

Том 60, Номер 5

ISSN 0016-6758

Май 2024



# ГЕНЕТИКА



НАУКА  
— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 60, номер 5, 2024

---

---

## Обзорные и теоретические статьи

- Локализация генетических факторов, обуславливающих хозяйственно полезные признаки груши (*Pyrus*) и методики маркер-вспомогательной селекции  
*А.А. Павленко, А.В. Пикунова* 3
- CNV у пациентов с нарушениями психомоторного развития: метаанализ  
*Д.А. Федотов, А.А. Кашеварова, И.Н. Лебедев* 26

---

## Генетика животных

- Генетическая изменчивость средней бурозубки (*Sorex caecutiens* Laxmann, 1788) бассейна реки Колымы и на Чукотке  
*В. В. Переверзева, Н. Е. Докучаев, А. А. Примак, Е. А. Дубинин* 42
- Генетическое разнообразие пашенной полевки *Microtus agrestis* (Arvicolinae, Rodentia) центральной части Северной Евразии по данным анализа гена цитохрома *b*  
*Л. Э. Ялковская, М. А. Крохалева, Е. А. Маркова, А. В. Бородин, С. А. Борисов, М. В. Чибиряк, А. В. Бобрецов* 51

---

## Генетика человека

- Сравнительный анализ мутаций в буккальном эпителии и крови у пациентов с раком легких и здоровых людей  
*О. В. Сержантова, А. Г. Новикова, А. А. Михайлов, И. П. Мошуров, А. П. Гуреев* 66
- Гиперметилирование при раке яичников генов длинных некодирующих РНК: *HOTAIR, GAS5, LINC00472, LINC00886, TUG1*  
*А. М. Бурдённый, С. С. Лукина, Л.А. Урошлев, Е. А. Филиппова, И. В. Пронина, М. В. Фридман, К. И. Жордания, Т. П. Казубская, Н. Е. Кушлинский, В. И. Логинов, Э. А. Брага* 83

Информативность стандартных аутосомных STR  
в популяциях коренных народов России  
для определения родства первой степени

*К. В. Вагайцева, М. Е. Лопаткина, Н. А. Колесников,  
В. Н. Харьков, В. А. Степанов*

95

---

**Краткие сообщения**

Распространение генов гибридного некроза в генотипах сортов  
озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) английской селекции

*В.А. Пухальский, А.М. Кудрявцев*

102

УДК 634.13:577.2

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ ХОЗЯЙСТВЕННО ПОЛЕЗНЫЕ ПРИЗНАКИ ГРУШИ (*Pyrus*), И МЕТОДИКИ МАРКЕР-ВСПОМОГАТЕЛЬНОЙ СЕЛЕКЦИИ

© А. А. Павленко<sup>1</sup>\*, А. В. Пикунова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, Орловская область, дер. Жилина, 302530 Россия

\*e-mail: pavlenko@orel.vniispk.ru

Поступила в редакцию 25.09.2023 г.

После доработки 07.12.2023 г.

Принята к публикации 14.12.2023 г.

ДНК-маркеры являются альтернативным классическому отбору гибридов ускоренным методом выявления генов и локусов значимых для селекции признаков на ранних этапах онтогенеза, а следовательно, методом интенсификации селекционного процесса. В настоящей статье приведены исследования, посвященные локализации хозяйственно полезных признаков в геноме груши, разработке и использованию методик маркер-вспомогательной селекции (МВС). На данный момент в геноме груши локализован ряд генетических факторов: устойчивость к болезням и вредителям, а именно устойчивость к парше европейской (*V. pirina* Aderh) и азиатской (*V. nashicola*), к черной пятнистости (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler) и бурой пятнистости (*Stemphylium vesicarium*), бактериальному ожогу (*Erwinia amylovora*), грушевой медянице (*Cacopsylla pyri*), грушевому пилильщику (*Caliroa cerasi*), грушевому пузырчатому клещу (*Eriophyes pyri*), локус самонесовместимости, ген карликовости. Также определены основные (major) гены и локусы количественных признаков (QTLs) качественных характеристик плодов, а именно: цвет кожицы и оржавленность плода, размер и масса плодов, вкусовые качества, уровень производства этилена, сроки сбора плодов. Следует отметить, что отечественные работы ограничены валидацией и использованием разработанных за рубежом методик МВС. По опыту японских ученых, использование МВС на несколько ключевых признаков позволило значительно повысить эффективность селекционного процесса. Несмотря на ограниченный на данный момент перечень методик МВС для груши, высокий темп изучения геномов гарантирует достаточно быструю разработку новых методик в будущем. В сочетании с новыми технологиями селекции (New Breeding Technics) применение МВС для груши является перспективным направлением селекции.

**Ключевые слова:** методики МВС, QTL, болезни растений, самонесовместимость, карликовость, качество плодов.

**DOI:** 10.31857/S0016675824050014 **EDN:** CJSNUW

Груша (род *Pyrus*, семейство Rosaceae) является важной плодовой культурой. Плоды груши обладают высокими потребительскими качествами, имеют превосходный вкус и аромат, могут быть использованы для употребления в свежем виде и для переработки [1].

Груша имеет большой потенциал в промышленном производстве. На основании данных ФАО (Продовольственная и сельскохозяйственная Организация Объединенных Наций) можно проследить динамику роста производства груши в мире. За период с 1990 г. по 2021 г. (рис. 1) видны изменения в мировом производстве груши от 9.5 млн тонн (суммарное количество производства груши

в 1990 г.) до более чем 22 млн тонн в 2021 г. Также можно отметить, что страны Азии лидируют на протяжении рассматриваемого периода, начиная с производства 4 млн тонн груши (1990 г.) до более чем 20 млн тонн (2021 г.) в год.

За период с 1992 г. по 2021 г. производство груши в Российской Федерации не превышало 96 тыс. тонн (2004 и 2007 гг.). В 2021 г. произведено 79 тыс. тонн груши.

Восточная Азия, районы современного Китая и Японии считаются центром первоначального происхождения груши, как и многих других плодовых листопадных растений [2]. Род *Pyrus* включает по меньшей мере 26 видов, но в основном в

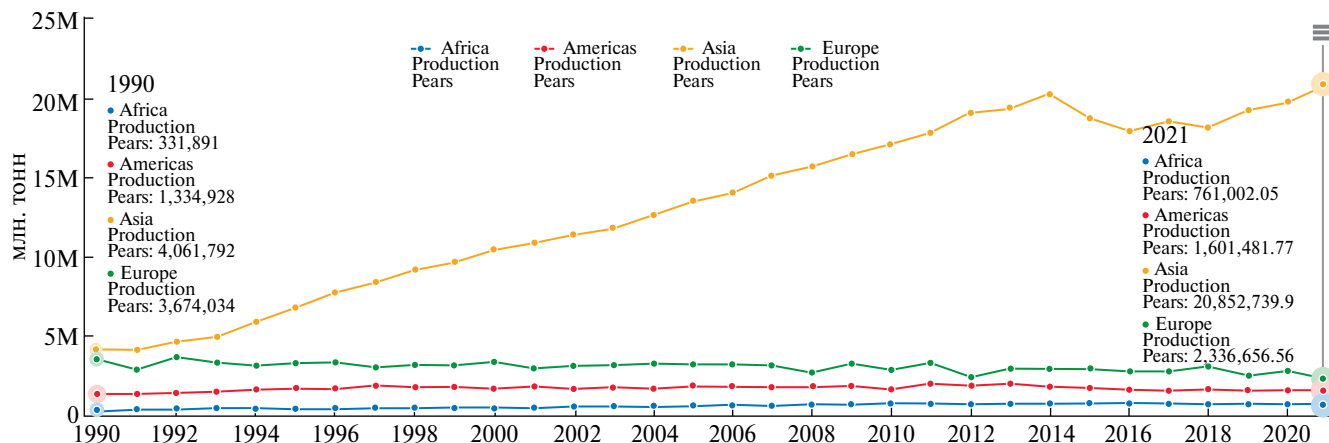


Рис. 1. Динамика увеличения мирового производства груши по отдельным континентам (по данным ФАО 2023 г.).

коммерческих целях выращивают четыре вида: груша обыкновенная (*P. communis* L.), груша грушелистная (*P. pyrifolia* Nakai), китайская груша (*P. bretschneideri* Rehd), груша уссурийская (*P. ussuriensis* Maxim.) [1].

В разных странах предпочитают выращивать различные виды груш. Например, груша обыкновенная (*P. communis* L.) является основным коммерческим видом в Европе, Северной и Южной Америке, Африке, Новой Зеландии и Австралии. Груша грушелистная (*P. pyrifolia* Nakai) считается основным видом в Японии, Южном и Центральном Китае, Тайване и Корее. Китайская груша (*P. bretschneideri* Rehd) – основной вид в Северном и Центральном Китае. Груша уссурийская (*P. ussuriensis* Maxim.) произрастает в диком виде в Северо-Восточном Китае и северной части провинций Хэйбэй и Шаньси. Она также произрастает в диком виде на Дальнем Востоке России и в Северной Корее [3]. В России особую роль играют сорта от скрещивания груши обыкновенной (*P. communis* L.) с грушей уссурийской (*P. ussuriensis*) [4]. Учитывая, что страны Азии лидируют в мировом производстве, можно заключить, что в мировом производстве лидируют сорта потомков груши китайской (*P. bretschneideri* Rehd) и груши грушелистной (*P. pyrifolia* Nakai).

Главная область возделывания груши в России – это Северо-Кавказский регион (Краснодарский и Ставропольский края, Ростовская область, республика Адыгея, Дагестан, Ингушетия, Кабардино-Балкария, Северная Осетия, Чечня) [5].

В Орловской области во Всероссийском НИИ селекции плодовых культур селекционная работа с грушей была начата в 1949 г. Паршиным А.В. С 1956 г. по 1990 г. работа проводилась под руководством Седова Е.Н., а с 1991 г. под руководством Долматова Е.А. В настоящее время работа продолжается под руководством Корнеевой С.А. В результате селекционной работы были созданы новые

сорта груши, которые в настоящее время внесены в Государственный реестр селекционных достижений (Памятная, Память Паршина, Муратовская, Орловская красавица, Орловская летняя, Тютчевская, Есенинская, Лири) [6]. Для груши в качестве подвоя широко используют айву обыкновенную, которая значительно сдерживает рост этой сильнорослой культуры [7].

В Государственном реестре селекционных достижений [8] наблюдается увеличение сортового разнообразия груши. Так, в 2022 г. было допущено к использованию 168 сортов груши обыкновенной (*P. communis* L.) и два сорта груши уссурийской (*P. ussuriensis* Maxim.). В 2023 г. (по состоянию на 23.05.2023 г.) количество груши обыкновенной увеличилось до 177 сортов, а груши уссурийской осталось так же два сорта.

Цель настоящей работы – рассмотреть современный этап исследований по локализации в геноме груши генов и локусов, контролирующих проявление хозяйственно полезных признаков, обобщить опубликованные методы маркер-вспомогательной селекции груши и опыт их применения учеными из разных стран.

## МАРКЕР-ВСПОМОГАТЕЛЬНАЯ СЕЛЕКЦИЯ

Возрастающую потребность в производстве плодовых культур можно удовлетворить за счет повышения урожайности, интенсивности земледелия и применения новых технологий [9]. Внедрение в селекционные программы современных биотехнологических подходов, в том числе основанных на использовании молекулярных маркеров, может способствовать ускорению селекционного процесса и более эффективной адаптации сорта к требованиям, обусловленным климатическими изменениями и потребностями рынка.

Одним из таких биотехнологических подходов является маркер-вспомогательная селекция

(МВС), которая используется в селекционных программах в качестве методического приема для интенсификации селекционных процессов.

Основной принцип маркер-вспомогательной селекции заключается в использовании ассоциаций маркер–признак в практических целях для создания новых сортов и селекционных линий на этапе подбора родительских пар для скрещивания и отбора гибридов. Таким образом, МВС базируется на знаниях о генетике признаков, локализации в геноме генов и локусов, контролирующих проявление конкретных признаков, идентификации тесного сцепления между маркером (маркерами) и геном (генами), контролирующим(и) признак. После того как ассоциации маркер–признак установлены, создание новых генотипов может идти с привлечением традиционных методов селекции (скрещивание, самоопыление, отбор и др.) и использованием маркерного отбора начиная с ранних этапов онтогенеза растения [10, 11]. В настоящее время большое число генов и локусов, контролирующих устойчивость и восприимчивость различных культур к биотическим и абиотическим стрессам, признаки урожайности и их качества, были идентифицированы и картированы с помощью ДНК-маркеров [9]. Однако различные культуры изучены в разной степени и число методик маркер-вспомогательной селекции сильно варьирует.

В основном геном груши является диплоидным и насчитывает 17 пар хромосом, при этом известны триплоидные и тетраплоидные формы [12]. Геном

груши *P. communis* приблизительно насчитывает 577 млн пн (для гаплоидного генома), а для *P. × bretschneideri* – 527 млн пн (для гаплоидного генома). Информация о геномах груши собрана в базе данных геномов семейства Rosaceae [13].

Важно отметить, что между геномами яблони и груши присутствует достаточно большое сходство (синтения). Также интересным фактом является дубликация (наличие хромосом или частей хромосом значительно похожих друг на друга), обнаруженная в геноме груши, как и в геноме яблони [14]. На данный момент секвенированы несколько геномов груши различных видов, а именно *P. communis* d’Anjou draft Genome v1.0, *P. pyrifolia* Cuiguan Genome v1.0, *P. pyrifolia* Genome v1.0, *P. ussuriensis* × *communis* Genome v1.0, *P. betulifolia* Genome v1.0, *P. communis* Bartlett DH Genome v2.0, *P. bretschneideri* DangshanSuli Genome Assembly v1.1, *P. communis* Genome v1.0 [13]. Данные о геноме становятся основой для разработки методик МВС. Хотелось отметить, что изучение молекулярно-биологических основ генетики груши в настоящее время активно продолжается за рубежом, и для ряда признаков работы по локализации в геноме и разработке методик МВС находятся в процессе. При этом ряд методик уже применяется, преимущественно в зарубежной селекции. Опубликованная информация о локализации генов и локусов, ассоциированных с хозяйственно полезными признаками груши, обобщена нами в табл. 1.

