип	Линия	Поколение	Биваленты, шт.			Количество хромосом, входящих в биваленты, %	Униваленты, шт.
			закрытые	открытые	всего		
Рассвет × <i>T. kiharae</i>	31	F ₇	19,90 ± 0,20	1,10 ± 0,20	21 ± 0	100	0
		F ₁₀	20 ± 0,18	0,96 ± 0,18	20,97 ± 0,03	99,76	0,07 ± 0,06
<i>T. kiharae</i> × Саратовская 29	19	F ₇	18,70 ± 0,20	1,90 ± 0,20	20,60 ± 0,10	98,30	0,70 ± 0,20
		F ₁₀	19,53 ± 0,19	1,33 ± 0,19	20,90 ± 0,06	99,52	0,20 ± 0,11
	20-1	F ₇	18,40 ± 0,20	2,40 ± 0,20	20,90 ± 0,10	99,40	0,30 ± 0,10
		F ₁₀	19,13 ± 0,27	1,80 ± 0,25	20,93 ± 0,05	99,68	0,13 ± 0,09
	25-2	F ₇	18,30 ± 0,30	2,30 ± 0,30	20,70 ± 0,10	98,40	0,70 ± 0,20
		F ₁₀	19,10 ± 0,31	1,67 ± 0,26	20,77 ± 0,10	98,89	0,47 ± 0,21
<i>T. kiharae</i> × Фестивальная	28	F ₇	18,90 ± 0,30	1,90 ± 0,20	20,80 ± 0,10	99,20	0,30 ± 0,20
		F ₁₀	19,70 ± 0,21	1,23 ± 0,20	20,93 ± 0,05	99,68	0,13 ± 0,09
	34-1	F ₇	18 ± 0,30	2,70 ± 0,30	20,70 ± 0,10	98,70	0,50 ± 0,20
		F ₁₀	17,83 ± 0,21	2,87 ± 0,18	20,70 ± 0,09	98,57	0,60 ± 0,19
	34-2	F ₁₀	17,73 ± 0,28	2,40 ± 0,31	20,13 ± 0,12	95,87	1,80 ± 0,26
	Рассвет × <i>T. dicoccoides</i> к5199	29	F ₇	18,70 ± 0,30	1,90 ± 0,20	20,60 ± 0,10	98,30
F ₁₀			19,23 ± 0,22	1,73 ± 0,22	20,96 ± 0,03	99,76	0,07 ± 0,06
<i>T. dicoccoides</i> × Фестивальная	15-7-1	F ₇	19,10 ± 0,20	1,80 ± 0,20	20,90 ± 0,04	99,70	0,10 ± 0,10
		F ₁₀	19,00 ± 0,23	1,80 ± 0,21	20,80 ± 0,07	99,05	0,40 ± 0,15
	15-7-2	F ₇	17,20 ± 0,30	3,60 ± 0,30	20,70 ± 0,10	98,70	0,50 ± 0,20
	16-5	F ₇	18,50 ± 0,20	2,30 ± 0,20	20,80 ± 0,10	99,20	0,30 ± 0,10
F ₁₀		19,67 ± 0,19	1,33 ± 0,20	21 ± 0	100	0	
<i>T. dicoccut</i> К45926 × Фестивальная	1-3	F ₁₀	19,50 ± 0,18	1,47 ± 0,18	20,97 ± 0,03	99,84	0,07 ± 0,06
	2-7	F ₇	19,40 ± 0,20	1,40 ± 0,20	20,90 ± 0,10	99,30	0,30 ± 0,10
		F ₁₀	19,50 ± 0,23	1,43 ± 0,22	20,93 ± 0,05	99,68	0,13 ± 0,09
Рассвет			20,03 ± 0,16	0,97 ± 0,16	21 ± 0	100	0
Саратовская 29			19,60 ± 0,18	1,37 ± 0,19	20,97 ± 0,03	99,76	0,07 ± 0,06
Фестивальная			19,50 ± 0,21	1,43 ± 0,21	20,97 ± 0,03	99,76	0,06 ± 0,06
<i>T. kiharae</i>			18,53 ± 0,27	2,27 ± 0,25	20,80 ± 0,09	99,05	0,40 ± 0,18
<i>T. dicoccut</i> К45926			12,97 ± 0,24	0,97 ± 0,24	13,97 ± 0,03	99,76	0,07 ± 0,06
<i>T. dicoccoides</i>			12,63 ± 0,18	1,30 ± 0,18	13,93 ± 0,07	99,52	0,07 ± 0,06
<i>T. dicoccoides</i> к5199			12,20 ± 0,49	1,50 ± 0,43	13,70 ± 0,21	97,86	0,60 ± 0,43

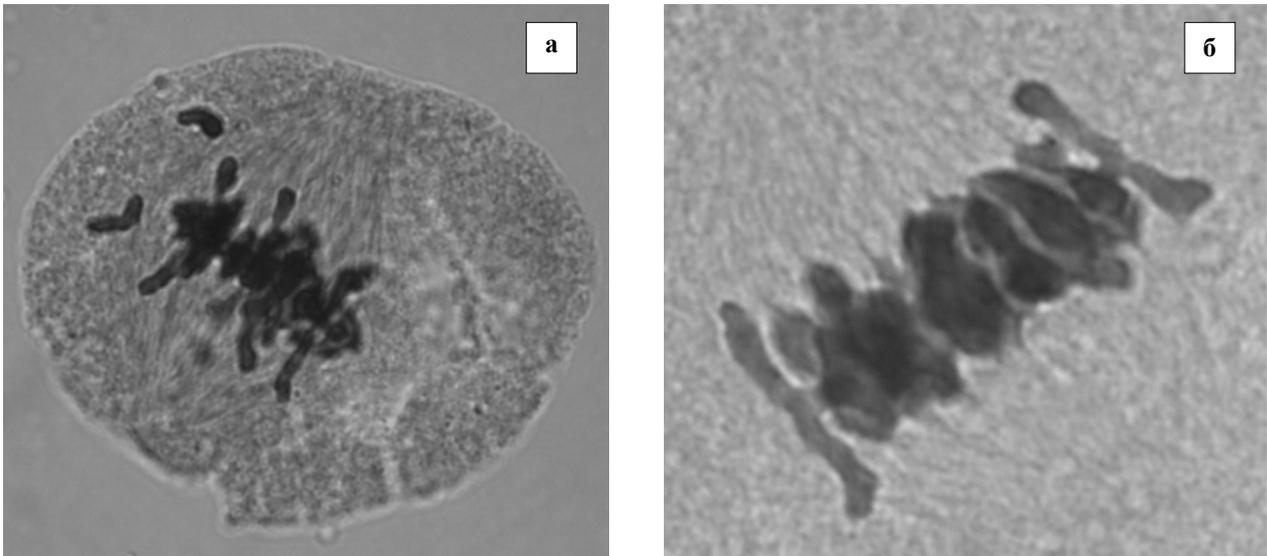


Рис. 1. Метафаза I у гибридных линий мягкой пшеницы: а — с открытыми бивалентами и унивалентами, б — с двумя открытыми бивалентами

виды которой значительно отличаются от видов группы Emmer (к которой относится и мягкая пшеница) по структуре кариотипа и рисункам дифференциального окрашивания хромосом [12]. Е. Д. Бадаевой показано, что предки пшениц группы Emmer и Timopheevi возникли от скрещиваний одних и тех же родительских видов, но независимо друг от друга. Группа Emmer является более древней, чем Timopheevi. Донором В- и G-геномов послужил диплоидный вид, близкий современному *Ae. speltoides* [13]. В процессе дальнейшей эволюции S-геном *Ae. speltoides* и В/G геномы полиплоидных пшениц значительно дивергировали относительно друг друга. Модификации хромосом проявлялись в изменении рисунков С-бэндинга. Так, для S-генома *Ae. speltoides* характерны крупные теломерные блоки, но большая часть В-генома их утратила. В целом, хромосомы G-генома *T. timopheevii* имеют больше сходных признаков с хромосомами S-генома *Ae. speltoides* по сравнению с В-геномом *T. durum* [12]. Все это объясняет более низкий уровень спаривания хромосом у линий, созданных с участием *T. kiharae*, по сравнению с линиями, полученными при скрещивании с *T. dicoccoides* и *T. dicoccum*. Виды *T. dicoccoides*, *T. dicoccum* относятся к группе Emmer, как и мягкая пшеница, и сходны с *T. aestivum* по морфологии и рисункам С-окрашивания хромосом. Известно, что дикая полба *T. dicoccoides* (Körn. ex

Aschers. et Graebn.) Schweinf. является древнейшим естественным, т. е. встречающимся в дикой природе, тетраплоидным видом, в процессе доместикиции из которого человеком были выделены другие тетраплоидные виды пшениц, отличающиеся друг от друга рядом признаков. Один из таких тетраплоидных видов — культурная двузернянка, или полба *T. dicoccum* — за 7 тыс. лет до н. э. выращивалась на полях в Старом Свете на значительных площадях. В настоящее время очевидно, что гексаплоидные виды рода *Triticum* являются самыми эволюционно молодыми, и первичный гексаплоид образовался путем присоединения генома D диплоидного дикорастущего злака эгилопса *Ae. squarrosa* L. (*Ae. tauschii*) к тетраплоидной пшенице, имеющей геном AABB. Принято считать, что предками мягкой пшеницы являются *T. dicoccum* (AABB) и *Ae. squarrosa* L. (DD) [14]. Проведенный нами анализ поведения хромосом в метафазе I мейоза показал высокий уровень спаривания хромосом у линий с генетическим материалом *T. dicoccoides* и *T. dicoccum*, что согласуется с литературными данными о сходстве А- и В-геномов данных видов и мягкой пшеницы [15].

Несмотря на достаточно высокий уровень спаривания хромосом в метафазе I гибридов F_2 , последующие стадии мейоза в этом поколении протекали со значительными нарушениями, вследствие чего процент нормальных тетрад (так называемый мейотический индекс,

являющийся показателем нормального течения всего мейоза) был очень низким с вариацией от 0 до 32% [11].

Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют о том, что к седьмому поколению произошла существенная стабилизация мейотического цикла и общая картина прохождения различных его стадий в ходе дальнейшей смены поколений менялась незначительно (табл. 2), а наблюдавшиеся между поколениями различия были обусловлены разными погодными условиями в период вегетации, оказывающими, как известно, существенное влияние на процесс формирования гамет.

На стадии анафазы I у исходных сортов пшеницы и видов рода *Triticum* количество МКП без нарушений было высоким и составило 80,0–82,86% и 74,0–91,67% соответственно (табл. 2). Для всех родительских форм обнаружены единичные клетки с отставшими хромосомами, причем число отставших хромосом было невелико (1–3). Лишь у сорта

Фестивальная и *T. kiharae* выявлены клетки с 4 отставшими хромосомами (1,25% и 4,0% соответственно), и данные генотипы были наименее стабильными среди изученных родительских форм. У сортов мягкой пшеницы обнаружено большое количество клеток с такой аномалией, как мосты, особенно у сорта Рассвет (18,33%) и Саратовская 29 (12,85%). У исследованных гибридных линий типичным нарушением мейоза в анафазе I являлось отставание хромосом от основных анафазных групп деления (количество отставших хромосом варьировало от 1 до 6). При этом максимальное число отставших хромосом (6) отмечено только у линии 29 Рассвет × *T. dicoccoides* к5199 (2,0%). Модальным классом являлись МКП с двумя или одной отставшими хромосомами. Кроме того, на стадии AI у всех исследованных линий отмечены МКП с хромосомными мостами, количество которых варьировало в широких пределах: 5,4–12,9% в F₇ и 8,33–23,75% в F₁₀. Следует

Таблица 2

Характеристика стадий мейоза и продуктивности растений у линий мягкой пшеницы F₇ и F₁₀ с интрогрессией чужеродного генетического материала и их родительских форм

Генотип	Линия	Поколение	Количество МКП без нарушений, %			Мейотический индекс, %	Масса зерна с растения, г
			анафаза I	метафаза II	анафаза II		
Рассвет × <i>T. kiharae</i>	31	F ₇	82,80	85,00	86,00	91,30	2,76 ± 0,27
		F ₁₀	76,25	88,75	92,50	92,00	3,91 ± 0,19
<i>T. kiharae</i> × Саратовская 29	19	F ₇	42,0	57,20	72,40	72,50	2,04 ± 0,12
		F ₁₀	54,67	80,65	88,00	93,00	3,75 ± 0,25
	20-1	F ₇	89,10	78,70	84,40	95,00	2,77 ± 0,14
		F ₁₀	82,86	86,25	78,57	92,00	3,44 ± 0,22 ^a
	25-2	F ₇	74,30	71,40	78,00	88,70	2,08 ± 0,20
		F ₁₀	85,00	80,00	77,50	90,91	3,25 ± 0,20 ^b
<i>T. kiharae</i> × Фестивальная	28	F ₇	82,00	74,00	76,00	77,00	2,78 ± 0,18
		F ₁₀	62,90	90,67	91,66	88,18	3,84 ± 0,62
	34-1	F ₇	65,00	60,00	70,80	85,00	1,51 ± 0,08
		F ₁₀	76,00	63,75	71,11	77,00	2,61 ± 0,27 ^a
	34-2	F ₇	72,50	44,29	48,75	55,83	2,67 ± 0,25 ^a
		F ₁₀	72,50	44,29	48,75	55,83	2,67 ± 0,25 ^a
Рассвет × <i>T. dicoccoides</i> к5199	29	F ₇	81,70	83,30	87,80	95,00	2,98 ± 0,26
		F ₁₀	68,00	81,67	82,86	93,00	3,81 ± 0,29

Продолжение табл. 2

Генотип	Линия	Поклоение	Количество МКП без нарушений, %			Мейотический индекс, %	Масса зерна с растения, г
			анафаза I	метафаза II	анафаза II		
<i>T. dicoccoides</i> × Фестивальная	15-7-1	F ₇	81,50	60,00	67,50	86,20	2,01 ± 0,14
		F ₁₀	75,00	67,86	77,50	87,00	3,71 ± 0,28
	15-7-2	F ₇	78,30	81,40	82,00	86,20	2,00 ± 0,22
	16-5	F ₇	81,50	76,70	82,00	85,00	2,44 ± 0,25
		F ₁₀	85,00	88,57	85,00	89,09	3,31 ± 0,25
<i>T. dicocum</i> К45926 × Фестивальная	1-3	F ₁₀	82,86	90,00	90,01	96,00	3,61 ± 0,22
	2-7	F ₇	78,30	73,20	72,40	94,30	3,34 ± 0,34
		F ₁₀	83,33	86,25	82,86	99,00	4,33 ± 0,21 ^b
Рассвет			80,00	96,67	91,12	99,00	5,01 ± 0,35
Саратовская 29			82,86	91,25	96,36	99,00	4,55 ± 0,35
Фестивальная			82,50	90,91	88,32	84,55	3,35 ± 0,20
<i>T. kiharae</i>			74,00	74,29	61,43	80,00	2,46 ± 0,26
<i>T. dicocum</i> К45926			91,25	92,50	95,00	97,50	3,44 ± 0,23
<i>T. dicoccoides</i>			91,67	80,00	82,86	96,25	4,35 ± 0,38
<i>T. dicoccoides</i> к5199			82,35	81,67	85,00	95,71	3,71 ± 0,46

Примечание. Отличия между интрогрессивными линиями и родительским сортом мягкой пшеницы: а — достоверно при $P < 0,05$; b — достоверно при $P < 0,01$

отметить, что количество клеток с мостами существенно отличалось в разные годы исследований, что можно объяснить влиянием среды на этот признак. Максимальное количество клеток с хромосомными мостами выявлено у линии 31 Рассвет × *T. kiharae*, что вероятнее всего обусловлено влиянием сорта Рассвет, для которого обнаружено самое большое количество клеток с такими нарушениями среди родительских форм (18,33%). Общее количество МКП без нарушений на стадии анафазы I находилось в интервале 42,0–89,1% (F₇) и 54,67–85,0% (F₁₀). Примечательно то, что на этой стадии мейоза, так же как и на стадии MI, наименьшая стабильность отмечена для линий с интрогрессией генетического материала от *T. kiharae*.

Основным нарушением на стадии метафазы II мейоза, как и в метафазе I, являлось наличие хромосом, не включенных в метафазные пластинки. Максимальное количество унивалентов (6) отмечено только у одной линии — 34-1

комбинации *T. kiharae* × Фестивальная в оба года исследований. В основном встречались МКП с одной или двумя хромосомами, не включенными в метафазную пластинку. На данной стадии у всех линий наблюдалась асинхронность деления, когда одна из клеток находится на более поздней стадии, чем другая. Количество МКП без нарушений на стадии метафазы II составило 57,2–85,0% в F₇ и 44,29–90,67% в F₁₀. Наименьший уровень стабильности на данной стадии мейоза среди родительских форм выявлен у *T. kiharae*, а среди интрогрессивных линий — у линий 34-1 и 34-2, созданных с участием данного вида (табл. 2).

Расхождение хромосом к полюсам во втором делении мейоза (анафаза II) сопровождалось отставанием отдельных хромосом (рис. 2а), нарушением синхронности (рис. 2б), образованием мостов (рис. 2в). У интрогрессивных линий число отставших хромосом в анафазе II сохранилось на уровне предыдущей стадии — от

1 до 6. Для 3 линий из 10 изученных в поколении F_7 и для 8 линий из 12 изученных в поколении F_{10} выявлены клетки с хромосомными мостами, но частота встречаемости клеток с данной аномалией во втором делении была значительно ниже по сравнению с первым делением. Количество МКП без нарушений у гибридного материала на стадии анафазы II незначительно возросло по сравнению с метафазой II (табл. 2, рис. 2г). Такая же тенденция обнаружена для сородичей пшеницы: количество клеток без нарушений в АП было выше, чем на предыдущей стадии мейоза и составило 61,43–95,0%. Самый высокий уровень стабильности на данной стадии характерен для родительских сортов пшеницы (88,32–96,36%).

Стадия тетрад является заключительной, и количество МКП без нарушений на этой стадии (мейотический индекс) — важный показатель нормального течения всего мейоза. Процент нормальных тетрад у изученного материала находится на высоком уровне и, как правило, превышает 80% у гибридов F_7 и 90% — у гибридов F_{10} (табл. 2). Максимальный мейотический индекс выявлен у линии 2-7 комбинации *T. dicoccum* K45926 × Фестивальная. Следует отметить, что линия 1-3 этой же комбинации скрещивания также была цитологически стабильна, что вероятно обусловлено высоким уровнем спаривания хромосом в МI, отмеченным для линий, созданных с участием *T. dicoccum* K45926 (табл. 1, 2). Самый низкий показатель мейотического индекса принадлежит линиям 34-2 и 34-1 *T. kiharae* × Фестивальная, для которых показано наибольшее количество нарушений и на предыдущих стадиях мейоза (табл. 2). Не следует также исключать определенной доли влияния на цитологическую стабильность этих линий генотипа исходного сорта пшени-

цы Фестивальная, имеющего самый низкий мейотический индекс среди включенных в гибридизацию сортов (табл. 2).

На завершающей стадии мейоза наряду с нормальными тетрадами (рис. 3а) встречались и аномальные — с микроядрами различного размера, количество которых варьировало в исследованном материале от 1 до 6 (рис. 3б), однако чаще всего образовывались тетрады с одним и двумя микроядрами (рис. 3в). МКП, содержащие 6 микроядер, отмечены только для двух линий комбинации *T. kiharae* × Фестивальная, причем частота их встречаемости была очень низкой и находилась на уровне 0,91–1,67% от общего числа проанализированных клеток. Иногда встречались диады и пентады (рис. 3г). Количество клеток с такими нарушениями было незначительно, и диады обнаружены только в F_{10} у линии 19 *T. kiharae* × Саратовская 29 (1,0%), а пентады — в F_{10} у линий 34-1 *T. kiharae* × Фестивальная и 15-7-1 *T. dicoccoides* × Фестивальная (по 1,0%) и в F_7 у линии 2-7 *T. dicoccum* K45926 × Фестивальная (1,4%).

Сравнительный анализ цитологической стабильности и продуктивности родительских форм показал, что снижение мейотического индекса негативно отражается на массе зерна с растения. Так, самый низкий мейотический индекс среди исходных сортов мягкой пшеницы отмечен для сорта Фестивальная (84,55%), а среди видов рода *Triticum* — для *T. kiharae* (80%), эти же генотипы характеризуются сниженной массой зерна с растения (табл. 2). Такая же тенденция обнаружена и для исследованных интрогрессивных линий: наиболее цитологически стабильная линия 2-7 характеризовалась самой высокой массой зерна с растения, в то время как линии 34-1 и 34-2 из комбинации скрещивания *T. kiharae* × Фестивальная

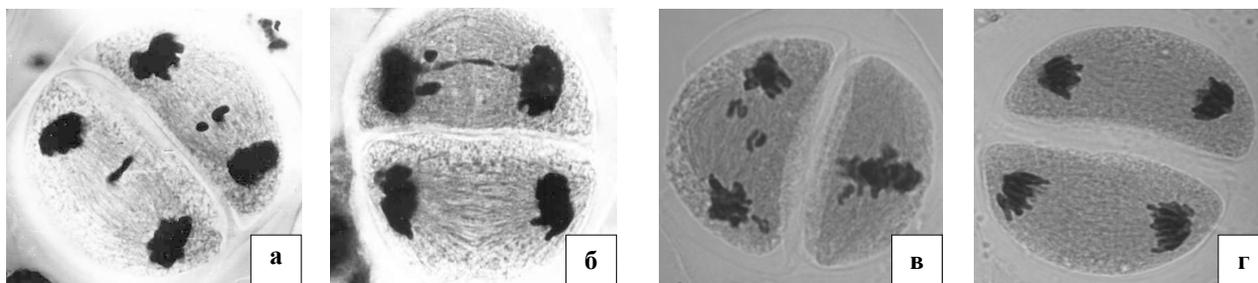


Рис. 2. Анафаза II мейоза у гибридных линий мягкой пшеницы: а — с отставшими хромосомами, б — нарушением синхронности, в — мостом, г — без нарушений

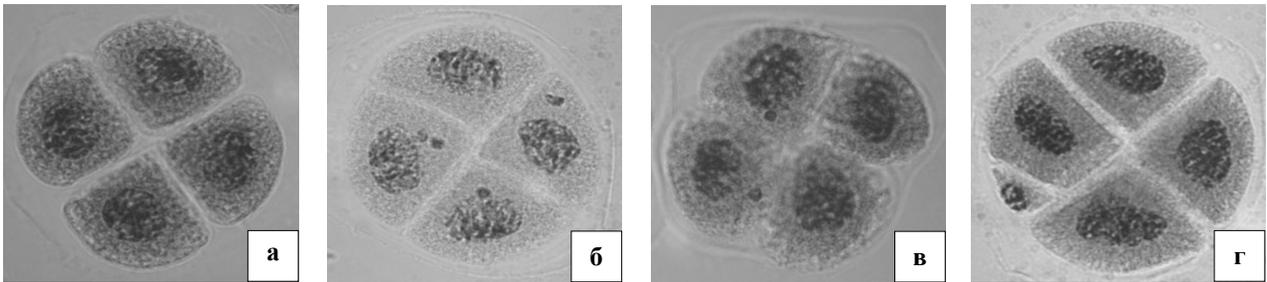


Рис. 3. Стадия тетрады в микроспорогенезе гибридных линий мягкой пшеницы: а — без нарушений, б — тетрада с четырьмя микроядрами, в — тетрада с двумя микроядрами, г — пентада

с низким мейотическим индексом — самыми низкими показателями по данному признаку. Интрогрессивные линии, как правило, превышали сородичей пшеницы, но уступали родительскому сорту по признаку «масса зерен с растения». Только наиболее цитологически стабильная линия 2-7 *T. dicoccut* K45926 × Фестивальная превосходила исходный сорт пшеницы по данному признаку с высокой степенью достоверности (табл. 2).

