

ISSN 1999-9127

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

# **МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА**

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ  
ТОМ 32**

Издается с 2005 года  
Выходит два раза в год

Минск  
2022

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, 2022. — Т. 32. — 132 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, Н. И. Дубовец, В. В. Титок, И. П. Шейко,  
О. Н. Харкевич — члены редколлегии;  
Е. М. Селихова — ответственный секретарь.

УДК [577.21+575] (082)  
ISSN 1999-9127

Институт генетики  
и цитологии НАН Беларуси, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Е. В. Дрозд, О. Г. Бабак, Н. А. Некрашевич, Н. В. Анисимова, Т. В. Никитинская, К. К. Яцевич, И. В. Гашикова, А. М. Артемьева, А. В. Кильчевский</i> Изучение особенностей накопления антоцианов у <i>Solanum melongena</i> L. в зависимости от полиморфизма генов R2R3 Мyb-активатора .....	6
<i>В. А. Лемеш, Г. В. Мозгова, В. Н. Кипень, Л. В. Хотылёва</i> Полиморфизм аллелей, ассоциированных с устойчивостью к низким температурам, у представителей семейства <i>Brassicaceae</i> с широким ареалом распространения .....	18
<i>Е. П. Михаленко, А. Н. Щаюк, М. Н. Шепетько, Ю. В. Полюхович, Т. В. Никитинская, А. В. Кильчевский</i> Изучение генетического полиморфизма DNMT3B ДНК-метилтрансферазы у пациентов с немелкоклеточным раком легкого .....	28
<i>О. Ч. Мазур, Е. П. Михаленко, С. В. Байко, О. М. Мальшева, И. В. Шевчук, А. В. Кильчевский, А. В. Сукало</i> Спектр мутаций у детей с изолированными и синдромальными формами врожденных аномалий мочевых путей и почек .....	44
<i>И. Б. Моссэ, Н. Г. Седляр, А. С. Бабенко, К. А. Моссэ, Р. С. Шулинский, А. В. Кильчевский</i> Высокоинформативные эпигенетические маркеры психоэмоционального статуса человека.....	54
<i>Е. П. Михаленко, О. М. Мальшева, И. В. Сахаров, А. Ю. Гордеева, М. В. Артюшевская, В. А. Шостак, А. Б. Суцевский, Г. А. Шишко, А. В. Кильчевский</i> Клинический случай врожденной альвеолярно-капиллярной дисплазии легкого: использование высокопроизводительного секвенирования для уточнения диагноза .....	64
<i>М. Л. Луцик, М. Д. Амелянович, И. Б. Моссэ</i> Ассоциация полиморфных вариантов гена <i>FTO</i> с риском развития сахарного диабета 2 типа .....	73
<i>И. Н. Андреева, Р. С. Шулинский, Е. П. Михаленко, А. В. Байда, Н. Б. Кузнецова, А. В. Кильчевский</i> Исследование микробиома кишечника у людей старше 60 лет .....	81
<i>Е. Л. Романишко, А. И. Киреева, М. Е. Михайлова, Р. И. Шейко</i> Исследование полиморфизма rs17872000 в генах кальпаина ( <i>CAPN1</i> ) и rs109221039 кальпастатина ( <i>CAST</i> ) у крупного рогатого скота мясного направления продуктивности.....	88
<i>Е. А. Фомина, А. Н. Заинчковская, О. Ю. Урбанович</i> Генетическое разнообразие представителей инбредных линий мышей BALB/c, CBA, C57BL/6, используемых в медико-биологических исследованиях в Республике Беларусь.....	97

*Е. В. Гузенко, А. И. Царь, В. А. Лемеш*

Методы идентификации таксономической принадлежности медоносных пчел  
*Apis mellifera* L. .... 107

*О. Ю. Урбанович*

К 85-летию со дня рождения академика Николая Александровича Картеля.  
Генетически модифицированные растения — история и перспективы ..... 121

## CONTENTS

<i>E. V. Drozd, O. G. Babak, N. A. Nekrashevich, N. V. Anisimova, T. V. Nikitinskaya, K. K. Yatsevich, I. V. Gashkova, A. M. Artemyeva, A. V. Kilchevsky</i> Study of anthocyanin accumulation peculiarities in <i>Solanum melongena</i> depending on the polymorphism of activator-type R2R3-MYB genes.....	6
<i>V. A. Lemesh, G. V. Mozgova, V. N. Kipen, L. V. Khotyleva</i> Polymorphism of alleles associated with low temperature resistance in representatives of the <i>Brassicaceae</i> family with a wide distribution area.....	18
<i>A. P. Mikhalenka, A. N. Shchayuk, M. N. Shapetska, Yu. V. Paliukhovich, T. V. Nikitinskaya, A. V. Kilchevsky</i> Study of genetic polymorphism of DNA methyltransferase DNMT3B in the patients with non-small cell lung cancer.....	28
<i>A. Ch. Mazur, A. P. Mikhalenka, S. V. Baiko, V. M. Malyshava, I. V. Shauchuk, A. V. Kilchevsky, A. V. Sukalo</i> A range of mutations in patients with isolated and syndromal forms of congenital anomalies of the kidney and urinary tract.....	44
<i>I. B. Mosse, N. G. Sedlyar, A. S. Babenko, K. A. Mosse, R. S. Shulinsky, A. V. Kilchevsky</i> Most informative epigenetic markers to the human psychoemotional state .....	54
<i>A. P. Mikhalenka, V. M. Malyshava, I. V. Sakharau, A. Y. Gordeeva, M. V. Artsiusheuskaya, V. A. Shostak, A. B. Sushchevski, G. A. Shyshko, A. V. Kilchevsky</i> A clinical case of congenital alveolar capillary dysplasia: use of high throughput sequencing to verify a diagnosis.....	64
<i>M. L. Lushchik, M. D. Ameliyanovich, I. B. Mosse</i> Association of <i>FTO</i> gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus .....	73
<i>I. N. Andreeva, R. S. Shulinski, A. P. Mikhalenka, A. V. Bajda, N. B. Kuzniatsova, A. V. Kilchevsky</i> Studying the gut microbiome in people over 60.....	81
<i>E. L. Ramanishka, A. I. Kireyeva, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko</i> Study of rs17872000 polymorphism in calpain ( <i>CAPN1</i> ) and rs109221039 calpastatin ( <i>CAST</i> ) genes in meat productivity cattle.....	88
<i>A. A. Famina, A. N. Zainchkovskaya, O. Yu. Urbanovich</i> Genetic diversity of BALB/c, CBA, C57BL/6 inbred mice lines used in medical and biological research in the Republic of Belarus.....	97
<i>E. V. Guzenko, A. I. Tsar, V. A. Lemesh</i> Identification methods for the taxonomic affiliation of the honey bee <i>Apis mellifera</i> L. ....	107
<i>O. Yu. Urbanovich</i> By the 85th anniversary of the birth of academician Nikolai Alexandrovich Kartel. Genetically modified plants — history and prospects.....	121

Е. В. Дрозд<sup>1</sup>, О. Г. Бабак<sup>1</sup>, Н. А. Некрашевич<sup>1</sup>, Н. В. Анисимова<sup>1</sup>, Т. В. Никитинская<sup>1</sup>,  
К. К. Яцевич<sup>1</sup>, И. В. Гашкова<sup>2</sup>, А. М. Артемьева<sup>2</sup>, А. В. Кильчевский<sup>1</sup>

## ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ НАКОПЛЕНИЯ АНТОЦИАНОВ У *SOLANUM MELONGENA* L. В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ R2R3 MYB-АКТИВАТОРА

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

<sup>2</sup>ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР)  
Россия, 190000, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42–44

На основе сопоставления накопления антоцианов в различных частях растений баклажана и полиморфизмов гена *Myb1 S. melongena* с использованием статистического метода Хи-квадрат подтверждена высокая эффективность молекулярных маркеров, выявляющих аллели *Myb1-del6* и *Myb1-del26 S. melongena*, связанные с нарушением синтеза антоцианов в плодах. В результате изучения характера накопления антоцианов в плодах *S. melongena* в зависимости от аллельного состава гена *Myb1* у гибридов F<sub>1</sub> и популяций F<sub>2</sub>–F<sub>3</sub> установлен промежуточный характер наследования признака «накопление антоцианов в различных частях растений» у гетерозиготных форм с аллелями *Myb1-del6* и *Myb1-del26* гена *Myb1* баклажана. Показана полная идентичность нуклеотидного состава экзонных областей гена *Myb2 S. melongena* у форм с различным накоплением антоцианов в плодах. С помощью разработанных маркеров получен новый селекционный материал для создания сортов для функционального питания.

**Ключевые слова:** *Solanum melongena*, регуляция синтеза антоциана, ДНК маркеры, генетический полиморфизм.

### Введение

Баклажаны являются одной из овощных культур, возделываемых в закрытом грунте в Беларуси. Важность данной культуры в питании человека связана с диетическими свойствами, что обусловлено низким содержанием углеводов (причем большая часть в виде клетчатки) и практически полным отсутствием жиров в плодах [1]. Цвет плодов баклажанов является не только отличительной чертой, характеризующей сорт, но и важным критерием, который влияет на выбор производителей и потребителей. Плоды баклажана характеризуются различной окраской кожицы: от белой, зеленой до темно-фиолетовой. Фиолетовый цвет плодов главным образом определяется присутствием вторичных метаболитов — антоцианов [2, 3]. Производители часто отдают предпочтение сортам с фиолетовыми плодами, поскольку у плодов с такой окраской легче определить стадию технической зрелости, что важно, так как при переходе в стадию биологической

зрелости плоды накапливают соланин, придающий им горький вкус. Потребители также чаще выбирают плоды с накоплением антоцианов в кожице (фиолетовой окраски), обеспечивающих более высокую антиоксидантную, бактерицидную активности данных продуктов питания для человека. При этом использование в качестве продуктов питания плодов без антоцианов (зеленой и белой окраски) может иметь важное значение для людей, склонных к аллергиям баклажана [4] или в питании которых употребление веществ с высокой антиоксидантной активностью должно быть ограничено.

Принимая во внимание, что структурные гены пути биосинтеза антоцианов функционируют под контролем регуляторного комплекса, называемого MYB-bHLH-WD40 (MBW) [3], исследование аллельного полиморфизма генов этого регуляторного комплекса является важным. На основе представленных последовательностей гена *Myb1* R2R3-MYB фактора,

связанного с накоплением антоцианов [5, 6], в Институте генетики и цитологии к настоящему моменту установлены полиморфизмы гена *Myb1*, разработаны маркеры к аллелям, связанным с нарушением синтеза антоцианов в плодах. Аллель *Myb1* сорта Зелёный характеризуется наличием делеции размером 6 п. н. в конце экзона 1, которая приводит к выпадению двух аминокислот в белке и образованию плода зеленого цвета. Аллель *Myb1* сорта баклажана Снежный отличается от аллеля *Myb1*, обеспечивающего нормальный синтез антоцианов, делецией размером 26 п. н., охватывающей конец интрона 1–начало экзона 2, и 11 SNP в кодирующих областях изучаемого гена. Показано, что 26 п. н. делеция в гене *Myb1* приводит к нарушению сплайсинга и сокращению мРНК на область второго экзона [7, 8]. Выявленные новые аллели *Myb1-del6* и *Myb1-del26* были включены в электронную генетическую базу GenBank [5]. Среди изучаемых образцов выделена форма Грушевидный, у которой при активном накоплении антоцианов в вегетативной части плоды оставались зелеными, при этом в генотипе сорта присутствует аллель *Myb1*, обеспечивающий нормальный синтез антоцианов. Сделано предположение о влиянии других генов на проявление признака накопления антоцианов в плодах у данного образца [7, 8].

Целью данных исследований было статистическое подтверждение эффективности разработанных ранее маркеров аллелей *Myb1-del6* и *Myb1-del26* на широком материале и изучение особенностей проявления антоциановой окраски у гибридов  $F_1$ , популяции  $F_2$  и  $F_3$  форм баклажана с различным сочетанием выявленных аллелей гена *Myb1*. Для этого были поставлены следующие задачи: оценить наблюдаемое проявление окраски плода и проанализировать его соответствие с распределениями аллелей в генотипах образцов популяций  $F_2$  и  $F_3$  по критерию Хи-квадрат ( $\chi^2$ ); осуществить поиск полиморфизма гена *Myb2* у образцов с различным накоплением антоцианов и оценить его связь с фенотипическим проявлением антоциановой окраски плодов.

### Материалы и методы исследования

Объектами для сопоставления особенностей фенотипического проявления антоциановой окраски различных частей растений (плод,

цветок, лист, стебель) и аллельного состава гена *Myb1*, а также для секвенирования гена *Myb2* с целью поиска возможных полиморфизмов являлись коллекционные образцы баклажана из Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова. Для изучения особенностей проявления признака «накопление антоцианов в плодах» использовали 18 созданных гибридов  $F_1$  между сортами с различными аллелями гена *Myb1*: Пеликан  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del26/Myb1*), Пеликан  $\times$  Зелёный (*Myb1-del26/Myb1-del6*), Донецкий урожайный  $\times$  Грушевидный (*Myb1-del6/Myb1*), Донецкий урожайный  $\times$  Снежный (*Myb1-del6/Myb1-del26*), Зелёный  $\times$  Линия 2 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del6/Myb1-del26*), Зелёный  $\times$  Грушевидный (*Myb1-del6/Myb1*), Зелёный  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del6/Myb1*), Снежный  $\times$  Зелёный (*Myb1-del26/Myb1-del6*), Снежный  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del26/Myb1*), Снежный  $\times$  Грушевидный (*Myb1-del26/Myb1*), Грушевидный  $\times$  Пеликан (*Myb1/Myb1-del26*), Грушевидный  $\times$  Зелёный (*Myb1/Myb1-del6*), Грушевидный  $\times$  Снежный (*Myb1/Myb1-del26*), Синдбад Пинкстрип  $\times$  Грушевидный (*Myb1/Myb1*), Синдбад Пинкстрип  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1/Myb1*), Король Севера  $\times$  Shina omaru nasu (*Myb1/Myb1*), Shina omaru nasu  $\times$  Король Севера (*Myb1/Myb1*), Линия 2 Jokuwase t. s. n.  $\times$  Зелёный (*Myb1-del26/Myb1-del6*). Для установления эффективности разработанных маркеров использовали популяции  $F_2$  и  $F_3$  созданных гибридов. Образцы изучаемых культур характеризовались широким фенотипическим полиморфизмом по признаку «накопление антоцианов в плодах».

Выделение ДНК проводили при помощи Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) из молодых верхушечных листьев растений баклажана согласно протоколу производителя. Количество ДНК в образце определяли на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro (Швеция).

ДНК-типирование аллелей гена *Myb1* созданных гибридов и расщепляющихся популяций проводили с использованием ранее подобранных праймеров [7, 8]. ПЦР-реакцию проводили в Термоциклере Biometra T Professional Basic (Германия). Реакционная ПЦР-смесь объемом 15 мкл содержала

60–100 нг геномной ДНК; 2,5 мМ dNTP Mix (Thermo Scientific), и 1,4 единицы Tornado DNA-полимеразы в инкубационном буфере «F» (Праймтех, Беларусь) и 0,25 пмоль/мл праймеров (Праймтех, Беларусь). Режим ПЦР был следующим: 95 °С — 15 мин, затем следовало 35 циклов: 99 °С — 1 с, 55–60 °С — 30 с и 72 °С — 1 мин. Реакцию завершали при 72 °С в течение 7 мин.

Продукты ПЦР реакции разделяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия и документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000 (США). Размеры амплифицированных фрагментов определяли при использовании в качестве маркера молекулярного веса 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific). Продукты ПЦР с использованием SCAR маркера MybMel с флюоресцирующей меткой разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле с использованием ДНК-секвенатора ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Размер ампликонов определяли с использова-

нием стандарта Liz500.

Оценка соответствия между наблюдаемыми и ожидаемыми распределениями оценивалась методом  $\chi^2$ , где общей мерой отклонения практических данных от теоретических, т. е. критерия соответствия  $\chi^2$ , является сумма отношений квадратов разностей между частотами практического  $f_n$  и теоретического  $F_n$  распределений к частотам теоретического  $F_n$  распределения для данной группы (формула 1) [9].

$$\chi^2 = \sum ((f_n - F_n)^2) / F_n \quad (1)$$

Нуклеотидные последовательности экзонных областей гена *Myb2* у образцов баклажана определяли путем секвенирования. Для этого фрагменты амплификации, полученные на геномной ДНК с подобранными нами геноспецифическими праймерами (табл. 1) были секвенированы. Для дизайна праймеров использовали программу Primer-BLAST на сайте Национального центра биотехнологической информации США.

Таблица 1

Список праймеров, использованных для секвенирования гена *Myb2*

Наименование праймера	Область секвенирования	Последовательность праймера, 5' → 3'	Температура отжига, °С	Размер ПЦР продукта, н. п.
Myb2-1F/R	Экзон 1	ACAGCTAATAGGGGTTTGAACA	57	547
		TGTTTCCACTATAAAAGATAAGACC		
Myb2-2F/R	Экзон 2	CAAGGCAAAGGATCTTCTAAACC	57	537
		TTAGAAGAGCAGTAGTGAGTATC		
Myb2-3F/R	Первая часть экзона 3	CTTAATACATGACGTGGACCATC	59	748
		CTGAAAAGTCATCCCAACCATC		
Myb2-4F/R	Вторая часть экзона 3	GACCTTCTCAAGTGCAAAGAATG	58	626
		GCTAACCCCGATCATTTTAGT		

Секвенирующие реакции выполняли с применением набора Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно методике производителя. Продукты секвенирующей реакции очищали спиртовым осаждением и растворяли в 20 мкл формамида, денатурировали нагреванием до

95 °С в течение 2 мин и далее проводили капиллярный электрофорез с использованием ДНК-секвенатора ABI 3500. Компьютерную обработку данных, полученных в результате секвенирования, проводили в программе Sequencing Analysis Software v 5.2 (Applied Biosystems).

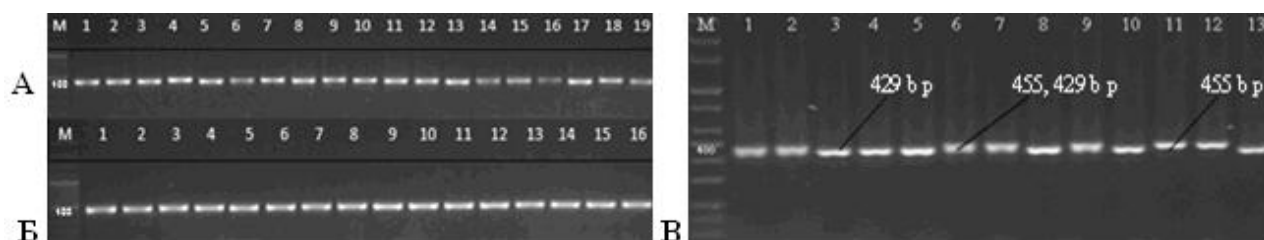


### Результаты и их обсуждение

В ранее выполненных исследованиях [7, 8] с помощью разработанных маркеров аллелей *Myb1-del26*, *Myb1-del6*, *Myb1* проведено ДНК-типирование широкой коллекции сортов баклажана и расщепляющейся популяции Jokuwase t. s. n. Для этого были использованы SCAR маркер *Mybmel* (для типирования аллеля *Myb1-del26*) и CAPS маркер *Mybmel-Pst1* (для типирования аллеля *Myb1-del6*). Однако, учитывая небольшие различия в размерах продуктов, получаемых при ис-

пользовании SCAR маркера *Mybmel*, типирование гетерозиготных форм было затруднено, особенно при одновременном наличии в гено типе *Myb1-del26*, *Myb1-del6*, что показано на рисунке 1.

С целью дальнейшего совершенствования методов выявления данных полиморфизмов разработан SCAR маркер *MybMel del6-26*. Для четкого разделения ампликонов с минимальными различиями в размерах использовали прямой праймер *MybMel* с флуоресцентной меткой и последующим анализом продукта



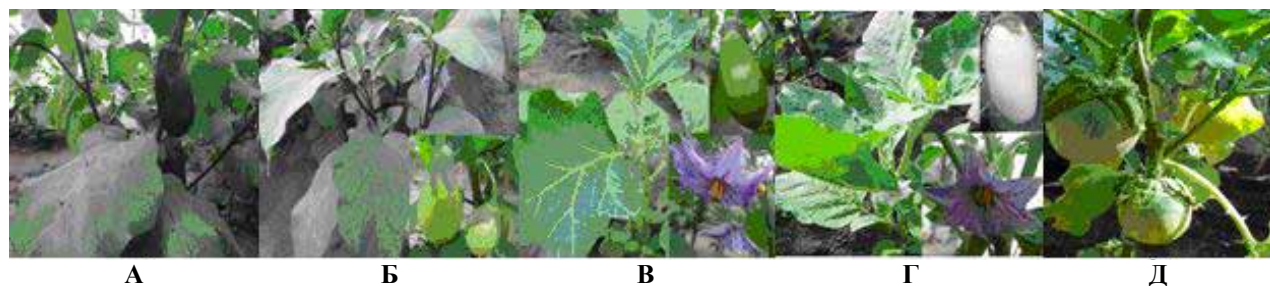
**Рис. 1.** Продукты амплификации ДНК образцов гибридов  $F_1$ : А — Зелёненъкий × Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del6/Myb1*); Б — Снежный × Зелёненъкий (*Myb1-del26/Myb1-del6*); В — Пеликан × Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del26/Myb1*)

на генетическом анализаторе. Данный способ типирования позволил четко выявлять оба аллеля, связанных с нарушением синтеза антоцианов в гомо- и гетерозиготных формах. В результате ДНК-типирования на генетическом анализаторе выявлялись фрагменты размером 429, 449, 455 п. н., характеризующие аллели *Myb1-del26*, *Myb1-del6*, *Myb1* соответственно.

По результатам ДНК-анализа и фенотипической оценки для изучения особенностей про-

явления признака «накопление антоцианов в плодах» были созданы гибриды  $F_1$  с различными аллелями, ряд фенотипов которых представлен на рисунке 2.

В 2020 году испытывались 18 гибридов  $F_1$  баклажана с различными полиморфизмами гена *Myb1*. Оценка данных гибридов проводилась в 2 этапа — в зимний период в теплицах Минской овощной фабрики и в летний период в теплицах БОС Института генетики и цито-



**Рис. 2.** Проявление интенсивности антоциановой окраски на стебле, плодах, листьях и венчике цветка у сортов баклажана с выявленными полиморфизмами: А — Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1*); Б — Грушевидный (*Myb1*); В — Зелёненъкий (*Myb1-del6*); Г — Пеликан (*Myb1-del26*); Д — Линия 2 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del26*)

логии НАН Беларуси. В результате исследования соответствия изучаемых аллелей и их фенотипического проявления у коллекционных образцов и расщепляющегося поколения гете-

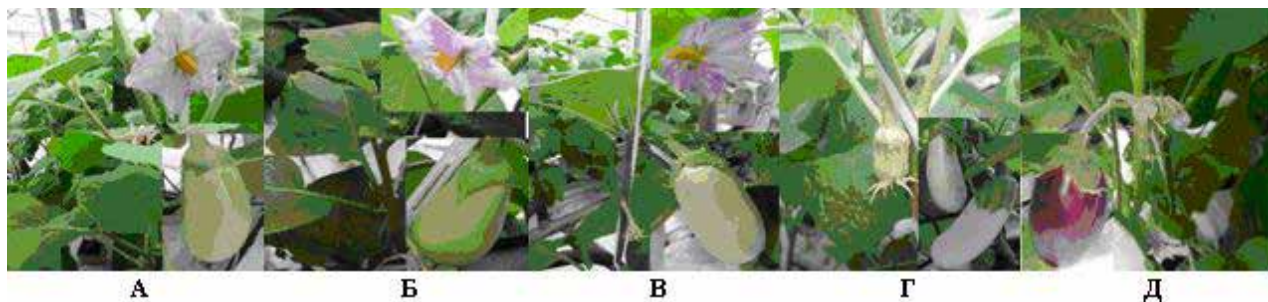
розиготной формы баклажана Jokuwase t. s. n. выявлен промежуточный характер наследования признака «накопление антоцианов в различных частях растений» у гетерозиготных

форм с аллелями *Myb1/Myb1* и *Myb1-del26* гена *Myb1* баклажана.

В ходе исследований проведен подробный анализ изменения антоциановой окраски плодов, стеблей и жилок листьев. Анализ гибридов  $F_1$  баклажана показал отсутствие антоциана у гибридов с аллелями *Myb1-del26* и *Myb1-del6* во всех частях растения, кроме венчика (Пеликан  $\times$  Зелёный, Донецкий урожайный  $\times$  Снежный, Снежный  $\times$  Зелёный). Окраска плода на стадии технической спелости у данной группы гибридов была белая или светло-салатовая. Гибриды между формами с нормальным аллелем гена *Myb1* и *Myb1-del26* (Снежный  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n. и др.) или *Myb1-del6* (Зелёный  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n. и др.) имели проме-

жуточный характер накопления антоцианов в плодах и вегетативных частях растений. Гибриды, одним из родителей которых был сорт Грушевидный, характеризующийся активным накоплением антоциана в вегетативных частях и его отсутствием в плодах (при наличии нормального аллеля *Myb1/Myb1*), имели белые и зеленые плоды в комбинациях скрещивания с *Myb1-del26* или *Myb1-del6* и промежуточный характер накопления в вегетативных частях (Зелёный  $\times$  Грушевидный, Снежный  $\times$  Грушевидный); в комбинациях скрещивания с аллелем *Myb1* плоды имели промежуточный характер накопления антоциана в плодах и вегетативных органах (Синдбад Пинкстрип  $\times$  Грушевидный) (рис. 3).

Выращивание образцов в защищенном грун-



**Рис. 3.** Проявление интенсивности антоциановой окраски на стебле, плодах, листьях и венчике цветка у сортов баклажана с выявленными полиморфизмами: А — Пеликан  $\times$  Зелёный (*Myb1-del26/Myb1-del6*); Б — Донецкий урожайный  $\times$  Грушевидный (*Myb1-del6/Myb1*); В — Пеликан  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del26/Myb1-Myb1*); Г — Донецкий урожайный  $\times$  Снежный (*Myb1-del6/Myb1-del26*); Д — Синдбад Пинкстрип  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1/Myb1*)

те в зимний период позволило в летний период, наряду с испытанием гибридов  $F_1$ , провести испытание и оценку расщепляющегося материала 9 популяций следующих гибридов  $F_2$ : Пеликан  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n., Зелёный  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n., Снежный  $\times$  Зелёный, Донецкий урожайный  $\times$  Снежный, Снежный  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n., Грушевидный  $\times$  Пеликан, Грушевидный  $\times$  Снежный, Shina omaru nasu.  $\times$  Король Севера. По результатам испытания гибридов  $F_1$  выделен гибрид баклажана Синяя птица, который после оценки ГСИ включен в Реестр сортов сельскохозяйственных растений Беларуси.

Для сопоставления фенотипического проявления признака «накопление антоцианов различными частями растений» и аллелей гена *Myb1* выполнено ДНК-типирование 371

растения изучаемых популяций. Для подтверждения статистической достоверности эффективности разработанных маркеров были использованы популяции  $F_2$ : Зелёный  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n. — 148 растений и Пеликан  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del26/Myb1*) — 158 растений. Был проведен анализ соответствия фенотипических признаков проявления антоциановой окраски на вегетативных органах и аллелей *Myb1* методом Хи-квадрат, результаты которого представлены в таблицах 2 и 3.

В 2021 году был выращен и протипирован расщепляющийся материал 6 популяций  $F_3$  (по 200 растений на популяцию) следующих гибридов: Пеликан  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n., Синдбад Пинкстрип  $\times$  Линия 9 Jokuwase t. s. n., Синдбад Пинкстрип  $\times$  Грушевидный,

**Таблица 2**

Результаты анализа расщепления популяции  $F_2$  — Зелёненский × Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del6/Myb1*) методом  $\chi^2$

Показатели	Расщепление			Сумма
	<i>Myb1-del6/Myb1-del6</i>	<i>Myb1/Myb1-del6</i>	<i>Myb1/Myb1</i>	
Ожидаемое расщепление ( $H_0$ )	1	2	1	5
Наблюдаемые частоты ( $f$ )	31	79	38	148
Ожидаемые частоты ( $F$ )	37	74	37	148
Разность частот ( $f-F$ )	-6	5	1	-
Квадрат разности ( $(f-F)^2$ )	36	25	1	-
Отношение $(f-F)^2/F$	0,97	0,33	0,02	0,99 = $\chi^2$
Фенотипическое проявление антоциана на вегетативных органах	слабое на стебле	среднее и сильное на стебле и жилках листьев	сильное на стебле и жилках листьев	

**Примечание.**

Нулевая гипотеза ( $H_0$ ) — ожидаемое расщепление: 1 *Myb1-del6/Myb1-del6* : 2 *Myb1/Myb1-del6* : 1 *Myb1/Myb1*  
 Число степеней свобод —  $(c-1) \times (k-1) = (3-1) \times (2-1) = 2$ ;  $\chi^2_{теор} = 6,0$ ;  
 $\chi^2_{факт} = 0,99 < \chi^2_{теор} = 6,0$ , следовательно, гипотеза верна и расщепление соответствует 1 : 2 : 1.

**Таблица 3**

Результаты анализа расщепления популяции  $F_2$  — Пеликан × Линия 9 Jokuwase t. s. n. (*Myb1-del26/Myb1*) методом  $\chi^2$

Показатели	Расщепление			Сумма
	<i>Myb1-del26/Myb1-del26</i>	<i>Myb1/Myb1-del26</i>	<i>Myb1/Myb1</i>	
Ожидаемое расщепление ( $H_0$ )	1	2	1	5
Наблюдаемые частоты ( $f$ )	40	81	37	158
Ожидаемые частоты ( $F$ )	39,5	79	39,5	158
Разность частот ( $f-F$ )	0,5	2	-2,5	-
Квадрат разности ( $(f-F)^2$ )	0,25	4	6,25	-

## Окончание таблицы 3

Показатели	Расщепление			Сумма
	<i>Myb1-del26/Myb1-del26</i>	<i>Myb1/Myb1-del26</i>	<i>Myb1/Myb1</i>	
Отношение ( $f^2$ )/F	0,006	0,05	0,15	0,2 = $\chi^2$
Фенотипическое проявление антоциана на вегетативных органах	слабое на стебле	среднее и сильное на стебле и жилках листьев	сильное на стебле и жилках листьев	

**Примечание.**

Нулевая гипотеза ( $H_0$ ) — ожидаемое расщепление: 1 *Myb1-del26/Myb1-del26* : 2 *Myb1/Myb1-del26* : 1 *Myb1/Myb1*

Число степеней свобод —  $(c-1) \times (k-1) = (3-1) \times (2-1) = 2$ ;  $\chi^2_{\text{теор}} = 6,0$ ;

$\chi^2_{\text{факт}} = 0,2 < \chi^2_{\text{теор}} = 6,0$ , следовательно, гипотеза верна и расщепление соответствует 1 : 2 : 1.

Донецкий урожайный × Грушевидный, Снежный × Грушевидный, Зелёный × Грушевидный. Для сопоставления с фенотипическим проявлением признака в теплицы было высажено по 10–15 растений с различными вариантами сочетания аллелей в связи с ограниченными размерами площади. В таблице 4 представлены результаты данного сопоставления. По результатам оценки популяций  $F_3$  отобраны формы для создания новых сортов и гибридов с различным накоплением антоцианов в плодах.

Согласно результатам оценки, фенотипиче-

ское проявление антоциановой окраски у высаженных растений в популяциях  $F_2$  и  $F_3$  соответствовало ожидаемому по результатам ДНК-типирования образцов. Как и по ранее полученным результатам, выделились формы, одним из родителей которых являлся сорт Грушевидный. Возможно, данное фенотипическое проявление вызвано действием других регуляторных генов, определяющих процесс биосинтеза антоцианов.

По результатам анализа литературы [10, 11] и поиска последовательностей R2R3 *Myb* транскрипционного фактора в генетических

Таблица 4

Проявление признака «накопление антоцианов различными частями растений» у форм баклажана в зависимости от аллелей гена *Myb1*

Наименование гибрида $F_1$ , аллели	№ образца $F_3$	Размер ПЦР продукта, п.о.	Аллель	Наличие и интенсивность антоциановой окраски		
				Лист	Плод	Венчик цветка
Снежный × Грушевидный ( <i>Myb1-del26/Myb1</i> )	Б41-2	455/429	<i>Myb1/del26</i>	Средняя	Салатовый	Ярко-сиреневый
	Б41-3	429	<i>del26</i>	Отсутствует	Салатово-белый	Сиреневый
	Б41-4	429	<i>del26</i>	Отсутствует	Зеленый	Сиреневый
	Б41-12	429	<i>del26</i>	Отсутствует	Светло-салатовый	Сиреневый
Зелёный × Грушевидный ( <i>Myb1-del6/Myb1</i> )	Б42-5	455	<i>del6/Myb1</i>	Средняя	Зеленый	Сиреневый
	Б42-6	449/455	<i>del6/Myb1</i>	Отсутствует	Светло-зеленый	Бледно-сиреневый
	Б42-7	449/455	<i>del6/Myb1</i>	Средняя	Фиолетовый	Бледно-сиреневый

## Окончание таблицы 4

Наименование гибрида F <sub>1</sub> , аллели	№ образца F <sub>3</sub>	Размер ПЦР продукта, п.о.	Аллель	Наличие и интенсивность антоциановой окраски		
				Лист	Плод	Венчик цветка
Донецкий урожайный × Грушевидный ( <i>Myb1-del6/Myb1</i> )	Б43-1	455	<i>Myb1</i>	Сильная	Сиреневый	Сиреневый
	Б43-3	449/455	<i>del6/Myb1</i>	Средняя	Светло-зеленый	Бледно-сиреневый
	Б43-7	455	<i>Myb1</i>	Сильная	Светло-сиреневый	Сиреневый
	Б43-10	449/455	<i>del6/Myb1</i>	Сильная	Светло-салатовый	Бледно-сиреневый
	Б43-13	455	<i>Myb1</i>	Легкая	Сиреневый	Сиреневый
Синдбад Пинкстрип × Грушевидный ( <i>Myb1/Myb1</i> )	Б44-2	455	<i>Myb1</i>	Сильная	Сиреневый	Сиреневый
	Б44-16	455	<i>Myb1</i>	Средняя	Светло-сиреневый	Сиреневый
	Б44-27	455	<i>Myb1</i>	Средняя	Бело-розовый	Сиреневый
	Б44-31	455	<i>Myb1</i>	Средняя	Светло-сиреневый	Сиреневый
Синдбад Пинкстрип × Jokuwase t. s. n. 9 рас. ( <i>Myb1/Myb1</i> )	Б45-2	455	<i>Myb1</i>	Сильная	Сиреневый	Сиреневый
	Б45-4	455	<i>Myb1</i>	Сильная	Фиолетовый	Сиреневый
	Б45-13	455	<i>Myb1</i>	Сильная	Фиолетовый	Сиреневый
	Б45-15	455	<i>Myb1</i>	Сильная	Светло-сиреневый	Сиреневый
Пеликан × Jokuwase t. s. n. 9 рас. ( <i>Myb1-del26/Myb1</i> )	Б46-2	455/429	<i>Myb1/del26</i>	Сильная	Фиолетово-белый	Сиреневый
	Б46-4	429	<i>del26</i>	Отсутствует	Белый	Сиреневый
	Б46-10	455/429	<i>Myb1/del26</i>	Сильная	Фиолетово-белый	Сиреневый
	Б46-11	429	<i>del26</i>	Отсутствует	Белый	Сиреневый
	Б46-13	455	<i>Myb1</i>	Сильная	Бело-сиреневый	Сиреневый

базах данных GenBank, SolGenomics для дальнейшего исследования выбрана последовательность гена *Myb2 Solanum melongena*. На основании данных о последовательностях ДНК гена *Myb2* (SolGenomics, Sme2.5\_05099.1) и мРНК (GenBank, KF727477.1) была установлена экзонно-интронная структура данного гена. В результате сравнения последовательностей генов *Myb1* (KT727965.1) и *Myb2* (Sme2.5\_05099.1) выявлено, что экзонная область гена *Myb1* короче на 66 п. н. Существенная разница обнаружена в величине интронов.

В последовательности гена *Myb2* интроны составляют большую часть гена — около 81%, в то время как у гена *Myb1* интронная область составляет 37%. На рисунке 4 представлены аминокислотные последовательности, формируемые на основе трех аллелей гена *Myb1* и гена *Myb2*, а также выделены области доменов транскрипционных факторов. Данный рисунок демонстрирует, что выявленные полиморфизмы в аллелях гена *Myb1-del26* (сорт Пеликан) и *Myb1-del6* (сорт Зелёный) приводят к нарушению структуры доменов в син-



тезируемых белковых соединениях, что делает невозможным нормальное взаимодействие доменов транскрипционного фактора с промоторами активируемых генов.

Для секвенирования последовательности гена *Myb2* у коллекционных образцов баклажана с контрастной антоциановой окраской плодов, в том числе формы Грушевидный, по-

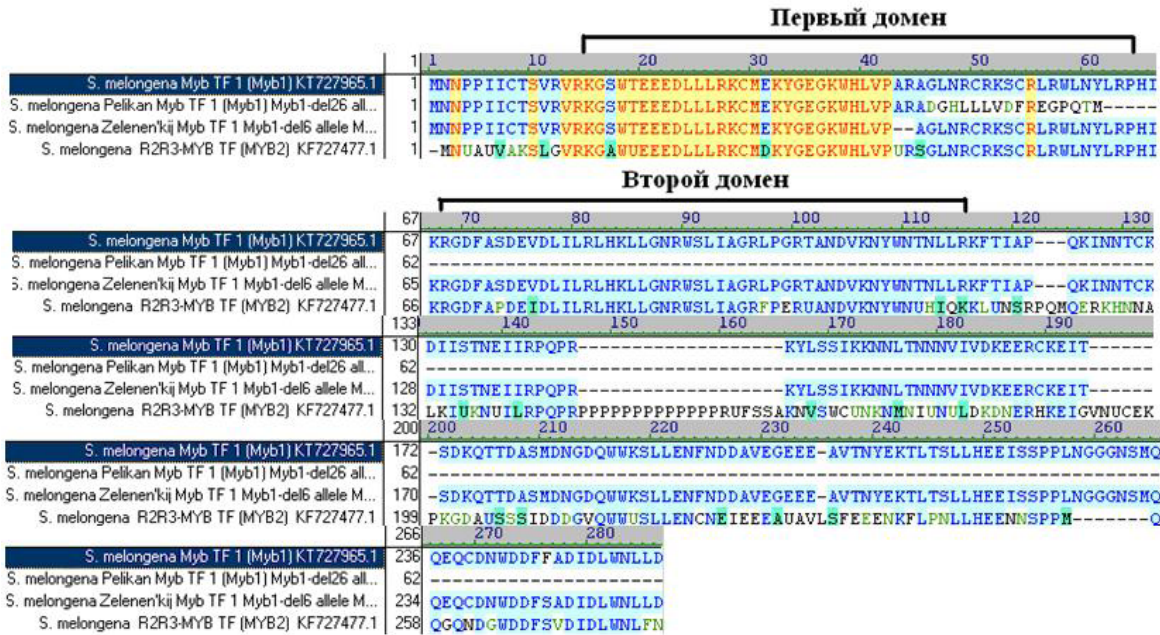


Рис. 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей транскрипционных факторов, кодируемых аллелями генов *Myb1* и *Myb2*

добраны геноспецифические праймеры, полностью перекрывающие экзоны гена *Myb2* (табл. 1). После выравнивания полученных последовательностей гена *Myb2* изучаемых форм *S. melongena* относительно последовательности ДНК *Sme2.5\_05099.1* (Solgenomic) [6] полиморфизмов выявлено не было (рис. 5), что говорит об отсутствии влияния данного гена на накопление антоцианов в плодах.

В дальнейшем будут изучаться последовательности интронных областей гена *Myb2* и другие гены, участвующие в регуляции биосинтеза антоцианов.

### Заключение

Усовершенствован метод молекулярного маркирования, позволяющий одновременно выявлять 2 известных аллеля гена *Myb1*, связанных с нарушением накопления антоцианов в плодах. С использованием широкого селекционного материала: образцов *Solanum melongena* с различными аллелями гена *Myb1*, внутривидовых гибридов F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> и F<sub>3</sub> *Solanum*

*melongena* изучен характер накопления антоцианов в зависимости от аллельного состава гена *Myb1*. Установлен промежуточный характер наследования признака «накопление антоцианов в различных частях растений» у гетерозиготных форм с аллелями *Myb1-del6* и *Myb1-del26* гена *Myb1* баклажана. Показана высокая эффективность SCAR маркера MybMel del6-26 для выявления форм с нарушенным синтезом антоцианов.

По результатам секвенирования последовательностей экзонных областей гена *Myb2* форм баклажана с различной антоциановой окраской плодов показана их полная идентичность, что говорит о его неучастии в регуляции накопления антоцианов в плодах.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Б20Р-285 «Изучение генетических механизмов регуляции накопления антоцианов и каротиноидов у овощных пасленовых (*Solanaceae*) и капустных (*Brassicaceae*) культур».



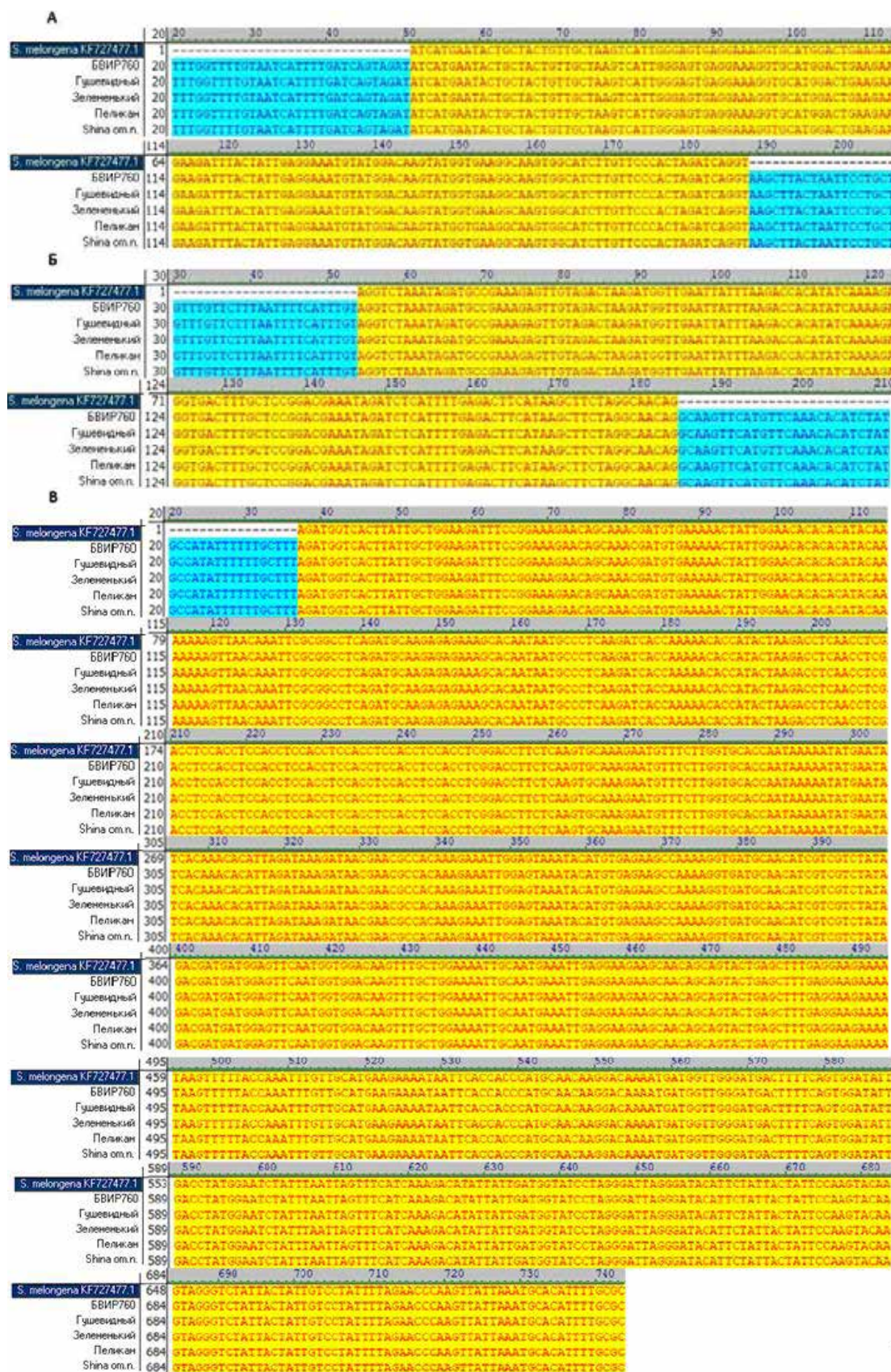


Рис. 5. Выравнивание последовательностей экзонов гена *Myb2* *Solanum melongena* у сортов с различным накоплением антоцианов: А — область экзона 1, Б — область экзона 2, В — область экзона 3

**Список использованных источников**

1. Intelmeal [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.intelmeal.ru/nutrition/foodinfo-eggplant-ru.php>. – Дата доступа: 01.03.2022.
2. Мамедов, М. И., Пышная О. Н., Джос Е. А., Шмыкова Н. А., Супрунова Т. П., Митрофанова О. А., Верба В. М. Баклажан (*Solanum spp.*) / М. И. Мамедов // Изд-во ВНИИССОК. Москва. – 2015. – 264 с.
3. Liu Y., Tikunov Y., Schouten R. E., Marcelis L. F. M., Visser R. G. F., Bovy A. Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in *Solanaceous* Vegetables: A Review / Y. Liu // *Frontiers in Chemistry*. – 2018. – Vol. 6, n. 52.
4. HELIX [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://helix.ru/kb/item/21-134>. – Дата доступа: 01.03.2022.
5. GenBank [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. – Дата доступа: 01.08.2021.
6. Solgenomics [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://solgenomics.net/>. – Дата доступа: 01.08.2021.
7. Бабак, О. Г. Изучение полиморфизма генов туб-факторов на основе сравнительной геномики овощных пасленовых культур (томат, перец, баклажан) для поиска ДНК-маркеров, дифференцирующих образцы по накоплению антоцианов / О. Г. Бабак, Н. А. Некрашевич, Т. В. Никитинская, К. К. Яцевич, А. В. Кильчевский // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 6. – С. 721–729.
8. Babak O., Nikitinskaya T., Nekrashevich N., Yatsevich K., Kilchevsky A. Identification of DNA Markers of Anthocyanin Biosynthesis Disorders Based on the Polymorphism of Anthocyanin 1 Tomato Ortholog Genes in Pepper and Eggplant / O. Babak // *Crop Breed Genet Genom.* – 2020. – Vol. 2, n. 3.
9. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – 5-е изд., доп. и перераб. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
10. Docimo T., Francese G., Ruggiero A., et al. Phenylpropanoids Accumulation in Eggplant Fruit: Characterization of Biosynthetic Genes and Regulation by a MYB Transcription Factor / T. Docimo // *Front Plant Sci.* – 2016. – Vol. 6, n. 1 233.
11. Zhang Y., Zongli Hu., et al. Anthocyanin Accumulation and Molecular Analysis of Anthocyanin Biosynthesis-Associated Genes in Eggplant (*Solanum melongena* L.) / Y. Zhang // *J. Agric. Food Chem.* – 2014. – Vol. 62, n. 13. – P. 2 906–2 912.



E. V. Drozd<sup>1</sup>, O. G. Babak<sup>1</sup>, N. A. Nekrashevich<sup>1</sup>, N. V. Anisimova<sup>1</sup>, T. V. Nikitinskaya<sup>1</sup>,  
K. K. Yatsevich<sup>1</sup>, I. V. Gashkova<sup>2</sup>, A. M. Artemyeva<sup>2</sup>, A. V. Kilchevsky<sup>1</sup>

## STUDY OF ANTHOCYANIAN ACCUMULATION PECULIARITIES IN *SOLANUM MELONGENA* DEPENDING ON THE POLYMORPHISM OF ACTIVATOR-TYPE R2R3-MYB GENES

<sup>1</sup>State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: e.drozd@igc.by

<sup>2</sup>N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR)

42–44 Bolshaya Morskaya St., 190000 St.-Petersburg, Russia

Based on the comparison of anthocyanins' accumulation in various parts of eggplant and *Myb1 S. melongena* polymorphisms using the Chi-squared test, the high efficiency of molecular markers, identifying *Myb1-del6* and *Myb1-del26 S. melongena* alleles associated with impaired anthocyanins' synthesis in fruits, was confirmed. As a result of studying the nature of anthocyanins' accumulation in the fruits of *S. melongena*, depending on the allelic composition of the *Myb1* gene in F<sub>1</sub> hybrids and F<sub>2</sub>–F<sub>3</sub> populations, an intermediate character of the inheritance of the trait “accumulation of anthocyanins in various parts of plants” was established in heterozygous eggplant forms with *Myb1-del6* and *Myb1-del26* alleles of the *Myb1* gene. Complete identity of the nucleotide composition of exon regions of the *Myb2 S. melongena* gene was demonstrated in the forms with different anthocyanins' accumulation in fruits. Using the developed markers, a new breeding material for developing of functional nutrition varieties was obtained.

**Keywords:** *Solanum melongena*, anthocyanin synthesis regulation, DNA markers, genetic polymorphism.

Дата поступления в редакцию: 04 марта 2022 г.

В. А. Лемеш, Г. В. Мозгова, В. Н. Кипень, Л. В. Хотылёва

## ПОЛИМОРФИЗМ АЛЛЕЛЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ, У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE* С ШИРОКИМ АРЕАЛОМ РАСПРОСТРАНЕНИЯ

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

Исследован полиморфизм локусов, ассоциированных с холодостойкостью у представителей семейства *Brassicaceae*. Использованы 11 SSR-маркеров, достоверно коррелирующих с относительной электропроводностью тканей и содержанием MDA, 4 SCAR-маркера, сцепленных с аллелями гена *CCA1*, а также SSR O110 и SSR BnO110, тесно сцепленные с QTL, ассоциированными с временем начала цветения растений, морозостойкостью и зимней выживаемостью. Верификация образцов при помощи SCAR-маркера *BoCCA1-1R1* показала, что аллель *BoCCA1-1*, характерный для устойчивых к холоду сортов, содержится в геномах 26 из 88 проанализированных форм, включая белорусские сорта рапса Зенит, Добродей, Мартын.

Начаты работы по определению CNV для SSR-маркеров, ассоциированных с содержанием MDA и относительной электропроводностью тканей, у представителей семейства *Brassicaceae*. Установлено, что для ДНК-маркеров *BnGMS102* и *BnGMS4511*, которые оказались не эффективны для выявления полиморфизма по генетическим локусам, ассоциированными с морозостойкостью у представителей семейства *Brassicaceae*, также отсутствует выраженный полиморфизм по числу копий в геноме. Эффективный маркер *BnGMS180-1* проявил вариабельность: от двух до двенадцати копий на геном. Показано, что копийность генов оказывает влияние на повышение устойчивости к низким температурам представителей семейства *Brassicaceae*.

**Ключевые слова:** семейство *Brassicaceae*, холодостойкость, SSR-маркеры, SCAR-маркеры, CNV.

### Введение

Существующие трудности проведения полевых испытаний сельскохозяйственных культур общепринятыми методами традиционного отбора и гибридизации стимулировали интерес к исследованию генов-регуляторов холодового стресса и механизмов, лежащих в его основе, а также выявления молекулярных маркеров, проявляющих положительную корреляцию с признаками, определяющими холодостойкость и морозостойкость растений [1, 2]. Учитывая тот факт, что устойчивость к пониженным температурам является количественным признаком [3], научно обоснованный подход для создания новых устойчивых сортов растений семейства *Brassicaceae* состоит в том, чтобы идентифицировать полиморфные аллели генов, ассоциированные с устойчивостью к пониженным температурам, разработать эффективные молекулярные маркеры к выявлен-

ным аллелям и использовать их для отбора устойчивых форм.

Факторы транскрипции и эффекторный ген, участвующие в реакции растений на холодовый стресс, в совокупности называются генами, регулируемые холодом (COR, cold-regulated) [4]. Были выявлены основные гены-регуляторы холодового ответа: COR (холодорегулируемые, cold-regulated), KIN (индуцируемые холодом, cold-induced), LTI (индуцируемые низкой температурой, low temperature induced) и RD (реагирующие на обезвоживание, responsive to dehydration) [5]. Продукты этих генов можно классифицировать на две группы: 1) транскрипционные факторы, регулирующие передачу сигналов и экспрессию генов ответа на холод; 2) белки позднего эмбриогенеза LEA (late embryogenesis abundant proteins), белки теплового шока HSP (heat shock proteins), анти-

фриз-белки, белки транспорта липидов, дегидрины [5].