**Таблица 1.** Локализация генов и локусов, ассоциированных с хозяйственно полезными признаками груши

| Заболевание, вредитель, признак   | Ген/ локус, аллель  | Молекулярный маркер, сцепленный с геном/локусом, аллелями | ГС* (% фенотипической вариации) | Растительный материал (вид)           | Источник литературы        |
|---|---|---|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Парша (европейская ( <i>V. pirina</i> Aderh), азиатская ( <i>V.nashicola</i> )) | <i>Rvp1</i>   | CH02b10   | 2                               | Navara ( <i>P. communis</i> )         | Bouvier et al., 2012 [15]  |
|   | <i>Rvn2</i> ( <i>Vn</i> ), возможно тот же, что и <i>Rvp1</i> | PSC217-XhoI, PSC234-HaeIII                                | 2                               | Bartlett ( <i>Pyrus communis</i> L.)  | Cho et al., 2009 [16]      |
|   | <i>Vnk</i> ( <i>Rvn1</i> )                                    | PS12A02, NH013a, CH-Vf2, AG04, Hi02c07                    | 1                               | Kinchaku ( <i>P. pyrifolia</i> Nakai) | Terakami et al., 2006 [17] |

Таблица 1 (продолжение)

|  |                               |   |   |  |                                  |
|--|-------------------------------|---|---|--|----------------------------------|
|  | <i>Rvn3</i>                   | HB09  | 6   | Greensis<br>( <i>P. pyriformis</i> ×<br><i>P. communis</i> ) ×<br><i>P. pyriformis</i> )                         | Oh et al.,<br>2021 [18]          |
|  | <i>Rvn4</i>                   | Pbr.chr07.20  | 7   | Hong Li ( <i>P. pyriformis</i> )   | Terakami et al.<br>2023 [19]     |
|  | QTLs                          | E32-M50-3,<br>E34-M48-9,<br>E39-M53-5   | 3<br>7  | Abbé Fétel<br>( <i>P. communis</i> )   | Pierantoni et<br>al., 2007 [20]  |
|  | QTLs                          | SNP: ss527787809  | 7   | PEAR1  | Won et al.,<br>2014 [21]         |
|  |                               | SNP: ss527789299  | 10  | PEAR1  |                                  |
|  |                               | SNP: ss5277891  | 17  | PEAR1  |                                  |
|  |                               | SNP: ss527789556  | 2   | PEAR2  |                                  |
|  |                               | SNP: ss527788406  | 5   | PEAR2  |                                  |
|  |                               | SNP: ss475875799  | 7   | PEAR2  |                                  |
| Черная<br>пятнистость<br>( <i>Alternaria<br/>alternata</i> ) | <i>A</i>                      | CMNB41  | Неизвестно  | Osa Nijisseiki × Oharabeni   | Banno et al.,<br>1999 [22]       |
|  | <i>Ani</i>                    | H04h02,<br>CH03d02  | 11  | Osa Nijisseiki<br>( <i>P. pyriformis</i> Nakai)  | Terakami et al.,<br>2007 [23]    |
|  | <i>Ana</i>                    | H04h02,<br>CH03d02  |   | Nansui<br>( <i>P. pyriformis</i> Nakai)  |                                  |
|  | <i>Aki</i>                    | Mdo.chr11.28,<br>Mdo.chr11.34   |   | Kinchaku<br>( <i>P. pyriformis</i> Nakai)  | Terakami et al.,<br>2016 [24]    |
|  | Mdo.chr11.27,<br>Mdo.chr11.34 | ( <i>P. pyriformis</i> Nakai)<br>( <i>P. bretschnideri</i> Rehd.<br>и <i>P. ussuriensis</i> Maxim.) |   | Terakami et al.,<br>2021 [25]  |                                  |
| Буряя<br>пятнистость   | <i>Sv</i>                     | NZ02B0,<br>AFLP E39M52-3  | 15  | Abbé Fétel<br>( <i>P. communis</i> )   | Cappai et al.,<br>2018 [26]      |
| Бактериальный<br>ожог  | QTL                           | HS02  | 2 (28.1%<br>до 32.3%<br>фенотипиче-<br>ской вариации) | Harrow Sweet'<br>( <i>P. communis</i> L.)  | Le Roux et al.,<br>2012 [27]     |
|  | QTL                           | HS04  | 4   | Harrow Sweet'<br>( <i>P. communis</i> L.)  |                                  |
|  | QTL                           | SSR:<br>RLG1  | 11  | <i>P. ussuriensis</i>  | Bokszczanin et<br>al., 2009 [28] |
|  | QTL                           | CH02c02b  | 4   | Doyenne du Comice<br>( <i>P. communis</i> )  | Montanari et<br>al., 2016 [29]   |
|  |                               | SNP:ss475876829   | 7   | PEAR3<br>(PremP003,<br><i>P. bretschnideri</i> ×<br><i>P. communis</i> ) ×<br>Moonglow<br>( <i>P. communis</i> ) |                                  |
|  |                               | SNP:ss475879846   | 9   |  |                                  |
|  |                               | SNP:ss475879592   | 10  |  |                                  |
|  |                               | SNP:ss475880537   | 12  |  |                                  |
|  |                               | SNP:ss475876971   | 15  |  |                                  |
|  | SNP:ss527789563               | 2   | Moonglow<br>( <i>P. communis</i> )                    |  |                                  |
|  | 7 QTL                         |   | 2   | El Dorado × Potomac,<br>Old Home × Bartlett,<br>NJA2R59T69 × Bartlett  | Zurn et al.,<br>2020 [30]        |

Таблица 1 (продолжение)

|                                 |                                  |   |  |  |  |
|---------------------------------|----------------------------------|---|--|--|--|
| Грушевая медяница               | QTLs                             |   | 8 (17.2–39.1%)                           | PEAR3<br>( <i>P. bretschneideri</i> )  | Montanari et al., 2015 [31]            |
|                                 |                                  |   | 5 (10.8%)                                | PEAR3<br>( <i>P. bretschneideri</i> )  |  |
|                                 |                                  |   | 15 (13.7%).                              | Moonglow<br>( <i>P. communis</i> )   |  |
|                                 | QTLs                             | CH05G03,<br>AJ001681SSR                                 | 17 (12.5–19.3%)<br>17 (от<br>10.3–20.1%) | NY10353  | Dondini et al., 2015 [32]              |
| Грушевый пилильщик              | QTLs                             | SNP: ss475878791  | 7  | Moonglow<br>( <i>P. communis</i> )<br>PremP003   | Brewer et al., 2018 [33]               |
|                                 |                                  | SNP: ss475880949  | 9  |  |  |
|                                 |                                  | SNP: ss475879807  | 10                                       |  |  |
| Грушевый пузырчатый клещ        | QTLs                             | SNP: ss475880469  | 13 (63.0%)                               | PremP003   | Brewer et al., 2018 [33]               |
| Самонесовместимость             | <i>S</i>                         |   | 17                                       | ( <i>P. pyrifolia</i> Nakai,<br><i>P. communis</i> L.)                                     | Yamamoto et al., 2002 [34]             |
|                                 | <i>S1–S14</i>                    | PycomC1F<br>PycomC5R                                    |  | ( <i>P. communis</i> L.)   | Sanzol and Robbins, 2008 [35]          |
|                                 |                                  |   |  | ( <i>P. communis</i> L.,<br><i>P. pyrifolia</i> Nakai,<br><i>P. amygdaliformis</i> Vill.)  | Bennici et al., 2020 [36]              |
|                                 | <i>S5</i>                        | PycomS5R  |  | (P. communis L.)   | Sanzol and Robbins, 2008 [35]          |
|                                 | <i>S6</i>                        | PycomS6R  |  |  |  |
|                                 | <i>S7</i>                        | PycomS7   |  |  |  |
|                                 | <i>S8</i>                        | PycomS8   |  |  |  |
|                                 | <i>S9</i>                        | PycomS9R  |  |  |  |
|                                 | <i>S11</i>                       | PycomS11R   |  |  |  |
|                                 | <i>S12</i>                       | PycomS12R   |  |  |  |
|                                 | <i>S14</i>                       | PycomS14R   |  |  |  |
|                                 | <i>PcS103</i><br>( <i>S3</i> )** | B39S3F1<br>B40S3R1                                      |  | (P. communis,<br><i>P. salicifolia</i> ,<br><i>P. syriaca</i> ,<br><i>P. ussuriensis</i> ) | Nikzad et al., 2014 [37],<br>2015 [38] |
|                                 | <i>PcS105</i><br>( <i>S5</i> )   | A55S5F1<br>A57S5R2                                      |  |  |  |
|                                 | <i>PcS106</i><br>( <i>S6</i> )   | PycomC1F<br>PycomS6R                                    |  |  |  |
|                                 | <i>PcS107</i><br>( <i>S7</i> )   | A60S7F1<br>A63S7R3                                      |  |  |  |
| <i>PcS108</i><br>( <i>S8</i> )  | PycomS8F<br>PycomS8R             | (P. communis)   | Sanzol et al., 2009 [39]                 |  |  |
| <i>PcS109</i><br>( <i>S9</i> )  | B47S9F2<br>B48S9R3               | (P. pyrifolia Nakai,<br><i>P. amygdaliformis</i> Vill.) | Bennici et al., 2020 [36]                |  |  |
| <i>PcS111</i><br>( <i>S11</i> ) | A68S11F1<br>PycomS11R            |   |  |  |  |
| ( <i>S12</i> )                  | B41S12F1<br>B51S12R3             |   |  |  |  |
| <i>PcS114</i>                   | B36S14F2<br>A71S14R4             |   |  |  |  |
| <i>PcS115</i><br>( <i>Sm</i> )  | A83SmF1<br>B37SmR2               |   |  |  |  |



Таблица 1 (продолжение)

|               |                        |   |                                     |  |                                 |
|---------------|------------------------|---|-------------------------------------|--|---------------------------------|
|               | <i>PcS121</i><br>(S21) | B52S21F2<br>B53S21R2                    |                                     |  |                                 |
|               | <i>PcS122</i><br>(S22) | A84S22F1<br>A89S22R1                    |                                     |  |                                 |
|               | <i>PcS123</i><br>(S23) | A88S23F1<br>B38S23R2                    |                                     |  |                                 |
|               | <i>PcS124</i><br>(S24) | A85S24F1<br>A86S24F2                    |                                     |  |                                 |
|               | <i>PcS127</i>          | -                                       |                                     |  |                                 |
|               | <i>PcS116</i>          | PcS16<br>PcS16                          |                                     |  |                                 |
|               | <i>PcS125</i>          | PycomC1F1<br>PcS25                      |                                     |  |                                 |
|               | <i>PpS2</i>            | PpS2<br>PpS2                            |                                     |  |                                 |
|               | <i>PpS3</i>            | PpS3<br>PpS3 5                          |                                     |  |                                 |
|               | <i>PpS4</i>            | PycomC1F1<br>PpS4                       |                                     |  |                                 |
|               | <i>PpS8</i>            | PpS8<br>PycomC5R1                       |                                     |  |                                 |
|               | <i>PpS9</i>            | PpS9F<br>PpS9R                          |                                     |  |                                 |
| Карликовость  | <i>PcDw</i>            |   | 16                                  | Aihuali × Chili  | Wang et al.,<br>2016 [40]       |
| Окраска плода |                        | AFLP: E31M56-7,<br>E33M48-5             | 4                                   | Max Red Bartlett<br>( <i>P. communis</i> )                         | Dondini et al.,<br>2008 [41]    |
|               | <i>PyMYB1</i>          |   | 9                                   | ( <i>P. communis</i> )   | Pierantoni et al.,<br>2010 [42] |
|               | R/G                    | ZFRI 130-16,<br>In2130-12,<br>In2130-16 | 5                                   | ( <i>P. pyrifolia</i> )  | Xue et al.,<br>2017[43]         |
|               | <i>Py-MYB114</i>       | SNP: Pyb05_380,<br>Pyb 389              | 5                                   | ( <i>P. bretschneideri</i> )                                       | Yao et al., 2017<br>[44]        |
|               | QTL                    | Pyd16_028,<br>Pyb16_055                 | 16                                  | Bayuehong<br>( <i>P. communis</i> L.)                              | Wu et al., 2014<br>[45]         |
|               |                        | Pyb04_016,<br>Pyd13_006                 | 4, 13<br>не стабильные<br>по годам) |  |                                 |
| Оржавленность | <i>R</i>               |   | 8                                   | ( <i>P. pyrifolia</i> Nakai)                                       | Yamamoto<br>et al., 2014 [46]   |
|               |                        | Psc07                                   |                                     | (P. ussuriensis,<br>P. bretschneideri,<br>P. pyrifolia Nakai)      | Takeuchi et al.,<br>2021 [47]   |
|               |                        | Psc03                                   |                                     |  |                                 |
| Масса плода   | QTL<br><i>Pfw-2-1</i>  | NH8b                                    | 2 (16,1%)                           | Bayuehong<br>( <i>P. communis</i> L. ×<br>P. bretschneideri Rehd.) | Zhang et al.,<br>2013 [48]      |
|               | <i>Pfw-7-1</i>         | EACAMCAC-2000                           | 7 (17,2%)                           |  |                                 |
|               | <i>Pfw-8-1</i>         | EAATMCAA-745                            | 8 (19,3%)                           |  |                                 |
|               | <i>Pfw-10-1</i>        | EAAAMCTA-398                            | 10 (9,4%)                           | Dangshansuli<br>( <i>P. bretschneideri</i> Rehd.)                  |                                 |
|               | <i>FruW-2010-1</i>     | CH04h02                                 | 11 (13,8%)                          | Akiakari<br>( <i>P. pyrifolia</i> Nakai)                           | Yamamoto et al.,<br>2014 [46]   |
|               | <i>FruW-2011-1</i>     | CH01b12-m2                              | 3 (17,5%)                           | Taihaku<br>( <i>P. pyrifolia</i> Nakai)                            |                                 |

Таблица 1 (окончание)

|  |  |  |                   |  |                              |
|--|--|--|-------------------|--|------------------------------|
| Длина плода                                    | <i>Pfl-7-1</i>                             | 2007г.<br>ЕАСАМСАС-2000,<br>2008 г.<br>ЕАСАМСТС-1200 | 7 (15.3%, 14.1 %) | Bayuehong<br>( <i>P. communis</i> L. ×<br><i>P. bretschneideri</i> Rehd.)                    | Zhang et al.,<br>2013 [48]   |
|  | <i>Pfl-8-1</i>                             | 2007г.,<br>ЕААТМСАА-745                              | 8 (11.7%)         |  |                              |
| Диаметр плода                                  | <i>Pfd-15-1</i>                            | ЕАСАМСТТ-3100  | 15 (9.0%)         | Dangshansuli<br>( <i>P. bretschneideri</i> Rehd.)  | Zhang et al.,<br>2013 [48]   |
|  | <i>Pfd-10-1</i>                            | ЕАААМСТА-398   | 10 (8.8%)         | Bayuehong<br>( <i>P. communis</i> L.)  | Wu et al.,<br>2014 [45]      |
|  |  | Pyd17_012  | 17 (18.5%)        | Bayuehong<br>( <i>P. communis</i> L.)<br>и Dangshansuli<br>( <i>P. bretschneideri</i> Rehd.) |                              |
|  |  | Pyb13_250  | 13 (14.6%)        |  |                              |
|  |  | Pyb17_086  | 3 (18.5%)         |  |                              |
| Индекс<br>формы плода                          | QTL<br><i>Pfi-1-1</i>                      | ga3sa17-330  | 1 (7.1%)          | Bayuehong<br>( <i>P. communis</i> L. ×<br><i>P. bretschneideri</i> Rehd.)                    | Zhang et al.,<br>2013 [48]   |
|  | <i>Pfi-2-1</i>                             | 2007 г, ga41sa20-170,<br>2008 г.,<br>ЕААСМСТА-900    | 2 (9.3%, 9.5%)    |  |                              |
|  | <i>Pfi-2-2</i>                             | me6em9-90  | 7 (14.3%)         |  |                              |
|  | <i>Pfi-7-1</i>                             | ЕААТМСАА-745   | 8 (18.7%)         |  |                              |
|  | <i>Pfi-8-1</i>                             |  |                   |  |                              |
| Содержание<br>растворимых<br>сухих веществ     | <i>SugC-2010-1</i>                         | CH02h11a   | 4 (11.3%)         | Akiakari × Taihaku   | Yamamoto et al,<br>2014 [46] |
|  | <i>SugC-2010-2</i>                         | Hi01c11-m1   | 8 (19.0%)         |  |                              |
|  |  | Pyd05_003  | 5 (14.2%)         | Bayuehong<br>( <i>P. communis</i> L.) ×<br>Dangshansuli<br>( <i>P. bretschneideri</i> Rehd.) | Wu et al.,<br>2014 [45]      |
|  |  | Pyb10_134  | 10 (30.0%)        |  |                              |
|  |  | Pyb14_176  | 14 (23.8%)        |  |                              |
|  | <i>Pss-2-1</i>                             | Pm36em5-330  | 2 (12.6%)         | Dangshansuli<br>( <i>P. bretschneideri</i> Rehd.)<br>Bayuehong<br>( <i>P. communis</i> L.)   | Zhang et al.,<br>2013 [48]   |
|  | <i>Pss-6-1</i>                             | ЕАААМСАС-520   | 6 (18.9%)         |  |                              |
|  | <i>Pss-5-1</i>                             | me6pm19-1300   | 5 (15.5%)         |  |                              |
| Содержание<br>сахара                           | QTL  | TsuGNH250  | 1 (7.7–26.6%)     | Akizuki × 373-55   | Nishio et al.,<br>2018 [49]  |
|  | QTL  | TsuGNH159  | 7 (1.9–22.2%)     |  |                              |
|  | QTL  | sca114.0_432636                                      | 11 (1.7–21.4%)    |  |                              |
| Содержание<br>кислоты                          | QTL  | NH041a   | 14                | ( <i>Pyrus pyrifolia</i> Nakai)  | Yamamoto et al., 2014 [46]   |
| Плотность                                      |  | TsuENH121-m1   | 4 (16.0–16.9%)    | ( <i>Pyrus pyrifolia</i> Nakai)  | Yamamoto et al., 2014 [46]   |
| Уровень<br>производства<br>этилена<br>в плодах | <i>PPACS1</i> ,<br><i>PPACS2</i>           |  | Не картирован     | ( <i>Pyrus pyrifolia</i> Nakai)  | Itai et al.,<br>2008 [50]    |
| Время<br>созревания                            | <i>Hart-2010-1</i> ,<br><i>Hart-2011-1</i> | BGA35<br>BGA35                                       | 3 (22.0%)         | (Pyrus pyrifolia Nakai)  | Yamamoto et al., 2014 [46]   |
|  | <i>Hart-2010-2</i> ,<br><i>Hart-2011-2</i> | PPACS2<br>PPACS2                                     | 15 (13–15%)       |  |                              |
|  | <i>Pfm-8-1</i> ,<br><i>Pfm-8-2</i>         | EAGGMCAG-410   | 8                 | Bayuehong<br>( <i>P. communis</i> L.)  | Zhang et al.,<br>2013 [48]   |

\* Маркеры используются одновременно.