Таким образом, анализ заключительной стадии мейоза показал высокий уровень цитологической стабильности у подавляющего количества линий пшеницы с включением чужеродного генетического материала. Следует отметить, что линии, характеризующиеся незначительным количеством аномалий на ранних стадиях микроспорогенеза, как правило, имели более высокое значение мейотического индекса и показателей продуктивности.

Заключение

В ходе изучения особенностей поведения хромосом в мейозе линий пшеницы с интрогрессией генетического материала *T. dicocoides*, *T. dicoccut*, *T. kiharae* установлено, что наибольшим количеством нарушений на всех стадиях цикла характеризуются линии, созданные с участием синтетической пшеницы *T. kiharae* (A¹A¹GGDD). Хромосомы A¹ и G-геномов *T. kiharae* более отдалены в филогенетическом плане от хромосом A- и V-геномов мягкой пшеницы, что приводит к пониженному уровню спаривания между ними на ранних этапах формообразовательного процесса гибридных растений. Кроме того, среди родительских форм этот вид является наименее цитологически стабильным, что также приводит к снижению мейотического индекса интрогрессивных линий, созданных

с его участием. В целом, полученные в ходе анализа микроспорогенеза данные показали, что у интрогрессивных линий к седьмому поколению произошла существенная стабилизация мейотического цикла, которая обеспечивает формирование у них полноценных гамет и, как следствие, успешное воспроизведение в ряду последующих поколений.

Исследование поддержано Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант № Б18Р-028).

Список использованных источников

1. Sources of stem rust resistance in wheat-alien introgression lines / M. Rahmatov [et al.] // *Plant Dis.* – 2016. – Vol. 100, № 6. – P. 1101–1109.
2. Development of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr39* with reduced *Aegilops speltoides* chromatin and simple PCR markers for marker-assisted selection / R. Mago [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – Vol. 119, № 8. – P. 1441–1450.
3. Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene Pm43 introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat / R. L. He [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – Vol. 118. P. 1173–1180.
4. Introgression of novel traits from a wild wheat relative improves drought adaptation in wheat / D. F. Placido [et al.] // *Plant Physiol.* – 2013. – Vol. 161, № 4. – P. 1806–1819.
5. Wheat seed storage proteins: advances in molecular genetics, diversity and breeding applications / A. Rasheed // *J. Cereal Sci.* – 2014. – Vol. 60, № 1. – P. 11–24.
6. Khotyleva, L. Use of *Triticeae* tribe species for expanding and enriching genetic resources of *Triticum aestivum* / L. Khotyleva, L. Koren, O. Orlovskaya // 8th International Wheat Confer-

- ence, St. Petersburg, 1–4 June, 2010: abstracts. – St. Petersburg: VIR, 2010. – P. 101–102.
7. Сравнительная характеристика гибридных линий *Triticum aestivum* / *Triticum durum* и *Triticum aestivum* / *Triticum dicoccum* по геномному составу и устойчивости к грибным болезням в различных экологических условиях / И. Н. Леонова и др. // Генетика. – 2013. – Т.49, № 11. – С. 1276–1283.
8. Molecular-cytogenetic analysis of common wheat lines with *T. kiharae* genetic material / О. А. Orlovskaya [et al.] // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2019): The Fifth International Scientific Conference, Novosibirsk, 24–29 June, 2019: abstracts / Ins. Cytology and Genetics, SB RAS; ed.: A. V. Kochetov, E. A. Salina. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2019. – P. 152.
9. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М.: Колос, 1970. – 254 с.
10. Мережко, А. Ф. Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и тритикале: методические указания / А. Ф. Мережко. – С.-Петербург: ВИР, 1999. – 82 с.
11. Орловская, О. А. Цитологическая характеристика гибридов пшеницы, созданных при отдаленной гибридизации в трибе Triticeae // О. А. Орловская, Л. В. Корень, Л. В. Хотылёва // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2010. – № 4. – С. 50–54.
12. Бадаева, Е. Д. Эволюция геномов пшениц и их дикорастущих сородичей: молекулярно-цитогенетическое исследование: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.03; 03.00.15 / Е. Д. Бадаева; Рос. акад. наук, Ин-т мол. биологии. – М., 2000. – 48 с.
13. Badaeva, E. D. Evolution of the S-genome in *Triticum* and *Aegilops* / E. D. Badaeva // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2019): The Fifth International Scientific Conference, Novosibirsk, 24–29 June, 2019: abstracts / Ins. Cytology and Genetics, SB RAS; ed.: A. V. Kochetov, E. A. Salina. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2019. – P. 35.
14. Гончаров, Н. П. Происхождение, доместикация и эволюция пшениц / Н. П. Гончаров, Е. Я. Кондратенко // Вестник ВОГиС. – 2008. – Т. 12, №1/2. – С. 159–179.
15. Исследование внутривидового разнообразия тетраплоидной пшеницы *Triticum dicoccum* (Schrank.) Schuebl с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом / О. С. Дедкова и др. // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 11. – С. 1517–1533.

O. A. Orlovskaya., L. A. Solovey, N. I. Dubovets, L. V. Khotyleva

EVALUATION OF CYTOLOGICAL STABILITY OF COMMON WHEAT LINES WITH *T. DICOCCOIDES*, *T. DICOCCUM*, *T. KIHARAE* GENETIC MATERIAL

Institute of Genetic and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

The study of the chromosome behavior in meiosis of F_7 and F_{10} lines of common wheat with *T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, and *T. kiharae* genetic material was made. The greatest number of disorders at all cycle stages was found in the lines obtained from crossing with synthetic wheat *T. kiharae*, which has the lowest level of cytological stability. In general, the data obtained during the microsporogenesis analysis allow us to conclude that the level of meiotic cycle stability achieved in F_7 by introgression lines ensures the formation of functional gametes, and therefore successful reproduction in subsequent generations.

Key words: common wheat *T. aestivum*, tetraploid (*T. dicoccoides*, *T. dicoccum*) and hexaploid (*T. kiharae*) species of genus *Triticum*, introgression lines, microsporogenesis.

Дата поступления статьи: 17 июля 2019 г.

Т. Н. Марцинкевич¹, Т. А. Гашенко¹, З. А. Козловская¹, Ю. Г. Кондратенко¹, С. К. Лозюк²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ITS-РЕГИОНА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕНОВ РОДА *VENTURIA* CES. ET DE NOT

¹Институт плодоводства НАН Беларуси

Республика Беларусь, 223013, Минская обл., Минский р-н, аг. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2
e-mail: 87martany@gmail.com

²ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Министерства здравоохранения Республики Беларусь
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23

В статье представлены результаты исследований по идентификации грибов рода *Venturia* spp. с использованием internal transcribed spacer (ITS)-региона. Установлена высокая результативность метода секвенирования рибосомальной ДНК для идентификации аскомицетных грибов рода *Venturia* Ces. et De Not. Степень сходства регионов выделенного гриба с имеющимися в базе *V. pirina*, *V. nashicola* и *V. inaequalis* составила 95–99%, 96–97% и 81–83% соответственно. Также в исследовании установлено, что для видового определения представителей рода *Venturia* необходимо применение более специфических методов идентификации.

Ключевые слова: ITS-регион, идентификация, *Venturia* spp., груша, яблоня.

Введение

В связи с интенсивным развитием биологических технологий, сегодня становится возможным более точно и объективно отвечать на вопросы по идентификации различных патогенов и их филогенетических связей.

Традиционные методы идентификации видов часто осложняются высоким внутривидовым полиморфизмом или, напротив, высокими межвидовыми морфологическими сходствами. В то же время необходимость видовой идентификации не вызывает сомнений, поэтому все чаще исследователи используют современные методы, основанные на применении технологий молекулярной генетики.

Преимущество современных молекулярно-генетических методов заключается в высокой универсальности, точности и относительной простоте проводимого анализа, поэтому они востребованы в области диагностики и идентификации различных объектов, в том числе возбудителей заболеваний растений.

Обзор литературных источников показал, что в исследованиях по идентификации грибных патогенов широко используют участок кластера рибосомной ДНК, так называемого транскрибирующегося спейсера internal transcribed spacer или ITS-регион [1].

Кластер рибосомной ДНК (рДНК) является неотъемлемой частью генома любого эукариотического организма и представляет собой тандемно повторяющиеся гены рибосомных РНК (18S-, 5.8S-, 28S-подобные), разделенные рядом спейсерных последовательностей: внутренними транскрибируемыми (ITS1 и ITS2), внешним транскрибируемым (ETS) и межгенными, или нетранскрибируемыми (NTS), спейсерами. Данные структурные элементы рДНК обладают различной степенью эволюционного консерватизма, и наиболее вариabельными являются именно спейсерные последовательности. Молекулярно-генетическая организация рДНК различных эукариот во многом сходна, в то же время каждый вид обладает рядом структурных и функциональных особенностей, характерных для данного участка генома. На основе этого различия и возможна видовая и расовая идентификация эукариот [2].

Анализ межвидового разнообразия нуклеотидных последовательностей ITS участка рДНК грибов основан на том, что участки генома, кодирующие рибосомальные РНК, имеют в своем составе как консервативные (собственно участки, кодирующие рРНК), так и вариabельные спейсерные последовательности. Консервативные участки позволяют

подобрать праймеры для амплификации всей ITS-области и отдельных ее частей. Благодаря вариабельным участкам получаемые в результате ПЦР продукты у эукариот различаются по величине и имеют разные последовательности [3].

Среди грибных патогенов, наносящих наибольший вред семечковым культурам в условиях Беларуси является парша. Паршу яблони и груши вызывают грибы рода *Venturia* Ces. et De Not. Среди данного рода выделяют вид *V. inaequalis*, паразитирующий на яблоне, и два вида на груше — *V. pirina* [4] и *V. nashicola* [5], вызывающие паршу у европейских и азиатских груш соответственно [6]. Также установлен и тот факт, что данные виды очень сходны по своим морфологическим и физиологическим признакам, что вызывает сложности при их идентификации традиционными способами [7].

В работах, посвященных изучению парши груши, исследователями E. Shabi и др. в 70-х годах было заявлено, что *V. nashicola* является расой *V. pirina*, а не отдельным видом [8]. Однако, в 2000 г. H. Ishii и H. Yanase проанализировали связь между двумя этими видами и пришли к выводу, что *V. nashicola* является видом, отличным от *V. pirina*. Их результаты были основаны на тестах на патогенность, где наглядно было продемонстрировано существование специфичного хозяина и патогена. Кроме того, было доказано достоверное морфологическое отличие между ними, в частности, по размеру конидий и аскоспор [9]. Позже учеными B. Le Cam, M. Devaux и L. Parisi было подтверждено генетическое различие *V. nashicola* и *V. pirina* с использованием специфической ПЦР (анализ участка, охватывающего оба спейсера ITS) [10].

В Беларуси исследованием возбудителя парши груши в 90-е годы занималась Т.П. Курдюк [11]. В результате изучения морфолого-культуральных признаков фитопатогена ею было установлено, что в Беларуси распространена *V. pirina* Aderh., характеризующаяся широким полиморфизмом популяций на территории республики. Ученый выделила три морфотипа возбудителя парши — P1, P2, P3 с различной степенью вредоносности [12].

В дальнейшем на протяжении почти 30 лет исследований в области идентификации пато-

гена, вызывающего паршу груши, в Беларуси не проводили. Анализ литературных источников показал, что *V. pirina* — относительно мало изученный объект по сравнению с возбудителями парши яблони *V. inaequalis* или азиатских груш *V. nashicola* [13]. В международной базе данных NCBI нуклеотидные последовательности *V. pirina* представлены слабо.

Благодаря полученным сведениям о том, что два возбудителя — *V. pirina* Aderh. и *V. nashicola* относятся к отдельным видам, сегодня мы можем судить о существовании отличий в нуклеотидной последовательности ДНК данного рода и в этом контексте искать свой молекулярно-генетический подход для их различия. Учитывая близкое генетическое родство данных видов и их морфологическое сходство, имеется необходимость поиска и разработки молекулярно-генетических методов их видовой идентификации, как наиболее точных.

Цель данного исследования — использование ITS-региона для идентификации грибов рода *Venturia* Ces. et De Not.

Материалы и методы

Исследования проводились в 2017–2018 гг. в лаборатории иммунитета отдела селекции плодовых культур РУП «Институт пловодства».

Объектами исследований являлись моноизолаты грибов *V. inaequalis* (Cooke) Wint. и *V. pirina* Aderh., выделенных в чистую культуру, и изоляты грибов, полученных со смывов пораженных плодов яблони и груши различного географического и генетического происхождения, культивированных на питательной среде. Объекты собраны в коллекционных садах РУП «Институт пловодства».

Выделение моноспоровых изолятов, возбудителей парши яблони и груши в чистую культуру осуществляли при помощи специальной насадки на объектив микроскопа [14]. Для культивации патогенов использовали модифицированную среду Чапека. Смывы с пораженных плодов проводили по общепринятым в фитопатологии методикам [15–17].

Выделение ДНК грибов-возбудителей болезней яблони и груши проводили с использованием колоночного набора «АртДНК MiniSpin» (ООО «АртБиоТех», Беларусь) в сочетании с инкубированием в сорбирующем

и лизирующем растворах при 65 °С в течение 2 ч. Количество ДНК в препаратах определяли с помощью спектрофотометра P330 («Implen», Германия).

Для ПЦР использовали следующие праймеры:

- ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') — для определения последовательности региона малой субъединицы 5.8S;

- LR3 (5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3') и LR5 (5'-TCCTGAGGGAAACTTCG3') — к региону большой субъединицы 28S;

- NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'), NS4(5'CTTCCGTC AATTCSTTTAAG-3') — к региону малой субъединицы у мицелиальных грибов 18S.

Реакцию амплификации проводили с готовым премиксом iProof HF master mix (Bio-Rad, США) с добавлением 10мМ праймеров и 50 нг ДНК-матрицы по следующему протоколу:

- I этап — преденатурация при 98 °С — 1 мин;
- II этап — 35 циклов: денатурация при 98 °С — 10 с, отжиг при 55 °С — 10 с, элонгация при 72 °С — 1 мин;

- III этап — элонгация при 72 °С — 3 мин.

Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза с использованием агарозных гелей 0,8% и 1,2%. Для визуализации и сохранения результатов электрофореза применяли систему цифровой видеодокументации ChemiDoc («BioRad», США).

Очистку ПЦР-фрагментов от посторонних примесей проводили колоночным набором «АртДНК MiniSpin гель» (ООО «АртБиоТех», Беларусь) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

Секвенирующую реакцию проводили с праймерами, указанными выше, по подобранному протоколу:

- I этап — 96 °С — ∞;
- II этап — 30 циклов: 96 °С — 20 с, 55 °С — 20 с, 60 °С — 4 мин;
- III этап — 4 °С — ∞.

Прямое секвенирование нуклеотидных последовательностей межгенного ITS- региона проводили на генетическом анализаторе GenomeLab GEXP («Beckman Coulter», США) с использованием набора для секвенирования согласно рекомендациям фирмы-производителя. Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы Lfr-a 130 («Beckman Coulter», США).

Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с доступными последовательностями из базы данных GeneBank проводили с помощью программы BLASTN 2.3.1 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты и обсуждение

В данной работе в качестве материала для исследования были использованы чистые культуры возбудителей парши яблони и груши и смывы с пораженных плодов данных культур. Чистые культуры возбудителя парши яблони *V.inaequalis* были получены с сортов Лучезарное и Мечта, парши груши *V.pirina* — с сортов Велеса, Восточная золотистая, Десертная росошанская, Красавица Черненко.

Проведена первичная идентификация возбудителей парши яблони и груши по совокупности морфо-культуральных признаков (рис.1, 2). Установлено, что изоляты, выделенные с яблони, относятся к виду *V.inaequalis*, с груши — к виду *V.pirina*.

Проведение первичной морфологической оценки возбудителей со смывов было затруд-



Рис. 1. 30-дневные колонии изолята *V.inaequalis* на питательной среде Чапека (а) и конидии гриба (б)

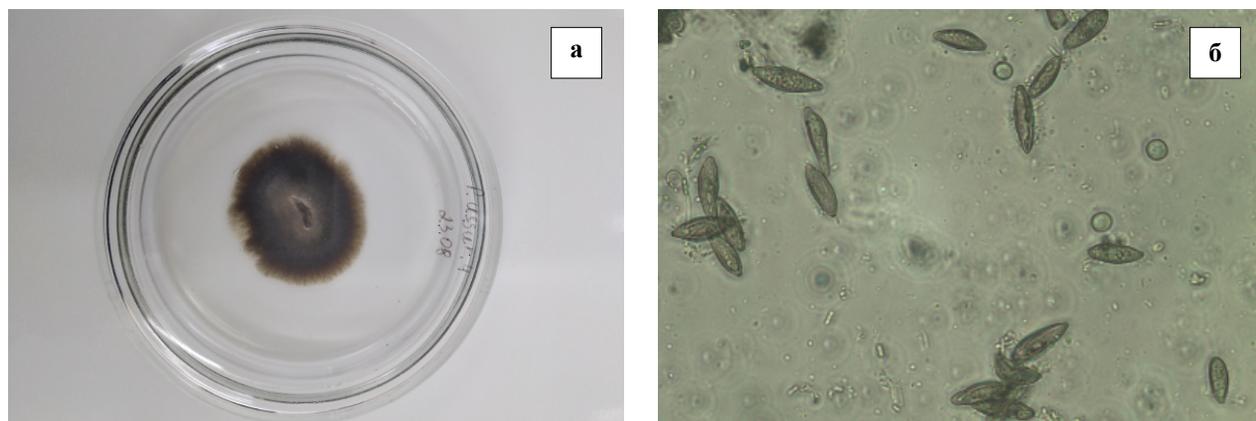


Рис. 2. 30-дневные колонии изолята *V. pirina* на питательной среде Чапека (а) и конидии гриба (б)

нительным ввиду наличия нескольких культур в подготовленных образцах.

ДНК выделяли из чистой культуры гриба и со смывов плодов. Использовали колоночный набор «АртДНК MiniSpin» в сочетании с инкубированием в сорбирующем и лизирующем растворах в течение двух часов. Детекция результатов экстракции показала высокое содержание ДНК в пробах как при выделении из чистых культур, так и со смывов плодов. А именно — отношение 260/280, используемое для определения чистоты ДНК, составило 1,8–1,9, а отношение 260/230 — 2,0–2,2 (табл. 1).

Полученные препараты ДНК со смывов и из чистых культур были использованы для постановки ПЦР. В результате ПЦР грибной ДНК с парами праймеров ITS1 и LR3, NS1 и NS4 были получены продукты амплификации размером около 1200 п. н., в реакции с парой праймеров ITS1 и LR5 — около 1400 п. н.

Для проведения точной идентификации грибов-возбудителей парши на молекулярно-генетическом уровне были использованы фрагменты ДНК, полученные из чистых культур.

Сравнение полученных в результате секвенирования нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации с базой данных GeneBank показало, что исследованные изоляты, полученные из чистых культур, являются представителями сумчатых грибов рода *Venturia*. В результате было установлено, что последовательности, полученные при применении пар праймеров ITS1 и LR3, NS1 и NS4, были недостаточно информативны для четкого разделения близкородственных видов рода *Venturia* Ces. et De Not. (последовательности представлены на рис. 5). А именно — степень сходства регионов выделенного гриба с имеющимися в базе *V. pirina*, *V. nashicola* и *V. inaequalis* составила 95–99%, 96–97% и 81–83% соответственно.

Таблица 1

Детекция результатов экстракции ДНК в пробе

Объекты	Выделение ДНК грибов из чистых культур		ДНК нг/мкл	Выделение ДНК грибов со смывов плодов		ДНК нг/мкл
	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀		A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	
Яблоня Лучезарное	1,906	2,089	283	1,864	2,000	105
Яблоня Мечта	1,874	2,000	89	1,799	1,987	300
Груша Велеса	1,887	2,052	100	1,764	2,190	197
Груша Восточная золотистая	1,981	1,945	51,5	1,802	1,963	25
Груша Десертная росошанская	1,897	2,018	27,5	1,895	2,246	97
Груша Красавица Черненко	1,882	1,971	104	1,938	2,010	45

Так, изолят 13XIII, выделенный с сорта груши Велеса и идентифицированный по морфо-культуральным признакам как *V.pirina*, на молекулярно-генетическом уровне проявил высокий процент сходства (99%) как с *V.pirina*, так и с *V.inaequalis*. Изолят 19XIX, выделенный с сорта яблони Мечта, показал сходство с *V.inaequalis* и *V.pirina*, хотя ранее при идентификации традиционными методами был определен как возбудитель парши яблони. А изоляты 11f/11r от *P.pyrifolia* сорта Восточная золотистая и 14 f/14r от

P.ussuriensis сорта Десертная росошанская проявили высокий процент сходства с *V.nashicola* и *V.pirina* (табл. 2). Анализ более длинной последовательности кластера рибосомных генов *ITS1–LR5* также не дал желаемых результатов, так как поиск гомологий был затруднен отсутствием достаточного количества референсных последовательностей, депонированных в Genbank.

Таким образом, в ходе проведенного исследования с применением пар праймеров ITS1 и LR3, NS1 и NS4, ITS1–LR5 удалось иденти-

а CATCCTAGCAGAGCGCGAACCTCGTGTCCGGGCTGGCCGCATGGCACGCCGGGCTATAACACCTCCCCGAGGGGAGGCCACG
TGTCCCGCCGCTTTATCCGGCCGCCAAACCGATGCTGGCCGTGACCGCGGAAGAGTGACCCCGCCAAAAGCGGGGTGAGCAACCG
CGGGCAAGTCTGGCCGCAAGCGCTTCCSTTTCAACAATTCACGTACTTTTTAACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCACTTTTCGATCACT
CTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCGGTATTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCAATTTAGAGCTGCATTTCCAAACAACCTCGACTC
GTCGAAGGAGTTTACAGCGGGGGGACCGACGGCCAGGTACGGGGTTTCAACCCTATGACGTCTGTTCCTCAAGGGACTTGGACC
GTGGCTTACCCGAAACATCTCTGCAAATTACAACCTGGGCTTGCGCCAGATTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCCGTTA
CTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTTCTTTCCCTCGCTTATTGATATTGCCTTAAAGTTTTCAAGCCGGGGTTA

б TTATCTCCCCCAGAACCCAAAACTTTGATTTCTCGATAAGGTGCCGAGCGAGTCAAGATAGTAACATCGCCCGATCCCTAGT
CGGCATAGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATACCCCTAATTGTCGTGTTCACTGATTAATGAAAACATCCTT
GCGCAAATGCTGTTTCGACAGTAGTTAGTCTTCAATAAATCCAAGAAATTCACCTCTGACAATGTGAATACTGATGCCCCGACTATCCCTA
TTAATCATTACGGCTTCACTAGAAAACCAACAAAATAGAGAAAGCCGTCTATTGCATATTATGGCCATGGCTAATGTATACGAGCAA
GGCCTGCTGTTGAACACTCTAATGATTTGCAAAGTAAAAGTCTGGGTTCCCCAGCACACCCAGTGAAGGGGCATGCGGATCACCCA
GTGATGCTAAGGGCCCCGGCCGGAAACCATGTTGTCACTGCCGGATTGTAGGGCTGAGAACCCCGGAACCAATCCCCCAATTG
ATCCCCCAAAAAAATATCCAAAACT

Рис. 5. Нуклеотидные последовательности изолятов *V.pirina* 11f/11r и 5V, полученные в результате секвенирования ITS-региона: а — сиквенс, полученный при применении пары праймеров ITS1 и LR3; б — сиквенс, полученный при применении пары праймеров NS1 и NS4

Таблица 2

Результаты идентификации возбудителей парши яблони и груши различными методами

№ изолята	Растение – хозяин	Видовая принадлежность по морфо-культуральным признакам	Праймеры	Видовая принадлежность по результатам молекулярно-генетического анализа и процент сходства с последовательностями из базы данных Genbank
13XIII	<i>P.communis</i> var. Велеса	<i>Venturia pirina</i>	NS1/NS4	<i>Venturia pirina</i> isolate ATCC38995(EF114739.1) — 99% <i>Venturia asperata</i> isolate ATCC 34052 (EF114736.1) — 99%
5V	<i>P.communis</i> var. Красавица Черненко	<i>Venturia pirina</i>	NS1/NS4	<i>Venturia pirina</i> isolate ATCC38995(EF114739.1) — 95% <i>Venturia inaequalis</i> isolate ATCC 60070 (EF114737.1) — 94%
12R	<i>M.x domestica</i> var. Лучезарное	<i>Venturia inaequalis</i>	NS4	<i>Venturia inaequalis</i> isolate ATCC 60070 (EF114737.1) — 83% <i>Venturia pirina</i> isolate ATCC38995 (EF114739.1) — 83%

Продолжение табл. 2

№ изолята	Растение – хозяин	Видовая принадлежность по морфо-культуральным признакам	Праймеры	Видовая принадлежность по результатам молекулярно-генетического анализа и процент сходства с последовательностями из базы данных Genbank
19XIX	<i>M.x domestica</i> var. Мечта	<i>Venturia inaequalis</i>	NS1/NS4	<i>Venturia inaequalis</i> isolate ATCC 60070 (EF114737.1) — 81% <i>Venturia pirina</i> isolate ATCC38995(EF114739.1) — 81%
11f/11r	<i>P.pyrifolia</i> var. Восточная золотистая	<i>Venturia pirina</i>	ITS/LR3	<i>Venturia nashicola</i> strain CBS 793.84 (EU035465.1) — 97% <i>Venturia pirina</i> strain CBS331.65 (EU035469.1) — 97%
14f/14r	<i>P.ussuriensis</i> var. Десертная россошанская	<i>Venturia pirina</i>	ITS/LR5	<i>Venturia nashicola</i> strain CBS 793.84 (EU035465.1) — 96% <i>Venturia pirina</i> strain CBS331.65 (EU035469.1) — 96%

фицировать гриб *Venturia* до рода. Сложность видовой идентификации грибов данного рода обусловлена недостаточным для сравнения количеством нуклеотидных последовательностей, представленных в GeneBank. Поэтому необходим поиск и разработка дополнительных методов идентификации (табл. 2).