Установлено, что одними из первых в каскадный механизм формирования морозоустойчивости вовлекаются гены семейства *CBF* (C-repeated Binding Factor), которые играют ведущую роль в регуляции ответа на холодостресс у растений [6]. С использованием модельного объекта семейства *Brassicaceae* — *A. thaliana* были открыты ключевые гены сигнального пути CBF: индукторы экспрессии генов *CBF-ICE* (inducer of CBF expression), гены *CBF* (C-repeat-binding factor), гены *COR* (cold-regulated genes) и их сигнальные пути [7, 8]. В последующем было выявлено наличие *CBF*-генов у многих видов растений, включая полевые и овощные культуры, древесные растения [9, 10], указывая на то, что сигнальный путь CBF-ответа на холодостресс является высоко консервативным для царства растений.

Установлено, что критическую роль в регуляции многих физиологических и метаболических процессов у растений, а также в формировании адаптивных реакций на абиотические стрессы, в т. ч. адаптации к пониженным температурам, играют циркадные ритмы [1]. Ассоциированный с циркадными ритмами транскрипционный фактор семейства MYB *CCA1* (белок 1, Circadian Clock Associated 1), а также *LHY* (Late Elongated Hypocotyl) играют важную роль в фитохром-зависимой индукции фотосинтетических генов и регуляции циркадных ритмов. У капусты огородной *B. oleracea* в последовательности гена *BoCCA1* выявлены делеции и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и разработаны молекулярные SCAR-маркеры, позволяющие выявлять их наличие в двух аллелях гена (*BoCCA1-1* и *BoCCA1-2*), ассоциированных с устойчивостью и восприимчивостью растений к низким температурам [3].

Несмотря на большой прогресс в исследовании молекулярных механизмов ответа на холодостресс и выявлении локусов ключевых генов-факторов транскрипции и эффекторных генов на модельном объекте *A. thaliana*, разработано немного молекулярных маркеров, которые выявляют полиморфизм генов и локусов количественных признаков, ассоциированных с холодо- и морозостойкостью, у представителей семейства

*Brassicaceae*. Это связано с тем, что не все гены сложной транскрипционной регуляторной сети могут быть напрямую ассоциированы с фенотипическим признаком. Эффективными молекулярными маркерами являются те, с помощью которых можно четко дифференцировать аллели холодостойкости. Предпочтительнее использовать молекулярные маркеры, которые позволяют выявлять мутации на уровне последовательности ДНК, включая SNP либо вставки или делеции. Так, Song et al. (2018) разработали молекулярные маркеры *BoCCA1-1R1*, *BoCCA1-2R1*, *BoCCA1-1R2*, *BoCCA1-2R2*, *BoCCA1-1* и *BoCCA1-2*, позволяющие детектировать делеции и инсерции, а также SNP (замена C на G и C на A) в двух аллелях гена *CCA1 B. oleracea: BoCCA1-1* и *BoCCA1-2* [3]. Показана эффективность ДНК-маркеров для дифференциации устойчивых и чувствительных к низким отрицательным температурам генотипов *B. oleracea* [3]. Нами было выявлено, что данные ДНК-маркеры позволяют эффективно дифференцировать между собой отдельные сорта *B. napus* и *B. rapa* [7, 8].

Было установлено, что при высоком содержании малонового диальдегида (MDA, malondialdehyde) в мембранах растений происходит ускорение перекисного окисления липидов, что приводит к снижению устойчивости к холоду [9]. У рапса *B. napus* выявлена отрицательная корреляция относительной проводимости мембран с устойчивостью к холоду [14]. У репы *B. rapa* степень повреждения растений отрицательными температурами также коррелирует с содержанием MDA и относительной проводимостью мембран, были выявлены SSR-маркеры, достоверно коррелирующие с данными признаками [2].

Известно, что SNP, делеции и инсерции могут быть использованы как маркеры для дифференциации аллелей [3, 7, 8]. Кроме того, недавние исследования по полногеномному секвенированию растений и животных выявили вариации копий генов (copy number variation, CNV) и то, что в геномах имеются протяженные инсерции или делеции от сотен до миллионов пар оснований [10], что подтверждает важность CNV как компонентов геномной изменчивости у эукариот. Результатом вариации может являться снижение или повышение числа копий определенного гена и, сле-

довательно, повышение или снижение экспрессии продукта гена [11]. Было установлено, что многие CNV напрямую или опосредованно вовлечены в стрессовый ответ [12]. Установлено, что CNV влияют на фенотип, включая адаптивные реакции, в т. ч. устойчивость к заморозкам [13, 14], и их можно ассоциировать с признаком и использовать как маркер. Например, CNV успешно использованы для реконструкции генетической структуры популяции *A. thaliana*. Кроме того, показано, что существенные изменения дозы гена могут приводить к изменению количества транскриптов (РНК и белков) у растений данного вида [10].

Таким образом, к настоящему времени установлены ряд маркеров генетических локусов, генов и вариации копий генов CNV, ассоциированных с морозостойкостью у представителей семейства *Brassicaceae*.

Цель работы — выявление полиморфных аллелей генов, ассоциированных с морозостойкостью, у представителей семейства *Brassicaceae* с широким ареалом распространения, а также определение вариации числа копий для некоторых из этих генов.

### Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы 88 сортов семейства *Brassicaceae* различного происхождения: 78 образцов рапса *B. napus* L. (Беларусь, Россия, Украина, Германия, Франция, Швейцария, Швеция, Великобритания, США, Канада, Перу, Япония, Новая Зеландия), 4 образца капусты полевой *B. rapa* ssp. *oliefera* (DC) Metzg (Россия, Латвия, Финляндия), 2 образца турнепса *Brassica rapa* L. ssp. *rapa* Metzg (Дания, Норвегия), 2 образца репы листовой *Brassica rapa* L. ssp. *rapa* f. *Shirona* Kitam и *Brassica rapa* L. ssp. *rapa* var. *komatsuna* Makino (Япония), 2 образца брюквы *Brassica napus* var. *napobrassica* (L.) Döll (Швеция, Россия).

#### Детекция ДНК-маркеров

Геномную ДНК выделяли из листьев индивидуальных растений (не менее 15 шт.), объединенных в пулл, с помощью набора Genomic DNA Purification Kit согласно инструкции (Thermo Fisher Scientific, Литва). Концентрацию ДНК определяли с использованием спектрофотометра Implen Nano Photometer N50 (Implen, Германия). Целевые фрагмен-

ты ДНК амплифицировали с локус-специфическими парами праймеров. ПЦР проводили на амплификаторе SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems). ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 2,0% агарозном геле. Результаты электрофореза документировали с использованием системы E-Box CX5 (Vilber, Германия), ПО E-Box CX5 TS Edge 18.01. Последовательности олигонуклеотидов для амплификации генетических маркеров Na10-CO3, BrgMS4511, BRAS011, O113-G05 даны в работе [2], BoCCA1-1R1, BoCCA1-2R1, BoCCA1-1R2, BoCCA1-2R2 в работе [3], CB10578-1, BrgMS653-2, BrgMS609-1, BrgMS5339-1, BrgMS372-2, BnGMS180-1, BnGMS10578-1 в работе [15], SSR O110, SSR BnO110 в работе [16].

#### Определение CNV

ДНК была выделена одновременно в течение одного рабочего дня и проанализирована в течение 2-х дней. Праймеры смоделированы в программе Primer-BLAST таким образом, чтобы последовательности нуклеотидов располагались внутри ампликонов, которые синтезируются в ПЦР с использованием оригинальных праймеров из работ [22, 23, 24] (табл. 1). Соответственно, были подобраны праймеры в регионах, максимально консервативных для всех анализируемых видов. Амплификацию проводили на термоциклере QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo FS, США).

### Результаты и обсуждение

Нами исследован полиморфизм микросателлитных локусов, сцепленных с QTL, ассоциированных с холодостойкостью у представителей семейства *Brassicaceae*. Использованы 11 SSR-маркеров, достоверно коррелирующих с относительной электропроводностью тканей и содержанием MDA у *B. napus* и *B. rapa* [2, 15]. Данные маркеры расположены у *B. rapa* в интервале BrgMs609-1–BrgMs5339-1 и сцеплены с QTL qSPADYL-6, qSPADYS-6 и qMADYS-6 *B. napus* [2, 15], а также SSR O110 и SSR BnO110, тесно сцепленные с QTL, ассоциированными с временем начала цветения растений, морозостойкостью и зимней выживаемостью [16]. ДНК-маркеры BrgMS4511, BRAS011, BrgMS653-2, BrgMS609-1, BrgMS372-2 и SSR O110 не выявили полиморфизм коллекции. С помощью остальных ДНК-

**Таблица 1**

Последовательности олигонуклеотидов для амплификации генетических маркеров для определения CNV

№	Маркер	Праймеры	Размер ампликона, п. н.
1	BnGMS180-1	F 5'-GTCTTGTTTTGGTGTGGCTT-3' R 5'-GCAGAGGCTTGAGATACACCA-3'	105
2	BrGMS102	F 5'-GCTCATACATTTGGAAGAGCACA-3' R 5'-ACTCGGGTCTGGTTTATTGGT-3'	84
3	BrgMS372	F 5'-TTCGGTTTCTACGTCGCTGT-3' R 5'-TGGTGCTATTGTTGGCGAATG-3'	61
4	BrGMS4511	F 5'-GTTGGTGCTCCTAAATTCCTTAGC-3' R 5'-GGCCGCCATATGTCAGTGAA-3'	84
5	SSR O110	F 5'-AACGGAAGAATCAACGGACCC-3' R 5'-TGTTGCTGGTCGAACGGTTA-3'	60

маркеров установлен полиморфизм изученной коллекции образцов с широким ареалом распространения. Были выявлены некоторые закономерности для отдельных SSR-маркеров. Так, для SSR-маркера Bn O110 *B. napus*, который, как было показано в работе [15], ассоциирован с QTL холодостойкости, у всех исследованных нами сортов рапса выявлялся идентичный фрагмент размером 180 п. н. Вместе с тем у сортов Васэ Абурана и Каванагарэ (Япония), а также у сорта Sutton's Favorite (Великобритания) выявлялся дополнительный фрагмент размером 274 п. н., а у сорта Asparagus (Великобритания) выявлялся дополнительный фрагмент размером 308 п. н. Фрагмент в 274 п. н. выявлялся также у капусты полевой Злата (Россия) и репы листовой Okute Oosaka Shirona (Япония).

Ранее показано, что SSR-маркер BnGMS180-1, ассоциированный с QTL холодостойкости у рапса, позволяет выявить у *B. napus* фрагменты размером 383 п. н.

(устойчивые формы) и 361 п. н. (чувствительные формы) [20]. В данном исследовании в генотипах образцов из различных стран выявлено наличие фрагмента размером 383 п. н. либо обоих фрагментов 383 п. н. и 361 п. н. При этом установлено, что японский сорт рапса Васэ Абурана содержит уникальный фрагмент размером 400 п. н. вместо фрагмента 383 п. н. наряду с фрагментом 361 п. н. (рис. 1).

SSR-маркер BnGMS10578-1, ассоциированный с QTL холодостойкости у рапса, выявлялся у сортов *B. napus*, в основном, оба фрагмента размером 232 и 202 п. н., за редким исключением — 202 п. н. (сорты Арсенал, Sutton's Favorite, Schnitt brauner, Pabularia, Forragero). Фрагмент 202 п. н. выявлялся также у брюквы *B. napobrassica* Местная. При этом у сортов рапса из Японии Васэ Абурана и Каванагарэ выявлялся только фрагмент размером 232 п. н. Данный единичный фрагмент выявлялся также у всех сортов капусты полевой, репы листовой и кормовой.

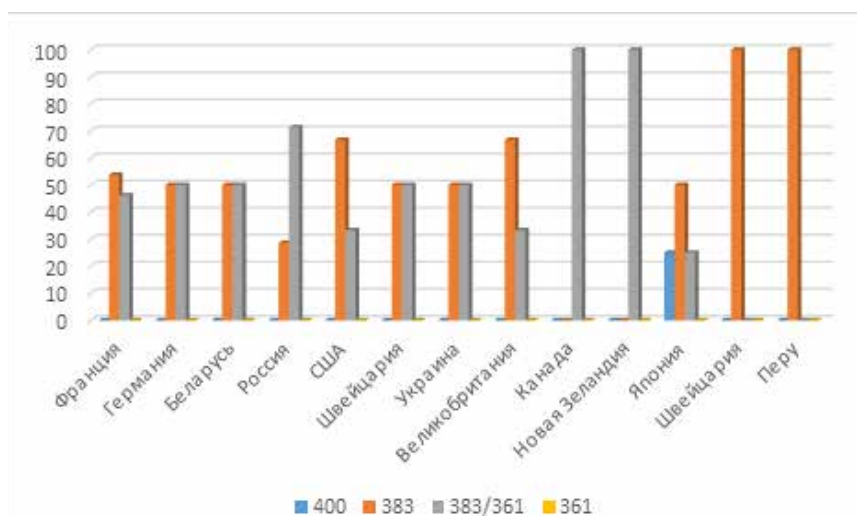


Рис. 1. Процентное соотношение нуклеотидных последовательностей, выявляемых с помощью ДНК-маркера BnGMS180-1 по странам

SSR-маркер CB10578-1 позволил детектировать у сортов *B. napus* фрагменты размером 200 п. н., 232 п. н. или оба фрагмента. SSR маркер BrgMS 372-2 выявлял фрагменты размером 386 п. н., 401 п. н. или оба фрагмента, при этом у большинства сортов *B. napus* выявлялся единственный фрагмент размером 401 п. н.

С помощью SSR-маркера BrgMS5339-1, фланкирующего области qSPADYS-6 и qMDAYS-6, также были определены полиморфные фрагменты. У большинства сортов рапса детектировалось 2 фрагмента размером 299 и 363 п. н. Фрагмент размером 363 п. н. также детектировался у сортов брюквы *B. napus* var. *napobrassica*. У сорта рапса Schnitt brauner (Германия) детектировались фрагменты размером 313 п. н. и 363 п. н. Интересно то, что и у исследованных сортов капусты полевой детектировалась последовательность размером 313 п. н. У *B. rapa* (репа кормовая и листовая) идентифицировался либо единственный фрагмент размером 298 п. н., либо два фрагмента размером 313 п. н.

С помощью SSR-маркера Na10-CO3 выявлен фрагмент размером 222 п. н. у 50 сортов *B. napus* L. Для SSR BnO110 были определены полиморфные фрагменты размером 180 п. н., 274 п. н. и 308 п. н. для различных генотипов.

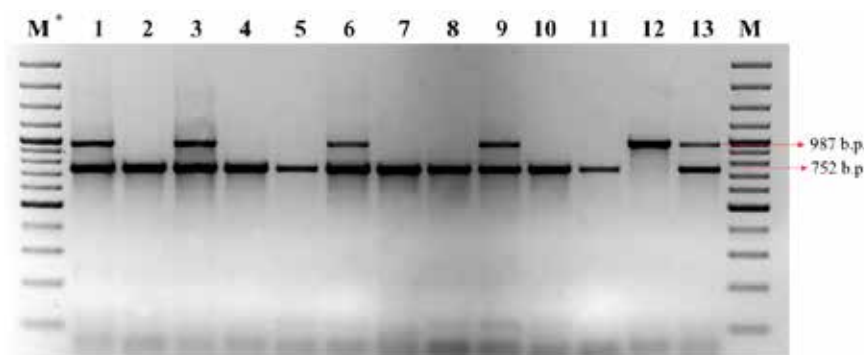
ДНК-маркер O113-G05 [2] позволял детектировать фрагмент размером 127 п. н. практически у всех сортов рапса, вне зависимости от региона происхождения, но отсутствовал у японского сорта рапса Васэ Абурана. У со-

ртов других видов и разновидностей семейства данный фрагмент не выявлен.

Потеря функциональных аллелей генов *CCA1*, *LHY*, а также *PRRs*, *ZTL*, *TOC1* влечет за собой появление циркадных эффектов, подобных световым эффектам, что указывает на критическую роль этих компонентов циркадной системы [21]. Ген *CCA1* участвует в позитивной регуляции холодового ответа у растений путем индукции экспрессии *CBF*-генов (факторов транскрипции генов *COR*) при низких температурах и определяет различия по степени устойчивости растений [8, 22]. Нами проведен анализ коллекции с помощью молекулярных маркеров к гену *CCA1*. Использованы молекулярные маркеры BoCCA1-1R1, BoCCA1-2R1, BoCCA1-1R2, BoCCA1-2R2 [10, 11].

Верификация коллекции образцов рапса при помощи SCAR-маркера BoCCA1-1R1 показала, что аллель *BoCCA1-1*, характерный для устойчивых к холоду сортов, содержится в геномах 26 из 88 проанализированных форм, включая белорусские сорта рапса Зенит, Добродей, Мартын (рис. 2).

SCAR-маркер BoCCA1-2R1 сцеплен с аллелем *BoCCA1-2* гена *CCA1*, который вносит вклад в устойчивость рапса к низким температурам. Праймеры, фланкирующие последовательность маркера, позволяют амплифицировать фрагмент размером 792 п. о. для восприимчивых образцов. Использование ДНК-маркера BoCCA1-2R1 позволило де-

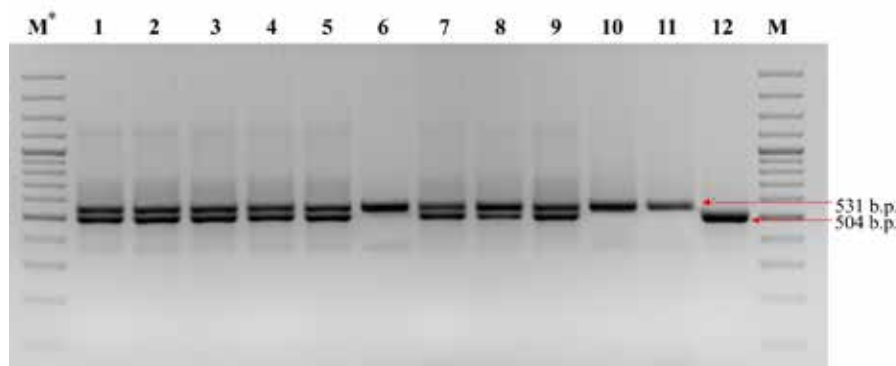


**Рис. 2.** Электрофореграммы продуктов амплификации аллелей гена *CCA1* с помощью SCAR-маркера BoCCA1-1R1 M — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (100–3 000 п. о., Thermo Fisher Scientific), 1 — Зенит; 2 — Зорный; 3 — Добродей; 4 — Инспирацион; 5 — Кодиак; 6 — Мартын; 7 — Jet Neuf; 8 — ВИК 2; 9 — Васэ Абурана; 10 — НОРД; 11 — Август; 12 — Tall Scotch Curled; 13 — Мерседес

тектировать последовательность, определяющую восприимчивость к пониженным отрицательным температурам, у подавляющего числа сортов рапса. SCAR-маркер BoCCA1-2R2 выявлял практически у всех сортов рапса два аллеля 531 и 504 п. о. Вместе с тем выявлено, что у сортов рапса из регионов Канады и Японии, где резкие различия между летом и зимой, с помощью SCAR-маркера BoCCA1-1R1 была установлена гомозиготность по аллелю *BoCCA1-1*, наличие которой определяет устойчивость к отрицательным температурам, с помощью SCAR-маркера BoCCA1-2R2 детектировался только фрагмент размером 504 п. о. (рис. 3).

Установлено также, что отдельные SCAR-маркеры, фланкирующие аллель *BoCCA1-1*, позволяют амплифицировать нуклеотидные последовательности различных размеров

и выявлять делеции либо инсерции в данных последовательностях. Тот факт, что у рапса из регионов с неблагоприятными погодными условиями — Каванагаре (Япония) и Tall Scotch Curled (Канада), у которых с помощью BoCCA1-1R1 была установлена гомозиготность по аллелю *BoCCA1-1*, наличие которой определяет устойчивость к отрицательным температурам, а с помощью маркера BoCCA1-2R2 не детектировалась последовательность 531 п. н., а выявлялся фрагмент размером 504 п. н., указывает на наличие делеции в гене *CCA1*. Эта делеция, возможно, определяет наибольшую морозостойкость данных сортов. Следует отметить, что у сортов Васэ Абурана (Япония), Satton`s Favorite (Великобритания), Добродей, Днепр (Беларусь), Синтетик (Украина), Мемфис (Германия), ЕС Нептун (Франция), а также у исследованных сортов капусты



**Рис. 3.** Электрофореграммы продуктов амплификации аллелей гена *CCA1* с помощью SCAR-маркера BoCCA1-2R2 M — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (100–3 000 п. о., Thermo Scientific), 1 — Зенит; 2 — Мартын; 3 — Август; 4 — ВИК 2; 5 — НОРД; 6 — Добродей; 7 — Мерседес; 8 — Кодиак; 9 — Jet Neuf; 10 — Васэ Абурана; 11 — Синтетик; 12 — Каванагаре

полевой, репы листовой и кормовой выявлялся единичный фрагмент размером 531 п. о., что, по-видимому, указывает на наличие инсерции в исследуемом гене. По нашему мнению, отклонения по амплифицируемым фрагментам от ожидаемых, выявленные с помощью отдельных SSR-маркеров для некоторых сортов, указывают на наличие делеций либо инсерций, которые также могут определять отклонения по степени холодостойкости у данных сортов.

Нами было также отмечено, что маркеры Na10CO3, O113-G05 выявляли локусы, ассоциированные с холодостойкостью, вне зависимости от страны происхождения. Вместе с тем, по данным литературы, ряд семейств генов ответа на температурный стресс, или даже индивидуальные члены этих семейств, могут быть вовлечены как в высоко-, так и в низкотемпературный стресс [23, 24]. Поэтому в нашем исследовании подтверждена гипотеза о предпочтительном сохранении генов, ассоциированных с холодом, в процессе эволюции как результат полиплоидизации растений семейства *Brassicaceae*, происходящих как из холодных, так и теплых областей.

*Вариация числа генов (copy number variation, CNV)*

Предполагается, что полиплоидизация геномов может быть основным двигателем эволюции растений и коррелирует с возникновением и быстрой диверсификацией основных таксонов [11]. Секвенирование геномов *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa* выявило рекурсивную полиплоидизацию, несмотря на их небольшие размеры [20]. Геномный анализ *A. thaliana*, трех видов рода *Brassica* и представителей 17 других видов растений, позволил установить, что гены холодового ответа CRGs (cold-related genes) и их коллинеарность предпочтительно сохраняются после полиплоидизации, в то время как для других геномных сетей характерно разнообразие механизмов развития. Показано, что холодовой стресс может способствовать возникновению полиплоидных растений путем как увеличения полиплоидии, так и селективного отбора CRGs в ходе эволюции [21].

Нами начаты работы по определению CNV для SSR-маркеров, ассоциированных с содержанием MDA и относительной электропроводностью тканей, у представителей семейства *Brassicaceae*. Показано [2, 15], что у *B. rapa*

и *B. napus* степень повреждения растений при отрицательных температурах также коррелирует с содержанием MDA и относительной проводимостью мембран. Были выявлены SSR-маркеры, в том числе BnGMS180-1, BrGMS102 и BrGMS4511 [2, 15], пригодные для диагностики устойчивых и восприимчивых к холоду генотипов. Ранее нами были протестированы вышеперечисленные ДНК-маркеры на отдельных сортах *B. napus* и *B. rapa*. Однако на рабочей коллекции изученных генотипов образцов показано, что полиморфизм выявлял только один из трех отобранных для изучения ДНК-маркеров — BnGMS180-1 [7, 8]. Вместе с тем в работе [2] выявлена достоверная корреляция этих ДНК-маркеров (BnGMS180-1, BrGMS102 и BrGMS4511) с содержанием MDA и относительной электропроводностью тканей. В связи с этим мы предположили, что изменения в характере ДНК-маркирования могут происходить на уровне вариации числа генов.

В проведенном нами исследовании установлено, что ДНК-маркеры BrGMS102 и BrGMS4511, которые были не эффективны для выявления полиморфизма по генетическим локусам, ассоциированными с морозостойкостью у представителей семейства *Brassicaceae*, также не имеют выраженного полиморфизма по CNV и показывают в среднем две копии на геном. Эффективный для оценки полиморфизма генотипов нашей коллекции маркер BnGMS180-1 проявил вариабельность. Показано присутствие в генотипах коллекции образцов, содержащих от двух до двенадцати копий на геном, для сорта из Великобритании Sutton's Favorite.

### Заключение

Семейство *Brassicaceae* включает в себя ценные сельскохозяйственные культуры масличного, кормового и овощного назначения, такие как рапс, сурепица, репа, брюква, турнепс, капуста и др. В зонах рискованного земледелия растения подвергаются воздействию низких температур как в период зимних заморозков, так и весенних резких понижений температуры, которые могут совпадать у озимых форм с периодом вегетации и первым урожаем. В связи с этим отбор и создание сортов с повышенной устойчивостью к охлаждению и за-



мораживанию является крайне актуальным.

В настоящее время разработано небольшое количество молекулярных маркеров, которые выявляют полиморфизм генов и локусов количественных признаков, ассоциированных с холодо- и морозостойкостью, у представителей семейства *Brassicaceae*. В нашей работе мы использовали эффективные молекулярные маркеры, с помощью которых были дифференцированы аллели холодостойкости у 88 образцов семейства *Brassicaceae* с широким ареалом распространения. В коллекции были представлены образцы из Европы, Азии, Северной и Южной Америки, Новой Зеландии.

В нашей работе из проанализированных SSR-маркеров, ассоциированных с QTL морозостойкости, шесть (Na10-CO3, O1113-G05, SSR Bn O110, BngMS180-1, BrgMS 5339-1, CB 10578-1), позволили установить полиморфизм коллекции. Кроме того, были выявлены некоторые закономерности для отдельных SSR-маркеров.

Первый опыт исследований по выявлению копияности генетических локусов CNV показал, что эффективный для выявления полиморфизма генотипов нашей коллекции образцов маркер BnGMs180-1 проявил вариабельность: установлено присутствие в геномах от двух до двенадцати копий на геном. Показано, что копияность генов, ассоциированных с холодостойкостью, оказывает влияние на повышение устойчивости к низким температурам представителей семейства *Brassicaceae*.

#### Список использованных источников

1. Rihan H. Z., Al-Issawi M., Fuller M. P. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance / J. of Plant Interactions. – 2017. – Vol. 12. – P. 143–157.
2. Analysis of cold resistance and identification of SSR markers linked to cold resistance genes in *Brassica rapa* / Z. Huang [et al.] / Breed Sci. – 2017. Vol. 67, № 3. – P. 213–220.
3. Allelic variation in *Brassica oleracea* CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (BoCCA1) is associated with freezing tolerance / H. Song [et al.] // Hort. Environ. Biotechnol. – 2018. – Vol. 59, № 3. – P. 423–434.
4. Thomashow MF. (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 118, 1–7.

5. Генетические механизмы акклиматизации чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) к холодовому стрессу / Самарина Л.С. и соавт. // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2019. – Т. 23, № 8. – С. 958–963.

6. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities / S.J. Gilmour [et al.] // *Plant Mol Biol.* – 2004. Vol. 54, № 5. – P. 767–781.

7. Генетический полиморфизм рапса (*Brassica napus*) в связи с морозостойкостью / Мозгова Г. В., Хоружий Н. Е., Амосова А. В., Пиллюк Я. Э., Белявский В. М., Храменко С. Ю., Муравенко О. В., Лемеш В. А. // Молекулярная и прикладная генетика. – 2019. – Т. 26. – С. 34–43.

8. Геномные маркеры, ассоциированные с устойчивостью к низким температурам у *Brassica rapa* L. / Амосова А. В., Саматадзе Т. Е., Мозгова Г. В., Кипень В. Н., Дубовская А. Г., Артемьева А. М., Юркевич О. Ю., Зошук С. А., Лемеш В. А., Муравенко О. В. // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54, № 4. – С. 603–615.

9. Lin Y., Guo W., Xu Z. and Jia Z. Cold resistance and changes in MDA and soluble sugar of lives of *Ligustrum lucidum* Ait in winter / *Chinese Agricultural Science Bulletin.* – 2013. – Vol. 28. – P. 68–72.

10. Żmieńko, A., Samelak, A., Kozłowski, P., and Figlerowicz, M. / Copy number polymorphism in plant genomes. – *Theor. Appl. Genet.* – 2014. – Vol. 127. – P. 1–18.

11. Genome reduction uncovers a large dispensable genome and adaptive role for copy number variation in asexually propagated *Solanum tuberosum* / Hardigan M. [et al.] // *The Plant Cell.* – 2016. – Vol. 28. – DOI:10.1105/tpc.15.00538

12. CBF gene copy number variation at Frost Resistance-2 is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals / Knox A.K. [et al.]. – *Theor. Appl. Genet.* – 2010. – Vol. 121. – P. 21–35.

13. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice / Xu K. [et al.] // *Nature.* – 2006. – Vol. 442. – P. 705–708.

14. Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number / Maron L. G. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110. – P. 5 241–5 246.

15. Mapping of quantitative trait loci related to cold resistance in *Brassica napus* L. / Zh. Huang [et al.] // *J. of Plant Physiology*. – 2018. – Vol. 231. – P. 147–154.
16. Genetic variability between several *Brassicaceae* populations of different winter survival ability / B. Rakić [et al.] // In. 12th IRC: Sustainable Development in Cruciferous Oilseed Crops Production. Vol. 2. – Wuhan, China. – 2007. – P. 78–80.
17. Analysis of cold resistance and identification of SSR markers linked to cold resistance genes in *Brassica rapa* L. / Huang Zh. [et al.] // *Breed Sci*. – 2017. – Vol. 67, № 3. – P. 213–220.
18. A Complex Recombination Pattern in the Genome of Allotetraploid *Brassica napus* as Revealed by a High-Density Genetic Map / Cai G. [et al.] // *PLoS One*. 2014. – Vol. 9, № 10: e109910.
19. Kole 2002 Linkage mapping of genes controlling resistance to white rust (*Albugo candida*) in *Brassica rapa* (syn. *campestris*) and comparative mapping to *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* / *Genome*. – 2002. – Vol. 45, № 1. – P. 22–27.
20. Paterson, A. H., Bowers, J. E. & Chapman, B. A. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics / *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. 101. – P. 9 903–9 908.
21. Preferential gene retention increases the robustness of cold regulation in *Brassicaceae* and other plants after polyploidization / *Horticulture Research* // Song [et al.]. – 2020. – Vol. 7, № 20. – <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0253-0>.
22. Salome P. A., McClung C.R. PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock / *Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17. – P. 791–803.
23. A cytosolic class II small heat shock protein, PfhSP17.2, confers resistance to heat, cold, and salt stresses in transgenic *Arabidopsis* / *Genet. Mol. Biol.* // Zhang, L. [et al.]. – 2018. – Vol. 41. – P. 649–660.
24. Genome-wide identification and characterization of HSP gene superfamily in whitefly (*Bemisia tabaci*) and expression profiling analysis under temperature stress / Wang X. R. [et al.] // *Insect Sci*. – 2019. – Vol. 26. – P. 44–57.

V. A. Lemesh, G. V. Mozgova, V. N. Kipen, L. V. Khotyleva

**POLYMORPHISM OF ALLELES ASSOCIATED WITH LOW  
TEMPERATURE RESISTANCE IN REPRESENTATIVES OF THE  
*BRASSICACEAE* FAMILY WITH A WIDE DISTRIBUTION AREA**

State Scientific Institution

"Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus"

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Belarus

e-mail: g.mozgova@igc.by

The polymorphism of loci associated with cold resistance in representatives of the *Brassicaceae* family was studied. We used 11 SSR markers significantly correlated with relative electrical conductivity of tissue and MDA content, 4 SCAR-markers linked to the alleles of gene *CCA1*, as well as SSR O110 and SSR BnO110, closely linked to QTLs associated with plant flowering start time, frost resistance, and winter survival. Verification of samples using the BoCCA1-1R1 SCAR marker showed that the *BoCCA1-1* allele, which is characteristic of cold resistant varieties, is contained in the genomes of 26 out of 88 analyzed forms, including the Belarusian varieties of rapeseed Zenit, Dobrodey, Martyn.

Work has begun on the determination of CNV for SSR markers associated with MDA content and relative electrical conductivity of tissues in representatives of the *Brassicaceae* family. It was found that the DNA markers BrGMS102 and BrGMS4511, which are not effective for detecting polymorphism at genetic loci associated with cold resistance in representatives of the *Brassicaceae* family, show less than one copy per genome. The effective marker BnGMS180-1 showed variability: from two to twelve copies per genome. Consequently, gene copy number has an effect on increasing resistance to low temperatures in representatives of the *Brassicaceae* family.

**Keywords:** family *Brassicaceae*, cold resistance, SSR-markers, SCAR-markers, CNV.

*Дата поступления в редакцию: 15 марта 2022 г.*

Е. П. Михаленко<sup>1</sup>, А. Н. Щаюк<sup>1</sup>, М. Н. Шепетько<sup>2</sup>, Ю. В. Полюхович<sup>1</sup>, Т. В. Никитинская<sup>1</sup>,  
А. В. Кильчевский<sup>1</sup>

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА DNMT3B ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: E.Michalenko@igc.by

<sup>2</sup>УО «Белорусский медицинский университет»  
Республика Беларусь, 220016, г. Минск, пр. Дзержинского, 83

Проведена оценка влияния полиморфных вариантов гена *DNMT3B* на риск развития и клинические характеристики немелкоклеточного рака легкого. Для определения полиморфизмов rs1569686 (–579G > T) и rs2424913 (–149C > T) в промоторном регионе гена *DNMT3B* использовали метод ПЦР-ПДРФ. Показана рискованная значимость генотипов –579GT + TT (OR = 1,73; 95% CI: 1,11–2,71) и генотипов –149 CT + TT (OR = 1,59; 95% CI: 1,00–2,50) в развитии более распространенного опухолевого процесса при немелкоклеточном раке легкого. У лиц старше 60 лет с генотипом –579TT *DNMT3B* повышен риск развития немелкоклеточного рака легкого (OR = 2,49; 95% CI: 1,15–5,40) и плоскоклеточного рака легкого (OR = 4,39; 95% CI: 1,36–14,13). Выявлено, что у курящих пациентов достоверно чаще по сравнению с некурящими пациентами встречаются носители генотипа –149TT (OR = 2,39; 95% CI: 1,16–6,93) и носители генотипа –579TT (OR = 3,05; 95% CI: 1,36–6,85). Такая же зависимость сохраняется для курящих пациентов с плоскоклеточным раком легкого.

**Ключевые слова:** ДНК-метилтрансфераза, генетический полиморфизм, опухолевый процесс, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак легкого.

### Введение

Рак легкого (РЛ) является актуальной социально-биологической проблемой. Значение ее возрастает в связи с неуклонным ростом заболеваемости и смертности от рака легкого во многих экономически развитых регионах. Во всем мире растет число случаев рака легких и случаев смерти. По гистологическому строению рак легкого делится на две большие группы: мелкоклеточный (около 15% случаев) и немелкоклеточный (НМРЛ) (85% случаев). В 2020 году GLOBOCAN зарегистрировал 2,2 млн новых случаев рака легкого (11,4% от общего числа случаев рака) и 1,8 млн смертей (18,0% от общего числа смертей от рака) [1]. В структуре онкопатологии РЛ занимает первое место среди мужского населения. За последние годы заболеваемость мужчин увеличилась на 44%, женщин — на 75% [2].

Отличительной чертой развития рака легкого являются последовательные эпигенетиче-

ские и генетические аномалии в соматических клетках [1], и лучшее понимание внутренних биологических признаков, которые определяют инициацию и прогрессирование НМРЛ, может иметь важное значение для разработки биомаркеров диагностики и лечения этого заболевания.

Метилирование ДНК играет важную роль в модуляции структуры хроматина, регуляции транскрипции и стабильности генома. У высших организмов метилирование защищает ДНК от деградации нуклеазами и играет важную роль в регуляции экспрессии гена, что существенно для нормального развития и функционирования. Метилирование ДНК у людей отмечают едва ли не исключительно в CpG-динуклеотидах, большинство CpG-последовательностей в геноме метилированы. Модификация, как правило, репрессивна по отношению к транскрипции и помогает поддерживать «молчание» мобильных гене-

тических элементов, усиливая таким образом стабильность генома. Однако имеются «СрG-островки», которые ассоциируются с геными промоторами и ускользают от метилирования ДНК [3, 5, 6]. Гипометилирование ДНК может вести к активации онкогенов. В опухолевых клетках оно может вызвать деконденсацию хроматина и хромосомные реаранжировки, которые могут привести к нестабильности хромосом. Характерной чертой злокачественно трансформированных клеток является дисбаланс метилирования ДНК, выражающийся в том, что в одном типе опухолевых клеток наблюдается и aberrантное гиперметилирование промоторных зон генов-супрессоров, вовлеченных в канцерогенез, и снижение уровня метилирования остальной части генома [6–8]. Изучение изменений в метилировании ДНК может способствовать ранней диагностике опухоли, определению индикаторов канцерогенного риска и прогнозировать исход заболевания для онкологических пациентов [9, 10].

У человека за процесс метилирования ДНК отвечают три фермента, называемые ДНК-метилтрансферазами: 1 (DNMT1), 3a (DNMT3a) и 3b (DNMT3b). Активность метилтрансфераз заключается в переносе метильных (СН<sub>3</sub>-) групп на азотистое основание цитозин в составе ДНК, ведет к изменению свойств ДНК, при этом изменяется активность, функции соответствующих генов, а также пространственная структура нуклеиновой кислоты [11, 12].

ДНК-метилтрансфераза 3b (DNMT3B) осуществляет метилирование ДНК *de novo*. Ген *DNMT3B* локализован на хромосоме 20q11.2, состоит из 23 экзонов и 22 интронов и имеет протяженность около 47kb геномной ДНК. Ген *DNMT3B* имеет два сайта старта транскрипции, которые существуют в разных экзонах (экзон 1A и 1B), и экспрессия регулируется разными промоторами. Один промотор расположен в области богатой СрG, тогда как другой промотор обнаружен в участке с малым количеством СрG. Однонуклеотидные полиморфизмы в промоторе гена *DNMT3B* связаны с широким спектром онкологических заболеваний, таких как рак головы и шеи, рак желудка, рак легкого и острый миелоидный лейкоз [13–17].

Цель данной работы — оценить влияние по-

лиморфных вариантов гена *DNMT3B* на риск развития и клинические характеристики немелкоклеточного рака легкого.

## Материалы и методы

В ходе проведения исследования были собраны образцы биологического материала 403 пациентов, страдающих раком легкого и находившихся на лечении в УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер» с 2004 по 2019 годы. Для повышения точности и достоверности результатов проводимого исследования осуществлен отбор пациентов и контроля по определенным критериям.

Критериями включения в группу пациентов для исследования были: а) гистологический тип опухоли — плоскоклеточный РЛ и аденокарцинома; б) славянское происхождение; в) отсутствие первично-множественных онкозаболеваний; г) соответствие в группах пациентов и контроля по возрасту, полу и сопутствующим заболеваниям.

В контрольную группу вошли 409 людей без онкопатологий.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К с последующей очисткой этанолом. Для выявления полиморфизмов rs1569686 (–579G > T) и rs2424913 (–149C > T) в промоторном регионе гена *DNMT3B* использовали метод ПЦР с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). В таблице 1 представлены праймеры и эндонуклеазы рестрикции, использованные в работе [18].

Условия ПЦР подбирали экспериментально для каждой пары праймеров. Амплифицированные фрагменты исследуемых генов подвергали рестрикционному расщеплению соответствующей эндонуклеазой согласно инструкции фирмы-производителя. Продукты рестрикции фракционировали в горизонтальном агарозном геле с концентрацией 1,8–2,2% в зависимости от длины ПДРФ-фрагментов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием онлайн-ресурса SNPStats [19] и прикладной программы GraphPad InStat Version 3.05. Тест на соответствие контрольной выборки (группа сравнения) равновесию Харди-Вайнберга проводили

Таблица 1

Праймеры и эндонуклеазы рестрикции, использованные в работе

Полиморфизм	Праймеры 5'-3'	Длина продукта, п. н.	Рестриктаза	Длина ПДРФ-фрагментов, п. н. (аллель)
rs1569686 (-579G > T)	F: GACCTGGAGCTGTTTGTGGT R: CAGAGTCCCAAGTCCCAAG	550	PvuII	550 (GG) 550 + 420 + 130 (GT) 420 + 130 (TT)
rs2424913 (-149C > T)	F: TTGTCCTGAAGCTGGCTACC R: ACCAGGAGAGAAGCCAACAG	431	AvrII	431 (CC) 431 + 362 + 69 (CT) 362 + 69 (TT)

с использованием метода  $\chi^2$  ( $\alpha = 0,05$ ;  $df = 1$ ). Связь между генотипами, гаплотипами и течением заболевания оценивали по отношению шансов (OR (95% CI)) с использованием кодоминантной модели SNPStats. OR указан с 95%-ным доверительным интервалом (confidence interval — CI). Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым. При условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали точный тест Фишера.

### Результаты и обсуждение

Характеристики участников этого исследования приведены в таблице 2. Средний воз-

раст пациентов с НМРЛ составлял 62,3 года и 64,1 год для здоровых людей. Группы пациентов с НМРЛ и контроля различались по статусу курения (59,5% против 29,8%; OR: 2,60; 95% CI: 1,89–3,57), что подтверждает ключевую роль этого фактора среди других факторов внешней среды в этиологии рака легкого. По гистологии опухоли выборка разделена на практически равные группы пациентов с плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ) (48,4%) и аденокарциномой (АК) (46,2%). Группа пациентов с ПКРЛ преимущественно представлена мужчинами (94,4%), в группе пациентов с АК — 62,9% мужчин и 37,1% женщин.

Таблица 2

Клинико-anamнестические данные пациентов и контрольной группы, включенных в исследование

Характеристика	Пациенты с НМРЛ, n (%)	Контрольная группа, n (%)
	n = 403	n = 409
Возраст (лет):		
Медиана	62,3	64,1
Минимум/максимум	32/92	33/94
Пол:		
Женский	82 (20,3)	111 (27,1)
Мужской	321 (79,7)	298 (72,9)
Статус курения:		
Не курит	127 (31,5)	168 (41,1)
Курит	240 (59,5)	122 (29,8)
Нет данных	36 (8,9)	119 (29,1)

## Окончание таблицы 2

Характеристика	Пациенты с НМРЛ, n (%)	Контрольная группа, n (%)
	n = 403	n = 409
<b>Гистология:</b>		
<i>Плоскоклеточный</i>	195 (48,4)	–
Мужчины	184 (94,4)	–
Женщины	11 (5,6)	–
<i>Аденокарцинома</i>	186 (46,2)	–
Мужчины	117 (62,9)	–
Женщины	69 (37,1)	–
<i>НМРЛ, раковые клетки</i>	22 (5,5)	–
<b>Стадия:</b>		
I	173 (42,9)	–
II	75 (18,6)	–
III	126 (31,2)	–
IV	27 (6,7)	–
Невозможно определить	2 (0,5)	–
<b>Степень распространения первичной опухоли (T):</b>		
Tis	1 (0,2)	–
T1	131 (32,5)	–
T2	187 (46,4)	–
T3	54 (13,4)	–
T4	30 (7,4)	–
<b>Наличие метастазов в регионарных лимфоузлах (N):</b>		
N0	218 (53,9)	–
N1	77 (19,2)	–
N2	93 (24,2)	–
N3	11 (1,3)	–
Нет данных	3 (1,3)	–
<b>Наличие отдаленных метастазов (M):</b>		
M0	374 (92,8)	–
M1	28 (6,9)	–
Нет данных	1 (0,2)	–

Был осуществлен поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена *DNMT3B* с вероятностью развития НМРЛ (табл. 3). Распределение частот встречаемости полиморфных вариантов гена *DNMT3B* в общей группе пациентов с НМРЛ не отличалось от их распределения

в группе контроля.

При разделении пациентов на группы по гистологическому признаку распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* в контрольной группе соответствовало таковой в группах пациентов с АК и ПКРЛ (табл. 4).

Таблица 3

Распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* в контрольной группе и у пациентов с немелкоклеточным раком легкого

Полиморфный вариант	Контроль	НМРЛ	OR (95% CI)	p
	n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> -579G > T	n = 359	n = 348		
GG	124 (34,5)	135 (38,8)	1,00	0,48
GT	185 (51,5)	165 (47,4)	0,82 (0,59–1,13)	
TT	50 (13,9)	48 (13,8)	0,88 (0,55–1,40)	
GT + TT	235 (65,5)	213 (61,2)	0,83 (0,61–1,13)	0,24
<i>DNMT3B</i> -149C > T	n = 350	n = 363		
CC	99 (28,3)	114 (31,4)	1,00	0,66
CT	189 (54)	188 (51,8)	0,86 (0,62–1,21)	
TT	62 (17,7)	61 (16,8)	0,85 (0,55–1,33)	
CT + TT	251 (71,7)	249 (68,6)	0,86 (0,62–1,19)	0,36

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что полиморфные варианты гена *DNMT3B* не оказывают влияния на риск развития НМРЛ в исследуемой выборке пациентов.

На следующем этапе работы проанализировали связь полиморфных вариантов гена *DNMT3B* с клинико-морфологическими параметрами опухоли: размер первичной опухоли (Т), наличие регионарных (N) и отдаленных

Таблица 4

Распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* в контрольной группе и у пациентов с АК и ПКРЛ

Полиморфный вариант	Контроль	АК	OR (95% CI)	P	ПКРЛ	OR (95% CI)	P
	n (%)	n (%)			n (%)		
<i>DNMT3B</i> -579G > T	n = 359	n = 164			n = 178		
GG	124 (34,5)	70 (42,7)	1,00	0,19	63 (35,4)	1,00	0,70
GT	185 (51,5)	76 (46,3)	0,73 (0,49–1,08)		86 (48,3)	0,91 (0,62–1,36)	
TT	50 (13,9)	18 (11)	0,64 (0,35–1,18)		29 (16,3)	1,14 (0,66–1,98)	
GT + TT	235 (65,5)	94 (57,3)	0,71 (0,49–1,03)	0,075	115 (64,6)	0,96 (0,66–1,40)	0,85



Окончание таблицы 4

Полиморфный вариант	Контроль	АК	OR (95% CI)	P	ПКРЛ	OR (95% CI)	P
	n (%)	n (%)			n (%)		
<i>DNMT3B</i> -149C > T	n = 350	n = 172			n = 186		
CC	99 (28,3)	52 (30,2)	1,00	0,71	61 (32,8)	1,00	0,52
CT	189 (54)	94 (54,6)	0,94 (0,62–1,42)		92 (49,5)	0,79 (0,53–1,18)	
TT	62 (17,7)	26 (15,1)	0,79 (0,45–1,39)		33 (17,7)	0,86 (0,51–1,47)	
CT + TT	251 (71,7)	120 (69,8)	0,90 (0,60–1,34)	0,61	125 (67,2)	0,81 (0,55–1,19)	0,28

метастазов (M).

При анализе влияния полиморфных вариантов гена *DNMT3B* на размер первичной опухоли не выявлено достоверно значимых различий

в распределении частот встречаемости генотипов *DNMT3B* между пациентами, имеющими степень распространения первичной опухоли T1 и T2–T4 (табл. 5).

Таблица 5

Распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* у пациентов в зависимости от степени распространения первичной опухоли (T)

Полиморфный вариант	T1	T2–T4	OR (95% CI)	P
	n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> -579G > T	n = 114	n = 247		
GG	42 (36,8)	96 (38,9)	1,00	0,24
GT	51 (44,7)	122 (49,4)	1,05 (0,64–1,71)	
TT	21 (18,4)	29 (11,7)	0,60 (0,31–1,18)	
GT + TT	72 (63,2)	151 (61,1)	0,92 (0,58–1,45)	0,71
<i>DNMT3B</i> -149C > T	n = 126	n = 252		
CC	36 (28,6)	82 (32,5)	1,00	0,17
CT	61 (48,4)	132 (52,4)	0,95 (0,58–1,56)	
TT	29 (23)	38 (15,1)	0,58 (0,31–1,07)	
CT + TT	90 (71,4)	170 (67,5)	0,83 (0,52–1,32)	0,43

Анализ ассоциации полиморфных вариантов гена *DNMT3B* с развитием метастазов в регионарных лимфоузлах показал (табл. 6), что у носителей аллеля T полиморфизма rs1569686 (генотипы -579GT + TT) наблюдается повышенный риск развития регионарных метастазов

(OR = 1,61; 95% CI: 1,04–2,48; p = 0,032).

При анализе влияния полиморфных вариантов гена *DNMT3B* на метастазирование в отдаленные от первичного очага ткани и органы в исследуемой популяции не выявлено достоверно значимых различий в распределении ча-

Таблица 6

Распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* у пациентов с НМРЛ в зависимости от наличия метастазов в регионарных лимфоузлах (N)

Полиморфный вариант	N0	N1–N3	OR (95% CI)	p
	n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> –579G > T	n = 196	n = 161		
GG	85 (43,4)	52 (32,3)	1,00	<b>0,048</b>
GT	<b>82 (41,8)</b>	<b>88 (54,7)</b>	<b>1,75 (1,11–2,77)</b>	
TT	29 (14,8)	21 (13)	1,18 (0,61–2,29)	
GT + TT	<b>111 (56,6)</b>	<b>109 (67,7)</b>	<b>1,61 (1,04–2,48)</b>	<b>0,032</b>
<i>DNMT3B</i> -149C > T	n = 205	n = 169		
CC	73 (35,6)	45 (26,6)	1,00	0,24
CT	97 (47,3)	93 (55)	1,56 (0,97–2,48)	
TT	35 (17,1)	31 (18,3)	1,44 (0,78–2,64)	
CT + TT	132 (64,4)	124 (73,4)	1,52 (0,98–2,38)	0,062

**Примечание.** Выделение жирным шрифтом соответствует  $p \leq 0,05$

стот встречаемости генотипов *DNMT3B* между пациентами имеющими метастазы в отдаленных органах (M1) и пациентами без метастазов (M0) (табл. 7). Далее провели анализ всех трех клинико-морфологических параметров,

показывающих распространенность опухолевого процесса (табл. 8). Распределение частот встречаемости полиморфных вариантов гена *DNMT3B* в группах пациентов с распространенным и нераспространенным опухолевым

Таблица 7

Распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* у пациентов с НМРЛ в зависимости от наличия отдаленных метастазов (M)

Полиморфный вариант	M0	M1	OR (95% CI)	p
	n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> –579G > T	n = 334	n = 26		

Окончание таблицы 7

Полиморфный вариант	M0	M1	OR (95% CI)	p
	n (%)	n (%)		
GG	129 (38,6)	9 (34,6)	1,00	0,46
GT	157 (47)	15 (57,7)	1,37 (0,58–3,23)	
TT	48 (14,4)	2 (7,7)	0,60 (0,12–2,86)	
GT + TT	205 (61,4)	17 (65,4)	1,19 (0,51–2,75)	0,68
<i>DNMT3B</i> –149C > T	n = 351	n = 26		
CC	111 (31,6)	7 (26,9)	1,00	0,74
CT	179 (51)	13 (50)	1,15 (0,45–2,97)	
TT	61 (17,4)	6 (23,1)	1,56 (0,50–4,85)	
CT + TT	240 (68,4)	19 (73,1)	1,26 (0,51–3,07)	0,61

процессом достоверно отличалось. Выявлено наличие более распространенного опухолевого процесса при НМРЛ у носителей ге-

нотипов –579GT + TT (OR = 1,73; 95% CI: 1,11–2,71; p = 0,016) и у носителей генотипов –149 CT + TT (OR = 1,59; 95% CI: 1,00–2,50;

Таблица 8

Распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* у пациентов с НМРЛ в зависимости распространенности опухолевого процесса

Полиморфный вариант	T1–T2 N0 M0	T1–T4 N1–N3 M0–M1	OR (95% CI)	p
	n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> –579G > T	n = 168	n = 161		
GG	76 (45,2)	52 (32,3)	1,00	0,028
GT	<b>68 (40,5)</b>	<b>88 (54,7)</b>	<b>1,89 (1,18–3,04)</b>	
TT	24 (14,3)	21 (13,0)	1,28 (0,65–2,53)	
GT + TT	<b>92 (54,8)</b>	<b>109 (67,7)</b>	<b>1,73 (1,11–2,71)</b>	<b>0,016</b>

## Окончание таблицы 8

Полиморфный вариант	T1–T2 N0 M0	T1–T4 N1–N3 M0–M1	OR (95% CI)	p
	n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> –149C > T	n = 178	n = 169		
CC	65 (36,5)	45 (26,6)	1,00	0,14
CT	85 (47,8)	93 (55,0)	1,58 (0,98–2,56)	
TT	28 (15,7)	31 (18,3)	1,60 (0,85–3,02)	
CT + TT	<b>113 (63,5)</b>	<b>124 (73,4)</b>	<b>1,59 (1,00–2,50)</b>	<b>0,047</b>

**Примечание.** Выделение жирным шрифтом соответствует  $p \leq 0,05$

$p = 0,047$ ).