\*\* В скобках указаны названия S-аллелей по старой номенклатуре [76].

## УСТОЙЧИВОСТЬ К БОЛЕЗНЯМ И ВРЕДИТЕЛЯМ

Изучение наследования устойчивости/восприимчивости к болезням и вредителям и создание новых сортов груши с комплексной устойчивостью к ним имеет первостепенное значение [51].

В селекции груши приоритетным является направление по созданию высокопродуктивных сортов, имеющих генетическую устойчивость к болезням и вредителям в сочетании с хорошим качеством плодов. С этой целью ведется направленный поиск аллельных форм генов в геномах невосприимчивых сортов, обеспечивающих такую устойчивость, для последующего использования их в селекционном процессе [51].

Груша подвержена различным типам заболеваний. Наиболее вредоносными считаются грибковые (парша, черная пятнистость, септориоз, ржавчина, монилиоз и др.), бактериальные (бактериальный ожог и др.) [51].

Отмечают, что различные виды *Pyrus* имеют свою реакцию на различные заболевания. В табл. 2 указана реакция видов на восприимчивость/устойчивость к грибковым и бактериальным болезням груши [27, 52–55].

В условиях Центрального и Центрально-Черноземного районов России наиболее вредоносными считаются грибковые болезни, такие как парша (*Venturia*), ржавчина (*Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) [56, 57]. Ржавчина, заболевание, вызываемое грибом *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) Wint, в настоящее время является серьезной проблемой при выращивании груши в средней полосе России. Долгое время ареал распространения ржавчины был ограничен Европейской территорией, где находился промежуточный хозяин – можжевельник казацкий и некоторые другие виды можжевельников (древовидный, красный и другие различные виды рода *Juniperus* sect. *sabinae*). В последнее время ржавчина широко распространяется в Малой Азии, Северной Африке, Северной Америке, Австралии.

Также отмечается высокий уровень заражения ржавчиной груши в Республике Беларусь [58].

Многолетние исследования показывают, что сорта груши не обладают полной устойчивостью к ржавчине, но имеют разную реакцию на данное заболевание. В Европе сорт Conference (*P. communis*) является восприимчивым к ржавчине [59]. В Нидерландах сорт Erika (*P. communis*) был описан как частично устойчивый, имеющий лишь незначительные поражения ржавчиной [60]. По многолетним наблюдениям, в Беларуси отсутствовали иммунные к ржавчине генотипы, но были выявлены различия по степени поражения заболеванием. Незначительно поразились интродуцированные сорта груши Аллегро, Виктория, Мария, Особлыва, Смеричка, Сувенир, Щедра, производные от *P. communis* L.; Августовская роса, Верная, Десертная россшанская, Краснобокая, Подгорянка, ДУ 20-3, Чуспан – от *P. ussuriensis* Maxim.; Чухуан – от *P. ussuriensis* × *P. ovoides*; Феерия – производный сорт от груши грушелистной (песчаной) *P. pyrifolia* (Burm.) Nakai [55].

Стоит отметить, что были обнаружены межродовые гибриды, обладающие устойчивостью к ржавчине, а именно: Сорбопирус Курьянова (груша обыкновенная × рябина обыкновенная), Сорбопирус золотистый (груша Полверия) (груша обыкновенная × рябина мучнистая), Малопирус № 1 (яблоня × груша), Пиромалюс № 818 (груша уссурийская × яблоня ягодная) [56]. Вопрос о возможности привлечения их в селекцию на устойчивость к ржавчине требует изучения.

На данный момент методики маркер-вспомогательной селекции груши на устойчивость к болезням и вредителям ограничены методиками селекции на некоторые гены устойчивости к парше (европейской и азиатской), черной пятнистости (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler) и бурой пятнистости (*Stemphylium vesicarium*), бактериальному ожогу (*Erwinia amylovora*), грушевой медянице (*Cacopsylla pyri*), грушевому пилильщику (*Caliroa cerasi*), грушевому пузырчатому клещу (*Eriophyes pyri*). К сожалению, на данный момент слабо изучены (не

**Таблица 2.** Восприимчивость/устойчивость видов *Pyrus* к болезням [53].

| Виды                     | Грибковые                    |                            |                         |               | Бактериальные |
|--------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------|---------------|
|                          | Парша европейской груши [16] | Парша азиатской груши [16] | Черная пятнистость [18] | Ржавчина [20] |               |
| <i>P. communis</i>       | В–У                          | У                          | –                       | В             | ОВ–У          |
| <i>P. bretschneideri</i> | –                            | В–УУ                       | –                       | В             | В–УУ          |
| <i>P. pyrifolia</i>      | В–У                          | В                          | В                       | В             | УВ–УУ         |
| <i>P. ussuriensis</i>    | В–У                          | В                          | –                       | В             | У             |

Примечание. ОВ – очень восприимчивые, В – восприимчивые, УВ – умеренно восприимчивые, УУ – умеренно устойчивые, У – устойчивые.

локализованы в геноме) генетические факторы устойчивости к ржавчине, монилиозу, септориозу и др. Ниже подробнее остановимся на работах по локализации генов и локусов количественных признаков (QTL) устойчивости к болезням и вредителям в геноме груши и разработанных на их основе методах МВС.

### УСТОЙЧИВОСТЬ К ПАРШЕ

Сорта груши могут поражаться двумя видами парши. Уссурийская груша (*P. ussuriensis* Maxim.), груша бретшнейдера (*P. bretschneideri* Rehd.) и груша грушелистная (японская) (*P. pyrifolia* Nakai) восприимчивы к *V. nashicola*, а европейская груша (*P. communis* L.) – к *V. pirina* Aderh. Интенсивному размножению патогена способствует высокая влажность воздуха, болезнь широко распространяется в дождливое лето. На пораженных паршой плодах и листьях возникают темные бархатистые пятна, при сильном поражении дерева его плоды трескаются, а листья осыпаются. Пораженные паршой деревья менее морозостойки [61].

В Европе селекция на устойчивость груши к парше стала приоритетной задачей. В результате реализации программы, направленной на обнаружение и картирование QTL и генов устойчивости груши к парше, Bouvier L. с соавторами выявили наличие гена устойчивости к *V. pirina* у европейского сорта груши Navaga. Он был назван *Rvp1* и локализован в группе сцепления 2 рядом с микросателлитным маркером CN02b10 [15].

Изучая межвидовые гибриды груш, группа ученых [62] идентифицировала доминантный ген – *Vn*, который придает высокую устойчивость к *V. nashicola* и предположительно присутствует у европейских груш La France и Bartlett. Позднее на карту были нанесены два дополнительных гена устойчивости к *V. nashicola*, а именно *Vnk*, расположенный на группе сцепления 1 у сорта Kinchaku [17], и *Rvn2*, унаследованный от Bartlett [16], картированный на группе сцепления 2. Предполагается, что *Vn* и *Rvn2* могут быть одним и тем же геном [15]. Для выявления гена устойчивости к парше *Rvn2* были разработаны CAPS маркеры PSC217-XhoI и PSC234-HaeIII, которые, по мнению авторов, обладают потенциалом для повышения эффективности отбора на устойчивость к парше в программах селекции груши [16]. В работе Terakami S. с соавт. [17] ген устойчивости к парше *Vnk* у японской груши Kinchaku локализован в центре группы сцепления 1 рядом с SSR-маркерами (PS12A02, NH013a, CH-Vf2, AG04, Hi02c07).

У европейского сорта Abbé Fétel были идентифицированы несколько QTL устойчивости к *V. pirina*, расположенных на 3-й (маркер E32-M50-3) и

7-й (маркеры E34-M48-9, E39-M53-5) группах сцепления [20].

По результатам изучения потомства родителей PEAR1 × PEAR2 (гибриды от межвидового скрещивания европейских (*P. communis*) и азиатских (*P. pyrifolia* и *P. ussuriensis*) груш) были выявлены QTLs устойчивости к *V. pirina* на группах сцепления 7, 10 и 17 у PEAR1 и на группах сцепления 2, 5 и 7 у PEAR2. При этом QTL на группе сцепления 17 обеспечивал устойчивость к трем разным изолятам, в то время как QTL на группе сцепления 7 был эффективен против двух изолятов [21]. Кроме того, QTL на группе сцепления 7 у PEAR1 и у сорта Abbé Fétel предположительно располагаются в одном локусе, в то время как QTL у PEAR2 на группе сцепления 2 вероятно локализуется вместе с генами *Rvp1* (ранее идентифицирован у сорта Navaga) и *Rvn2* (ранее выявлен у сорта Bartlett) [15, 16].

В работе Oh S. (2021) с использованием межвидового гибрида Greensis (*P. pyrifolia* × *P. communis*) × *P. pyrifolia*) был выявлен новый ген *Rvn3* (на группе сцепления 6) устойчивости к парше (*V. nashicola*). Был найден SSR-маркер HB09, тесно сцепленный с *Rvn3* [18].

Недавно установили, что устойчивость к парше (*V. nashicola*) в китайском сорте груши Hong Li контролирует единственный доминантный ген *Rvn4*, его локализовали в верхней части группы сцепления 7. Разработанный авторами SSR-маркер Pbr.chr07.20 сцеплен с *Rvn4* на генетическом расстоянии 1.3 см [19].

Таким образом, выявлено несколько генов устойчивости к *V. nashicola* (*Vnk*(*Rvn1*), *Rvn2*(*Vn*), *Rvn3*, *Rvn4*), и ген устойчивости к *V. pirina* (*Rvp1*), а также ряд QTLs. При этом *Rvp1* возможно тот же ген, что и *Rvn2*.

### УСТОЙЧИВОСТЬ/ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К ЧЕРНОЙ И БУРОЙ ПЯТНИСТОСТЯМ

Болезнь черной пятнистости, которая вызывается грибом *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, является одним из самых вредных заболеваний при выращивании японской груши. Восприимчивость к болезни черной пятнистости контролируется доминантным геном, обозначенным как *A*.

Ванно К. с соавт. [22] тестировали RAPD-праймеры на потомках японской груши Osa Nijisseiki для выявления маркеров, связанных с геном восприимчивости к заболеванию черной пятнистости. Был выявлен маркер CMNB41, который присутствовал у восприимчивых потомков и находился на расстоянии около 3.1 см от восприимчивого гена *A*, частота встречаемости этого маркера составила 96% у восприимчивых сортов и потомков семьи Osa Nijisseiki × Oharabeni.

Впоследствии было определено точное расположение генов восприимчивости к черной пятнистости у японской груши (*P. pyrifolia* Nakai) на группе сцепления 11. Так, гены восприимчивости обнаружены у сорта Osa Nijisseiki – ген *Ani*; у сорта Nansui – ген *Ana*; у сорта Kinchaku – ген *Aki* [23, 24]. Гены восприимчивости *Ani* и *Ana* тесно сцеплены с микросателлитными маркерами H04h02 и CH03d02 [23], а локус *Aki* локализовали между маркерами Mdo.chr11.28 и Mdo.chr11.34 [24]. В 2021 г. Terakami S. с соавт. [25] провели исследование по изучению восприимчивости к черной пятнистости у сортов японской (*P. pyrifolia* Nakai) и китайской груши (*P. bretschneideri* Rehd. и *P. ussuriensis* Maxim.). В результате для локуса восприимчивости на 11-й группе сцепления были выявлены новые микросателлитные маркеры Mdo.chr11.27 и Mdo.chr11.34, сцепленные с восприимчивостью японских сортов к черной пятнистости. У наиболее восприимчивых сортов маркер Mdo.chr11.27 амплифицировал фрагмент 220 пн, а Mdo.chr11.34 – фрагмент 259 пн. У китайских груш не было обнаружено специфических полос у восприимчивых сортов.

Бурая пятнистость – одно из самых серьезных грибковых заболеваний, которое может поражать плоды и листья груши, его возбудителем является *Stemphylium vesicarium*. Коммерчески важные сорта, например Abbé Fétel, являются очень восприимчивыми к этому патогену, в то время как другие (такие как Bartlett и его мутанты), устойчивы [63].

Обнаружен локус восприимчивости к бурой пятнистости, который назван *Sy* и локализован между SSR-маркером NZ02B0 и AFLP E39M52-3 в нижней части 15-й группы сцепления у сорта Abbé Fétel. Однако маркер AFLP не удалось локализовать на физической карте [26].

Таким образом, выявлены гены восприимчивости к черной и бурой пятнистостям.

## УСТОЙЧИВОСТЬ К БАКТЕРИАЛЬНОМУ ОЖОГУ ГРУШИ

Бактериальный ожог, вызываемый бактерией *Erwinia amylovora*, поражает многих представителей семейства Rosaceae [64]. В частности, это заболевание представляет серьезную угрозу для отдельных коммерческих сортов груши, у которых, по мнению ряда исследователей, не существует полного иммунитета к бактериальному ожогу [3]. Однако есть сведения о том, что высокий уровень устойчивости к бактериальному ожогу встречается у диких видов *P. calleryana*, *P. betulaeifolia*, *P. fauriei* и др. [65].

Dondini L. с соавт. [66] провели идентификацию локусов количественных признаков (QTL), связанных с устойчивостью к бактериальному ожогу у сортов европейской груши (*P. communis* L.). Авторами были разработаны генетические карты сортов Passe

Crassane (восприимчивый) и Narrow Sweet (устойчивый) с использованием ДНК-маркеров SSRs, MFLPs, AFLPs, RGAs и AFLP-RGAs. На карте были идентифицированы четыре предполагаемых QTL, связанных с устойчивостью к бактериальному ожогу. У устойчивого сорта Narrow Sweet QTL были расположены в группах сцепления 2A, 2B (группа сцепления 2 разделена на две части A и B), 4 и 9.

В 2012 г. было уточнено положение QTL устойчивости на группе сцепления 2 сорта Narrow Sweet путем включения новых SSR-маркеров в ранее существовавшую карту. Выявлены маркеры, окружающие QTL Narrow Sweet на группе сцепления 2 (TsuENH017 и NH033b) [27].

В работе Montanari S. с соавт. [29] один QTL у сорта Moonglow, также на группе сцепления 2 и с ним ассоциирован маркер TsuENH017, унаследованный от Roi Charles de Wurtemberg. При этом обнаружено несколько минорных QTLs у восприимчивого родителя PEAR3 (на группах сцепления 7, 9, 10, 12 и 15).