Заключение

Метод секвенирования рибосомальной ДНК в идентификации грибов дает высокую результативность в определении родовой принадлежности.

В результате данного исследования была проанализирована ITS-область грибов рода *Venturia* Ces. et De Not местных изолятов возбудителей парши яблони и груши, а именно — регионы малой субъединицы 5.8S, большой субъединицы 28S и малой субъединицы у мицелиальных грибов 18S, где был установлен 81–99% сходства с базовыми вариантами. Несмотря на то, что анализ проводился с несколькими парами праймеров по нескольким участкам, охватывающим в конечном счете полный ITS- и частично NS-регионы рибосомального кластера, четкие различия нуклеотидных последовательностей *V.pirina*, *V.nashicola* и *V.inaequalis* не были выявлены, что свидетельствует о невозможности разделения этих близкородственных видов, используя данные праймеры. Для дальнейшего исследования необходима разработка более специфических методов идентификации.

Работа выполняется в рамках ГПНИ «Качество и эффективность агропромышленного производства» на 2016–2020 годы (подпрограмма «Земледелие и селекция») по заданию 6.50: Выявление морфологической и генетической структуры популяций грибов рода *Venturia* — возбудителей парши семечковых культур.

Список использованных источников

1. Арефьев, В. А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов / В. А. Арефьев, Л. А. Лисовенко; под ред. Л.И. Патрушев. — М.: Изд-во ВНИРО, 1995. — 407 с.
2. Юрченко, Е. О. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК: практическое руководство / Е. О. Юрченко, М. Г. Синявская; Ин-т эксперим. Ботаники НАН Беларуси. — Минск: Право и экономика, 2007. — 101 с.
3. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRna / С. А. Jasalavich [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. — 2000. — Vol. 66, № 11. — P. 4725–4734.
4. Tanaka, S. Taxonomy of the causal fungus of Japanese pear scab: Studies in pear scab II / S. Tanaka, S. Yamamoto // Annals Phytopathol. Soc. Jpn. — 1964. — Vol. 29. — P. 128–136.
5. Langford, M.H. Heterothallism and variability in *Venturia pirina* / M.H. Langford, E.N. Keitt // Phytopathology. — 1942. — Vol. 32. — P. 357–369.

6. Abe, K. Inheritance of resistance to pear scab from European pears to Asian pears / K. Abe, K. Kotobuki [et al.] // Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. – 2000. – Vol. 69. – P. 1–8.
7. Schnabel, G. Characterization of ribosomal DNA from *Venturia inaequalis* and its phylogenetic relationship to rDNA from other tree-fruit *Venturia* species / G. Schnabel [et al.] // Phytopathology. – 1999. – Vol. 89. – P. 100–108.
8. Shabi, E. Physiological races of *Venturia pirina* on pear / E. Shabi [et al.] // Phytopathology. – 1973. – Vol. 63. – P. 41–43.
9. Ishii, H. *Venturia nashicola*, the scab fungus of Japanese and Chinese pears: A species distinct from *V. pirina* / H. Ishii, H. Yanase // Mycol. Res. – 2000. – Vol. 104. – P. 755–759.
10. Le Cam, B. Specific polymerase chain reaction identification of *Venturia nashicola* using internally transcribed spacer region in the ribosomal DNA / B. Le Cam [et al.] // Phytopathology. – 2001. – Vol. 91. – P. 900–904.
11. Курдюк, Т. П. Внутривидовая неоднородность *Venturia pirina* Aderh.- возбудителя парши груши / Т. П. Курдюк // Плодоводство: межвед. темат. сб. / Белорус. Науч.-исслед ин-т картофелеводства и плодоовощеводства; гл. ред.: В. А. Самусь. – Минск, 1989. – Вып. 7. – С. 39–45.
12. Курдюк, Т. П. Конкурентная способность штаммов *Venturia pirina* Aderh. в связи с селекцией груши на устойчивость к парше / Т. П. Курдюк // Плодоводство: науч. тр. / Белорус. науч.-исслед ин-т плодоводства; гл. ред.: В. А. Самусь. – Минск, 1993. – Т. 8. – С. 79–87.
13. Козловская, З. А. Внутривидовая неоднородность *Venturia inaequalis*-возбудителя парши яблони / З. А. Козловская, Т. А. Гашенко // Вестн. Бел. гос. с.-х. акад.: Земледелие, селекция, растениеводство. – 2009. – № 4. – С. 97–100.
14. Коновалова, Н. А. Биологическая специализация возбудителя парши яблони в Белорусской ССР: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: / Н. А. Коновалова. – Самохваловичи, 1977. – 24 с.
15. Гашенко, Т. А. Исходный материал яблони для создания высокопродуктивных сортов, сочетающих устойчивость к парше и высокое качество плодов: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Т. А. Гашенко. – Самохваловичи, 2009. – 132 с.
16. Бондарцев, А. С. Шкала цветов / А. С. Бондарцев. – М.; Л., 1954. – 27 с.
17. Хохряков, М. К. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов / М. К. Хохряков. – Ленинград: ВИЗР, 1974. – 69 с.

T. M. Martsinkevich¹, T. A. Hashenka¹, Z. A. Kazlouskaya¹, J. G. Kandratsenak¹, S. K. Laziuk²

USING ITS REGION IN THE RIBOSOMAL DNA TO IDENTIFY PATHOGENES OF THE GENUS *VENTURIA* CES.ET DE NOT

¹Institute for Fruit Growing of NASB

Samokhvalovichy, Minsk reg., 223013, the Republic of Belarus

²State University «Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology»
of the Ministry of Health of the Republic of Belarus
Minsk, 220114, the Republic of Belarus

This article presents the results obtained using the internal transcribed spacer (ITS) region to the study of fungi of the genus *Venturia* spp. The ribosomal DNA sequencing method proved itself as highly efficient in the identification of ascomycetes of the genus *Venturia* Ces. et De Not. A degree of similarity between the regions of a fungus we isolated and of *V. pirina*, *V. nashicola* and *V. inaequalis* present in the database was 95–97%, 96–97% and 81–83% respectively. The study also found that the species identification of *Venturia* genus representatives requires the use of more specific identification methods.

Key words: ITS region, identification, *Venturia* spp., pear, apple.

Дата поступления статьи: 16 июля 2019 г.

Л. В. Можаровская, С. В. Пантелеев, О. Ю. Баранов, В. Е. Падутов

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ ПАТОГЕН-ИНДУЦИРОВАННЫХ ГЕНОВ ПРОРОСТКОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

Институт леса НАН Беларуси

Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71

e-mail: milamozh@yandex.by

На основе данных высокопроизводительного секвенирования транскриптомов проростков сосны обыкновенной в условиях заражения микромицетом *Fusarium* sp идентифицированы патоген-индуцибельные гены, характеризующиеся наибольшим уровнем экспрессионной активности, кодирующие белки, ассоциированные с патогенезом, PR-4 и PR-10, тауматин и противогрибковые тауматин-подобные белки, лейцин-насыщенные рецепторподобные протеинкиназы, глицин-насыщенные РНК-связывающие белки, а также белок-шаперон HSP40S. Полученные данные относительно структуры и спектра генов, вовлеченных в защитные механизмы, позволяют в дальнейшем использовать их в качестве маркеров для генотипирования растений на признак индуцированной устойчивости к инфекционным заболеваниям.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, высокопроизводительное секвенирование, транскриптом, гены устойчивости, антимикробные пептиды, фитопатогенные организмы.

Введение

Инфекционные болезни растений представляют собой сложные патологические комплексы и рассматриваются в настоящее время как совокупность биотических элементов, находящихся в топических и трофических отношениях и формирующих определенную экологическую систему. Как правило, основой формирования большинства патосистем является взаимодействие двух диаметрально противоположных экологических стратегий, степень реализации каждой из которых определяет итоговый результат сосуществования хозяина и патогена. В то же время, как отмечает ряд исследователей, в патосистемах зачастую выявляется и определенная взаимная координация физиологических процессов, что обеспечивает пролонгированность во времени существования системы организмов в рамках их онтогенетического развития [1]. Наряду с диагностируемыми морфолого-анатомическими изменениями тканей и органов инфицированных растений, значительные изменения могут затрагивать и метаболомы индивидов, что, как правило, обусловлено физиологической интеграцией организмов, представленных в патосистемах. Особенности формирования

метаболома патологического типа зачастую обусловлены таксономической принадлежностью видов (как хозяев, так и паразитов), представленных в патосистемах, характером паразитической специализации (облигатные, факультативные), физиологическим статусом и стадией онтогенеза растения-хозяина, генетическими детерминантами биотических элементов патоконспекса [2].

Среди молекулярно-генетических подходов, позволяющих выполнять сравнительную оценку метаболически различающихся патосистем, транскриптомный анализ в настоящее время характеризуется наибольшей информативностью и прогностической ценностью. С одной стороны, данный подход позволяет охарактеризовать полный перечень генов, ассоциированных с патогенезом (как растений-хозяев, так и паразитов), а с другой — дает возможность проводить молекулярно-генетическую «паспортизацию» физиологического статуса каждого элемента, представленного в патосистеме [3].

Гены, определяющие защитные реакции растительных организмов, можно разделить на несколько групп по типам детерминируемых факторов резистентности: формирование

механического (биосинтез элементов клеточной стенки, покровных тканей и структур, и др.) и химического (выработка веществ биоцидного действия) барьеров, физиологических реакций (реакция сверхчувствительности). Кроме того, не менее важным аспектом является учет косвенных, по отношению к признаку резистентности, детерминант, определяющих анаболическую и катаболическую устойчивость, морфолого-анатомические особенности и способных в значительной степени определять формирование и проявление защитных свойств организмов [4, 5].

Последние достижения в области секвенирования генома привели к значительному прогрессу в исследованиях различных количественных и качественных признаков древесных растений, ассоциированных с устойчивостью к негативным биотическим факторам [6]. Проведенный анализ структурно-функциональной организации генома лесных древесных растений позволил выявить широкий спектр генетических механизмов, формирующих индуцированный ответ у растений-хозяев на проникновение патогенной микрофлоры и более сложный характер взаимодействия на молекулярном уровне в патосистемах по сравнению с традиционной моделью «ген на ген», предложенной Гарольдом Флором.

На текущий момент генетическая детерминация факторов резистентности была установлена для различных патосистем древесных растений: *Pinus* sp. — *Cronartium* sp., *Eucalyptus* — *Puccinia* (Junghans et al. 2004), *Populus* sp. — *Melampsora* sp. (Newcombe et al. 1996) и др. [7–9]. Так, например, транскриптомный анализ патосистемы *Populus* sp. — *Melampsora* sp. показал, что защитные механизмы растения-хозяина, как правило, иницируются специфическими для тополя сигнальными системами и выражаются в накоплении мРНК, кодирующих PR-белки, глутатион-S-трансферазу (GST) и белок RISP, индуцируемый патогеном *Melampsora* sp. [10]. Исследования по картированию PR-генов лесообразующих пород позволили установить существенный вклад как аддитивной, так и неаддитивной генетической изменчивости в формировании устойчивости древесных видов к возбудителям заболеваний, что является подтверждением гипотезы о комплексной природе

взаимодействия локусов, ассоциированных с резистентностью, и тем самым предопределяет высокий потенциальный эффект от проведения клоновой селекции, в ходе которой может быть отобрано значительное число хозяйственно-значимых генетических комбинаций [11, 12].

Следует подчеркнуть, что особую актуальность направление генетического анализа патосистем приобрело в последнее время, в связи с наблюдающимися негативными процессами, протекающими в лесных экосистемах в различных странах мира, обусловленных вспышками насекомых-вредителей и фитопатогенных микроорганизмов. При этом, как отмечает ряд исследователей, прогнозируемые климатические изменения в ближайшем будущем могут привести к еще большему снижению устойчивости лесных ценозов и, как следствие, увеличению числа и площади очагов болезней и вредителей.

Исходя из всего вышесказанного видно, что проведение мероприятий по отбору устойчивых к заболеваниям форм и генотипов деревьев является одним из приоритетных направлений лесной селекции. Среди генетических маркеров наиболее ценными в селекционном плане являются локусы с индуцированным (на биотическое воздействие) характером экспрессии, поскольку конститутивные гены, как правило, находятся под прямым действием отбора и зачастую характеризуются низким уровнем полиморфизма. В то же время реализация наследственной информации патоген-индуцированных генов в большинстве случаев зависит от степени воздействия комплекса внешних факторов.

Исследования, проведенные нами ранее, позволили идентифицировать перечень конститутивных генов, ассоциированных с факторами резистентности по отношению фитопатогенным организмам, а также провести анализ уровня их экспрессии при различных температурных условиях [14, 15].

Целью текущей работы являлось выявление и описание патоген-индуцированных генов сосны обыкновенной, детерминирующих защитные механизмы на стадии проростков, на примере фузариоза (инфекционного полегания семян) — заболевания, вызываемого различными видами некротрофных микромицетов рода *Fusarium*.

Материалы и методы

План проведения эксперимента включал в себя посев и выращивание семян сосны обыкновенной в контролируемых условиях (фитотроне) с последующим заражением возбудителем фузариоза (*Fusarium* sp.). Условия культивирования растений: торфо-песчаный субстрат, T = 22 °C, относительная влажность субстрата 60%. Создание избыточного инфекционного фона достигалось поэтапным внесением инокуляма гриба в субстрат (5 мг мицелия на 100 см² площади субстрата): перед посадкой семян, на 7 и 14 день после появления всходов. В качестве инокуляма использовали культуру *Fusarium* sp., идентифицированного и выделенного из семян с признаками инфекционного полегания (лесной питомник ГЛХУ «Брестский лесхоз»). В условиях опыта семена (n = 15) с симптомами инфекционного полегания (увядание, наличие воздушного налета мицелия вокруг стволика) изымали из почвы, очищали и использовали в качестве экспериментального материала (ткани корня и гипокотыля) для получения препаратов мРНК. Высокопроизводительное секвенирование и анализ транскриптомов выполняли на базе Ion PGM Torrent (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколам, изложенным в предыдущих исследованиях [14, 15]. Нормализацию уровней экспрессии генов исследуемых транскриптомов проводили относительно одного миллиона прочтений — рассчитывали величину RPM (от англ. reads per million, RPM — прочтений на миллион) [16].

Результаты и обсуждение

В ходе аннотации в базе данных консервативных доменов (CDD) GeneBank NCBI кодирующих последовательностей, полученных на основании процессинга и анализа результатов секвенирования транскриптомов семян сосны обыкновенной, было идентифицировано 2209 типов функциональных и структурных полипептидов. Для поиска и идентификации индуцибельных генов, ассоциированных с устойчивостью, было отобрано 150 EST-локусов, характеризующихся наибольшим уровнем экспрессии и, соответственно, наивысшими значениями показателя количества прочтений на транскрипт. Структурно-функциональная принадлежность и оценка дифферен-

циальной экспрессии изученных EST-локусов проростков сосны обыкновенной относительно одного миллиона прочтений RPM приведена в электронном ресурсе <https://mega.nz> [16].

Проведенный анализ экспрессируемых последовательностей, представленных в транскриптомах инфицированных семян сосны обыкновенной, показал, что наряду с описанными нами ранее конститутивными генами, кодирующими защитные белки SS/AF, AMP, DEF, GH19, LEA, DHN, CBP, PSACRE, HSP70, HSP90, выявлен обширный спектр локусов, детерминирующих структурные и функциональные полипептиды, вовлеченные в индуцированные механизмы защиты растений [13, 14, 17]. Описание выявленных патоген-индуцированных генов, ассоциированных с защитными реакциями, приводится ниже.

Одними из наиболее представленных транскриптов в анализируемых патосистемах явились последовательности (10 локусов), кодирующие белки семейства PR-10. Наибольший уровень генетического сходства (90–97%) идентифицированных локусов был выявлен с депонентами GenBank HM210088.1 и AY064202.1, относящимися к генам семейства PR-10 *Pinus pinaster* и *P. monticola* соответственно. Согласно литературным данным, белки семейства PR-10 идентифицированы у значительного числа видов растений, включая также и хвойные породы [18–20]. Защитные свойства PR-10-белков, как правило, ассоциированы с их рибонуклеазной активностью и, как следствие, способностью подавлять рост патогенов [21, 22]. Индуцибельный характер экспрессии генов семейства PR-10 был продемонстрирован на примере формирования защитных реакций, вызванных воздействием различных негативных биотических и абиотических факторов, таких как фитопатогенная инфекция [23, 24], ультрафиолетовое излучение [25], холодостресс [24, 26, 27] и др. Так, в работе Аб. Экрамоддулы и Р. Ханта на модельных объектах продемонстрирован эффект интенсивного накопления PR-10-белков в инфицированных тканях древесных растений [28].

Также в исследуемых нами транскриптомах диагностировано 16 последовательностей, содержащих функциональный домен pfam00314 белков семейства тауматинов и cd09217 подсемейства противогрибковых тауматин-подобных

белков TLP-P, относящихся к суперсемейству 64 гликозидгидролаз и тауматин-подобных белков GH64-TLP-SF. Анализ сходства нуклеотидных последовательностей для транскриптов, отнесенных к семейству тауматинов, показал высокий уровень их консервативности. Так, например, сходство с последовательностями из базы данных нуклеотидных последовательностей GeneBank NCBI для контигов № 355, 702, 957 составило 91–95% с последовательностями генов тауамин-подобных белков L4 (TLP-L4) *P. monticola* (депонент GenBank GQ329662.1); контигов № 697 и 776 — 84% и 92% с генами тауамин-подобных белков L2 (TLP-L2) *P. monticola* (депонент GenBank GQ329660.1); контига № 1814 — 96% с последовательностью гена, кодирующего тауамин-подобный белок L3 *P. monticola* (депонент GenBank GQ329661.1); контига № 1547 — 98% с транскрибируемой последовательностью *P. taeda* (депонент GenBank JQ015853.1). Проведенный сравнительный анализ выявленных генов тауматин-подобных белков сосны обыкновенной также показал высокий уровень их консервативности в пределах рода *Pinus* — степень сходства с аналогичным локусом TLP *P. massoniana* (депонент GenBank KM063439.1) составила 97–99 %.

В соответствии с существующей международной классификацией, тауматин-подобные белки растений (TLP) относятся к семейству PR-5-белков и широко представлены в протеомах растений, подверженных воздействию стрессовым факторам абиотической (пониженные температуры, засуха, засоление) и биотической природы [29]. Так, например, при исследовании патосистемы *Populus* sp. — *Melampsora* sp., в листьях тополя выявлено значительное накопление транскриптов TLP в местах локализации инфекции *Melampsora* sp. — возбудителя обыкновенной ржавчины [30]. Для хвойных видов на примере *P. monticola* также был продемонстрирован индуцированный защитный ответ, основанный на гиперэкспрессии тауматин-подобных белков в ответ на заражение фитопатогенным грибом *Cronartium ribicola* [31]. Кроме того, различными авторами описана антигрибковая активность TLP по отношению к патогенным грибам рода *Fusarium* [32–34]. Согласно современным биохимическим данным, основой

фунгицидных свойств TLP-белков является их гидролитическая активность, направленная на разрушение полисахаридных компонентов клеточной стенки грибов [35, 36].

Высокий уровень экспрессии у изученных транскриптомов семян сосны обыкновенной был выявлен и для гена, детерминирующего белок семейства глутатион-S-трансфераз (GST), подсемейства класса Тау. Ферменты с глутатион-S-трансферазной активностью (EC 2.5.1.18) являются многофункциональными белками и кодируются значительным числом семейств генов, классифицируемых на основе идентичности нуклеотидных последовательностей. В настоящее время выделяют пять основных групп — *phi*, *tau*, *theta*, *zeta* и *lambda*, которые главным образом детерминируют реакции каталитической конъюгации внутриклеточного глутатиона (GSH) с широким спектром электрофильных, цитотоксических и генотоксических молекул эндогенного или экзогенного происхождения [37]. Семейства генов *phi* и *tau* присутствуют только у растений, и их основными физиологическими функциями являются формирование механизмов детоксикация ксенобиотиков и защиты клеток от различных биотических и абиотических стрессовых факторов, таких как фитопатогены, токсины тяжелых металлов, окислительные агенты и ультрафиолетовое излучение [38–41]. Вследствие высокого разнообразия потенциальных ксенобиотиков и стрессовых факторов функциональная дивергенция семейств генов *GST* имеет большое адаптивное значение [42]. Так, в исследовании Тинг Лана с соавторами показаны направления филогенетической дивергенции семейств генов *GST* по сайтам связывания субстрата и формированию новых каталитических функций, что играет немаловажную роль в повышении системной устойчивости растений к абиотическому и биотическому стрессу [43–45]. Среди хвойных видов рода *Pinus* структурно-функциональная организация пептидов глутатион-S-трансфераз детально исследована для сосны красной китайской *P. tabulaeformis*.

Среди индуцибельных PR-генов нами были идентифицированы локусы семейства белков PR-4, содержащих консервативный C-концевой домен Barwin (pfam00967), состоящий из шести остатков цистеина, объединенных тремя

внутримолекулярными дисульфидными связями. Как и в случае PR-10-белков, семейство PR-4 характеризуется рибонуклеазной активностью, определяющей ее фунгицидные свойства [46–51]. В качестве примера работ по изучению защитных свойств PR-4-белков можно привести статью М. А. Ислама с соавторами, посвященную изучению устойчивости семян *Pseudotsuga menziesii* к корневой гнили (*Phellinus sulphurascens*). В данном исследовании продемонстрирован повышенный уровень экспрессии PR-4-генов у резистентных растений, что указывает на важную роль PR-4-белков как фактора резистентности по отношению к некротрофным грибам [51].