При разделении пациентов с НМРЛ на группы в соответствии с возрастом обнаружено,

что генотип –579ТТ ассоциирован с развитием заболевания у лиц старше 60 лет (OR = 2,49; 95% CI: 1,15–5,40;  $p = 0,0065$ ) (табл. 9).

## Таблица 9

Распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* у пациентов с НМРЛ в зависимости от возраста

Полиморфный вариант	Младше 60 лет	Старше 60 лет	OR (95% CI)	p
	n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> –579G > T	n = 139	n = 222		
GG	53 (38,1)	85 (38,3)	1,00	<b>0,0065</b>
GT	76 (54,7)	97 (43,7)	0,80 (0,50–1,26)	
TT	<b>10 (7,2)</b>	<b>40 (18,0)</b>	<b>2,49 (1,15–5,40)</b>	
GT + TT	86 (61,9)	137 (61,7)	0,99 (0,64–1,54)	0,98
<i>DNMT3B</i> –149C > T	n = 145	n = 232		
CC	49 (33,8)	69 (29,7)	1,00	0,19
CT	77 (53,1)	116 (50,0)	1,07 (0,67–1,70)	
TT	19 (13,1)	47 (20,3)	1,76 (0,92–3,35)	

Окончание таблицы 9

Полиморфный вариант	Младше 60 лет	Старше 60 лет	OR (95% CI)	p
	n (%)	n (%)		
СТ + ТТ	96 (66,2)	163 (70,3)	1,21 (0,77–1,88)	0,41

**Примечание.** Выделение жирным шрифтом соответствует  $p \leq 0,05$

Анализ ассоциации полиморфных вариантов гена *DNMT3B* у пациентов с АК и ПКРЛ показал, что только для ПКРЛ сохраняется рисковая значимость генотипа –579ТТ в развитии заболевания у пациентов старше 60 лет (OR = 4,39; 95% CI: 1,36–14,13;  $p = 0,0051$ ) (табл. 10).

Полученные результаты можно объяснить тем, что на этиологию ПКРЛ оказывают большое влияние курение и факторы внешней среды. Подобное воздействие приводит

к накоплению мутаций в онкогенах и генах-онкосупрессорах, а при нарушении функционирования метилтрансфераз за счет изменения их экспрессии происходит гиперметилование промоторов генов-онкосупрессоров, что приводит к повышенной вероятности возникновения в них мутаций, либо к гипометилации онкогенов, которое способствует их экспрессии [20, 21]. Поэтому на следующем этапе провели анализ взаимосвязи полиморфных вариантов гена *DNMT3B* с вероятностью разви-

Таблица 10

Распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* у пациентов с НМРЛ в зависимости от возраста и гистологического типа опухоли

Полиморфный вариант	АК		OR (95% CI)	p	ПКРЛ		OR (95% CI)	p
	Младше 60 лет	Старше 60 лет			Младше 60 лет	Старше 60 лет		
	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> –579G > T	n = 64	n = 100			n = 62	n = 88		
GG	25 (39,1)	45 (45,0)	1,00	0,55	26 (37,7)	37 (33,9)	1,00	0,0051
GT	33 (51,6)	43 (43,0)	0,72 (0,37–1,41)		39 (56,5)	47 (43,1)	0,85 (0,44–1,63)	
TT	6 (9,4)	12 (12,0)	1,11 (0,37–3,32)		<b>4 (5,8)</b>	<b>25 (22,9)</b>	<b>4,39 (1,36–14,13)</b>	
GT + TT	39 (60,9)	55 (55,0)	0,78 (0,41–1,48)	0,45	43 (62,3)	72 (66,1)	1,18 (0,63–2,20)	0,61
<i>DNMT3B</i> –149C > T	n = 70	n = 102			n = 64	n = 89		
CC	21 (30)	31 (30,4)	1,00	0,49	25 (36,2)	36 (30,8)	1,00	0,59
CT	41 (58,6)	53 (52,0)	0,88 (0,44–1,74)		34 (49,3)	58 (49,6)	1,18 (0,61–2,30)	
TT	8 (11,4)	18 (17,6)	1,52 (0,56–4,14)		10 (14,5)	23 (19,7)	1,60 (0,65–3,93)	

## Окончание таблицы 10

Полиморфный вариант	АК		OR (95% CI)	P	ПКРЛ		OR (95% CI)	P
	Младше 60 лет	Старше 60 лет			Младше 60 лет	Старше 60 лет		
	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)		
СТ + ТТ	49 (70)	71 (69,6)	0,98 (0,51–1,90)	0,96	44 (63,8)	81 (69,2)	1,28 (0,68–2,40)	0,44

**Примечание.** Выделение жирным шрифтом соответствует  $p \leq 0,05$

тия НМРЛ у курящих и некурящих пациентов.

Анализ связи полиморфных вариантов гена *DNMT3B* с риском развития заболевания в зависимости от статуса курения пациентов показал рисковую значимость генотипа –579ТТ (OR = 3,05; 95% CI: 1,36–6,85;  $p = 0,011$ ) и генотипов –579GT + ТТ (OR = 1,82; 95% CI: 1,14–2,91;  $p = 0,012$ ) для курящих пациентов. Выявлено также, что у курящих пациентов достоверно чаще встречаются носители генотипа –149ТТ по сравнению с некурящими пациентами (OR = 2,39; 95% CI: 1,16–6,93;  $p = 0,037$ ) (табл. 11).

При разделении пациентов на группы с АК и ПКРЛ показано, что для курящих пациентов с ПКРЛ сохраняется рисковая значимость генотипов –149ТТ (OR = 8,65; 95% CI: 1,07–70,06;  $p = 0,031$ ) и –579ТТ (OR = 8,47; 95% CI: 1,05–68,14;  $p = 0,033$ ) (табл. 12).

Исследования показывают, что эпигенетические нарушения при опухолевой трансформации и прогрессировании связаны с нарушением функционирования генов *DNMT* [20]. Известно, что ДНК-метилтрансфераза *DNMT3B* сверхэкспрессируется в трансформированных клетках и первичной опухоли

Таблица 11

Распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* у пациентов с НМРЛ в зависимости от статуса курения

Полиморфный вариант	Не курит	Курит	OR (95% CI)	P
	n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> –579G > T	n = 110	n = 218		
GG	52 (47,3)	72 (33)	1,00	<b>0,011</b>
GT	49 (44,5)	108 (49,5)	1,59 (0,97–2,60)	
TT	<b>9 (8,2)</b>	<b>38 (17,4)</b>	<b>3,05 (1,36–6,85)</b>	
GT + TT	<b>58 (52,7)</b>	<b>146 (67)</b>	<b>1,82 (1,14–2,91)</b>	<b>0,012</b>
<i>DNMT3B</i> –149C > T	n = 117	n = 229		

Окончание таблицы 11

Полиморфный вариант	Не курит	Курит	OR (95% CI)	p
	n (%)	n (%)		
CC	41 (35)	66 (28,8)	1,00	<b>0,037</b>
CT	63 (53,9)	113 (49,3)	1,11 (0,68–1,83)	
TT	<b>13 (11,1)</b>	<b>50 (21,8)</b>	<b>2,39 (1,16–4,93)</b>	
CT + TT	76 (65)	163 (71,2)	1,33 (0,83–2,14)	0,24

Примечание. Выделение жирным шрифтом соответствует  $p \leq 0,05$

[20, 22]. Многие исследования показали, что генетические вариации в генах *DNMT* могут нарушать их ферментативную активность в эпигенетических процессах и впоследствии изменять геномные функции метилирования ДНК [18].

Полиморфный локус rs2424913 гена

*DNMT3B* является одним из наиболее широко изучаемых, располагается в промоторном регионе гена на расстоянии — 149 п. о. от стартового сайта транскрипции. В исследованиях *in vitro* установлено, что однонуклеотидная замена С→Т (–149С > Т) связана с увеличением промоторной активности гена примерно на

Таблица 12

Распределение частот встречаемости генотипов *DNMT3B* у пациентов с АК и ПКРЛ в зависимости от статуса курения

Полиморфный вариант	АК		OR (95% CI)	p	ПКРЛ		OR (95% CI)	p
	Не курит	Курит			Не курит	Курит		
	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> –579G > T	n = 71	n = 56			n = 23	n = 116		
GG	36 (45,6)	28 (40)	1,00	0,75	14 (50)	43 (31,4)	1,00	0,033
GT	35 (44,3)	33 (47,1)	1,21 (0,61–2,41)		13 (46,4)	68 (49,6)	1,70 (0,73–3,97)	
TT	8 (10,1)	9 (12,9)	1,45 (0,49–4,23)		1 (3,6)	26 (19)	8,47 (1,05–68,14)	
GT + TT	43 (54,4)	42 (60)	1,26 (0,65–2,41)	0,49	14 (50)	94 (68,6)	2,19 (0,96–4,98)	0,064

## Окончание таблицы 12

Полиморфный вариант	АК		OR (95% CI)	p	ПКРЛ		OR (95% CI)	p
	Не курит	Курит			Не курит	Курит		
	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)		
<i>DNMT3B</i> -149C > T	n = 71	n = 56			n = 23	n = 120		
CC	27 (31,4)	21 (29,2)	1,00	0,52	12 (42,9)	43 (29,4)	1,00	0,031
CT	48 (55,8)	37 (51,4)	0,99 (0,49–2,02)		15 (53,6)	72 (49,3)	1,34 (0,57–3,13)	
TT	11 (12,8)	14 (19,4)	1,64 (0,62–4,33)		<b>1 (3,6)</b>	<b>31 (21,2)</b>	<b>8,65 (1,07–70,06)</b>	
CT + TT	59 (68,6)	51 (70,8)	1,11 (0,56–2,20)	0,76	16 (57,1)	103 (70,5)	1,80 (0,78–4,11)	0,17

**Примечание.** Выделение жирным шрифтом соответствует  $p \leq 0,05$

30% [23]. Частота аллеля Т в европейской популяции составляет 41% [24].

Полиморфный локус rs1569686 располагается на расстоянии –579 п. н. от начала транскрипции экзона 1В и приводит к замене G→T (–579G > T). Полиморфизм –579G > T *DNMT3B* находится в области промотора, содержащей мало CpG-островков, которая расположена на расстоянии –579 п. н. от сайта начала транскрипции экзона 1В. Хотя результаты анализа *in vitro* показали, что этот полиморфизм не влияет на транскрипционную активность промотора [14, 22], до сих пор нет определенных доказательств в пользу отрицательной связи между полиморфизмом –579G > T *DNMT3B* и прогрессированием онкологических заболеваний. Некоторые исследователи показывают, что полиморфизм –579G > T *DNMT3B* играет существенную роль в развитии и прогрессировании развития рака, особенно при колоректальном раке в азиатских популяциях. Результаты их исследований выявили рисковую значимость генотипа –579GT в гетерозиготной и доминантной моделях наследования в развитии и течении онкологических заболеваний, в том числе и ра-

ка легкого [20, 22, 25]. Предполагается также, что могут быть этнические и гистологические различия в риске из-за определенных генотипов, придающих большую восприимчивость к определенному гистологическому типу рака.

Полученные в нашем исследовании данные о влиянии полиморфных вариантов гена *DNMT3B* на степень распространения опухолевого процесса при НМРЛ подтверждают, что метилирование ДНК играет важную роль в развитии и прогрессировании онкологических заболеваний и согласуются с результатами других исследователей [20, 22]. Выявлена повышенная частота генотипа –579TT у пациентов старше 60 лет и курящих пациентов, а также повышенная частота генотипа –149TT у курящих пациентов, что согласуется с результатами других исследований [15]. Как указывалось выше, у курящих людей и людей пожилого возраста происходит более интенсивное накопление повреждений ДНК, что приводит к накоплению мутаций в онкогенах и генах-онкосупрессорах. Можно предположить, что полиморфные варианты гена *DNMT3B*, обладающие более высокой промоторной активностью, в совокупности с други-



ми факторами риска увеличивают вероятность развития рака легких.

### Заключение

Таким образом, в изучаемой группе пациентов с НМРЛ полиморфные варианты гена *DNMT3B* играют важную роль в развитии и распространении опухолевого процесса НМРЛ. Показана рискованная значимость генотипов  $-579GT + TT$  (OR = 1,73; 95% CI: 1,11–2,71;  $p = 0,016$ ) и генотипов  $-149CT + TT$  (OR = 1,59; 95% CI: 1,00–2,50;  $p = 0,047$ ) в развитии более распространенного опухолевого процесса при немелкоклеточном раке легкого. У лиц старше 60 лет с генотипом  $-579TT$  *DNMT3B* повышен риск развития немелкоклеточного рака легкого (OR = 2,49; 95% CI: 1,15–5,40;  $p = 0,0065$ ) и плоскоклеточного рака легкого (OR = 4,39; 95% CI: 1,36–14,13;  $p = 0,0051$ ). Анализ связи полиморфных вариантов гена *DNMT3B* с риском развития заболевания в зависимости от статуса курения пациентов показал рискованную значимость генотипа  $-579TT$  (OR = 3,05; 95% CI: 1,36–6,85;  $p = 0,011$ ) и генотипов  $-579GT + TT$  (OR = 1,82; 95% CI: 1,14–2,91;  $p = 0,012$ ) для курящих пациентов. Выявлено также, что у курящих пациентов достоверно чаще встречаются носители генотипа  $-149TT$  по сравнению с некурящими пациентами (OR = 2,39; 95% CI: 1,16–6,93;  $p = 0,037$ ). Для курящих пациентов с плоскоклеточным раком легкого сохраняется рискованная значимость генотипов  $-149TT$  (OR = 8,65; 95% CI: 1,07–70,06;  $p = 0,031$ ) и  $-579TT$  (OR = 8,47; 95% CI: 1,05–68,14;  $p = 0,033$ ).

### Список использованных источников

1. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray [et al.] // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2021. – Vol. 71, № 3. – P. 209–249.
2. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / Hyuna Sung [et al.] // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2021. – Vol. 71, № 3. – P. 209–249.
3. A Panel of Novel Detection and Prognostic Methylated DNA Markers in Primary Non-Small Cell Lung Cancer and Serum DNA / A. Ooki [et

al.] // Clinical Cancer Research. – 2017. – Vol. 23, № 22. – P. 7141–7152.

4. Parikh, A. R. Lung Cancer Genomics / A. R. Parikh // Acta Medica Academica. – 2019. – Vol. 48, № 1. – P. 78–83.

5. A novel epigenetic signature for early diagnosis in lung cancer / A. Diaz-Lagares [et al.] // Clin Cancer Res. – 2016. – Vol. 22. – P. 3 361–3 371.

6. Саложин, С. В. Метилирование ДНК как один из основных эпигенетических маркеров / С. В. Саложин, Е. Б. Прохорчук, Г. П. Георгиев // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 5. – С. 641–650

7. Ажикина, Т. Л. Изучение тканеспецифического CpG-метилирования ДНК в протяженных геномных локусах / Т. Л. Ажикина, Н. П. Киселева, Ф. Л. Киселев // Биохимия. – 2005. – № 70. – С. 722–730.

8. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies / A. E. Jaffe [et al.] // Int J Epidemiol. – 2012. – Vol. 41. – P. 200–209.

9. Epigenome-wide scan identifies differentially methylated regions for lung cancer using pre-diagnostic peripheral blood / Naisi Zhao [et al.] // Epigenetics. – 2021. – Vol. 19. – P. 1–13.

10. Differentially methylated regions within lung cancer risk loci are enriched in deregulated enhancers / Marina Laplana [et al.] // Epigenetics. – 2021. – Vol. 17. – P. 1–16.

11. Das, P. M. DNA Methylation and Cancer / P. M. Das, R. Singal // Journal of Clinical Oncology. – 2004. – Vol. 22. – P. 4 632–4 642.

12. Goldberg, A. D. Epigenetics: a landscape takes shape / A. D. Goldberg, C. D. Allis, E. Bernstein // Cell. – 2007. – Vol. 128. – P. 635–638.

13. Polymorphism of DNA methyltransferase 3B  $-149C/T$  and cancer risk: a meta-analysis / J. Zhu [et al.] // Med Oncol. – 2014. – Vol. 32, № 1. – P. 399.

14. *DNMT3B* polymorphisms and risk of primary lung cancer / S. J. Lee [et al.] // Carcinogenesis. – 2005. – Vol. 26. – P. 403–409.

15. Combined effects of cigarette smoking, DNA methyltransferase 3B genetic polymorphism, and DNA damage on lung cancer / C. C. Huang [et al.] // BMC Cancer. – 2021. – Vol. 21, № 1. – P. 1 066.

16. Gene Polymorphisms Involved in Folate

- Metabolism and DNA Methylation with the Risk of Head and Neck Cancer / T. B. De Castro [et al.] // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2020. – Vol. 21, № 12. – P. 3 751–3 759.
17. *DNMT1* and *DNMT3B* genetic polymorphisms affect the clinical course and outcome of melanoma patients / H. Maric [et al.] // *Melanoma Res.* – 2019. – Vol. 29, № 6. – P. 596–602
18. *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B* gene variants in relation to ovarian cancer risk in the Polish population / A. Mostowska [et al.] // *Molecular Biology Reports.* – 2013. – Vol. 40, № 8. – P. 4 893–4 899.
19. SNPStats: your web tool for SNP analysis [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.snpstats.net/start.html>. – Date of access: 09.03.2022.
20. A Novel Polymorphism in Human Cytosine DNA-Methyltransferase-3B Promoter Is Associated with an Increased Risk of Lung Cancer / H. Shen [et al.] // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – P. 4 992–4 995.
21. DNA damage/repair management in cancers / J.F. Alhmoud [et al.] // *Cancers.* – 2020. – Vol. 12, № 4. – P. 1 050.
22. Association of *DNMT3B* –283T > C and –579G > T polymorphisms with decreased cancer risk: evidence from a meta-analysis / Y. Zhang [et al.] // *Int J Clin Exp Med.* – 2015. – Vol. 8, № 8. – P. 13 028–13 038.
23. Telomerase reverse transcriptase regulates *DNMT3B* expression/aberrant DNA methylation phenotype and AKT activation in hepatocellular carcinoma / J. Yu [et al.] // *Cancer Lett.* – 2018. – Vol. 434. – P. 33–41.
24. Electronic resource. – Mode of access: <http://grch37.ensembl.org/index.html>. – Date of access: 09.03.2022.
25. *DNMT3B* –579G1>1T Promoter Polymorphism and the Risk of Gastric Cancer in the West of Iran / K. Ahmadi [et al.] // *Journal of Gastrointestinal Cancer.* – 2017. – Vol. 49, № 2. – P. 167–171.

**A. P. Mikhalenka<sup>1</sup>, A. N. Shchayuk<sup>1</sup>, M. N. Shapetska<sup>2</sup>, Yu. V. Paliukhovich<sup>1</sup>,  
T. V. Nikitinskaya<sup>1</sup>, A. V. Kilchevsky<sup>1</sup>**

## **STUDY OF GENETIC POLYMORPHISM OF DNA METHYLTRANSFERASE DNMT3B IN THE PATIENTS WITH NON- SMALL CELL LUNG CANCER**

<sup>1</sup>State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: E.Michalenko@igc.by

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

83 Dzerzhinsky Ave., 220116 Minsk, Republic of Belarus

The effect of polymorphic variants of the *DNMT3B* gene on the risk of non-small cell lung cancer (NSCLC) development and its clinical characteristics was assessed. To identify rs1569686 (–579G > T) and rs2424913 (–149C > T) polymorphisms in the promoter region of the *DNMT3B* gene, a PCR-RFLP method was used. The risk significance of –579GT + TT (OR = 1.73; 95% CI: 1.11–2.71) and –149 CT + TT (OR = 1.59; 95% CI: 1.00–2.50) in the development of a more common tumor process in the case of non-small cell lung cancer was shown. Individuals over 60 years with the –579TT *DNMT3B* genotype are subjects to an increased risk of non-small cell lung cancer development (OR = 2.49; 95% CI: 1.15–5.40) and squamous cell lung cancer (OR = 4.39; 95% CI: 1.36–14.13). It was found that among smoking patients compared with non-smoking patients, there are significantly more carriers of –149TT (OR = 2.39; 95% CI: 1.16–6.93) and –579TT (OR = 3.05; 95 % CI: 1.36–6.85) genotypes. The same dependence sustained in the case of smoking patients with squamous cell lung cancer.

**Keywords:** DNA methyltransferase, genetic polymorphism, tumor process, non-small cell lung cancer, squamous cell lung cancer.

*Дата поступления в редакцию: 10 марта 2022 г.*

О. Ч. Мазур<sup>1</sup>, Е. П. Михаленко<sup>1</sup>, С. В. Байко<sup>2</sup>, О. М. Малышева<sup>1</sup>,  
И. В. Шевчук<sup>3</sup>, А. В. Кильчевский<sup>1</sup>, А. В. Сукало<sup>2</sup>

## СПЕКТР МУТАЦИЙ У ДЕТЕЙ С ИЗОЛИРОВАННЫМИ И СИНДРОМАЛЬНЫМИ ФОРМАМИ ВРОЖДЕННЫХ АНОМАЛИЙ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ И ПОЧЕК

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

<sup>2</sup>УО «Белорусский государственный медицинский университет»  
Республика Беларусь, 220016, г. Минск, пр. Дзержинского, 83

<sup>3</sup>УЗ «2-я городская детская клиническая больница»,  
220020, г. Минск, ул. Нарочанская, 17

По результатам многочисленных исследований установлено, что генетический фактор вносит существенный вклад в формирование врожденных аномалий мочевых путей и почек (ВАМП). Изучение генома с применением секвенирования нового поколения (NGS) позволяет установить генетическую природу ВАМП и одновременно проанализировать структурные нарушения значительного количества генов у одного пациента. Полноэкзомное секвенирование выполнено у 69 детей с ВАМП и проведен биоинформационный анализ 101 гена, ассоциированного с данной патологией. Обнаружены известные мутации генов у пяти (26,3%) пациентов с синдромальным и у четырех (8%) с изолированным ВАМП. Выявлены ранее не встречавшиеся в популяции варианты нуклеотидных последовательностей, а также варианты с неопределенным значением, которые требуют дальнейшего анализа.

**Ключевые слова:** врожденные аномалии мочевых путей и почек (ВАМП), секвенирование нового поколения, дети.

### Введение

Частота развития врожденных аномалий мочевых путей и почек (ВАМП) составляет 3–6 случаев на 1 000 новорожденных [1, 2]. ВАМП включает в себя аномалии почек (агенезия / гипоплазия / аплазия / дисплазия), их положения (дистопия) и взаиморасположения (подковообразная, галето-, S-, L-образная почка), и аномалии мочевых путей: пузырно-мочеточниковый рефлюкс (ПМР), экстрофия мочевого пузыря, эктопия устья мочеточника, уретероцеле, удвоение мочеточников, мегауретер, стеноз прилоханочного отдела мочеточника, стеноз лоханочно-мочеточникового сегмента, удвоение собирательной системы, клапаны задней уретры [3, 4, 5].

По результатам многочисленных исследований установлено, что генетический фактор вносит существенный вклад в формирование ВАМП [2–7]. Более 500 генетических син-

дромов включают аномалии мочевых путей и почек [6, 7]. J. Harambat и др. в своих исследованиях определили, что в 10–16% случаев ВАМП имеет генетическое происхождение и чаще встречается в тех семьях, где у родственников имеются случаи аномалий органов мочевой системы [8].

ВАМП является основным фактором, приводящим к полной потере функции почек и необходимости проведения диализа и трансплантации, поэтому ранняя диагностика этих аномалий является одной из важных проблем педиатрической нефрологии [9, 10]. Классические методы секвенирования по Сэнгеру и ПЦР-диагностика позволяют обнаруживать наличие мутаций генов, ассоциированных с ВАМП, только в 10% случаев, что обуславливает необходимость использования новых, более эффективных технологий. Секвенирование нового поколения (NGS) позволяет од-

номоментно проанализировать структурные нарушения значительного количества генов одного пациента.

Секвенирование генома с применением NGS позволяет установить генетическую природу ВАМП в случаях отсутствия клинических проявлений ряда синдромов, поскольку вовлечение других органов может быть отсроченным [11, 12]. Полное секвенирование генома/экзома может идентифицировать новые гены, ответственные за нарушение нефрогенеза, и выявить уже известные мутации, характерные для ВАМП [13, 14].

Целью нашего исследования было определить частоту и варианты мутаций генов, ассоциированных с развитием синдромального и изолированного ВАМП.

### Материалы и методы

В исследование включено 69 пациентов с ВАМП, которые были разделены на 2 группы: 1 группа — дети с синдромальным ВАМП (с сопутствующей патологией органа зрения, слуха, аномалиями конечностей и др.) — 19 человек; 2 группа — пациенты с изолированным ВАМП — 50 человек.

У исследуемых пациентов выполнено выделение тотальной ДНК из периферической крови фенол-хлороформным методом с последующим полноэкзомным секвенированием. Подготовку образцов ДНК проводили по протоколу Exome sequencing Nextera plus IDT (Illumina). Секвенирование образцов осуществлялось на приборе NextSeq 550 (Illumina). Биоинформатическая обработка полученных fastQ-файлов была проведена в облачном сервере BaseSpace, в приложении Dragene (Illumina) — пайплайн Dragene Germline Pipeline версии 3.2.8. Аннотирование полученных данных осуществлялось в онлайн-сервисе Wannovar. Полученные vcf-файлы фильтровались согласно разработанному алгоритму, который позволил проанализировать молекулярно-генетические особенности в генах, ассоциированных с ВАМП. В ходе исследования была использована панель генов Congenital Anomaly of Kidney and Urinary Tract (CAKUT) версия 1.164 (всего 101 ген), ассоциированных с развитием ВАМП, согласно рекомендациям NHS Genomic Medicine Service (GMS) Panel Resource (<https://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/234/>). Все гены панели разделены на 3 группы по степени доказательности ассоциации с развитием ВАМП:

со.uk/panels/234/). Все гены панели разделены на 3 группы по степени доказательности ассоциации с развитием ВАМП:

1 группа — 57 генов с максимальной доказательной базой: *ACE, ACTG2, AGT, AGTR1, ANOS1, BNC2, CEP55, CHD7, CHRNA3, CTU2, DHCR7, DSTYK, EYA1, FAM58A, FRAS1, FREM1, FREM2, GATA3, GLI3, GPC3, GREB1L, GRIP1, HAAO, HGNC, HNF1B, HOXA13, HPSE2, ITGA8, JAG1, KDM6A, KMT2D, KYNU, LIFR, LRIG2, LRP4, MYOCD, NADSYN1, NIPBL, NOTCH2, NPHP3, PAX2, PBX1, PLVAP, REN, RET, ROBO2, ROR2, SALL1, SIX5, STRA6, TBC1D1, TBX18, TFAP2A, TRAP1, WBP11, ZIC3, ZMYM2*;

2 группа — 8 генов со средней доказательной базой: *BMP4, CENPF, EXOC3L2, FGF20, HS2ST1, SALL4, SLIT2, WNT5A*;

3 группа — 35 генов со слабой доказательной базой: *ACTA2, BICC1, BMP7, BSND, CHD1L, CHRM3, COX10, DACT1, DLG3, FOXC1, FOXC2, FOXD2, GDNF, GREM1, HCN3, ISCA-37432-Loss, ISL2, MUC1, MYH11, NEK8, OCRL, RPGRIP1L, RRM2B, SHH, SIX1, SMARCA4, SOX17, SPRY1, TNXB, TSHZ3, UMOD, UPK2, UPK3A, VIPAS39, VPS33B*.

Все использованные алгоритмы и панели имеют свои преимущества и не являются взаимозаменяемыми — в случае отсутствия результатов поиска мутаций в одном случае, другая панель либо алгоритм могут позволить обнаружить генетические находки, представляющие клинический интерес.

Следует также отметить, что метод NGS не позволяет выявлять инсерции и делеции длиной более 10 п. о., мутации в интронных областях (за исключением канонических сайтов сплайсинга), вариации длины повторов (в том числе экспансии триплетов), вариации длины гомополимеров (более 4 нуклеотидов), а также мутации в генах, у которых в геноме существует близкий по последовательности паралог (псевдоген). Метод также не предназначен для определения цис-, транс-положения пар гетерозиготных мутаций, а также для оценки уровня метилирования, выявления хромосомных перестроек, полиплоидии, выявления мутаций в состоянии мозаицизма.

### Результаты и обсуждение

Обработка данных высокопроизводительно-

го секвенирования выполнена с применением разработанного биоинформатического алгоритма. Количество выявленных вариантов нуклеотидных замен в каждом из протестированных образцов после применения фильтрации по панели генов САКУТ варьировало в диапазоне от 1 до 7. В подавляющем большинстве случаев во всех генах типы мутаций были представлены однонуклеотидными полиморфизмами, встречались варианты делеций и инсерций. В двух случаях выявлены варианты

нуклеотидных последовательностей, которые представлены стопкодонами, в трех случаях обнаружены мутации сплайсинга. Выявленные в данном исследовании типы вариантов нуклеотидных последовательностей в исследуемых группах представлены в таблице 1.

Далее был проведен поиск патогенных и вероятно патогенных мутаций в генах, ассоциированных с ВАМП в исследуемых группах. Результаты представлены в таблицах 2 и 3.

В ходе данного исследования было выявлено

**Таблица 1**  
Разнообразие выявленных типов вариантов нуклеотидных последовательностей в исследуемых группах

Тип замены нуклеотидных последовательностей	Синдромальный ВАМП	Изолированный ВАМП
Сплайсинг	2	1
Делеция в рамке считывания	4	9
Инсерция в рамке считывания	1	1
Делеция вне рамки считывания	6	5
Инерция вне рамки считывания	4	13
Несинонимичные SNV (single nucleotide variations)	52	114
Стопкодон	1	1

**Таблица 2**  
Перечень патогенных мутаций, выявленных у пациентов с синдромальным ВАМП

Шифр пациента	Тип замены	Положение в кДНК	Частота в ExAc	dbSNP	Значение в ClinVar
1	Несинонимичный SNV	<i>MYH11</i> :exon37:c. G5273A:p.R1758Q	0,0002	rs142546324	Патогенная
2	Несинонимичный SNV	<i>RET</i> :exon13:c. A2372T:p.Y791F	0,0002	rs77724903	Патогенная

## Окончание таблицы 2

Шифр пациента	Тип замены	Положение в кДНК	Частота в ExAc	dbSNP	Значение в ClinVar
3	Несинонимичный SNV	<i>HNF1B</i> :exon4:c. C1006G:p.H336D	0,0002	rs138986885	Вероятно патогенная
4	Несинонимичный SNV	<i>HNF1B</i> :exon4:c. C1006G:p.H336D	0,0002	rs138986885	Вероятно патогенная
5	Сплайсинг	<i>EYA1</i> :c.1361-1G>T	–	rs397517917	Патогенная

## Таблица 3

Перечень патогенных мутаций, выявленных у пациентов с изолированным ВАМП

Шифр пациента	Тип замены	Положение в кДНК	Частота в ExAc	dbSNP	Значение в ClinVar
6	Несинонимичный SNV	<i>BMP4</i> :exon2:c. C272G:p.S91C	0,0001	rs121912767	Патогенная
7	Несинонимичный SNV	<i>GLI3</i> :exon14:c. G2179A:p.G727R	0,0057	rs121917710	Патогенная
8	Делеция в рамке считывания	<i>PAX2</i> :c.70delG:p. V26Cfs*2	–	rs75462234	Патогенная
9	Несинонимичный SNV	<i>RET</i> :exon13:c. A2372T:p.Y791F	0,0018	rs77724903	Патогенная

но 5 патогенных и вероятно патогенных вариантов нуклеотидных последовательностей в группе пациентов с синдромальным ВАМП и 4 патогенных варианта в группе детей с изолированным ВАМП.

У остальных пациентов обнаружены альтернативные варианты, отличные от референсного генома GRCh37 в выбранной панели генов — от одного до семи вариантов нуклеотидных последовательностей у каждого из пациентов. На данном этапе исследования во многих случаях определить детерминирующий вариант, приводящий к патологии у пациента, невозмож-

но. Это связано с тем, что 61% обнаруженных вариантов являются вариантами неопределенного значения (VUS) либо не обнаруживаются в большинстве баз данных, а существующие критерии оценки патогенности и корреляции с фенотипическими проявлениями у пациентов недостаточны для того, чтобы отдать предпочтение какому-то одному из обнаруженных вариантов (табл. 4). Также следует отметить тот факт, что информация по благоприятным и вероятно благоприятным вариантам постоянно пересматривается и на основе новых клинических данных, работ по функциональному

Таблица 4

Обнаруженные варианты нуклеотидных последовательностей по клиническому значению в базе данных ClinVar

Клиническое значение варианта по ClinVar	Синдромальный ВАМП	Изолированный ВАМП
Патогенный (pathogenic)	3	4
Вероятно патогенный (likely pathogenic)	2	0
Неопределенного значения (uncertain significance)	6	22
Вероятно доброкачественный (likely benign)	8	12
Доброкачественный (benign)	6	7
Не представлен в ClinVar	41	99

анализу генов, а также благодаря постоянному пополнению баз данных новыми клиническими и генетическими данными, наблюдается изменение статуса доброкачественных нуклеотидных вариантов на статус патогенных/вероятно патогенных. Однако необходимо учитывать в анализе данных все выявленные варианты, что позволит как пополнить базу выявляемых вариантов, так и проанализировать их частоты встречаемости.

Следует отметить, что по выбранной для данного исследования панели генов САКУТ, у двоих испытуемых (по одному в каждой из представленных групп) альтернативных вариантов нуклеотидных последовательностей не выявлено. В таком случае необходим даль-

нейший поиск вариантов в генах, не входящих в используемую панель.

В группе синдромального ВАМП все выявленные варианты являлись гетерозиготами, в группе изолированного ВАМП только два варианта находились в гомозиготном состоянии (в генах *CHRNA3* и *LIFR*). Следует отметить, что в обеих группах встречалось практически одинаковое количество вариантов в генах, являющихся причиной аутосомно-доминантных моногенных ВАМП (15,3% и 13,7% в группе синдромального и изолированного ВАМП соответственно). В таблице 5 представлены гены, детерминирующие развитие доминантного и рецессивного ВАМП.

В ходе исследования было выявлено, что

Таблица 5

Ключевые гены, детерминирующие развитие ВАМП по типу наследования [адаптировано по 21]

Доминантное наследование ВАМП		Рецессивное наследование ВАМП
BMP4	SIX2	
EYA1	SIX5	ACE
GATA3	SOX17	AGT
HNF1B	TNXB	AGTR1
KAL1	UPK3A	REN



Окончание таблицы 5

Доминантное наследование ВАМП		Рецессивное наследование ВАМП
PAX2	WNT4	FGF20
RET	CHD1L	TRAP1
ROBO2	DSTYK	FRAS1
SALL1	MUC1	FREM2
SIX1	UMOD	

в группе пациентов с синдромальным ВАМП наиболее частые варианты нуклеотидных замен встречались в генах *KMT2D*, *FRAS1* и *FREM2*. В группе пациентов с изолированным ВАМП лидирующими оказались варианты нуклеотидных замен в генах *FREM2*, *FRAS1*, *TNXB*, *KMT2D* и *TRAP1*. На рисунке 1

(а, б) схематично представлены наиболее часто выявляемые варианты в группах испытуемых. Гены, в которых обнаружены единичные варианты, на рисунках не представлены.

Как видно из представленных данных, общими генами с наиболее часто обнаруживаемыми заменами в обеих группах являются *FREM2*,

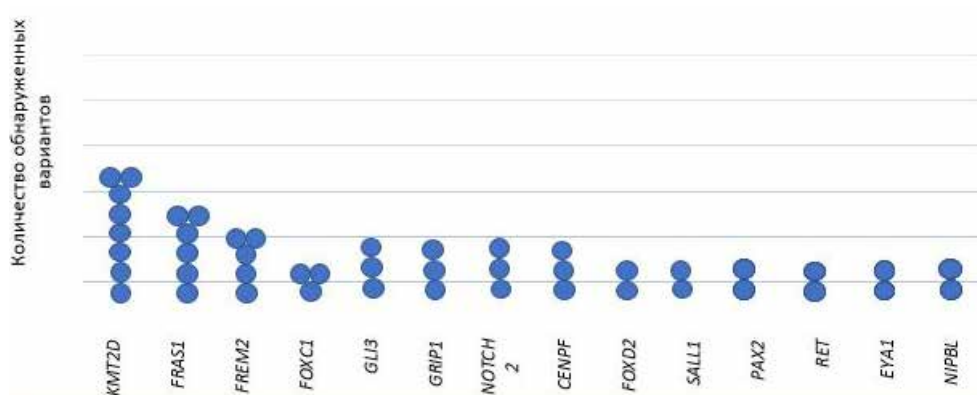


Рис. 1 а. Встречаемость обнаруженных вариантов в генах у пациентов с синдромальным ВАМП

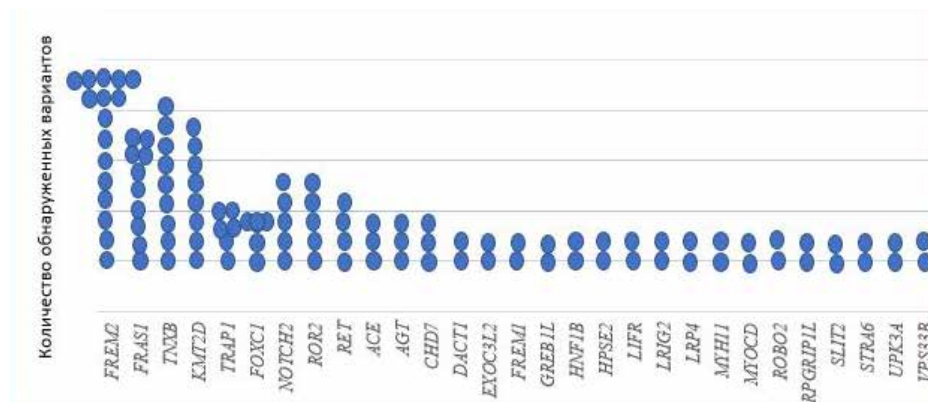


Рис. 1 б. Встречаемость обнаруженных вариантов в генах у пациентов с изолированным ВАМП

**Примечание.** Варианты, которые были выявлены у нескольких пациентов, расположены по горизонтали

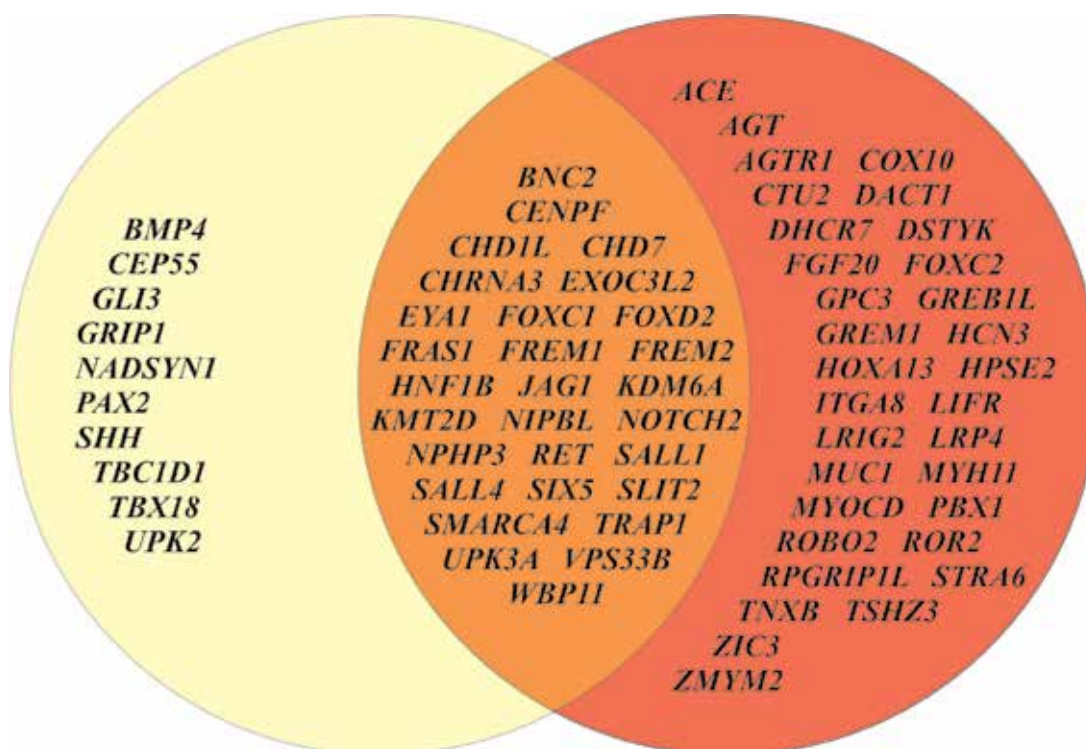
*FRAS1* и *KMT2D*. Частота встречаемости вариантов в генах *FREM2* и *FRAS1* примерно одинаковая (6,4% / 8,0% — *FREM2* и 7,6% / 5,0% — *FRAS1* для групп синдромальный / изолированный ВАМП соответственно), а варианты в гене *KMT2D* встречались наиболее часто в группе пациентов с синдромальным ВАМП — 10,2%. В группе с изолированным ВАМП — всего 4% вариантов нуклеотидных последовательностей в данном гене.

На рисунке 2 представлен спектр общих генов из панели САКУТ для двух исследуемых групп, в которых выявлены варианты нуклеотидных последовательностей, а также определены гены, обнаруженные варианты в которых были характерны только для пациентов с синдромальным либо с изолированным ВАМП.

Поскольку в своем исследовании мы использовали панель САКУТ с перечнем генов с разной доказательной базой, была подсчитана частота встречаемости генов с сильной, средней и слабой доказательной базой. Так, для

группы пациентов с синдромальным ВАМП частота встречаемости вариантов нуклеотидных последовательностей в генах с сильной доказательной базой составила 66% от всех выявленных вариантов, для генов со средней доказательной базой — 7,6%, а для генов со слабой доказательной базой — 14,1%. В группе изолированного ВАМП частоты встречаемости вариантов нуклеотидных замен среди генов с сильной / средней / слабой доказательной базой распределились соответственно — 52,7% / 3,5% / 16,7% от общего числа выявленных замен.

Поскольку 61% обнаруженных вариантов в рассматриваемой панели генов САКУТ являются вариантами неопределенного значения, либо не представлены в доступных базах данных, предстоит дальнейшая работа по их анализу, в том числе по расчету критериев патогенности. Так, например, у пациента с синдромальным ВАМП (колобома-ренальным синдромом, врожденной хронической почеч-



**Рис. 2.** Распределение генов с выявленными вариантами нуклеотидных последовательностей в группах пациентов с синдромальным и изолированным ВАМП

**Примечание.** Слева располагаются гены, варианты нуклеотидных последовательностей в которых выявлены только в группе с синдромальным ВАМП, справа — только в группе с изолированным ВАМП, в центре — общие гены

ной недостаточностью, вторичной артериальной гипертензией, низкорослостью) обнаружена ранее не описанная в генетических базах делеция с.226delG (р. G76Afs\*6) в 3-ем экзоне гена *PAX2*. Данная мутация была проанализирована в программах предсказателей патогенности (Sift PolyPhen, MutationTaster, VarSome, Franklin). Согласно полученному анализу, най-

денный вариант с.226delG (р. G76Afs\*6) может рассматриваться как вероятно патогенный, поскольку данная делеция приводит к сдвигу рамки считывания и прекращению синтеза белка, а также находится в «горячем» регионе гена, где располагаются наиболее патогенные мутации (рис. 3).

Следует также отметить, что по результа-

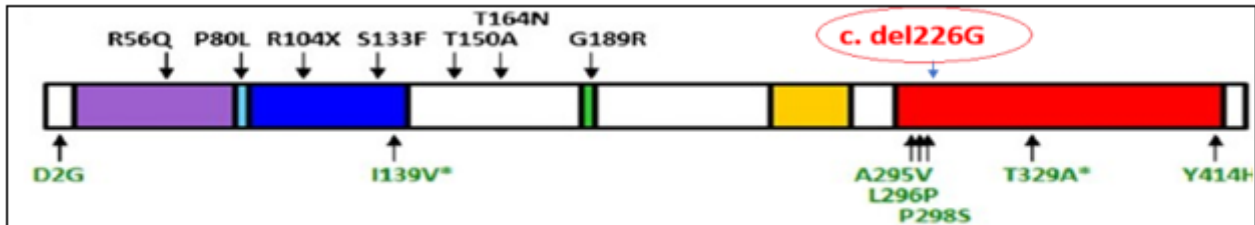


Рис. 3. Схематическое изображение гена *PAX2*.

**Примечание.** Красным цветом отмечен «горячий» регион гена, в котором выявлена делеция

там других исследований практически у 80% случаев ВАМП не определяется генетический фактор заболевания [12]. Поэтому в настоящее время ведется дискуссия о необходимости применения комбинированных мульти-системных подходов для установления роли генетических факторов в развитии ВАМП. Такие подходы должны включать анализ широких массивов данных геномных и функциональных исследований, а также данные по экспрессии РНК и белков, и эпигенетике [13].

### Заключение

Полученные данные полноэкзомного секвенирования генов позволили сравнить частоту и варианты мутаций у пациентов с синдромальным и изолированным ВАМП. В обеих группах выявлены патогенные и вероятно патогенные мутации (у 26,3% и 8% пациентов соответственно), и обнаружены ранее не встречавшиеся в популяции варианты нуклеотидных последовательностей, а также варианты с неопределенным значением, которые требуют дальнейшего глубокого и всестороннего анализа. Кроме того, необходимо продолжить изучение генов, вовлеченных в патогенез ВАМП и расширение существующих диагностических панелей генов.

Требуются дальнейшие клинические, молекулярно-генетические исследования у детей с врожденными аномалиями почек и мочевых

путей, разработка и совершенствование новых биоинформатических приемов для выявления транслокаций, инверсий, протяженных делеций, а также необходимо продолжение работы по пополнению базы данных обнаруживаемых патогенных и вероятно патогенных вариантов у пациентов с данной патологией.

### Список использованных источников

1. Yerkes, E. Role of angiotensin in the congenital anomalies of the kidney and urinary track in the mouse and the human / E. Yerkes, H. Nishimura // *Kidney Int.* – 1998. – Vol. 67. – P. 75–77.
2. Yosypiv, I. V. Congenital anomalies of kidney and urinary tract: Genetic disorder? / I. V. Yosypiv // *Int. J. Nephrology.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 909–913.
3. Кутырло, И. Э. САКУТ – синдром у детей / И. Э. Кутырло, Н. Д. Савенкова // *Нефрология.* – 2017. – Т. 21, № 3. – P. 18–24.
4. Молекулярно-генетические основы врожденных аномалий почек и мочевых путей / А. В. Сукало и др. // *Нефрология.* – 2020. – Т. 24, № 3. – С. 9–14.
5. Гарманова, Т. Н. Генетические причины врожденных заболеваний почек и верхних мочевыводящих путей. Обзор литературы / Т. Н. Гарманова // *Экспер. и клин. урология.* – 2016. – № 2. – P. 118–124.
6. Severe congenital anomalies of the kidney

and urinary tract: epidemiology can inform ethical decision-making/ Danziger P [et al.] // *Journal of Perinatology* 2016; 36: 954-959.

7. Van der Ven, A. T. Novel Insights into the Pathogenesis of Monogenic Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract / A. T. van der Ven, A. Vivante, F. Hildebrandt // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2018. – Vol. 29, № 1. – P. 36–50.

8. Epidemiology of chronic kidney diseases / Harambat J [et al.] // *Pediatr Nephrol.* – 2012. – 27(3): 363-373. 2014; 223-229.

9. Байко, С. В. Заместительная почечная терапия (ЗПТ) у детей в Республике Беларусь 2007–2016 гг. Анализ антропометрических данных пациентов на диализе и после трансплантации почки (Отчет по данным национального детского регистра ЗПТ) / С. В. Байко, А. В. Сукало // *Нефрология и диализ.* – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 25–40.

10. Genetic, environmental, and epigenetic factors involved in CAKUT / Nicolaou [et al.] // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2015. – Vol.11 (12):720-73118.

11. Teashirt 3 is necessary for ureteral smooth muscle differentiation downstream of SHH and BMP4 / Caubit X [et al.] // *Development.* – 2008. – 135:3301–10.

12. Targeted Exome Sequencing Identifies PBX1 as Involved in Monogenic Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract / L. Heidet [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2017. – Vol. 28, № 10. – P. 2 901–2 914.

13. Whole-Exome Sequencing Identifies Causative Mutations in Families with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract / A.T.van der Ven [et al.] // *J Am Soc Nephrol.* – 2018. – Vol. 29, № 9. – P. 2 348–2 361.

14. Impact of next generation sequencing on our understanding of CAKUT / Anukrati Nigam [et al.] // *Seminars in Cell & Developmental Biology Seminars in Cell and Developmental Biology.* – Vol. 91. – 2019. – P. 104–110.

15. Single nucleotide variations: biological impact and theoretical interpretation/ Katsonis, A. // *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 23. – 2014. – P. 1 650–1 666.

**A. Ch. Mazur<sup>1</sup>, A. P. Mikhalenka<sup>1</sup>, S. V. Baiko<sup>2</sup>, V. M. Malyshava<sup>1</sup>, I. V. Shauchuk<sup>3</sup>, A. V. Kilchevsky<sup>1</sup>,  
A. V. Sukalo<sup>2</sup>**

## **A RANGE OF MUTATIONS IN PATIENTS WITH ISOLATED AND SYNDROMAL FORMS OF CONGENITAL ANOMALIES OF THE KIDNEY AND URINARY TRACT**

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus  
220072 Minsk, Republic of Belarus, Akademicheskaya st., 27  
e-mail: o.mazur@igc.by

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University  
220116, Minsk, Republic of Belarus, Dzerzhinsky Ave., 83

<sup>3</sup>2nd City Children's Clinical Hospital  
17 Narochanskaya St., 220020 Minsk

Based on the results of numerous studies, it was established that the genetic factor makes a significant contribution to the formation of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (VAMP). The study of the genome using next generation sequencing (NGS) makes it possible to establish the genetic nature of VAMP and simultaneously analyze structural disorders of a significant number of genes in one patient. Whole-exome sequencing was performed in 69 children with VAMP and a bioinformatic analysis of 101 genes associated with this pathology was carried out. Known gene mutations were found in five (26.3%) patients with syndromic and four (8%) with isolated VAMP. Variants of nucleotide sequences that were not previously found in the population, as well as variants with an undetermined value, which require further analysis, were determined.

**Keywords:** congenital anomalies of the kidney and urinary tract, whole exome sequencing, syndromic and isolated CAKUT, mutations.

*Дата поступления в редакцию: 11 марта 2022 г.*

И. Б. Моссе<sup>1</sup>, Н. Г. Седляр<sup>1</sup>, А. С. Бабенко<sup>2</sup>, К. А. Моссе<sup>1</sup>, Р. С. Шулинский<sup>1</sup>,  
А. В. Кильчевский<sup>1</sup>

## ВЫСОКОИНФОРМАТИВНЫЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: I.Mosse@igc.by

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

Эпигенетические изменения в настоящее время считаются основными детерминантами психоэмоционального состояния человека. В данной работе проведено исследование уровня метилирования 24 целевых CpG-сайтов в ДНК трех психоэмоционально различающихся групп представителей белорусской популяции: контрольная группа условно здоровых добровольцев; пациенты РНПЦ психического здоровья с личностными расстройствами и девиантным поведением; представители спецподразделений МВД РБ. Выявлены статистически значимые различия между группами для 11 CpG-сайтов, расположенных в промоторных областях восьми генов нейромедиаторных систем мозга, ответственных за психоэмоциональный статус человека — *FKPB*, *COMT*, *CACNA1C*, *HTR2A*, *OXTR*, *NR3C1*, *CRH* и *SKA2*. Наиболее значимые различия в уровне метилирования установлены для сайтов генов, кодирующих рецепторы серотонина и окситоцина, *HTR2A* и *OXTR*, анализ которых может иметь важное практическое значение в медицине и криминалистике.

**Ключевые слова:** психоэмоциональный статус, эпигенетическая регуляция, метилирование CpG-сайтов, высокопроизводительное секвенирование.

### Введение

В реализации наследственной информации на разных стадиях онтогенеза решающая роль принадлежит процессам молекулярной и надмолекулярной (эпигенетической) регуляции функции генома. Под эпигенетической изменчивостью понимают изменения дифференциальной экспрессии генов, наследуемые в ряду митотических делений клетки без нарушения нуклеотидной последовательности ДНК [1–3].