В Польше провели межвидовое скрещивание восприимчивого сорта Douenne du Comice (*P. communis*) с устойчивым видом *P. ussuriensis*. Генетическая карта обоих родителей была составлена на основе 48 маркеров AFLP и 32 SSR. В результате этого был идентифицирован предполагаемый QTL для устойчивости к бактериальному ожогу у *P. ussuriensis* на группе сцепления 11 [28].

В исследованиях Zugr J. с соавт. [30] были выявлены QTL в трех регионах, аналогично предыдущим исследованиям [29, 32].

В работе Карытина А. с соавт. [67] протестировано три микросателлитных маркера TsuENH017 и CH02F06 (2-я группа сцепления), CH05c07 (9-я группа сцепления), ранее обнаруженных рядом с локусами устойчивости груши к бактериальному ожогу [29, 32]. При этом ожидаемые аллели не всегда амплифицировали на устойчивых сортах, а в локусе CH02f06 было выявлено, что некоторые восприимчивые сорта амплифицировали “устойчивые аллели”.

Таким образом, локусы устойчивости к бактериальному ожогу были идентифицированы в восьми различных группах сцепления (табл. 1). Выявлены ДНК-маркеры, ассоциированные с устойчивостью. Однако проверка некоторых молекулярных маркеров показала, что они не всегда диагностируют устойчивость или восприимчивость генотипа груши к бактериальному ожогу.

## УСТОЙЧИВОСТЬ К ВРЕДИТЕЛЯМ

Одним из серьезных вредителей груши является грушевая медяница (*Cacopsylla pyri*). Виды груши *P. ussuriensis*, *P. bretschneideri*, *P. fauriei*, *P. calleryana*

выделяют как источники устойчивости к данному вредителю [31, 68]. В работе Bellini E. и Nin S. [69] сообщается, что генетический контроль устойчивости к *Cacopsylla pyri*, по-видимому является полигенным признаком.

Тем не менее устойчивость к грушевой медянице была обнаружена у *P. ussuriensis* под названием Illinois 65. В результате скрещиваний был получен ряд образцов груши, включая NY10352, NY10353 и NY10355, имеющих устойчивость к данному вредителю [70].

Молекулярные механизмы, которые регулируют устойчивость груши к медянице, слабо изучены с точки зрения физиологии и генетики. Тем не менее Pasqualini E. с соавт. [71] описали поведение насекомых на потомках NY10353, в то время как Salvianti F. с соавт. [72] проанализировали дифференциальную экспрессию генов после заражения грушевой медяницей у NY10355 и William's. Исследовано пищевое поведение у взрослых особей и нимф *Cacopsylla pyri* на устойчивом к грушевой медянице генотипе NY10353, на основании чего сделан вывод, что факторы устойчивости локализованы в соке флоэмы этой формы [73].

Основной QTL устойчивости к грушевой медянице был идентифицирован на группе сцепления 17 устойчивого родителя NY10353, между маркерами CN05G03 (процент объясненной фенотипической вариации 12.5–19.3% в разные годы) и AJ001681SSR (процент фенотипической вариации 10.3–20.1% в разные годы) [32]. Также было подтверждено, что данный QTL присутствует у NY10355 [74].

Percheried L. с соавт [74] идентифицировали два новых локуса устойчивости к грушевой медянице на группах сцепления 1 и 4 у NY10355 и подтвердили QTL, ранее обнаруженный на 17-й группе сцепления.

В работе Montanari S. и соавт. [31] устойчивый к грушевой медянице межвидовой гибрид PEAR3 (*P. bretschneideri* × *P. communis*) скрестили с восприимчивым европейским сортом груши Moonglow (*P. communis*), чтобы получить популяцию F1 для генетического картирования устойчивости. Стабильный QTL был локализован на группе сцепления 8 у PEAR3 (процент фенотипической вариации изменился по годам, в зависимости от метода статистического анализа и учетных фаз развития вредителя от 17.2 до 39.1%). Дополнительные локусы количественных признаков были обнаружены на группе сцепления 5 (процент фенотипической вариации 10.8%) у PEAR3 и на группе сцепления 15 у Moonglow (процент фенотипической вариации 13.7%).

Грушевый пилильщик (*Caliroa cerasi*) и грушевый пузырчатый клещ (*Eriophyes pyri*) считают

незначительными насекомыми-вредителями груши, поскольку с ними легко бороться с помощью стандартной программы применения инсектицидов при обычном выращивании груш. Однако с целью сокращения использования инсектицидов при производстве груш актуальной задачей является создание новых устойчивых сортов к данным вредителям [33].

В работе Brewer L. с соавт. в 2018 г. [33] идентифицированы QTL устойчивости к грушевому пилильщику и грушевому пузырчатому клещу с использованием потомства PremP003 × Moonglow. В частности, основной QTL устойчивости к грушевому пузырчатому клещу был обнаружен на группе сцепления 13 PremP003 с помощью маркера ss475880469, с процентом вариации, объясняемой QTL, 63.0%. Для грушевого пилильщика было обнаружено 3 QTL для яйцекладки: на 7 (маркер ss475878791) и 9 (маркер ss475880949) группах сцепления у сорта Moonglow и на группе сцепления 10 у PremP003 (маркер ss475879807). Локус восприимчивости был обнаружен на группе сцепления 9 Moonglow (объясняет 15.6% фенотипической вариации) рядом с маркером ss475882938.

Таким образом, выявленные ДНК-маркеры, сцепленные с QTL устойчивости к грушевому пилильщику и грушевому пузырчатому клещу и грушевой медянице могут быть использованы для пирамидирования (совмещения в одном генотипе) нескольких генов устойчивости [75], что поможет в выведении экологически чистых сортов, производство которых требует сниженных доз инсектицидов, а также послужит основой для совершенствования методов геномной селекции груши.

## САМОНЕСОВМЕСТИМОСТЬ ГРУШИ

Большинство сортов груши являются самобесплодными, и лишь немногие сорта способны формировать урожай при самоопылении [76]. Способность сорта завязывать плоды при опылении собственной пылью определяется как условиями среды, так и наследственностью, что создает предпосылки для контролируемого создания самоплодных сортов [77]. Не менее актуальным, чем создание самоплодных сортов, является выявление лучших опылителей для современного сортимента груши [78].

Затрагивая вопрос самоплодности, нельзя не упомянуть о таком механизме как партенокарпия. Партенокарпия – образование плодов растений, чаще бессемянных, без оплодотворения. У ряда сортов груши имеется ценный признак – способность завязывать партенокарпические (бессемянные) плоды. Обладая этим признаком, сорта груши могут устойчивее переносить неблагоприятные погодные условия во время цветения, положительно

реагируют на обработку цветков физиологически активными веществами при самоопылении или в отсутствие опылителей [79]. Однако гены, вовлеченные в механизм партенокарпии у груши, изучены слабо. Далее мы подробно остановимся на механизме самонесовместимости при опылении пыльцой.

Все семейство Rosaceae, в том числе и груша, принадлежит к растениям с моногенным гаметофитным (вещества самонесовместимости продуцируются протопластом самой микроспоры) контролем реакции самонесовместимости. Эта система генетически контролируется одним локусом, названным *S*-локусом, который включает по меньшей мере два тесно связанных полиморфных гена: ген, экспрессирующийся в пестике, и один или несколько генов, экспрессирующихся в пыльце [80]. Предполагается, что у видов *Pyrus* *S*-детерминанта пыльцы состоит из множества генов *F-box*, называемых *SFBs* (*S*-locus F-Box Brothers). Для всех генотипов *P. communis* существует большая вариабельность гаплотипа *S*-локуса, экспрессируемого как в пыльце, так и в пестике [81].

Механизм самонесовместимости заключается в росте пыльцевой трубки и формировании завязи, только если аллель гена *S* в пыльцевой трубке отличается от аллельного набора гена *S* тканей пестика, в противном случае рост пыльцевой трубки блокируется [82].

Однако существуют механизмы, влияющие на прерывание роста пыльцевых трубок собственной *S*-РНКазой. В исследовании Wu L. с соавт. (2023) были идентифицированы два богатых лейцином гена экстенсина: *PbLRXA2.1* и *PbLRXA2.2*. Сорт Jinzhui – спонтанный почковый мутант самонесовместимого сорта Yali, который отличается от него самосовместимостью. Уровни экспрессии генов *PbLRXA2.1* и *PbLRXA2.2* были значительно выше в пыльцевых зернах и пыльцевых трубках самосовместимого сорта Jinzhui, чем у самонесовместимого сорта Yali. Как *PbLRXA2.1*, так и *PbLRXA2.2* стимулировали рост пыльцевых трубок и ослабляли ингибирующее действие *S*-РНКазы на рост пыльцевых трубок путем стабилизации актинового цитоскелета и улучшения целостности клеточной стенки. Установлено, что именно аномальная экспрессия *PbLRXA2.1* и *PbLRXA2.2* привела к потере самонесовместимости у сорта Jinzhui. Эти результаты дают новое представление о механизмах прекращения роста пыльцевых трубок с помощью *S*-РНКазы [83].

В работе Claessen H. с соавт. (2019) приведены результаты изучения механизма генетической детерминации и молекулярного контроля самонесовместимости груши. Молекулярный анализ *S*-генов у нескольких самосовместимых сортов

*Pyrus* выявил мутации в обеих частях, специфичных для пестика или пыльцы, которые вызывают нарушение самосовместимости [84].

Изучение гена самонесовместимости (*S*) является одним из важных направлений в генетике растений, имеющих перекрестный тип опыления.

Ген *S*-РНКазы был нанесен на карту в нижней части группы сцепления 17 как у японской, так и у европейской груши [34].

Известно более 100 генов *S*-РНКаза у груши, которые внесены в базу данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) [85]. Основные *S*-аллели представлены в табл. 1.

Были разработаны молекулярные методы для идентификации *S*-генотипов у европейской груши. Mota M. с соавт. в 2007 г. [86] выполнили идентификацию аллельных комбинаций *S*-гена для 14 европейских сортов груши. Sanzoli J. и Robbins T. [35] разработали аллель-специфические праймеры для РНКаз *S5*, *S6*, *S7*, *S8*, *S9*, *S11*, *S12* и *S14* на 33 сортах. Takasaki T. с соавт. [87] выделили полноразмерные кДНК девяти *S*-РНКаза (*Sa-*, *Sb-*, *Sd-*, *Se-*, *Sh-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sq-* и *Sr-*) и создали систему маркеров CAPS для генотипирования европейских сортов груши, содержащих эти девять аллелей. В Иране было выполнено генотипирование 57 иранских сортов груши и диких генотипов, а также 21 сорта европейской груши с использованием консенсусных и аллель-специфичных праймеров. Результаты показали наличие трех аллелей *S*-РНКазы, которые ранее не были идентифицированы у *P. communis* [37].

Nashima K. с соавт. разработали метод, позволяющий идентифицировать 11 *S*-аллелей, включая *S4sm* у японской груши, на основе наличия или отсутствия специфического продукта. Разработанные пары праймеров были протестированы на 14 сортах японской груши. В результате чего было установлено, что *S*-аллель-специфичные пары праймеров могут эффективно идентифицировать *S*-генотипы [88].

В исследовании He M. с соавт. [89] идентифицированы *S*-генотипы 84 образцов китайской груши на основе методов ПЦР. В общей сложности было обнаружено 34 аллеля *S*-РНКазы и одна новая *S*-РНКаза (*S67*), и каждый образец имел по меньшей мере два разных аллеля *S*-РНКазы. Анализ последовательностей выявил, что шесть сортов груши, выведенных в Китае, имеют одни и те же *S*-РНКазы с *P. communis*. Эти результаты подтвердили гипотезу о том, что восточный и западный виды *Pyrus* могут иметь один и тот же набор аллелей в *S*-локусе.

В табл. 1 обобщены работы нескольких ученых, которые использовали в своих исследованиях схожие консенсусные [35, 36] и аллель-специфичные [36, 38, 39] праймеры, но на разных популяциях.

Использование таких праймеров показало, что это очень эффективный метод определения комбинаций *S*-аллелей современных и старых сортов груши. Так, в работе Bennici S. с соавт. (2020) [36] проводилось исследование на 86 образцах, состоящих из 43 местных итальянских сортов, 16 сортов, принадлежащих к дикорастущим видам (девять *P. pyraster* и семь *P. amygdaliformis*), 18 сортов, культивируемых на национальном уровне (NCV), и девяти сортов, культивируемых на международном уровне. Nikzad Gharehaghaji A. с соавт. [38] изучали 64 сорта и дикие генотипы груши из Ирана и Европы, включая *P. communis*, *P. salicifolia*, *P. syriaca*, *P. ussuriensis*. Были идентифицированы 23 *S*-РНКазы (*S101–S125*) и выявлен новый *S*-аллель – *PcS127*, который чаще встречается у диких генотипов. Стоит заметить, что в шести образцах аллель *PcS127* сочетается с *PpS8*, что позволяет предположить, что эти сорта могут происходить из подгрупп или популяций, где прослеживается вклад японской груши в иранские генотипы. Набор *S*-РНКаз, обнаруженный в иранском генофонде, отличался по составу от европейских сортов и демонстрировал генетический вклад других видов. В работе Sanzoli J. с соавт. [39] были проанализированы 74 европейских сорта (*P. communis*) и были охарактеризованы последовательности геномной ДНК, соответствующие пяти новым аллелям *S*-РНКазы (*S2*, *S21*, *S22*, *S23* и *S24*) и *Sm*. Также в данной работе был разработан метод на основе ПЦР, способный различить 20 аллелей (*S1–S14*, *Sm* и *S20–S24*).

Группа отечественных ученых провела молекулярно-генетический анализ самонесовместимости груши с применением ранее опубликованных консенсусных и аллель-специфичных ДНК-маркеров. На основе полученных данных был полностью идентифицирован аллельный набор у сортов Славянка и Скрамница – *S1S8*. Для ряда сортов был идентифицирован только один из аллелей: Большая летняя (*S8*), Скрамница (*S5*), Сочинская крупноплодная (*S1*), Вильямс ставропольский (*S1*), Запорожская (*S1*), Краснодарская зимняя (*S1*), Перлына (*S1*), Самородок (*S1*), Шихан (*S1*), Вера (*S5*) [90].

На данный момент весьма распространена гипотеза, что, зная аллельный состав *S*-гена, можно спрогнозировать эффективность перекрестного опыления сортов и форм, что важно при составлении схем посадки сада плодовых культур [90]. Тем не менее следует помнить, что на механизм прекращения роста пыльцевых трубок с помощью *S*-РНКазы влияют и иные гены.

## КАРЛИКОВОСТЬ ГРУШИ

Карликовость и высокая плотность посадки – важные факторы интенсификации производства груши. Благодаря этим факторам у интенсивных

садов появляются преимущества в более раннем плодоношении, высокой урожайности, в быстром обновлении сортов и простоте ухода. Серьезная проблема для производства груши в нехватке карликовых подвоев и карликовых сортов. Поэтому изучение и использование генетических ресурсов карликовой груши имеет огромное значение. Карликовость груши сорта Nain Vert, случайного сеянца *P. communis*, определяется доминантным геном *PcDw* [40].

В 1991 г. в Великобритании от семян сорта Nain Vert был получен и выращен сеянец с чертами карликового дерева и похожий на мать – сорт Aihuali. Было подтверждено, что карликовый рост определяется одним доминантным геном – *PcDw*. Потомки сорта Nain Vert служат важным генетическим ресурсом для выведения сортов груши с карликовой формой дерева [91].