Еще одной идентифицированной группой наследственных факторов устойчивости явились локусы, детерминирующие белки с лейцин-насыщенными повторами (LRR), большая часть из которых относилась к рецептор-подобным протеинкиназам с лейцин-насыщенным доменом LRR-RLK (cl33413). Кроме того, нами были идентифицированы последовательности, содержащие домен, аннотированный как PLN03210, определяющий устойчивость растений к *Pseudomonas syringae* (в частности, характерный для рецепторов класса TIR-NBS-LRR *Arabidopsis thaliana*) [52]. LRR-RLK представляют собой самую разнообразную группу рецептороподобных киназ у растений, играют важную роль в индуцировании ответных реакций на стресс, опосредуя сигнальные трансдукции в клетках [53]. Согласно литературным данным, LRR-RLK являются многофункциональными — кроме выполнения защитных функций, они участвуют во многих других физиологических процессах, включая рост и развитие растений [54–58].

Кроме генов лейцин-насыщенных белков, в транскриптомах зараженных семян соевых обыкновенной были диагностированы мРНК семейства глицин-насыщенных белков (pfam07172), а также глицин-насыщенных РНК-связывающих белков GRP (PLN03134). РНК-связывающие белки регулируют экспрессию генов главным образом на посттранскрипционном уровне, который включает сплайсинг пре-мРНК, нуклеоцитоплазматический транспорт мРНК, стабильность и распад мРНК и трансляцию [59]. Глицин-насыщенные РНК-связывающие белки содержат

мотив узнавания РНК (RRM) на N-конце и глицин-богатую область на C-конце [60, 61]. Присутствие GRP у различных видов растений и их ключевая роль в адаптации организмов к биотическим и абиотическим стрессам, включая те, которые возникают в результате патогенеза, изменений в осмотической, физиологической и окислительной среде и изменений температуры, подробно описана в ряде исследований [61–65]. Предположительно РНК-связывающие глицин-насыщенные белки являются основными молекулярными компонентами посттранскрипционной регуляции генов, изменяя их экспрессию путем модификации альтернативного сплайсинга, экспорта мРНК, трансляции мРНК и деградации мРНК, при этом их функционирование регулируется растительными гормонами [61].

Интересно отметить, что среди белков-шаперонов наибольшим уровнем экспрессии характеризовались транскрипты, содержащие домен DnaJ (pfam00226), идентифицированные также как белки-шапероны HSP40S. HSP40S является ко-шапероном системы HSP70, опосредуя его взаимодействие с измененным белком. Согласно литературным данным, HSP40 и HSP70 участвуют в механизмах защиты растений при микробном или вирусном патогенезе. Несмотря на то, что повышенная экспрессия HSP усиливает устойчивость растений к фитопатогенам, большинство механизмов данного ответа остаются невыясненными [66].

Для всех идентифицированных индуцибельных генов, ассоциированных с защитными реакциями растений к биотическому фактору *Fusarium* spp., нами были разработаны алгоритмы их анализа, включая оценку уровня экспрессии методом количественной ПЦР и типирования генетического полиморфизма.

Заключение

Использование наследственно-обусловленного устойчивого к фитопатогенным микроорганизмам посадочного материала является приоритетной задачей современного лесовосстановления, когда в силу наблюдающихся глобальных климатических изменений и широкого распространения различных патогенных организмов вопросы устойчивости насаждений стоят наиболее остро. В данном аспекте центральным звеном является

проведение селекционных мероприятий, направленных на поиск генотипов, характеризующихся пластичными индуцибельными механизмами устойчивости. В результате проведенного исследования для транскриптома проростков сосны обыкновенной идентифицированы гены, участвующие в индуцированном защитном ответе, которые кодируют белки, ассоциированные с патогенезом, PR-4 и PR-10, тауматин и противогрибковые тауматин-подобные белки, лейцин-насыщенные рецепторподобные протеинкиназы, глицин-насыщенные РНК-связывающие белки, а также белок-шаперон HSP40S. Полученные данные, относительно структуры и спектра генов, вовлеченных в защитные механизмы, позволяют в дальнейшем их использовать в качестве маркеров для генотипирования растений на признак индуцированной устойчивости к инфекционным заболеваниям.

Список использованных источников

1. Фундаментальная фитопатология: [монография] / [С. Ф. Багирова и др.] под ред. Ю. Т. Дьякова // Москва : КРАСАНД. – 2011. – 508 с.
2. Tugizimana, F. Metabolomic analysis of defence-related reprogramming in *Sorghum bicolor* in response to *Colletotrichum sublineolum* infection reveals a functional metabolic web of phenylpropanoid and flavonoid pathways / F. Tugizimana [et al.] // *Frontiers in plant science*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1840.
3. Vogel, C. The Arabidopsis leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health / C. Vogel, N. Bodenhausen, W. Gruissem, J. A. Vorholt // *New Phytologist*. – 2016. – Vol. 212, № 1. – P. 192–207.
4. Rasul, I. Genetic Basis for Biotic Stress Resistance in Plants from Solanaceae Family: A Review / I. Rasul [et al.] // *International Journal Of Agriculture And Biology*. – 2019. – Vol. 22, № 1. – P. 178–194.
5. Krattinger, S. G. Molecular genetics and evolution of disease resistance in cereals / S. G. Krattinger, B. Keller // *New Phytologist*. – 2016. – Vol. 212, № 2. – P. 320–332.
6. Plomion, C. Forest tree genomics: 10 achievements from the past 10 years and future prospects / C. Plomion [et al.] // *Annals of Forest Science*. – 2016. – Vol. 73, № 1. – P. 77–103.
7. Wilcox, P. L. Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping / P. L. Wilcox [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1996. – Vol. 93. – P. 3859–3864.
8. Junghans, D. T. Resistance to rust *Puccinia psidii* winter in Eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers / D. T. Junghans [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics Theor Appl Genet*. – 2004. – Vol. 108. – P. 175–180.
9. Newcombe, G. A major gene for resistance to *Melampsora medusa* f.sp. *deltoidae* in a hybrid poplar pedigree / G. Newcombe, H. D. Bradshaw, G. A. Chastagner, R. F. Stettler // *Phytopathology*. – 1996. – Vol. 86. – P. 87–94.
10. Duplessis, S. Poplar and pathogen interactions: insights from *Populus* genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling / S. Duplessis, I. Major, F. Martin, Seguin // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2009. – Vol. 28. – P. 309–334.
11. Jorge, V. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection / V. Jorge, A. Dowkiw, P. Faivre-Rampant, C. Bastien // *New Phytologist*. – 2005. – Vol. 167. – P. 113–127.
12. Alves, A. A. Genetic mapping provides evidence for the role of additive and non-additive QTLs in the response of inter-specific hybrids of Eucalyptus to *Puccinia psidii* rust infection / A. A. Alves // *Euphytica*. – 2012. – Vol. 183. – P. 27–38.
13. Можаровская, Л. В. Функциональная аннотация генов *Pinus sylvestris*, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенным микроицетам / Л. В. Можаровская // *Журнал Белорусского государственного университета. – Биология*. – 2018. – № 2. – С. 78–84.
14. Можаровская, Л. В. Сравнительный анализ транскрипционных профилей проростков сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) различающихся температурными условиями выращивания / Л. В. Можаровская // *Проблемы лесоведения и лесоводства: Сб. науч. Трудов ИЛ НАН Беларуси. – Вып. 78. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2018. – С. 70–78.*
15. Aanes, H. Normalization of RNA-sequencing data from samples with varying mRNA lev-

- els / H. Aanes [et al.] // PloS one. – 2014. – Vol. 9, № 2. – P. e89158.
16. Приложение [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://mega.nz/#!a90knIpC!wKpA8q0Ees3LMisDe4qjr1s0coLwNW_H0bMnT5-bIH0. – Дата доступа: 16.08.2019.
17. Можаровская, Л. В. Структурно-функциональный анализ локусов, кодирующих антимикробные пептиды сосны обыкновенной / Л. В. Можаровская // Сборник научных трудов. Молекулярная и прикладная генетика. – 2018. – Т. 25. – С. 84–91
18. Ekramoddoullah, A. K. M. Challenges and opportunities in studies of host-pathogen interactions in forest tree species / A. K. M. Ekramoddoullah, R. S. Hunt // Canadian Journal of Plant Pathology. – 2002. – Vol. 24. – P. 408–415.
19. Dubos, C. Drought differentially affects expression of a PR-10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings / C. Dubos, C. Plomion // Journal of Experimental Botany. – 2001. – Vol. 52, № 358. – P. 1143–1144.
20. Liu, J. J. Characterization, expression and evolution of two novel subfamilies of *Pinus monticola* cDNAs encoding pathogenesis-related (PR)-10 proteins / J. J. Liu, A. K. M. Ekramoddoullah // Tree physiology. – 2004. – Vol. 24, № 12. – P. 1377–1385.
21. Bantignies, B. Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots / B. Bantignies [et al.] // Plant molecular biology. – 2000. – Vol. 42, № 6. – P. 871–881.
22. Филипенко, Е. А. PR-белки с рибонуклеазной активностью и устойчивостью растений к патогенным грибам / Е. А. Филипенко [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 17, № 2. – С. 326–334.
23. McGee, J. D. Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea* / J. D. McGee, J. E. Hamer, T. K. Hodges // Molecular Plant Microbe Interactions. – 2001. – Vol. 14. – P. 877–886.
24. Liu, J. J. Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold-hardening / J. J. Liu, A. K. M. Ekramoddoullah, X. Yu // Plant Physiology. – 2003. – Vol. 119. – P. 544–553.
25. Pinto, M. P. *Lupinus albus* L. pathogenesis-related proteins that show similarity to PR-10 proteins / M. P. Pinto, C. P. Ricardo // Plant Physiology. – 1995. – Vol. 109. – P. 1345–1351.
26. Ekramoddoullah, A. K. M. Characterization of a fall protein of sugar pine and detection of its homologue associated with frost hardiness of western white pine needles / A. K. M. Ekramoddoullah, D. Taylor, B. J. Hawkins // Canadian Journal of Forest Research. – 1995. – Vol. 25. – P. 1137–1147.
27. Ekramoddoullah, A. K. M. Detection and seasonal expression pattern of a pathogenesis-related protein (PR-10) in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) tissues / A. K. M. Ekramoddoullah, X. Yu, R. Sturrock, A. Zamani, D. Taylor // Plant Physiology. – 2000. – Vol. 110. – P. 240–247.
28. Ekramoddoullah, A. K. M. Challenges and opportunities in studies of host-pathogen interactions in forest tree species / A. K. M. Ekramoddoullah, R. S. Hunt // Canadian Journal of Plant Pathology. – 2002. – Vol. 24, № 4. – P. 408–415.
29. Liu, J. J. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function / J. J. Liu, R. Sturrock, A. K. M. Ekramoddoullah // Plant cell reports. – 2010. – Vol. № 5. – P. 419–436.
30. Petre, B. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar / B. Petre [et al.] // BMC plant biology. – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 33.
31. Liu, J. J. Expression profiling of a complex thaumatin-like protein family in western white pine / J. J. Liu, A. Zamani, A. K. M. Ekramoddoullah // Planta. – 2010. – Vol. 231, № 3. – P. 637–651.
32. Garcia-Casado, G. Characterization of an apoplastic basic thaumatin-like protein from recalcitrant chestnut seeds / G. Garcia-Casado [et al.] // Physiologia Plantarum. – 2000. – Vol. 110, № 2. – P. 172–180.
33. Chu, K. T. Isolation of a large thaumatin-like antifungal protein from seeds of the Kweilin chestnut *Castanopsis chinensis* / K. T. Chu, T. B. Ng // Biochemical and biophysical research communications. – 2003. – Vol. 301, № 2. – P. 364–370.
34. Campos, M. A. Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum* / M. A. Campos [et al.] // Microbial cell factories. – 2008. – Vol. 7, № 1. – P. 7.
35. Trudel, J. Several thaumatin-like proteins bind to β -1, 3-glucans / J. Trudel [et al.] // Plant physiology. – 1998. – Vol. 118, № 4. – P. 1431–1438.

36. Grenier, J. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β -1, 3-glucans / J. Grenier, C. Potvin, J. Trudel, A. Asselin // *Plant J.* – 1999. – Vol. 19. – P. 473–480.
37. Nutricati, E. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases / E. Nutricati [et al.] // *Plant cell reports.* – 2006. – Vol. 25, № 9. – P. 997–1005.
38. Loyall, L. Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures / L. Loyall [et al.] // *Plant Cell.* – 2000. – Vol. 12. – P. 1939–1950.
39. Kampranis, S. C. A novel plant glutathione S-transferase/ peroxidase suppresses Bax lethality in yeast / S. C. Kampranis [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 2000. – Vol. 275. – P. 29207–29216.
40. Mueller, L. A. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein / L. A. Mueller, C. D. Goodman, R. A. Silady, V. Walbot // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 123. – P. 1561–1570.
41. Agrawal, G. K. A pathogen-induced novel rice (*Oryza sativa* L.) gene encodes a putative protein homologous to type II glutathione S-transferases / G. K. Agrawal, N. S. Jwa, R. Rakwal // *Plant Science.* – 2002. – Vol. 163. – P. 1153–1160.
42. Lan, T. Structural and functional evolution of positively selected sites in pine glutathione S-transferase enzyme family / T. Lan, X. R. Wang, Q. Y. Zeng // *Journal of Biological Chemistry.* – 2013. – Vol. 288, № 34. – P. 24441–24451.
43. Zeng, Q. Y. Molecular characterization of a glutathione transferase from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) / Q. Y. Zeng, H. Lu, X. R. Wang // *Biochimie.* – 2005. – Vol. 87, № 5. – P. 445–455.
44. Lan, T. Structural and functional evolution of positively selected sites in pine glutathione S-transferase enzyme family/ T. Lan, X. R. Wang, Q. Y. Zeng // *Journal of Biological Chemistry.* – 2013. – Vol. 288, № 34. – P. 24441–24451.
45. Zeng, Q. Y. Catalytic properties of glutathione-binding residues in a τ class glutathione transferase (PtGSTU1) from *Pinus tabulaeformis* / Q. Y. Zeng, X. R. Wang // *FEBS letters.* – 2005. – Vol. 579, № 12. – P. 2657–2662.
46. Chung, S. Y. Molecular characterization of a PR4 gene in Chinese cabbage / Chung S. Y. [et al.] // *Integrative Biosciences.* – 2005. – Vol. 9, № 4. – P. 239–244.
47. Agrawal, G. K. Isolation of a novel rice PR4 type gene whose mRNA expression is modulated by blast pathogen attack and signaling components / G. K. Agrawal [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry.* – 2003. – Vol. 41, № 1. – P. 81–90.
48. Zhu, T. Molecular characterization of the rice pathogenesis-related protein, OsPR-4b, and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani* / T. Zhu, F. Song, Z. Zheng // *Journal of Phytopathology.* – 2006. – Vol. 154, № 6. – P. 378–384.
49. Li, X. A new pathogenesis-related protein, LrPR4, from *Lycoris radiata*, and its antifungal activity against *Magnaporthe grisea* / X. Li [et al.] // *Molecular biology reports.* – 2010. – Vol. 37, № 2. – P. 995.
50. Caporale, C. Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity / C. Caporale [et al.] // *FEBS Letters.* – 2004. – Vol. 575, № 1–3. – P. 71–76.
51. Islam, M. A. Molecular cloning and gene transcription analyses of barwin-type PR-4 genes from *Phellinus sulphurascens*-infected Douglas-fir seedlings / M. A. Islam, R. N. Sturrock, A. K. M. Ekramoddoullah // *Forest Pathology.* – 2012. – Vol. 42, № 4. – P. 279–288.
52. Kim, S. Resistance to the *Pseudomonas syringae* effector HopA1 is governed by the TIR-NBS-LRR protein RPS6 and is enhanced by mutations in SRFR1 / S. H. Kim [et al.] // *Plant physiology.* – 2009. – Vol. 150, № 4. – P. 1723–1732.
53. Shiu, S. H. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases / S. H. Shiu, A. B. Bleeker // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2001. – Vol. 98, № 19. – P. 10763–10768.
54. Schoof, H. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes / H. Schoof [et al.] // *Cell.* – 2000. – Vol. 100, № 6. – P. 635–644.
55. Agusti, J. Characterization of transcriptome remodeling during cambium formation identifies *MOL1* and *RUL1* as opposing regulators of secondary growth / J. Agusti, R. Lichtenberger, M. Schwarz, L. Nehlin, T. Greb // *PLoS Genetics.* – 2011. – Vol. 7, № 2. – P. e1001312.
56. Albrecht, C. The *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinases1 and 2

- control male sporogenesis / C. Albrecht [et al.] // *Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17, № 12. – P. 37–49.
57. Gomez-Gomez, L. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis* / L. Gomez-Gomez, T. Boller // *Mol Cell*. – 2000. – Vol. 5, № 6. – P. 1003–1011. – doi: 10.1016/S1097-2765(00)80265-8.
58. Zipfel, C. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation / C. Zipfel [et al.] // *Cell*. – 2006. – Vol. 125, № 4. – P. 749–760.
59. Simpson, G. G. Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organization of the spliceosomal machinery / G. G. Simpson, W. Filipowicz // *Plant Molecular Biology*. – 1996. – Vol. 32. – P. 1–41.
60. Burd, C. G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins / C. G. Burd, G. Dreyfuss // *Science*. – 1994. – Vol. 265. – P. 615–621.
61. Ciuzan, O. The evolutionarily conserved multifunctional glycine-rich RNA-binding proteins play key roles in development and stress adaptation / O. Ciuzan [et al.] // *Physiologia plantarum*. – 2015. – Vol. 153, № 1. – P. 1–11.
62. Simon, A. E. Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm / A. E. Simon // *Plant Physiology*. – 1994. – Vol. 104. – P. 1015–1025.
63. Ferullo, J-M. Differential accumulation of two glycine-rich proteins during cold-acclimation alfalfa / J-M. Ferullo [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 1997. – Vol. 33. – P. 625–633.
64. Aneeta, N. S.-M. Salinity- and ABA-induced up-regulation and light-mediated modulation of mRNA encoding glycine-rich RNA-binding protein from *Sorghum bicolor* / N. S.-M. Aneeta, N. Tuteja, S. K. Sopory // *Biochemical and Biophysical Research Communication*. – 2002. – Vol. 296. – P. 1063–1068.
65. Naqvi, S. M. S. A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following Tobacco Mosaic Virus infection in tobacco / S. M. S. Naqvi [et al.] // *Plant molecular biology*. – 1998. – Vol. 37, № 3. – P. 571–576.
66. Park, C. J. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity / C. J. Park, Y. S. Seo // *The plant pathology journal*. – 2015. – Vol. 31, № 4. – P. 323.

L. V. Mozharovskaya, S. V. Pantelev, O. Yu. Baranov, V. E. Padutov

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL ANNOTATION OF PATHOGEN-INDUCED GENES OF SCOTS PINE SEEDLINGS

Forest Research Institute of NASB
Gomel, 246050, the Republic of Belarus

Based on the data of high-throughput sequencing of Scots pine seedling transcriptomes under the conditions of *Fusarium* sp micromycete infection, pathogen-induced genes characterized by the highest level of their expression activity, coding proteins associated with pathogenesis, PR-4 and PR-10, thaumatin and antifungal thaumatin-like proteins, leucine-saturated receptor-like protein kinases, glycine-saturated RNA-binding proteins, as well as the chaperone protein HSP40S were identified. The data obtained regarding the structure and a spectrum of genes involved in defense mechanisms allow to use them as markers in plant genotyping for induced resistance traits to infectious diseases.

Key words: Scotcs pine, high-throughput sequencing, transcriptome, resistance genes, phytopathogenic organisms.

Дата поступления статьи: 31 августа 2019 г.

Р. И. Шейко

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ И МЕТОДЫ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВИНИНЫ

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

Изучены биохимические показатели крови и генетическая структура животных мясных генотипов по генам *RYR-1*, *PRKAG3* (*RN*-ген), *H-FABP* у молодняка свиней различных породных сочетаний. Установлено, что животные сочетаний (БКБхБМ)хЙ, (БКБхБМ)хД и (БКБхБМ)хЛ генотипа *RYR-1*^{NN} в сравнении с чистопородными аналогами белорусской крупной белой породы характеризовались большим убойным выходом — на 1,1–1,9 п. п., длиной туши — на 0,6%, площадью «мышечного глазка» — на 9,3–11,8%, более тонким шпиком — на 17,6–18,9% соответственно. Частота предпочтительного по содержанию внутримышечного жира генотипа *H-FABP*^{HH} изменялась от 70,0% у животных (БКБхБМ)хЙ до 100% у молодняка сочетания БКБхЙ с частотой аллеля *H-FABP*^H — 0,8–1,0. Откормочный молодняк генотипа *PRKAG3* II отличался лучшей толщиной шпика и площадью «мышечного глазка» — 19,5 мм и 38,4 см².

Ключевые слова: свиньи, порода, белорусская мясная, крупная белая, ландрас, дюрок, йоркшир, качество мяса, гены, показатели крови.

Введение

Одними из важнейших селекционных признаков свиней являются мясная продуктивность и качество мяса. Так как эти признаки характеризуются негативной корреляцией, то направленная селекция свиней по мясности приводит к значительному ухудшению качества мяса. Селекция свиней по качеству мяса и мясной продуктивности традиционными методами затруднена из-за низкого коэффициента наследуемости признака. В этой связи возникает необходимость в выявлении и использовании в селекции генетических маркеров, напрямую или косвенно связанных с качественными и количественными признаками мясной продуктивности [1–5].

Одним из маркеров откормочных и мясных признаков свиней является ген *H-FABP* (аллельные системы H и D). Его биологическая особенность заключается в кодировании белков, участвующих в липидном обмене, основная функция которых — связывание длинных цепочек жирных кислот и перенос их внутри клетки к различным органеллам. В процессе липидного обмена происходит жиросотложение между волокнами мышечной ткани, что способствует увеличению мраморности мяса [6–8].

При интенсивной селекции на мясность и растущей популярности пород, применяемых для улучшения мясных качеств и получения товарных гибридов, отмечается увеличение частоты встречаемости предрасположенных и чувствительных к стрессу животных, вследствие чего наблюдается повышенный отход поросят, снижение откормочной и мясной продуктивности, а также качества свинины [9, 10].

Чувствительные к стрессу свиньи характеризуются более низким уровнем репродуктивных и откормочных качеств. В то же время известно, что стресс-чувствительные свиньи — носители злокачественной гипертермии — отличаются более высокой мясностью туш [11, 12].

Биохимические исследования крови животных всегда занимали видное место среди методов объективной оценки обменных процессов в организме и закономерностей формирования хозяйственно - полезных признаков. Важным показателем, характеризующим уровень и направление продуктивности животных, является белковый состав крови. Актуальность изучения белков крови согласовывается с их способностью поддерживать

на надлежащем уровне структуру плазмы, обеспечивать стойкость организма к заболеваниям, рост мышечной ткани и т. п. Установлено существование зависимости содержания общего белка с интенсивностью роста животных, причем животные, которые более интенсивно растут, имеют высшие показатели общего белка, особенно на этапе роста мышечной ткани.

Точное и своевременное выявление происходящих в организме изменений и их причин дает возможность селекционеру целенаправленно влиять на формирование мясных качеств туш свиней с желательным для потребителя соотношением мышечной и жировой тканей.

Материалы и методы

Исследования проводились в СГЦ «Заднепровский» Витебской области. Объектом исследования являлся двух- и трехпородный молодняк сочетаний БКБхЙ, (БКБхБМ)хЛ, (БКБхБМ)хД, (БКБхБМ)хЙ. В качестве контрольной группы использовались чистопородные животные белорусской крупной белой породы (БКБ).