В настоящее время описаны два молекулярных эпигенетических механизма: модификация гистонов и метилирование ДНК. Метилирование — обратимая ковалентная модификация ДНК, происходящая в результате присоединения метильной группы к углероду в 5-ом положении цитозинового нуклеотида с образованием 5-метилцитозина. В геномах млекопитающих, в том числе у человека, метилированный цитозин преимущественно входит в состав динуклеотидов 5'-CG-3' (так называемые CpG-

динуклеотиды) — 70–80% цитозина в составе CpG-динуклеотидов представлены 5-метилцитозином. Их небольшое число содержится в последовательностях 5'-CpNpGp-3' или асимметричных последовательностях 5'-CpA-3' и 5'-CpT-3' [4].

В процессе эволюции происходит постепенная элиминация CpG-динуклеотидов, в результате чего их доля в геномах высших эукариот составляет только 5–10% от теоретически ожидаемой. Метилирование играет важную роль в этом процессе, т. к. потеря большинства CpG-сайтов обусловлена превращением метилированного цитозина в тимин в результате спонтанного дезаминирования. Распределение CpG-динуклеотидов по различным участкам генома млекопитающих неравномерно. В транскрипционно инертном хроматине (гетерохроматине) CpG-динуклеотиды расположены с частотой приблизительно 16:80. Гетерохроматин характеризуется наличием метилированной, поздно реплицирующейся

ДНК, труднодоступной для транскрипционных факторов, а также соответствующим набором гистонов и специфической нуклеосомной организацией. Для функционально активного хроматина (эухроматина) более характерны участки ДНК (500–5 000 п. н.), называемые CpG-островками, в которых плотность CpG-динуклеотидов в пять раз больше, чем в среднем по геному. Цитозин в эухроматине, как правило, находится в неметилированном состоянии.

Хроматин, содержащий CpG-островки, мало спирализован, отличается высокой степенью ацетилирования коровых гистонов, практически полным отсутствием гистона H1 и слабо выраженной нуклеосомной организацией. Все эти особенности строения ДНК эухроматина позволяют ему активно взаимодействовать с транскрипционными факторами. Согласно последним данным, в геноме человека насчитывается около 29 000 CpG-островков [4, 5].

По аналогии с мутациями их метильные метки на ДНК получили название эпимутаций. В отличие от мутаций эпимутации контекст-зависимы, обусловлены сигналами из внешней среды, особенно представляющими опасность и угрозу, и служат целям адаптации к этим сигналам. Это достигается за счет их участия в регуляции экспрессии генов [6–8].

Достижения современной науки позволяют использовать данные о статусе метилирования в ряде областей не только биологической, но и биомедицинской направленности, а также эффективно применять эти методики для идентификации личности человека в криминалистике.

В представленной работе исследованы гены нейромедиаторных систем мозга, уровень метилирования CpG-сайтов в регуляторных участках которых ассоциирован с психоэмоциональным статусом человека.

### Материалы и методы

В исследовании приняли участие 194 представителя белорусской популяции трех психоэмоционально различающихся групп: контрольная группа условно здоровых добровольцев — 48 человек, пациенты РНПЦ психического здоровья с личностными расстройствами и девиантным поведением — 77 человек и в качестве стрессоустойчивой группы представители спецподразделений МВД

РБ — 69 человек.

От каждого участника было получено информированное согласие на включение в исследование. Дизайн исследования утвержден Биоэтическим комитетом РНПЦ психического здоровья Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

В качестве биологического материала использовали цельную кровь. Выделение ДНК проводилось набором «GeneJET Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, США).

Образцы ДНК подвергали бисульфитной конверсии, при которой каждый неметилированный цитозин превращается в урацил посредством дезаминирования. Бисульфитную конверсию геномной ДНК в количестве 1 мкг выполняли с использованием набора реагентов EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen) согласно инструкции производителя.

Аmplификацию конвертированной ДНК проводили для 21 целевого участка генов, содержащих 24 исследуемых CpG-сайта метилирования (табл. 1). Для амплификации участков генов, включающих исследуемые сайты, использовали разработанную нами панель специфических олигонуклеотидных праймеров [9].

Контроль качества и определение концентрации полученных фрагментов ДНК выполняли на флуориметре GloMax Explorer (Promega) с набором реагентов QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega).

Нормализацию и пулирование образцов выполняли с помощью системы автоматического дозирования Eppendorf epMotion. Для приготовления NGS-библиотек использовали наборы реагентов QIAseq Methyl Library Kit (Qiagen), позволяющие работать с фрагментированными участками ДНК после бисульфитной конверсии. Конечная концентрация анализируемой библиотеки составила 8 пмоль, концентрация контрольной библиотеки PhiX — 10%.

Высокопроизводительное секвенирование выполнялось одновременно для 24 образцов на приборе Illumina MiSeq. Для запуска использован набор v3 2x250 (500 cycles) Illumina — MiSeq Reagent Kit v3.

Оценку качества прочтений проводили в программе FastQC, с последующим триммингом некачественных оснований в Trimmomatic.

Локальное картирование прочтений на референс (GRCh37 [GCF\_000001405.13]) проводили по алгоритму Burrows-Wheeler Aligner при помощи программного модуля Bowtie2 в утилите Bismark.

Фильтрацию с последующим преобразованием карты выравнивания прочтений (SAM), также сортировку и индексирование проводили в Samtools. Вызов сайтов метилирова-

ния на «изначально верхней цепи» (original top strand) в CpG-островках проведено в пайплайне Bismark. Подсчет отношения деметилированных сайтов к метилированным был произведен на языке программирования Python с использованием библиотеки Pandas.

В качестве источника последовательностей геномной ДНК человека использовали сборку Homo sapiens assembly GRCh38.p13 пре-

Таблица 1

Фрагменты генов, содержащие исследуемые CpG-сайты метилирования

Название гена	Хромосома	Координаты	Протяженность, п. о.
<i>TRKB</i>	9	84668523–84668590	68
<i>CRH</i>	8	66178523–66178594	72
<i>OXTR</i> (1)	3	8769061–8769160	100
<i>OXTR</i> (2)	3	8767614–8767659	46
<i>FKBP5</i> (1)	6	35590602–35590701	100
<i>FKBP5</i> (2)	6	35590648–35590757	110
<i>FKBP5</i> (3)	6	35663934–35664005	72
<i>NR3C1</i>	5	143404032–143404124	93
<i>BDNF</i> (1)	11	27700216–27700305	90
<i>BDNF</i> (2)	11	27742305–27742408	104
<i>BDNF</i> (3)	11	27720777–27720842	66
<i>MAOA</i>	X	43655941–43656026	86
<i>SLC6A4</i>	17	30236081–30236216	136
<i>SKA2</i>	17	59110331–59110398	68
<i>CACNA1C</i> (1)	12	2230286–2230405	120
<i>CACNA1C</i> (2)	12	2218746–2218860	115
<i>COMT</i> (1)	22	19963698–19963788	91
<i>COMT</i> (2)	22	19962318–19962410	93
<i>HTR2A</i> (1)	13	46897303–46897383	81
<i>HTR2A</i> (2)	13	46897282–46897375	94
<i>HTR2A</i> (3)	13	46897493–46897642	150



доставляемую в свободном доступе базой данных NCBI [10]. Для дизайна олигонуклеотидов также использовали бесплатные онлайн программы, предназначенные для поиска и предсказания сайтов метилирования в исследуемой последовательности ДНК: SMS (Sequence Manipulation Suite), раздел CpG Islands [11], iMETHYL (integrative DNA methylation database) [12].

Сравнение уровней метилирования отдельных CpG-сайтов в группах исследования проводилось с использованием критериев Манна-Уитни. Различия принимались как статистически значимые при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Выполнение высокопроизводительного секвенирования и анализ его результатов позволили получить данные об уровне метилирования 24 целевых CpG-сайтов в 194 образцах

ДНК пациентов, спецназа и группы контроля.

По результатам секвенирования выявлен достаточно высокий процент сформированных кластеров. Около 93% кластеров прошли фильтр. Q-Score запуска  $>30$  соответствовал 88,4%. Финальный объем полученных данных соответствовал 8,3 Gb. Плотность кластеров — 654 000 мм<sup>2</sup> ячейки.

Для оценки различий степени метилирования исследуемых сайтов в образцах ДНК в трех группах (спецназ, пациенты и контроль) в программной среде R построены диаграммы Box Plot (рис. 1) для каждого из 24 целевых сайтов. Диаграмма Box Plot — это удобный способ визуального представления групп числовых данных через квартили.

Для автоматизации процесса построения диаграмм Box Plot нами написан компьютерный код на языке R, который позволяет рассчитывать процент метилирования каждого образца

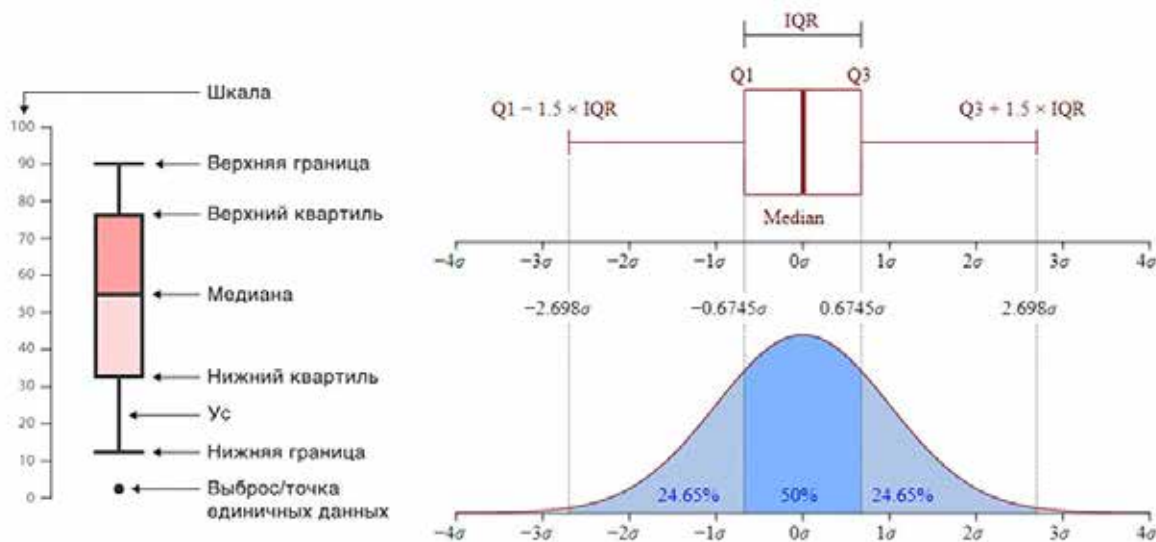


Рис. 1. Схема диаграммы Box Plot

и строить графики. На каждом таком графике в виде точек отображается положение каждого образца в зависимости от степени его метилирования. Над каждым графиком приводится значение  $p$ -value, рассчитанное с помощью теста Манна-Уитни для независимых выборок.

Статистически значимые различия между группами были зафиксированы для 11 CpG-сайтов, расположенных в промоторных областях восьми генов — *FKBP*, *COMT*, *CACNA1C*, *HTR2A*, *OXTR*, *NR3C1*, *CRH* и *SKA2*.

Для всех 11 сайтов выявленные различия между группами были статистически досто-

верны ( $p < 0,05$ ). Результаты представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы, самые значительные различия в уровне метилирования установлены для целевых сайтов генов *HTR2A* и *OXTR*, анализ которых может иметь важное практическое значение в медицине и криминалистике.

Сравнение процента метилирования сайта 47471705 гена *HTR2A* между группами спецназа, пациентов и контроля представлено на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, для сайта 47471705 гена *HTR2A* установлены ярко выражен-

Таблица 2

Степень метилирования целевых сайтов, для которых выявлены статистически значимые различия в группах пациентов, спецназа и контроля

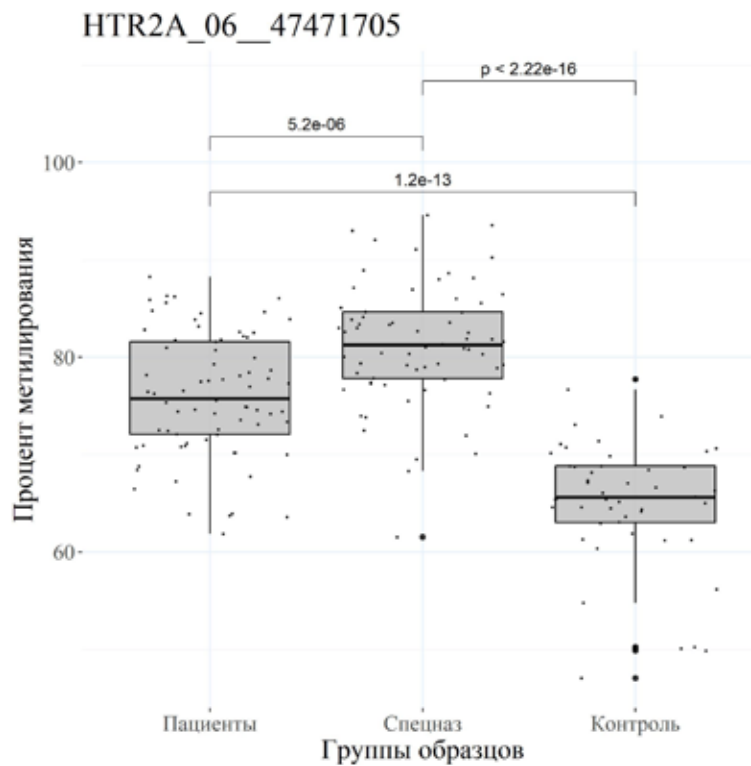
Анализируемые CpG-сайты	Степень метилирования, %			Уровень значимости <i>p</i>
	пациенты	спецназ	контроль	
<i>CACNA1C</i> _67__2327967	–	83,452	81,977	0,01800
<i>CACNA1C</i> _15__2339515	56,192	–	60,517	0,01900
	–	55,026	60,517	0,00160
<i>COMT</i> _01__19949901	75,430	–	73,016	0,04800
<i>FKBP5</i> _38__35558438	71,544	66,658	–	0,00072
	71,544	–	67,465	0,00420
<i>FKBP5</i> _88__35558488	96,949	96,151	–	0,02900
	96,949	–	96,186	0,00180
<i>HTR2A</i> _06__47471705	76,097	81,254	–	$5,2 \times 10^{-6}$
	76,097	–	65,129	$1,2 \times 10^{-13}$
	–	81,254	65,129	$2,22 \times 10^{-16}$
<i>NR3C1</i> _47__142783637	0,062	0,436	–	0,03200
	0,062	–	0,389	0,02400
<i>OXTR</i> _24__8809324	11,164	9,942	–	0,04800
<i>OXTR</i> _07__8810807	39,729	–	30,775	$2,3 \times 10^{-7}$
	–	37,376	30,775	$9,8 \times 10^{-6}$
<i>CRH</i> _67090798	61,566	57,075	–	0,01100
	–	57,075	60,995	0,04500
<i>SKA2</i> _57187728	–	41,875	32,466	0,03500

ные различия в распределении уровней метилирования между всеми группами: группой пациентов и контрольной группой ( $p$ -value =  $1,2 \times 10^{-13}$ ), группой пациентов и группой спецназа ( $p$ -value =  $5,2 \times 10^{-6}$ ), группой спецназа и контрольной группой ( $p$ -value <  $2,22 \times 10^{-16}$ ).

Рецептор серотонина 2A (5-HT<sub>2A</sub>) вовлечен в формирование множественных психических расстройств. Серотонин — нейромедиатор, ко-

торый действует в желудочно-кишечном тракте, крови и во всех областях мозга, влияя на поведение и физиологию. Открытие того, что многие из психоактивных препаратов действуют на серотонинергические мишени, сделало серотонин центром исследований психических расстройств.

Вырабатывающие серотонин нейроны проецируются на несколько ключевых областей, участвующих в эмоциях, поведении и позна-



**Рис. 2.** Сравнение процента метилирования сайта 47471705 гена *HTR2A* в группах спецназа, пациентов и контроля с указанием значения p-value

нии. Высвобожденный серотонин может связываться с более чем дюжиной уникальных рецепторов серотонина, каждый со своим собственным распределением и функцией. Активация рецепторов *HTR2A* в серой области мозга подавляет панические реакции, в то время как их активация в миндалевидном теле больше связана с генерализованным тревожным расстройством и посттравматическим стрессовым расстройством [13]. Множественные помертные исследования и исследования *in vivo* обнаружили изменения связывания и экспрессии рецептора 5-НТ2А в мозге людей с различными формами психопатологии [14].

Эпигенетические модификации являются важной детерминантой различий в экспрессии и активности рецептора 5-НТ2А. Метилирование сайтов CpG в гене *HTR2A* может блокировать или усиливать транскрипцию гена, изменяя связывание факторов транскрипции. Такие изменения в настоящее время считаются основным механизмом, с помощью которого среда в раннем периоде жизни влияет на развитие поведенческого фенотипа. Начиная с эмбриогенеза, серотонин играет важную роль в развитии нервной системы, а рецептор

5-НТ2А способствует пролиферации нейронов [15]. Таким образом, эпигенетические изменения экспрессии гена *HTR2A* могут через факторы стресса окружающей среды влиять на развитие мозга и, следовательно, на поведение индивида.

Установлено, что в неонатальном периоде метилирование плацентарного *HTR2A* по сайтам CpG связано с более высоким уровнем заботы о младенцах [16]. Более того, вполне вероятно, что различия в экспрессии гена рецептора *HTR2A*, вызванные метилированием, изменяют физиологию плаценты с последующим влиянием на развитие мозга плода.

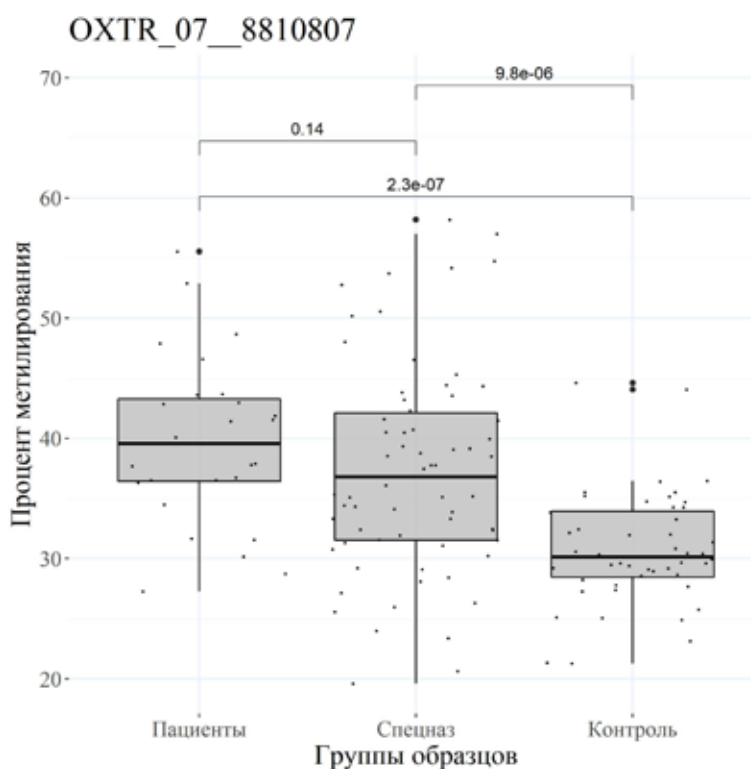
Хотя исследования, посвященные роли метилирования *HTR2A* в психических расстройствах ограничены, тем не менее гиперметилирование CpG в области промотора было обнаружено у взрослых пациентов с шизофренией и биполярным расстройством [17], что позволило предположить, что гиперметилирование CpG в области промотора *HTR2A* может быть механизмом, лежащим в основе снижения экспрессии *HTR2A* у пациентов с шизофренией.

Значительные различия в распределении

уровней метилирования выявлены нами также для сайта 8810807 гена рецептора окситоцина *OXTR* между группой пациентов и контрольной группой ( $p\text{-value} = 2,3 \times 10^{-7}$ ), между группой спецназа и контрольной группой ( $p\text{-value} = 9,8 \times 10^{-6}$ ) (рис. 3).

Система окситоцина представляет значи-

тельный интерес при идентификации биомаркеров психоэмоционального статуса человека из-за ее участия в формировании многих психологических состояний, модуляции широкого спектра физиологических процессов и потенциального использования в качестве лекарств [18].



**Рис. 3.** Сравнение процента метилирования сайта 8810807 гена *OXTR* в группах спецназа, пациентов и контроля с указанием значения  $p\text{-value}$

Метилирование гена рецептора окситоцина (*OXTR*) является одним из эпигенетических биомаркеров функционирования окситоциновой системы. Ген *OXTR* структурно состоит из четырех экзонов и трех интронов [19]. Ген содержит в своем промоторе специфическую область, названную MT2, содержащую большое количество сайтов CpG (рис. 4).

Было обнаружено, что повышенное метилирование этой области связано со сниженной экспрессией *OXTR*, что свидетельствует о регуляторной роли метилирования в транскрипции генов [20]. *OXTR* экспрессируется во всех участках мозга человека с наивысшими уровнями экспрессии в полосатом теле, таламусе и обонятельных областях.

Показано, что у взрослых людей варибель-

ность метилирования участков CpG в пределах промотора коррелирует с восприимчивостью к расстройствам, связанным с социальным дефицитом, а также с индивидуальными различиями в реакции мозга на социальную информацию [21–23]. Наибольшие различия наблюдаются для сайтов метилирования –934, –924 и –901 [24–25]. В нашем исследовании эти сайты имеют обозначение 8810807, 8810797 и 8810774 соответственно.

Таким образом, уровень метилирования гена *OXTR* может быть полезной эпигенетической меткой, отражающей индивидуальные различия в социальной функции взрослых, а также служит для адаптации организма к окружающей среде и для повышения устойчивости к стрессу.

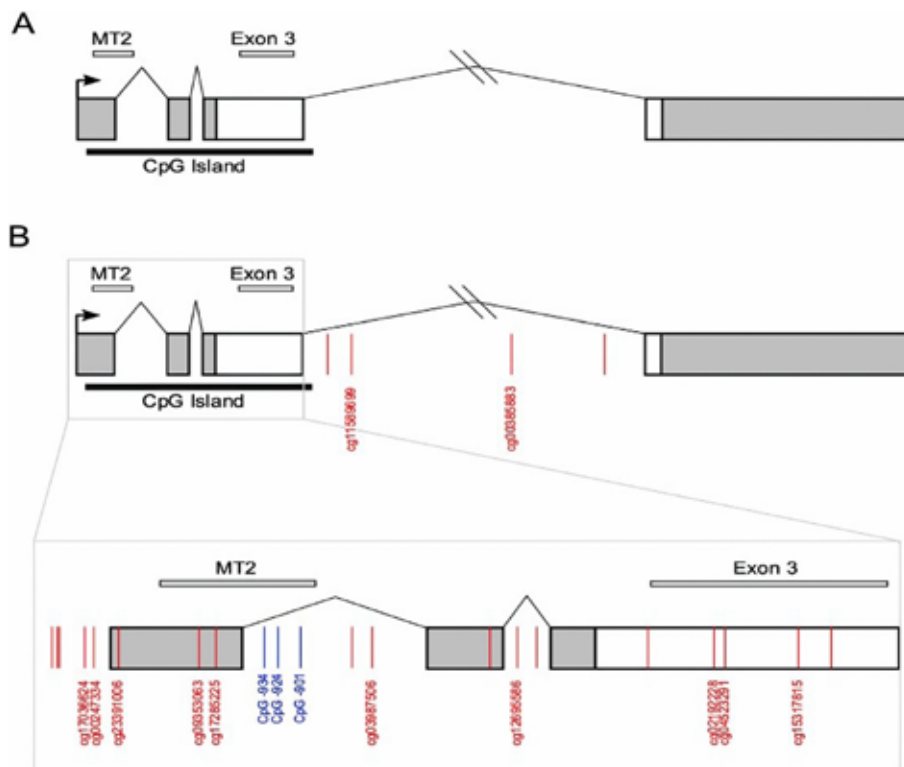


Рис. 4. Схема гена *OXTR* и часто изучаемые сайты CpG

А) Схема гена *OXTR*. Черная стрелка указывает начальный сайт транскрипции. Обозначены представляющие интерес области, MT2 и экзон 3, где обычно исследуется метилирование ДНК; В) Схема гена *OXTR* с обозначением сайтов CpG. Синими линиями показаны сайты CpG -934, -924 и -901 (названные в соответствии с положением относительно начала трансляции), которые связаны с экспрессией гена [20]

### Заключение

Выявлены информативные гены, анализ метилирования регуляторных областей или целевых сайтов которых может рассматриваться как высокоспецифичный тест для определения психоэмоционального статуса человека как в научных целях, так и в практике здравоохранения и криминалистики.

Обобщая полученные результаты сравнения эпигенетического статуса групп исследования, можно сделать ряд выводов и выявить некоторые закономерности:

1. Разработанная панель генов для высокопроизводительного секвенирования позволяет с высокой эффективностью получать данные об уровне метилирования целевых CpG-сайтов при выполнении анализа психоэмоционального статуса.

2. По результатам выполненного исследования статистически значимые различия между группами были зафиксированы для 11 CpG-сайтов, расположенных в промоторных областях восьми генов, ответственных за пси-

хоэмоциональный статус человека — *FKPB*, *COMT*, *SACNA1C*, *HTR2A*, *OXTR*, *NR3C1*, *CRH* и *SKA2*.

3. Диагностически значимые различия в уровне метилирования установлены для целевых сайтов генов, кодирующих рецепторы серотонина и окситоцина, *HTR2A* и *OXTR*, анализ которых может иметь важное практическое значение в медицине и криминалистике.

*Работа проведена в рамках реализации мероприятия «Разработка методики определения статуса генетических локусов и прижизненной модификации участков ДНК, влияющих на психоэмоциональный статус человека» научно-технической программы Союзного государства «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства» («ДНК-идентификация»).*

**Список использованных источников**

1. Wasserman D., Sokolowski M., Wasserman J., Rujesku J. Neurobiology and the genetics of suicide. In: Oxford textbook of suicidology and suicide prevention / Ed. D. Wasserman, C. Wasserman, NY: OxfordUniversity Press, 2009. – P. 165–182.
2. Розанов В. А. Гены и суицидальное поведение // Суицидология. – 2013. – Т. 4 (10), № 1. – С. 3–14.
3. Roy A., Sarchiapone M. Interaction of the hereditary and environmental factors in the psychiatric disorders associated with suicidal behavior. In: Oxford textbook of suicidology and suicide prevention / Ed. D. Wasserman, C. Wasserman, NY: Oxford University Press, 2009. – P. 183–187.
4. Розанов, В. А. Стресс-индуцированные эпигенетические феномены — еще один вероятный биологический фактор суицида // Суицидология. – Т. 6, № 3 (20), 2015. – С. 1–17.
5. Hing B., Gardner C., Potash J.B. Effects of negative stressors on DNA methylation in the brain: implications for mood and anxiety disorders // Neuropsychiatric Genetics. – 2014. – Vol. 165B (7). – P. 541–554.
6. Bondy B., Buettner A., Zill P. Genetics of suicide // Molecular Psychiatry. – 2006. – Vol. 11. – P. 336–351.
7. Розанов В. А. О механизмах формирования суицидального поведения и возможностях его предикции на ранних этапах развития // Украинский медицинский журнал. – 2010. – № 1 (75). – С. 92–97.
8. Вайсерман А. М., Войтенко В. П., Мехова Л.В. Эпигенетическая эпидемиология возраст зависимых заболеваний // Онтогенез. – 2011. – Т. 42, № 1. – С. 1–21
9. Бабенко А. С., Моссэ К. А., Седляр Н. Г., и др. Разработка панели для анализа профиля метилирования целевых эпигенетических локусов, ассоциированных с психоэмоциональным статусом человека // Молекулярная и прикладная генетика. 2020. – Т. 29. – С. 37–48.
10. Homo sapiens (ID 51) – Genome – NCBI [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Homo+sapiens>. – Дата доступа: 01.03.2022.
11. Sequence Manipulation Suite [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://www.bio-informatics.org/sms2/cpg\\_islands.html](https://www.bio-informatics.org/sms2/cpg_islands.html). – Дата доступа: 01.03.2022.
12. iMETHYL Database [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://imethyl.iwate-megabank.org/index.html>. – Дата доступа: 01.03.2022.
13. Aznar S, Klein AB. Regulating Prefrontal Cortex Activation: An Emerging Role for the 5-HT2A Serotonin Receptor in the Modulation of Emotion-Based Actions? Molecular Neurobiology. 2013;48:841–853. doi: 10.1007/s12035-013-8472.
14. Selvaraj S., Arnone D., Cappai A., Howes O. Alterations in the serotonin system in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2014;45:233–245. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.06.005.
15. Ghadirivasfi M., Nohesara S., Ahmadvkhaniha H-R, Eskandari M-R, Mostafavi S., Thiagal-ingam S., Abdolmaleky HM. Hypomethylation of the serotonin receptor type-2A Gene (*HTR2A*) at T102C polymorphic site in DNA derived from the saliva of patients with schizophrenia and bipolar disorder. American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics. 2011;156B:536–545. doi: 10.1002/ajmg.b.31192.
16. Azmitia EC. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. Brain Research Bulletin. 2001;56:413–424. doi: 10.1016/S0361-9230(01)00614-1.
17. Paquette AG, Lesseur C., Armstrong DA, Koestler DC, Appleton AA, Lester BM, Marsit CJ. Placental *HTR2A* methylation is associated with infant neurobehavioral outcomes. Epigenetics. 2013;8:796–801. doi: 10.4161/epi.25358.
18. Romano A., Tempesta B., Di Bonaventura MVM, Gaetani S. From autism to eating disorders and more: The role of oxytocin in neuropsychiatric disorders. Front Neurosci. 2016;9:497. doi: 10.3389/fnins.2015.00497.
19. Quintana DS, Rokicki J., van der Meer D, Alnæs D, Kaufmann T, Córdova-Palomera A, et al. Oxytocin pathway gene networks in the human brain. Nat Commun. 2019;10:668. doi: 10.1038/s41467-019-08503-8.
20. Kusui C., Kimura T., Ogita K., Nakamura

H., Matsumura Y., Koyama M., et al. DNA methylation of the human oxytocin receptor gene promoter regulates tissue-specific gene suppression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289:681–686. doi: 10.1006/bbrc.2001.6024.

21. Vaiserman A. Early-Life epigenetic programming of human disease and aging. In: *Epigenetics in human disease* / Ed. Trygve O. Tollefsbol. – Amsterdam, Boston, etc.: Elsevier, 2012. – P. 545–567.

22. Sasaki A., de Vega W. C., McGowan P. O. Biological embedding in mental health: an epigenomic perspective // *Biochemistry and cellular biology.* – 2013. – Vol. 9, № 1. – P. 14–21.

23. Strohman R. C. Toward an epigenetic bi-

ology & medicine. [Online]. Network. [1996, May 15]. <http://www.gracepointwellness.org/site/article/273perspectives-vol-1-no-2-towards-an-epigenetic-biology-and-medicine>.

24. Danoff J. S., Wroblewski K. L., Graves A. J., et al. Genetic, epigenetic, and environmental factors controlling oxytocin receptor gene expression. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):23. doi:10.1186/s13148-021-01017-5.

25. Joshua S. Danoff, Jessica J. Connelly, James P. Morris, Allison M. Perkeybile. An epigenetic rheostat of experience: DNA methylation of OXTR as a mechanism of early life allostasis. *Comprehensive Psychoneuroendocrinology*, 2021, Volume 8, 100098.

I. B. Mosse<sup>1</sup>, N. G. Sedlyar<sup>1</sup>, A. S. Babenko<sup>2</sup>, K. A. Mosse<sup>1</sup>, R. S. Shulinsky<sup>1</sup>, A. V. Kilchevsky<sup>1</sup>

## MOST INFORMATIVE EPIGENETIC MARKERS TO THE HUMAN PSYCHOEMOTIONAL STATE

<sup>1</sup>State Scientific Institution

"Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus"

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: I.Mosse@igc.by

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

83 Dzerzhinsky Ave., 220116 Minsk, Republic of Belarus

Epigenetic changes are currently considered to be the main determinants of the psycho-emotional state of a person. In this work, we studied the level of methylation of 24 target CpG sites in the DNA of three psychoemotionally different groups of Belarusian population representatives: the control group of conditionally healthy volunteers, patients of the Republican Scientific and Practical Center for Mental Health with personality disorders, and representatives of the special forces of the Ministry of Internal Affairs of the Belarus Republic. Statistically significant differences between the groups were found for 11 CpG sites located in the promoter regions of eight genes of the brain neurotransmitter systems responsible for the psycho-emotional status of a person — *FKBP*, *COMT*, *CACNA1C*, *HTR2A*, *OXTR*, *NR3C1*, *CRH*, and *SKA2*. The most significant differences in the level of methylation were established for the target sites of genes encoding serotonin and oxytocin receptors, *HTR2A* and *OXTR*, the analysis of which can be of great practical importance for medicine and forensics.

**Keywords:** psychoemotional state, epigenetic regulation, methylation of CpG sites, high-throughput sequencing.

*Дата поступления в редакцию: 15 марта 2022 г.*

Е. П. Михаленко<sup>1</sup>, О. М. Малышева<sup>1</sup>, И. В. Сахаров<sup>2</sup>, А. Ю. Гордеева<sup>3</sup>, М. В. Артюшевская<sup>4</sup>,  
В. А. Шостак<sup>3</sup>, А. Б. Суцевский<sup>3</sup>, Г. А. Шишко<sup>4</sup>, А. В. Кильчевский<sup>1</sup>

## КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ВРОЖДЕННОЙ АЛЬВЕОЛЯРНО-КАПИЛЛЯРНОЙ ДИСПЛАЗИИ ЛЕГКОГО: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ УТОЧНЕНИЯ ДИАГНОЗА

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: [michalenko75@mail.ru](mailto:michalenko75@mail.ru)

<sup>2</sup>Учреждение здравоохранения «Городское клиническое патологоанатомическое бюро»  
Республика Беларусь, 220045, г. Минск, ул. Семашко, 8/8

<sup>3</sup>Учреждение здравоохранения «5-я городская клиническая больница г. Минска»  
Республика Беларусь, 220026, г. Минск, ул. Филатова, 9

<sup>4</sup>Государственное учреждение образования  
«Белорусская академия последипломного образования»  
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3

Цель исследования — установить роль патологических клинико-лабораторных характеристик течения неонатального периода, данных морфологического и молекулярно-генетического исследования в танатогенезе случая альвеолярно-капиллярной дисплазии (АКД) у новорожденного. АКД — редкое летальное нарушение развития легких у новорожденных, причиной развития которого в большинстве случаев являются точечные мутации в гене *FOXF1* или делеции в области q24.1 хромосомы 16. У ребенка Ш. проведено высокопроизводительное секвенирование полного экзона с использованием протокола Illumina-IDT Exome Enrichment на секвенаторе NextSeq 550. Ведущую роль в танатогенезе тяжелой дыхательной недостаточности сыграло наличие у ребенка АКД, что подтверждено морфологическими данными. Генетический анализ не выявил патогенных вариантов в генах *FOXF1*, *PLXNB2*, *DOCK8*, *MPRI1*, *ESRP1*, *SLC50A1*, *ZMYND11*, а также делеций в области L17941 и L29692 q24.1 хромосомы 16. Для определения делеций LINC01081 и LINC01082 необходима разработка дополнительных биоинформатических алгоритмов.

**Ключевые слова:** альвеолярно-капиллярная дисплазия, новорожденный, дыхательная недостаточность, гистология, молекулярно-генетическая диагностика.

### Введение

Интерстициальные заболевания легких в детском возрасте включают гетерогенную группу состояний, характеризующихся нарушением развития альвеол и дистальных отделов воздушного пространства [1, 2]. Альвеолярно-капиллярная дисплазия со смещением легочных вен (АКД) — редкое летальное нарушение развития легких у новорожденных, характеризующееся уменьшением количества легочных капилляров, утолщением мышц в малых легочных артериолах и аномально расположенными легочными венами, идущими вдоль легочных артериол [3, 4].

Пациенты с АКД имеют синдром дыхательных расстройств, обычно сопровождающийся легочной гипертензией и возникающий в течение нескольких часов после рождения. В большинстве случаев (80–90%) причиной развития АКД являются точечные мутации в гене *FOXF1* или делеции в области q24.1 хромосомы 16, которая может включать часть гена *FOXF1* или некодирующие элементы (энхансер гена), регулирующие его экспрессию [5, 6]. В 10–20% случаев генетическая основа развития АКД неизвестна. Чаще заболевание носит спорадический характер, что означает, что генетические изменения происходят во



время оплодотворения и не наследуются от родителей. Однако наблюдаются редкие случаи, когда АКД может передаваться по наследству [5–7]. Гетерогенность симптомов заболевания, отсутствие у большинства пациентов мутаций в гене *FOXF1* и его энхансерах указывают на необходимость поиска генов, которые также могут быть задействованы в патогенезе данного заболевания.

Цель исследования — установить роль патологических клинико-лабораторных характеристик течения неонатального периода, данных морфологического и молекулярно-генетического исследования в танатогенезе случая АКД у новорожденного.

### Материалы и методы

Представлен случай альвеолярно-капиллярной дисплазии легких у новорожденного ребенка Ш., выхаживание и лечение которого осуществлялось в отделении новорожденных и в отделении реанимации и интенсивной терапии для новорожденных родильного дома УЗ «5-я городская клиническая больница» г. Минска. Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, получено письменное информированное согласие законного представителя пациента и разрешение Комитета по этике БелМАПО на проведение исследования.

Клинический метод исследования включал результаты объективного осмотра и динамического наблюдения за новорожденным, данные анамнеза (акушерско-гинекологический анамнез, течение беременности и родов).

Инструментальные методы, использованные в работе — мониторинг механики дыхания, эхокардиография и рентгенологическое исследование. Для уточнения причин тяжелого течения заболевания выполнена гистологическая, молекулярно-генетическая экспертиза фрагмента легкого. Морфологический метод представлял собой посмертное макро- и микроскопическое исследование с использованием иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания.

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужила геномная ДНК, выделенная из ткани легкого с помощью коммерческого набора FFPE gDNA Miniprep System (Promega, США). Проведено высоко-

производительное секвенирование полного экзона с использованием протокола Illumina-IDT Exome Enrichment на секвенаторе NextSeq 550 (Illumina) с последующей обработкой полученных данных (fastq-файлы) алгоритмом Dragen Enrichment (Illumina). Аннотирование vcf-файла выполнено с помощью онлайн-ресурса wANNOVAR [8].

При фильтрации вариантов, ассоциированных с развитием альвеолярно-капиллярной дисплазии, из полученного списка замен удалены некодирующие (интронные) и синонимичные варианты без изменения сайтов сплайсинга, варианты с незначительной частотой встречаемости аллелей (MAF), большей или равной 1%, в базе данных 1000Genome, ExAc, GnomadGenome, GnomadExome, миссенс-варианты, которые, согласно программам предсказания PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) и Mutation Taster (<http://mutationtaster.org/>) не являются патогенными. Для дальнейшей проверки и анализа были отобраны обнаруженные варианты в генах, влияющих на функциональную активность их белков.

Наиболее протяженные делеции в области энхансера гена анализировали с использованием микросателлитного анализа проба и его родителей. Микросателлиты были амплифицированы с использованием пар праймеров L17941 (Forward: 5'-6FAM-CTGGGTACTCTTC TGTGACA-3'; Reverse: 5'-CTCTCTCCCAACATGGTG-3') и L29692 (Forward: 5'-6FAM-TGTGTGTCTTCTG GGGGAGT-3'; Reverse: 5'-CACAGCTAGCCACAGGCAG-3') [9]. Амплифицированные продукты детектировались с помощью капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 («Applied Biosystems», США).

### Результаты и обсуждение

Ребенок Ш. — доношенный мальчик массой 3 340 г, длиной 51 см с оценкой по шкале Апгар 8/9 баллов, родился от первой беременности, протекавшей на фоне хронической фетоплацентарной недостаточности в УЗ «5-я городская клиническая больница» в сроке гестации 275 дней (39 недель).

Послед массой 500 г отделился самостоятельно (патоморфологическое исследование:

ворсинчатый хорион, оболочки плаценты, пуповина — нормального строения).

Состояние ребенка Ш. при рождении и в течение последующих трех суток было удовлетворительное. На четвертые сутки жизни наблюдалось ухудшение состояния новорожденного младенца за счет нарастания дыхательной недостаточности (ДН). Для дальнейшего обследования и лечения ребенок был переведен в отделение реанимации для новорожденных.

Состояние новорожденного ребенка при поступлении в отделение реанимации было тяжелое, обусловленное ДН 3-й степени. Ре-

бенок был переведен на конвенциональную искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) с уровнем подачи кислорода 40% ( $f_iO_2$ ), однако в динамике наблюдалось нарастание кислородозависимости, что потребовало перевода младенца на высокочастотную искусственную вентиляцию легких (ВЧО-ИВЛ).

Динамика кислородозависимости ( $f_iO_2$ ), уровня сатурации ( $SaO_2$ ) и изменения параметров среднего давления в дыхательных путях (MAP) у ребенка Ш. в отделении анестезиологии и реанимации для новорожденных отображена на рисунке 1.

Вследствие тяжелого течения дыхательной

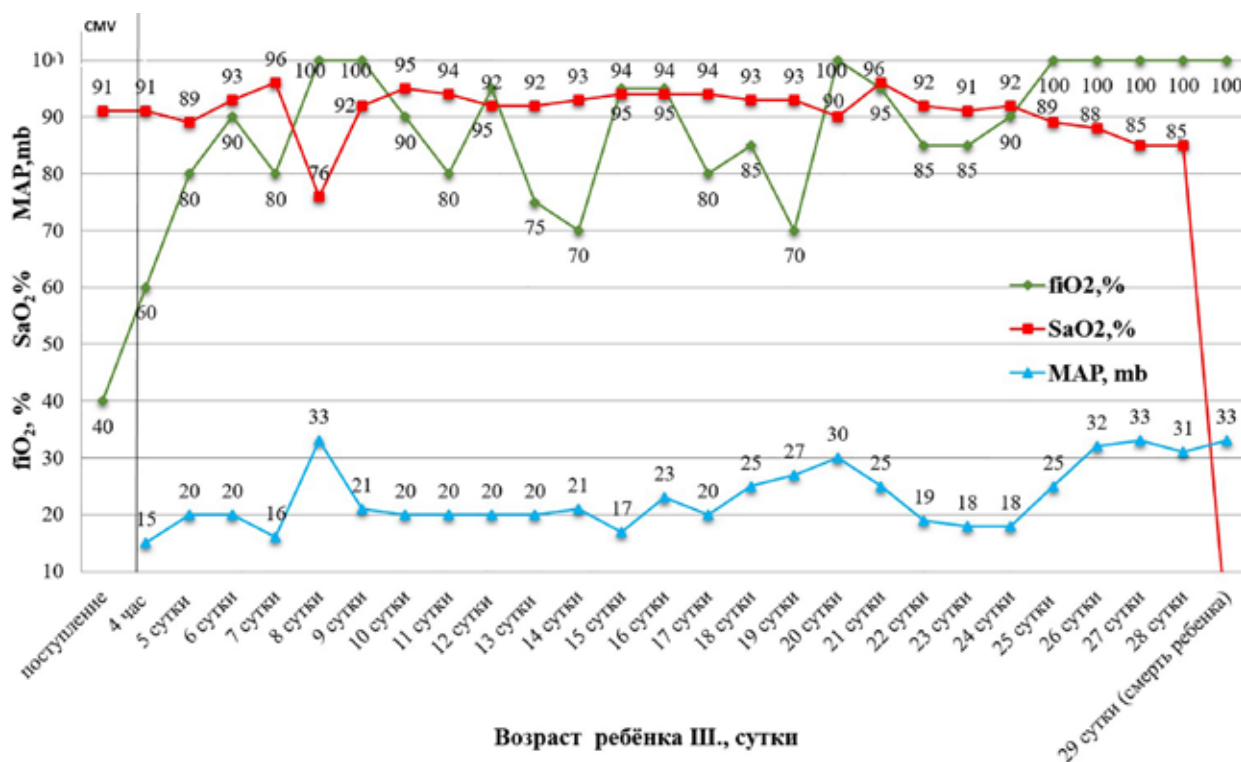


Рис. 1. Динамика кислородозависимости ( $f_iO_2$ ), уровня сатурации ( $SaO_2$ ), изменения параметров MAP у ребенка Ш. в отделении реанимации для новорожденных

недостаточности и высокой резистентности легких у ребенка развилась клиника персистирующей легочной гипертензии. На протяжении последующих 28-ми дней у ребенка сохранялась высокая кислородозависимость ( $f_iO_2$  80–100%). На 29-е сутки ребенок умер.

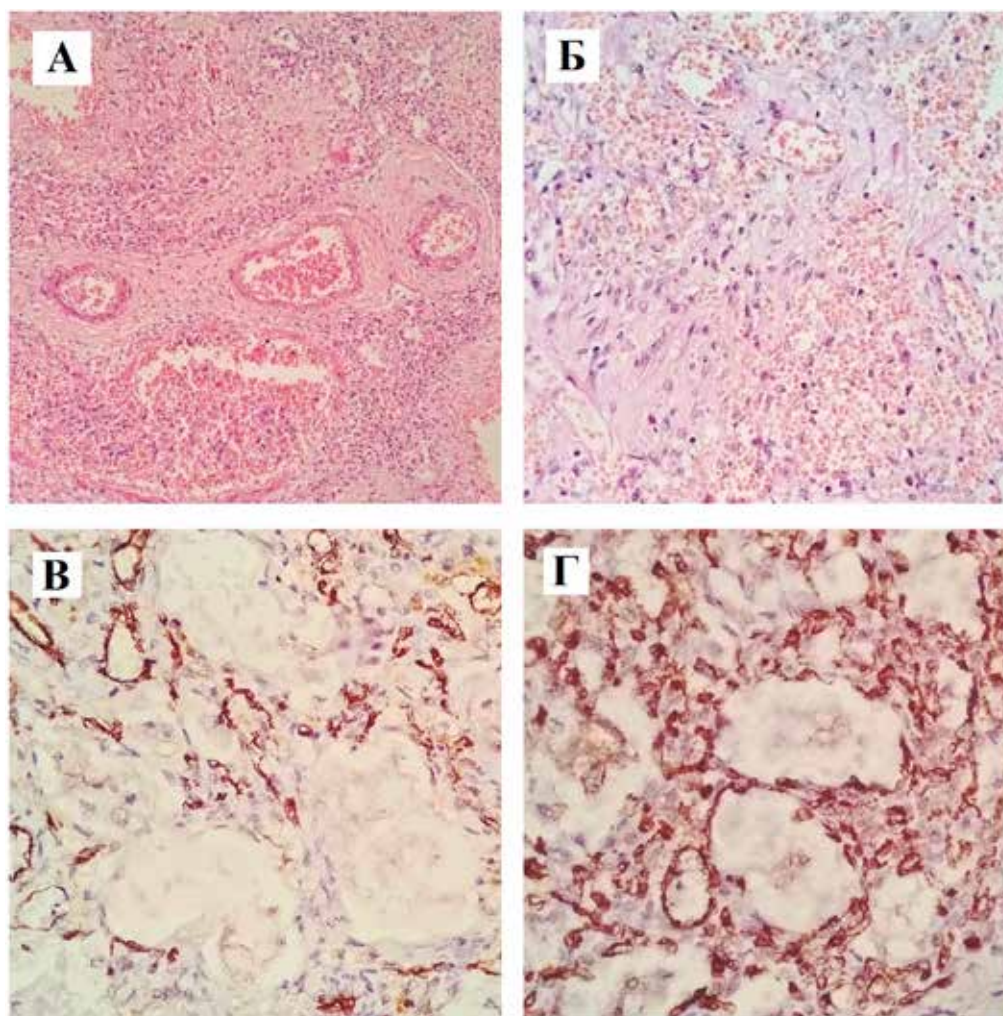
По данным эхокардиографии было выявлено наличие персистирующей легочной гипертензии, резистентной к проводившейся терапии. При анализе клинической картины заболевания ребенка Ш. наблюдалось волнообразное

течение и стойкая отрицательная динамика патологического процесса. На основании анализа имеющихся клинико-лабораторных данных у новорожденного Ш. было предположено наличие интерстициального заболевания легких — альвеолярно-капиллярной дисплазии.

Для уточнения причин тяжелого течения заболевания выполнена гистологическая, молекулярно-генетическая экспертиза фрагмента легкого. При морфологическом исследовании на малом увеличении определяется выра-

женная дезорганизация легочной ткани, нормальное дольковое и ацинарное строение не прослеживается. На малом увеличении ткань представлена дольками разной формы и размеров, не имеющими связи с ветвлением бронхиального дерева. Отмечается аномальное расположение крупных артерий и вен, многие бронхи и крупные сосуды находятся субплеврально. Большинство артерий с периваскулярным фиброзом, многие имеют извитой ход (рис. 2А). Регистрировались множественные участки кровоизлияний и геморрагического пропитывания с очаговым некрозом ткани. В бронхах выявлена десквамация эпителия и кровоизлияния.

На большом увеличении в большинстве участков преобладает рыхлая и плотная соединительная ткань с большим количеством сосудов капиллярного типа, альвеолы между ними отсутствуют (рис. 2Б). В других участках имеются альвеолы, выстланные кубическим эпителием. Между ними широкие прослойки из рыхлой соединительной ткани, в которой расположены капилляры, не контактирующие со стенкой альвеол (рис. 2В). Для визуализации сосудистого русла использовалась ИГХ окраска на CD31 (маркер эндотелиоцитов). В небольших фрагментах определяются немногочисленные мелкие альвеолы нормального строения с десквами-



**Рис. 2.** Микроскопические изменения в легких

А — Периваскулярный фиброз и извитой ход артериолы, ув.  $\times 100$ ; Б — Отсутствие альвеол, преобладание соединительной ткани с многочисленными капиллярами, ув.  $\times 400$ ; В — Альвеолы разделены широкими прослойками из рыхлой соединительной ткани с капиллярами, не контактирующими со стенкой альвеол, ув.  $\times 400$ ; Г — Небольшой участок нормально сформированных альвеол, ув.  $\times 400$ . А, Б — окраска гематоксилином и эозином, В, Г — ИГХ окраска на CD31

рованным и некротизированным эпителием (рис. 2Г). Местами в просвете альвеол небольшое количество лейкоцитов и фибрин. Гранулы гемосидерина во многих альвеолах и в соединительной ткани.

По результатам проведенной гистологической экспертизы фрагмента легкого был поставлен патологоанатомический диагноз — АКД: дезорганизация легочной ткани, нарушение долькового и ацинарного строения, аномальное расположение крупных артерий и вен около бронхов и бронхиол, а также субплеврально, нарушение васкуляризации альвеол, нарушение лобуляции правого легкого.

Следует отметить, что при АКД часто микроскопически определяется нарушение расположения ветвей легочных вен (*misalignment of pulmonary veins*, MPV). Они расположены не в междольковых соединительнотканых

перегородках, а рядом с артериями, и имеют общую с ними адвентициальную оболочку [2, 10, 11]. У ребенка Ш. этого не наблюдалось, однако многие артерии и вены располагались субплеврально. Важно, что поражение легочной ткани было тотальным, что обусловило быстрое развитие, тяжелое течение и летальный исход заболевания.

В дальнейшем было проведено молекулярно-генетическое исследование образца ткани легкого пациента. Полноэкзомное секвенирование позволило обнаружить 11 485 замен с глубиной прочтения  $\geq 30$ , среди которых 71 расположены в зонах сплайсинга. Распределение детектированных генетических изменений новорожденного Ш. по типам мутаций представлены в таблице 1.

После проведения фильтрации выявленных при секвенировании замен был проанализиро-

Таблица 1

Распределение выявленных генетических изменений по типам мутаций

Тип замены	Количество, %	Количество замен после фильтрации, %
Синонимичные однонуклеотидные	6 203 (54)	—
Несинонимичные однонуклеотидные	4 961 (43,19)	219 (90,87)
Замены со сдвигом рамки считывания	78 (0,67)	10 (4,15)
Нонсенс-замены	41 (0,34)	3 (1,24)
Замены без сдвига рамки считывания	190 (1,7)	9 (3,73)
Замены, нарушающие старт-кодон и стоп/кодон	12 (0,1)	—
Всего:	11 485	241

ван 241 вариант в 217 генах на их возможное участие в развитии тяжелого состояния пациента (табл. 1). Были обнаружены 4 гетерозиготные однонуклеотидные замены в 3 генах *SHH*, *MUC5B*, *SH2B3*, ассоциированных с развитием респираторных осложнений у человека (табл. 2).

Патогенные замены в этих генах могут вызывать заболевания с аутосомно-рецессивным типом наследования. Обнаруженные гетерозиготные замены не влияют на развитие АКД

у пациента.