Wang C. с соавт. [91] провели крупное исследование генетики, лежащей в основе признака карликовости и подбора молекулярных маркеров, связанных с этим признаком. Использовались маркеры SSR, разработанные как для груши, так и для яблони, а также маркеры RAPD. Для этого исследования использовался карликовый сорт Aihuali, скрещенный с сортом обычного габитуса Chili. Среди потомства были обнаружены как карликовые, так и стандартные фенотипы. Ряд RAPD-маркеров (в том числе два маркера, полученные от амплификации праймеров S1172 и S1212) показали значительную связь с геном *PcDw*. Анализ 28 пар SSR-праймеров выявил праймер KA14, который связан с *PcDw*. Ранее KA14 располагался на группе сцепления 10, теперь считается, что он локализован на 16-й группе сцепления, что свидетельствует о расположении *PcDw* в той же группе сцепления. Другой SSR-маркер, TsuENH022, также имеет тесную связь с *PcDw*. А в 2016 году Wang C.H. с соавт. [40] разработали молекулярные маркеры для генетического и физического картирования локуса *PcDw* у груши (*P. communis* L.) с помощью SSR- и SNP-маркеров.

В исследовании Zheng X. с соавт. [92] был клонирован ген *PcPIN-Like* (*PcPIN-L*) (регистрационный номер PCP021016) в качестве одного из кандидатов на роль *PcDw*. В работе сравнили CDS (кодирующую область) и промоторную последовательность генов-кандидатов у груш карликового и стандартного типов и обнаружили, что делеция СТ-повтора в промоторе PCP021016 соответствовала фенотипу карлика.

В России работы по привлечению гена карликовости груши в селекцию были начаты в начале 90-х годов прошлого века во ВСТИСП, а затем продолжены в ООО “Опытно-селекционный питомник” М.В. Качалкиным. Исходным материалом



послужили семена от свободного опыления гибрида третьего поколения от сорта Nain Vert, которые были предоставлены Ф.Х. Олстоном. К сожалению, все сеянцы в этой семье оказались незимостойкими и к настоящему времени сохранились только в частном питомнике под Крымском, попытки разместить их в Москве, Орле и даже Ростове-на-Дону не увенчались успехом. С 2000 г. ведется работа по созданию слаборослых сортов груши с моногенной детерминированной карликовостью во Всероссийском НИИ селекции плодовых культур [93]. В настоящее время в биоресурсной коллекции ВНИИСПК имеется карликовое потомство от сорта Nain Vert.

Таким образом, детекция локуса карликовости *PcDw* с применением маркер-вспомогательной селекции может служить эффективным методом для отбора и подтверждения наличия гена *PcDw*.

### ОСНОВНЫЕ ГЕНЫ И ЛОКУСЫ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ(QTLs) КАЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПЛОДОВ

Признаки качества плода – обширная группа характеристик, сюда относятся и вкус, обусловленный биохимическим составом, и запах, окраска плодов, плотность мякоти, способность к длительному хранению и т.д. Большинство из перечисленных признаков, за редкими исключениями, являются полигенными, что затрудняет идентификацию контролирующих их генов и разработку методик МВС [94].

Целый ряд характеристик качества плода (время сбора урожая, цвет кожицы плода, плотность мякоти, вес плода, кислотность, общее содержание растворимых веществ, сброс плодов до урожая (табл. 1)) был локализован в геноме груши грушелистной (*P. pyrifolia* Nakai) [46] путем картирования гибридной семьи Akiakari × Taihaku. Были выявлены ближайшие маркеры, однако QTLs объясняли от 11.3 до 36.9% фенотипической вариации, и не все локусы стабильно проявлялись в разные года. Тем не менее авторы заключили, что QTLs, выявленные в данной работе, могут быть использованы для МВС в японских селекционных программах.

В работе Wu J. соавт. [45] путем картирования гибридной семьи Bayuehong (потомок европейской *P. communis* L. и китайской груши *P. bretschneideri* Rehd.) и Dangshansuli (сорт китайской груши) выявлен целый ряд QTL, связанных с качеством плода, а именно: с длиной плодоножки, массой одного плода, содержанием растворимых сухих веществ, поперечным диаметром, вертикальным диаметром, строением чашечки, цветом мякоти, содержанием сока, количеством семян, цветом кожицы и ее гладкостью. При этом большинство QTL нестабильно

проявляются по годам (мы не приводим их в табл. 1.) Стабильные QTL выявлены для вертикального диаметра плода (расположен на группе сцепления 17), строения чашечки (*Calyx status*, на группе сцепления 6), цвета мякоти (на группе сцепления 9), числа семян (группы сцепления 5, 17), цвета кожицы (группа сцепления 16).

На данный момент из признаков, связанных с качеством плодов, наиболее изучены с молекулярно-генетической точки зрения цвет кожицы груши, оржавленность и сроки созревания.

### ЦВЕТ ПЛОДОВ, ОРЖАВЛЕННОСТЬ

Цвет кожицы груши определяет зрелость и качество плодов, также характеризует их внешний вид, что влияет на привлекательность для потенциальных покупателей. Считается, что красный цвет увеличивает ценность урожая. Однако в настоящее время большинство основных коммерческих европейских и азиатских сортов груш зеленого, желтого или коричневого (красновато-коричневого) цвета с очень небольшим количеством сортов красного цвета [95].

Как упоминалось выше, груши делятся на две основные группы: азиатские и европейские. Обычно азиатские груши с красной кожицей окрашиваются на стадии почти созревания [96], в то время как европейские груши окрашиваются в начале развития, а затем теряют цвет и восстанавливают его по мере приближения к зрелости. Это позволило предположить, что генетическая основа и механизм образования красного цвета кожицы плода могут отличаться у азиатских и европейских сортов груш.

Источниками красного цвета кожицы считаются европейский сорт груши Max Red Bartlett (MRB) (имеет красные листья, плод на 90% покрыт темно-красным цветом) и сорт китайской груши Huobali, который имеет бронзово-зеленый цвет листы с ярко-красным румянцем на 40% поверхности плода. Исследования показывают, что наличие красного цвета листы у потомства, полученного от MRB, контролируется одним доминантным геном [97, 98].

Красная окраска плодов европейских груш считается моногенным доминантным признаком, что подтверждается анализом семи отдельных гибридных семей, родителями которых является один из следующих сортов: Max Red Bartlett, Cascade или California с красной кожурой плодов. Более того, Dondini с соавт. [41] выявили локус красного цвета на группе сцепления 4 у гибридной семьи Abbé Fétel × Max Red Bartlett. Данный локус окружали два AFLP-маркера: E31M56-7 и E33M48-5.

Интересно отметить, что у яблони генетические факторы, контролирующие красный окрас плода,

локализованы на хромосоме 9. Pierantoni L. с соавт. [42] определили уровень экспрессии генов, связанных с антоцианами, во время развития плодов европейской груши Williams и Max Red Bartlett. Авторы сообщили, что *PuMYB10*, расположенный на группе сцепления 9, не несет прямой ответственности за окраску сортов груш красного и желтого цвета. Wang с соавт. в 2013 г. [99] предположили, что уровень метилирования *PcMYB10* может быть связан с образованием красной кожуры у груши MRB.

В исследовании Wu J. с соавт. [45], проведенном на Bauehong (сорт унаследовал красный румянец от матери – Clapp's Favorite (*P. communis* L.), отцовская форма – китайская груша Zaosuli (*P. bretschneideri* Rehd.)) и Dangshansuli (зелено-желтый сорт китайской груши), приведены данные о том, что в 2008 г. был выявлен QTL красного цвета на группе сцепления 16 (маркер Pvd16\_028), а в 2009 г. выявлено три QTL на группах сцепления 4 (маркер Pvb04\_016), 13 (маркер Pvd13\_006) и 16 (маркер Pvb16\_055). Исходя из результатов двухлетнего анализа, группа сцепления 16 показала более стабильные результаты.

В исследовании, проводимом Хие Н. в 2017 г. [43], использовался модифицированный метод QTL-seq для изучения признака окраски плода у груши грушелистной (*P. pyrifolia*). В анализе использовались гибриды, полученные от скрещивания сортов Mantianhong (красный цвет кожицы) и Hongxiangsu (зеленый). Геном сорта Dangshansuli использовался в качестве эталона. Результатом этого исследования являются найденные SNP-маркеры ZFRI 130-16, In2130-12 и In2130-16, расположенные вблизи локуса R/G (красный/зеленый) на группе сцепления 5, которые потенциально могут быть использованы для идентификации признака красной кожицы плода в селекции груши грушелистной. А в 2018 г. Хие Н. с соавт. [100] выявили, что у краснокоржего мутанта груши грушелистной Zaosu Red (*P. pyrifolia*) генетический локус, определяющий красные листья и кожицу плода, картирован в той же позиции, на группе сцепления 4, что и у краснокоржего мутанта груши европейской Max Red Bartlett. Суть мутации у Zaosu Red состоит в отсутствии 14 нуклеотидов в кодирующем регионе гена *PpBBX24* [101].

Таким образом, на данный момент генетическая основа красной окраски плода груши лучше изучена для азиатских груш, для них также обнаружены маркеры, рекомендованные для маркер-вспомогательной селекции. Мутация сорта Max Red Bartlett локализована на группе сцепления 4, однако публикаций об использовании МВС на этот признак, насколько нам известно, нет.

Еще один важный компонент внешнего вида груши – оржавленность кожицы. Условно груши имеют три типа кожицы – оржавленную,

промежуточную (частично оржавленную) и гладкую. Интересно, что в Японии оптимальный тип кожуры, как правило, оржавленный, при котором пробковый слой покрывает всю поверхность. С другой стороны, европейские производители и потребители предпочитают гладкий тип кожуры, у которой нет пробкового слоя. Основными компонентами пробкового слоя являются суберин, лигнин, дубильные вещества и другие фенольные соединения [47].

Wang Y. Z. с соавт. в 2014 г. [102] показали, что оржавленная кожица содержит больше целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина, чем гладкая. Гены, участвующие в оржавлении кожицы, сгруппированы в две группы: биосинтетические гены и реагирующие на стресс гены [103]. Согласно Wang Y. Z. с соавт. [104], у груши оржавленного типа экспрессия генов биосинтеза кутикулы подавляется во время стресса и экспрессируются гены отложения суберина, тогда как у груши гладкого типа стресс не изменяет экспрессию генов эпикарпия.

Оржавленный тип контролируется доминантным генетическим фактором, *R*. Локус количественного признака, связанный с типом кожицы плода, был идентифицирован на хромосоме 8. Были разработаны маркеры, однако они не показали тесной корреляции между их аллелями и типом кожицы плодов на всех сортах, следовательно эффективность этих маркеров не была подтверждена [46].

В исследовании Takeuchi Y. с соавт. [47] генотипировали 93 сортообразца груши по 13 маркерам SSR и STS. Сорта были классифицированы по основным гаплотипам НАР1–НАР8. Из восьми гаплотипов семь (НАР1–НАР7) были обнаружены у японской груши, а НАР8 был специфичен для китайской груши. Сравнивая гаплотипы и фенотипы сортообразцов и популяции F1, было обнаружено, что НАР1–НАР3 и НАР7 имели доминантный эффект и были связаны с образованием оржавленности, тогда как НАР4–НАР6 и НАР8 были рецессивными и не способствовали оржавлению. Восемь гаплотипов можно полностью отличить по двум SSR-маркерам (Psc07 и Psc03).

Таким образом, идентификация генов, ответственных за окраску и тип кожицы, может быть полезна для селекции сортов с красной кожицей плода, а также для проведения отбраковки по оржавленности кожицы плодов на ранних этапах онтогенеза.

## РАЗМЕР, ФОРМА И МАССА ПЛОДА

У груш, как и у большинства культурных видов плодов, размер плода, вероятно, является одним из признаков, которые наиболее резко изменились в процессе одомашнивания. Хотя фактический

размер плода всегда зависит от взаимодействия между экологическими и генетическими факторами, потенциальный размер плода определяется генетически и значительно варьируется у разных сортов [105].

Zhang R. с соавт. [48] в 2007 и 2008 гг. провели генетическое картирование гибридной популяции от скрещивания Bayuehong (*P. communis* L. × *P. bretschneideri* Rehd.) и Dangshansuli (*P. bretschneideri* Rehd.) и идентифицировали QTL для шести различных признаков плодов. Для массы плодов были обнаружены QTL *Pfw-2-1*, *Pfw-7-1*, *Pfw-8-1* и *Pfw-10-1*, из которых *Pfw-7-1* и *Pfw-8-1* считались основными. QTL были расположены на 2-й группе сцепления сорта Dangshansuli (объясняет 16.1% фенотипической вариации признака) и на группах сцепления 7 (17.2% фенотипической вариации признака), 8 (19.3% фенотипической вариации признака) и 10 (9.4% фенотипической вариации признака) карты Bayuehong. Наиболее близкими маркерами к каждому из этих QTLs были NH8b, EACAMCASC-2000, EAATMCAA-745. Интересно отметить, что в исследовании Wu J. с соавт. [45] на той же гибридной семье, но в другие годы (2008г., 2009 г.) были идентифицированы два QTL для массы плода на 13-й (маркер Pyd17\_012) и 17-й (маркер Pyb13\_250) группах сцепления. Дополнительно, Zhang R. с соавт. [48] обнаружили 10 QTL для трех признаков плода, а именно: длина плода (на группах сцепления 7 и 8), индекс формы плода (на группах сцепления 1, 2 и 8), диаметр плодов (на группах сцепления 10 и 15). Кроме того, три QTL (*Pfi-8-1*, *Pfw-7-1* и *Pfw-8-1*) считались основными. Обнаруженные QTL, их фенотипическая вариация и ближайшие маркеры указаны в табл. 1. Также картированы два признака поперечного диаметра плода (группы сцепления 3 (Pyb17\_086, 18.5%), 11 (Pyd11\_052, 16.3%), 17 (Pyb17\_086, 18.5%) и вертикального диаметра на группах сцепления 11 (Pybd11\_013, 17.8%) и 17 (Pyb17\_049, 27.7%; Pyb17\_292, 19.4%). При этом QTL на группе сцепления 17 влиял как на поперечный и вертикальный диаметр, так и на массу плода.

Еще в одном исследовании QTLs для массы плода у японских груш были обнаружены на группе сцепления 11 (рядом с маркером CH04h02) у сорта Akiakari (*P. pyrifolia* Nakai) и на группе сцепления 3 у сорта Taihaku (*P. pyrifolia* Nakai) (рядом с маркером CH01b12-m2) [46].

Таким образом, анализ QTL, направленный на выявление геномных областей, контролирующих размер, массу, диаметр плода, выявил целый ряд локусов на различных группах сцепления, однако, как правило, эти локусы нестабильны по годам и объясняют небольшой процент вариации фенотипического признака. Вероятно, в связи с этим

внедрение методик МВС на эти признаки на данный момент затруднительно.

## ВКУСОВЫЕ КАЧЕСТВА

Вкус плодов определяется множеством различных биохимических факторов, таких как накопление сахаров и кислот, твердость и текстура мякоти, а также наличие ароматических веществ. Содержание твердых растворимых веществ в плодах груши в основном определяется сахарами и органическими кислотами. Количества и соотношения между этими различными соединениями являются критическими факторами в определении вкуса фруктов и, следовательно, считаются ключевыми компонентами качества фруктов. Поскольку сахара и органические кислоты являются первичными метаболитами, многие факторы могут влиять на их синтез и накопление в плодах [94].

На данный момент выявлены QTL для следующих признаков, связанных со вкусом плода: содержание растворимых сухих веществ, содержание кислот, плотность, преобразование сахарозы (sucrose conversion).

Для содержания растворимых сухих веществ были обнаружены QTL в различных областях генома. Так, Zhang R. с соавт. [48] идентифицировали несколько QTL: *Pss-2-1* на группе сцепления 2 (маркер Pm3bem5-330, 12.6%) и *Pss-6-1* на группе сцепления 6 (EAAAMCASC-520, 18.9%) у сорта Dangshansuli, *Pss-5-1* на группе сцепления 5 (mebpm19-1300, 15.5%) у сорта Bayuehong. Yamamoto T. с соавт. [46] картировали два QTL, *SugC-2010-1* (CH02h11a) и *SugC-2010-2* (Hi01c11-m1) на группах сцепления 4 (11.3%) и 8 (19.0%) у японской груши *P. pyrifolia*. Wu J. с соавт. [45], используя Bayuehong и Dangshansuli, картировали три QTL на группах сцепления 5 (маркер Pyd05\_003, фенотипическая вариация 14.2%), 10 (Pyb10\_134, фенотипическая вариация 30.0%), 14 (Pyb14\_176, фенотипическая вариация 23.8%).