В лаборатории биохимических анализов РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству» проведены исследования по изучению гематологических показателей крови с использованием приборов «Medonic SA 620» и «Cotman Lumen». В крови определено содержание эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина. В сыворотке крови — содержание общего белка и белковых фракций, кислотная емкость.

С целью изучения полиморфизма генов *RYR-1*, *H-FABP* и *PRKAG3* (*RN*-ген) у животных взяты биопробы ткани ушной раковины. В лаборатории генетики с.-х. РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству» животных проведено ДНК-тестирование животных мясных генотипов методом ПЦР-ПДРФ по генам *RYR-1*, *H-FABP*, *PRKAG3* (*RN*-ген).

Биохимические показатели крови считаются одними из важнейших характеристик функционального состояния и потенциальных возможностей организма свиней. При этом они не передаются от родителей потомкам в неизменном виде, а формируются в процессе онтогенеза на базе взаимодействия

наследственных особенностей и условий внешней среды. Изменение состава крови свидетельствует о том, что метаболические системы могут быть связующим звеном между генотипом и фенотипом организма. Протекающие в организме процессы влияют на состав и свойства крови, по ним можно судить об интенсивности метаболизма, обуславливающего продуктивные качества животных. Уровень белкового метаболизма может свидетельствовать о скорости роста и развития свиней. От функциональной активности и биохимической изменчивости состава крови зависят продуктивные качества животных.

Кровь является наиболее важной биологической жидкостью организма, объединяющей все органы и ткани, и наиболее полно отражает протекающие в них процессы (метаболизм белков, энергетический обмен), поэтому она функционально связана с энергией роста, продуктивными и племенными качествами животных.

Результаты и обсуждение

Ведущая роль в обмене веществ организма принадлежит белку. Он незаменимый материал, участвующий в процессе питания, образования новых клеток, регенерации отдельных клеточных структур, в становлении неспецифической защиты организма, синтезе ферментов. Белковый состав крови меняется при изменении условий кормления, содержания и иных факторов.

Наибольшим количеством общего белка в сыворотке крови при предубойной массе 95–105 кг характеризовались животные, полученные при скрещивании помесных свиноматок БКБхБМ с хряками пород йоркшир, дюрок и ландрас — 62,5–70,3 г/л (табл. 1).

Двухпородный молодняк БКБхЙ также имел достаточно высокий показатель общего белка, практически соответствующий его уровню у чистопородных животных крупной белой породы. В то же время животные данного сочетания уступали трехпородному молодняку на 1,1–12,1%.

В наших исследованиях у животных всех сочетаний при средней живой массе 95–105 кг уровень мочевины в крови был примерно одинаковым и, хотя в пределах физиологической нормы (6,9–7,2 ммоль/л), но довольно

Таблица 1

Биохимические показатели крови молодняка свиней различных генотипов

Породное сочетание	Количество, (n)	Общий белок, г/л	Триглицериды, ммоль/л	Мочевина, ммоль/л
При предубойной массе 95–105 кг				
БКБхБКБ	5	60,2 ± 0,1	0,50 ± 0,01	7,2 ± 0,12
БКБхЙ	5	61,8 ± 0,2	0,33 ± 0,01	7,0 ± 0,14
(БКБхБМ)хД	4	63,7 ± 1,6	0,35 ± 0,01	6,9 ± 0,12
(БКБхБМ)хЛ	4	70,3 ± 0,4	0,34 ± 0,01	7,1 ± 0,07
(БКБхБМ)хЙ	4	62,5 ± 0,3	0,31 ± 0,02	7,2 ± 0,09
При предубойной массе 106–115 кг				
БКБхБКБ	5	61,9 ± 0,44	0,52 ± 0,01	8,0 ± 0,04
БКБхЙ	5	63,3 ± 0,15	0,34 ± 0,01	7,1 ± 0,08
(БКБхБМ)хД	4	65,1 ± 0,22	0,38 ± 0,01	7,1 ± 0,06
(БКБхБМ)хЛ	4	71,9 ± 0,13	0,36 ± 0,02	7,1 ± 0,09
(БКБхБМ)хЙ	4	63,8 ± 0,21	0,33 ± 0,02	6,9 ± 0,14
При предубойной массе 116–125 кг				
БКБхБКБ	4	61,1 ± 0,24	0,59 ± 0,01	8,4 ± 0,07
БКБхЙ	4	63,1 ± 0,15	0,37 ± 0,01	7,2 ± 0,03
(БКБхБМ)хД	4	65,9 ± 0,19	0,40 ± 0,01	7,1 ± 0,08
(БКБхБМ)хЛ	4	70,9 ± 0,27	0,38 ± 0,02	7,2 ± 0,04
(БКБхБМ)хЙ	4	63,2 ± 0,10	0,35 ± 0,01	7,1 ± 0,05

высоким, что свидетельствует о повышенном уровне обменных процессов в организме.

С увеличением предубойной массы до 106–115 кг выявлена тенденция к увеличению содержания общего белка в сыворотке крови всех подопытных животных (табл. 1). Однако лидерами по этому показателю остались трехпородные животные сочетания (БКБхБМ)хЛ, превосходящие по содержанию общего белка чистопородных сверстников белорусской крупной белой породы на 10 г/л, или 16,2%. Что касается остальных опытных групп животных, содержание общего белка у них находилось на достаточно высоком уровне — 63,3–65,1 г/л.

При анализе динамики содержания общего белка в сыворотке крови подопытных животных, как материальной основы естественной резистентности и иммунобиологической активности организма животных, в убойном

возрасте 220 дней и массой 116–125 кг были выявлены различия. Трехпородный молодняк имел наиболее высокий уровень общего белка среди контрольных и опытных групп животных — 63,2–70,9 г/л. Более высокое содержание белка в сыворотке крови свидетельствует о интенсивности обменных процессов, связанных с ростом мышечной ткани.

Достаточно высокими показателями уровня общего белка отличались животные сочетания БКБхЙ — 63,1 г/л.

Установлено, что во все возрастные периоды уровень общего белка был достаточно высоким, что свидетельствует о крепости конституции животных.

Наибольшим количеством общего белка в сыворотке крови во все возрастные периоды среди животных опытных групп отличался молодняк сочетания (БКБхБМ)хЛ, превосходство над чистопородными животными белорусской

крупной белой породы составило 16,0–16,8%. Показатель содержания общего белка в крови у помесного молодняка сочетания БКБхИ оказался выше аналогичного показателя чистопородных животных белорусской крупной белой породы на 2,3–3,3%.

Основным продуктом распада белков является мочевины. Она вырабатывается печенью из аммиака и выводится из организма почками. Соответственно, если из крови мочевины выводится плохо, это означает нарушение выделительной функции почек.

Максимальный уровень отложения белка в организме выращиваемых свиней зависит от их породных особенностей. Установлено, что при адекватном потреблении протеина оставшаяся его часть после удовлетворения потребностей организма используется с постоянной эффективностью на отложение, пока не достигнет максимального его генетического уровня. Сверх этого количества потребленный протеин должен дезаминироваться. Соответственно, уровень мочевины в крови таких животных будет повышаться.

С возрастом и повышением живой массы наблюдается тенденция к увеличению содержания мочевины в сыворотке крови у чистопородных животных белорусской крупной белой породы — к возрасту 210 дней величина данного показателя увеличилась на 11,1%, а к возрасту 220 дней — еще на 5%, что свидетельствует о снижении уровня отложения белка и скорости роста мышечной ткани у этих животных. У молодняка остальных сочетаний уровень мочевины с возрастом существенно не изменился, что свидетельствует о постоянстве у них уровня отложения белка и роста мышечной ткани в данном возрастном периоде.

Триглицериды — это жиры, которые являются основным источником энергии для организма. Большая часть триглицеридов содержится в жировой ткани, однако часть из них находится в крови, обеспечивая мышцы энергией. Триглицериды всасываются в кишечнике и, транспортируясь через кровь, откладываются в жировой ткани про запас, поэтому их уровень в крови может свидетельствовать об интенсивности жиросотложения. Увеличение концентрации триглицеридов отмечается при ожирении. Это может указывать на растянутые сроки откорма и как

следствие, излишний расход на кормление и содержание животных.

В наших исследованиях уровень триглицеридов с повышением возраста и массы у животных всех исследуемых сочетаний также несколько повышался от 0,31 до 0,59 ммоль/л, находясь в пределах физиологической нормы. Наибольшие величины данного показателя крови во все изучаемые периоды среди животных опытных групп имел молодняк, полученный при скрещивании помесных свиноматок БКБхБМ с хряками породы дюрок, — 0,35–0,40 ммоль/л. Животные данного сочетания уступали чистопородным контрольным сверстникам по содержанию в сыворотке крови триглицеридов на 26,9–32,2%. Полученные результаты позволяют утверждать, что животные опытных групп при более продолжительном откорме, до достижения более тяжелых весовых кондиций, способны давать менее жирную свинину, чем чистопородные контрольные животные. В целом же средние показатели уровня белкового и жирового обмена у молодняка всех исследуемых сочетаний свидетельствуют о том, что кормление подопытных животных было сбалансированным, полнорационным и корма хорошо усваивались животными.

Изучена генетическая структура животных мясных генотипов по генам *RYR-1*, *PRKAG3* (*RN*-ген), *H-FABP* в СГЦ «Заднепровский».

В качестве гена, обуславливающего чувствительность свиней к стрессам, можно использовать ген рецептора рианодина скелетных мышц *RYR-1*, который отвечает за синтез белка, находящегося в саркоплазматическом ретикулуме мышечной ткани. Основная функция этого белка — регуляция концентрации ионов кальция в цитоплазме. Мутация в позиции 1843, заменяющая цитозин на тимин, приводит к замене аргинина на цистин в позиции 615 рианодинрецепторного белка. Даже незначительное стрессовое воздействие на животное-носителя мутации (генотип *RYR-1^{Nn}*) приводит к резкому повышению в саркоплазме содержания ионов кальция, из-за чего мышечные ткани начинают работать в режиме чрезвычайно повышенной мышечной нагрузки, что приводит к ухудшению качества мяса. Влияние *RYR-1* генотипа на признаки туши составляет от 3,5 до 27%, на критерии

Таблица 2

Частота встречаемости генотипов гена *RYR-1*

Порода	Количество, n	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
		RYR1 ^{NN}	RYR1 ^{Nn}	RYR1 ⁿⁿ	N	n
БКБхБКБ	10	90,0	10,0	–	0,95	0,05
БКБхЙ	5	80,0	20,0	–	0,90	0,10
(БКБхБМ)хЙ	10	100	–	–	1,00	–
(БКБхБМ)хД	10	90,0	10,0	–	0,95	0,05
(БКБхБМ)хЛ	10	83,0	17,0	–	0,92	0,08

качества мяса — до 60%, на прирост живой массы — до 10%.

При исследовании ядерной ДНК свиней различных мясных генотипов выявлен полиморфизм гена *RYR-1*, представленный двумя аллелями: RYR-1^N и RYR-1ⁿ (табл. 2). Идентифицированы генотипы RYR-1^{NN} и RYR-1^{Nn}. Животные со стресс-чувствительным генотипом pp отсутствовали.

По локусу гена *RYR-1* в исследуемых группах свиней основная часть имела гомозиготный генотип RYR1^{NN} от 80% у животных, полученных при скрещивании свиноматок крупной белой породы с хряками породы йоркшир, до 100% в сочетании (БКБхБМ)хЙ. Установлена высокая частота встречаемости аллеля RYR1^N от 0,90 до 1.

В качестве возможных маркеров признаков мясной продуктивности и качества мяса свиней рассматриваются гены семейства связывающих белков жирных кислот (FABP). Один из генов этого семейства — *H-FABP* — представляет большой интерес в качестве ген-кандидата содержания внутримышечного жира — важнейшего показателя, определяющего качество мяса, а также в роли генетического маркера сниженного содержания жира в туше свиней. ДНК-типирование генома выявило, что ген, кодирующий белок, связывающий жирные кислоты, расположен в пределах содержащей QTL-области по этим признакам и картирован на длинном плече (q) субметоцентрической хромосомы 6, в субъединицах 1–6 второго сегмента. Ген *H-FABP* характеризуется двумя типами аллельного полиморфизма, определяющего наличие аллелей H-FABP^D, H-FABP^d и H-FABP^H, H-FABP^h. Его поли-

морфизм обусловлен точковыми мутациями, ведущими к нуклеотидным заменам, первая расположена в пятой регуляторной области (распознается ферментом HinfI), вторая расположена во втором интроне (распознается ферментом HaeIII).

В ходе молекулярно-генетического тестирования животных мясных генотипов по гену *H-FABP* диагностированы аллели H-FABP^D, H-FABP^d и H-FABP^H, H-FABP^h и идентифицированы генотипы H-FABP^{DD}, H-FABP^{Dd}, H-FABP^{dd} и H-FABP^{HH}, H-FABP^{Hh}, H-FABP^{hh}.

При ДНК-типировании гена *H-FABP* по аллельной системе H частота предпочтительного аллеля по содержанию внутримышечного жира генотипа H-FABP^{HH} изменялась от 70,0% у животных генотипа (БКБхБМ)хЙ до 100% у молодняка сочетания БКБхЙ с частотой аллеля H-FABP^H — 0,80–1,0 (табл. 3). Встречаемость животных с гетерозиготным генотипом H-FABP^{Hh} варьировала от 20,0% в сочетаниях (БКБхБМ)хЙ и (БКБхБМ)хД до 10,0% в группе молодняка, полученного при скрещивании помесных свиноматок с хряками породы ландрас, и у чистопородных животных белорусской крупной белой. В опытных группах генотип H-FABP^{hh} выявлен у животных сочетаний (БКБхБМ)хЙ и (БКБхБМ)хЛ — 10%.

Анализ генетической структуры выборок из популяции по гену *H-FABP* (аллельная система D) свидетельствует, что концентрация предпочтительного генотипа H-FABP^{dd} и аллеля H-FABP^d, влияющего на меньшую толщину шпика, у молодняка опытных групп составила 10–56% и 0,2–0,8 соответственно (табл. 4). Встречаемость животных с гетерозиготным

Таблица 3
Частота встречаемости генотипов гена *H-FABP* у животных (аллельная система Н)

Порода	Количество, n	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
		NN	Nh	hh	H	h
БКБхБКБ	10	80,0	10,0	10,0	0,85	0,15
БКБхЙ	5	100	–	–	1,0	–
(БКБхБМ)хЙ	10	70,0	20,0	10,0	0,80	0,20
(БКБхБМ)хД	10	80,0	20,0	0	0,90	0,10
(БКБхБМ)хЛ	10	80,0	10,0	10,0	0,86	0,14

Таблица 4
Частота встречаемости генотипов гена *H-FABP* у животных (аллельная система D)

Порода	Количество, n	Частота встречаемости генотипов, %			Концентрация аллелей	
		DD	Dd	dd	D	d
БКБхБКБ	10	30,0	60,0	10,0	0,6	0,4
БКБхЙ	5	60,0	40,0	–	0,8	0,2
(БКБхБМ)хЙ	10	30,0	60,0	10,0	0,6	0,4
(БКБхБМ)хД	10	10,0	40,0	50,0	0,3	0,7
(БКБхБМ)хЛ	10	4,0	40,0	56,0	0,2	0,8

генотипом $H-FABP^{Dd}$ варьировала от 40% у молодняка опытных групп сочетаний БКБхЙ, (БКБхБМ)хД и (БКБхБМ)хЛ до 60% у чистопородных животных крупной белой породы и (БКБхБМ)хЙ.

Интенсивная селекция на создание мясных генотипов в свиноводстве привела, наряду с положительным эффектом увеличения содержания мяса в туше, к отрицательным последствиям — снижению качества мяса и появлению пороков PSE (бледное, слабоокрашенное, водянистое мясо) и DFD (жесткое, сухое, сильноокрашенное мясо).

ДНК-тестирование свиней различных генотипов, полученных в СГЦ «Заднепровский», по гену *PRKAG3* (замена V199I) позволило идентифицировать аллель дикого типа ($PRKAG3^V$) мутантный аллель ($PRKAG3^I$) и три генотипа: $PRKAG3^{VV}$, $PRKAG3^{VI}$, $PRKAG3^{II}$ (табл. 5).

Полученные данные свидетельствуют о межпородных различиях в генетической структуре в выборке животных из популяции по гену *PRKAG3*.

Более высокой частотой встречаемости аллеля $PRKAG3^I$ характеризовался молодняк сочетания (БКБхБМ)хД — 0,40. «Желательный» генотип $PRKAG3^{II}$ выявлен у свиней, полученных при скрещивании помесных свиноматок БКБхБМ с хряками пород ландрас и йоркшир. Частота встречаемости аллеля $PRKAG3^I$ у них составила 0,35. Изучена ассоциация генов *RYR-1*, *H-FABP*, *PRKAG3* (*RN*-ген) с показателями продуктивности животных мясных генотипов в СГЦ «Заднепровский».

Одним из приемов, позволяющих значительно увеличить производство высококачественной свинины, является разработка наиболее эффективных технологий, а также использование свиней разных генотипов (NN, Nn, nn) по гену *RYR-1* в системах межпородного скрещивания и гибридизации для достижения различных характеристик качества мяса.

Лучшими показателями мясной продуктивности отличался трехпородный молодняк сочетаний (БКБхБМ)хЙ, (БКБхБМ)хД и (БКБхБМ)хЛ генотипа $RYR-1^{NN}$ (табл. 6). Полученные

Таблица 5

Частота встречаемости генотипов гена *PRKAG3* (*RN*-ген) у животных

Порода	Количество, n	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
		VV	VI	II	V	I
БКБхБКБ	10	40,0	60,0	–	0,70	0,30
БКБхЙ	5	80,0	20,0	–	0,90	0,10
(БКБхБМ)хЙ	10	50,0	30,0	20,0	0,65	0,35
(БКБхБМ)хД	10	30,0	60,0	10,0	0,60	0,40
(БКБхБМ)хЛ	10	40,0	50,0	10,0	0,65	0,35

Таблица 6

Влияние мутации в гене *RYR-1* на мясные качества молодняка

Порода	Генотип	Количество, n	Убойный выход, %	Толщина шпика, мм	Площадь мышечного глазка, см ²
БКБхБКБ	NN	9	67,3 ± 0,12	23,8 ± 0,19	35,3 ± 0,28
	Nn	1	66,9	24,2	34,0
БКБхЙ	NN	4	68,3 ± 0,32	20,2 ± 0,14	38,6 ± 0,35
	Nn	1	67,7	20,5	37,2
(БКБхБМ)хЙ	NN	10	68,4 ± 0,21	19,6 ± 0,12	38,6 ± 0,65
	Nn	–	–	–	–
(БКБхБМ)хД	NN	9	68,9 ± 0,19	19,6 ± 0,32	39,0 ± 0,72
	Nn	1	68,3	20,1	38,4
(БКБхБМ)хЛ	NN	8	69,2 ± 0,21	19,3 ± 0,16	39,5 ± 0,26
	Nn	2	68,6 ± 0,52	19,5 ± 0,24	38,6 ± 0,32

от этих животных туши, в сравнении с чистопородными аналогами белорусской мясной и белорусской крупной белой пород, характеризовались большим убойным выходом — на 0,2–1,0 п. п. и 1,1–1,9 п. п., длиной туши — на 0,6%, площадью «мышечного глазка» — на 5,7–8,2% и 9,3–11,8%, более тонким шпиком — на 3,0–4,5% и 17,6–18,9% соответственно.

Анализ физико-химических свойств мяса животных разных генотипов позволил установить, что мясо гетерозиготных особей $RYR1^{Nn}$, по сравнению с гомозиготными, характеризовалось повышенным содержанием в мышечной ткани сырого протеина при меньшем количестве жира (на 1,7–4,3% и 1,6–5,9%) (табл. 7).

Установлено, что туши молодняка всех опытных групп были свободными от пороков

PSE и DFD. Величина pH через 48 часов после убоя в мясе составила 5,53–5,72 единиц, что соответствует технологической норме.

Одновременно при сравнении качества мяса, полученного от гомозиготных животных, отмечено ухудшение технологических параметров: снижение влагоудерживающей способности и повышение значения pH. По влагоудерживающей способности мяса в группе опытных животных генотипа $RYR1^{NN}$ показатель находился в пределах 51,2–52,2%, а у молодняка генотипа $RYR1^{Nn}$ — 51,9–52,9%.

Приведенные данные позволяют сделать предположение, что лучшие условия для протекания процессов гликолиза, обеспечивающих равномерность созревания мяса, отмечены в мышечной ткани стрессоустойчивых

Таблица 7

Влияние мутации в гене *RYR-1* на химический состав и физико-химические свойства мышечной ткани молодняка мясных генотипов

Порода	Генотип	Кол-во, n	Протеин, %	Жир, %	Кислотность (рН), ед	Влагоудерживающая способность, %	Потери мясного сока, %
БКБхБКБ	NN	5	20,12 ± 0,16	4,63 ± 0,10	5,62 ± 0,09	51,0 ± 0,17	37,5 ± 0,65
	Nn	1	20,75	4,42	5,51	51,6	36,8
БКБхЙ	NN	5	20,23 ± 0,24	4,62 ± 0,19	5,72 ± 0,03	51,2 ± 0,19	38,2 ± 0,46
	Nn	1	21,1	4,35	5,61	51,9	37,4
(БКБхБМ)хЙ	NN	6	21,09 ± 0,31	5,42 ± 0,17	5,68 ± 0,04	52,2 ± 0,48	35,9 ± 0,33
	Nn	—	—	—	—	—	—
(БКБхБМ)хД	NN	4	20,53 ± 0,11	5,40 ± 0,16	5,65 ± 0,03	51,4 ± 0,35	37,2 ± 0,28
	Nn	2	20,91 ± 0,18	5,14 ± 0,12	5,53 ± 0,06	52,8 ± 0,21	36,3 ± 0,19
(БКБхБМ)хЛ	NN	5	21,05 ± 0,26	5,62 ± 0,11	5,72 ± 0,05	51,8 ± 0,28	37,4 ± 0,38
	Nn	1	21,4	5,29	5,63	52,9	35,5

Таблица 8

Влияние полиморфизма по гену *PRKAG3* (*RN*-ген) на мясные качества молодняка

Генотип свиней	Количество, n	Убойный выход, %	Толщина шпика, мм	Площадь «мышечного глазка», см ²
VV	25	68,1 ± 0,36	22,3 ± 0,11	35,2 ± 0,34
VI	28	68,4 ± 0,14	20,5 ± 0,23	36,6 ± 0,19
II	7	68,7 ± 0,35	19,5 ± 0,19***	38,4 ± 0,21***

Примечание. *** — $p \leq 0,001$

особей. Результаты анализа уровня продуктивности с учетом генотипа животных по гену *PRKAG3* представлены в табл. 8.

По вариантам гена *PRKAG3* выявлены значимые различия. Откормочный молодняк с II генотипом отличался более тонким шпиком и большей площадью «мышечного глазка» — 19,5 мм и 38,4 см². Превосходство над животными генотипа *PRKAG3*^{VV} по данным показателям составило 2,8 мм, или 12,6%, и 3,2 см², или 9,1%, соответственно. По показателю убойного выхода достоверной разницы между группами не установлено.

В результате анализа ассоциации гена *H-FABP* с показателями мясной продуктивности свиней различных сочетаний установлено, что лучшей мясностью отличались межпо-

родные животные, обладающие генотипами dd и NN, у которых показатели убойного выхода, толщины шпика и площади «мышечного глазка» составили 68,9%, 19,4 мм, 38,3 см² и 68,7%, 19,5 мм, 38,0 см² соответственно (табл. 9). Животные генотипов Dd и Hh несколько уступали по указанным продуктивным качествам молодняку генотипов dd и NN. Так, по показателям толщины шпика и площади «мышечного глазка» они уступали лидерам в среднем на 4,7–8,5% и 2,4–4,2% соответственно. Самые низкие показатели отмечались у свиней, обладающих генотипами DD и hh. Установлена закономерность, заключающаяся в положительной тенденции улучшения мясных качеств свиней с генотипами dd и NN в системе *H-FABP*.