Ген *FOXF1*, мутации в котором вызывают развитие АКД, кодирует белок FOXF1, экспрессируемый в мезенхиме легких и эндотелии сосудов во время органогенеза легких. Он относится к семейству факторов транскрипции forkhead и является мишенью для передачи сигналов из эпителия в SHH-сигнальном пути, а также участвует в развитии легочных альвеол и капилляров. Промотор гена *FOXF1* перекрывает CpG-островок, не содержит ТАТА-боксы

**Таблица 2**

Характеристика нуклеотидных замен генов *SHH*, *MUC5B*, *SH2B3*, ассоциированных с развитием респираторных осложнений

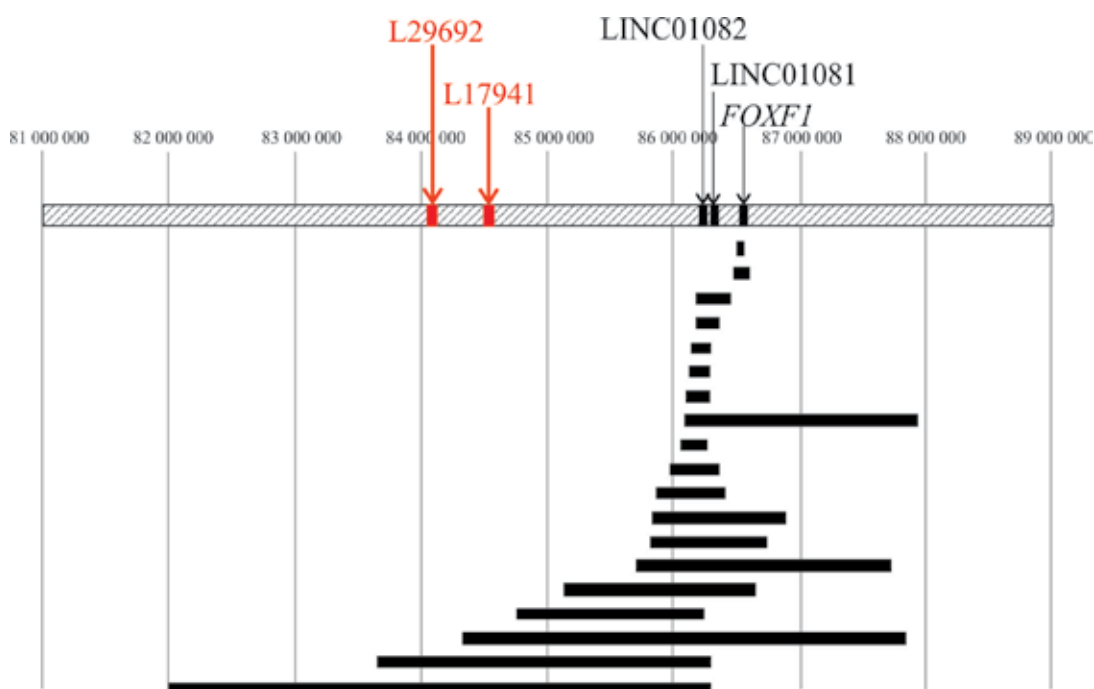
Ген	Замена	Патогенность	dbSNP
<i>SHH</i>	c.G869A p.Gly290Asp	Патогенный (HGMD)	rs104894047
<i>MUC5B</i>	c.C7882T p.R2628C	Неопределенного значения	rs200675933
<i>MUC5B</i>	c.C11126T p.T3709M	Неопределенного значения	rs199858725
<i>SH2B3</i>	c.C639A p.S213R	Неопределенного значения	rs111360561

и требует энхансерной функции для своей активности. Энхансерная область, специфичная для легких, картирована на ~ 270 т. п. н. выше по течению гена *FOXF1*, содержит гены длинных некодирующих РНК (*LINC01081* и *LINC01082*), которые регулируют его экспрессию. Кроме того, найден еще один энхансер, расположенный внутри интрона гена *FOXF1* [5]. Помимо патогенных вариантов в локусе *FOXF1*, причиной развития АКД могут быть мутации в генах, вовлеченных в SHH-или другие сигнальные пути, необходимые для развития легких (*PLXNB2*, *DOCK8*, *MPRIP*,

*ESRP1*, *SLC50A1*, *ZMYND11* и др.).

Обнаруживаемые у пациентов с АКД делеции, затрагивающие область энхансера гена *FOXF1*, могут быть различной протяженности (рис. 3).

По результатам проведенного полноэкзомного секвенирования патогенных вариантов (точечных мутаций) в гене *FOXF1* не обнаружено. Протяженной делеции, затрагивающей как ген *FOXF1*, так и близлежащие гены, выявлено не было. О ее наличии можно было бы судить по отсутствию гетерозиготных полиморфных вариантов в этих генах.



**Рис. 3.** Делеции, ассоциированные с АКД (представлены черными полосами). Карта региона гена *FOXF1*: *LINC01081* и *LINC01082* — длинные некодирующие РНК, L17941 и L29692 — микросателлиты [9]



К ограничениям метода NGS относится неспособность выявления делеций и вставок больше 50 п. о., а использованной в работе панели — некодирующих вариантов, расположенных глубже 20 п. о. от границы экзон-интрон. Поэтому исключать наличие делеции в области энхансера гена *FOXF1* нельзя. Учитывая ограничения метода секвенирования для определения делеции в области энхансера, гистологическое исследование легочной ткани

остается золотым стандартом обследования младенцев, рожденных с АКД. В качестве альтернативного метода выявления делеции в области энхансера используется также метод определения комплекса микросателлитных повторов в этом регионе.

Микросателлитный анализ на наличие протяженной делеции в области энхансера гена *FOXF1* у пробанда и его родителей дал отрицательный результат (рис. 4).

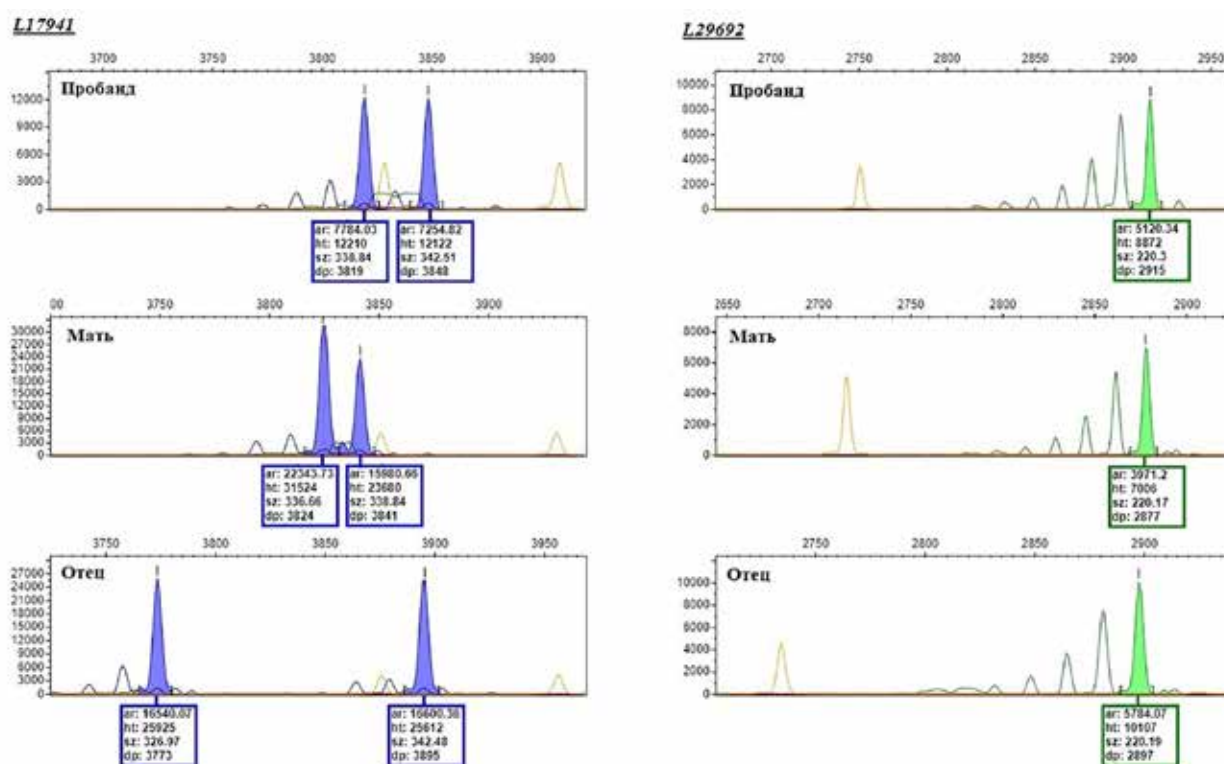


Рис. 4. Результаты микросателлитного анализа: у пробанда отсутствуют делеции в исследуемой области

### Заключение

Ведущую роль в танатогенезе тяжелой дыхательной недостаточности сыграло наличие у ребенка альвеоларно-капиллярной дисплазии, что подтверждено морфологическими данными. Генетический анализ не выявил патогенных вариантов в генах *FOXF1*, *PLXNB2*, *DOCK8*, *MPRIP*, *ESRP1*, *SLC50A1*, *ZMYND11*, а также делеции в области L17941 и L29692 q24.1 хромосомы 16. Для определения делеций LINC01081 и LINC01082 необходима разработка дополнительных биоинформатических алгоритмов.

### Список использованных источников

1. Федоров, И. А. Врожденная альвеоларно-

капиллярная дисплазия легких у новорожденного ребенка / И. А. Федоров, О. Г. Степанов, Ю. Э. Пушкарева // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура. – 2012. – № 42. – С. 127–128.

2. Alveolar capillary dysplasia / B. Naomi [et al.] // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2011. – Vol. 184. – P. 172–179.

3. Expanding the phenotype of alveolar capillary dysplasia (ACD) / P. Sen [et al.] // J. Pediatr. – 2004. – Vol. 145. – P. 646–651.

4. Bishop, N. B. Alveolar capillary dysplasia / N. B. Bishop, P. Stankiewicz, R. H. Steinhorn // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2011. – Vol.

184. – P. 172–179.

5. Pathogenetics of alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins / P. Szafranski [et al.] // *Hum. Genet.* – 2016. – Vol. 135. – P. 569–586.

6. Genomic and genic deletions of the FOX gene cluster on 16q24.1 and inactivating mutations of *FOXF1* cause alveolar capillary dysplasia and other malformations / P. Stankiewicz. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2009. – Vol. 84. – P. 780–791.

7. Novel *FOXF1* mutations in sporadic and familial cases of alveolar capillary dysplasia with misaligned pulmonary veins imply a role for its DNA binding domain / P. Sen [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2013. – Vol. 34. – P. 801–811.

8. Chang, X. wANNOVAR: annotating genetic

variants for personal genomes via the web / X. Chang, K. Wang // *J. Med. Gen.* – 2012. – Vol. 49. – P. 433–436.

9. A 16q deletion involving *FOXF1* enhancer is associated to pulmonary capillary hemangiomatosis / P. D. Russo [ et al.] // *BMC Med. Gen.* – 2015. – Vol. 16. – P. 1–6.

10. Alveolar capillary dysplasia with misalignment of the pulmonary veins: clinical, histological, and genetic aspects / E. Slot [et al.] // *Pulm. Circ.* – 2018. – Vol. 8. – P. 1–8.

11. A familial case of alveolar capillary dysplasia with misalignment of the pulmonary veins: the clinicopathological features and unusual glomeruloid endothelial proliferation / A. Kitano [et al.] // *Diagn. Pathol.* – 2020. – Vol. 15. – P. 1–7.

A. P. Mikhalenka<sup>1</sup>, V. M. Malyshava<sup>1</sup>, I. V. Sakharau<sup>2</sup>, A. Y. Gordeeva<sup>3</sup>, M. V. Artsiusheuskaya<sup>4</sup>,  
V. A. Shostak<sup>3</sup>, A. B. Sushchevski<sup>3</sup>, G. A. Shyshko<sup>4</sup>, A. V. Kilchevsky<sup>1</sup>

## A CLINICAL CASE OF CONGENITAL ALVEOLAR CAPILLARY DYSPLASIA: USE OF HIGH THROUGHPUT SEQUENCING TO VERIFY A DIAGNOSIS

<sup>1</sup>State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: michalenko75@mail.ru

<sup>2</sup>Health Care Institution “City Clinical Pathology Bureau”

8/8 Semashko St., 220045 Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Health Care Institution “5th City Clinical Hospital”

9 Filatova St., 220026 Minsk, Republic of Belarus

<sup>4</sup>State Educational Institution “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”

3/3 P. Brovka St., 220013 Minsk, Republic of Belarus

The aim of the study was to establish the role of pathological clinical and laboratory characteristics of the course of the neonatal period, the data of morphological and molecular genetic studies in the thanatogenesis of a case of alveolar capillary dysplasia (ACD) in a newborn. ACD is a rare lethal neonatal lung developmental disorder, the development of which is caused in most cases by point mutations in the *FOXF1* gene or deletion in the q24.1 region of chromosome 16. High-throughput whole-exome sequencing was performed in the child Sh. using the Illumina-IDT Exome Enrichment Protocol on the NextSeq 550 sequencer. A key role in the thanatogenesis of severe respiratory failure was existing alveolocapillary dysplasia in a child, which was confirmed by morphological data. Genetic analysis did not reveal pathogenic variants in *FOXF1*, *PLXNB2*, *DOCK8*, *MPRIIP*, *ESRP1*, *SLC50A1*, and *ZMYND11* genes, as well as deletions in regions L17941 and L29692 q24.1 of chromosome 16. In order to identify LINC01081 and LINC01082 deletions, it is necessary to develop additional bioinformatic algorithms.

**Keywords:** alveolar capillary dysplasia, newborn, respiratory failure, histology, molecular genetic diagnostics.

*Дата поступления в редакцию: 10 марта 2022 г.*



М. Л. Луцки<sup>1</sup>, М. Д. Амелянович<sup>2</sup>, И. Б. Моссэ<sup>2</sup>

## АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *FTO* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

<sup>1</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования

Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение

«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

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

e-mail: M.Ameliyanovich@igc.by

Разработка методов оценки риска развития ожирения и сахарного диабета 2 типа с учетом фенотипических и молекулярно-генетических особенностей конкретного человека позволит персонализировать профилактические, диагностические и лечебные подходы. Раннее выделение групп риска значительно повышает эффективность применения методов профилактики. Своевременная модификация образа жизни и корректирующие схемы лечения позволят избежать формирования осложнений или предотвратить развитие диабета. В данном исследовании проведен анализ ассоциации 13 полиморфных вариантов гена *FTO* с сахарным диабетом 2 типа у лиц белорусской популяции. Показано, что минорные гомозиготные генотипы полиморфных вариантов rs11075990, rs1121980, rs17817449, rs3751812, rs9939609, rs9940128, rs9941349 гена *FTO* достоверно ассоциированы с повышенным риском развития сахарного диабета 2-го типа (OR = 2,20–2,78; P < 0,05).

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа, индекс массы тела, ожирение, избыточная масса тела, полиморфные варианты *FTO*, генетическая предрасположенность.

### Введение

Рост заболеваемости сахарным диабетом 2 типа (СД 2 типа), принимающий характер мировой пандемии, связан с повсеместным увеличением числа лиц с избыточной массой тела и ожирением [1, 2]. Количество случаев избыточной массы тела и СД 2 типа резко возросла за последние три десятилетия почти во всех странах, в том числе и в Республике Беларусь [3, 4], при этом эксперты сходятся во мнении, что истинное число людей с СД 2 типа в каждой популяции превышает зарегистрированные случаи не менее, чем в 2 раза, что подтверждается статистикой впервые выявляемых случаев диабета на фоне уже развившихся осложнений [5, 6]. Поэтому остаются актуальными клинические и молекулярно-генетические исследования по поиску оптимальных предикторов СД 2 типа и ожирения.

Разработка методов оценки риска развития ожирения и СД 2 типа, учитывающих фенотипические и молекулярно-генетические особенности конкретного индивидуума, представляет важную задачу для персонализации медицинской профилактики, диагностических,

лечебных и корректирующих подходов. Ранняя стратификация групп риска среди населения существенно повышает эффективность применения методов профилактики, т. к. своевременная коррекция образа жизни и применение соответствующих медикаментозных препаратов позволит избежать тяжелых осложнений или вовсе предотвратить манифестацию заболевания.

Впервые влияние однонуклеотидных полиморфизмов гена *FTO* на риск развития СД 2 типа было описано в 2007 году [7]. Дальнейшие исследования показали связь полиморфных вариантов с индексом массы тела, нарушением контроля аппетита, уровнем глюкозы натощак, триглицеридов, холестерина, а также с эффективностью работы бета-клеток поджелудочной железы [8, 9]. В то же время наблюдаются существенные популяционные различия в распределении частот аллелей полиморфных вариантов гена *FTO*.

Целью настоящего исследования является анализ ассоциации полиморфных вариантов rs10852521, rs11075990, rs1121980, rs1421085, rs1477196, rs17817449, rs3751812, rs4783819, rs7206790, rs8047395, rs9939609, rs9940128,

rs9941349 гена *FTO* с риском развития СД 2 типа.

### Материалы и методы

#### Характеристика исследуемых групп

В исследовании приняли участие 327 добровольцев (контрольная группа — 164 человека, СД 2 типа — 163 человека), проживающих на территории Республики Беларусь. Взятие биологического материала осуществлялось на клинических базах кафедры эндокринологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (далее — БелМАПО). К обследованию приглашались лица в возрасте старше 18 лет мужского и женского пола, с впервые выявленным диабетом или болеющие им не более 10 лет, давшие информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с Хельсинкской декларацией (в редакции 2013 г.). Форма информированного согласия и программа исследования были утверждены на заседании комитета по биоэтике БелМАПО.

Диагноз СД 2 типа пациентам был установлен ранее на амбулаторно-поликлиническом этапе в соответствии со стандартами Американской Диабетической Ассоциации (ADA-2019). Клинический осмотр участников осуществлялся врачом-эндокринологом с оценкой клинических и антропометрических характеристик. Антропометрические измерения выполняли в соответствии с требованиями WHO/ВОЗ и IDF (Международной Федерации диабета). Рост измеряли с точностью до 0,1 см, массу тела — с точностью до 0,1 кг с помощью напольных биоимпедансных весов (анализатор состава тела) Tanita (TF-780, Japan) с анализатором процента распределения жировой ткани.

Индекс массы тела рассчитывали по формуле: ИМТ = масса тела (кг) / рост (м)<sup>2</sup>. Распределение по группам в зависимости от ИМТ производили согласно общепринятым критериям (<25 — нормальный вес; ≥25–<30 — избыточный вес; ≥30–<35 — ожирение I степени; ≥35–<40 — ожирение II степени; ≥40 — ожирение III степени).

#### Генетические исследования

Для молекулярно-генетического тестирования использовали тотальную геномную ДНК, выделенную из Buccal epithelial cells набором

Нуклеосорб-А (ОДО «Праймтех», Беларусь) согласно инструкции производителя. Количество ДНК определяли на флуориметре Qubit 2 (Thermo Scientific, США). Полиморфные варианты гена *FTO* (rs10852521, rs11075990, rs1121980, rs1421085, rs1477196, rs17817449, rs3751812, rs4783819, rs7206790, rs8047395, rs9939609, rs9940128, rs9941349) анализировали с помощью полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с зондами TaqMan (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для детекции флуоресценции, а также первичной обработки результатов использовали программное обеспечение CFX Manager 3.1 прибора CFX96 (BIO-RAD, США).

#### Статистический анализ

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием стандартного пакета программы STATISTICA для Windows (StatSoft Inc., USA). Для анализа распределения частот генотипов в исследованных группах использован критерий  $\chi^2$  Пирсона. Распределение соответствующих генотипов в исследуемых группах для всех проанализированных полиморфизмов соответствовало ожидаемому распределению Харди-Вайнберга.

Для оценки влияния полиморфизмов на риск развития заболевания использовали показатель отношения шансов (OR) с учетом 95% доверительного интервала (95% CI). Результаты анализа считали статистически значимыми при уровне  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В группу пациентов с СД 2 типа вошли 163 человека (97 женщин и 66 мужчин) средний возраст 54,2 [50,9; 56,9] года, индекс массы тела (ИМТ) — 31,7 [28,4; 36,1] кг/м<sup>2</sup>. Контрольная группа включала 164 добровольца (89 женщин и 75 мужчин) средний возраст 33,0 [30,0; 38,0] года, индекс массы тела (ИМТ) — 23,4 [20,4; 26,0] кг/м<sup>2</sup>.

В таблице 1 представлены результаты анализа ассоциации ИМТ в объединенной группе участников исследования с полиморфными вариантами гена *FTO*. Так как распределение ИМТ в исследуемой группе соответствовало нормальному, были применены параметрические методы анализа.

**Таблица 1**

**Различия ИМТ в зависимости от генотипа по полиморфным вариантам гена *FTO***

Полиморфизм	Генотип	N	ИМТ	Разница (95% CI)	P
rs10852521	C/C	90	29 (0,78)	0,00	0,05
	C/T	157	28,12 (0,55)	-0,88 (-2,65-0,90)	
	T/T	48	26,01 (0,82)	-2,99 (-5,39-(-0,59))	
rs11075990	A/A	88	25,44 (0,57)	0,00	<0,001
	A/G	148	28,95 (0,59)	3,52 (1,75-5,29)	
	G/G	59	29,65 (0,94)	4,21 (2,00-6,42)	
rs1121980	G/G	72	25,35 (0,63)	0,00	<0,001
	A/G	160	28,6 (0,56)	3,25 (1,37-5,12)	
	A/A	63	29,73 (0,9)	4,38 (2,10-6,66)	
rs1421085	T/T	85	25,94 (0,59)	0,00	0,001
	C/T	161	28,78 (0,56)	2,84 (1,10-4,57)	
	C/C	67	29,57 (0,83)	3,63 (1,51-5,74)	
rs1477196	G/G	146	28,47 (0,55)	0,00	0,44
	A/G	142	28,16 (0,58)	-0,31 (-1,87-1,25)	
	A/A	25	26,6 (1,17)	-1,86 (-4,72-1,00)	
rs17817449	T/T	94	25,83 (0,55)	0,00	<0,001
	G/T	152	28,77 (0,56)	2,95 (1,27-4,62)	
	G/G	64	29,66 (0,86)	3,83 (1,77-5,90)	
rs3751812	G/G	94	25,88 (0,55)	0,00	<0,001
	G/T	153	28,91 (0,57)	3,03 (1,34-4,72)	
	T/T	64	29,58 (0,88)	3,70 (1,61-5,79)	
rs4783819	C/C	147	28,45 (0,55)	0,00	0,45
	G/C	141	28,18 (0,58)	-0,27 (-1,83-1,29)	
	G/G	25	26,6 (1,17)	-1,84 (-4,70-1,01)	
rs7206790	C/C	71	26,39 (0,63)	0,00	0,028
	G/C	172	28,92 (0,54)	2,53 (0,68-4,38)	
	G/G	70	28,16 (0,82)	1,77 (-0,43-3,98)	
rs8047395	A/A	95	28,68 (0,72)	0,00	0,22
	A/G	167	28,28 (0,53)	-0,40 (-2,09-1,29)	
	G/G	50	26,7 (0,8)	-1,99 (-4,29-0,31)	
rs9939609	T/T	95	25,89 (0,55)	0,00	<0,001
	T/A	155	28,99 (0,57)	3,11 (1,42-4,79)	
	A/A	62	29,63 (0,89)	3,74 (1,64-5,85)	
rs9940128	G/G	75	25,74 (0,63)	0,00	<0,001
	A/G	166	28,67 (0,54)	2,93 (1,12-4,73)	
	A/A	72	29,58 (0,8)	3,84 (1,70-5,98)	
rs9941349	C/C	85	25,63 (0,58)	0,00	<0,001
	C/T	160	28,7 (0,54)	3,07 (1,37-4,77)	
	T/T	67	29,81 (0,85)	4,18 (2,11-6,24)	

Из 13 проанализированных полиморфных вариантов, для 10 была показана статистически значимая ассоциация с ИМТ в исследуемой группе. При этом у носителей минорных гомозигот полиморфных вариантов rs11075990, rs1121980, rs1421085, rs17817449, rs3751812, rs9939609, rs9940128, rs9941349 ИМТ был на 3,63–4,38 кг/м<sup>2</sup> выше, чем у носителей соответствующих мажорных гомозигот ( $P < 0,001$ ), а у носителей генотипа Т/Т полиморфного варианта rs10852521 ИМТ был на 2,99 (5,39–0,59,  $P = 0,05$ ) кг/м<sup>2</sup> ниже и составил  $26,01 \pm 0,82$  кг/м<sup>2</sup>. Для вариантов rs1477196, rs4783819, rs8047395 не наблюдалось статистически значимой связи генотипа с индексом массы тела в представленной группе.

Несмотря на большое количество опубликованных исследований, конкретные молекулярные механизмы влияния гена *FTO*, на предрасположенность к развитию ожирения и СД 2 типа остаются не до конца изученными. Описано влияние *FTO* на уровень экспрессии генов *IRX3* и *IRX5*, ответственных за дифференцировку адипоцитов бурой и белой жировой ткани, отличающихся уровнем метаболической активности и отвечающих за адаптивный термогенез и накопление жировой ткани соответственно [10]. С другой стороны, подтверждена взаимосвязь с уровнем физической активности и особенностями пищевого

поведения [11].

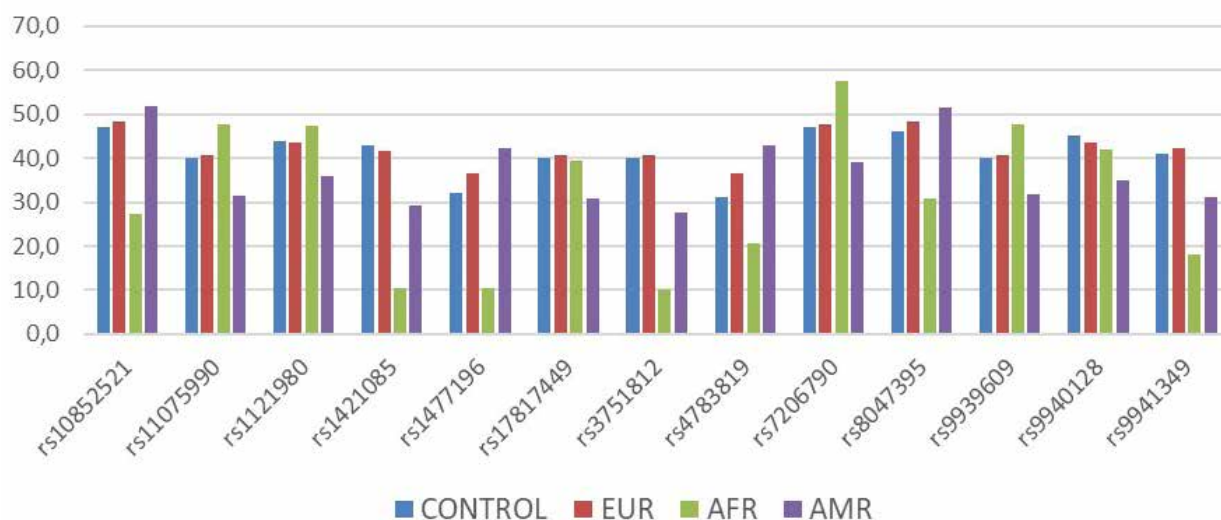
Описанные в литературе исследования свидетельствуют о высокой степени этнических различий в распределении частот аллелей полиморфных вариантов гена *FTO*. Так частота минорного аллеля полиморфного варианта rs11075990 варьирует от 13,5% у населения восточной Азии до 47,6% у африканцев [12]. На рисунке 1 представлены результаты сравнения частот минорных аллелей, наблюдаемых в контрольной группе нашего исследования, по сравнению с частотами, описанными для разных популяций в базе gnomAD v3.1.2.

Проведенный анализ показал, что частоты минорных аллелей всех исследованных полиморфных вариантов в контрольной группе сопоставимы с частотами в европейской популяции.

Распределение частот генотипов по исследуемым вариантам гена *FTO* в группе пациентов с СД 2 типа по сравнению с контрольной группой представлено в таблице 2.

По результатам генотипирования были выявлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов полиморфных вариантов rs11075990, rs1121980, rs17817449, rs3751812, rs9939609, rs9940128, rs9941349 ( $P = 0,0031–0,033$ ). Частота минорных аллелей указанных вариантов в группе пациентов с СД 2 типа была достоверно выше по сравнению с контрольной группой.

Частоты минорных аллелей полиморфных вариантов гена *FTO*



**Рис. 1.** Сравнение частот минорных аллелей полиморфных вариантов гена *FTO* в различных популяциях CONTROL — контрольная группа в данном исследовании; EUR — европейцы не финского происхождения; AFR — африканцы и афроамериканцы; AMR — американцы

**Таблица 2**

**Результаты генотипирования группы пациентов с СД2 типа и контрольной группы**

Полиморфизм	Генотип	Частота		OR (95% CI)	P
		Контроль	СД2		
rs10852521	C/C	44 (26,8%)	50 (36,2%)	1,00	0,061
	C/T	87 (53%)	72 (52,2%)	0,73 (0,44–1,21)	
	T/T	33 (20,1%)	16 (11,6%)	0,43 (0,21–0,88)	
rs11075990	A/A	60 (36,6%)	29 (21%)	1,00	0,0092
	A/G	76 (46,3%)	75 (54,4%)	2,04 (1,18–3,53)	
	G/G	28 (17,1%)	34 (24,6%)	2,51 (1,29–4,90)	
rs1121980	G/G	50 (30,5%)	23 (16,7%)	1,00	0,013
	A/G	84 (51,2%)	79 (57,2%)	2,04 (1,14–3,66)	
	A/A	30 (18,3%)	36 (26,1%)	2,61 (1,31–5,21)	
rs1421085	T/T	52 (31,7%)	34 (21,7%)	1,00	0,057
	C/T	83 (50,6%)	82 (52,2%)	1,51 (0,89–2,56)	
	C/C	29 (17,7%)	41 (26,1%)	2,16 (1,14–4,11)	
rs1477196	G/G	74 (45,1%)	78 (49,7%)	1,00	0,71
	A/G	76 (46,3%)	67 (42,7%)	0,84 (0,53–1,32)	
	A/A	14 (8,5%)	12 (7,6%)	0,81 (0,35–1,87)	
rs17817449	T/T	60 (36,6%)	35 (22,7%)	1,00	0,016
	G/T	76 (46,3%)	80 (52%)	1,80 (1,07–3,04)	
	G/G	28 (17,1%)	39 (25,3%)	2,39 (1,26–4,53)	
rs3751812	G/G	60 (36,6%)	35 (22,6%)	1,00	0,015
	G/T	76 (46,3%)	81 (52,3%)	1,83 (1,08–3,08)	
	T/T	28 (17,1%)	39 (25,2%)	2,39 (1,26–4,53)	
rs4783819	C/C	75 (45,7%)	78 (49,7%)	1,00	0,77
	G/C	75 (45,7%)	67 (42,7%)	0,86 (0,54–1,36)	
	G/G	14 (8,5%)	12 (7,6%)	0,82 (0,36–1,90)	
rs7206790	C/C	42 (25,6%)	30 (19,1%)	1,00	0,31
	G/C	89 (54,3%)	88 (56%)	1,38 (0,80–2,41)	
	G/G	33 (20,1%)	39 (24,8%)	1,65 (0,86–3,20)	
rs8047395	A/A	44 (26,8%)	55 (35,3%)	1,00	0,2
	A/G	90 (54,9%)	80 (51,3%)	0,71 (0,43–1,17)	
	G/G	30 (18,3%)	21 (13,5%)	0,56 (0,28–1,11)	
rs9939609	T/T	60 (36,6%)	36 (23,1%)	1,00	0,024
	T/A	76 (46,3%)	83 (53,2%)	1,82 (1,09–3,05)	
	A/A	28 (17,1%)	37 (23,7%)	2,20 (1,16–4,18)	
rs9940128	G/G	48 (29,3%)	28 (17,8%)	1,00	0,033
	A/G	84 (51,2%)	86 (54,8%)	1,76 (1,01–3,06)	
	A/A	32 (19,5%)	43 (27,4%)	2,30 (1,20–4,43)	
rs9941349	C/C	57 (34,8%)	29 (18,6%)	1,00	0,0031
	C/T	78 (47,6%)	86 (55,1%)	2,17 (1,26–3,73)	
	T/T	29 (17,7%)	41 (26,3%)	2,78 (1,45–5,34)	

Наиболее значительные различия между группами наблюдаются для полиморфного варианта rs9941349 гена *FTO*. Частота минорного генотипа Т/Т в группе пациентов с СД 2 типа составила 26,3%, что в 1,48 раза больше, чем в контрольной группе. Полученные данные свидетельствуют об увеличении риска развития СД 2 типа у носителей данного генотипа (OR = 2,78; 95% CI 1,45–5,34).

По полиморфным вариантам rs10852521 и rs1421085, для которых ранее нами была показана статистически значимая ассоциация с ИМТ, различия частот генотипов среди пациентов и контрольной группы наблюдались на уровне тенденции (P = 0,061 и P = 0,057 соответственно). При этом генотип Т/Т варианта rs10852521 в группе пациентов с СД 2 типа встречался в 1,7 раза реже, чем в контрольной, что может свидетельствовать о его протекторном эффекте.

Большой интерес представляет анализ неравновесного сцепления (Linkage Disequilibrium, LD) данных полиморфных вариантов. Выявление статистически значимого высоко-

го коэффициента неравновесности позволит определить аллели, которые преимущественно наследуются сцеплено. По данным исследований, описанных в литературе, большинство изученных полиморфных вариантов гена *FTO* составляют 4–5 блоков неравновесного сцепления, однако формирование блоков неравновесного сцепления, по-видимому, имеет этнические особенности, так, уровень неравновесного сцепления rs10852521 и rs9939609, по данным HarMap, варьировал от D' = 0,48 до D' = 1,0 в зависимости от популяции [13].

Протестированные нами полиморфные варианты гена *FTO* составляют один блок неравновесного сцепления (D' = 0,7461–0,9997, P < 0,001). По результатам генотипирования выявлено, что из 7 полиморфных вариантов гена *FTO*, ассоциированных с повышенным риском развития СД 2 типа, образуются 4 аллельных комбинации, которые встречались у 98,1% всех участников исследования (табл. 3).

Выявленные статистически значимые различия между анализируемыми группами в глобальном распределении аллельных ком-

Таблица 3

Аллельные комбинации полиморфных вариантов гена

rs11075990	rs1121980	rs17817449	rs3751812	rs9939609	rs9940128	rs9941349	Частота (%)			OR(95%CI)	P
							Всего	Контроль	СД2		
A	G	T	G	T	G	C	49,84	54,26	45,22	1,00	–
G	A	G	T	A	A	T	44,54	39,32	50,00	1,56 (1,11–2,18)	0,01
A	A	T	G	T	A	T	02,03	01,53	02,55	2,25 (0,70–7,28)	0,18
A	A	T	G	T	A	C	01,64	02,44	0,96	0,39 (0,07–2,09)	0,27

бинаций (global P = 0,024) позволяют предположить ассоциацию риска СД 2 типа с анализируемыми ДНК-маркерами. Наиболее частой аллельной комбинацией (общая частота 49,84%) являлась A/G/T/G/T/G/C, включающая мажорные аллели исследуемых вариантов. Частота данной комбинации составила 54,26% в контрольной группе и 45,22% в группе пациентов. Для носителей аллельной комбинации

G/A/G/T/A/A/T, включающей все минорные аллели, риск развития СД 2 типа был статистически значимо выше по сравнению с контрольной комбинацией (OR = 1,56; 95% CI 1,11–2,18; P = 0,01).

Таким образом, результаты проведенного исследования показали достоверную ассоциацию полиморфных вариантов гена *FTO* с риском развития ожирения и СД 2 типа

в белорусской популяции. Проведение молекулярно-генетического тестирования по данным вариантам, позволяет персонализировать корректирующие подходы в детском и молодом возрасте и минимизировать случаи выхода на клинический сахарный диабет.

### Заключение

Частота аллельной комбинации, включающей минорные аллели полиморфных вариантов rs11075990, rs1121980, rs17817449, rs3751812, rs9939609, rs9940128, rs9941349 гена *FTO* у обследованных лиц белорусской популяции с СД 2 типа достигает 50,0%, что в 1,27 раза превышает частоту в контрольной группе.

У носителей минорных гомозиготных генотипов указанных вариантов наблюдается достоверное увеличение риска развития СД 2 типа ( $OR = 2,20-2,78$ ;  $P < 0,05$ ), что определяет целесообразность раннего старта превентивных корректирующих мероприятий по модификации процентного содержания и распределения жировой массы.

*Исследование выполнено в рамках задания 6.1 «Разработать ДНК-технологии выявления генетического риска эндокринных заболеваний» научно-технической программы Союзного государства «ДНК-идентификация».*

### Список использованных источников

1. Goodall R. Trends in type 2 diabetes mellitus disease burden in European Union countries between 1990 and 2019 / R. Goodall [et al.] // *Nature. Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 15356. – P. 1–8. doi.org/10.1038/s41598-021-94807-z.
2. Strelitz J. Association between weight change and incidence of cardiovascular disease events and mortality among adults with type 2 diabetes: a systematic review of observational studies and behavioral intervention trials / J. Strelitz [et al.] // *Diabetologia*. – 2022. – Vol. 65, № 3. – P. 424–429. doi.org/10.1007/s00125-021-05605-1.
3. Beulens J. W. J. Environmental risk factors of type 2 diabetes — an exposome approach / J. W. J. Beulens [et al.] // *Diabetologia*. – 2022. – Vol. 65, № 2. – P. 263–274. doi.org/10.1007/s00125-021-05618-w.
4. Hjort R. Overweight, obesity and the risk of LADA: results from a Swedish case-control

study and the Norwegian HUNT Study / R. Hjort [et al.] // *Diabetologia*. – 2018. – Vol. 61, № 4. – P. 1 333–1 343. doi.org/10.1007/s00125-018-4596-0.

5. О. Н. Исачкина, Л. И. Данилова. Дисгликемия критических состояний // *Неотложная кардиология и кардиоваскулярные риски*. – 2018. – Т. 2, № 2. – С. 302–311.

6. Clodi M. Treatment of hyperglycemia in adult, critically ill patients (Update 2019) / M. Clodi [et al.] // *Klin Wochenschr*. – 2019. – Vol. 131, №1. – P. 218–220.

7. Frayling T. M. 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, № 5826. – P. 889–894. doi.org/10.1126/science.1141634.

8. Freathy, R. M. 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. 1 419–1 426 doi: 10.2337/db07-1466.

9. Wing, M. R. Analysis of *FTO* gene variants with obesity and glucose homeostasis measures in the multiethnic Insulin Resistance Atherosclerosis Study cohort / M. R. Wing [et al.] // *Int J Obes (Lond)*. – 2011. – Vol. 35, № 9. – P. 1 173–1 182 doi:10.1038/ijo.2010.244.

10. Landgraf, K. *FTO* Obesity Risk Variants Are Linked to Adipocyte *IRX3* Expression and BMI of Children — Relevance of *FTO* Variants to Defend Body Weight in Lean Children? / K. Landgraf [et al.] // *PloS one*. – 2016. – Vol. 11, № 8. doi:10.1371/journal.pone.0161739

11. Vimalaswaran K. S. Interaction between *FTO* gene variants and lifestyle factors on metabolic traits in an Asian Indian population / K. S. Vimalaswaran [et al.] // *Nutr Metab (Lond)*. – 2016. – Vol. 13, № 39. doi:10.1186/s12986-016-0098-6

12. Peng, S. *FTO* gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis / S. Peng [et al.] // *BMC medicine*. – 2011. – Vol. 9, № 71. doi: 10.1186/1741-7015-9-71.

13. Apalasy, Y. D. Genetic association of SNPs in the *FTO* gene and predisposition to obesity in Malaysian Malays / Y. D. Apalasy [et al.] // *Braz J Med Biol Res*. – 2012. – Vol. 45, № 12. – P. 1 119–1 126. doi:10.1590/s0100-879x2012007500134.

M. L. Lushchik<sup>1</sup>, M. D. Ameliyanovich<sup>2</sup>, I. B. Mosse<sup>2</sup>

## ASSOCIATION OF *FTO* GENE POLYMORPHISMS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

<sup>1</sup>Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education  
220013, Minsk, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>State Scientific Institution  
“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”  
27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus  
e-mail: M.Ameliyanovich@igc.by

Development of methods allowing to assess obesity and type 2 diabetes risks, taking into account the phenotypic and molecular-genetic characteristics of a particular individual, will make it possible to personalize preventive, diagnostic and therapeutic approaches. Early stratification of risk groups significantly increases effective application of preventive methods. Timely correction of lifestyle and the use of appropriate medications will allow avoiding severe complications or even preventing the development of diabetes. This study analyzed an association of 13 polymorphic variants of the *FTO* gene with type 2 diabetes mellitus in the Belarusian population. It was shown that minor homozygous genotypes of polymorphic variants rs11075990, rs1121980, rs17817449, rs3751812, rs9939609, rs9940128, and rs9941349 of the *FTO* gene are significantly associated with an increased risk of type 2 diabetes mellitus (OR = 2.20–2.78;  $P < 0.05$ ) development.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus, obesity, body mass index, excessive body weight, *FTO* gene polymorphic variants, genetic predisposition.

*Дата поступления в редакцию: 09 марта 2022 г.*



И. Н. Андреева<sup>1</sup>, Р. С. Шулинский<sup>1</sup>, Е. П. Михаленко<sup>1</sup>, А. В. Байда<sup>2</sup>, Н. Б. Кузнецова<sup>2</sup>,  
А. В. Кильчевский<sup>1</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА У ЛЮДЕЙ СТАРШЕ 60 ЛЕТ

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: irishka14790@mail.ru

<sup>2</sup>Государственное учреждение образования  
«Белорусская академия последипломного образования»  
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3

Старение определяется сложным взаимодействием между генетическими факторами и факторами окружающей среды. Все больше данных свидетельствует о том, что микробиом кишечника оказывает влияние на многие возрастные изменения, включая дисрегуляцию иммунной системы и восприимчивость к заболеваниям. В данной работе проанализированы особенности микробиома кишечника у 23 человек старшей возрастной группы (старше 60 лет), проживающих в Беларуси. Генетический анализ биологического материала проводился методом метагеномного анализа с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования компании Illumina. Наиболее представленные компоненты в исследованных образцах микробиома включали представителей семейств *Ruminococcaceae* и *Verrucomicrobiaceae*. Было выявлено, что с увеличением возраста человека уменьшается количество бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, а также наблюдается тенденция к уменьшению количества бактерий семейства *Erysipelotrichaceae*.

**Ключевые слова:** долголетие, старение, образ жизни, микробиом кишечника, метагеномный анализ.

### Введение

В настоящее время в мире число людей в возрасте 60 лет и старше, по сравнению с 1980-ми годами, удвоилось. Для Республики Беларусь коэффициент старения населения в 2018 году составил около 20%. Старение населения ставит задачи укрепления здоровья и расширения функциональных возможностей пожилых людей для увеличения периода активной жизни человека [1].

Увеличение доли пожилых людей в структуре населения экономически развитых и развивающихся стран, ставшее особенно заметным в последние десятилетия, вызывает большой интерес к изучению первичных механизмов старения и биологических факторов, определяющих продолжительность жизни [2]. Кроме того, старение человека часто сопровождается заболеваниями, такими как сердечно-сосудистые, атеросклероз, слабоумие, диабет II типа, болезнь Альцгеймера, остеопороз и рак [2, 3]. Выявление фундаментальных механизмов

старения, в том числе генетически обусловленных, является необходимой предпосылкой для продления жизни и разработки эффективных мер сохранения активного долголетия [4, 5].

Согласно современным представлениям, старение определяется сложным взаимодействием между генетическими факторами и факторами окружающей среды. Основу старения составляет постепенная дегенерация всего транскриптома клетки, то есть нарушения функций регуляторных и структурных генов, вызываемые различными экзогенными и эндогенными факторами [6, 7]. Прогрессия старения включает постепенное ослабление иммунной системы, что ведет к дисбалансу между провоспалительной и противовоспалительной активностями. Возрастные изменения провоспалительного статуса приводят к системному воспалению, что увеличивает склонность к хроническим заболеваниям, снижению когнитивных функций, нарушению обмена веществ и смертности [8–10].

На функциональное состояние организма, кроме образа жизни человека и генетических особенностей системы обмена веществ, также влияет качественный и количественный состав микробиома кишечника человека. Исследование микробиома человека, различных аспектов его формирования и функционирования привлекают все большее внимание. Во-первых, стоит отметить, что действие кишечной микробиоты может оказывать регулирующее влияние на экспрессию генов человека. Из этого можно предположить, что сходный фенотипический эффект может быть достигнут как за счет собственных генетических особенностей организма человека, так и за счет функционирования генетической системы, составляющей микробиом человека. Во-вторых, микробиом является одним из основных факторов, определяющим функционирование иммунной системы, системный ответ на воспаление [11]. Кроме того, микробиом через ось «кишечник-мозг» участвует в модуляции когнитивных функций [12]. Адекватно сформированный микробиом поддерживает здоровое состояние нашего организма и, возможно, даже продлевает жизнь [13].

Установлено, что с возрастом кишечная микробиота претерпевает значительные изменения, связанные с процессами старения [14, 15]. Эти изменения во многом еще недостаточно исследованы, но установлено, что в процессе старения существенно изменяется относительная пропорция микроорганизмов. С возрастом в микробиоте человека увеличивается доля *Bacteroidetes* и уменьшается доля *Firmicutes* [16, 17]. В связи с этим значительный интерес представляет установление особенностей микробиоты кишечника человека, играющей важную роль в формировании здорового старения и активного долголетия.

Цель данного исследования — изучить особенности микробиома кишечника у людей старшей возрастной группы, проживающих в Беларуси.

### Материалы и методы исследования

Проведено обследование 23 человек (16 женщин и 7 мужчин), поступивших в отделение Республиканского клинического госпиталя инвалидов Великой Отечественной войны имени П. М. Машерова. У всех участников ис-

следования получено письменное информированное согласие на проведение исследования. Возраст пациентов был в диапазоне от 74 до 93 лет (средний возраст —  $81 \pm 0,2$ ).

Известно, что на состав микробиома оказывают влияние факторы окружающей среды и диета. Поэтому было проведено обследование добровольцев, чтобы сформировать однородную группу исследования. Обследование включало изучение клинико-фенотипических показателей с оценкой антропометрических, клинико-функциональных данных, а также анализа некоторых средовых факторов (место проживания, состав семьи, наследственность, хобби, вредные привычки, социальное взаимодействие) и оценку пищевого статуса добровольцев.

У участников исследования отбирали в стерильные контейнеры стул. Отобранные образцы замораживали при температуре минус 20 °С, хранили и транспортировали образцы при данной температуре.

Для выделения микробной ДНК из образцов стула использовали набор innuPREP Stool DNA Kit (Anflytik Jena) по протоколу производителя.

После выделения тотальной ДНК и подготовки библиотек для секвенирования было выполнено секвенирование переменных участков V3–V4 гена 16S рРНК с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов) и прибора MiSeq Illumina (США) согласно рекомендациям производителя. На первом этапе для анализа полученных данных и их визуализации использовали программу 16S Metagenomics (Version 1.1.0), предоставляемую фирмой Illumina в составе пакета BaseSpace (<https://basespace.illumina.com>).

Оценку качества прочтений и тримминг некачественных оснований проводили в программах FastQC и Trimmomatic соответственно. Анализ регионов V3–V4 проводили в программе qiime2 в соответствии со следующими этапами:

- 1) Импорт данных в типе «SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]» в метаданные;
- 2) Удаление шумов из прочтений с использованием утилиты dada2;
- 3) Классификация прочтения с использованием утилиты classify-sklearn и использованием предварительно обученного байесов-

ского классификатора методами машинного обучения;

4) Расчет и нормализация метрик альфа- и бета-разнообразия, понижение размерности с использованием векторов Шеннона.

При анализе данных учитывались основные параметры пациентов, также загруженные как файл с метаданными в tsv формате. Финальная версия пайплайна размещена по ссыл-

ке [https://github.com/IGC-bioinf/metagenome\\_scripts/blob/main/qiime2.sh](https://github.com/IGC-bioinf/metagenome_scripts/blob/main/qiime2.sh).

### Результаты и обсуждение

Количество прочтений в образцах библиотек составляло от 56 365 до 849 731 (табл. 1). После процедуры очистки шумов и классификации прочтений было процессировано от 32 522 до 582 484 прочтений.

Таблица 1

Характеристика исследованных образцов микробиома пациентов с наиболее часто встречающимися семействами

Шифр образца	Возраст	Число прочтений	% прочтений, семейство <i>Ruminococcaceae</i>	% прочтений, семейство <i>Verrucomicrobiaceae</i>
563_S9	74	525 719	26,03	48,38
20_S8	76	46 116	10,48	0,39
21_S9	77	49 491	24,64	24,91
22_S10	77	25 180	46,53	26,29
560_S11	77	304 894	52,35	6,61
561_S6	77	375 934	31,44	0,9
564_S10	77	543 014	22,51	61,83
568_S15	77	207 094	33,34	13,21
15_S3	78	36 507	16,84	0,0
556_S7	78	261 675	59,63	0,07
559_S14	78	334 893	46,12	0,03
17_S5	79	39 290	46,09	0,18
558_S13	79	227 356	32,55	32,39
18_S6	81	37 935	50,06	3,37
2_S17	82	295 285	40,62	0,05
562_S8	82	398 923	57,48	0,17
19_S7	83	69 325	26,11	0,0
3_S18	83	250 627	46,22	15,79
557_S12	86	356 297	13,09	58,07
16_S4	87	41 176	28,54	2,3
1_S16	89	280 259	37,68	32,59
5_S20	90	359 184	29,08	1,25
4_S19	93	151 390	35,84	17,03

Наиболее представленные компоненты в исследованных образцах микробиома включали представителей семейств *Ruminococcaceae* и *Verrucomicrobiaceae* (табл. 1). В некоторых образцах к представителям одного семейства (*Ruminococcaceae*, *Verrucomicrobiaceae*) отно-

силось более 50 процентов детектированных прочтений (рис. 1а, б). При иерархической кластеризации образцов был выделен кластер, включающий образцы, которые имели доминирующие виды бактерий рода *Akkermansia* (от 5,89 до 52,86%).