Анализ гибридной семьи от скрещивания японской груши Akizuki и селекционной линии 373-55 идентифицировал две области QTL, связанные с индивидуальным содержанием сахара в группах сцепления 1 (ближайший маркер TsuGNH250, фенотипическая вариация 7.7–26.6%) и 7 (ближайший маркер TsuGNH159, фенотипическая вариация 1.9–22.2%), и QTL общего содержания сахара на группе сцепления 11 (ближайший маркер sca114.0\_432636, фенотипическая вариация 1.7–21.4%) [49]. Также сообщается о QTL содержания кислот в плоде, расположенном на группе сцепления 14. Данный QTL расположился поблизости с маркером NH041a, а фенотипическая вариация, объясняемая аллельным полиморфизмом этого локуса, составила 19.3% [46].

Вместе с тем, был картирован признак плотности плода, который определяется компонентами клеточной стенки, размягчение которых происходит несколькими гидролазами во время созревания. QTL для этого признака был идентифицирован на группе сцепления 4 вблизи маркера TsuENH121-m1 и был стабилен на протяжении нескольких лет с фенотипической вариацией в 2010 г. 16.9%, а в 2011 г. 16.0% [46]. Еще один QTL был идентифицирован на группе сцепления 3 у родителей POP369 и POP356, полученных в результате межвидового скрещивания азиатских (*P. pyrifolia* Nakai и *P. bretschneideri* Rehd.) и европейских (*P. communis*) груш [106].

### СРОК ХРАНЕНИЯ

Одним из ключевых качеств плодовых культур является срок хранения плодов. Способность продолжительное время сохранять свой внешний вид и структуру является важным товарно-потребительским качеством. Сложная генетическая основа данного признака затрудняет процесс создания новых генотипов с высокими показателями лежкости.

Itai A. с соавт. в 2008 г. [50] использовали метод анализа генов, участвующих в производстве этилена во время созревания плодов японской груши. Были идентифицированы два CAPS-маркера (маркер А для гена *PPACS1* и маркер В для гена *PPACS2*), связанных с количеством продуцируемого этилена. Маркер А ассоциировался с высоким уровнем производства этилена, а маркер В – со средним уровнем производства этилена. Отсутствие этих двух маркеров позволило идентифицировать генотипы с низким содержанием этилена.

Yamamoto T. с соавт. [46] картировали QTL для времени сбора урожая, которые были расположены в нижней части группы сцепления 3 (ближайший маркер: *BGA35*) и в верхней части данной группы сцепления (ближайшие маркеры: *PPACS2* и *MEST050*). Ген *PPACS2*, принадлежащий к семейству генов АСС-синтазы, может в определенной мере влиять на время сбора урожая, предуборочное опадание плодов и потенциал хранения плодов.

Для даты созревания также были идентифицированы QTLs *Pfm-8-1* и *Pfm-8-2*, которые были расположены на группе сцепления 8 у сорта Bauehong, на их долю приходилось 22.0 и 13.0% наблюдаемой фенотипической вариации соответственно. *Pfm-8-1* определили как основной QTL, поскольку он имел оценку LOD 7.21 [48].

Таким образом, в результате изучения молекулярно-генетических основ сроков хранения и даты созревания плодов груши получены определенные данные, однако исследований их использования

для МВС, насколько нам известно, на данный момент не опубликовано.

Использование МВС груши, по опыту японских ученых из National Agriculture and Food Research Organization (NARO) [107], в 3 раза повысило эффективность селекционного процесса. При этом одновременно использовали несколько МВС-методик, а именно: на устойчивость к черной пятнистости и парше, окраску плодов, самонесовместимость и время сбора урожая (как потенциал сохранности плодов).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время активно изучается геном груши (*Pyrus*) и внедряются в селекционную практику молекулярно-генетические методы, которые позволят на начальном этапе селекции определять хозяйственно полезные признаки. Также использование ДНК-маркеров может помочь отобрать и сохранить важные генетические ресурсы, а при подборе родительских пар для гибридизации позволит выявить формы с необходимым набором генов для повышения эффективности селекции.

В модель “идеального” сорта груши входит целый перечень характеристик: помимо вкусовых качеств, внешнего вида плода, требований к срокам созревания (важны как ранние, так и поздние, лежкие сорта), это и требования к адаптивности растения (устойчивость к биотическим, болезням и вредителям и абиотическим стрессам, пониженным и повышенным температурам, условиям влажности), габитусу, ускоренному вступлению в плодоношение (что особенно актуально для груши, но может решаться частично за счёт специально подобранных подвоев айвы), самоплодности и/или партенокарпии. Многие из этих признаков локализованы в геноме, и обнаружены близкорасположенные ДНК-маркеры, однако большинство из них нуждаются в валидации, проверке. Валидация необходима также в силу того, что исследования, в результате которых обнаружили ДНК-маркеры, проводились на зарубежном генофонде. Отечественный генофонд имеет связь с европейским генофондом, однако имеет и свои особенности. Очевидно, что в настоящее время методики МВС для груши ограничены. Однако по опыту японских ученых, даже использование МВС на нескольких ключевых признаках (устойчивость к парше и черной пятнистости, самонесовместимость, цвет плода, срок сбора урожая) позволило в три раза повысить эффективность селекционного процесса [107]. Важно отметить также высокий темп развития технологий секвенирования генома и соответственно перспективу скорой разработки новых методик МВС.

Следует отметить, что отечественные работы ограничены валидацией и использованием разработанных за рубежом методик МВС.

Методики МВС наиболее эффективны при их использовании вместе с новыми технологиями селекции, ускоряющими цветение и сокращающими, таким образом, селекционный цикл. Они основаны на применении специальных трансформированных линий типа T1190 у яблони [108], EF-Spa у груши [109] или индуцировании цветения с помощью вирусов [110].

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fernández-Fernández F., Harvey N.G., James C.M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from European pear (*Pyrus communis* L.) // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. № 4. P. 1039–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01422.x>
2. Гончаров Н.П. Центры происхождения культурных растений // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 3/4. С. 561–574.
3. Bell R.L., Itai A. *Pyrus* // Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Temperate Fruits. Berlin; Heidelberg: Springer, 2011. P. 147–177. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8_8)
4. Седов Е.Н., Красова Н.Г., Долматов Е.А., Сидоров А.В. Использование генофонда груши для создания новых сортов // АгроXXI. 2008. № 4–6. С. 21–24.
5. Ермоленко В.Г., Аполехов Ф.Ф., Можар Н.В. Перспективы выращивания груши в центральном Предкавказье // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020. № 66. С. 284–294. <https://doi.org/10.30679/2219-5335-2020-6-66-284-294>
6. Долматов Е.А., Седов Е.Н. Итоги селекции груши во ВНИИСПК // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2019. Т. 6. № 2. С. 11–16.
7. Долматов Е. А., Борисова О. Н. Хозяйственно-биологические особенности форм айвы обыкновенной селекции ВНИИСПК в качестве подвоев для груши // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2018. Т. 5. № 1. С. 20–25.
8. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (по состоянию на 23.05.2023 г.). М.: ФГБНУ “Росинформагротех”, 2022. Т. 1. С. 379–381.
9. Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 2. С. 314–325.
10. Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. Genomics-assisted breeding for crop improvement // Trends in Plant Sci. 2005. V. 10. № 12. P. 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.004>
11. Collard B.C.Y., Mackill D.J. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century // Philosoph. Transactions Royal Society B: Biol. Sci. 2008. V. 363. № 1491. P. 557–572. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>
12. Свистунова Н.Ю., Бурменко Ю.В. Современные достижения и направления селекции груши (*Pyrus* L.) в России (обзор) // Вестник Красноярского гос. аграрного ун-та. 2022. № 2 (179). С. 85–92.
13. Jung S., Lee T., Cheng C.H. 15 years of GDR: New data and functionality in the Genome Database for Rosaceae // Nucl. Acids Res. 2019. V. 47. № D1. D1137–D1145 <https://doi.org/10.1093/nar/gky1000>.
14. Li H., Huang C.H., Ma H. Whole-genome duplications in pear and apple // The Pear Genome. 2019. P. 279–299. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11048-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11048-2_15)
15. Bouvier L., Bourcy M., Boulay M. et al. A new pear scab resistance gene *Rvp1* from the European pear cultivar “Navara” maps in a genomic region syntenic to an apple scab resistance gene cluster on linkage group 2 // Tree Genetics & Genomes. 2012. V. 8. № 1. P. 53–60. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0419-x>
16. Cho K.H., Shin I.S., Kim K.T. et al. Development of AFLP and CAPS markers linked to the scab resistance gene, *Rvn2*, in an inter-specific hybrid pear (*Pyrus* spp.) // The J. of Horticultural Sc. Biotechnol. 2009. V. 84. № 6. P. 619–624. <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512576>
17. Terakami S., Shoda M., Adachi Y. et al. Genetic mapping of the pear scab resistance gene *Vnk* of Japanese pear cultivar Kinchaku // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 113. № 4. P. 743–752. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0344-9>
18. Oh S., Han H., Kim D.A. A novel pear scab (*Venturia nashicola*) resistance gene, *Rvn3*, from interspecific hybrid pear (*Pyrus pyrifolia* × *P. communis*) // Plants. 2021. V. 10. № 12. <https://doi.org/10.3390/plants10122632>
19. Terakami S., Ogata N., Kita K. et al. Identification and genetic mapping of novel resistance gene, *Rvn4*, for pear scab in Chinese pear // Scientia Horticulturae. 2023. V. 317. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112032>
20. Pierantoni L., Dondini L., Cho K.H. et al. Pear scab resistance QTLs via a European pear (*Pyrus communis*) linkage map // Tree Genetics & Genomes. 2007. V. 3. P.

- 311–317.  
<https://doi.org/10.1007/s11295-006-0070-0>
21. Won K., Bastiaanse H., Kim Y.K. et al. Genetic mapping of polygenic scab (*Venturia pirina*) resistance in an interspecific pear family // Mol. Breeding. 2014. V. 34. P. 2179–2189.  
<https://doi.org/10.1007/s11032-014-0172-6>
22. Banno K., Ishikawa H., Hamauzu Y., Tabira H. Identification of a RAPD marker linked to the susceptible gene of black spot disease in Japanese pear // J. Japanese Society for Horticultural Sci. 1999. V. 68. № 3. P. 476–481.  
<https://doi.org/10.2503/jjshs.68.476>
23. Terakami S., Adachi Y., Iketani H. et al. Genetic mapping of genes for susceptibility to black spot disease in Japanese pears // Genome. 2007. V. 50. № 8. P. 735–741.  
<https://doi.org/10.1139/G07-053>
24. Terakami S., Moriya S., Adachi Y. Fine mapping of the gene for susceptibility to black spot disease in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) // Breeding Sci. 2016. V. 66. № 2. P. 271–280.  
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.66.271>
25. Terakami S., Adachi Y., Takeuchi Y. et al. Development of an SSR marker set for efficient selection for resistance to black spot disease in pear breeding // Breeding Sci. 2021. V. 71. № 2. P. 240–252.  
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.20136>
26. Cappai F., De Franceschi P., Ciriani A. et al. QTLs for susceptibility to *Stemphylium vesicarium* in pear // Mol. Breeding. 2018. V. 38. № 24.  
<https://doi.org/10.1007/s11032-018-0785-2>
27. Le Roux P. M. F., Christen D., Duffy B. et al. Redefinition of the map position and validation of a major quantitative trait locus for fire blight resistance of the pear cultivar “Harrow Sweet” (*Pyrus communis* L.) // Plant Breeding. 2012. V. 131. № 5. P. 656–664.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2012.02000.x>
28. Bokszczanin K., Dondini L., Przybyla A.A. First report on the presence of fire blight resistance in linkage group 11 of *Pyrus ussuriensis* Maxim. // J. of Applied Genet. 2009. V. 50. P. 99–104.  
<https://doi.org/10.1007/BF03195660>
29. Montanari S., Perchepied L., Renault D. et al. A QTL detected in an interspecific pear population confers stable fire blight resistance across different environments and genetic backgrounds // Mol. Breeding. 2016. V. 36. № 47.  
<https://doi.org/10.1007/s11032-016-0473-z>
30. Zurn J.D., Norelli J.L., Montanari S. et al. Dissecting genetic resistance to fire blight in three pear populations // Phytopathology. 2020. V. 110. № 7. P. 1305–1311.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-20-0051-R>
31. Montanari S., Guérif P., Ravon E. et al. Genetic mapping of *Cacopsylla pyri* resistance in an interspecific pear (*Pyrus* spp.) population // Tree Genetics & Genomes. 2015. V. 11. № 74.  
<https://doi.org/10.1007/s11295-015-0901-y>
32. Dondini L., De Franceschi P., Ancarani V. et al. Identification of a QTL for psylla resistance in pear via genome scanning approach // Scientia Horticulturae. 2015. V. 197. P. 568–572.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.018>
33. Brewer L., Shaw P., Wallis R. et al. Genetic mapping of pear sawfly (*Caliroa cerasi*) and pear blister mite (*Eriophyes pyri*) resistance in an interspecific pear family // Tree Genetics & Genomes. 2018. V. 14. № 38.  
<https://doi.org/10.1007/s11295-018-1254-0>
34. Yamamoto T., Kimura T., Shoda M. et al. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 106. P. 9–18.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-002-0966-5>
35. Sanzol J., Robbins T.P. Combined analysis of S-alleles in European pear by pollinations and PCR-based S-genotyping; correlation between S-phenotypes and S-RNase genotypes // J. Am. Society for Horticultural Sci. 2008. V. 133. № 2. P. 213–224.  
<https://doi.org/10.21273/JASHS.133.2.213>
36. Bennici S., Di Guardo M., Distefano G. et al. Deciphering S-RNase allele patterns in cultivated and wild accessions of Italian pear germplasm // Forests. 2020. V. 11. № 11.  
<https://doi.org/10.3390/f11111228>
37. Nikzad Gharehaghaji A., Arzani K., Abdollahi H. et al. Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases in the Central Asian pear germplasm and introgression of new alleles from other species of the genus *Pyrus* // Tree Genetics & Genomes. 2014. V. 10. P. 411–428.  
<https://doi.org/10.1007/s11295-013-0696-7>
38. Nikzad Gharehaghaji A., Arzani K., Abdollahi H. et al. Identification and S-genotyping of novel S-alleles in wild species of *Pyrus* genus // J. Crop Production and Processing. 2015. V. 5. № 17. P. 239–252.  
<https://doi.org/10.18869/acadpub.jcpp.5.17.239>
39. Sanzol J. Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases (S-RNases) in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles // Tree Genetics & Genomes. 2009. V. 5. P. 393–405.  
<https://doi.org/10.1007/s11295-008-0194-5>
40. Wang C.H., Li W., Tian Y.K. et al. Development of molecular markers for genetic and physical mapping of the PcDw locus in pear (*Pyrus communis* L.) // The Journal of Horticultural Sci. and Biotechnol. 2016. V. 91. № 3. P. 299–307.  
<https://doi.org/10.1080/14620316.2016.1155319>
41. Dondini L., Pierantoni L., Ancarani V. et al. The inheritance of the red colour character in European pear (*Pyrus communis*) and its map position in the mutated cultivar “Max Red Bartlett” // Plant Breeding. 2008. V. 127. № 5. P. 524–526.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01500.x>
42. Pierantoni L., Dondini L., De Franceschi P. et al. Mapping of an anthocyanin-regulating MYB