Таблица 9

Влияние полиморфизма по гену *H-FABP* на мясные качества молодняка

Генотип свиней	Количество, n	Убойный выход, %	Толщина шпика, мм	Площадь «мышечного глазка», см ²
dd	16	68,9 ± 0,35	19,4 ± 0,22	38,3 ± 0,18
Dd	35	68,1 ± 0,11	21,2 ± 0,07	36,7 ± 0,25
DD	9	67,4 ± 0,23	22,4 ± 0,11	35,5 ± 0,16
HH	48	68,7 ± 0,41	19,5 ± 0,10	38,0 ± 0,21
Hh	9	68,0 ± 0,12	21,5 ± 0,19	37,1 ± 0,15
hh	3	67,5 ± 0,17	23,9 ± 0,31	35,2 ± 0,42

Заключение

Полученные результаты позволяют утверждать, что животные опытных групп при более продолжительном откорме, до достижения более тяжелых весовых кондиций, способны давать менее жирную свинину, чем чистопородные контрольные животные.

Показатели уровня белкового и жирового обмена у молодняка всех исследуемых сочетаний свидетельствуют о том, что кормление подопытных животных было сбалансированным, полнорационным и корма хорошо усваивались животными.

Проведенные исследования свидетельствуют о необходимости более широкого изучения биохимических показателей крови и установления генетической структуры организма животных мясных генотипов по генам *RYR-1*, *PRKAG3* (*RN*-ген), *H-FABP* у чистопородного молодняка свиней и гибридов различных сочетаний с целью получения высококачественной свинины на промышленных комплексах.

Список использованных источников

1. Зиновьева, Н. А. Диагностика полиморфизма гена *H-FABP* как генетического маркера мясных качеств свиней / Н. А. Зиновьева, Е. А. Гладырь // Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных: материалы II междунар. науч. конф., 19–20 нояб. 2002г. – Дубровицы, 2002. – С. 45–50.

2. Князев, С. П. Проблемы дискордантности и косегрегации экспрессии галотанчувствительности свиней с мутацией 1843 С-Т в локусе *RYR1* рецептора рианоидина / С. П. Князев, К. Е. Жучаев, В. В. Гарт // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 12. – С. 1648–1654.

3. Балацкий, В. Н. Разработка ДНК-технологий генотипирования свиней и их использование в свиноводстве / В. Н. Балацкий // Вісник аграрної науки Причорномор'я. – Миколаїв. 2002. – Спец. вип. (17): Актуальні проблеми розвитку галузі свинарства. – С. 5–8.

4. Введение в ДНК-технологии / В. И. Глазко [и др.]. – М.: Росинформагротех, 2001. – 434 с.

5. Генные карты сельскохозяйственных животных / П. М. Кленовицкий [и др.]. – Дубровицы, 2003. – 91 с.

6. Зиновьева, Н. А. Перспективы использования молекулярной генной диагностики сельскохозяйственных животных / Н. А. Зиновьева // ДНК-технологии в клеточной инженерии и маркетингование признаков сельскохозяйственных животных. – Дубровицы, 2001. – С. 44–49.

7. Епишко, Т. И. Интенсификация селекционных процессов в свиноводстве с использованием классических методов генетики и ДНК-технологии : дис. ... д-ра с.-х. наук : 06.02.01 / Т. И. Епишко. – Жодино, 2008. – 346 с.

8. Зиновьева, Н. А. Современное состояние и перспективы биотехнологии в животноводстве / Н. А. Зиновьева, Л. К. Эрнст. – Дубровицы : ВИЖ, 2006. – 375 с.

9. Пестис, В. К., Епишко, О. А., Танана, Л. А., Шейко, Р. И. Ассоциация полиморфизма гена *RYR1* с показателями продуктивных качеств свиней — пород, разводимых в Беларуси // Молодой ученый. – 2015. – № 5.2. – С. 33–37.

10. Использование маркерных генов в селекции свиней / Т. И. Епишко, О. П. Курак, Н. В. Журина, О. А. Епишко // Пути интен-

сификации отрасли свиноводства в странах СНГ: тез. докл. XIII междунар. науч.-практ. конф. по свиноводству. – Жодино, 2006. – С. 44–46.

11. Бирта, Г. А. Белковый состав крови свиней при различной интенсивности выращивания / Г. А. Бирта // Свиноферма. – 2006. – № 12. – С.10–11.

12. Баранникова, А. Н. Качественные показатели мышечной ткани подсвинков различных генотипов / А. Н. Баранникова, Е. А. Крыштоп, В. А. Баранников // Актуальные проблемы производства свинины в РФ : мат. Всерос. науч.-практ. конф. и межвуз. коор. совета «Свинина». – пос. Персиановский, 2009. – С. 18–20.

R. I. Sheiko

BIOTECHNOLOGICAL TECHNIQUES AND METHODS IMPROVING QUALITY INDICATORS OF PORK

Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

Biochemical blood factors and the genetic structure of meat genotype animals by the genes *RYS-1*, *PRKAG3* (*RN-gene*), and *H-FABP* were studied in young pigs of various breed combinations. It was found that animals with the combinations (BKBxBM)xY, (BKBxBM)xD and (BKBxBM)xL of the *RYS-1^{NN}* genotype in comparison with the purebred analogues of the Belarusian Large White breeds had the larger slaughter yield by 1.1–1.9 bp, the carcass length by 0.6%, the “loin eye” area by 9.3–11.8% and the thinner fat by 17.6–18.9%, respectively. The *H-FABP^{HH}* genotype frequency, which is preferable in the content of intramuscular fat, varied from 70.0% in animals (BKBxBM)xY to 100% in young animals of a BKBxY combination with the *H-FABP^H* allele frequency of 0.8–1.0. The fattening young pigs of the *PRKAG3* II genotype were characterized by the best fat depth and the “loin eye” area — 19.5 mm and 38.4 cm².

Key words: pigs, breed, the Belarusian meat breed, the Large White, the Landrace, the Duroc, the Yorkshire, meat quality, genes, blood factors.

Дата поступления статьи: 15 июля 2019 г.

М. Е. Михайлова¹, Р. И. Шейко¹, А. И. Киреева¹, Е. Л. Романишко¹, Н. А. Камыш¹,
Н. И. Тиханович¹, О. А. Беляк¹, А. Н. Баяхов²

ДНК-СКРИНИНГ РЕЦЕССИВНЫХ МУТАЦИЙ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИХ РАЗВИТИЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ДЕФЕКТОВ (VLAD- И CVM-СИНДРОМОВ) В ПОПУЛЯЦИИ КРС В БЕЛАРУСИ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: M.Mikhailova@igc.by

²Казахстанский университет инновационных и телекоммуникационных систем
Казахстан, L02E6P1, г. Уральск, ул. М. Маметовой, 81

Проведен анализ генетической структуры популяций голштинской и черно-пестрой (голштинизированной) пород крупного рогатого скота в Беларуси по локусам генов *CD18* и *SLC35A3*. Частоты встречаемости мутантных аллелей VL гена *CD18*, обуславливающего развитие VLAD-синдрома и CV-аллеля гена *SLC35A3* (CVM-синдром) в белорусской популяции КРС, составляет 0,004 и 0,015 соответственно. Проведение ДНК-скрининга наследственных дефектов в популяции КРС и выведение из селекционного процесса скрытых носителей мутаций позволило снизить встречаемость гетерозиготных генотипов по генам *CD18* и *SLC35A3* с 1,73% (2015 г.) до 0,53% (2018 г.) и с 4,45% (2015 г.) до 1,56% (2017 г.) соответственно.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, наследственные дефекты, мутации, VLAD-синдром, CVM-синдром.

Введение

В XX столетии интенсивное использование в мире генофонда голштинской породы крупного рогатого скота (КРС) и биотехнологий репродукции (искусственное осеменение, трансплантация эмбрионов) позволило значительно повысить генетический потенциал молочной продуктивности за счет получения потомства производителей — лидеров породы. Вместе с тем в поголовье все чаще проявляются признаки генетической «эрозии» — накопления груза вредных рецессивных мутаций. При этом снижаются воспроизводительная способность и плодовитость, жизнеспособность новорожденных и молодняка, резистентность к инфекциям и продолжительность хозяйственного использования животных, что отрицательно сказывается на рентабельности производства. У крупного рогатого скота выявлено свыше 400 генетически обусловленных морфологических и функциональных нарушений жизнедеятельности организма [1]. Одним из таких генетических дефектов, наследуемых по ауто-сомно-рецессивному типу, т.е. проявляющихся только у животных, гомозиготных по соответствующему гену и не имеющих клинических

проявлений у гетерозигот, является дефицит адгезии лейкоцитов (VLAD-синдром), введенный в генофонд черно-пестрого скота в виде рецессивной мутации в гене *CD18*. Мутация впервые была обнаружена у быков голштинской породы, которых широко использовали для улучшения генетического потенциала других популяций КРС.

Первые случаи дисфункции лейкоцитов были зарегистрированы еще в 1983 г. у коров голштинской породы. В 1987 г. в Японии сообщили о нескольких аналогичных случаях проявления у телят подобных клинических симптомов, которые сопровождались постоянными или рецидивирующими инфекциями, связанными с устойчивой нейтрофилией. В 1990 г. у телят с гранулоцитопатическим синдромом обнаружили недостаточную экспрессию молекулы β 2-интегрина на поверхности лейкоцитов и назвали данное заболевание дефицитом адгезии лейкоцитов (VLAD) у крупного рогатого скота, по аналогии с лейкоцитарной адгезией человека (LAD) [2].

Семейство интегринов включает следующие факторы, известные в международной классификации как CD11/CD18: LFA-1, Mac-

1 и p150,95. Все три семейства белков являются гетеродимерами, каждый состоит из α -субъединиц [CD11a, CD11b и CD11c] и общей β -субъединицы [CD18]. У КРС синдром связан с дефицитом Mac-1 гликопротеина [CD11b/CD18] лейкоцитов крови [3].

Клинически BLAD проявляется также в подавлении клеточного иммунитета, при котором нарушается процесс диапедеза, т. е. блокируется способность лейкоцитов проникать через кровеносные капилляры и двигаться с кровотоком к очагу инфекции. Эти нарушения способствуют развитию иммунодефицитного состояния животного. Животные с гетерозиготным генотипом (*TL/BL*) не имеют фенотипических проявлений заболевания, но являются скрытыми носителями мутации. У особей, гомозиготных по рецессивному аллелю, резко снижается устойчивость к бактериальным и вирусным инфекциям, замедляется рост. У пораженных животных отмечаются тяжелые язвы на слизистых оболочках ротовой полости, гингивит, потеря зубов, рецидивирующая диарея, хроническая пневмония. Биохимические показатели крови указывают на постоянную нейтрофилию. Большинство телят погибает в возрасте 3–7 месяцев, не достигнув половозрелого возраста [2].

Молекулярной основой BLAD является точечная мутация в кодирующей части гена *CD18*, имеющая аутосомно-рецессивный характер наследования. Замена (аденин-гуанин) в положении 383 кДНК приводит к аминокислотной замене в молекуле белка ($\text{Asp} \rightarrow \text{Gly}$), в результате чего нарушается взаимодействие β -субъединицы с α -субъединицами. Лейкоциты больного животного на своей поверхности содержат очень низкое количество β -интегрина, менее 2% от 160 кД белка здорового животного. Нарушается экспрессия β -интегрина — поверхностного белка нейтрофилов, которая приводит к дефициту адгезии фагоцитов, что вызывает в свою очередь резкое снижение функциональной активности фагоцитоза, невозможность выхода лейкоцитов за пределы кровеносного сосуда [4]. Лейкоциты теряют свою активность и способность выполнять защитную фагоцитарную функцию. В итоге возникает иммунодефицитное состояние, что и приводит к гибели.

В октябре 2000 г. датские исследователи объявили международному сообществу голштин-

ского скота об открытии нового летального генетического дефекта, который они назвали Complex Vertebral Malformation (CVM) — комплексный порок позвоночника [5].

У гомозиготных по мутантному CV-аллелю телят проявляется общая недоразвитость. У них наблюдаются аномалии развития позвоночного столба: укороченная шея, сколиоз, кифоз, сросшиеся и деформированные позвонки, расщепление позвоночника надвое. В целом количество пораженных позвонков колеблется от 2 до 18. Причем к поражениям шейного и грудного отделов часто присоединяется артрогрипоз. Встречаются пороки ребер, которые зачастую слиты между собой проксимальными и иногда средними частями, при этом дистальные части свободны. Трубочатые кости конечностей удлинены и истончены, встречается деформация суставов (контрактуры) [5]. Большинство (до 77 %) плодов-носителей резорбируются или погибают до 260-х суток стельности, при этом абортруемость плода может происходить на любых сроках (менее, чем 1 на 100 тыс. отелов). В некоторых случаях, плод донашивается, однако стельность заканчивается мертворождением обычно на 1–2 недели раньше ожидаемого срока. Лишь небольшая доля гомозиготных по CV/CV телят рождаются живыми, однако и они вскоре погибают [6].

Молекулярной основой наследственного заболевания комплексного порока позвоночника CVM является точечная миссенс-мутация $G \rightarrow T$ в позиции 599 в локусе гена *SLC35A3*. Ген *SLC35A3* (58582 п. н.) кодирует белок UDPN — acetyl glucosamine transporter (уридин-5'-дифосфат-N-ацетил-глюкозамина транспортный белок), который относится к семейству растворимых ферментов переносчиков (solute carrier family 35, member A3 (SLC35A3), транспортирующих нуклеотид связанные сахара из цитозоля в эндоплазматический ретикулум или полости комплекса Гольджи. Мутация приводит к аминокислотной замене $\text{Val} \rightarrow \text{Phe}$ в пептиде UDPN в позиции 180 (V180F), что нарушает его транспортную функцию. Белок UDPN играет важную роль в процессах, контролирующих образование позвонков из несегментированной параксиальной мезодермы. Следовательно, дефектная молекула белка-транспортера приводит к порокам развития позвоночника [6–8].

Материалы и методы

ДНК выделяли из цельной крови, ушных выщипов и криоконсервированной спермы в пайетах. Выделение и очистку ДНК из образцов биологического материала животных проводили с помощью набора реагентов «Нуклеосорб» («Праймтех», Республика Беларусь). Для выявления в мультиплексе мутаций в локусах генов *CD18* и *SLC35A3* методом ПЦР-РВ использовали набор реагентов для определения комплексной аномалии позвоночника (CVM) и дефицита лейкоцитарной адгезии (BLAD) у крупного рогатого скота («Синтол», Россия), состоящий из реакционной смеси, разбавителя, Taq ДНК-полимеразы, положительных контрольных образцов (ПКО 1, ПКО 2, ПКО 3) и отрицательного контрольного образца (ОКО). При тестировании образцов ДНК использовались флуорофоры FAM, HEX (для выявления нормальных и мутантных аллелей CVM) и ROX, Cy 5 (для выявления нормальных и мутантных аллелей BLAD). Методика проведения ПЦР-РВ представлена в методических рекомендациях [9].

Результаты и обсуждение

Анализ частоты гетерозиготных генотипов – скрытых носителей генетических дефектов, приводящих к развитию BLAD- и CVM-синдромов, проводится во многих странах мира, занимающихся разведением голштинского скота. Мутантный аллель BL локуса гена *CD18* выявлен в 27 стран мира. В США в 1992 г. носителями мутации BLAD являлись 15,6% быков и 6% маточного поголовья, а экономический ущерб был оценен в 5 млн долларов [3]. Эта мутация диагностирована в шести республиках бывшего СССР, в трех республиках СНГ (Россия, Беларусь и Украина), а также в странах Балтии (Эстония, Латвия, Литва), однако не установлен в Казахстане и Молдове [10].

Частота встречаемости мутантного аллеля BL до 2000 г. составляла от 0,31% (Япония) до 6,4% (Германия) (табл. 1).

На современном этапе в мировом поголовье частота мутантного BL-аллеля диагностируется в пределах 0,22–4% [12].

Генетический тест для выявления скрытых носителей CVM разработан датскими учеными в 2002 году. Систематизация данных по

голштинскому скоту позволила определить процент гетерозиготных скрытых носителей мутации локуса гена *SLC35A3* среди быков-производителей в разных странах. По данным Шайдуллина Р. (2015), среди исследованных быков, семенной материал которых применялся в искусственном осеменении поголовья КРС, разводимого в Чехии, Венгрии, Австралии и Великобритании, носителей этой мутации найдено не было. Однако скрытые носители данной мутации выявлены в следующих странах: США — 20,07%, Канада — 6,42%, Голландия — 8,8%, Франция — 42,85%, Германия — 7,15%, Италия — 15,4%. Таким образом, в среднем 19,5% быков голштинской породы оказались скрытыми носителями мутаций, обуславливающих CVM-синдром крупного рогатого скота [10, 11].

Нами проведен мониторинг частоты мутантных аллелей и генотипов генов *SLC35A3* и *CD18* в популяции голштинского и черно-пестрого (голштинизированного) КРС, разводимого в Беларуси, за период 2015–2019 гг. Установлено, что самое большое количество выявленных мутантных генотипов гена *SLC35A3* зафиксировано в 2015 г. — 4,45%, а в 2017 г. выявлен только 1,56% гетерозигот (табл. 2).

Таблица 1

Частота встречаемости мутантного аллеля BL локуса гена *CD18* в поголовье КРС голштинской породы [11]

Страна	Частота мутантного аллеля BL, %
Аргентина	2,88
Бразилия	2,80
Япония	0,31
Китай	0,49
Иран	3,30
Турция	4,00
Индия	1,59
Польша	5,00
Франция	6,00
Германия	6,40
Чехия	4,00
Россия	5,66
Украина	3,20

В Беларуси ДНК-диагностика носителей мутации BLAD проводится с 2008 г. По нашим данным в 2008 г. частота мутантных генотипов гена *CD18* составляла 3,76% [13]. В 2015 г. процент мутантных генотипов составил 1,73%, а в 2018 году — 0,53% (табл. 2).

В среднем, за годы мониторинга (2015–2019 гг.) в популяции КРС диагностируется 2,53% животных – скрытых носителей мутации гена *SLC35A3* (CVC) и 0,56% мутантных генотипов гена *CD18* (BLC) (табл. 2).

Анализ генетической структуры проанализированной выборки (3108 голов) из популяции голштинского (голландизированного) КРС в Беларуси показал, что частота мутантного аллеля CV локуса гена *SLC35A3* составляет 0,015. Частота мутантного аллеля BL локуса гена *CD18* — 0,004 (табл. 3).

Известно, что бык американской селекции № USA000001667366 Carlin-M Ivanhoe BELL 1974 года рождения является родоначальником мутации гена *CD18* [14]. Нами проведен анализ родословных животных – скрытых носителей мутаций генов *CD18* и *SLC35A3*, выявленных в Беларуси.

Прослежена генеалогия животных, которые диагностированы как скрытые носители мутации B1 (BLC) гена *CD18*: ♀ АЛЕСЯ № 678–880, ♀ 10940, ♂ № 51429060, ♀ 1136, ♀ 9367, ♀ 9459, ♀ 1335, ♀ 11023, ♂ 51429057, ♀ 11437, ♀ 11023, ♀ 19046, ♀ 11036 и др. Ветви генеалогического древа этих животных ведут к основателю мутации B1 в белорусском поголовье — быку О. Ivanhoe 1189870 (ветвь Осборндэйл Иванхоу 1189870, линия Chieftain: 95679). Этот же бык показан как предок основателя второй

Таблица 2

Мониторинг частоты мутантных генотипов и аллелей локуса гена *SLC35A3* и локуса гена *CD18* популяции КРС, разводимого в Беларуси

Год	Количество проанализированных животных, n	Носители мутации гена <i>SLC35A3</i> (CVC), n	Соотношение выявленных мутантных генотипов по гену <i>SLC35A3</i> (CVM-синдром), %	Носители мутации гена <i>CD18</i> (BLC), n	Соотношение выявленных мутантных генотипов по гену <i>CD18</i> (BLAD-синдром), %
2015	1101	49	4,45	19	1,73
2016	620	21	3,39	2	0,32
2017	832	13	1,56	2	0,24
2018	376	8	2,13	2	0,53
I полугодие 2019	179	2	1,12	–	–
Всего	3108	93	в среднем 2,53%	25	в среднем 0,56%

Таблица 3

Частота генотипов и аллелей генов *SLC35A3* (CVM-синдром) и *CD18* (BLAD-синдром) в выборке из популяции КРС в Беларуси

Ген/синдром	Количество проанализированных животных, n	Частота генотипов			Частота аллелей		X ²
		n	wt/mt	mt/mt	wt (p ^{wt} ± Sp)	mt (p ^{mt} ± Sp)	
<i>SLC35A3</i> /CVM	3108	0,97	0,03	–	0,985 ± 0,003	0,015 ± 0,003	0,72
<i>CD18</i> /BLAD	3108	0,992	0,008	–	0,996 ± 0,001	0,004 ± 0,003	0,05

Примечание. wt — аллель дикого типа; mt — мутантный аллель; wt/wt — гомозиготный генотип с аллелями дикого типа, свободный от мутации; wt/mt — гетерозиготный генотип, с аллелями дикого и мутантного типа; mt/mt — гомозиготный генотип с мутантными аллелями

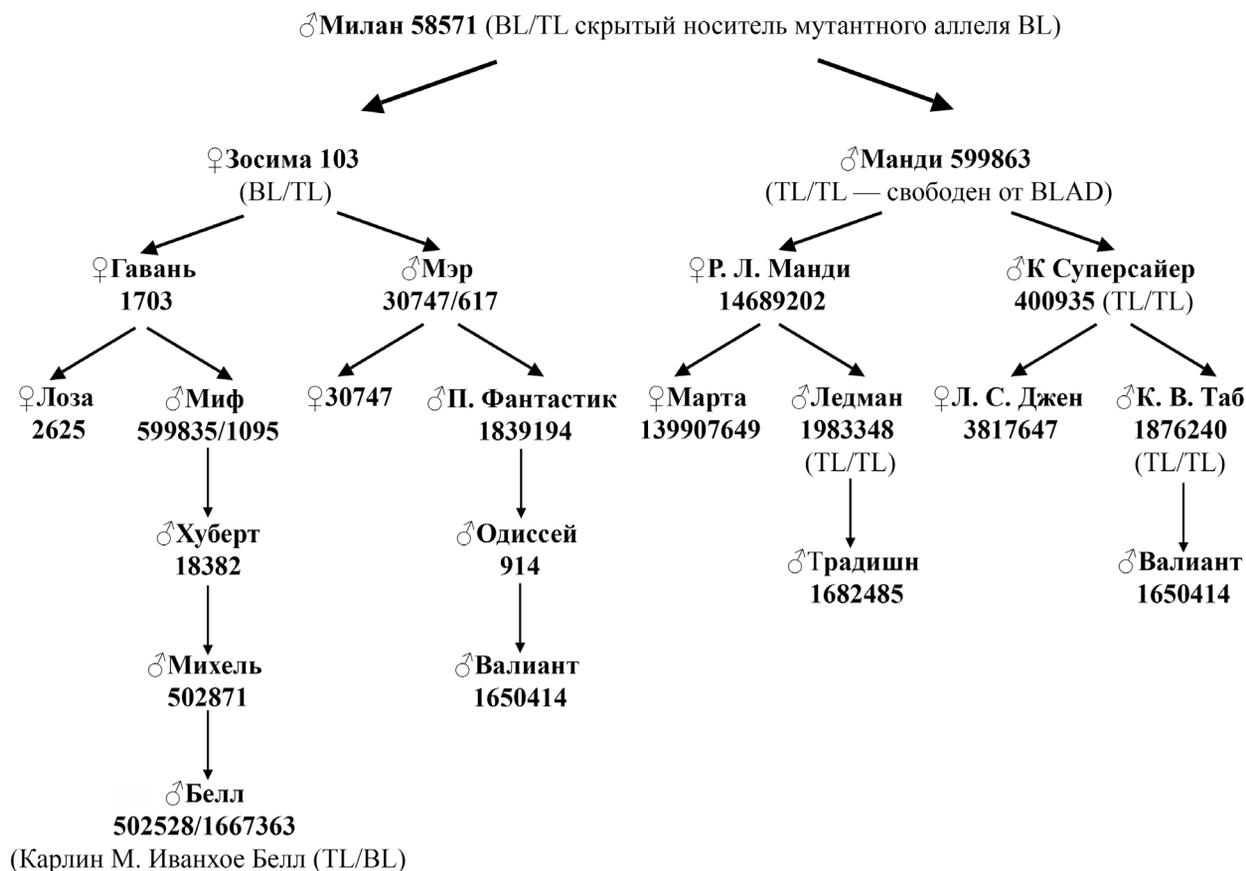


Рис. Генеологическая схема происхождения мутации в локусе гена *CD18* у быка белорусской селекции № 58571 (Милан) от знаменитого американского предка Карлин М. Айвенго Белл

мутации CV в белорусской популяции, что хорошо прослеживается по родословной прародителей особи № 47322, у которой выявлено два наследственных дефекта: CV и BL.