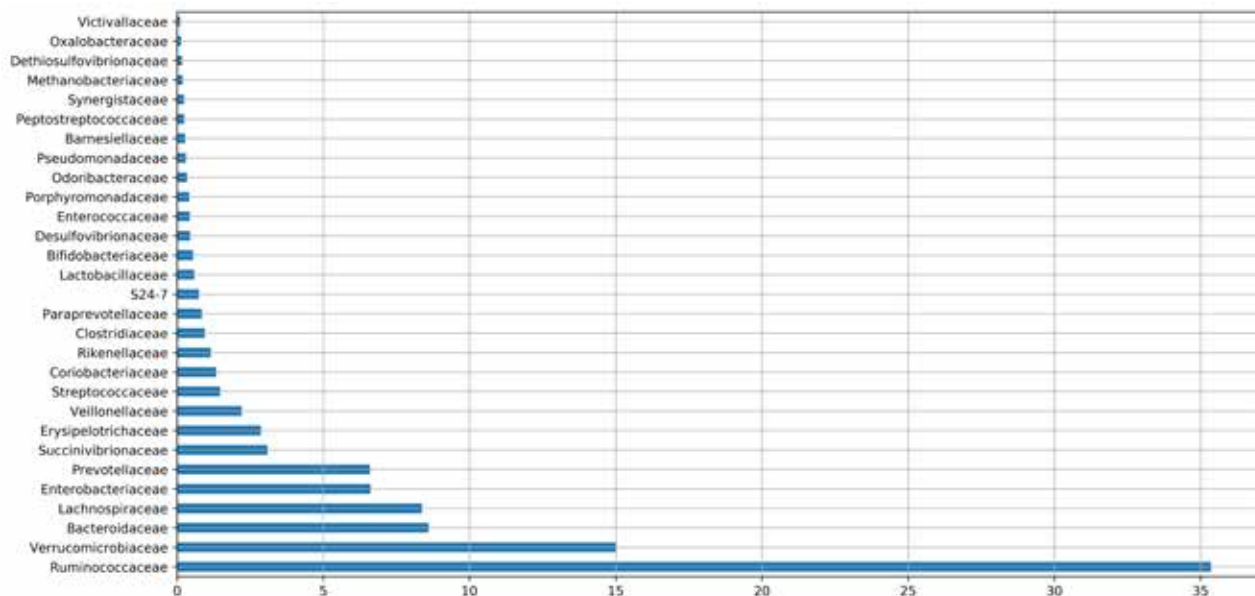


Рис. 1 а. Процентное содержание прочтений бактерий различных семейств в образцах библиотек

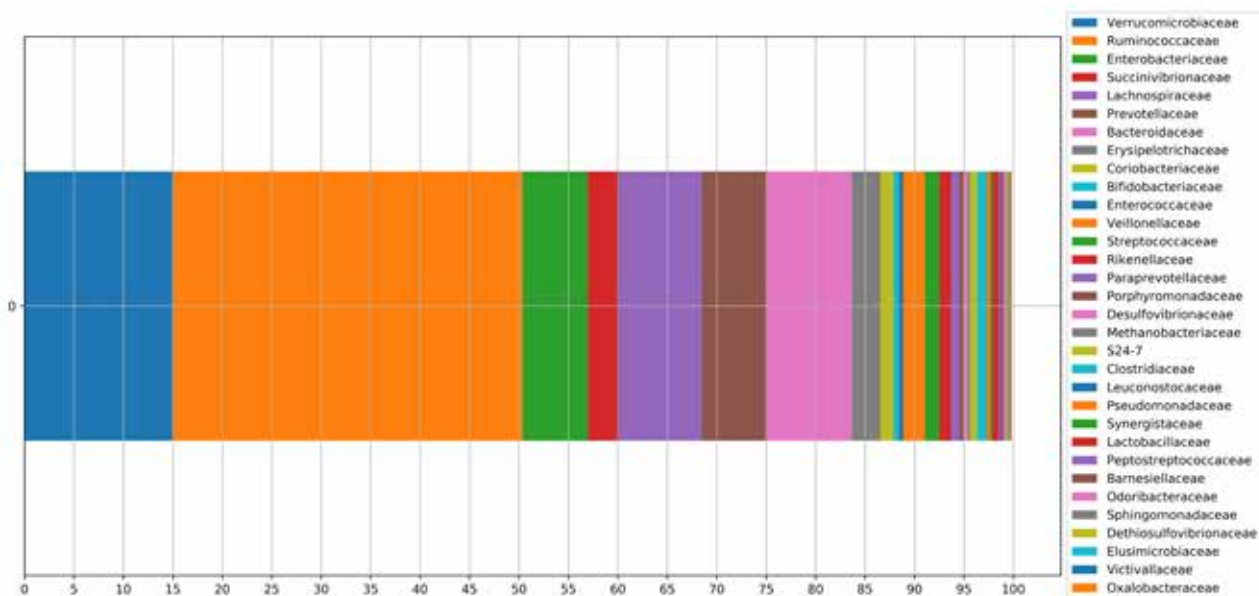
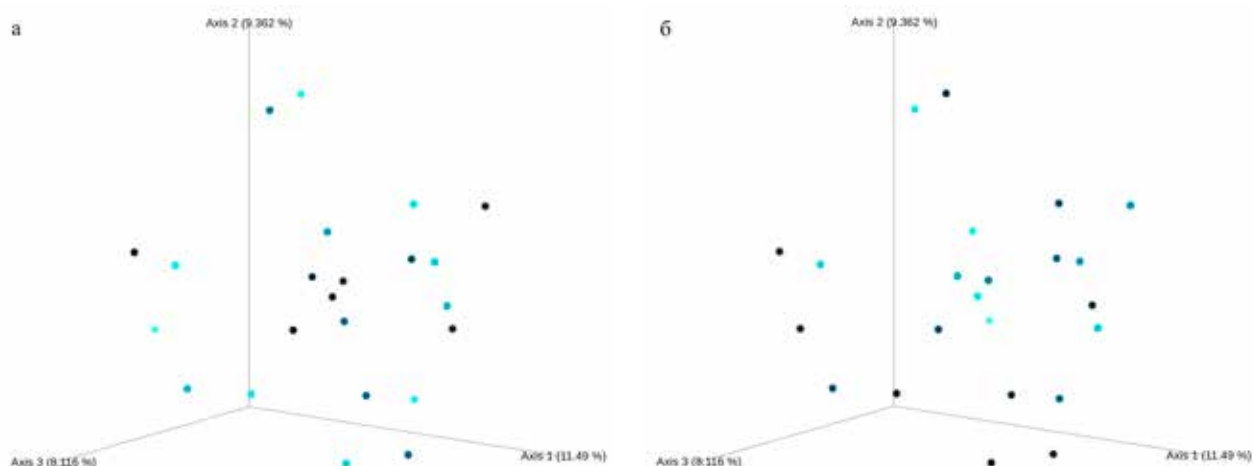


Рис. 1 б. Процентное содержание прочтений бактерий различных семейств в среднем по библиотекам

При понижении размерности с использованием несходства Брея-Кертиса была выделена тенденция кластеризации образцов людей в возрасте старше 82 лет, а также была отмечена высокая степень расхождения среди остальных образцов (рис. 2а). Полученные

результаты свидетельствуют о более однородном составе микробиома у людей старше 80 лет. При использовании аналогичного анализа кластеризации образцов в соответствии с индексом массы тела выявлено не было (рис. 2б).

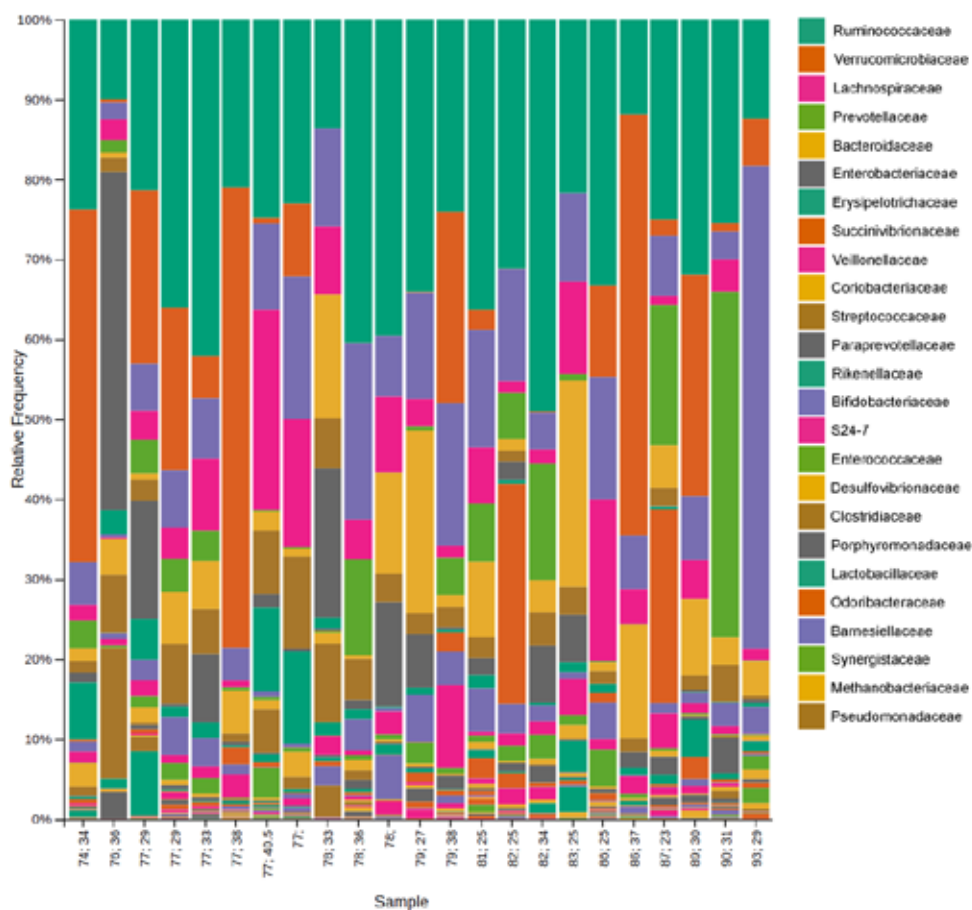
Далее был проведен анализ процентно-



**Рис. 2.** Кластеризация образцов с покраской по возрасту (а), и по индексу массы тела пациента (б)  
Более темный тон точки указывает на более высокое значение возраста/индекса массы тела

го соотношения разнообразия микробиома для каждого пациента (рис. 3). Было выявлено, что с увеличением возраста пациента уменьшается количество бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, а также наблю-

дается тенденция к уменьшению количества бактерий семейства *Erysipelotrichaceae*. Процентное соотношение встречаемости в исследованных образцах представителей семейства *Ruminococcaceae* не отличалось у пациентов



**Рис. 3.** Процентное соотношение бактерий в микробиоме пациентов. Подписи на оси ординат в формате «возраст; индекс массы тела»

разного возраста. Однако можно отметить, что наблюдается повышенное содержание бактерий семейства *Bifidobacteriaceae* в метагеноме наиболее пожилой пациентки.

В нашем исследовании показано, что у людей старше 80 лет состав микробиома более однороден, чем у людей младше 80 лет. Кроме того, необходимо подчеркнуть наличие кластера образцов, которые имели доминирующие виды бактерий рода *Akkermansia* (от 5,89 до 52,86%). Схожие результаты были также получены и другими исследователями. Результаты многочисленных исследований показывают, что представленность таксонов (*Verrucomicrobia*, *Akkermansia*, *Christensenellaceae*), для которых доказана ассоциация со здоровьем, повышена у пожилых людей [20–22]. *Akkermansia* был наиболее часто упоминаемым родом в рассмотренных исследованиях [22, 23]. *Akkermansia muciniphila* является одним из немногих известных видов филума *Verrucomicrobia*, и этот вид известен своей способностью разлагать муцин и способствовать целостности кишечника за счет снижения уровня токсичности, связанного с диетой с высоким содержанием жиров [24, 25]. Эти данные свидетельствуют о том, что *Verrucomicrobia* и *Akkermansia* могут способствовать гомеостазу кишечника и здоровому старению.

### Заключение

Таким образом, наиболее стабильные компоненты в исследованных образцах микробиома людей старшей возрастной группы включали представителей семейств *Ruminococcaceae* и *Verrucomicrobiaceae*. Было выявлено, что с увеличением возраста участников исследования уменьшается количество бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, а также наблюдается тенденция к уменьшению количества бактерий семейства *Erysipelotrichaceae*. Дальнейшие исследования будут продолжены в направлении изучения взаимодействия генома самого человека и микробиома его желудочно-кишечного тракта для выявления маркеров, ассоциированных со старением и продолжительностью жизни.

### Список использованных источников

1. Национальный статистический комитет

Республики Беларусь, [Электронный ресурс]. – 2018. – Режим доступа: [http://www.belstat.gov.by/ofitsialnaya-statistika/solialnaya-sfera/demografiya\\_2/](http://www.belstat.gov.by/ofitsialnaya-statistika/solialnaya-sfera/demografiya_2/). – Дата доступа: 12.01.2019.

2. Vaupel, J. W. Biodemography of human ageing / J. W. Vaupel // *Nature*. – 2010. – Vol. 464. – P. 536–542.

3. The critical need to promote research of aging and aging-related diseases to improve health and longevity of the elderly population / K. Jin [et. al.] // *Aging Disease*. – 2015. – Vol. 6. – P. 1–5.

4. International Society on Aging and Disease (ISOAD) [Электронный ресурс]. – 2018. – Режим доступа: <http://isoad.org/>. – Дата доступа: 09.03.2022.

5. Геномика старения и предиктивная медицина / В. С. Баранов, О. С. Глотов, Е. В. Баранова // *Успехи геронтологии*. – 2010. – Т. 23. № 3. – С. 329–338.

6. Баранов В. С., Баранова Е. В. Генетические аспекты старения // *Успехи геронтол.* – 2007. – Т. 20, № 2. – С. 26–34.

7. The transcriptional profile of aging in the human kidney / E. Graham [et.al.] // *PLoS Biology*. – 2004. – Vol. 2, № 12. – P. 1–23.

8. Chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty / L. Ferrucci // *Nat. Rev. Cardiol.* – 2018. – Vol. 15. – P. 505–522.

9. Gorelick, P. B. Role of inflammation in cognitive impairment: Results of observational epidemiological studies and clinical trials / P. B. Gorelick // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2010. – Vol. 1207. – P. 155–162.

10. Аверина, О. В., Даниленко, В. Н. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы // *Микробиология*. – 2017. – Т. 86, № 1. – С. 5–24.

11. Honda, K. The Microbiome in Infectious Disease and Inflammation / K. Honda, D.R. Littman // *Annu. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 759–795.

12. Cryan, J. F. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behavior / J. F. Cryan, T. G. Dinan // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2012. – Vol. 13. – P. 701–712.

13. Zapata, H. J. The Microbiota and Microbiome in Aging: Potential Implications in Health and Age-Related Diseases / H. J. Zapata, V. J. Quagliarello // *J. Am. Geriatr. Soc.* – 2015. – Vol. 63. – P. 776–781.

14. Human gut microbiome viewed across age

- and geography / T. Yatsunenکو [et.al.] // Nature. – 2012. – Vol. 486. – P. 222–227.
15. Gut microbiota changes in the extreme decades of human life: A focus on centenarians / A. Santoro [et.al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2018. – Vol. 75. – P. 129–148.
16. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly / M. J. Claesson [et.al.] // Nature. – 2012. – Vol. 488. – P. 178–184.
17. The Gut Microbiome, Aging, and Longevity: A Systematic Review / V. D. Badal [et.al.] // Nutrients. – 2020. – Vol. 12, № 12. – P. 3 759.
18. Electronic resource. – Mode of access: <https://basespace.illumina.com>. – Date of access: 10.03.2022.
19. Electronic resource. – Mode of access: [https://github.com/IGC-bioinf/metagenome\\_scripts/blob/main/qiime2.sh](https://github.com/IGC-bioinf/metagenome_scripts/blob/main/qiime2.sh). – Date of access: 10.03.2022.
20. Walters, W. A. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD / W. A. Walters, Z. Xu, R. Knight // FEBS Lett. – 2014. – Vol. 588. – P. 4223–4233.
21. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study / T. Odamaki [et.al.] // BMC Microbiol. – 2016. – Vol. 16. – P. 90.
22. Gut microbiota and extreme longevity / E. Biagi [et.al.] // Curr. Biol. – 2016. – Vol. 26. – P. 1480–1485.
23. Gastro-intestinal and oral microbiome signatures associated with healthy aging / H. Singh [et.al.] // GeroScience. – 2019. – Vol. 41. – P. 907–921.
24. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity / A. Everard [et.al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – Vol. 110. – P. 9 066–9 071.
25. Function of Akkermansia muciniphila in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems / Y. Xu [et.al.] // Front. Microbiol. – 2020. – Vol. 11.

I. N. Andreeva<sup>1</sup>, R. S. Shulinski<sup>1</sup>, A. P. Mikhaleuka<sup>1</sup>, A. V. Bajda<sup>2</sup>, N. B. Kuzniatsova<sup>2</sup>,  
A. V. Kilchevsky<sup>1</sup>

## STUDYING THE GUT MICROBIOME IN PEOPLE OVER 60

<sup>1</sup>State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education

3/3 P. Brovka St., 220013 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: irishka14790@mail.ru

Aging is determined by the complex interaction between genetic and environmental factors. A growing body of evidence suggests that the gut microbiome determines many age-related changes, including immune system dysregulation and disease susceptibility. This paper analyzes the characteristics of the gut microbiome in 23 people of an elderly group living in Belarus. The genetic analysis of biological material was carried out by metagenomic analysis using the high-throughput sequencing technology from Illumina. The most demonstrated components in the studied microbiome samples included *Ruminococcaceae* and *Verrucomicrobiaceae* representatives. In the study group, it was found that with aging, the number of bacteria of the *Enterobacteriaceae* family decreases in a patient, and there is also a tendency to a decrease in the number of bacteria of the *Erysipelotrichaceae* family.

**Keywords:** longevity, aging, lifespan, gut microbiome, metagenomic analysis.

Дата поступления в редакцию: 11 марта 2022 г.

Е. Л. Романишко, А. И. Киреева, М. Е. Михайлова, Р. И. Шейко

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА RS17872000 В ГЕНАХ КАЛЬПАИНА (*CAPNI*) И RS109221039 КАЛЬПАСТАТИНА (*CAST*) У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЯСНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ

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

Аллельные варианты однонуклеотидных полиморфизмов генов *CAPNI* и *CAST* крупного рогатого скота ассоциированы с «мраморностью» и «нежностью» мяса. Методами KASP и ПЦР-РВ были исследованы SNP в гене *CAPNI* (rs17872000) и гене *CAST* (rs109221039) у КРС мясных пород, разводимых в Республике Беларусь. Анализ генетической структуры исследуемых выборок из популяций КРС по гену *CAPNI* показал, что частота встречаемости предпочтительного аллеля С, ассоциированного с «мраморностью», у КРС абердин-ангусской породы составила 34,3%, у породы лимузин — 14,3%, у породы геррефорд — 13,9%. Частота встречаемости предпочтительного аллеля А (*CAST*), обуславливающего повышенную «нежность» мяса, составила у абердин-ангусской породы 87,1 %, лимузинской — 75,5 %, и геррефорд — 77,8 %. Использование генетических маркеров в качестве важного дополнительного критерия в селекции скота мясного направления в сочетании с основными зоотехническими методами позволит улучшить показатели мясной продуктивности.

**Ключевые слова:** ДНК-тестирование, *CAST*, *CAPNI*, SNP, КРС, KASP, ПЦР-РВ, мясные качества, мраморность, нежность.

### Введение

В настоящее время в Республике Беларусь животноводство развивается как в молочном, так и мясном направлении. Развитие мясного скотоводства предусматривает не только увеличение объемов производства мяса, но и улучшение его органолептических качеств. Получение высококачественного мяса зависит от таких факторов, как геном животных, условия содержания и кормления. В хозяйствах Республики Беларусь 89% крупного рогатого скота (КРС) составляют животные молочно-мясного направления продуктивности. Основными породами мясного направления продуктивности являются: лимузинская, геррефордская, абердин-ангусская и шароле. По состоянию на 2021 г. в республике было более 7,5 тыс. голов чистопородных коров, в том числе 3,4 тыс. голов абердин-ангусского скота, 3,4 тыс. голов лимузинской породы, около 2 тыс. голов геррефордской породы и 147 животных породы шароле. Всего в мясном скотоводстве задействовано около 60,0 тыс. голов скота. В стра-

не созданы 25 хозяйств, специализирующихся на разведении мясного скота. Создано семь селекционно-генетических центров по разведению племенного скота мясного направления и производству племенной продукции (материала). Основная масса мяса КРС в стране производится путем скрещивания молочного скота с быками специализированных мясных пород [1–3].

Развитие отрасли животноводства связано с увеличением потребительского спроса на качественную говядину. Одними из важнейших потребительских свойств мясной продукции КРС являются органолептические качества мяса: вкус, запах, нежность, мраморность и сочность. «Нежность» мяса — это хозяйственно полезный признак, который можно определить, как степень жесткости мышечных волокон, которая измеряется по усилию сдвига Уорнера Братцлера (WBSF, кг). Нежность мяса зависит от множества факторов: содержание в мышцах соединительной ткани, возраст и пол животного, методы техно-



логической обработки, а также генетических факторов. После убоя животных гликоген переходит в молочную кислоту, которая при достаточно длительном воздействии размягчает соединительную ткань. С возрастом в мясе животных снижается содержание влаги и повышается содержание жира, изменяется белковый качественный показатель, увеличивается количество соединительных белков. В соединительной ткани взрослых животных увеличивается содержание эластина, а коллагеновые волокна обладают значительно большей жесткостью. Мышечные белки подвергаются различной степени денатурации и протеолиза [4–7]. Широкий спектр клеточных процессов в тканях млекопитающих регулирует кальпаин — кальпастинавая (CAPN-CAST) система, которая включает кальций-зависимые протеиназы  $\mu$ - и  $m$ -кальпаины и их ингибитор — кальпастин. CAPN-CAST система оказывает влияние на различные процессы, протекающие в скелетной мускулатуре, играет значительную роль в регуляции катаболизма и анаболизма белков, развитии и распаде мускулатуры, органогенезисе, клеточном цикле, движении мышечных волокон и смерти клеток. Кальций-зависимая протеиназа кальпаин первого типа и ее ингибитор кальпастин, кодируемые генами *CAPN1* и *CAST*, соответственно, играют ключевую роль в естественной тендеризации мяса, изменяя мышечные волокна в послеубойный период. Показано, что некоторые аллельные варианты генов *CAPN1* и *CAST* ассоциированы с более нежным мясом КРС [8–10].

Ген *CAPN1* — кодирует каталитическую субъединицу 80 кДа  $\mu$ -кальпаина, которая относится к семейству нелизосомальных внутриклеточных цистеиновых кальций-зависимых протеиназ. Кальпаин — протеолитический фермент, который участвует в частичном разрушении мышечных волокон в процессе созревания мяса в послеубойный период. Данный процесс происходит за счет декомпозиции Z-дисков скелетной мускулатуры и ослабления связей между мышечными волокнами, что создает условия для равномерного распределения внутримышечного жира между волокнами и обеспечивает нежность и сочность мяса, его «мраморность» [9–12]. *CAPN1* — состоит из 22 экзонов, имеет размер около 30 т. н. п.

и расположен на 29 хромосоме [13]. В кодирующей части гена выявлена несинонимическая нуклеотидная замена  $g.43405875C > G$ , приводящая к замене в аминокислотной последовательности глицина на аланин в положении 316 (rs17872000). Желательной аллельной формой, обеспечивающей получение мяса повышенной нежности, является С316. Гомозиготные животные по этому аллелю представляют большой интерес для селекции на мясность. Животные с мутацией в локусе гена *CAPN1*, которая приводит к аминокислотной замене глицина на аланин, имеют более высокую нежность мяса, по сравнению с животными-носителями глицинового аллеля (>30%) [12–14].

Ген *CAST* — кодирует важнейший белок-регулятор кальпаиновой системы кальпастина, который ингибирует протеолитическую активность  $\mu$ - и  $m$ -кальпаинов, предотвращая их связывание с мембранами, тем самым регулируя посмертный протеолиз мяса после убоя [13–15]. После прекращения кровообращения нарушается поступление кислорода в мышечные волокна. С этого момента в мясе запускаются метаболические процессы при анаэробных условиях, снижающие уровень АТФ в мышечных клетках. Формирование в этих условиях в мышечной ткани поперечных мостиков актомиозина приводит к увеличению плотности мяса. Затем наступает стадия естественной тендеризации мяса и увеличение его нежности [16]. Эффективность естественной тендеризации зависит от постубойного протеолиза мышечных волокон. *CAST* — состоит из 35 экзонов, имеет размер около 149 т. н. п. расположен на 7 хромосоме [17]. В некодирующей части гена (3'UTR) выявлен однонуклеотидный полиморфизм, характеризующийся заменой аденина на гуанин в  $g.96165561A > G$  (rs109221039). Согласно исследованию Barendse, предпочтительным является генотип AA, ассоциированный с «нежностью» мяса. Гетерозиготные животные, имеющие два аллеля A и G в гене *CAST*, не показали значимых отличий в нежности мяса [16, 18–19].

Обеспечение населения качественными мясными продуктами является одной из главных задач продовольственной безопасности страны. Благодаря грамотному проведению селекционных мероприятий достигнуты значи-

тельные результаты в мясном животноводстве. Однако эта отрасль еще не вышла на рентабельность производства, что требует поиска и внедрения новых технологий для повышения эффективности отрасли [20, 21]. Включение молекулярно-генетических исследований в селекционные программы рекомендовано для повышения их эффективности. Поэтому цель работы заключалась в разработке методов идентификации полиморфных вариантов (SNP) 471A > G (*CAST*) и 947C > G (*CAPN1*) с целью отбора животных с предпочтительными генотипами в выборках КРС мясного направления продуктивности.

### Материалы и методы

В качестве объекта исследования был использован крупный рогатый скот мясного направления продуктивности. Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из биологического материала — цельной крови, проб ткани (ушной выщип) и спермы. Вы-

деление ДНК проводили набором реагентов «Нуклеосорб» («Праймтех», Беларусь).

Количество выделенной ДНК определяли с помощью флуориметра DeNovix DS 11 FS с использованием набора реагентов для измерения концентрации ДНК DeNovix dsDNA Broad Range Kit (DeNovix, США).

Для идентификации полиморфизма rs109221039 (A/G) *CAST\_2959* в гене кальпастатина (*CAST*) и rs17872000 (C/G) *CAPN1\_316* в гене  $\mu$ -кальпаина (*CAPN1*) у крупного рогатого скота мясного направления продуктивности были использованы следующие методы: метод конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP), метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием аллель-специфичных TagMan зондов (табл. 1).

*ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция в реальном времени)*

ПЦР-РВ проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). ПЦР в объеме 20 мкл реакционной

**Таблица 1**

Описание полиморфизмов, ассоциированных с органолептическими качествами мяса у КРС мясного направления продуктивности и методов их идентификации

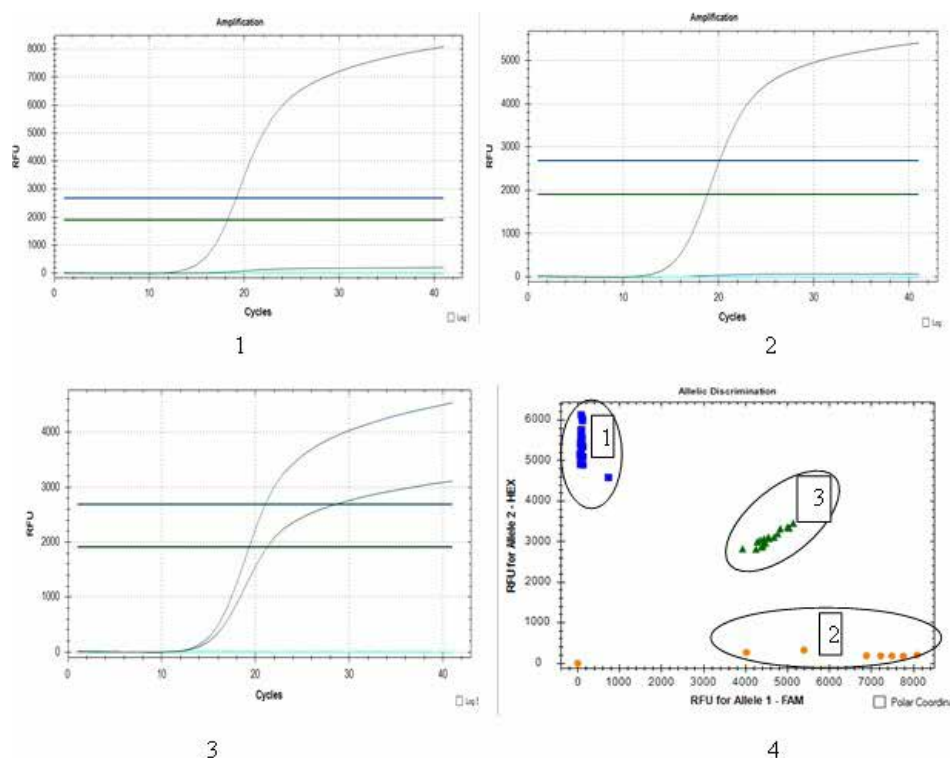
Ген	Хромосома	Локализация	Полиморфизм (SNP)	Тип мутации	Метод
<i>CAPN1</i>	29	43405875	rs17872000	947C > G (316) (Ala316Gly)	ПЦР-РВ/ KASP
<i>CAST</i>	7	96165561	rs109221039	471A > G (2959)	KASP

смеси, содержала: 10 мкл реакционной смеси, 10 мкл разбавителя, 0,5 мкл ДНК полимеразы и 10 нг геномной ДНК (Синтол, Россия). Программа амплификации: 95 °C — 2 мин; 95 °C — 20 сек; 63 °C — 40 сек (40 циклов). При каждой постановке ПЦР-РВ наряду с исследуемыми образцами амплифицировали положительные контрольные образцы (ПКО1, ПКО2, ПКО3), и отрицательный контрольный образец (ОКО). Анализ и учет полученных результатов ПЦР по гену *CAPN1* (рис. 1) осуществляли с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro 3.1.

*Конкурентная аллель-специфическая ПЦР*  
Конкурентную аллель-специфическую ПЦР

(KASP, Kompetitive Allele Specific PCR) проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь для проведения ПЦР (10 мкл) содержала:  $\times 2$  KASP Мастер Микс, смесь специфических праймеров (KASP Assay mix), деионизированную MQ-H<sub>2</sub>O и 10 нг геномной ДНК.

Полимеразную цепную реакцию проводили по программе: 94 °C — 15 мин; 94 °C — 20 сек; 60 °C — 1 мин (со снижением каждого цикла на 0,6 °C) — 10 циклов; 94 °C — 20 сек; 55 °C — 60 сек (26 циклов). Анализ и учет полученных результатов ПЦР осуществляли с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro.



**Рис. 1.** Выявление полиморфизма 947C > G в гене *CAPN1* методом ПЦР-РВ: 1 — животное с генотипом CC (FAM), 2 — животное с генотипом GG (R6G), 3 — животное с гетерозиготным генотипом CG (R6G/FAM), 4 — аллельная дискриминация

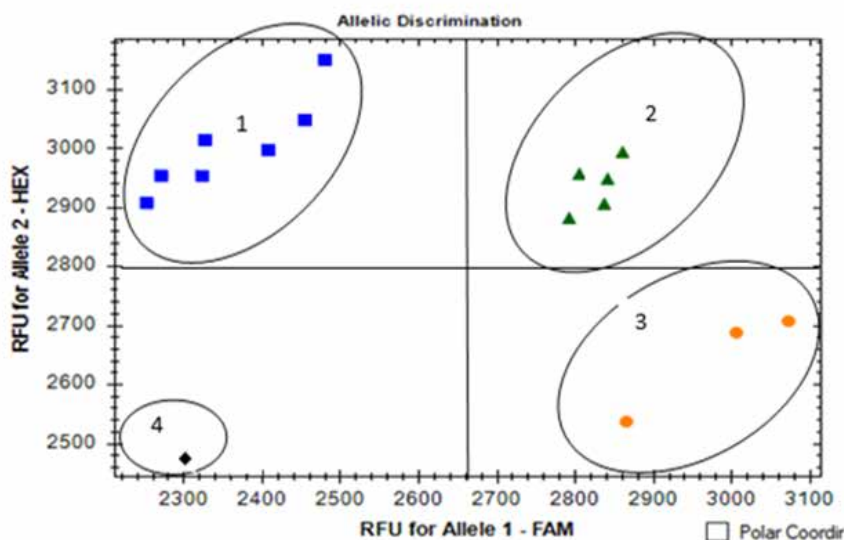
Дуаллельная дискриминация достигается за счет конкурентного связывания двух аллель-специфических прямых праймеров. Дискриминацию аллелей для определения генотипов проводили по значениям RFU (относительные единицы флуоресценции) для каналов FAM и HEX (табл. 2; рис. 2, 3).

Проведение ПЦР в режиме реального времени с использованием как технологии KASP, так и TaqMan ПЦР-РВ позволяет значительно сократить время проведения анализа, что выгодно отличает эти технологии от ПЦР-ПДРФ анализа.

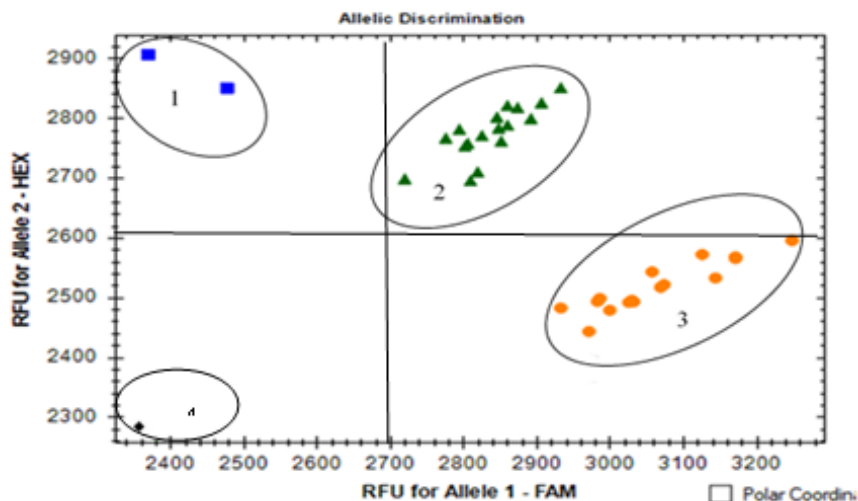
**Таблица 2**

Последовательность нуклеотидов исследуемых локусов генов *CAPN1* и *CAST*

Ген	Поли-морфизм (SNP)	Последовательность ДНК	FAM Аллель	HEX Аллель
<i>CAPN1</i>	rs17872000	GAGGCTGGGCAGGTCAGTGGCCGCCAGCCCCTGGCAGT-GCCGTTTTCTACAGCTCCTCGGAGTGAACG[C/G]CGTG-GACCCTTACATGCGGGAGCAGCTCCGGGTCAAGATGGAG-GATGGGGAGTTCTGGTGAGCAGCCCCCTCCTC	C	G
<i>CAST</i>	rs109221039	TTGGAAAACGATGCCTCACGTGTTCTTTCAGTGTTC-TGATTTCTCATGACCCCTTTCCTCTT[A/G]GACTTGTGGACT-GTGTGTTGATGTTTCTTTGGGTTGTTGTTTATAAGTCAG	A	G



**Рис. 2.** Дискриминация аллелей однонуклеотидного полиморфизма 947C > G в гене *CAPNI* с использованием технологии KASP-генотипирования: 1 кластер — животные с генотипом GG; 2 кластер — животные с генотипом CG; 3 кластер — животные с генотипом CC, которые представляют интерес для селекции; 4 — контроль без матрицы (NTC)



**Рис. 3.** Дискриминация аллелей однонуклеотидного полиморфизма 471A > G в гене *CAST* с использованием технологии KASP-генотипирования: 1 кластер — животные с генотипом GG; 2 кластер — животные с генотипом AG; 3 кластер — животные с предпочтительным генотипом AA; 4 — контроль без матрицы (NTC)

### Результаты исследования

В качестве объекта исследования был использован крупный рогатый скот мясного направления продуктивности ( $n = 102$ ) следующих пород: лимузинская ( $n = 49$  гол.), герфордская ( $n = 18$  гол.), абердин-ангусская ( $n = 35$  гол.) из животноводческих хозяйств Республики Беларусь. Оценена частота аллелей и генотипов исследуемых полиморфных

вариантов генов в выборке племенных животных различных пород КРС, разводимых в Республике Беларусь (табл. 3).

Анализ генетической структуры в исследуемых выборках из популяций крупного рогатого скота по гену *CAPNI* показал, что частота встречаемости предпочтительного аллеля С, улучшающего качественные показатели мяса («мраморность»), у КРС абердин-ангус-

Таблица 3

Частоты аллелей и генотипов исследуемых полиморфных вариантов генов *CAPNI* и *CAST*

Ген	Порода	Всего	Частота встречаемости генотипов, %						Частота аллелей, $\pm S_q$	
			n	CC	n	CG	n	GG	C	G
<i>CAPNI</i>	Герефордская	18	0	–	5	27,8	13	72,2	0,139 $\pm$ 0,058	0,861 $\pm$ 0,058
	Абердин-ангусская	35	6	17,1	12	34,3	17	48,6	0,343 $\pm$ 0,057	0,657 $\pm$ 0,057
	Лимузинская	49	1	2,0	12	24,5	36	73,5	0,143 $\pm$ 0,035	0,857 $\pm$ 0,035
			n	AA	n	AG	n	GG	A	G
<i>CAST</i>	Герефордская	18	10	55,6	8	44,4	0	–	0,778 $\pm$ 0,069	0,222 $\pm$ 0,069
	Абердин-ангусская	35	26	74,3	9	25,7	0	–	0,871 $\pm$ 0,04	0,129 $\pm$ 0,04
	Лимузинская	49	28	57,1	18	36,7	3	6,1	0,755 $\pm$ 0,043	0,245 $\pm$ 0,043

ской породы составила 34,3%, у породы лимузин — 14,3%, у породы герефорд — 13,9%. Частота встречаемости животных с желательной аллельной формой в гомозиготе (генотип CC) составляет у абердин-ангусской породы — 17,1%, у лимузинов — 2%. В исследованной выборке КРС герефордской породы животных с предпочтительным генотипом CC не выявлено. Полученные нами данные отличаются от литературных, так, в исследовании Dzhulamanov с соавторами частота встречаемости животных с генотипом CC в российской популяции герефордов составляет 7,9% [22]. В Бразильской популяции КРС помеси Ангус  $\times$  Герефорд частота предпочтительного аллеля C гена *CAPNI* составила от 27 до 46%, в помесной популяции Лимузин  $\times$  Герефорд  $\times$  Ангус — 29% [23].

Согласно литературным данным, при анализе казахской белоголовой породы ( $n = 39$ ) 10,3% имели желательную форму аллеля (CC), а 2,6% составляли гетерозиготы GC. Анализ проб животных калмыцкой породы ( $n = 122$ ) показал большую частоту желательного генотипа CC — 19,67%. Частота животных с генотипом CC у каргалинского мясного типа

( $n = 52$ ) составила 17,31%. Таким образом, у животных калмыцкой породы частота желательного генотипа CC выше, чем у аналогов казахской белоголовой породы на 9,41%, а по сравнению с каргалинским мясным типом — на 2,36%. Превосходство животных каргалинского мясного типа над казахскими белоголовыми составило 7,05% [18].

Анализ генетической структуры исследуемых выборок из популяций крупного рогатого скота по гену *CAST* показал, что частота предпочтительного аллеля A, улучшающего качественные показатели мяса («нежность»), у КРС абердин-ангусской породы составила 87,1%, у породы лимузинская — 75,5%, у породы герефорд — 77,8%. Частота встречаемости предпочтительного генотипа AA, обуславливающего повышенную «нежность» мяса крупного рогатого скота, выше у абердин-ангусской породы (74,3%), по сравнению с лимузинами и герефордами — 57,1% и 55,6% соответственно. Полученные нами данные соотносятся с литературными данными. В исследовании Morris с соавторами в популяции *M. longissimus dorsi*, полученной путем скрещивания пород джерсейской  $\times$  лимузинской,

ангусской и герефордской частота предпочтительного аллеля А гена *CAST* варьировала от 84% до 99,5% [25].

Многочисленные исследования показали связь однонуклеотидных полиморфизмов генов *CAPNI* и *CAST* с «нежностью» мяса у разных пород [9, 23–28]. Исследования Gill с соавторами показали, что полиморфизм rs17872000 гена *CAPNI* у абердин-ангусского скота был в значительной степени связан с «нежностью» мяса, измеренной как с помощью тендерометра, так и с помощью «панели вкуса», а также весом задней четверти туши. Животные, наследующие генотип СС, имели более нежное мясо и более тяжелую заднюю часть [26]. В исследовании Casas с соавторами в популяции GPE7, в которую входили помеси пород герефордская, ангусская, лимузинская, шароле, гельбви и симментальской ( $n = 539$ ) оценивали такие признаки, как «нежность» мяса, измеренная как усилие сдвига Уорнера-Братцлера (WBSF; кг) через 14 дней после убоя, и признаки сочности и интенсивности вкуса. Мясо животных, наследующих генотип СС по *CAPNI*, было более нежным, чем у животных с генотипом GG. Однонуклеотидный полиморфизм в гене *CAST* оказал значительное ( $P < 0,003$ ) влияние на WBSF и показатель нежности. Мясо животных, наследующих генотип ТТ гена *CAST*, было более нежным, чем у животных наследующих генотип СС [9]. Согласно исследованию Corva P. с соавторами, самое жесткое мясо связано с аллелем G в гене *CAPNI* [23].

Таким образом, исследование полиморфных вариантов генов *CAPNI* и *CAST* и анализ генетической структуры популяций КРС, позволяет определить частоту предпочтительных аллелей для MAS-селекции мясного скота с целью улучшения органолептических качеств мясной продукции.

### Заключение

В результате исследования выборок белорусских популяций крупного рогатого скота мясного направления продуктивности была показана частота встречаемости животных с предпочтительным генотипом СС (*CAPNI*), ассоциированным с «мраморностью» мяса, которая составила у абердин-ангусской породы — 17,1%, у лимузинов — 2%. В исследованной выборке герефордской породы животных с предпочтительным генотипом СС не было выявлено. Частота животных с предпочтительным генотипом АА (*CAST*), обуславливающим повышенную «нежность» мяса крупного рогатого скота выше у абердин-ангусской породы (74,3%), в сравнении с животными лимузинской и герефордской пород 57,1% и 55,6% соответственно. Использование разработанных методов генодиагностики крупного рогатого скота позволяет проводить идентификацию предпочтительных генотипов для производства более нежного мяса. Таким образом, увеличение частоты встречаемости предпочтительных аллелей С (*CAPNI*) и А (*CAST*) в популяции белорусского мясного скота путем подбора животных для селекции, будет способствовать улучшению органолептических качеств мясной продукции.

дованной выборке герефордской породы животных с предпочтительным генотипом СС не было выявлено. Частота животных с предпочтительным генотипом АА (*CAST*), обуславливающим повышенную «нежность» мяса крупного рогатого скота выше у абердин-ангусской породы (74,3%), в сравнении с животными лимузинской и герефордской пород 57,1% и 55,6% соответственно. Использование разработанных методов генодиагностики крупного рогатого скота позволяет проводить идентификацию предпочтительных генотипов для производства более нежного мяса. Таким образом, увеличение частоты встречаемости предпочтительных аллелей С (*CAPNI*) и А (*CAST*) в популяции белорусского мясного скота путем подбора животных для селекции, будет способствовать улучшению органолептических качеств мясной продукции.

### Список использованных источников

1. Пестис, М. В. Эффективность выращивания и откорма крупного рогатого скота в Гродненской области: монография / М. В. Пестис, Т. И. Еремеевич, П. В. Пестис. – Гродно: ГГАУ, 2011. – 163 с.
2. Обзор рынка мяса крупного рогатого скота государств — членов Евразийского экономического союза за 2013–2017 годы // Департамент агропромышленной политики Евразийской экономической комиссии Москва. – 2018.
3. Зоотехнические правила о порядке создания и использования генофондных стад, банков спермы и эмбрионов (в ред. постановления Минсельхозпрода от 23.11.2017 № 55). – Минск, 2017.
4. Романишко, Е. Л. Исследование полиморфизма С316G в гене кальпаина (*CAPNI*) крупного рогатого скота, ассоциированного с органолептическим качеством мяса / Е. Л. Романишко, А. И. Киреева, М. Е. Михайлова, и др. // Материалы IV Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». – Минск. – 2020. – С. 99.
5. Casas, E.; White, S. N.; Riley, et. all. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in the  $\mu$ -Calpain Gene in Spanish Maternal Beef Breeds / Casas, E.; White, S. N.; Riley, et. all. // *Animal Biotechnology*. – 2009. – Vol. 20. – Issue

3. – P. 161–164.
6. Barendse, W. J. DNA markers for meat tenderness. – 2002. – International patent publication WO 02/064820 A1.
7. Гизатова Н. В. Потребительские свойства говядины // Международный научный журнал «Символ науки». – 2015. – № 10. – С. 68.
8. Casas, E.; White, S. N.; Wheeler, T. L Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits / Casas, E.; White, S. N.; Wheeler, T. L. et al // Journal of Animal Science. – 2006. – № 84. – P. 520–525.
9. Casas E., White S. N., Riley D. G., T. P. L. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle / Casas E., S. N. White, D. G. Riley, T. P. L. et al // Journal of Animal Science. – 2005. – Vol. 83. – Issue 1. – P. 13–19.
10. Curi, R. A.; Chardulo, L. A. L.; Silveira, A. C. 2008. Alternative genotyping method for the single nucleotide polymorphism A2959G (AF159246) of the bovine *CAST* gene / Curi, R. A.; Chardulo, L. A. L.; Silveira, A. C. et al // Pesquisa Agropecuária Brasileira. – 2008. – № 3. – P. 657–659.
11. Колобынина К. Г., Соловьева В. В., Слепак В. З. Роль EF-HAND  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  — связывающего белка тескалина в процессах пролиферации и дифференцировки клеток // Гены&Клетки. – 2015. – Том X. – № 1. – С. 28–34.
12. Barendse, W. J. DNA markers for meat tenderness. – 2002. – International patent publication WO 02/064820 A1.
13. Curi, R. A.; Chardulo, L. A. L.; Mason, M. C. Effect of single nucleotide polymorphisms of *CAPNI* and *CAST* genes on meat traits in Nelore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus* / Curi, R. A.; Chardulo, L. A. L.; Mason, M. C. et al // Animal Genetics. – 2009. – № 40. – P. 456–462.
14. Копилова К. В. Генетична структура різних порід великої рогатої худоби за молекулярно-генетичними маркерами / К. В. Копилова, А. В. Шельов, О. В. Березовський, К. В. Копилов, В. І. Россоха // Науково-технічний бюлетень. – 2013. – № 110. – С. 76–83.
15. Bruford M. W., Bradley, D. G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication / M. W. Bruford, D. G. Bradley // Nature Reviews Genetics. – 2003. – № 4. – P. 900–910.
16. McClure M. C. et al. Genome-wide association analysis for quantitative trait loci influencing Warner–Bratzler shear force in five taurine cattle breeds // Animal genetics. – 2012. – Т. 43. – С. 662–673.
17. Электронный ресурс: <https://www.ensembl.org/index.html>
18. Косян Д. Б., Использование метода ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по гену *CAPNI* с использованием генетических маркеров/ Косян Д. Б. и др // Вестник ОГУ. – 2012. – № 6 (142). – С. 26–30
19. Li X. et al. Association of polymorphisms at *DGAT1*, *leptin*, *SCD1*, *CAPNI* and *CAST* genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden // Meat science. – 2013. – Т. 94. – С. 153–158.
20. Пилипук А. В., Гусаков Г. В., Карпович Н. В. Свистун Продовольственная безопасность Республики Беларусь: достижения и перспективы / А. В. Пилипук, Г. В. Гусаков, Н. В. Карпович и др. // Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, agrarian series. – 2020. – vol. 58, no. 1. – P. 24–41.
21. Гизатова Н. В. Потребительские свойства говядины // Международный научный журнал «Символ науки». – 2015. – № 10. – С. 68.
22. Polymorphisms of *CAPNI*, *CAST*, *GDF5*, *TG5* and *GH* genes in Russian Hereford cattle / K. Dzhulamanov, N. Gerasimov, M. Dubovskova, et al // Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2019. – 25 (№ 2). – P. 375–379.
23. Association of *CAPNI* and *CAST* gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle / Pablo Corva, Liliana Soria, Alejandro Schor, et al // Genetics and Molecular Biology. – 2007. – № 30 (4). – P. 1 064–1 069.
24. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked *M. longissimus dorsi* steaks from Jersey  $\times$  Limousin, Angus and Hereford-cross cattle / C. A. Morris, N. G. Cullen, S. M. Hickey // Anim Genet. – 2006. – № 37(4). – P. 411–414.
25. A new single nucleotide polymorphism in *CAPNI* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent / White, S. N., Casas,

E., Wheeler, T. L., et al. // Journal of Animal Science. – 2005. – № 83(9).

26. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle / Gill, J. L., Bishop, S. C., McCorquodale, C., et al. // Genetics Selection Evolution. – 2009. – № 41 (36).

27. Validation of commercial DNA tests for

quantitative beef quality traits / Van Eenennaam A. L., Li J., Thallman R. M., Quaas et al. // Journal of Animal Science. – 2007. – 85 (4). – P. 891–900.

28. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPNI* for association with meat tenderness in cattle / Page B. T., Casas E., Heaton M. P., et al // Journal of Animal Science. – 2002. – 80(12). – P. 3 077–3 085.

**E. L. Ramanishka, A. I. Kireyeva, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko**

## **STUDY OF RS17872000 POLYMORPHISM IN CALPAIN (*CAPNI*) AND RS109221039 CALPASTATIN (*CAST*) GENES IN MEAT PRODUCTIVITY CATTLE**

State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: lenaramanishko@mail.ru

Allelic variants of single nucleotide *CAPNI* and *CAST* polymorphisms in cattle are associated with “marbling” and “tenderness” of meat. SNPs in *CAPNI* (rs17872000) and *CAST* (rs109221039) genes in beef cattle breeds being bred in the Republic of Belarus were studied using KASP and real-time PCR methods. Genetic structure analysis of studied samples from cattle populations by the *CAPNI* gene showed that the frequency of occurrence of the preferential C allele associated with “marbling” in Aberdeen Angus cattle was 34.3%, in the Limousine breed — 14.3%, and in the Hereford breed — 13.9%. The frequency of occurrence of the preferential A allele (*CAST*), which determines increased “tenderness” of meat, was 87.1% in the Aberdeen Angus breed, 75.5% in the Limousin, and 77.8% in the Hereford. The use of genetic markers as an important additional criterion in meat cattle breeding in combination with main zootechnical methods will allow improving meat productivity.

**Keywords:** DNA testing, *CAST*, *CAPNI*, SNP, cattle, KASP, PCR-R, meat qualities, marbling, tenderness.

*Дата поступления в редакцию: 09 марта 2022 г.*



Е. А. Фомина, А. Н. Заинчковская, О. Ю. Урбанович

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ BALB/c, CBA, C57BL/6, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

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

При помощи 10 STR-маркеров исследован генетический полиморфизм представителей инбредных линий мышей BALB/c, C57BL/6 и CBA. Среди 30 особей выявлено 36 различных аллелей. С использованием алгоритма программы Structure выявлено, что каждая линия мышей генетически дифференцирована от других линий, имеет свойственный ей профиль аллелей локусов микросателлитных последовательностей. Результаты исследования можно использовать для мониторинга чистоты инбредных линий мышей в ряду поколений.

**Ключевые слова:** выборка линии мышей, STR анализ, полиморфизм STR аллелей, линии BALB/c, CBA, C57BL/6.

### Введение

Инбредные линии мышей (*Mus musculus*) стали важным инструментом в решении множества научных задач. Этих лабораторных животных используют для проведения экспериментальных биологических и медицинских исследований в области онкологии, токсикологии, вирусологии, иммунологии, трансплантологии, физиологии, в доклинических испытаниях лекарственных средств и др. [1]. Развитие технологий создания трансгенных мышей, в том числе с применением систем CRISPR/Cas9, также требует наличия чистопородных инбредных линий [2].

Серьезной проблемой для успешного решения научных задач может быть неправильная идентификация и перекрестная контаминация линий лабораторных животных либо их клеточных линий [3]. Несоответствие лабораторных животных требуемым параметрам увеличивает риск публикаций недостоверных данных и результатов, в связи с чем некоторые научные журналы требуют, а другие только рекомендуют, аутентификацию линий мышей и их клеточных линий перед публикацией [4]. Научное сообщество поощряет прозрачность данных для повышения воспроизводимости и качества исследований [5].

Известно, что изменения в структуре генома у млекопитающих, включая мышь, встречаются достаточно часто [6]. Они могут быть причиной болезней и оказывать влияние на фенотипические признаки [7]. Однако до сих пор не всегда ясно, насколько варианты структуры генома многочисленны и важны в формировании фенотипической изменчивости [7].

Для того, чтобы осуществлять контроль за чистотой линий мышей, предлагается множество методов, включая молекулярные. Среди них методы секвенирования, различные варианты ПЦР анализа, SNP анализ и др. [8, 9]. Для линий клеток человека существуют проверенные методы [10], наборы и базы данных, доступные для тестирования внутривидовой идентичности. Для линий клеток, не относящихся к человеку, существуют проверенные методы межвидовой идентификации, такие как bar-кодирование ДНК и видоспецифический мультиплексный ПЦР анализ [11]. Предложен метод идентификации клеточных линий мышей, основанный на анализе STR (коротких tandemных повторов) аллелей, выявляемых методом мультиплексной ПЦР [12]. Он обеспечивает возможность получения уникального профиля STR для каждой тестируемой линии клеток мыши, включая

близкородственные. С его помощью показано, что клеточные линии несут консервативные аллели в определенных локусах, которые можно использовать для их идентификации на уровне штамма, что позволяет обнаруживать неверно идентифицированные клеточные линии [12]. Данный метод можно применить и для идентификации инбредных линий мышей. Он дешевле секвенирования и способен заменить SNP анализ для решения отдельных задач. Развитию методологии контроля чистоты линий мышей и клеточных линий уделяют большое внимание питомники лабораторных животных и другие научные центры (например, The Jackson Laboratory, ATCC (American Type Culture Collection), НЦБМТ ФМБА России и др.).

Исследование генетического разнообразия инбредных линий мышей, используемых в медико-биологических исследованиях в Республике Беларусь, ранее не проводилось. Не установлено, какие наборы маркеров позволяют эффективно их дифференцировать и идентифицировать, не разработаны регламенты методик, нет референсных баз данных. Вместе с тем такие исследования могут помочь поддерживать чистоту инбредных линий в ряду поколений.