- transcription factor and its expression in red and green pear, *Pyrus communis* // Plant Physiol. Biochem. 2010. V. 48. № 12. P. 1020–1026.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.09.002>
43. Xue H., Shi T., Wang F. et al. Interval mapping for red/green skin color in Asian pears using a modified QTL-seq method // Horticulture Res. 2017. V. 4. № 17053.  
<https://doi.org/10.1038/hortres.2017.53>
  44. Yao G., Ming M., Allan A.C. et al. Map-based cloning of the pear gene *MYB114* identifies an interaction with other transcription factors to coordinately regulate fruit anthocyanin biosynthesis // The Plant J. 2017. V. 92. № 3. P. 437–451.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.13666>
  45. Wu J., Li L.T., Li M. et al. High-density genetic linkage map construction and identification of fruit-related QTLs in pear using SNP and SSR markers // J. Experimental Bot. 2014. V. 65. № 20. P. 5771–5781.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru311>
  46. Yamamoto T., Terakami S., Takada N. et al. Identification of QTLs controlling harvest time and fruit skin color in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) // Breeding Sci. 2014. V. 64. № 4. P. 351–361.  
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.351>
  47. Takeuchi Y., Nishio S., Terakami S. et al. Haplotype structure analysis of a locus associated with fruit skin type on chromosome 8 in Japanese pear // Tree Genetics & Genomes. 2021. V. 17. № 3.  
<https://doi.org/10.1007/s11295-020-01483-7>
  48. Zhang R.P., Wu J., Li X.G. et al. An AFLP, SRAP, and SSR genetic linkage map and identification of QTLs for fruit traits in pear (*Pyrus L.*) // Plant Mol. Biol. Reporter. 2013. V. 31. P. 678–687.  
<https://doi.org/10.1007/s11105-012-0544-1>
  49. Nishio S., Saito T., Terakami S. et al. Identification of QTLs associated with conversion of sucrose to hexose in mature fruit of Japanese pear // Plant Mol. Biol. Reporter. 2018. V. 36. P. 643–652.  
<https://doi.org/10.1007/s11105-018-1106-y>
  50. Itai A., Fujita N. Identification of climacteric and non-climacteric phenotypes of Asian pear cultivars by CAPS analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes // HortScience. 2008. V. 43. № 1. P. 119–121.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.1.119>
  51. Баскакова В. Л. Изучение сортового разнообразия груши (*Pyrus communis* L.) для формирования признаковой коллекции // Бюлл. Гос. Никитского бот. сада. 2019. № 131. С. 79–85.
  52. Hancock J. F., Lobos G. A. Pears // Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics. Dordrecht: Springer, 2008. P. 299–336.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9_10)
  53. Bell R. L., Zwet T. Host resistance in *Pyrus* to *Fabraea* leaf spot // Hortscience. 2005. V. 40. № 1. P. 21–23.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.1.21>
  54. Насонов А.И., Супрун И.И. Парша яблони: особенности возбудителя и патогенеза // Микология и фитопатология. 2015. Т. 49. № 5. С. 275–285.
  55. Кондратёнок Ю. Г., Якимович О. А., Марцинкевич Т. Н. Ржавчина груши (*Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter) – опасная грибная болезнь // Плодоводство. 2022. Т. 33. С. 205–210.
  56. Долматов Е.А., Хрыкина Т.А. Источники устойчивости к ржавчине груши // Вестник рос. сельскохозяй. науки. 2021. № 1. С. 42–45.
  57. Simionca Mărcășan L.I, Oltean I., Popa S. et al. Comparative analysis of phenotypic and molecular data on response to main pear diseases and pest attack in a germplasm collection // Intern. J. Mol. Sciences. 2023. V. 24. № 7.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24076239>
  58. Комардина В.С., Колтун Н.Е., Ярчаковская С.И. Фитосанитарное состояние интенсивных насаждений груши в Беларуси // Земледелие и растениеводство. 2020. № 1. С. 27–32.
  59. Lāce B., Bankina B. Evaluation of European pear rust severity depending on agro-ecological factors // Res. Rural Development. 2013. V. 1. P. 6–12.
  60. Kemp H., van Dieren M.C.A. Screening of pear cultivars for resistance to fungal diseases (*Venturia pirina*, *Nectria galligena*) // Acta Horticulturae. 2000. № 538. P. 95–101.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.538.12>
  61. Урбанович О.Ю. Кузмицкая П.В. ПЦР-основанное клонирование гомолога генов *HcrVf* из генома сорта груши Память Яковлева // Мол. и прикл. генетика. 2013. Т. 16. С. 55–60.
  62. Abe K., Kotobuki K., Saito T., Terai O. Inheritance of resistance to pear scab from European pears to Asian pears // J. Japanese Soc. Horticultural Sci. 2000. V. 69. № 1. P. 1–8.  
<https://doi.org/10.2503/jjshs.69.1>
  63. Llorente I., Montesinos E. Brown spot of pear: an emerging disease of economic importance in Europe // Plant Disease. 2006. V. 90. № 11. P. 1368–1375.  
<https://doi.org/10.1094/PD-90-1368>
  64. Vanneste J.L. What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? // Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora* // Wallingford UK: CABI. 2000. P. 1–6.  
<https://doi.org/10.1079/9780851992945.0001>
  65. Bell A.C., Ranney T.G., Eaker T.A., Sutton T.B. Resistance to fire blight among flowering pears and quince // HortScience. 2005. V. 40. № 2. P. 413–415.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.2.413>
  66. Dondini L., Pierantoni L., Gaiotti F. et al. Identifying QTLs for fire-blight resistance via a European pear (*Pyrus communis* L.) genetic linkage map // Mol. Breeding. 2005. V. 14. P. 407–418.  
<https://doi.org/10.1007/s11032-005-0505-6>

67. Kapytina A., Turuspekova S., Kerimbek N. et al. Genetic resistance of pear cultivars to fire blight // Intern. J. Biology and Chemistry. 2023. V. 16. № 1. P. 44–48. <https://doi.org/10.26577/ijbch.2023.v16.i1.04>
68. Dondini L., Sansavini S. European pear // Fruit Breeding. New York, NY: Springer, 2012. P. 369–413. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_11)
69. Bellini E, Nin S. Breeding for new traits in pear // Acta Horticulturae. 2002. V. 1. № 596. P. 217–224. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2002.596.31>
70. Harris M.K. Host resistance to the pear psylla in a *Pyrus communis* × *P. ussuriensis* hybrid // Environmental Entomology. 1973. V. 2. № 5. P. 883–888. <https://doi.org/10.1093/ee/2.5.883>
71. Pasqualini E., Civolani S., Musacchi S. et al. *Cacopsylla pyri* behaviour on new pear selections for host resistance programs // Bull. Insectology. 2006. V. 59. № 1. P. 27–37.
72. Salvianti F., Bettini P. P., Giordani E. et al. Identification by suppression subtractive hybridization of genes expressed in pear (*Pyrus* spp.) upon infestation with *Cacopsylla pyri* (Homoptera: Psyllidae) // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. № 17. P. 1808–1816. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.010>
73. Civolani S., Grandi G., Chicca M. et al. Probing behaviour of *Cacopsylla pyri* on a resistant pear selection // J. Appl. Entomology. 2013. V. 137. № 5. P. 365–375. <https://doi.org/10.1111/jen.12003>
74. Perchepped L., Guérif P., Ravon E. et al. Polygenic inheritance of resistance to *Cacopsylla pyri* in a *Pyrus communis* × *P. ussuriensis* progeny is explained by three QTLs involving an epistatic interaction // Tree Genetics & Genomes. 2016. V. 12. № 108. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1072-1>
75. Bonasera J.M., Kim J.F., Beer S.V. PR genes of apple: Identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora* // BMC Plant Biol. 2006. V. 6. № 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-23>
76. Седов Е.Н., Долматов Е.А., Красова Н.Г. Оценка исходных форм и результаты селекции груши во ВНИ-ИСПК // Аграрный науч. журн. 2017. № 8. С. 29–32.
77. Солонкин А.В., Никольская О.А., Киктева Е.Н. Выделение исходных форм при изучении самоплодности Нижневолжских сортов груши // Изв. Нижневолжского агроуниверс. комплекса: Наука и высшее проф. образование. 2021. Т. 61. № 1. С. 103–112.
78. Васеха В.В., Таранов А.А. Современное состояние плодового хозяйства в Республике Беларусь // Плодоводство. 2019. Т. 31. № 1. С. 7–12.
79. Samorodov V.N., Pospelov S.V., Potogaibo V.M. A path analysis of traits determining setting of parthenocarpic fruits in pear-trees in natural cross-pollination // Tsiptologiya i Genetika. 1989. V. 23. № 4. P. 55–58.
80. Kao T. H., Tsukamoto T. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility // The Plant Cell. 2004. V. 16. № 1. P. S72–S83. <https://doi.org/10.1105/tpc.016154>
81. Sassa H., Kakui H., Miyamoto M. et al. *S* locus *F-box* brothers: Multiple and pollen-specific *F-box* genes with *S* haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear // Genetics. 2007. V. 175. № 4. P. 1869–1881. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.068858>
82. Сунрун И.И., Степанов И.В., Токмаков С.В. Молекулярно-генетические аспекты самонесовместимости яблони // Политематический сетевой электронный науч. журн. Кубанского гос. аграрного ун-та. 2012. № 80. С. 80–89.
83. Wu L., Liu X., Zhang M.Y. et al. Self S-RNase inhibits ABF-LRX signaling to arrest pollen tube growth to achieve self-incompatibility in pear // Plant J. 2023. V. 113. № 3. P. 595–609. <https://doi.org/10.1111/tpj.16072>
84. Claessen H., Keulemans W., Van de Poel B., De Storme N. Finding a compatible partner: Self-incompatibility in European pear (*Pyrus communis*); molecular control, genetic determination, and impact on fertilization and fruit set // Frontiers Plant Science. 2019. V. 10. № 407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00407>
85. Shi S.L., Cheng H.Y., Wu L. et al. Identification of S-genotypes in 18 pear accessions and exploration of the breakdown of self-incompatibility in the pear cultivar Xinxue // Sci. Horticulturae. 2018. V. 238. P. 350–355. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.003>
86. Mota M., Tavares L., Oliveira C.M. Identification of *S*-alleles in pear (*Pyrus communis* L.) cv. “Rocha” and other European cultivars // Sci. Horticulturae. 2007. V. 113. № 1. P. 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.022>
87. Takasaki T., Moriya Y., Okada K. et al. cDNA cloning of nine *S* alleles and establishment of a PCR-RFLP system for genotyping European pear cultivars // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 112. P. 1543–1552. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0257-7>
88. Nashima K., Terakami S., Nishio S. et al. *S*-genotype identification based on allele-specific PCR in Japanese pear // Breeding Sci. 2015. V. 65. № 3. P. 208–215. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.208>
89. He M., Li L., Xu Y. et al. Identification of *S*-genotypes and a novel S-RNase in 84 native Chinese pear accessions // Horticultural Plant J. 2022. V. 8. № 6. P. 713–726. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.02.002>
90. Сунрун И.И., Токмаков С.В., Макаркина М.В. Анализ аллельного полиморфизма гена самонесовместимости у некоторых отечественных сортов груши (*Pyrus communis* L.) с использованием консенсусных и *S5*, *S8*, аллель специфичных ДНК-маркеров // Политематический сетевой электронный науч. журн.



- Кубанского гос. аграрного ун-та. 2014. № 103. С. 607–618.
91. Wang C., Tian Y., Buck E. J. et al. Genetic mapping of *PcDw* determining pear dwarf trait // J. Am. Soc. Horticultural Sci. 2011. V. 136. № 1. P. 48–53. <https://doi.org/10.21273/JASHS.136.1.48>
  92. Zheng X., Zhang H., Xiao Y. et al. Deletion in the promoter of *PcPIN-L* affects the polar auxin transport in dwarf pear (*Pyrus communis* L.) // Sci. Reports. 2019. V. 9. № 25954. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55195-7>
  93. Долматов Е.А., Качалкин М.В., Сидоров А.В., Хрыкина Т.А. Перспективы селекции груши с моногенно-детерминированной карликовостью // Селекция, генетика и сортовая агротехника плодовых культур: Сб. научных статей. Орел: ВНИИСПК, 2013. С. 44–53.
  94. De Franceschi P., Dondini L. Molecular mapping of major genes and QTLs in pear // The Pear Genome. Cham: Springer, 2019. P. 113–131. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11048-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11048-2_6)
  95. Volz R.K., White A.G., Brewer L.R. Breeding for red skin colour in interspecific pears // Acta Horticulturae. 2008. V. 1. № 800. P. 469–474.
  96. Yang Y.N., Yao G.F., Zheng D. et al. Expression differences of anthocyanin biosynthesis genes reveal regulation patterns for red pear coloration // Plant Cell Reports. 2015. V. 34. P. 189–198. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1698-0>
  97. Reimer F. C. A genetic bud mutation in the pear // J. Heredity. 1951. V. 42. № 2. P. 93–94.
  98. Brown A. G. Genetical studies in pears V. Red mutants // Euphytica. 1966. V. 15. № 3. P. 425–429.
  99. Wang Z., Meng D., Wang A. et al. The methylation of the *PcMYB10* promoter is associated with green-skinned sport in Max Red Bartlett pear // Plant Physiology. 2013. V. 162. № 2. P. 885–896. <https://doi.org/10.1104/pp.113.214700>
  100. Xue H., Wang S., Yao J. L. et al. The genetic locus underlying red foliage and fruit skin traits is mapped to the same location in the two pear bud mutants “Red Zaosu” and “Max Red Bartlett” // Hereditas. 2018. V. 155. № 25. <https://doi.org/10.1186/s41065-018-0063-7>
  101. Ou C., Zhang X., Wang F. et al. A 14 nucleotide deletion mutation in the coding region of the *PpBBX24* gene is associated with the red skin of “Zaosu Red” pear (*Pyrus pyrifolia* White Pear Group): A deletion in the *PpBBX24* gene is associated with the red skin of pear // Horticulture Research. 2020. V. 7. № 39. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0259-7>
  102. Wang Y.Z., Zhang S., Dai M.S. et al. Pigmentation in sand pear (*Pyrus pyrifolia*) fruit: biochemical characterization, gene discovery and expression analysis with exocarp pigmentation mutant // Plant Molecular Biology. 2014. V. 85. P. 123–134. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0173-1>
  103. Legay S., Guerriero G., Deleruelle A. et al. Apple russetting as seen through the RNA-seq lens: strong alterations in the exocarp cell wall // Plant Molecular Biology. 2015. V. 88. P. 21–40. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0303-4>
  104. Wang Y.Z., Dai M.S., Cai D.Y. et al. A review for the molecular research of russet/semi-russet of sand pear exocarp and their genetic characters // Sci. Horticulturae. 2016. V. 210. P. 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.07.019>
  105. Zhang C., Tanabe K., Wang S. et al. The impact of cell division and cell enlargement on the evolution of fruit size in *Pyrus pyrifolia* // Ann. Botany. 2006. V. 98. № 3. P. 537–543. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl144>
  106. Saeed M., Brewer L., Johnston J. et al. Genetic, metabolite and developmental determinism of fruit friction discolouration in pear // BMC Plant Biology. 2014. V. 14. № 241. P. 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0241-3>
  107. Saito T. Advances in Japanese pear breeding in Japan // Breeding Science. 2016. V. 66. № 1. P. 46–59. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.66.46>
  108. Flachowsky H., Hanke M.V., Peil A. et al. A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants // Plant Breeding. 2009. V. 128. № 3. P. 217–226. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01591.x>
  109. Freiman A., Shlizerman L., Golobovitch S. et al. Development of a transgenic early flowering pear (*Pyrus communis* L.) genotype by RNAi silencing of *PcTFL1-1* and *PcTFL1-2* // Planta. 2012. V. 235. P. 1239–1251. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1571-0>
  110. McGarry R.C., Klocko A.L., Pang M. et al. Virus-induced flowering: an application of reproductive biology to benefit plant research and breeding // Plant Physiology. 2017. V. 173. № 1. P. 47–55. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01336>

## Localization of Genetic Factors that Determine the Economically-Useful Traits of the PEAR (*Pyrus*) and Methods of Marker-Assisted Selection

A. A. Pavlenko<sup>1, \*</sup>, A. V. Pikunova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, Orel district, Zhilina, 302530 Russia

\*e-mail: pavlenko@orel.vniispk.ru

DNA markers are an alternative method for accelerated identification of interested genes and loci at the early stages of ontogenesis, and, consequently, DNA markers are able to intensify the breeding process. This article represents overview of research on the localization of economically useful traits in the pear genome and the development and use of marker-assisted selection (MAS) techniques. At the moment, several traits have been localized in the pear genome, i.e.: resistance to scab European (*V. pirina* Aderh) and Asian (*V. nashicola*), black spot (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler), brown spot (*Stemphylium vesicarium*), fire blight (*Erwinia amylovora*), pear psylla (*Cacopsylla pyri*), pear sawfly (*Caliroa cerasi*), pear blister mite (*Eriophyes pyri*), self-incompatibility, dwarf trait. Major genes and loci of quantitative traits (QTLs) of fruits characteristics have also been identified, namely: skin color and rustiness of the fruit, size and weight of the fruit, taste, level of ethylene production, harvest time etc. It should be noted that currently Russian research is limited to the validation and use of MAS methods developed abroad. According to the experience of Japanese scientists, the use of MAS for several key traits has made it possible to triple the efficiency of the breeding process. Despite the currently limited list of MAS methods for pears, the high speed of genomic technologies development promises rapid development of new MAS methods in the future. In combination with new breeding technologies (New Breeding Techniques) based on accelerated flowering, the use of MAS for pears is a promising direction of breeding.