На дендрограмме (рисунок) показана генеалогия ♂Милана № 58571, который диагностирован как скрытый носитель мутации BL (BLC) гена *CD18*, предком которого является бык Белл 502528/1667363, потомок № USA000001667366 Carlin-M Ivanhoe BELL (линия Карлин М. Айвенго). Распространение мутации CV выявлено в линии Монтвик Чифтейна 95679, ветвь Осбордэйл Иванхое 1189870 (быки № 1070013, № 47322, № 60289, 29106) и в линии Вис Айдиала 933122 ветвь Тайди Бек Элевейшн 1271810 (быки № 60289, Алакатас/100516, № 93506/48742, № 87916/879166, № 10700131).

В линии Рефлекшн Соверинга 198998 ветвь Пони Фарм Арлинда Чифа 1427381 выявлены животные – скрытые носители мутаций BL и CV (№ 34125 (BLC, SVC) и CV (№ 30549 (CVC)).

Заключение

Таким образом, анализ генетической структуры популяций голштинской и черно-пестрой (голштинизированной) пород крупного рогатого скота в Беларуси по локусам генов *CD18* и *SLC35A3* показал присутствие в поголовье мутаций, обуславливающих развитие наследственных заболеваний. Частоты встречаемости мутантных аллелей BL гена *CD18*, (BLAD-синдром) и CV-аллеля гена *SLC35A3* (CVM-синдром) в белорусской популяции КРС составляет 0,004 и 0,015 соответственно.

Показаны современные линии и ветви КРС, разводимого в Беларуси, у которых выявлены животные – скрытые носители мутантных аллелей BL гена *CD18* и CV-аллеля гена *SLC35A3*.

Проведение ДНК-скрининга наследственных дефектов в популяции КРС и выведение из селекционного процесса скрытых носителей мутаций позволило снизить встречаемость гетерозиготных генотипов гена *CD18* с 3,76% (2008 г.) до 0,53% (2018 г.) и гена *SLC35A3* с 4,45% (2015 г.) до 1,56% (2017 г.).

Мутации генов *CD18* и *SLC35A3* относятся к гаплотипам фертильности ННВ и ННС, так как помимо физиологических сбоев развития организма они оказывают влияние на степень стельности и/или ассоциированы с эмбриональной и ранней постэмбриональной смертностью на различных стадиях [14].

Таким образом, необходимо контролировать частоту генетических дефектов, проводить ДНК-диагностику мутаций, обуславливающих развитие CVM- и BLAD-синдромов. Элиминация из стада животных — скрытых носителей вредных рецессивных мутаций позволяет внести вклад в совершенствование генофонда белорусских популяций сельскохозяйственных животных, расширяет возможности проведения мониторинга племенных животных в Республике Беларусь с целью оздоровления поголовья.

Список использованных источников

1. Жигачев, А. И. О накоплении груза мутаций в породах крупного рогатого скота при интенсивных технологиях воспроизводства и улучшения по целевым признакам / А. И. Жигачев, Л. К. Эрнст, А. С. Богачев // *Сельскохозяйственная биология*. – 2008. – Т. 6. – С. 25–32.
2. Nagahata, H. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) // *J. Vet. Med. Sci.* – 2004. – Vol. 66, № 12. – P. 1475–1482
3. Kehrli, M. E. Molecular Definition of The Bovine Granulocytopeny Syndrome: Identification of Deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) Glycoprotein, / M. E. Kehrli [et al.] // *Am. J. Vet. Res.* – 1990. – Vol. 51. – P. 1826.
4. Nagahata, H. Expression and role of adhesion molecule CD 18 on bovine neutrophils / H. Nagahata [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 1995. – Vol. 59. – P. 1–5.
5. Agerholm, J. S. Complex vertebral malformation in Holstein calves / J. S. Agerholm [et al.] // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13, 2001. – P. 283–289.
6. Гуськова, С. В. Основные генетические причины эмбриональных потерь в молочном скотоводстве, связанные с интенсивной селекцией по продуктивности / С. В. Гуськова [и др.]. – 2014. – Т. 4. – С. 67–71.
7. Усенбеков, Е. С. Генетическая природа наследственных болезней крупного рогатого скота и молекулярно-генетические методы их диагностики / Е. С. Усенбеков, К. Ж. Жуманов, В. П. Терлецкий // *Генетика и разведение животных*. – 2014. – Т. 3. – С. 9.
8. Генетическая природа наследственных болезней крупного рогатого скота и молекулярно-генетические методы их диагностики [электронный ресурс] / Ksu.edu.kz: Официальный сайт Костанайского государственного университета им. А. Байтурсынова. – Режим доступа: http://ksu.edu.kz/files/nauka/bejshova_i.pdf. – Дата доступа: 22.04.2018.
9. Михайлова, М. Е. ДНК-технологии выявления комплексной аномалии позвоночника (CVM) и дефицита лейкоцитарной адгезии (BLAD) у крупного рогатого скота методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени: метод. рекомендации / М. Е. Михайлова, А. И. Киреева, Е. В. Белая; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск: Право и экономика, 2014. – 10 с.
10. Шайдуллин, Р. Р. Характер распространения летальных генов у молочного скота / Р. Р. Шайдуллин, Т. Х. Фаизов, А. С. Ганиев // *Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана*. – 2015. – Т. 2. – С. 13.
11. Зиновьева, Н. А. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве / Зиновьева Н.А. [и др.]. // *Животноводство России*. – 2015. – № 6. – С. 30–31.
12. Генетические аномалии КРС [электронный ресурс] / Biofile.ru: Интернет портал публикаций статей. – Режим доступа: <http://biofile.ru/bio/6963.html>. – Дата доступа: 21.04.2018.
13. Михайлова, М. Е. Генетико-популяционные аспекты возникновения и распространения врожденных дефектов у крупного рогатого скота в Республике Беларусь // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. трудов*. – 2008. – Т. 8. – С. 152–160.
14. Зиновьева, Н. А. Гаплотипы фертильности голштинского скота // *Сельскохозяйственная биология*. – 2016. – Т. 51. – С. 423–435.

**M. E. Mikhaylova¹, R. I. Sheiko¹, A. I. Kireyeva¹, E. L. Romanishko¹, N. A. Kamysh¹, N. I. Tikhanovich¹,
O. A. Belyak¹, A. N. Bayakhov²**

DNA-SCREENING OF RECESSIVE MUTATIONS LEADING TO THE DEVELOPMENT OF HEREDITARY DEFECTS (BLAD- AND CVM-SYNDROMES) IN THE POPULATION OF CATTLE IN BELARUS

¹Institute of Genetics and Cytology of NASB

Minsk, 220072, the Republic of Belarus

²Kazakhstan University of Innovation and Telecommunication Systems

Uralsk, L02E6P1, Kazakhstan

Analysis of the genetic structure of the populations of Holstein and black-motley (Holstein) cattle breeds in Belarus was carried out by the loci of *CD18* and *SLC35A3* genes. The frequency of occurrence of mutant BL alleles of the *CD18* gene, causing the development of the BLAD syndrome and the CV allele of the *SLC35A3* gene (CVM syndrome) in the Belarus's cattle population is 0.004 and 0.015, respectively. DNA screening of hereditary defects in the cattle population and elimination of hidden mutation carriers from the breeding process allowed reducing the occurrence of heterozygous genotypes for *CD18* and *SLC35A3* genes from 1.73% (2015) to 0.53% (2018) and from 4.45% (2015) to 1.56% (2017), respectively.

Key words: cattle, inherited defects, mutations, BLAD syndrome, CVM syndrome.

Дата поступления статьи: 7 августа 2019 г.

М. Д. Амелянович, И. Б. Моссэ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ЭНДОКРИННОЙ ПАТОЛОГИИ (Обзорная статья)

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

В статье приведены данные об ассоциации ряда полиморфных вариантов генов эндокринной и сердечно-сосудистой систем с развитием ожирения, инсулинрезистентности, сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертензии. Исследование в белорусской популяции частот описанных полиморфных вариантов генов – маркеров риска развития эндокринной патологии позволит разработать эффективную технологию выявления групп повышенного риска среди населения. Использование молекулярно-генетического анализа в дополнение к стандартным диагностическим методам будет способствовать разработке персонализированных подходов к медицинской профилактике и лечению пациентов с сочетанными эндокринными заболеваниями.

Ключевые слова: полиморфные варианты, ожирение, сахарный диабет.

Введение

Метаболические заболевания и болезни щитовидной железы (ЩЖ) различной природы остаются массовой эндокринной патологией, существенно снижающей качество здоровья трудоспособного населения.

Актуальность проблемы медицинской профилактики моно- и сочетанных эндокринных заболеваний, нейроэндокринных и метаболических нарушений определяется не только высокой численностью пациентов, но и сохраняющейся тенденцией к росту заболеваемости, отсутствием единых подходов к оценке молекулярно-генетических рисков и проведению ранней медицинской профилактики сочетанных эндокринных и метаболических болезней, предиабета, сахарного диабета, аутоиммунной и неопластической патологии ЩЖ у лиц молодого возраста [1, 2].

Превентивная эндокринология — современное направление клинической медицины. Разработка новых технологий оценки генетического риска разных вариантов моно- и сочетанных эндокринных заболеваний, основанных на оценке фенотипических, нейроэндокринных и молекулярно-генетических особенностей конкретного индивидуума, позволит персонализировать медицинскую

профилактику, диагностические, лечебные и корригирующие подходы при тиреоидных и метаболических заболеваниях.

Ключевым компонентом с точки зрения предиктивной медицины является стратификация риска заболеваний. Чем раньше будет выявлен повышенный риск развития заболевания, тем эффективнее будет применение методов профилактики. Своевременная коррекция образа жизни и применение соответствующих медикаментозных препаратов позволит избежать тяжелых осложнений или вовсе предотвратить манифестацию заболевания.

Анализ молекулярно-генетических маркеров, влияющих на риск развития эндокринной патологии, и определение их ассоциации с фенотипическими и клиническими проявлениями заболевания позволит разработать эффективную технологию выявления групп риска среди населения.

Учитывая известные и предполагаемые механизмы развития сочетанной эндокринной патологии, для молекулярно-генетического анализа целесообразно использовать полиморфные варианты генов, связанные с развитием ожирения, инсулинрезистентности, СД 2 типа, артериальной гипертензии.

Полиморфные варианты в генах *APOA2* и *APOA5*

Ген *APOA2* кодирует аполипротеин А-II, являющийся одним из основных белковых компонентов липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Аполипротеин А-II обеспечивает транспорт холестерина и триглицеридов, кроме того, вероятно, участвует в метаболизме жиров и оказывает влияние на риск развития ожирения и атеросклеротического поражения сосудов [3].

Полиморфизм *rs5082* гена *APOA2*, по данным некоторых исследований, связан с риском развития ожирения [4]. Исследование, проведенное с участием 514 мужчин и 564 женщин, выявило статистически значимое увеличение индекса массы тела (ИМТ) у носителей генотипа *C/C* данного полиморфизма. Кроме того, для носителей генотипа *C/C* было характерно большее потребление жирной пищи в сравнении с носителями генотипов *C/T* и *T/T* [5, 6]. Также имеются данные о достоверных различиях в степени снижения веса в ответ на диету у лиц с разными генотипами по данному полиморфизму [7]. Таким образом, тестирование данного полиморфизма позволяет не только определить риск развития ожирения и атеросклероза, но и планировать мероприятия по профилактике и лечению.

Полиморфизмы в гене аполипротеина *A5* *APOA5* ассоциированы с уровнем липопротеинов в плазме крови, влияя на риск развития ожирения и сердечно-сосудистых заболеваний.

Полиморфный вариант *rs2075291* гена *APOA5* представляет собой замену гуанина на тимин, что приводит к замене глицина на цистеин в аминокислотной последовательности кодируемого белка. Распространенность минорного аллеля составляет 0,5–1,1% популяции. Проведенные исследования показали ассоциацию минорного аллеля данного полиморфизма с повышенным уровнем триглицеридов в крови, причем у гомозиготных носителей риск тяжелой гипертриглицеридемии был в 4,45 раз выше, чем у носителей нормального генотипа, а у гетерозиготных носителей — в 2 раза [8].

Полиморфный вариант *rs3135506* гена *APOA5* также влияет на уровень триглицеридов в плазме крови. Имеются данные о его связи с развитием артериальной гипертензии и

риском инфаркта миокарда [9], а также риском развития гипертриглицеридемии. При одновременном наличии минорных аллелей полиморфизмов *rs3135506*, *rs2075291*, *rs662799* риск значительно повышается [10].

Полиморфный вариант *rs662799* известен также как *-1131T>C*. Минорный аллель *C* встречается с частотой 13% в популяции. Данный полиморфный вариант ассоциирован с уровнем триглицеридов в плазме крови [11] и влияет на риск развития инфаркта миокарда (ИМ) в молодом возрасте [12].

Полиморфные варианты в генах *FTO* и *MC4R*

Ген *FTO* кодирует альфа-кетоглутарат зависимую диоксигеназу *FTO*, которая участвует в регуляции уровня метаболизма, энергетического баланса, термогенеза и контроле дифференцировки адипоцитов в бурые или белые жировые клетки [13].

В 2007 году Frayling T. M. с соавторами опубликовали результаты GWAS-исследования, в котором впервые была обнаружена связь гена *FTO* с риском развития диабета 2 типа [14]. Данная связь была опосредована влиянием гена *FTO* на массу тела. Так, у гомозиготных носителей аллеля *A* полиморфного варианта *rs9939609* средний вес был на 3 кг выше, а риск развития ожирения — в 1,67 раз выше, чем у гомозигот *G/G*. Распространенность альтернативного аллеля *A* в европейских популяциях составляет 45–55%. Носительство данного аллеля сопряжено со сниженным липолизом, нарушением контроля аппетита, отсутствием чувства насыщения после адекватного приема пищи. Проявление неблагоприятных эффектов начинается с раннего возраста [14].

Дальнейшие исследования показали, что полиморфные варианты в гене *FTO* связаны не только с повышенным ИМТ [15–17], но и с другими метаболическими нарушениями, такими как повышенный уровень инсулина натощак, глюкозы, триглицеридов, низкий уровень холестерина ЛПВП [18].

Проведенный Sihua Peng с соавторами метаанализ, включавший 59 случай-контроль исследований, подтвердил достоверную ассоциацию риска развития ожирения и пяти полиморфных вариантов гена *FTO*, находящихся в 47-килобазном блоке неравновесного

сцепления, охватывающем части первых двух интронов и экзон 2, : *rs9939609* (OR = 1,31, 95% CI 1,26–1,36), *rs1421085* (OR = 1,43, 95% CI 1,33–1,53), *rs8050136* (OR = 1,25, 95% CI 1,13–1,38), *rs17817449* (OR = 1,54, 95% CI 1,41–1,68) и *rs1121980* (OR = 1,34, 95% CI 1,10–1,62) [19].

Несколько исследований подтверждают связь с ожирением и для полиморфного варианта *rs1121980* гена *FTO*. Так, исследование, включавшее молекулярно-генетическое тестирование образцов ДНК 487 молодых немцев с ожирением, показало увеличение риска развития ожирения у гетерозиготных носителей минорного аллеля *T* в 1,67 раза (95% CI 1,22–2,27), а у гомозиготных — в 2,76 раза (95% CI 1,88–4,03) [19].

Ген *MC4R* кодирует рецептор 4 меланокортина, являющийся частью меланокортин-ергического сигнального пути, ответственного за регуляцию пищевого поведения. Связь рецептора *MC4R* с контролем аппетита была показана на мышах, у которых нарушение синтеза данного рецептора приводило к ожирению и инсулинрезистентности (ИР). Также было показано, что стимуляция данного рецептора меланоцитстимулирующим гормоном и другими лигандами приводит к подавлению аппетита.

Полиморфный вариант *rs2229616* связан с регуляцией аппетита, ИМТ и, соответственно, ожирением, а также другими проявлениями метаболического синдрома. Так, носители минорного аллеля (распространенность менее 10% в популяции) имели меньшую окружность талии, более низкий уровень гликированного гемоглобина и более высокий уровень ЛПВП, что рассматривается как протекторный эффект [20].

Известен и еще один полиморфный вариант — *rs17782313*, расположенный недалеко от гена *MC4R*. Аллель *C* данного полиморфного варианта ассоциирован с избыточным потреблением пищи, ранней гиперинсулинемией, повышенным ИМТ и высоким риском развития ожирения [21].

Полиморфные варианты в генах *LEP*, *LEPR* и *GNB3*

С момента открытия лептина и обнаружения его роли в регуляции аппетита, а также выявления взаимосвязи уровня сывороточ-

ного лептина с ожирением, было проведено множество исследований по поиску полиморфных вариантов в генах, кодирующих как сам гормон (*LEP*), так и его рецептор (*LEPR*). В настоящее время известно около 10 полиморфных вариантов гена *LEP* и более 30 — гена *LEPR*, кроме того описаны моногенные формы ожирения, связанные с недостаточным синтезом лептина или его рецептора. Однако исследования связи полиморфных вариантов с ожирением показали значительную вариабельность результатов в зависимости от изучаемой популяции [22, 23].

Наиболее изученным на данный момент является полиморфный вариант *rs7799039* гена *LEP* (-2548 G/A). Многими исследователями была показана ассоциация носительства -2548 G аллеля данного полиморфизма с развитием ожирения [24, 25], в то же время описаны и совершенно противоположные результаты [26].

Наиболее изучаемым полиморфным вариантом гена *LEPR* является *rs1137101*. По данным метаанализа, результаты которого были опубликованы в 2016 году, данный полиморфизм показал значимую связь с риском развития СД 2 типа во всех проанализированных исследованиях [27].

Ген *GNB3* кодирует бета 3 субъединицу G-белка, который является вторичным посредником во внутриклеточных сигнальных каскадах. Полиморфный вариант *rs5443* представляет собой замену цитозина на тимин в положении 825 кодирующей области гена, что приводит к нарушению аминокислотной последовательности кодируемого белка. Распространенность аллеля *T* в популяции составляет 33–36%. Во многих исследованиях была показана связь аллеля *T* полиморфизма *rs5443* с развитием таких метаболических нарушений, как ожирение, ИР, СД 2 типа, артериальная гипертензия и гипертрофия левого желудочка [28].

Полиморфные варианты в гене *LPL*

Липопротеинлипаза (*LPL*) является ключевым ферментом в метаболизме липидов человека, который способствует удалению богатых триглицеридами липопротеинов из кровотока. *LPL* гидролизует ядро богатых триглицеридами липопротеинов (хиломикроны и липопротеины

очень низкой плотности) в свободные жирные кислоты и моноацилглицерин.

Для изучения влияния липопротеинлипазы на различные ткани организма были разработаны трансгенные и нокаутные модели тканеспецифической экспрессии *LPL*. У мышей со сверхэкспрессией *LPL* в скелетных мышцах происходит накопление триглицеридов, развивается резистентность к инсулину, кроме того, отмечается увеличение скорости метаболизма в холодное время и отсутствие чрезмерного увеличения веса [29]. У мышей с делецией *LPL* в скелетных мышцах снижается накопление триглицеридов и усиливается действие инсулина на транспорт глюкозы. В конечном итоге это приводит к увеличению распределения липидов в других тканях, резистентности к инсулину и ожирению. У мышей с делецией *LPL* в сердечной ткани развивается гипертриглицеридемия и сердечная дисфункция [30].

Таким образом, липопротеинлипаза является ферментом, который регулирует метаболизм липопротеинов, а также влияет на риск развития ожирения и других метаболических нарушений, которые связаны с энергетическим балансом, действием инсулина и регулированием массы тела. Участие липопротеинлипазы в регуляции уровней холестерина и триглицеридов в плазме крови обеспечивает влияние данного фермента на риск развития атеросклероза, инфаркта миокарда и других осложнений, связанных с нарушением метаболизма жиров в организме.

Описаны мутации в гене *LPL*, которые вызывают дефицит липопротеинлипазы, что приводит к гиперлипотеинемии I типа, в то же время имеются полиморфные варианты в данном гене, связанные с нарушением метаболизма липопротеинов [31].

Полиморфные варианты гена *ADD1*

В гене *ADD1*, кодирующем белок аддуцин, описаны два полиморфных варианта, существенно повышающих риск развития артериальной гипертензии. Полиморфный вариант *rs4961* приводит к замене глицина на триптофан в положении 460 аминокислотной последовательности белка. Исследование, включавшее молекулярно-генетическое тестирование 477 пациентов, показало увеличение риска

развития артериальной гипертензии (АГ) у гомозиготных носителей аллеля *T* (OR = 1,8, 95% CI 1,32–2,43). Кроме того, в этом же исследовании было обнаружено, что при проведении терапии диуретиками в сочетании с диетой, исключающей потребление соли, показатели артериального давления (АД) у носителей *T* аллеля снижались в большей степени, чем у носителей аллеля *G* [32].

Похожие результаты были получены при исследовании ассоциации полиморфного варианта *rs4961* с развитием ИМ на фоне артериальной гипертензии. Показано достоверное снижение количества случаев ИМ и ишемического инсульта у носителей *T* аллеля при лечении АГ приемом диуретиков [33]. Также имеются сведения о влиянии полиморфных вариантов *rs880054* гена *WNK1* и *rs4149601* гена *NEDD4L* на эффект от *rs4961* [34].

Таким образом, проведение молекулярно-генетического тестирования полиморфного варианта *rs4961* позволяет не только определять группы повышенного риска развития АГ и осложнений в виде ИМ и ишемического инсульта, но и проводить персонализированную терапию конкретного пациента.

Несмотря на большое количество исследований, подтверждающих ассоциацию данного полиморфизма с уровнем АД и ответом на антигипертензивную терапию, встречаются результаты метаанализов, отрицающие какое-либо влияние *rs4961* на риск развития АГ, а также результаты исследований, не подтвердившие различий в реакции пациентов в зависимости от генотипа на проводимую терапию [35, 36].

Полиморфные варианты гена *NEDD4L*

Ген *NEDD4L* кодирует убиквитинлигазу семейства NEDD4, которая играет важнейшую роль в поддержании водно-солевого баланса организма, путем взаимодействия с эпителиальными натриевыми каналами в почечных канальцах. При синдроме Лиддла убиквитинлигаза NEDD4L не связывается с натриевым каналом, что приводит к усиленной реабсорбции натрия и секреции калия в дистальных почечных канальцах, что, в конечном итоге, проявляется артериальной гипертензией, снижением активности ренина и альдостерона в крови [37].