Цель данного исследования — оценка генетического разнообразия особей инбредных мышей линий BALB/c, CBA, C57BL/6, используемых в медико-биологических исследованиях в Республике Беларусь. В исследовании

были использованы молекулярные маркеры STR-типа, разработанные для идентификации клеточных линий мышей [12].

### Материалы и методы

*Материал.* Образцы проб крови инбредных линий мышей BALB/c (5 самок и 5 самцов), C57BL/6 (5 самок и 5 самцов) и CBA (5 самок и 5 самцов) были предоставлены Институтом физиологии НАН Беларуси. Работа выполнялась в рамках договора № 06-15/2021 от 15.06.2021 г.

*Получение препаратов ДНК.* Выделение тотальной ДНК из крови осуществляли с использованием набора «Нуклеосорб В» (Праймтех, Республика Беларусь) согласно протоколу, рекомендованному производителем.

*Молекулярные маркеры, использованные при исследовании инбредных линий мышей.* Для изучения аллельного состава генотипов линий мышей было отобрано 10 STR-маркеров: 18-3, 12-1, 1-1, 11-2, 8-1, 1-2, 4-2, 5-5, 3-2 и 19-2, специфичных для генома мыши. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в таблице 1. Маркеры были сгруппированы в наборы по 5 пар праймеров с учетом сведений об их размерах. Праймеры синтезированы компанией ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

*Условия проведения реакции ПЦР.* Реакционная смесь для проведения ПЦР с конечным объемом 25 мкл имела следующий состав: 1 × ПЦР буфер без MgCl<sub>2</sub>, 1,5 мМ

Таблица 1

Характеристика праймеров, использованных для исследования STR-локусов

Название маркера	Последовательность праймеров 5'-3'	Флуоресцентная метка	Температура отжига (T <sub>m</sub> ), °C	Размер, п. н	Ссылка
18-3	F TCTTTCTCCTTTTGTGTCATGC R GCTAAATAACTAAGCAAGTGAACAGA	FAM	61	130–194	[12]
12-1	F TTTCAAAATTGTCATTGAACACA R TGGTCCTCAGTATCATCCTTG	ROX	59	255–307	[12]
1-1	F CCCTTCACTCCTTCATGCCA R TGAGCCTAAGGACCTGGACA	R6G	59	319–371	[12]
11-2	F AAGGCAGGGGAATTCACAGT R TCTCACCATTGCAGTCCTGA	TMR	61	390–462	[12]
8-1	F AGTAATATCCTGGTCCTGGCC R GAGCTCACTATGTAGCTATTGGA	R6G	65	498–558	[12]

## Окончание таблицы 1

Название маркера	Последовательность праймеров 5'-3'	Флуоресцентная метка	Температура отжига ( $T_m$ ), °C	Размер, п. н	Ссылка
1-2	F TCTTTAAAAATCAAACAGGCAAA R GGGGAGGTTGGGGTGTATAA	R6G	61	104–180	[12]
4-2	F AAGCTTCTCTGGCCATTTGA R TTCATAAACTTCAAGCAATGACA	FAM	59	217–243	[12]
5-5	F CGTTTTACCTGGCTGACACA R TGGTTTAAAACTCAATACCAAACAA	ROX	61	314–366	[12]
3-2	F TGAGCTACCATGTGGGTACA R CACACACACACAAAGATGGA	R6G	65	387–459	[12]
19-2	F AGGCTAGCACTGTTCCCTTGT R ACTCAGCACCTTCCATCCTG	FAM	59	511-563	[12]

MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ смеси dNTP, 0,2 мкМ каждого из праймеров, 20–50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы (Thermo Scientific, ЕС). Амплификацию проводили на приборе GeneAmp® PCR System 2700 (Thermo Fisher Scientific, США) при следующих температурных условиях: 1 цикл продолжительностью 4 мин при 94 °C; 35 циклов, включающих: 1 мин 94 °C, 1 мин  $T_m$  для каждой пары праймеров приведены в таблице 1, 1 мин 30 сек 72 °C; заключительная элонгация — 7 мин 72 °C.

*Идентификация продуктов амплификации.* Разделение продуктов ПЦР проводили с помощью капиллярного электрофореза с использованием секвенатора 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Размер фрагментов рассчитывали с помощью программного обеспечения GeneMapper® Software v 5.0 относительно стандартных образцов ДНК известной длины. В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 (Applied Biosystems, Великобритания).

*Статистическая обработка данных.* Для оценки уровня полиморфизма и информативности маркеров использовали несколько параметров, которые были рассчитаны для каждого локуса микросателлитных последовательностей отдельно.

Одним из параметров, позволяющих оценить уровень генетической изменчивости, является доля полиморфных фрагментов, которая рассчитывается как отношение числа полиморфных фрагментов к общему количеству выявляемых фрагментов амплификации.

Частота встречаемости аллелей рассчиты-

валась как отношение числа особей, несущих определенный аллель, к общему числу особей.

Еще одним параметром, позволяющим оценить уровень генетического полиморфизма, является показатель гетерозиготности. Уровень наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) рассчитывался для каждого локуса отдельно как отношение числа гетерозигот к общему количеству исследованных образцов. Значение уровня ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) вычисляли для каждого локуса на основании его аллельных частот посредством следующего соотношения:

$$H_e = 1 - \sum(p_i)^2,$$

где  $p_i$  — частота встречаемости  $i$ -ого аллеля [13].

Эффективное число аллелей ( $N_e$ ) рассчитывали по формуле:

$$N_e = 1 / (1 - H_e).$$

Для расчета F-статистик Райта ( $F$ ) (Wright's fixation index) использовали значения аллельных частот, а также показатели наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности:

$$F = 1 - H_o / H_e [14].$$

Дискриминационная сила маркера (PD) была рассчитана по формуле:

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

где  $g_i$  — частота встречаемости  $i$ -ого генотипа [15].

Количественный неиерархический кластерный анализ осуществляли методом Байеса с использованием программы Structure 2.3.4 [16]. В данной программе путем байесовского анализа методом марковских цепей Монте-Карло на основании расчета частот аллелей

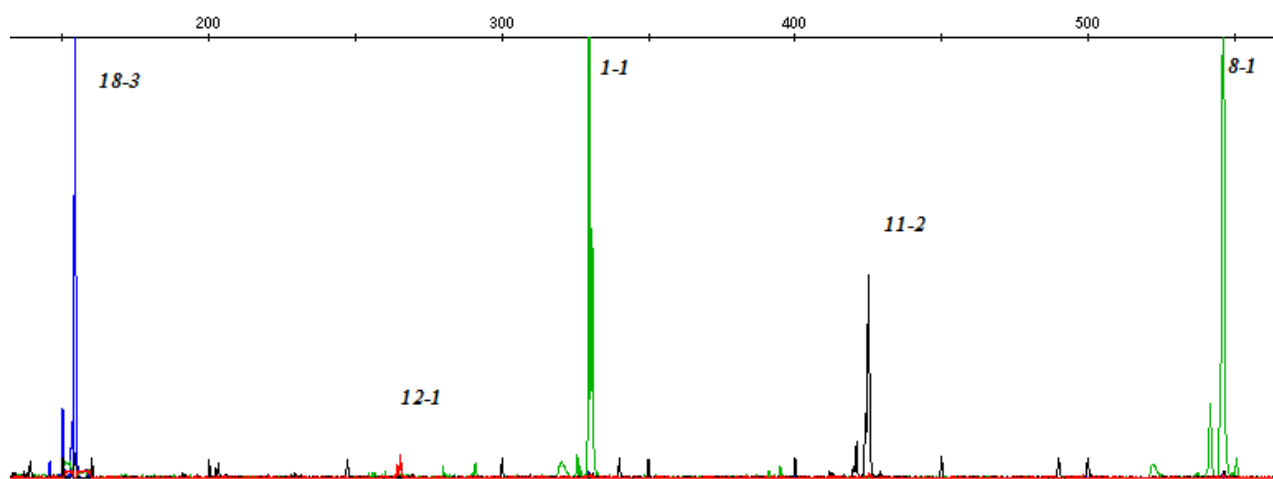
в каждой из генетически обособленных групп оценивается вероятность разбиения выборки на  $K$  популяций. Для анализа использовали модель генетического смешения (admixture). Для определения количества генетически однородных групп и вычисления  $\Delta K/K$  использовали ресурс Structure Harvester [17], на котором реализован метод Evanno [18]. В проведенном нами анализе число предполагаемых кластеров  $K$  варьировало от 1 до 5, длина burn-in периода была равна 3, количество Марковских цепей Монте-Карло — 1 000, для  $K$  была сделана 1 итерация.

## Результаты и обсуждение

Нами было исследовано генетическое разнообразие трех линий мышей — BALB/c, C57BL/6 и CBA. Выборка была представлена 10 мышами (5 самок и 5 самцов) каждой инбредной линии.

С помощью описанных в разделе «Материалы и методы» маркеров определен состав аллелей в геноме каждой особи мыши. Пример генетического профиля инбредной линии мыши, полученного с использованием STR маркеров, представлен на рисунке 1.

Взяты для анализа STR маркеры характери-



**Рис. 1.** Генетический профиль самки № 2 мыши инбредной линии C57BL/6, полученный с использованием STR-маркеров 18-3, 12-1, 1-1, 11-2 и 8-1. Цифры сверху обозначают длину (п. н.) продукта амплификации

зуются высоким уровнем эффективности [12], что видно и из данных, представленных в таблице 2. Среди трех линий мышей выявлено в общей сложности 36 аллелей. Максимальное количество аллелей среди трех инбредных линий наблюдалось в локусах 1-1, 11-2, 4-2. Среднее значение коэффициента полиморфизма составило 0,688.

Молекулярно-генетические профили особей инбредных линий мышей BALB/c, C57BL/6 и CBA были использованы для создания генетических паспортов отдельных особей, в которых указаны длины аллелей (п. н.), выявляемые с помощью каждого из 10 STR-маркеров (табл. 2).

Из результатов, представленных в таблице 3 (стр. 103), видно, что по отдельным локусам выборки линии мышей являются гомозиготными. Так, линия C57BL/6 гомозиготна по локусам 11-2, 8-1, 5-5. В остальных локусах обна-

ружены гетерозиготы, причем в локусе 1-1 представлено 4 аллеля. У линии CBA гомозиготными оказались локусы 1-2, 5-5, 3-2. Исследование показывает, что отдельные мыши одной линии могут отличаться по составу аллелей. Так, например, самка № 2 линии BALB/c в семи локусах из десяти (18-3, 1-1, 8-1, 4-2, 5-5, 3-2, 19-2) несет аллели, отсутствующие у самца № 5 этой же инбредной линии.

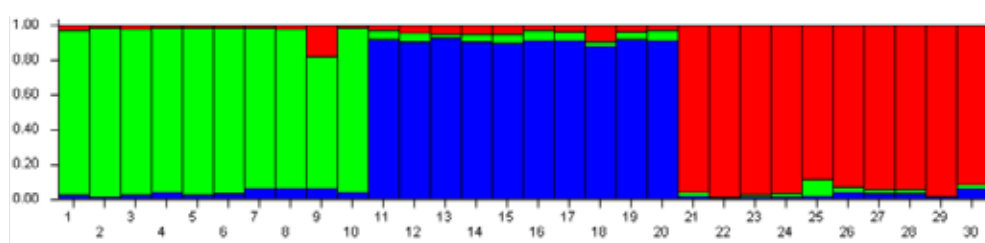
На основе полученных данных о составе STR-аллелей проведен анализ генетической структуры исследуемых инбредных линий мышей с использованием метода Evanno. В случае однородности выборки, представители линии формируют однотонные кластеры, если же выборка гетерогенна — кластеры двух и более цветов. Каждый представитель линии в массиве отображен отдельным вертикальным столбцом. Результаты проведенного анализа отображены на рисунке 2.

**Таблица 2**

Результаты статистического анализа для STR-маркеров, используемых для изучения аллельного состава генотипов представителей инбредных линий мышей BALB/c, C57BL/6 и CBA

STR-маркер	Варьирование размера фрагментов амплификации в п.н.	Кол-во аллелей	Кол-во уникальных генотипов	$H_e$	$H_o$	$N_e$	F	PD
18-3	146 – 158	4	6	0,267	0,287	1,402	0,069	0,682
12-1	265 – 269	2	3	0,200	0,244	1,324	0,182	0,606
1-1	331 – 353	5	8	0,433	0,254	1,341	-0,702	0,764
11-2	413 – 425	5	7	0,200	0,664	2,980	0,699	0,790
8-1	534 – 548	4	5	0,367	0,190	1,235	-0,932	0,568
1-2	123 – 127	2	3	0,133	0,338	1,510	0,606	0,593
4-2	223 – 239	5	8	0,433	0,421	1,727	-0,028	0,848
5-5	330–334	2	3	0,100	0,301	1,431	0,668	0,488
3-2	448-456	3	6	0,200	0,500	2,000	0,600	0,754
19-2	536-550	4	7	0,333	0,250	1,333	-0,332	0,790
Среднее значение		3,6	5,6	0,267	0,345	1,628	0,083	0,688

**Примечание.** Уровень ожидаемой ( $H_e$ ) и наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ), эффективное число аллелей ( $N_e$ ), индекс Райта (F), дискриминационная сила маркера (PD)



**Рис. 2.** Результаты кластеризации представителей инбредных линий мышей BALB/c, C57BL/6 и CBA, полученные с помощью программы Structure v. 2.3.4 ( $K = 3$ )

1–5 столбцы — самки линии BALB/c; 6–10 столбцы — самцы линии BALB/c; 11–15 столбцы — самки линии C57BL/6; 16–20 столбцы — самцы линии C57BL/6; 21–25 столбцы — самки линии CBA; 26–30 столбцы — самцы линии CBA. На вертикальной шкале отражен коэффициент количественной вероятности отношения линии к определенному кластеру (Q)

В программе Structure реализован математический алгоритм, позволяющий выявлять оптимальное количество кластеров для определенного массива данных. С использованием этого алгоритма было выявлено, что по

данным полиморфизма 10 STR-локусов с высокой вероятностью имеет место распределение исследуемой выборки представителей инбредных линий мышей на три кластера. Первый кластер включает представителей ли-

нии BALB/c (№ 1–10, столбцы зеленого цвета), второй кластер объединяет представитель линии C57BL/6 (№ 11–20, столбцы синего цвета), в третий кластер входят представители линии CBA (№ 21–30, столбцы красного цвета). При этом существенных различий между самцами и самками одной линии выявлено не было. Значение  $\Delta K/K$  для данных кластеров (с учетом трех прогонов) составило 0,35.

Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа показывают, что каждая линия мышей генетически дифференцирована от других линий и имеет свойственный ей профиль аллелей локусов микросателлитных последовательностей.

Важнейший вопрос, который возникает — относятся ли все особи к одной линии или в выборке присутствуют генотипы, не характерные для нее. Следует отметить, что мировое научное сообщество разрабатывает ряд подходов, направленных на то, чтобы получить наиболее точные и удобные методы идентификации линий мышей. Одним из них является секвенирование генома. Первой линией лабораторных инбредных мышей, геном которой был полностью секвенирован, была линия C57BL/6J [19]. В 2018 году завершен первый проект сборки *de novo* генома 16 наиболее часто используемых инбредных линий мышей [8]. Среди них 12 классических инбредных линий лабораторных мышей — 129S1/SvImJ, A/J, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, C57BL/6NJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LP/J, NZO/HILtJ и NOD/ShiLtJ и 4 линии дикого происхождения, несущие геномы *Mus musculus castaneus* (CAST/EiJ), *M. m. musculus* (PWK/PhJ), *M. m. domesticus* (WSB/EiJ) и *M. spretus* (SPRET/EiJ). Однако в настоящий момент в мире существует более десяти тысяч линий мышей, включая не только аутбредные и инбредные, но также трансгенные и нокаутные линии, и количество их стремительно растет с каждым годом [20]. При этом степень генетических вариаций между линиями не всегда известна [8, 19]. Генетическое разнообразие может быть обнаружено и внутри линий, что демонстрируют полученные нами результаты. Этот факт, в совокупности с тем, что геномы не всех линий мышей к настоящему времени секвенированы (среди них нет, например, используемых в Республике Беларусь линий

BALB/c, C57BL/6 и CBA), ограничивает применение данных полногеномного секвенирования для идентификации отдельных из множества существующих линий.

К другим методам, экономически менее затратным, но позволяющим получить достаточно точные результаты по идентификации инбредных линий мышей, относятся SNP и STR анализ. Так, например, для различения линий клеток мышей Консорциумом по проверке подлинности клеточных линий мышей был разработан метод мультиплексной ПЦР коротких tandemных повторов. Данный подход улучшает ранее запатентованные методы [21], которые теперь включают дополнительные праймеры, нацеленные в общей сложности на 19 STR-локусов мыши и два человеческих STR-маркера для обнаружения загрязнения. Метод является эффективным и использует соответствующие принципы и инструменты, которые уже используются для аутентификации линий клеток человека с помощью STR-профилирования. Благодаря совместной деятельности более 20 лабораториями разных стран были валидированы около 50 клеточных линий мышей [12].

Таким образом, в настоящее время имеется достаточно молекулярных методов, позволяющих на разном уровне проводить идентификацию лабораторных инбредных линий мышей. Необходимым условием для проведения таких исследований является привлечение к ним особей (либо их ДНК, другого биологического материала), принадлежность которых к той или иной линии достоверно установлена, например по морфологическим (или иным) признакам, подтверждается документами, лабораториями, аккредитованными на проведение соответствующей деятельности и др. Наличие контрольных референсных образцов необходимо для получения достоверных данных, позволяющих оценить степень генетического разнообразия популяций тех или иных инбредных линий. Сведения о составе аллелей контрольных особей могут быть использованы в течение многих лет в качестве стандарта и контроля для последующих сравнительных анализов и исключения генотипов, полученных от случайных скрещиваний или возникающих в результате мутаций.

**Таблица 3**  
Молекулярно-генетические паспорта представителей инбредных линий мышей BALB/c, C57BL/6 и SWA

№	Представитель линии	Набор праймеров 1: название, метка и ожидаемый размер аллелей					Набор праймеров 2: название, метка и ожидаемый размер аллелей				
		18-3, FAM 130-194 п. н.	12-1, ROX 255-307 п. н.	1-1, R6G 319-371 п. н.	11-2, TAMRA 390-462 п. н.	8-1, R6G 498-558 п. н.	1-2, R6G 104-180 п. н.	4-2, FAM 217-261 п. н.	5-5, ROX 314-366 п. н.	3-2, R6G 387-459 п. н.	19-2, FAM 511-563 п. н.
<b>Линия BALB/c</b>											
1	Самка 1	154	265, 269	331, 353	413	534, 546	127	223	334	448	546, 550
2	Самка 2	150, 154	269	331, 349	413	534, 542	127	239	330, 334	448	546
3	Самка 3	154	269	331, 353	413, 431	534, 548	127	223, 239	334	448	546, 550
4	Самка 4	150, 154	269	349	413, 421	534, 542	127	239	330, 334	448	546
5	Самка 5	154	269	331	413, 431	534, 548	127	223, 239	334	448, 452	546, 550
6	Самец 1	154	269	331, 349	413	534, 546	127	239	334	448	546
7	Самец 2	154, 158	265, 269	353	413	542, 546	127	223, 239	330, 334	448	550
8	Самец 3	154	265, 269	331	413	542, 546	127	223, 239	334	448	550
9	Самец 4	158	265	353	421	534, 542	127	223	334	448, 452	550
10	Самец 5	154, 158	269	353	413	534, 546	127	223	334	448, 452	550
<b>Линия C57BL/6</b>											
11	Самка 1	154	265	345, 349	425	546	123, 127	239	330	456	546
12	Самка 2	154	265	331	425	546	123, 127	239	330	452, 456	546
13	Самка 3	154	265	331, 347	425	546	127	235	330	456	546
14	Самка 4	154	265	347	425	546	123, 127	235	330	448, 456	540, 546
15	Самка 5	146, 154	265	331, 347	425	546	127	235, 239	330	448, 456	546
16	Самец 1	154	269	331	425	546	127	235, 239	330	456	546

## Окончание таблицы 3

№	Представитель линии	Набор праймеров 1: название, метка и ожидаемый размер аллелей					Набор праймеров 2: название, метка и ожидаемый размер аллелей				
		18-3, FAM 130-194 п. н.	12-1, ROX 255-307 п. н.	1-1, R6G 319-371 п. н.	11-2, TAMRA 390-462 п. н.	8-1, R6G 498-558 п. н.	1-2, R6G 104-180 п. н.	4-2, FAM 217-261 п. н.	5-5, ROX 314-366 п. н.	3-2, R6G 387-459 п. н.	19-2, FAM 511-563 п. н.
17	Самец 2	154	265, 269	331, 347	425	546	127	235, 239	330	456	546
18	Самец 3	154	265	331	425	546	127	235	330	452	540, 546
19	Самец 4	154	265, 269	331	425	546	127	235, 239	330	456	540, 546
20	Самец 5	154	265	347	425	546	123, 127	239	330	456	546
<b>Линия СВА</b>											
21	Самка 1	146	265	331	417	546	123	231, 235	330	452	536, 546
22	Самка 2	146	265	331, 347	417	546	123	235, 243	330	452	536
23	Самка 3	146	265	331, 347	417	546	123	235	330	452	536
24	Самка 4	146	265	331, 347	417	546	123	235	330	452	536
25	Самка 5	154	269	331	417, 421	546	123	231, 235	330	452	536
26	Самец 1	146, 154	265, 269	331	417, 421	546	123	231, 235	330	452	546
27	Самец 2	146	265	331	417	542, 546	123	235	330	452	536
28	Самец 3	146, 154	265	331, 347	417, 421	546	123	231	330	452	536, 546
29	Самец 4	146	265	331, 347	417	546	123	235, 243	330	452	536, 540
30	Самец 5	146, 154	265	331	421	546	123	235	330	452	536, 546

**Примечание.** Цифрами обозначена длина аллелей в п. н.



### Заключение

В результате исследования были апробированы высокополиморфные STR-маркеры 18-3, 12-1, 1-1, 11-2, 8-1, 1-2, 4-2, 5-5, 3-2 и 19-2, с использованием которых выявлено 36 различных аллелей у 30 мышей инбредных линий BALB/c, CBA и C57BL/6. На основе использования отобранных STR-маркеров разработаны молекулярно-генетические профили представителей инбредных линий мышей, характеризующие их генетическое разнообразие. Показано, что линии генетически дифференцированы друг от друга, при этом внутри линий наблюдается полиморфизм по составу STR аллелей.

*Научно-исследовательская работа выполнена по договору № 06-15/2021 от 15.06.2021.*

### Список использованных источников

1. Использование ДНК-маркеров для генотипирования инбредных линий лабораторных мышей / В. В. Мартынов [и др.] // Биомедицина. – 2007, № 6. – С. 149–152.
2. Tratar, U. L. Transgenic mouse models in cancer research / U. L. Tratar, S. Horvat, M. Cemazar // *Frontiers in Oncology*. – 2018. – Vol. 8, № 268. – P. 1–18.
3. The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates the scientific literature / S. Horbach, W. Halffman // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 10. – P. 1–6.
4. The culture of cell culture practices and authentication. Results from a 2015 survey / L. Freedman [et al.] // *Biotechniques*. – 2015. – Vol. 59, № 4. – P. 189–190.
5. Capes-Davis, A. Authentication: a standard problem or a problem of standards / A. Capes-Davis, R. M. Neve // *PLoS Biol*. – 2016. – Vol. 14, № 6. – P. 1–7.
6. Genome-wide mapping and assembly of structural variant breakpoints in the mouse genome / A. R. Quinlan [et al.] // *Genome research*. – 2010. – Vol. 20, № 5. – P. 623–635.
7. Sequence-based characterization of structural variation in the mouse genome / B. Yalcin [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 477, № 7364. – P. 326–329.
8. Sixteen diverse laboratory mouse reference genomes define strain-specific haplotypes and novel functional loci / J. Lilue [et al.] // *Nature Genetics*. – 2018. – Vol. 50, № 11. – P. 1574–1583.
9. ANSI/ATCC ASN-0003-2015: species-level identification of animal cells through mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) DNA barcodes. 2015
10. ANSI/ATCC ASN-0002-2011: authentication of human cell lines: standardization of STR profiling. 2011
11. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach / J. K. Cooper [et al.] // *In vitro Cell Dev Biol Anim*. – 2007. – Vol. 43, № 10. – P. 344–351.
12. Interlaboratory study to validate a STR profiling method for intraspecies identification of mouse cell lines / J. L. Almeida [et al.] // *PLoS ONE* – 2019. – Vol. 14, № 6. – P. 1–24.
13. Nei, M. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance / M. Nei, R. A. K. // *Genetics*. – 1974. – Vol. 76. – P. 379–390.
14. Wright, S The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating / S. Wright // *Evolution*. – 1965. – Vol. 19, № 3. – P. 395–420.
15. Kloosterman, A.D. PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis / A. D. Kloosterman, B. Budowle, P. Daselaar // *Int. J. Legal. Med.* – 1993. – Vol. 105, № 5. – P. 257–264.
16. Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics*. – 2000. – Vol. 155, № 2. – P. 945–959.
17. Earl, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D. A. Earl, B. M. Vonholdt // *Cons. Genet. Res.* – 2011. – Vol. 4, № 2. – P. 359–361.
18. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet // *Mol. Ecol.* – 2005. – Vol. 14, № 8. – P. 2611–2620.
19. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome / A. T. Chinwalla [et al.] // *Nature*. – 2002. – Vol. 420, № 6915. – P. 520–562.
20. Geneticists prepare for deluge of mutant mice / A. Abbott // *Nature*. – 2004. – Vol. 432, № 7017. – P. 541–541.
21. Almeida, J. L. Mouse cell line authentication / J. L. Almeida, C. R. Hill, K.D. Cole // *Cyto-technology*. – 2014. – Vol. 66, № 1. – P. 133–147.

**A. A. Famina, A. N. Zainchkovskaya, O. Yu. Urbanovich**

## **GENETIC DIVERSITY OF BALB/c, CBA, C57BL/6 INBRED MICE LINES USED IN MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH IN THE REPUBLIC OF BELARUS**

State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: O.Urbanovich@igc.by

Genetic polymorphism of the representatives of inbred BALB/c, C57BL/6, and CBA mice lines was studied using 10 STR markers. Among 30 individuals, 36 various alleles were identified. Using the algorithm of the Structure program, it was found that each line of mice is genetically differentiated from other lines and has its own allelic profile of microsatellite sequence loci. The study results may be used to monitor the purity of inbred mice lines in a number of generations.

**Keywords:** mice lines' sampling, STR analysis, STR allele polymorphism, BALB/c, CBA, C57BL/6 lines.

*Дата поступления в редакцию: 09 марта 2022 г.*

Е. В. Гузенко, А. И. Царь, В. А. Лемеш

## МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ *APIS MELLIFERA* L.

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

В статье представлен обзор литературных данных, касающихся применения различных методов идентификации таксономической принадлежности медоносных пчел *Apis mellifera* L. Проанализированы результаты исследований, направленных на разработку методов идентификации по морфологическим и молекулярно-генетическим особенностям пчел. Акцентируется внимание на глобальной проблеме метизации медоносных пчел и ее последствиях как для сохранения биоразнообразия, так и для мировой экономики. Отмечено, что в условиях возрастающей гибридизации пород и линий медоносных пчел традиционных методов морфометрии для идентификации недостаточно, необходимо использовать современные молекулярные методы анализа генома.

**Ключевые слова:** медоносная пчела, *Apis mellifera* L., гибридизация, метизация, методы идентификации, анализ митохондриальной ДНК, анализ ядерной ДНК.

### Введение

Энтомофилия — перекрестное опыление растений с помощью насекомых — является важным регулирующим экосистемным процессом в природе и сельском хозяйстве. В опубликованном докладе Межправительственной научно-политической платформы по биоразнообразию и экосистемным услугам (МПБЭУ) подчеркивается важнейшая роль насекомых-опылителей и опыления в производстве продовольствия [1]. Отмечается, что в мировой фауне почти 90% цветущих видов растений полностью или частично зависят от опылителей. Эти растения являются весьма важными для функционирования экосистем, предоставляя другим видам пищу, места обитания и иные ресурсы. Таким образом, насекомых-опылителей можно рассматривать в качестве связующего звена между сельским хозяйством, лесным хозяйством, биоразнообразием и продовольственной безопасностью.

За последние десятилетия наблюдается значительное уменьшение численности некоторых таксонов диких насекомых-опылителей и все большая степень зависимости успешности мирового сельского хозяйства от их деятельности [1]. Многие из причинных факторов, вызывающих сокращение численности

опылителей, определены Конвенцией о биологическом разнообразии [2]: фрагментация мест обитания и изменения в землепользовании, сельскохозяйственные и промышленные химические вещества, паразиты и болезни, инвазивные чужеродные виды. В дополнение к этому стали важными и другие непосредственные причины, такие как изменение климата, интенсивные методы ведения сельского хозяйства, производство монокультур, использование пестицидов.

Медоносная пчела *Apis mellifera* L. относится к насекомым-опылителям, является важным элементом наземных экосистем и имеет огромное народно-хозяйственное и экологическое значение. Облетая и опыляя около 80% дикорастущих и культурных растений, медоносные пчелы способствуют получению максимальных урожаев. Так, урожайность сельскохозяйственных культур повышается в среднем на 40%: рапса — на 30%, гречихи — на 40%, люцерны — на 50%, плодовых насаждений — на 60% [3]. Опыление пчелами положительно отражается на питательных и вкусовых качествах плодов и посевных кондициях семян. Показано увеличение содержания сухого вещества, витаминов и микроэлементов в семенах, также отмечается повышение всхожести

семенного материала [3]. Важна роль медоносных пчел и как производителей специфических продуктов (мед, воск, пыльца, маточное молочко, прополис, яд и др.), которые находят широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности.

Сокращение популяции пчел представляет угрозу для глобальной продовольственной безопасности и питания. Всемирная организация ФАО призывает правительства и международное сообщество активизировать усилия для решения проблем, связанных с исчезновением насекомых-опылителей. Разработана специальная Глобальная программа действий по опылителям в интересах устойчивого развития мирового сельского хозяйства [4]. Среди наиболее вероятных причин сокращения численности медоносных пчел ученые рассматривают заражение клещом Варроа, вирусные инфекции, снижение иммунитета под влиянием гербицидов и пестицидов. К числу генетических причин, связанных со снижением природной устойчивости к влиянию неблагоприятных факторов, относят массовую неконтролируемую межпородную гибридизацию, которая нарушает эволюционно сложившиеся адаптационные системы сообществ медоносных пчел.

Для комплексного понимания биологии пчел, повышения эффективности прикладных исследований для высокопродуктивного пчеловодства, выявления и охраны редких популяций пчел с уникальным генофондом необходимы исследования с использованием современных методов молекулярной генетики.

### Эволюция, разнообразие и метизация пчел рода *Apis*

Пчелы (латинское название Anthophila) — клада в надсемействе Apoidea летающих насекомых подотряда Стебельчатобрюхие отряда Перепончатокрылые, родственная осам и муравьям. Надсемейство включает семь семейств: Андрениды (Andrenidae), Пчелы настоящие Апида (Apidae), Коллетиды (Colletidae), Галиктиды (Halictidae), Мегачилиды (Megachilidae), Мелиттиды (Melittidae), Стенотритиды (Stenotritidae). Существует 520 родов пчел и около 21 тысячи видов.

Род медоносных пчел *Apis* входит в семейство Пчелы настоящие (Apidae). Он распро-

странен на всех континентах, кроме Антарктиды, в соответствии с ареалами произрастания цветковых энтомофильных растений. Основываясь на анализе существующих и вымерших видов, Kotthoff с соавторами [5] выдвинули гипотезу, что пчелы рода *Apis* возникли в Европе в олигоцене. Далее посредством юго-восточной миграции проникли в Азию и в течение миоцена обосновались на обоих континентах. В Северную Америку пчелы попали из Азии через Берингов пролив, а в конце миоцена — в Африку через Пиренейский полуостров. Древние климатические условия Азии способствовали диверсификации и эволюции рода *Apis*. В результате возникли все современные виды рода *Apis* (кроме *A. mellifera*). В то же время климатические условия в Европе и Северной Америке привели к исчезновению рода. Северная Америка оставалась лишенной пчел до их повторного завоза людьми в 17 веке н. э. Найдены ископаемые остатки пчел периода миоцена — в Европе *A. armbrusteri* (Zeuner, 1931), в Азии *A. dalica* (Engel et al., 2018), в Северной Америке *A. nearctica* (Engel et al., 2009). В Африке единственными находками являются окаменелости современных *A. mellifera* из позднего четвертичного периода [5, 6, 7, 8].

Количество существующих видов рода *Apis* и их соответствующие диагностические признаки были предметом дискуссий в течение последних нескольких десятилетий. Ученые выделяли от двадцати четырех [9] до десяти [10] или шести [11] видов. Большие противоречия отмечаются в исследованиях некоторых популяций пчел Юго-Восточной Азии [12]. В комбинированном анализе Engel и Schultz (1997) были признаны следующие виды: *A. mellifera* (Linnaeus, 1758), *A. cerana* (Fabricius, 1793), *A. koschevnikovi* (Enderlein, 1906), *A. nuluensis* (Tingek et al., 1996), *A. florea* (Fabricius, 1787), *A. andreniformis* (Smith, 1858), *A. dorsata* (Fabricius, 1793), *A. laboriosa* (Smith, 1871). В дальнейшем вид *A. nigrocincta* (Smith, 1861) добавили в список видов медоносных пчел. Современные филогенетические исследования, основанные на использовании молекулярно-генетических методов анализа ядерной и митохондриальной ДНК, выделяют девять видов рода *Apis*, которые группируют следующим образом: виды пчел

с гнездами с несколькими сотами (*A. mellifera*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nigrocincta* и *A. nuluensis*), карликовые пчелы с открытыми сотами (*A. florea* и *A. andreniformis*) и гигантские пчелы с открытыми сотами (*A. dorsata* и *A. laboriosa*) [13].

Из девяти видов *Apis*, упомянутых выше, только *A. mellifera* (европейская или западная медоносная пчела) и *A. cerana* (азиатская или восточная медоносная пчела) были «одомашнены» и имеют существенное коммерческое значение.

Представители вида *A. mellifera* обитают на территории Европы, Африки, Ближнего Востока и Центральной Азии [14, 15], и различаются по поведению, физиологии и морфологии [15]. Кроме того, подвиды европейской медоносной пчелы распространены за пределами их естественного ареала благодаря экономическим выгодам, связанным с опылением и производством меда. Описаны многочисленные подвиды *A. mellifera* [11, 14, 16]. Ruttner [17], используя классическую морфометрию, выделил 24 географических подвида *A. mellifera*. Engel [11] добавил четыре подвида и оставил синоним *A. m. remipes* как действительное имя для *A. m. armeniaca*. Далее были описаны еще три подвида: *A. m. pomonella* [17], *A. m. simensis* [18] и *A. m. sinisxinyuan* [15]. Сегодня определяют около 30 подвигов вида *A. mellifera* [14], для обозначения которых используют также термин раса, а в русскоязычной литературе — порода.

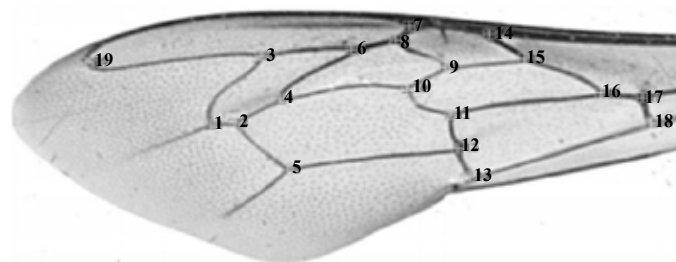
В результате деятельности человека происходит постоянная и интенсивная гибридизация существующих пород (рас) пчел, которая нарушает эволюционно сложившиеся адаптационные системы сообществ. Помеси характеризуются повышенной агрессивностью и ройливостью, низкой «силой семьи» и не могут эффективно использоваться в селекции, так как их хозяйственно ценные признаки неустойчиво наследуются потомством, расщепляются, что приводит к резкому снижению продуктивности, ухудшению зимостойкости, устойчивости к болезням и т. д. Кроме того, невозможно получить эффект гетерозиса в первом поколении, так как указанный эффект может реализоваться только при условии скрещивания генетически чистых линий. Даже такая примитивная селекционная работа, как

массовый отбор, при повсеместной метизации пчел не дает гарантии разведения лучших семей. После столетних испытаний помесных пчел в Германии пчеловоды отказались от этого опыта. В Европе, в частности в Австрии, создаются генетические банки пород пчел, где хранится материал для инструментального осеменения пчелиных маток и, соответственно, сохранения чистопородности. Генотип пчелиных семей определяет их племенную ценность и обеспечивает передачу продуктивных качеств потомкам. Одно из основных условий сохранения чистоты генофонда любого биологического вида — его достоверная идентификация.

### Классическая морфометрия и геометрическая морфометрия *A. mellifera*

Классическая морфометрия (также называемая традиционной морфометрией), основанная на измерении морфометрических признаков, широко использовалась для того, чтобы сначала выделить подвиды, а затем сгруппировать их в эволюционные линии [14, 19, 20]. Более ранние методы классификации медоносных пчел были основаны главным образом на качественных характеристиках морфологии. Хотя эти методы адекватны при различении более высоких таксонов, они оказались недостаточными при различении подвигов пчел. Это вызвало необходимость эволюции классической морфометрии. Вместо простого описания символов отдельных медоносных пчел в этом методе используются числовые данные, полученные в результате точных измерений, на основании которых получают средние статистические значения символов колоний [14]. Концепция численной таксономии была введена в таксономию медоносных пчел DuPraw [20] и получила дальнейшее развитие у Ruttner с соавторами [14]. До сих пор не существует общепринятого единого набора символов для использования в классической морфометрии.

Один из вариантов классической морфометрии — это геометрическая морфометрия (GM), которая анализирует форму крыла на основе координат выбранных ориентиров — пересечение вен. В настоящее время в основном используются координаты 19 ориентиров на переднем крыле [21] (рис. 1).



**Рис. 1.** Расположение 19 ориентиров на левом переднем крыле *A. mellifera*, используемых при геометрическом морфометрическом анализе

В то время как традиционная морфометрия ограничена расстоянием и отношениями расстояний, ГМ не только косвенно включает эти измерения, но также позволяет проводить анализ формы с использованием ориентиров. После наложения конфигурации ориентиры отличаются только по форме. Затем различия в форме можно анализировать с помощью многомерных статистических методов [22]. Передние крылья медоносных пчел анализируются всеми исследователями, некоторые авторы также используют данные по задним крыльям [23, 24].

Вариация формы крыла медоносных пчел на основе геометрической морфометрии использовалась для идентификации видов [25], подвидов [26], наследуемости формы крыла [27], влияния гибридизации на флуктуирующую асимметрию [28]. Использование геометрической морфометрии для выявления дифференциации и гибридизации у пчел в Греции [29], вероятно, было самым ранним применением этого метода для изучения подвидовой изменчивости *A. mellifera*. Последующие исследования подтвердили возможность применения метода геометрической морфометрии для микротаксономии медоносных пчел [26, 30]. При переоценке подвидовой таксономии *A. mellifera* с использованием ориентированной GM Kandemir с соавторами [30] показали дискриминацию четырех линий и 24-х подвидов медоносных пчел, которые прежде были дифференцированы методом классической морфометрии. Varouf и Baylac [31] использовали этот метод для идентификации трех африканских подвидов (*A. m. intermissa*, *A. m. sahariensis*, *A. m. capensis*) с высокой степенью перекрестной проверки (96,7%).

На основании морфометрического анализа были дифференцированы эволюционные ветви,

или линии, которые соответствовали географическому происхождению подвидов. К линии М отнесены подвиды медоносной пчелы западной части Средиземноморья и Северо-Западной Европы (*A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*, *A. m. intermissa*, *A. m. sahariensis*, *A. m. siciliana*, *A. m. ruttner*), к линии С — подвиды Юго-Восточной Европы и Восточного Средиземноморья (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. macedonica*, *A. m. cecropia*, *A. m. cypria*, *A. m. adami*), к линии О — подвиды Ближнего Востока и западной части Азии (*A. m. caucasica*, *A. m. anatoliaca*, *A. m. syriaca*, *A. m. meda*, *A. m. armeniaca*, *A. m. jemenitica*, *A. m. pomonella*) и к линии А — подвиды Африканского континента (*A. m. lamarckii*, *A. m. andansonii*, *A. m. scutellata*, *A. m. monticola*, *A. m. litorea*, *A. m. capensis*, *A. m. unicolor* и *A. m. simensis*) [32]. Однако в условиях возрастающей гибридизации пчел классического морфометрического метода идентификации недостаточно, необходимо использовать молекулярно-генетические методы анализа [33, 34].

### Определение таксономической принадлежности пчел по полиморфизму аллозимных локусов

Аллозимы — уникальные варибельные изоферменты, находящиеся под контролем одного гена. Исследования аллозимного полиморфизма пчел берут свое начало в 50-х годах и становятся популярными в 80-е гг. XX в. [35]. В популяциях медоносной пчелы были обнаружены следующие аллозимные локусы: малатдегидрогеназа MDH1 (EC1.1.1.37), малик-энзим ME (EC1.1.1.40), эстераза EST-3 (EC3.1.1), щелочная фосфатаза ALP (EC3.1.3.1), фосфоглюкомутаза PGM (EC5.4.2.2), гексокиназа НК (EC2.7.1.1). Каждый аллозимный локус характеризуется определенным количеством

аллелей. При изучении популяций пчел из Норвегии обнаружено два переменных локуса — MDH1 и ME [36]; в популяциях пчел Южной Америки и Австралии — один переменный локус EST [30]; в популяциях пчел Бразилии и Уругвая — два переменных локуса EST и PGM [37]; в популяциях пчел Африки — пять переменных локусов MDH, ME, PGM, EST, HK. На основе сравнительного анализа частот аллелей аллозимных локусов можно изучить процесс внутривидовой гибридизации. Так, на основе изменчивости аллозимного локуса EST была показана гибридизация между пчелами подвидов *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* Восточной Европы [38].

Использование аллозимной изменчивости в исследованиях пчел не получило широкого распространения в связи с низким уровнем полиморфизма аллозимных локусов. По данным маркерам не установлены различия между подвидами, а популяции различаются лишь по частотам аллелей. Показано, что в популяции пчел подвида *A. m. ligustica* средняя гетерозиготность по 39 аллозимным локусам составляла около 1% [39]. Следовательно, для идентификации подвидов медоносных пчел аллозимные маркеры недостаточно информативны, их использование в научных исследованиях ограничено.

### Определение таксономической принадлежности медоносных пчел полиморфизму митохондриальной ДНК

Изучение митохондриального генома — надежный инструмент идентификации. Возможность идентификации связана с материнским типом наследования и существующими в митохондриальном геноме животных групповыми и даже индивидуальными различиями. Скорость мутаций в митохондриальной ДНК (мтДНК) примерно в 10 раз выше, чем в ядерной ДНК [40]. Это связано с отсутствием эффективных систем репарации и активными окислительно-восстановительными процессами, проходящими в митохондриях, при этом накапливаются преимущественно селективно-нейтральные изменения, вносящие свой вклад в полиморфизм мтДНК.

Митохондриальный геном *A. mellifera* полностью секвенирован. Он представляет собой кольцевую молекулу ДНК размером 16,3

кб и состоит из 13 протеин-кодирующих генов, 22 генов тРНК, 2 генов рРНК и одного некодирующего региона (доступ в NCBI NC\_001566) [41]. Анализ последовательности нуклеотидов показал, что мтДНК пчел насыщена АТ-парами. Большое количество АТ-пар было выявлено в спейсерном участке мтДНК, локализованном между генами COI и COII (последовательность между генами цитохромоксидазы I и цитохромоксидазы II). Известно, что этот участок образован последовательностью гена тРНК<sup>Leu</sup> и сложными повторами [42]. Повторы представлены P и Q элементами (рис. 2).

Элемент P этих повторов длиной 54 п. н. состоит только из АТ-пар, содержание АТ-пар в элементе Q составляет 93%. В сложных повторах P-Q элементов P может иметь варианты P0, P1, P2, отличающиеся небольшими делециями и инсерциями. Пчелы разных эволюционных ветвей характеризуются разными комбинациями элементов P и Q. Наиболее коротким фрагментом локуса COI–COII мтДНК, содержащим единственный элемент Q (350 п. н.), характеризуются подвиды пчел эволюционной ветви C [43]. Подвиды пчел, относящиеся к эволюционным ветвям A, M, O, Y и Z, характеризуются более длинным фрагментом локуса COI–COII мтДНК, содержат разные варианты элемента P и от 1 до 5 копий элемента Q. У среднерусской породы, поддерживаемой в России, регистрируются несколько вариантов локуса — PQQ, PQQQ, PQQQQ (от 500 п. н. до 1 500 п. н.) [44].

Изменчивость длины межгенного локуса COI–COII мтДНК обнаруживается полимеразной цепной реакцией, дополнительный полиморфизм выявляется при ПДРФ-анализе. Для рестрикции митохондриальной ДНК медоносной пчелы применяются 13 эндонуклеаз HinfI, AccI, AvaI, BclI, BglII, EcoRI, HincII, HindII, HindIII, NdeI, PstI, PvuII, XbaI. На основе ПДРФ-анализа мтДНК 10 эндонуклеазами была подтверждена дифференциация подвидов пчел на четыре эволюционные ветви A, M, C, O и выявлены подвидоспецифичные гаплотипы [45]. На основе ПЦР-ПДРФ-анализа генов COI и Nd5 мтДНК с использованием специфических эндонуклеаз определены диагностические маркеры подвидов: для подвида *A. m. macedonica* из Маке-

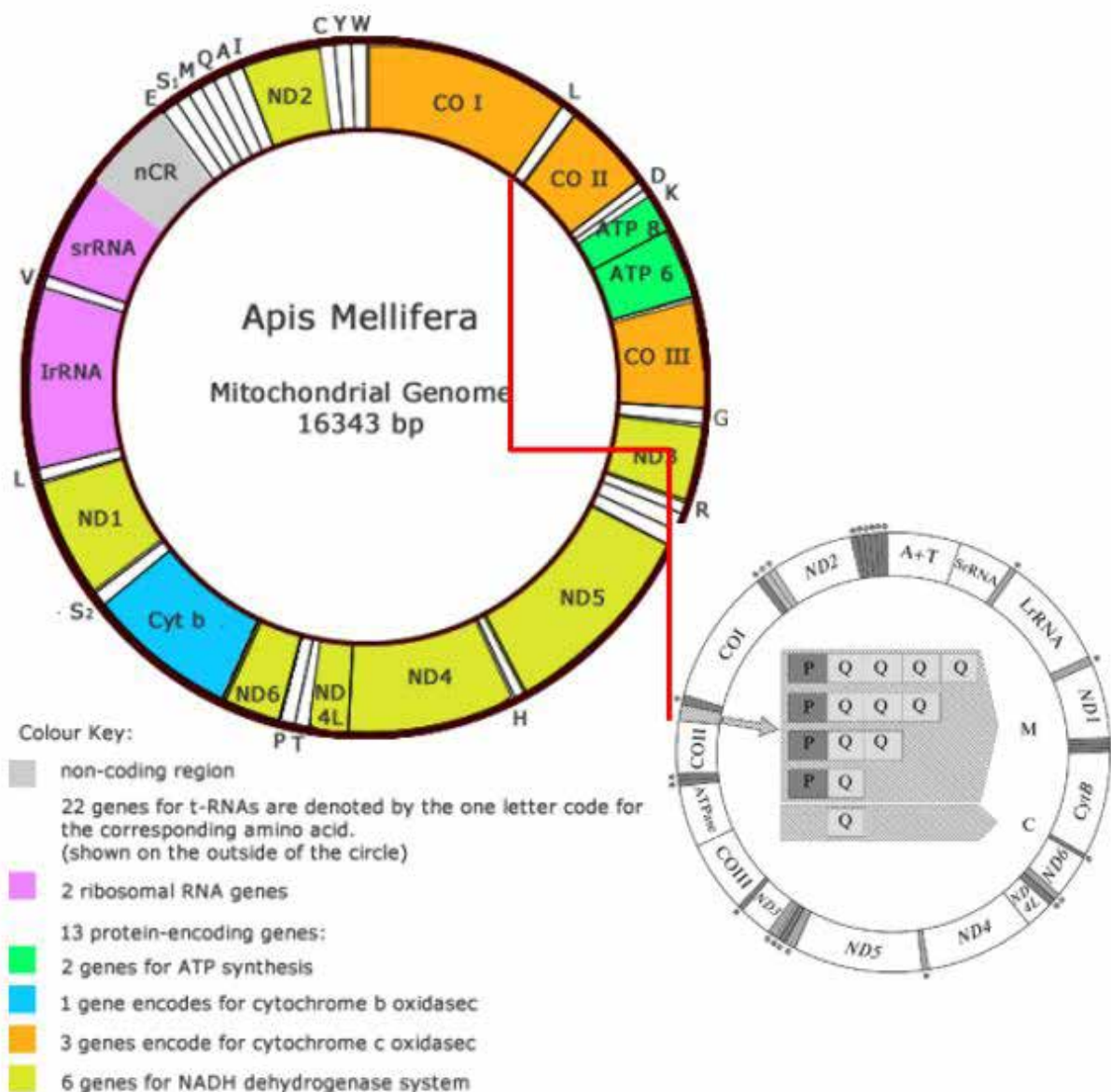


Рис. 2. Схематическое изображение митохондриального генома *A. mellifera*

донии использовали эндонуклеазы NcoI, StyI и AluI [46], для пчел подвидов *A. m. rodopica* из Болгарии и *A. m. macedonica* из Греции использовали эндонуклеазы SspI, HincII и FokI [47]. ПЦР-ПДРФ-анализ гена COI мтДНК с эндонуклеазами HincII и XbaI позволил дифференцировать подвиды эволюционных ветвей М (*A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*) и С (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasica*) [48], с эндонуклеазой HinfI — подвид *A. m. lamarkii* [49], с эндонуклеазами NcoI и StyI — для отличия подвида *A. m. macedonica* от подвидов *A. m. adami*, *A. m. cecropia*, *A. m. cypria* [46]. ПЦР-ПДРФ-анализ гена СУТ

мтДНК эндонуклеазой BglIII позволил разделить европейские семьи пчел (эволюционные ветви М и С) и африканские (эволюционная ветвь А) [50], тогда как рестрикционный анализ гена Ls rRNA мтДНК эндонуклеазой HincII дал возможность дифференцировать семьи пчел, относящиеся к эволюционным ветвям М и С [48].

Наиболее популярен рестрикционный анализ межгенного локуса COI–COII мтДНК с использованием эндонуклеазы DraI, называемый кратко *DraI*-тест [32]. *DraI*-тест широко использовался в анализе генетической структуры зон гибридизации подвидов [32],



изучении уровня интрогрессии генов «южных» подвидов [32], мониторинге изменений генофонда по материнской линии африканизированных популяций пчел Северной и Южной Америки [51]. *Dral*-тест позволяет дифференцировать свыше 100 гаплотипов медоносной пчелы. Несмотря на высокий уровень полиморфизма, *Dral*-тест не всегда позволяет четко дифференцировать подвиды пчел. Так, гаплотип С1 представлен как у *A. m. carnica*, так и у *A. m. ligustica*, хотя и с разными частотами [53], гаплотип А1 — у *A. m. iberiensis*, *A. m. adansonii* и других африканских подвидов, гаплотип М4 — у *A. m. iberiensis* и *A. m. mellifera* [52].

Таким образом, материнский тип наследования мтДНК создает некоторые ограничения для молекулярно-филогенетических исследований пчел и позволяет установить происхождение только по материнской линии.

### Определение таксономической принадлежности медоносных пчел по вариабельности микросателлитных локусов ядерного генома

Секвенирование ядерного генома *A. mellifera* в 2006 г. (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) значительно расширило воз-

можности изучения генофонда медоносных пчел, дало возможность для глубокого анализа структуры генома и особенностей его функционирования с использованием различных ДНК-маркеров (STR, SNP и др.).

Ядерный геном медоносной пчелы *A. mellifera* имеет размер 246 927 000 п. н., 16 хромосом и содержит 10 157 генов (доступ в GenBank AADG00000000) [53]. Ядерный и митохондриальный геномы *A. mellifera* отличаются высоким содержанием АТ-пар (67% А + Т и 33% G + C), характеризуются большей пространственной гетерогенностью А + Т богатых участков, более высоким содержанием CpG-островков и отсутствием транспозонов наиболее распространенных семейств. Геном *A. mellifera* содержит меньше генов естественного иммунитета, ферментов детоксикации, белков кутикулы и вкусовых рецепторов (по сравнению с модельным объектом *D. melanogaster*). Однако *A. mellifera* содержит «новые» гены, связанные с обонятельными рецепторами, переработкой пыльцы и нектара, что, по-видимому, связано с биологией пчел и их социальной организацией [54]. В таблице 1 представлена характеристика генома медоносной пчелы.

С 90-х гг. XX в. генетические исследова-

Таблица 1

Характеристика генома медоносной пчелы

Хромосома	Номер в генбанке	Число генов	Размер, п. н.	Хромосома	Номер в генбанке	Число генов	Размер, п. н.
LG 1	NC_007070	1 669	30 000	LG 9	NC_007078	584	11 100
LG 2	NC_007071	814	15 500	LG 10	NC_007079	768	13 000
LG 3	NC_007072	735	13 200	LG 11	NC_007080	968	14 700
LG 4	NC_007073	709	12 700	LG 12	NC_007081	504	11 900
LG 5	NC_007074	874	14 400	LG 13	NC_007082	418	10 300
LG 6	NC_007075	844	18 500	LG 14	NC_007083	612	10 300
LG 7	NC_007076	596	13 200	LG 15	NC_007084	730	10 200
LG 8	NC_007077	873	13 500	LG 16	NC_007085	420	7 200
				мтДНК	NC_001566	35	16 300

ния пчел и других перепончатокрылых насекомых стали проводиться на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов. Согласно рекомендациям Комиссии по био-

логии пчелы и конгресса «APIMONDIA» (<http://abeekeepersblog.blogspot.com>) (2009 г.) для изучения и сохранения аборигенных популяций пчел следует применять микросател-

литный анализ. У медоносной пчелы описано более 2 000 микросателлитных локусов. Они активно применяются для характеристики генетических особенностей различных популяций и эволюционных линий, оценки внутри- и межпородного генетического разнообразия, установления уровня интрогрессии между разными линиями, генетической паспортизации пчел [55–68]. Кроме того, данный класс маркеров может быть полезным для изучения особенностей формирования генетического состава пчелосемей, его временной динамики, в том числе и с учетом особенностей биологии размножения пчел (полиандрии). Информативность метода анализа генома по микросателлитным локусам во многом определяется числом и степенью полиморфизма исследованных локусов. Исследования подобного рода в конечном итоге направлены на оптимизацию селекционной работы с линиями, популяциями, породами и семьями, а также на разработку подходов к отбору семей с желательными признаками.

Первые исследования медоносных пчел с использованием микросателлитных локу-

сов были проведены на территории Европы. Проанализирован полиморфизм 552 микросателлитных локусов у четырех видов пчел — *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata* и *A. florea* и подвидов *A. mellifera*, относящихся к трем эволюционным линиям А, М и С [55]. Около 30% описанных микросателлитных локусов оценили как высоко информативные [55]. На основе изучения варибельности 7 микросателлитных локусов определена зона интрогрессии между пчелами подвидов *A. m. mellifera* и *A. m. ligustica* в Альпах на границе между Францией и Италией [56], в Швейцарии, Норвегии, Франции [57], Польше [58], а также в популяции африканизированных пчел между подвидами *A. m. intermissa* и *A. m. ligustica* на полуострове Юкатан [59]. Анализ варибельности 6 микросателлитных локусов позволил выяснить относительную чистоту линий иберийской популяции пчел подвида *A. m. iberiensis* в Испании и доказать генетическую изоляцию от популяции пчел подвида *A. m. intermissa* из Северной Африки и Португалии [60] (табл. 2).

Микросателлитные маркеры достаточ-

Таблица 2

Современное распределение 30 подвидов пчел в 6 эволюционных ветвях

Эволюционная ветвь	Подвиды	Ареал распространения
А	<i>A. m. sahariensis</i> , <i>A. m. intermissa</i> , <i>A. m. lamarckii</i> , <i>A. m. litorea</i> , <i>A. m. scutellata</i> , <i>A. m. monticola</i> , <i>A. m. adansonii</i> , <i>A. m. unicolor</i> , <i>A. m. capensis</i> , <i>A. m. simensis</i> , <i>A. m. nubica</i>	Тропическая Африка
С	<i>A. m. ligustica</i> , <i>A. m. carnica</i> , <i>A. m. carpatica</i> , <i>A. m. macedonica</i> , <i>A. m. cecropia</i> , <i>A. m. sicula</i> , <i>A. m. pomonella</i> , <i>A. m. ruttneri</i> , <i>A. m. caucasica</i>	Средиземноморье, Центральная и Восточная Европа
М	<i>A. m. mellifera</i> , <i>A. m. iberiensis</i>	Северная и Западная Европа
О	<i>A. m. remipes</i> , <i>A. m. armeniaca</i> , <i>A. m. adami</i> , <i>A. m. meda</i> , <i>A. m. cypria</i> , <i>A. m. anatoliaca</i>	Ближний Восток
У	<i>A. m. jemenitica</i>	Республика Йемен
Z	<i>A. m. syriaca</i>	Сирия

но информативны и активно используются при изучении продуктивности пчел и устойчивости к заболеваниям. Установлены два ДНК-локуса, ассоциированных с поведением медоносных пчел, а именно удалением взрослыми пчелами выводка, зараженного клещом Варроа [61]. Проводятся исследования по поиску микросателлитных маркеров, связанных с устойчивостью к нозематозу, обнаружена породо-специфичность устойчивости [62]. С целью отбора пчелосемей по продуктивности маточного молочка одним из наиболее перспективных для поиска ДНК-маркеров рассматривается микросателлитный локус *mrjp3*. Так, у африканских пчел три варианта локуса *mrjp3* (*C*, *D*, *F*) оказались ассоциированы с повышенной выработкой маточного молочка [63]. Активно ведутся работы по установлению чистопородности и гибридности пчелосемей. Такие исследования проводятся в странах Европы и России [64–68].

### Пчеловодство в Беларуси

Пчеловодство — важная отрасль сельского хозяйства и древний промысел населения Беларуси с тысячелетним опытом и традициями. Характерными этапами его становления и развития выступали охота за медом, бортничество, колодное пасечное хозяйство, рамочная система содержания пчел. В настоящее время в пчеловодстве Беларуси преобладает индивидуальное мелкое производство, основанное на примитивных технологиях.

Разрушение местных популяций медоносных пчел началось в послевоенные годы. В тот период страна находилась в тяжелейших условиях, и для восстановления отрасли в колхозы и совхозы тысячами завозились пчелопакеты с Северного Кавказа и Закавказья. Подавляющее большинство пчеловодов не занималось племенной работой, и завозимые породы превратились в помесные популяции. Процесс перемешивания зашел так далеко, что на территориях, куда завозился пчеломатериал южных пчел, чистопородных аборигенных пчел не осталось. Известный немецкий ученый К. Дреер (1985) писал: «В настоящее время исходные породы медоносной пчелы в Европе и за ее пределами оказались генетически разрушенными вследствие скрещивания. Невосполнимая наследственная основа, которая

создавалась в течение долгой эволюции, находится сейчас под угрозой гибели. Разрушение наших пчелиных пород идет все возрастающими темпами, так что говорить о сохранении некоторых из них, возможно, уже поздно».

В Беларуси возделывается более 80 видов сельскохозяйственных растений, продуктивность которых зависит от насекомых-опылителей. Для качественного опыления и получения высоких урожаев плодово-ягодных, овощных и технических культур нашей стране необходимо более миллиона пчелосемей. На сегодняшний день в республике содержится 223 тыс. пчелосемей, из которых 86% — в частных хозяйствах [69], при этом не осуществляется контроль за ввозимыми для разведения пчеломатками и пчелопакетами. В результате происходит повсеместная гибридизация медоносных пчел, потеря чистопородности, снижение приспособленности к неблагоприятным факторам окружающей среды, распространение болезней и, как следствие, гибель.

Традиционно для дифференциации и оценки чистопородности пчелосемей в Беларуси используют методы морфометрии. Однако в условиях возрастающей метизации традиционных методов идентификации недостаточно, и необходимо использовать методы анализа ДНК. В Беларуси в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси с 2020 года начаты системные молекулярно-генетические исследования пчел. Большинство исследованных пчелосемей относились к подвидам *A. m. caucasica*, *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, обнаружена пчелосемья подвида *A. m. mellifera*. Данные анализа ДНК отличались от данных классической морфометрии. Определен набор из 5 SSR-маркеров с высоким дифференцирующим потенциалом. Точность кластеризации составила 79,3–99,3%. Выявлен внутрисемейный и межсемейный генетический полиморфизм [70, 71].

### Заключение

В последние годы пчеловоды, ученые, экологи и просто любители природы обеспокоены массовой гибелью пчелиных семей. Сокращение популяции пчел представляет угрозу для глобальной продовольственной безопасности и питания. Всемирная организация ФАО призывает правительства и международное

сообщество активизировать усилия для решения проблем, связанных с исчезновением насекомых-опылителей. Разработана специальная Глобальная программа действий по опылителям в интересах устойчивого развития сельского хозяйства. Ученые всего мира ищут объяснение и пути решения данной проблемы. К числу генетических причин, связанных со снижением природной устойчивости к влиянию неблагоприятных факторов, относят массовую бесконтрольную межпородную гибридизацию, которая нарушает эволюционно сложившиеся адаптационные системы сообществ медоносных пчел. В результате интенсивного обмена генами между пчелами разных подвидов возникает массив гибридных пчел с измененным генетическим составом, которые обладают пониженным иммунитетом. Одно из основных условий сохранения чистоты генофонда любого биологического вида — его достоверная идентификация. Методы классической морфометрии и геометрической морфометрии недостаточны для идентификации медоносных пчел в условиях возрастающей гибридизации. В связи с этим особенно актуальными становятся генетические исследования по дифференциации подвидов, подтипов, экотипов медоносных пчел, выявлению чистопородности и метизации пчелосемей, поскольку данные методы являются высокоточными и исключают субъективную оценку. Анализ полиморфизма локуса COI–COII митохондриальной ДНК и микросателлитных локусов ядерной ДНК позволяет установить происхождение медоносной пчелы по материнской линии, оценить генетическое разнообразие и выявить внутри- и межпородную интрогрессию генетического материала. Стремительное развитие молекулярных технологий представляет широкие возможности для дальнейших исследований по поиску породо-специфичных, адаптивно-значимых ДНК-маркеров, а также ДНК-маркеров, ассоциированных с хозяйственно-полезными признаками, что составляет современную научную основу селекционной работы в пчелопитомниках.

#### Список использованных источников

1. The Assessment Report on Pollinators, Pollination, and Food Production // <https://www.>

[ippbes.net/assessment-reports/pollinators](https://www.ippbes.net/assessment-reports/pollinators)

2. Решение VI/5 о сельскохозяйственном биологическом разнообразии, приложение II // <https://www.cbd.int/doc/decisions/cop-06/full/cop-06-dec-ru.pdf>

3. Основы животноводства: учебно-методическое пособие / Н. Н. Климов, С. И. Коршун. – Гродно: ГГАУ, 2017. – 28 с.

4. Конвенция о биологическом разнообразии. Рекомендация, принятая вспомогательным органом по научным, техническим и технологическим консультациям // Двадцать второе совещание, Монреаль, Канада, 2–7 июля 2018 года. Пункт 11 повестки дня.

5. Greater past disparity and diversity hints at ancient migrations of European honey bee lineages into Africa and Asia / U. Kotthoff [et al.] // *Journal of Biogeography*. – 2013. – V. 40 – P. 1832–1838. doi: 10.1111/jbi.12151.

6. A primitive honey bee from the Middle Miocene deposits of southeastern Yunnan, China (Hymenoptera, Apidae) / M. S. Engel [et al.] // *Zookeys*. – 2018. – V. 775 – P. 117–129. doi: 10.3897/zookeys.775.24909.

7. Engel, M. S. A honey bee from the Miocene of Nevada and the biogeography of *Apis* (Hymenoptera: Apidae, Apini) / M. S. Engel, I. A. Hinojosa-Diaz, A. P. Rasnitsin // *Proceedings of the California Academy of Sciences*. – 2009. – V. 60 – P. 23–38.

8. Engel, M. S. A giant honey bee from the Middle Miocene of Japan (Hymenoptera: Apidae) // *American Museum Novitates*. – 2006 – V. 3504 – P. 1–12.

9. Rediscovery of *Apis vechti* (Maa, 1953): The Saban Honey Bee / S. Tingek [et al.] // *Apidologie*. – 1988. – V. 19 – P. 97–102.

10. A molecular phylogeny of the genus *Apis* suggests that the giant honey bee of the Philippines, *A. breviligula* Maa and the plains honey bee of southern India, *A. indica fabricius*, are valid species / N. Lo [et al.] // *Systematic Entomology*. – 2010. – V. 35 – P. 226–233. doi: 10.1111/j.1365-3113.2009.00504.

11. Engel, M. S. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera Apidae *Apis*) // *Journal of Hymenoptera Research*. – 1999. – Vol. 8 – P. 165–196. doi: 10.1007/978-1-4614-4960-718.

12. Koeniger, N. Honey bees of Borneo: exploring the centre of *Apis* diversity /

- N. Koeniger, G. Koeniger, S. Tingek // Natural History Publication (Borneo), 2010.
13. Raffiudin, R. Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution / R. Raffiudin, R. H. Crozier // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2007. – V. 43 – P. 543–552. doi: 10.1016/j.ympev.2006.10.013.
14. Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honey bees. Germany, Berlin, Springer, 1988.
15. Genomic analyses reveal demographic history and temperate adaptation of the newly discovered honey bee subspecies *Apis mellifera sinisxinyuan* n. ssp. / C. Chen [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2016. – V. 33. – P. 133–1348. doi: 10.1093/molbev/msw017.
16. *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta / W. S. Sheppard [et al.] // *Apidologie*. – 1997. – Vol. 28. – P. 287–293.
17. Sheppard, W. S. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia / W. S. Sheppard, M. D. Meixner // *Apidologie*. – 2003. – Vol. 34, is. 4. – P. 367–375.
18. The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera* – *Apis mellifera simensis* n. ssp. / M. D. Meixner [et al.] // *Apidologie*. – 2011. – Vol. 42. – P. 425–437.
19. Alpatov, V. V. Biometrical studies on variation and races of the honeybee *Apis mellifera* L. / V. V. Alpatov // *Quarterly Review of Biology*. – 1929. – Vol. 4. – P. 158.
20. DuPraw, E. J. Non-Linnean taxonomy // *Nature*. – 1964. – Vol. 202. – P. 849–852. doi: 10.1038/202849a0.
21. Smith, D. R. Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of ploidy and hybridization / D. R. Smith, B. J. Crespi, F. L. Bookstein // *Journal of Evolutionary Biology*. – 1997. – Vol. 10. – P. 551–574. doi: 10.1007/s000360050041.
22. Geometric Morphometrics For Biologists: A Primer / M. L. Zelditch [et al.] // Elsevier Academic, New York, 2004. – USA. doi: 10.1016/b978-012778460-1/50007-7.
23. Inferring developmental modularity from morphological integration: Analysis of individual variation and asymmetry in bumblebee wings / C.P. Klingenberg [et al.] // *The American Naturalist*. – 2001. – Vol. 157. – P. 11–23. doi: 10.1086/317002 81.
24. Dolati, L. Landmark-based morphometric study in the fore and hind wings of an Iranian race of European honey bee (*Apis mellifera meda*) / L. Dolati, N. J. Rafie, H. Khalesro // *Journal of Apicultural Research*. – 2013. – Vol. 57. – P. 187–197. doi: 10.2478/jas-2013-0028.
25. Santoso, M. A. Honey bee species differentiation using geometric morphometric on wing venations. / M. A. Santoso, B. Juliandi, R. Raffiudin // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2018. – 197:012015. doi: 10.1088/1755-1315/197/1/012015.
26. Tofilski, A. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honey bee subspecies // *Apidologie*. – 2008. – Vol. 39. – P. 558–563. doi: 10.1051/apido:2008037.
27. Geometric estimates of heritability in biological shape / L. R. Monteiro [et al.] // *Evolution*. – 2002. – Vol. 56. – P. 563–572. doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb01367.
28. The influence of hybridization between African and European honey bees, *Apis mellifera*, on asymmetries in wing size and shape / S.S. Schneider [et al.] // *Evolution*. – 2003. – Vol. 57 – V. 2 350–2 364. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00247.
29. Allozyme variability and phylogenetic relationships in honey bee (Hymenoptera: Apidae: *Apis mellifera*) populations from Greece and Cyprus / M. Bouga [et al.] // *Biochemical Genetics*. – 2005. – Vol. 43. – P. 471–483.
30. Kandemir, İ. Reevaluation of honey bee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach / İ. Kandemir, A. Özkan, S. Fuchs // *Apidologie*. – 2011. – Vol. 42. – P. 618–627. doi: 10.1007/s13592-011-0063-3.
31. Barour, C. Geometric morphometric discrimination of the three African honey bee subspecies *Apis mellifera intermissa*, *A. m. sahariensis* and *A. m. capensis* (Hymenoptera, Apidae): Fore wing and hind wing landmark configurations. / C. Barour, M. Baylac // *Journal of Hymenoptera Research*. – 2016. – Vol. 52 – P. 61–70. doi: 10.3897/jhr.52.8787.
32. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera* / M. D. Meixner [et al.] // *Journal of Apicultural Research*. – 2013. – Vol. 52, is.4. – P. 1–28.
33. Daly, H. V. Honey bee morphometries: linearity of variables with respect to body size and classification tested with European worker bees reared by varying ratios of nurse bees / H. V. Daly

- [et al.] // Journal of Apicultural Research. – 1995. – Vol. 34, is.3. – P. 129–145.
34. The genetic origin of honey bee colonies used in the COLOSS Genotype-Environment Interactions Experiment: a comparison of methods / R. M. Francis [et al.] // Journal of Apicultural Research. – 2014. – Vol. 53, is.2. – P. 188–204.
35. Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия / Ю. А. Янбаев [и др.] – Уфа: БГУ, 2000. – 108 с.
36. Sheppard, W. S New allozyme variability in Italian honey bees. / W. S. Sheppard, S. H. Berlocher // Journal of Heredity. – 1985. – V. 76. – P. 45–48.
37. Bookstein, F. L. Morphometric Tools for Landmark Data, Geometry and Biology. – NY, USA: Cambridge University Press; 1991.
38. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. / I. Miguel [et al.] // Apidologie. – 2011 – Vol. 42(2). – P. 150–161. doi: 10.1051/apido/2010048.
39. Sylvester, H. A. Biochemical genetics. In: Rinderer T, editor. Bee genetics and breeding; Orlando, Florida: Academic Press. – 1986. – P. 177–203.
40. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution / W. M. Brown [et al.] // J. Mol. Evol. – 1982. – Vol. 18. – P. 225–239.
41. Cornuet, J.-M. L. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications / J.-M. L. Cornuet, L. Garnery // Apidologie. – 1991. – Vol. 22. – P. 627–642.
42. Crozier, R. H. The cytochrome b and ATPase genes of honeybee mitochondrial DNA / R. H. Crozier, Y. C. Crozier // Mol. Biol. Evol. – 1992. – Vol. 9. – P. 474–482.
43. Genetic biodiversity of the West European honeybee (*Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera iberica*) / L. Garnery [et al.] // II. Mitochondrial DNA. Genetics, Selection and Evolution. – 1998. – Vol. 30. – P. 31–47.
44. Генетическое разнообразие локуса COI–COII мтДНК медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в Томской области / Н. В. Островерхова [и др.] // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 1. – С. 89–100.
45. Smith, D. R. Mitochondrial DNA and honeybee biogeography. In: Smith DR, editor. Diversity in the genus *Apis*. Boulder, CO: Westview Press. – 1991. – P. 131–176.
46. Biogeographic Study of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia Based on Mitochondrial DNA Analyses / J. Stevanovic [et al.] // Russian Journal of Genetics. – 2010. – Vol. 46(5) – P. 603–609. doi: 10.1134/S1022795410050145.
47. Ivanova, E. Allozyme variability in populations of local Bulgarian honey bee / E. Ivanova, T. Staykova, P. Petrov // Biotechnology and Biotechnological Equipment. – 2010. – Vol. 24(2) – P. 371–374.
48. Hall, H. G. Distinguishing African and European honey bee matrilineages using amplified mitochondrial DNA / H. G. Hall, D. R. Smith // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1991. – Vol. 88. – P. 4 548–4 552.
49. Improved polymerase chain reaction-based mitochondrial genotype assay for identification of the Africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae) / D. J. Nielsen [et al.] // Annals of Entomological Society of America. – 2000. – Vol. 93. – P. 1–6.
50. Crozier, Y. C. An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA / Y. C. Crozier, S. Koulianos, R. H. Crozier // Experientia. – 1991. – Vol. 47(9). – P. 968–969. doi: 10.1007/BF01929894.
51. Genetic structure of Africanized honey bee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI–COII patterns / T. Collet [et al.] // Heredity. – 2006. – Vol. 97. – P. 329–335. doi: 10.1038/sj.hdy.6800875.
52. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae) / F. Cánovas [et al.] // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2008. – Vol. 46(1). – P. 24–30. doi: 10.1111/j.1439-0469.2007.00435.
53. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera* / G. M Weinstock [et al.] // Nature. – 2006. – Vol. 443. – № 7114. – P. 931–949.
54. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* / A. Wallberg [et al.] // Nature Genetics. – 2014. – Vol. 46. – P. 1081–1088.

55. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) genome / M. Solignac [et al.] // *Molecular Ecology Notes*. – 2003. – Vol. 3. – P. 307–311.
56. Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives / M. Solignac [et al.] // *Molecular Ecology Notes*. – 2003. – Vol. 3(4). – P. 556–559. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00510.
57. Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera* / G. Soland-Reckeweg [et al.] // *Journal of Insect Conservation*. – 2009. – Vol. 13. – P. 317–328. doi: 10.1007/s10841-008-9175-0.
58. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland / A. Oleksa [et al.] // *Journal of Apicultural Research*. – 2011. – Vol. 50(2). – P. 116–129. doi: 10.3896/IBRA.1.50.2.03).
59. The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time / K. E. Clarke [et al.] // *Evolution*. – 2002. – Vol. 56(7). – P. 1462–1474.
60. Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores / P. De la Rúa [et al.] // *Apidologie*. – 2006. – Vol. 37. – P. 699–708.
61. Molecular genetic analysis of tracheal mite resistance in honey bees / A. L. Bourgeois [et al.] // *Journal of Apicultural Research*. – 2015a. – Vol. 54, is. 4. – P. 314–320.
62. Нозематоз типа С в Сибири: ретроспективный анализ / Н. В. Островерхова [и др.] // *Пчеловодство*. – 2018б. – № 1. – С. 32–34.
63. Potential use of major royal jelly proteins (MRJPs) as molecular markers for royal jelly production in Africanized honeybee colonies / T. V. Baitala [et al.] // *Apidologie*. – 2010. – Vol. 41. – P. 160–168.
64. Характеристика нуклеотидной последовательности микросателлитного локуса *mtjrp3* у медоносных пчел разного происхождения / Н. В. Островерхова [и др.] // *Генетика*. – 2018а. – Т. 54, № 3. – С. 335–341.
65. Genetic variability of local Bulgarian honey bees *Apis mellifera macedonica (rodopica)* based on microsatellite DNA analysis / S. R. Nikolova [et al.] // *Journal of Apicultural Science*. – 2011. – Vol. 55, is. 2. – P. 117–129.
66. Дифференциация карпатских и крайних пчел с использованием микросателлитов / Н. А. Зиновьева [и др.] // *Пчеловодство*. – 2013. – № 1. – С. 14–17.
67. Опыт молекулярно-генетической сертификации пасеки / А. Г. Николенко [и др.] // *Пчеловодство*. – 2013. – № 5. – С. 14–15.
68. Генетические показатели бурзянской популяции *Apis mellifera mellifera* L. / М. Д. Каскинова [и др.] // *Биомика*. – 2016. – Т. 8, № 2. – С. 117–124.
69. Азаренко, В. В. Научное сопровождение ведения отрасли пчеловодства и использования ее продукции / Актуальные вопросы современного пчеловодства: Материалы Международной научно-практической конференции, проводимой под эгидой Федерацией пчеловодческих организаций «Апиславия» (Минск, 20–22 мая 2021 г. / Институт плодоводства Национальной академии наук Беларуси, Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь; редкол.: П. А. Красочко (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Белорусская наука. – 2021. – С. 6–7.
70. Генетическая характеристика медоносных пчел *Apis mellifera* L., разводимых на пасеках Беларуси / Е. В. Гузенко [и др.] // *Пчеловодство холодного и умеренного климата: Материалы 5-й Международной научно-практической конференции. Москва–Псков. 19–20 октября 2021 г. Псков. Сборник включен в РИНЦ*. – С. 48–52.
71. Дифференциация медоносных пчел, разводимых на пасеках Беларуси, с помощью комплекса молекулярных маркеров / Е. В. Гузенко [и др.] // Актуальные вопросы современного пчеловодства: Материалы Международной научно-практической конференции, проводимой под эгидой Федерацией пчеловодческих организаций «Апиславия» (Минск, 20–22 мая 2021 г. / Институт плодоводства Национальной академии наук Беларуси, Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь; редкол.: П. А. Красочко (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Белорусская наука. – 2021. – С. 22–23.

E. V. Guzenko, A. I. Tsar, V. A. Lemesh

## IDENTIFICATION METHODS FOR THE TAXONOMIC AFFILIATION OF THE HONEY BEE *APIS MELLIFERA* L.

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

The Article presents a review of literature data on the use of various methods for the taxonomic affiliation of the honey bee *Apis mellifera* L. The results of the study aimed at developing of identification methods by morphological and molecular-genetic traits of bees have been analyzed. A focus of attention is directed to the global problem of honey bee mongrelism and its effects on biodiversity conservation and the global economy. It was noted that in the conditions of increasing hybridization of honey bee breeds and lines, traditional morphometry methods are not sufficient for identification and it is necessary to apply state-of-the-art molecular methods to analyze the genome.

**Keywords:** honey bee, *Apis mellifera* L., hybridization, crossbreeding, identification methods, mitochondrial DNA analysis, nuclear DNA analysis.

*Дата поступления в редакцию: 09 марта 2022 г.*



О. Ю. Урбанович

## К 85-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА НИКОЛАЯ АЛЕКСАНДРОВИЧА КАРТЕЛЯ. ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ РАСТЕНИЯ — ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

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

Представлены обобщающие результаты деятельности лаборатории молекулярной генетики в области создания генетически модифицированных растений. Под руководством академика Н. А. Картеля были созданы трансгенные растения табака, арабидопсиса, картофеля, наперстянки, рапса с генами *rhlA* и *rhlB* биосинтеза рамнолипидов, эндохитиназы *chiA*, *cry3aM Bacillus thuringiensis*, кодирующего дельта эндотоксин, *cypl1a1* цитохрома р450scс животного происхождения, глюкозооксидазы, устойчивости к гербициду глюфосинату и др. Рассмотрены перспективы развития в области трансгеноза растений.

**Ключевые слова:** трансгенные растения, генетически модифицированные организмы, целевые гены, генетическая трансформация.

«По-видимому, ни одна из наук не вызвала такой огромный научный и общественный резонанс в мире как генетическая инженерия...»  
академик Н. А. Картель



5 мая 2022 года исполняется 85 лет со дня рождения выдающегося деятеля белорусской науки академика Николая Александровича Картеля, доктора биологических наук, профессора, академика Международной академии наук Евразии, заслуженного деятеля науки Республики Беларусь. Он внес огромный вклад в развитие молекулярной генетики в стране. Под руководством академика Н. А. Картеля защищено 16 кандидатских диссертаций, опубликовано 648 научных работ. С 1994 года по 2004 год он был директором Института генетики и цитологии НАН Беларуси, по 2012 год возглавлял лабораторию молекулярной генетики, которую создал в 1985 году [1].

Академик Н. А. Картель всегда стоял на передовых рубежах науки. Под его руководством в стране были осуществлены первые исследования с применением методов секвенирования, ПЦР, клонирования, проведены эксперименты по ДНК-идентификации личности, разработаны и внедрены в селекционный процесс молекулярные маркеры и др. [1]. Первые

препараты очищенной ДНК в Беларуси также были получены под его непосредственным руководством. Тогда, в результате исследований, проведенных совместно с академиком Н. В. Турбиным, В. Ф. Соيفером и др. было показано, что экзогенная ДНК может влиять на проявление отдельных признаков сельскохозяйственных растений [2, 3]. С этого времени тема генетически модифицированных организмов стала активно развиваться академиком Н. А. Картелем. Он отмечал, что методология генетической инженерии таит в себе огромные возможности для целенаправленного преобразования живых существ, создания различных новых биотехнологий, которые позволяют выходить на совершенно новый уровень развития многих отраслей хозяйственной деятельности человека [4].

В 1990 году вышла статья Н. А. Картеля с соавторами, в которой был представлен эксперимент, где для создания генетически модифицированных растений была использована рекомбинантная плаزمид, несущая целевой ген. Экспериментальные исследования были проведены на линии ячменя Min 90-5. Выбранная для трансформации плазмид рABD1 несла ген устойчивости к антибиотику канамицину [5]. В дальнейшем технологии создания трансгенных растений были успешно развиты, что нашло отражение в многочисленных научных публикациях Н. А. Картеля [1, 4, 6]. Большое внимание уделялось совершенствованию как непосредственно методов трансформации, так и созданию эффективных векторных конструкций. В результате были получены генетически модифицированные модельные и сельскохозяйственные растения, несущие целевые гены, выполняющие различные функции. Так, с помощью метода агробактериальной трансформации были созданы растения табака и арабидопсиса, несущие гены биосинтеза рамнолипидов (*rhlA* и *rhlB*), толерантные к некоторым тяжелым металлам и способные к деградации нефтепродуктов [7, 8]. Разработаны оригинальные системы гетерологичной экспрессии гена *cry3aM* *Bacillus thuringiensis*, кодирующего дельта эндотоксин в растениях картофеля с целью выявления наиболее эффективной экспрессионной системы для создания растений, устойчивых к колорадскому жуку. Были получены трансгенные растения карто-

феля, проявляющие устойчивость к личинкам колорадского жука. Для трансформации была сконструирована векторная конструкция, несущая ген *cry3aM* из *Bacillus thuringiensis* и последовательность репортерного гена лихеназы. В качестве регуляторного элемента был использован светоиндуцибельный промотор, обеспечивающий преимущественную экспрессию контролируемых генов только в зеленых тканях растений, которые являются мишенями для насекомых-вредителей [9].

На модельных растениях трансгенного табака показана способность гена эндохитиназы *Chia-Spl* из почвенной бактерии *Serratia plymuthica* к подавлению роста различных возбудителей заболеваний растений в системе *in vitro* [10]. Полученные растения обладали повышенной устойчивостью к таким патогенам, как *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* и *Alternaria solani*.

Впервые показано, что гетерологичный ген, кодирующий полноразмерную последовательность кДНК *cypl1a1* цитохрома р450<sub>scc</sub> животного происхождения, экспрессируется в растениях табака и наперстянки с образованием функционально активного белкового продукта. Выявлено, что экспрессия гетерологичного гена *cypl1a1* в трансгенных растениях приводит к формированию у них фенотипа, характеризующегося сокращенным периодом вегетативного развития (раннее цветение и созревание семенных коробочек), увеличенной биомассой и повышенной продуктивностью. Впервые показано, что белковый продукт гена *cypl1a1* животного происхождения интегрируется в стероидогенную систему растений, вызывая изменения в метаболизме стероидных соединений. Установлено, что содержание кардиотонических стероидных гликозидов в листьях трансгенных растений наперстянки двух независимых генетических линий превышает таковое в листьях контрольных растений на 11–16% [1, 11, 12].

Ген *cypl1a1* цитохрома P450<sub>scc</sub> из коры надпочечников быка показал интересный эффект и у рапса [13]. Трансгенные линии ярового рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) на основе сорта Магнат белорусской селекции были созданы методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации с помощью конструкции несущей транскрипционно ак-

тивные гетерологичные гены: млекопитающих — *cypl1a1* цитохрома P450scs и бактериальный — *bar*. Посредством биометрического анализа в данных линиях T<sub>1</sub>—T<sub>3</sub> поколений установлено стабильное увеличение массы 1 000 семян и показателей главной кисти (длины, количества стручков и боковых побегов). В результате биохимического анализа в последующих экспериментах было показано, что инсерция гетерологичного гена *cypl1a1* не оказывает влияния на качественный состав масла семян трансгенных линий, однако отмечены существенные изменения в количественном соотношении жирных кислот в семенах трансгенных линий в T<sub>0</sub>—T<sub>3</sub> поколениях при сравнении с контролем. При сравнении содержания белка в двух выборках видно, что отдельные трансгенные линии превышают контроль в поколениях. Различия по содержанию белка в контрольных и трансгенных линиях могут зависеть от уровня экспрессии трансгена и места встраивания в растительный геном [14, 15].

Впервые проведена оптимизация нуклеотидной последовательности нативного гена *gox* грибного штамма *P. Funiculosum* 46.1 для эффективной экспрессии в растениях *S. tuberosum*. Получена искусственно синтезированная нуклеотидная последовательность *gox-mod* с оптимизированным кодоновым составом, но без изменения аминокислотной последовательности его белкового продукта, кодирующая функционально активную форму фермента глюкозооксидазы. Созданы конструкции векторов с нативным и модифицированным геном. Разработана технология создания трансгенных растений табака и картофеля с геном глюкозооксидазы [16, 17].

В настоящее время работы по созданию ГМ растений успешно продолжаются. Совершенствуются методы трансформации, позволяющие увеличить выход трансформантов. Изучаются гены-кандидаты для создания трансгенных растений с хозяйственно ценными качествами. Разрабатываются эффективные векторные конструкции, обеспечивающие включение целевого гена в геном растения и его эффективную экспрессию. Исследуются свойства созданных трансгенных растений [15, 18].

В частности, в лаборатории были продол-

жены работы по выделению трансгенных растений сорта картофеля белорусской селекции Скарб с нативным и модифицированным геном *gox* и *gox-mod*. Показано, что введение их в растительный геном приводит к синтезу в трансгенных растениях картофеля функционально активной формы фермента глюкозооксидазы и увеличению концентрации эндогенного пероксида водорода. Экспериментальные исследования показали, что экспрессия генов *gox* и *gox-mod* в трансгенных растениях картофеля приводит к повышению устойчивости к фитофторозу, вызываемому фитопатогеном *P. infestans*. Они повреждаются в среднем на 16% меньше, чем исходные растения. Кроме этого, растения с экспрессией гена *gox* и повышенным содержанием АФК оказались более устойчивы к низкой температуре, чем исходный сорт картофеля и растения, трансформированные вектором без целевого гена. Таким образом, введение чужеродного гена *gox* в геном картофеля позволило улучшить его хозяйственно ценные свойства и привело к устойчивости трансгенных растений к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды [19, 20].

То, что созданные трансгенные растения приобретают хозяйственно ценные свойства, позволило перейти от этапа лабораторных исследований к следующему этапу — проведению испытаний трансгенных растений в контролируемых полевых условиях. Испытанию подверглись трансгенные линии картофеля, полученные на основе сорта Скарб, содержащие гетерологичный ген *cry3Am*, кодирующий эндотоксин, губительно действующий на колорадского жука. Было получено разрешение № 1 Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь от 16 июня 2014 года на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов в окружающую среду. Растения были высажены на специально оборудованном для таких испытаний поле института. Испытания длились два года и показали, с одной стороны, биологическую безопасность созданных растений, с другой стороны, что поражаемость трансгенных растений колорадским жуком на 1,5 балла ниже, чем не трансгенных. Эффект от введения гена есть.

И здесь мы сталкиваемся с очень серьезной

проблемой. Если бы такие растения были получены традиционными методами селекции, они бы, безусловно, вызвали интерес у селекционеров. Но трансгенные растения не спешат выращивать на наших полях, несмотря на то, что история их создания насчитывает почти 40 лет. О первом генетически модифицированном растении табака было сообщено в 1983 году. В 1986 году прошли первые полевые испытания трансгенных растений. В 1992 году Китай начал коммерциализацию трансгенных растений. Сейчас генетически модифицированные сорта растений выращиваются на миллионах гектаров. Мировыми лидерами по их производству являются США, Бразилия, Аргентина, Индия и Канада. Созданы сотни сортов генетически модифицированных растений. Наибольшие площади занимают генетически модифицированные сорта сои, кукурузы, хлопка. Генетически модифицированные сорта выращиваются более чем в 40 странах: Северной и Южной Америке, Африке, Австралии, регионах юго-восточной Азии и т. д., но не в Европе, России и Беларуси. Как показывают социологические опросы, более 80% жителей России выступают против трансгенных организмов. Если бы такой опрос был проведен в Беларуси, результат был бы, скорее всего, похожий. Люди с осторожностью относятся к генетически модифицированным организмам, и это факт, с которым невозможно не считаться.

О спорах между противниками и сторонниками генетически модифицированных организмов всем известно, как и об аргументах, приводимых сторонами. Но возрастающее с каждым годом количество видов и сортов трансгенных растений, а также посевные площади, которые они занимают, говорит о том, что от данной технологии отказываться не будут, она будет расширяться и захватывать новые рынки.

Для нас же первостепенное значение имеет то, каким образом развивать стратегию создания ГМ растений в стране. И здесь хорошо просматриваются два важных направления. Первое — изучение функции генов и выделение генов-кандидатов для создания трансгенных растений с хозяйственно ценными признаками. И второе — использование новых методов, позволяющих свести к минимуму ри-

ски, возникающие при модификации генома.

Так, большой интерес представляют гены, кодирующие NAD(P)H дегидрогеназы (*ndb*). Они играют важную роль в реакции растений на стресс. Точная физиологическая функция этого семейства не изучена. Считается, что вместе с альтернативной оксидазой кодируемые ими белки участвуют в образовании нефосфорилирующей дыхательной цепи при окислительном стрессе и подавляют образование активных форм кислорода. Предполагается, что фермент «внешней» нефосфорилирующей НАДН-дегидрогеназы (NDB2) влияет на функционирование митохондрий, экспрессию генов стрессовой реакции и программы стрессовой сигнализации. Мы с помощью методов биоинформатики выделили ген *ndb2* из генома арабидопсиса, создали эффективные векторные конструкции, в которых данный ген был встроен как в прямой, так и в обратной ориентации. В результате были созданы трансгенные растения табака, несущие ген *ndb2* арабидопсиса в прямой и обратной ориентации. Предполагалось, что такие растения должны иметь измененный уровень АФК и, соответственно, защитную систему клетки, работающую в ином режиме. Ожидалось, что созданные трансгенные, несущие ген *ndb2*, проявят устойчивость к стрессу, в частности к резкому перепаду температур. Экспериментальные исследования показали, что при воздействии как низких (+4 °C), так и высоких (+40 °C) температур на трансгенные растения табака, несущие ген *ndb2*, выделенный из генома *Arabidopsis thaliana*, в прямой и обратной ориентации, происходит изменение уровня экспрессии генов, кодирующих НАДФ-Н дегидрогеназы *ndb1*, *ndb2*, *ndb4* из генома табака по сравнению с контрольными нетрансгенными растениями табака. Это свидетельствует об участии гена *ndb2* в цепи биохимических реакций, индуцируемых стрессовыми воздействиями. Было показано, что в листьях растений табака Т4 происходила экспрессия гена *NDB2* и накопление белка NDB2 *A. thaliana* в митохондриях. Сверхэкспрессия *AtNDB2* изменяла экспрессию генов табака, участвующих в альтернативных путях переноса электронов, оказывала влияние на содержание белков, вовлеченных в стрессовый ответ. Это исследование выполнялось совместно с учеными из Си-

бирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск [21, 22]. Таким образом, созданные модельные растения позволяют лучше понять функцию гена. Кроме того, полученные трансгенные растения выдерживали отрицательные температуры, при которых нетрансгенные растения погибали. Есть основания полагать, что введение данного гена позволит повысить устойчивость растений к абиотическим факторам.

Если говорить о новых методах создания генетически модифицированных организмов, то это, в первую очередь модификация генома с помощью системы CRISPR/Cas. Метод появился менее 10 лет назад и сразу привлек к себе внимание исследователей. CRISPR/Cas9 система является одним из мощнейших инструментов редактирования геномов. Метод основан на способности комплекса, состоящего из sgRNA (single guide RNA) и бактериальной нуклеазы Cas9 (CRISPR associated), вносить точечные двуцепочечные разрывы в участок генома, комплементарный последовательности sgRNA. Специфичность технологии CRISPR/Cas9 обеспечивается за счет направляющей РНК — sgRNA, которая состоит из двух частей — константной, длиной около 70 нуклеотидов, и варибельной, длиной 17–25 нуклеотидов. Константная часть необходима для образования комплекса sgRNA с нуклеазой Cas9, варибельная — для специфического связывания комплекса с целевой последовательностью в геноме. В геномной ДНК к 3'-концу участка, комплементарного sgRNA, должна примыкать так называемая последовательность PAM (protospacer adjacent motif), необходимая для связывания комплекса Cas9-sgRNA с геномной ДНК.

Редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas позволяет менять работу генов клетки, внося изменения в их первичную структуру, что может приводить как к замолчанию отдельных генов, так и к восстановлению функций генов, если она была нарушена, например, в результате мутации. В настоящее время с помощью этой системы получены растения как модельных объектов (табак, арабидопсис), так и имеющих важное хозяйственное значение (рис, огурец, картофель, яблоня, цитрусовые и др.) [23–25].

Сотрудники лаборатории молекулярной ге-

нетики также начали исследования по редактированию генома с помощью системы CRISPR/Cas9. С применением методов биоинформатики и онлайн-ресурсов проведено моделирование и синтезированы искусственные спейсеры для нокаута гена мишени *pds Nicotiana tabacum*, кодирующего фермент 15-дифитоендесатуразу. Растения с нарушенной работой данного гена приобретают фенотип альбиноса, что является удобным фенотипическим признаком для отбора трансформантов. В результате экспериментов по клонированию получены векторные конструкции на основе бинарного вектора, несущего CRISPR/Cas9 систему, в состав которой входят спейсеры к различным кодирующим последовательностям гена-мишени. Полученные векторные конструкции использованы в редактировании генома модельного объекта табака для нокаута гена *NiPDS*. В результате впервые в стране нами были получены генетически модифицированные растения табака с помощью системы CRISPR/Cas9. Полученные результаты позволяют нам переходить к этапу создания генетически модифицированных сельскохозяйственных растений нового поколения.

И хотя в настоящее время растения, полученные методом геномного редактирования, относятся к трансгенным, совершенствование технологии CRISPR/Cas9 позволяет уже сейчас получать генотипы, в которых отсутствуют чужеродные маркерные гены устойчивости и промоторы. Изменению подвергается только непосредственно область редактирования, иногда длиной в один нуклеотид. Активно обсуждается вопрос о том, чтобы на такие организмы не распространялись правила и ограничения, принятые для трансгенных растений, что откроет большие возможности для их использования.

### Список используемых источников

1. Николай Александрович Картель: к 80-летию со дня рождения / Нац. акад. наук Беларуси, И-т генетики и цитологии; сост.: Н. И. Рябоконт [и др.] ; науч. ред.: Л. В. Хотылёва, А. В. Кильчевский. – Минск: Беларуская навука, 2017. – 149 с.: ил. – (Библиография ученых Беларуси). ISBN 978-985-08-2235-2

2. Генетическое изменение признака Waxu у ячменя под влиянием экзогенной ДНК дико-

- го типа / Н. В. Турбин [и др.] // Сельскохозяйственная биология. Сер. Биология растений. – 1974. – Т. 9, № 2. – С. 204–215.
3. Genetic modification of the waxy character in barley under the action of exogenous DNA of the wild variety / N. V. Turbin [et al.] // Mutation Research. – 1975. – Vol. 27, № 1. – P. 59–68.
4. Генетически модифицированные растения, принципы их создания / Н. А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; [редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.), Н. А. Картель и др.]. – Минск. – 2006. – Т. 3. – С. 135–142.
5. Растения ячменя с введенным геном канамицин-устойчивости / Н. А. Картель [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 1990. – Т. 34, № 3. – С. 261–263.
6. Биотехнология в растениеводстве: учебник / Н. А. Картель, А. В. Кильчевский. – Мн.: Техналогия, 2005. – 310 с.: ил. ISBN 985-458-126-8.
7. Bioremediation with ecologically safe plants / G. G. Brychkova, A. P. Sorokin, N. A. Kartel // Genomics for Biosafety in Plant Biotechnology. JOS Press. – 2004. – P. 147–158.
8. Толерантность генетически модифицированных растений табака к алюминию / Г. Г. Бричкова [и др.] // Цитология и генетика. – 2007, № 3. – С. 23–28.
9. Экспериментальные модели для создания трансгенных растений, устойчивых к стрессовым факторам / И. В. Голденкова-Павлова [и др.] // Цитология и генетика. – 2007, № 3. – С. 44–49.
10. Сравнительный анализ ингибирования роста фитопатогенов хитиназой ChiaSpr1 на модели трансгенных растений табака / А. В. Шахбазов, А. С. Панюш, Н. А. Картель // Вестник фонда фундаментальных исследований. – 2007. – Т. 1, № 8. – С. 37–43.
11. Создание и характеристика трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L., экспрессирующих кДНК CYP11A1 цитохрома P450scs / С. Г. Спивак [и др.] // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 9. – С. 1 217–1 224.
12. Некоторые особенности метаболизма стероидов в трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum*, несущих кДНК CYP11A1 цитохрома P450scs из коры надпочечников быка / С. Г. Спивак [и др.] // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36, № 2. – С. 241–250.
13. Получение трансгенных растений ярового рапса (*Brassica napus*) экспрессирующих кДНК CYP11A1 цитохрома P450scs животного происхождения / А. М. Шишлова-Соколовская, Н. В. Кучук, Н. А. Картель // Весці НАНБ, сер. біял. Навук. – 2011, № 1. – С. 27–31.
14. Биометрический анализ трансгенных растений ярового рапса с генами животного CYP11A1 и бактериального bar происхождения / А. М. Шишлова-Соколовская, Н. А. Картель, М. П. Шишлов // Фізіологія рослин і генетика. – 2017. – Т. 49, № 3. – С. 218–228.
15. Biochemical composition of seeds of transgenic spring rapeseed plants carrying the mammalian CYP11A1 gene / А. М. Shishlova-Sokolovskaya, S. G. Efimenko // Фізіологія рослин і генетика. – 2020. – Т. 52, № 6. – С. 483–493.
16. Генетическая трансформация растений векторными конструкциями с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д. В. Савчин, А. С. Панюш, Н. А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. / Ин. генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол. А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.] Минск: Право и экономика. – 2011. – Т. 12. – С. 49–55.
17. Савчин, Д. В. Создание и анализ трансгенных растений картофеля и табака с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д. В. Савчин, А. С. Панюш, Н. А. Картель // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012, № 4. – P. 16–19.
18. Оптимизация кодонового состава грибного гена *gox Penicillium funiculosum* для эффективной экспрессии в растениях *Solanum tuberosum* / Д. В. Савчин, Т. Н. Вересова, О. А. Межнина, А. С. Панюш, А. О. Вячеславова, И. В. Голденкова-Павлова. – 2015. – № 1. – С. 50–55.
19. Comparative analysis of some Hsps synthesis in leaves of transgenic potato plants with gene *gox* at high temperature / G. B. Borovskii [et al.] // J. Stress Physiol. & Biochem. – 2015. – Vol. 11, № 4. – P. 5–10.
20. Biological effects of potato plants with glucose oxidase gene and their resistance to hyperthermia / O. I. Grabelnych [et al.] // J. Stress Physiol. & Biochem. – 2017. – Vol. 13, № 1. – P. 5–14.
21. Создание трансгенных растений *Nicotiana tabacum* с геном *ndb2 Arabidopsis thaliana* для изучения реакции на стресс / Д. В. Савчин,

П. В. Кузмицкая, О. Ю. Урбанович, И. В. Федосеева, Г. Б. Боровский // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук – 2017. – № 1. – С. 54–61. / Д.В. Савчин [et al.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017, № 1. – С. 54–61.

22. Трансформация *Nicotiana tabacum* конструкцией, несущей ген *ndb2* из *Arabidopsis thaliana* в антисмысловой ориентации / А. М. Шишлова-Соколовская [et al.] // 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. – 2017. – Т. 22. – С. 64–83.

23. CRISPR/dCas9 platforms in plants: strategies and applications beyond genome editing / M. Moradpour, S.N.A. Abdulah // Biotechnology Journal. – 2020, № 18. – P. 32–44.

24. Hotter, drier, CRISPR: the latest edit on climate change / K. Massel [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2021. – Vol. 134, № 6. – P. 1 691–1 709.

25. Engineering Plant Immunity: Using CRISPR/Cas9 to Generate Virus Resistance / S. S.-e.-A. Zaidi [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2016. – Vol. 7.

O. Yu. Urbanovich

## BY THE 85TH ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF ACADEMICIAN NIKOLAI ALEXANDROVICH KARTEL GENETICALLY MODIFIED PLANTS — HISTORY AND PROSPECTS

State Scientific Institution

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

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: O.Urbanovich@igc.by

The generalizing results of the activity of the laboratory of molecular genetics in the field of creation of genetically modified plants are presented. Under the leadership of academician N.A. Kartel created transgenic plants of tobacco, arabidopsis, potato, foxglove, rapeseed with genes *rhlA* and *rhlB* rhamnolipid biosynthesis, endochitinase *chiA*, *cry3aM* *Bacillus thuringiensis* encoding delta endotoxin, *cyp11a1* cytochrome p450scs of animal origin, glucose oxidase, resistance to the herbicide glufosinate, etc. The prospects are considered in the field of plant transgenesis.

**Keywords:** transgenic plants, genetically modified organisms, target genes, genetic transformation.

Дата поступления статьи: 23 февраля 2022 г.

## ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ ПО ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

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

Статьи публикуются на русском, белорусском и английском языках.

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

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

### ДЛЯ ОПУБЛИКОВАНИЯ РАССМАТРИВАЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ТИПЫ СТАТЕЙ

#### Экспериментальная статья

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

#### Обзорная статья

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

#### Краткое сообщение

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

### СТРУКТУРА СТАТЬИ

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

#### 1. УДК

Располагается в верхнем левом углу страницы.

#### 2. Инициалы и фамилии авторов

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



### 3. Название статьи

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

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

### 4. Место работы авторов с почтовым адресом

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

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

### 5. Авторское резюме (аннотация)

Располагается после места работы авторов, набирается прямым начертанием.

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

### 6. Ключевые слова (5–10 слов)

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

### 7. Основной текст статьи

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

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

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

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

Вставка в текст символов (например,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ) производится только через опцию Вставка/Символ.

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

#### *Общие правила набора текста*

Прямое начертание должны иметь:

- 1) греческие символы ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\phi$ ,  $\lambda$  и др.) и знаки ( $\%$ ,  $\leq$ ,  $\pm$ ,  $\times$ ,  $\neq$ ,  $\infty$ ,  $\rightarrow$ ,  $^\circ$ ,  $\notin$  и др.);
- 2) единицы измерения (Вт, В, Дж, кг, м и пр.);
- 3) кириллические (т. е. русские) буквы (П, Л, Ц);
- 4) сокращения от русских или белорусских слов ( $q_{св}$ );
- 5) обозначения химических элементов и соединений (Р,  $H_2O$ );
- 6) названия белков;
- 7) скобки ( ) и запятые ( , ) в формулах и после них ( $x^2 - 0,5b(1,5 + ca)$ ).

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

Без пробелов следует проставлять:

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

С пробелами проставлять:

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

#### *Требования к рисункам*

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

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

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

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

#### *Оформление таблиц*

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

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

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

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

Примечание к таблице располагается на следующей строке после таблицы. Слово **Примечание** выделяется полужирным начертанием, после него ставится точка. Текст примечания следует за словом **Примечание** и начинается с прописной буквы. Точка после текста примечания не ставится.

Четко указывается размерность показателей. Цифры в таблицах должны соответствовать своему упоминанию в тексте статьи.

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

#### *Информация о соблюдении требований Нагойского протокола*

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

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

#### *Информация о соблюдении биоэтических стандартов*

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

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

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

#### *В конце статьи по желанию авторов приводится следующая справочная информация:*

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

#### **8. Список использованных источников**

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

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

#### **9. На английском языке повторяются п. 2–6**

#### **10. Дата поступления статьи**

**К статье прилагаются:**

**1. Акт экспертизы** о возможности опубликования в открытой печати.

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

Авторы несут ответственность за достоверность представленных в рукописи материалов.

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

Бумажный экземпляр статьи подписывается всеми авторами.

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

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

Научное издание

## **МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА**

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 32

Ответственный за выпуск *Е. М. Селихова*  
Переводчик *М. Г. Пыжова*

Подписано в печать 08.04.2022 г. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага мелованная. Гарнитура Times.  
Печать цифровая. Усл. печ. л. 16,05. Уч.-изд. л. 15,35. Тираж 100 экз. Заказ № 210.

Отпечатано в государственном предприятии «СтройМедиаПроект»  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 2/42 от 13.02.2014.  
220123, г. Минск, ул. В. Хоружей, 13/61

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