Полиморфный вариант *rs4149601*, вероятно, влияющий на экспрессию гена *NEDD4L*, ассоциирован с риском развития АГ. Данная взаимосвязь была подтверждена несколькими независимыми исследованиями. Результаты проведенного Nordic Diltiazem Study показали, что носители *G* аллеля полиморфного варианта *rs4149601* при проведении антигипертензивной терапии бетаблокаторами и диуретиками имели большее снижение уровня АД по сравнению с носителями аллеля *A*, кроме того, риск развития сердечно-сосудистых осложнений у этих пациентов был в 2 раза ниже [38].

Имеются сведения о влиянии данного полиморфного варианта на риск развития ожирения. Так, анализ результатов генотипирования 892 представителей южнокитайской популяции показал, что у носителей минорного аллеля *A* в среднем вес был ниже на 2,60 кг, объем талии — меньше на 2,78 см, а ИМТ — на 0,97 кг/м² ниже по сравнению с носителями аллеля *G* [39].

Ген разобщающего белка 2 (*UCP2*)

UCP2 принадлежит к семейству митохондриальных транспортных белков, разобщающих окислительное фосфорилирование. *UCP2* выступает в роли канала, по которому жирные кислоты могут покидать митохондриальный матрикс, регулируя процесс их окисления [40]. Его роль в патогенезе ишемической болезни сердца (ИБС) связана с окислением липидов и участием в оксидативном стрессе. *G* аллель полиморфного варианта *rs660339* гена *UCP2* также ассоциируется со снижением уровня ЛПВП и повышением индекса атерогенности.

Разобщающий белок 2 (*UCP2*) — фермент, препятствующий выработке инсулина клетками поджелудочной железы. При потреблении продуктов с высоким содержанием жира экспрессия *UCP2* в белых адипоцитах повышается, что свидетельствует о влиянии *UCP2* на скорость метаболизма и, возможно, на резистентность к развитию ожирения. Таким образом, генетические изменения в гене *UCP2* влияют на патогенез ожирения и СД 2 типа.

Показано, что *UCP2*, благодаря своей активности, играет важную роль в патофизиологии диабета 2 типа. В частности, гипергликемия

вызывает патологическую активацию *UCP2* в панкреатических островках, которая, в свою очередь, приводит к снижению стимулированной глюкозой секреции инсулина [41].

Физиологические функции белков семейства *UCP* остаются до конца неизученными, однако считается, что *UCP2*, благодаря своей активности, играет важную роль в патофизиологии диабета 2 типа. Также имеются сведения о влиянии *UCP2* на солевой обмен в организме, что, в конечном счете, может приводить к нарушению регуляции артериального давления [42].

Для оценки наследственной предрасположенности к инсулинрезистентности и СД 2 типа наибольший интерес представляют полиморфные варианты *Ala55Val* и *-866G/A* гена *UCP2*, приводящие к функциональным изменениям в белке и влияющие на экспрессию гена [43].

Полиморфные варианты гена *NTN1*

Ген *NTN1* кодирует фермент нетрин-1, основная функция которого состоит в направлении роста аксонов во время эмбриогенеза [44]. В последнее время было показано, что нетрин-1 стимулирует выработку оксида азота (NO), способствуя миграции и пролиферации эндотелиальных клеток сосудов и сердца [45, 46].

В сосудистой системе было охарактеризовано по меньшей мере восемь рецепторов нетрина. Связывание нетрина-1 с DCC-рецептором вызывает подавление апоптоза [47, 48], онкогенеза [49] и ангиогенеза [50]. Изучение действия нетрина-1 на модельных диабетических животных показало, что экзогенное введение нетрина-1 оказывает кардиопротективный эффект против ишемии/реперфузии. Нетрин-1 устраняет индуцированную ишемией сердечную дисфункцию митохондрий посредством NO-зависимого ослабления активности NADPH-оксидазы и восстановления NOS [51]. Кроме того, при ишемическом повреждении почки, подавление нетрина-1 усиливает воспалительные процессы, тогда как избыточная экспрессия нетрина-1 вызывает регенерацию сосудов и подавляет воспаление и апоптоз при диабетической нефропатии [52].

В экспериментах *in vitro* было показано стимулирующее влияние нетрина-1 на секрецию инсулина. После четырехнедельного

непрерывного воздействия было продемонстрировано гипогликемическое свойство нетрина-1, что, вероятно, обусловлено улучшением функции β -клеток, так как наблюдалось увеличение содержания инсулина и экспрессии мРНК препроинсулина. У мышей со стрептозотоцин-индуцированным диабетом наблюдалось усиление васкуляризации островков, уменьшение инфильтрации островковых макрофагов и ослабление системного воспаления после введения нетрина-1 [53].

Проведенное Yim J с соавторами исследование показало значительное увеличение концентрации нетрина-1 в крови пациентов с СД 2 типа. Наблюдалась корреляция между концентрацией нетрина-1 и уровнями глюкозы натощак, гликированного гемоглобина, а также индексом инсулинрезистентности. Таким образом, повышенный уровень нетрина-1 может быть независимым прогностическим фактором наличия нарушений метаболизма глюкозы и СД 2 типа [54]. Кроме того, уровень нетрина-1 повышался при развитии хронической почечной недостаточности и альбуминурии на фоне СД 2 типа [55].

Полиморфные варианты генов *SMAD3* и *PRKAA2*

Фактор транскрипции SMAD3 является важным медиатором TGF- β -сигнального пути, регулирующего транскрипцию генов с SMAD-связывающими элементами. При стимуляции рецептора TGF- β происходит последовательная фосфорилиция TGF- β II типа, TGF- β I типа и SMAD3. Затем фосфорилированный SMAD3 образует комплекс с общим SMAD4, который впоследствии транслоцируется в ядро и регулирует транскрипцию [56, 57].

Исследование роли TGF- β /SMAD3 сигнального пути в развитии и прогрессировании атеросклеротического поражения сосудов показало заметное увеличение экспрессии *SMAD3* и других белков SMAD в фиброзно-жировых поражениях, причем экспрессия в основном ограничена CD68-позитивными макрофагами и пенными клетками. И наоборот — в фиброзных атеросклеротических бляшках высокий уровень экспрессии *SMAD3* наблюдается в клетках гладкой мускулатуры сосудов, что позволяет предположить, что роль *SMAD3* в развитии и прогрессировании

атеросклероза зависит от типа клеток и стадии атеросклероза. Более высокая экспрессия *SMAD3* в фиброзной бляшке совпадает с TGF- β -опосредованным синтезом коллагена и других белков внеклеточного матрикса, которые способствуют стабилизации бляшки [58–60]. Кроме того, показано, что TGF- β /SMAD3 сигнальный путь участвует в регуляции метаболизма глюкозы и поддержании энергетического гомеостаза. Наблюдается значительная корреляция между уровнями TGF- β и ожирением у грызунов и людей. Кроме того, системная блокада передачи сигналов TGF- β защищает мышей от ожирения, диабета и стеатоза печени [61]. Показана связь полиморфных вариантов в гене *SMAD3* с уровнем циркулирующих в крови липидов, а также с индексом массы тела в китайской популяции [62].

Ген *PRKAA2* кодирует белок, являющийся каталитической субъединицей АМФ-активированной протеинкиназы (АМФК). АМФК представляет собой гетеротример, состоящий из каталитической субъединицы альфа- и некаталитических бета- и гамма-субъединиц. АМФК является ферментом, который контролирует клеточный энергетический статус. АМФК активируется в ответ на клеточные метаболические стрессы и инактивирует ацетил-СоА-карбоксилазу и бета-гидрокси-бета-метилглутарил-СоА-редуктазу, участвующие в регуляции биосинтеза жирных кислот и холестерина. Исследования на мышах показали, что эта каталитическая субъединица может контролировать чувствительность к инсулину и необходима для поддержания энергетического гомеостаза миокарда во время ишемии [63].

Кроме того, АМФК — это фермент, который активируется физиологическими и фармакологическими стимулами, включая сокращение мышц [64], антидиабетический препарат метформин [65] и адипокины, такие как лептин [66] или адипонектин [67]. Активация АМФК в скелетных мышцах приводит к увеличению поглощения глюкозы и повышенной чувствительности к инсулину [68], тогда как в печени активация АМФК ингибирует выработку глюкозы [69]. Эти характеристики АМФК делают этот фермент одним из ключевых регуляторов чувствительности к инсулину и гомеостаза глюкозы.

Группа исследователей из Японии в 2006 г. опубликовала результаты исследования, в котором они секвенировали ген *PRKAA2* для поиска полиморфных вариантов, связанных с риском развития СД 2 типа. Было обнаружено 10 полиморфных вариантов, однако ни один из них не имел статистически значимой ассоциации с СД 2 типа. В то же время была показана взаимосвязь полиморфного варианта *rs2051040* с инсулинрезистентностью [70].

Заключение

Исследование частот описанных полиморфных вариантов в белорусской популяции и анализ ассоциации с риском развития эндокринной патологии позволят определить наиболее информативные молекулярно-генетические маркеры для создания эффективной технологии выявления групп риска среди населения.

Использование молекулярно-генетического анализа в дополнение к стандартным диагностическим методам будет способствовать разработке персонализированных подходов к медицинской профилактике, в последующем — диагностическим алгоритмам и лечению пациентов с сочетанными эндокринными заболеваниями.

Список использованных источников

1. Данилова, Л.И. Гиполипидемическая терапия при метаболическом синдроме, предиабете, сахарном диабете / Л.И. Данилова, — Минск: Доктор Дизайн, 2011. — 47 с.
2. Данилова, Л.И. Сахарный диабет 2 типа: изменились ли подходы к его лечению? / Л.И. Данилова, — *ARS Medica*, 2011. — № 10. — С. 31–43.
3. Evidence for linkage of the apolipoprotein A-II locus to plasma apolipoprotein A-II and free fatty acid levels in mice and humans / C.H. Warden [et al.]. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1993. — Vol. 90. — P. 10886–10890.
4. The -256T>C polymorphism in the apolipoprotein A-II gene promoter is associated with body mass index and food intake in the genetics of lipid lowering drugs and diet network study / D. Corella [et al.]. — *Clin Chem*, 2007. — Vol. 53. — P. 1144–1152.
5. APOA2, dietary fat, and body mass index. Replication of a gene–diet interaction in 3 independent populations / D. Corella [et

al.]. — *Arch Intern Med*, 2009. — Vol. 169. — P. 1897–1906.

6. Association between the APOA2 promoter polymorphism and body weight in Mediterranean and Asian populations: replication of a gene–saturated fat interaction / D. Corella [et al.]. — *Int J Obes*, 2011. — Vol. 35. — P. 666–675.

7. Apolipoprotein A-II polymorphism: relationships to behavioural and hormonal mediator of obesity / C.E. Smith [et al.]. — *Int J Obes*, 2012. — Vol. 36, № 1. — P. 130–136.

8. An apolipoprotein A-V gene SNP is associated with marked hypertriglyceridemia among Asian-American patients / C.R. Pullinger [et al.]. — *J Lipid Res*, 2008. — Vol. 49. — P. 1846–1854.

9. The influence of APOAV polymorphisms (T-1131>C and S19>W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction / J.A. Hubacek [et al.]. — *Clin. Genet*, 2004. — Vol. 65. — P. 126–130.

10. APOA5 polymorphisms influence plasma triglycerides in young, healthy African Americans and whites of the CARDIA Study / K.L. Klos [et al.]. — *J Lipid Res*, 2005. — Vol. 46, № 3. — P. 564–571.

11. Polygenic determinants of severe hypertriglyceridemia / J. Wang [et al.]. — *Hum Mol Genet*, 2008. — Vol. 17. — P. 2894–2899.

12. Strong association of the APOA-1131T>C gene variant and early-onset acute myocardial infarction / R. De Caterina [et al.]. — *Atherosclerosis*, 2011. — Vol. 214, № 2. — P. 397–403.

13. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity / Z. Han [et al.]. — *Nature*, 2010. — Vol. 464, № 7292. — P. 1205–1209.

14. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity / T.M. Frayling [et al.]. — *Science*, 2007. — Vol. 316. — P. 889–894.

15. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits / A. Scuteri [et al.]. — *Plos Genetics*, 2007. — Vol. 3. — P. 1200–1210.

16. Replication of the association of common rs9939609 variant of FTO with increased BMI in an Australian adult twin population but no evidence for gene by environment (G × E) interaction / B.K. Cornes [et al.]. —

- International Journal of Obesity, 2009. – Vol. 33. – P. 75–79.
17. FTO variants are associated with obesity in the Chinese and Malay populations in Singapore / J.T. Tan [et al.]. – *Diabetes*, 2008. – Vol. 57. – P. 2851–2857.
18. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI / R.M. Freathy [et al.]. – *Diabetes*, 2008. – Vol. 57. – P. 1419–1426.
19. FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis / S. Peng [et al.]. – *BMC Med*, 2011. – Vol. 9. – P. 71.
20. Association of the 1031 MC4R allele with decreased body mass in 7 937 participants of two population based surveys / I.M. Heid [et al.]. – *J Med Genet*, 2005.
21. The common obesity variant near MC4R gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change and diabetes risk in women / L. Qi [et al.]. – *Human Molecular Genetics*, 2008. – Vol. 17, № 22. – P. 3502–3508.
22. Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects / A. Constantin [et al.]. – *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. – Vol. 391. – P. 282–286.
23. Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain / O. Portoles [et al.]. – *Eur J Epidemiol*, 2006. – Vol. 21. – P. 605–612.
24. G-2548A polymorphism of the leptin gene is correlated with extreme obesity in Taiwanese aborigines / T.N. Wang [et al.]. – *Obesity (Silver Spring)*, 2006. – Vol. 14. – P. 183–187.
25. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin / J. Hoffstedt [et al.]. – *Horm Metab Res*, 2002. – Vol. 34. – P. 355–359.
26. Nieters, A. Polymorphisms in candidate obesity genes and their interaction with dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids affect obesity risk in a sub-sample of the EPIC-Heidelberg cohort / A. Nieters, N. Becker, J. Linseisen, – *Eur J Nutr*, 2002. – Vol. 41. – P. 210–221.
27. Variations in the obesity gene “LEPR” contribute to risk of type 2 diabetes mellitus: evidence from a meta-analysis / M.M. Yang [et al.]. – *Journal of diabetes research*, 2016.
28. Siffert, W. G protein beta 3 subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy / W. Siffert. – *Nephrol Dial Transplant*, 2000. – Vol. 15, № 9. – P. 1298–1306.
29. High lipoprotein lipase activity increases insulin sensitivity in transgenic rabbits / E. Liu [et al.]. – *Metab. Clin. Exp.*, 2005. – Vol. 54. – P. 132–138.
30. Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits improves hyperlipidemia and obesity / T. Koike [et al.]. – *J Biol Chem*, 2004. – Vol. 279. – P. 7521–7529.
31. Kathiresan, S., Defining the spectrum of alleles that contribute to blood lipid concentrations in humans / S. Kathiresan, K. Musunuru, M. Orho-Melander. – *Curr. Opin. Lipidol*, 2008. – Vol. 19. – P. 122–127.
32. Cardiovascular risk in relation to α -adducin Gly460Trp polymorphism and systolic pressure. A prospective population study / Y. Li [et al.]. – *Hypertension*, 2005. – Vol. 46. – P. 527–532.
33. Diuretic therapy, the alpha-adducin gene variant, and the risk of myocardial infarction or stroke in persons with treated hypertension / B.M. Psaty [et al.]. – *JAMA*, 2002. – Vol. 287, № 13. – P. 1680–1689.
34. Physiological interaction between alpha-adducin and WNK1-NEDD4L pathways on sodium-related blood pressure regulation / P. Manunta [et al.]. – *Hypertension*, 2008. – Vol. 52. – P. 366–372.
35. Antihypertensive therapy, the alpha-adducin polymorphism, and cardiovascular disease in high-risk hypertensive persons: The Genetics of Hypertension-Associated Treatment Study / B.R. Davis [et al.]. – *Pharmacogenomics J*, 2007. – Vol. 7, № 2. – P. 112–122.
36. Alpha-adducin polymorphism associated with increased risk of adverse cardiovascular outcomes: Results from GENetic Substudy of the INternational Verapamil SR-trandolapril Study (INVEST-GENES) / T. Gerhard [et al.]. – *Am. Heart J*, 2008. – Vol. 156, № 2. – P. 397–404.
37. Rotin, D. Role of the UPS in Liddle syndrome / D. Rotin. – *BMC Biochem*, 2008. – Vol. 9, Suppl 1. – P. 1–7.

38. A functional variant of the NEDD4L gene is associated with beneficial treatment response with β -blockers and diuretics in hypertensive patients / P. Svensson-Farbom [et al.]. – *J. Hypertens*, 2011. – Vol. 29. – P. 388–395.
39. A Functional Variant of NEDD4L Is Associated with Obesity and Related Phenotypes in a Han Population of Southern China / Y.L. Wang [et al.]. – *Int J Mol Sci*, 2013. – Vol. 14. – P. 7433–7444.
40. Structural organization and mutational analysis of the human uncoupling protein-2 (hUCP2) gene / N. Tu [et al.]. – *Life Sci*, 1999. – Vol. 64. – P. 41–50.
41. The common 866G/A polymorphism in the promoter region of the UCP-2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes in Caucasians from Italy / A. Bulotta [et al.]. – *J. Clin. End. Metab*, 2005. – Vol. 90. – P. 1176–1180.
42. Lombard, J.H. Uncoupling Protein 2 (UCP2): Another Player in the Complex Drama of Vascular Salt Sensitivity / J.H. Lombard. – *Am J Hypertens*, 2010. – Vol. 23, № 8. – P. 816.
43. Associations between UCP1 -3826A/G, UCP2 -866G/A, Ala55Val and Ins/Del, and UCP3 -55C/T polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: case-control study and meta-analysis / B.M. de Souza [et al.]. – *PLoS ONE*, 2013. – Vol 8, № 1. – e54259.
44. Arakawa, H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis / H. Arakawa. – *Nat Rev Cancer*, 2004. – P. 978–987.
45. Nguyen, A. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism / A. Nguyen, H. Cai. – *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. – Vol. 103. – P. 6530–6535.
46. Zhang, J. Netrin-1 prevents ischemia/reperfusion-induced myocardial infarction via a DCC/ERK1/2/eNOS s1177/NO/DCC feed-forward mechanism / J. Zhang, H. Cai. – *J Mol Cell Cardiol*, 2010. – Vol. 48. – P. 1060–1070.
47. Wu, T.W. Netrin-1 attenuates ischemic stroke-induced apoptosis / T.W. Wu, W.W. Li, H. Li. – *Neuroscience*, 2008. – Vol. 156. – P. 475–482.
48. Netrin-1 protects hypoxia-induced mitochondrial apoptosis through HSP27 expression via DCC- and integrin α 6 β 4-dependent Akt, GSK-3 β , and HSF-1 in mesenchymal stem cells / T.W. Son [et al.]. – *Cell Death Dis.* – 2013. – Vol. 4. – e563.
49. Deleted in colorectal carcinoma suppresses metastasis in p53-deficient mammary tumours / P. Krimpenfort [et al.]. – *Nature*, 2012. – Vol. 482. – P. 538–541.
50. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor / K.W. Park [et al.]. – *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004. – Vol. 101. – P. 16210–16215.
51. Netrin-1 abrogates ischemia/reperfusion-induced cardiac mitochondrial dysfunction via nitric oxide-dependent attenuation of NOX4 activation and recoupling of NOS / K.L. Siu [et al.]. – *J Mol Cell Cardiol*, 2015. – Vol. 78. – P. 174–185.
52. Kidney proximal tubular epithelial-specific overexpression of netrin-1 suppresses inflammation and albuminuria through suppression of COX-2-mediated PGE2 production in streptozotocin-induced diabetic mice / R. Mohamed [et al.]. – *Am J Pathol*, 2012. – Vol. 181. – P. 1991–2002.
53. Dual actions of Netrin-1 on islet insulin secretion and immune modulation / S. Gao [et al.]. – *Clin Sci*, 2016. – Vol. 130. – P. 1901–1911.
54. Relationship between circulating netrin-1 concentration, impaired fasting glucose, and newly diagnosed type 2 diabetes / J. Yim [et al.]. – *Front Endocrinol*, 2018. – P. 691.
55. Evaluation of Netrin-1 levels and albuminuria in patients with diabetes / E. Ay [et al.]. – *J Clin Lab Anal*, 2016. – Vol. 30, № 6. – P. 972–977.
56. Derynck, R. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling / R. Derynck, Y.E. Zhang. – *Nature*, 2003. – Vol. 425. – P. 577–584.
57. Akhurst, R.J. Targeting the TGF β signalling pathway in disease / R.J. Akhurst, A. Hata. – *Nat Rev Drug Discov*, 2012. – Vol. 11. – P. 790–811.
58. Smad expression in human atherosclerotic lesions: evidence for impaired TGF- β /Smad signaling in smooth muscle cells of fibrofatty lesions / N. Kalinina [et al.]. – *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. – Vol. 24, № 8. – P. 1391–1396.
59. Bobik, A. Transforming growth factor- β s and vascular disorders / A. Bobik. –

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. – Vol. 26. – P. 1712–1720.

60. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis / I.M. Van de Laar [et al.]. – Nat Genet, 2011. – Vol. 43, № 2. – P. 121–126.

61. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β / Smad 3 signaling / H. Yadav [et al.]. – Cell Metab, 2012. – Vol. 14. – P. 67–79.

62. Quantitative candidate gene association studies of metabolic traits in Han Chinese type 2 diabetes patients / F.J. Wei [et al.]. – Genet Mol Res, 2015. – Vol. 4. – P. 15471–15481.

63. The Last Enzyme of the De Novo Purine Synthesis Pathway 5-aminoimidazole-4-carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase (ATIC) Plays a Central Role in Insulin Signaling and the Golgi/Endosomes Protein Network / M. Boutchueng-Djijou [et al.]. – Mol Cell Proteomics, 2015. – Vol. 14, № 4. – P. 1079–1092.

64. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle / J. Mu [et al.]. – Molec Cell, 2001. – Vol. 7. – P. 1085–1094.

65. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action / G. Zhou [et al.]. – J Clin Invest, 2001. – Vol. 108. – P. 1167–1174.

66. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase / Y. Minokoshi [et al.]. – Nature, 2002. – Vol. 415. – P. 339–343.

67. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase / T. Yamachi [et al.]. – Nat Med, 2002. – Vol. 8. – P. 1288–1295.

68. AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle / N. Musi [et al.]. – Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. – Vol. 280. – P. 677–684.

69. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver / M. Foretz [et al.]. – Diabetes, 2005. – Vol. 54. – P. 1331–1339.

70. A polymorphism in the AMPK α 2 subunit gene is associated with insulin resistance and type 2 diabetes in the Japanese population / M. Horikoshi [et al.]. – Diabetes, 2006. – Vol. 55. – P. 919–923.

M. D. Ameliyanovich, I. B. Mosse

**MOLECULAR GENETIC RISK MARKERS OF ENDOCRINE
PATHOLOGY DEVELOPMENT
(Review Article)**

Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

The review presents data on the associations of multiple gene variants involved in different endocrine and cardiovascular systems with a risk of obesity, insulin resistance, diabetes mellitus and arterial hypertension. The evaluation of described polymorphic variant frequencies in the Belarusian population will allow developing an effective technology to identify high-risk groups in the population. Using molecular genetic analysis in addition to standard diagnostic methods will contribute to the development of personalized approaches to medical prophylaxis and treatment of patients with combined endocrine disorders.

Key words: polymorphic variants, obesity, diabetes mellitus.

Дата поступления статьи: 31 августа 2019 г.

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 27

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

Подписано в печать 01.10.2019. Формат 60×84^{1/8}. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 12,79. Уч.-изд. л. 7,52. Тираж 100 экз. Заказ № 8743.

Отпечатано в типографии УП «Донарит».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/108 от 07.04.2014.
220030, г. Минск, ул. Октябрьская, 25.

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