**Keywords:** marker-assisted selection methods, quantitative trait loci, disease resistance, self-incompatibility, dwarf trait, fruit quality.

УДК 575.224.232

## CNV У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЯМИ ПСИХОМОТОРНОГО РАЗВИТИЯ: МЕТА-АНАЛИЗ

© Д. А. Федотов<sup>1</sup>, \*, А. А. Кашеварова<sup>1</sup>,  
И. Н. Лебедев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия  
\*e-mail: dmitry.fedotov@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 06.10.2023 г.  
После доработки 06.12.2023 г.  
Принята к публикации 12.12.2023 г.

Обзор представляет собой комплексный анализ вариаций числа копий участков ДНК (CNV), обнаруженных у пациентов с нарушениями психомоторного развития (НПР) и опубликованных в мировой литературе, с применением специально разработанных критериев отбора. CNV охарактеризованы в отношении клинической значимости, типа изменения копийности (микроделеции/микродупликации), размера, происхождения и вовлеченных генов. Исследуемая выборка включала 3375 пациентов с НПР, среди которых патогенные и вероятно патогенные CNV, а также варианты с неопределенной клинической значимостью были обнаружены у 395 индивидов (12%). Хромосомные варианты из каждой категории выявлены у 89 (3%), 56 (2%) и 241 (7%) пациентов соответственно. Девять индивидов имели комбинации CNV разной клинической значимости. Количество микродупликаций незначительно преобладает над числом микроделей (250 и 204 соответственно). Размер большей части CNV варьировал в диапазоне от 193 пар нуклеотидов до 400 кб и от 1 до 3 Мб (237 и 96 соответственно). 72 варианта возникли *de novo*, 165 были унаследованы. 87 CNV ассоциированы с 33 известными микроделеционными/микродупликационными синдромами. Наиболее часто встречались синдромы микродупликации 1q21.1 (7/395, 1.8%) (OMIM:612475), микроделеции 2p16.3 (9/395, 2.3%) (OMIM:614332), микроделеции 15q13.3 (7/395, 1.8%) (OMIM:612001), микроделеции 16p11.2 (9/395, 2.3%) (OMIM:611913) и микродупликации 22q11.2 (7/395, 1.8%) (OMIM:608363). В результате анализа обогащения было установлено, что патогенные CNV, как и варианты с неопределенной клинической значимостью, обогащены генами, ассоциированными с аномальным поведенческим/неврологическим фенотипом. Вероятно патогенные CNV включали гены, связанные с нарушениями нервной системы, а также гомеостаза/метаболизма.

**Ключевые слова:** вариации числа копий участков ДНК (copy number variation, CNV), нарушения психомоторного развития (НПР), интеллектуальные нарушения, расстройства аутистического спектра (РАС), синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ).

**DOI:** 10.31857/S0016675824050026 **EDN:** CJRONR

Нарушения психомоторного развития (НПР) представляют собой большую группу этиологически разнородных состояний, ассоциированных с поражениями нервной системы. НПР характеризуются нарушением когнитивных, речевых, моторных, а также социальных способностей и включают такие патологии как интеллектуальные расстройства, задержку речи, расстройства аутистического спектра (РАС), синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), нарушения обучаемости и моторного развития [1]. Среди причин

НПР выделяют как средовые, так и генетические факторы. Генетические факторы включают моногенные формы наследственных болезней (X-сцепленные, аутосомно-рецессивные, аутосомно-доминантные), экспансию тринуклеотидных повторов, числовые аномалии хромосом (моносомии и трисомии), а также структурные хромосомные варианты, которые представлены вариациями числа копий участков ДНК (Copy Number Variation, CNV) [2]. CNV представляют собой фрагмент ДНК размером более одной тысячи пар нуклеотидов, по

числу копий отличающийся от референсного генома [3]. С развитием молекулярно-генетических технологий стали выявлять структурные хромосомные варианты значительно более мелкого размера, и в настоящее время нижняя граница размера CNV составляет 50 пар нуклеотидов [4].

Среди возможных молекулярных эффектов CNV описаны такие, как изменение копийности одного или нескольких дозозависимых генов, входящих в состав варианта, эффект положения, образование химерного гена, а также гомозиготизация рецессивных мутаций и манифестация эффектов импринтинга. CNV могут изменять 3D-архитектуру генома, таким образом нарушая работу генов, не вовлеченных в аберрацию непосредственно, что значительно затрудняет интерпретацию их клинической значимости [5]. Кроме этого, CNV могут выступать в роли модифицирующих факторов. Например, ранее предложенная “двуударная модель” подразумевает аддитивный эффект CNV, при котором первая CNV (первый удар) создает сенсибилизированный генетический фон, предрасполагающий к появлению некоторых психоневрологических дисфункций, а вторая CNV/SNP (второй удар) способствует более тяжелому фенотипу [6]. Известно о явлении неполной пенетрантности в отношении CNV, при котором патологический эффект возникает не у всех носителей варианта [7].

За последние десятилетия произошло активное развитие молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов исследования: хромосомный микроматричный анализ (Array Comparative Genomic Hybridization, aCGH), полноэкзомное и полногеномное секвенирование (Whole Exome Sequencing, WES и Whole Genome Sequencing, WGS). Это привело к описанию большого количества новых генных и хромосомных вариантов у пациентов с НПП и, соответственно, к значительному росту публикаций, описывающих генетические основы данной группы патологий. CNV являются важной этиологической составляющей НПП, и их спектр чрезвычайно многообразен. В ряде случаев в результате накопления данных о структурных хромосомных аберрациях в определенных регионах генома возможно выделить соответствующие микроделеционные/микродупликационные синдромы или, напротив, отнести CNV к разряду популяционного полиморфизма, распространенного у здоровых индивидов. Такие сведения накапливаются в Базе данных геномных вариантов (Database of Genomic Variants, DGV) [8], которая содержит CNV, обнаруженные у условно здоровых индивидов, а также в Базе данных геномных вариантов и фенотипов у человека (Database of Genomic Variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources, DECIPHER) и каталоге менделевского наследования у человека (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM),

включающих информацию о перестройках, выявленных у пациентов с различными патологиями, в том числе и с НПП [9, 10]. Однако в первую очередь информация о новых CNV появляется в виде отдельных публикаций, что делает интерпретацию патогенетической значимости вариантов при рутинном диагностическом исследовании значительно более трудоемким процессом. При выполнении данного исследования проведен анализ литературных данных с учетом строгих специально разработанных критериев с целью получения достоверной информации об особенностях CNV у пациентов с НПП.

## МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование выполнено в соответствии с рекомендациями PRISMA [11] и представляет собой анализ публикаций, посвященных CNV при НПП и также находящихся в открытом доступе в базе NCBI PubMed [12]. Поиск статей проводился с использованием двух вариантов запросов – “neurodevelopmental disorders, copy number variation” ( $n = 1410$ ) и “neurodevelopmental disorders, aCGH” ( $n = 208$ ). Всего обнаружено 1618 публикаций. Далее проводился отбор публикаций с использованием следующих критериев включения:

обследованы пациенты с нарушениями психомоторного развития (нарушениями интеллектуального развития, задержкой речи, РАС, нарушениями обучаемости, моторного развития, СДВГ);

в публикации приведен полный список обнаруженных CNV с интерпретацией клинической значимости каждого варианта;

размер каждой CNV не превышает 10 Мб;

указана версия сборки генома;

публикация на английском языке;

публикация в свободном доступе.

Исследования, не соответствующие вышеуказанным критериям, исключались из мета-анализа. Большая часть публикаций была исключена из анализа, поскольку тема данных работ не соответствовала теме мета-анализа, исследование проводилось на выборке менее 10 индивидов, а также не содержало полного списка CNV (рис. 1). Для выполнения исследования была сформирована единая база данных, включающая все идентифицированные CNV (патогенные, вероятно патогенные и варианты с неопределенной клинической значимостью) (таблица 1 в Приложении). Классификация CNV осуществлялась авторами публикаций, данные которых включены в мета-анализ, с использованием рекомендации Американской коллегии по медицинской генетике и геномике (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) [3].

Все CNV представлены в сборке генома GRCh37/hg19. В случае если в публикации присутствовали варианты в другой версии сборки генома, координаты переводились в GRCh37/hg19 с использованием ресурса NCBI Remap [13].

### ХАРАКТЕРИСТИКА CNV У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЯМИ ПСИХОМОТОРНОГО РАЗВИТИЯ

После отбора статей в соответствии с заданными критериями включения в следующий этап анализа вошло только семь публикаций (табл. 1, рис. 2). Общая выборка составила 3375 индивидов, среди которых CNV были обнаружены у 395 (12%) (таблица 1 в Приложении). Всего было выявлено 454 CNV (204 микроделеции, 249 микродупликаций и одна микротрипликация). При этом 89 (3%) индивидов являлись носителями патогенных вариантов. Данные мета-анализа согласуются с литературными, согласно которым патогенные CNV среди пациентов с НПР встречаются с частотой до 15% [21]. Частота патогенных вариантов при расстройствах аутистического спектра составляет 9% [22]. Вероятно патогенные CNV и варианты с неопределенной клинической значимостью были идентифицированы у 56 (2%) и 241 (7%) пациентов соответственно. 82 индивида являлись носителями (21% – от общего числа пациентов с CNV) вариантов, ассоциированных с 33 известными микроделеционными и микродупликационными синдромами (табл. 2). Чаще всего встречались синдромы микродупликации 1q21.1 (7/395, 1.8%) (OMIM:612475), микроделеции 2p16.3 (OMIM: 614332) (9/395, 2.3%), микроделеции 15q13.3 (7/395, 1.8%) (OMIM: 612001), микроделеции 16p11.2 (9/395, 2.3%) (OMIM: 611913) и микродупликации 22q11.2 (7/395, 1.8%) (OMIM:

608363). Количество вариантов с неопределенной клинической значимостью в значительной степени преобладает над числом патогенных и вероятно патогенных CNV – 292 (64%), 99 (22%) и 63 (14%) соответственно.

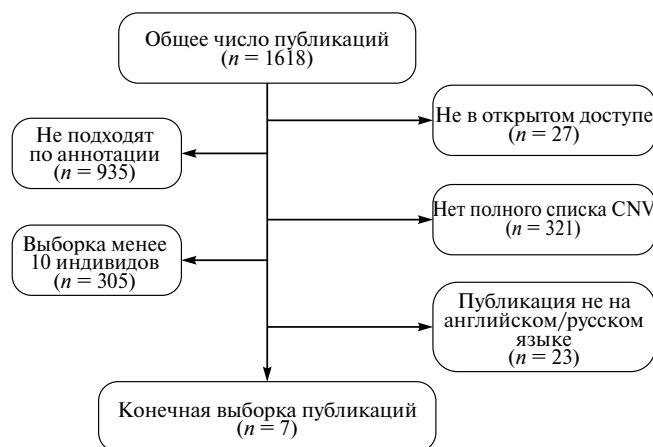
CNV обнаружены на всех хромосомах. Наиболее обогащены структурными aberrациями хромосомами являлись 1, 2, 7, 15, 16, X. Было обнаружено от 29 (хромосома 1) до 49 CNV (хромосома 16). Микроделеции в большей степени локализованы на хромосомах 2 и 15, при этом микродупликациями обогащены хромосомы 16 и X (рис. 3,а). Возможно, это связано с распределением сегментных дупликаций в геноме человека, являющихся субстратом для неаллельной гомологичной рекомбинации, обуславливающей формирование CNV [25]. Известно, что хромосома 16 является одной из самых богатых генами хромосом генома человека, а ее последовательность на 10% состоит из сегментных дупликаций, приводящих к нестабильности и, как следствие, к изменению числа копий участков ДНК [26]. Наибольшую представленность на X хромосоме CNV, ассоциированных с нарушением функций мозга, можно объяснить содержанием большого количества генов, экспрессирующихся в данном органе [27].

Среди патогенных CNV преимущественно встречались варианты на хромосомах 1, 2, 15, 16, 22 (от 9 до 16 CNV) (рис. 3,б). Только микроделеции были обнаружены на хромосомах 2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 18, при этом только микродупликации были локализованы на хромосомах 4 и 14. Ни одного патогенного варианта не выявлено на хромосомах 10, 13, 19, 20, 21. На остальных хромосомах детектированы комбинации микроделеций и микродупликаций. При этом большее количество микроделеций

**Таблица 1.** Статьи, включенные в исследование

| Количество пациентов | Количество CNV | Метод исследования  | Ссылка |
|----------------------|----------------|---|--------|
| 98                   | 42             | ХМА на микрочипах SurePrint G3 Microarray<br>4 × 180 К  | [14]   |
| 98                   | 49             | ХМА на микрочипах SurePrint G3 Microarray<br>4 × 180 К  | [15]   |
| 2691                 | 203            | ХМА на платформе Affymetrix<br>CytoScan HD  | [16]   |
| 68                   | 13             | ХМА на кастомных микрочипах<br>4 × 180 К  | [17]   |
| 325                  | 116            | ХМА   | [18]   |
| 15                   | 9              | ХМА на микрочипах BlueGnome CytoChip ISCA 8 × 60 К  | [19]   |
| 80                   | 22             | SNP-микрочипы Illumina610-Quad;<br>SNP-микрочипы<br>Illumina OmniExpress;<br>ХМА на микрочипах BlueGnome CytoChip ISCA<br>8 × 60 k v2.0 array | [20]   |

Примечание. ХМА – хромосомный микроматричный анализ.



**Рис. 1.** Алгоритм поиска публикаций (NCBI PubMed) [12]. Последняя дата обращения – 01.05.2023.

обнаружено на хромосоме 2; патогенные микродупликации на данной хромосоме выявлены не были.

Вероятно патогенные CNV были обнаружены на всех хромосомах, кроме 4, 5 и 13 (рис. 3,е). Микроделециями была обогащена хромосома 2, как и в случае с патогенными перестройками. При этом большая часть микродупликаций локализована на хромосоме X, микроделений на данной хромосоме обнаружено не было.

Варианты с неопределенной клинической значимостью в большинстве случаев встречались на хромосомах 7, 15, 16 и X (от 20 до 31 CNV) (рис. 3,з). Как микроделеции, так и микродупликации локализованы на всех хромосомах, кроме хромосом 14 и 22, которые включали только микродупликации. Микроделециями обогащена хромосома 15, а микродупликациями хромосомы 16 и X.

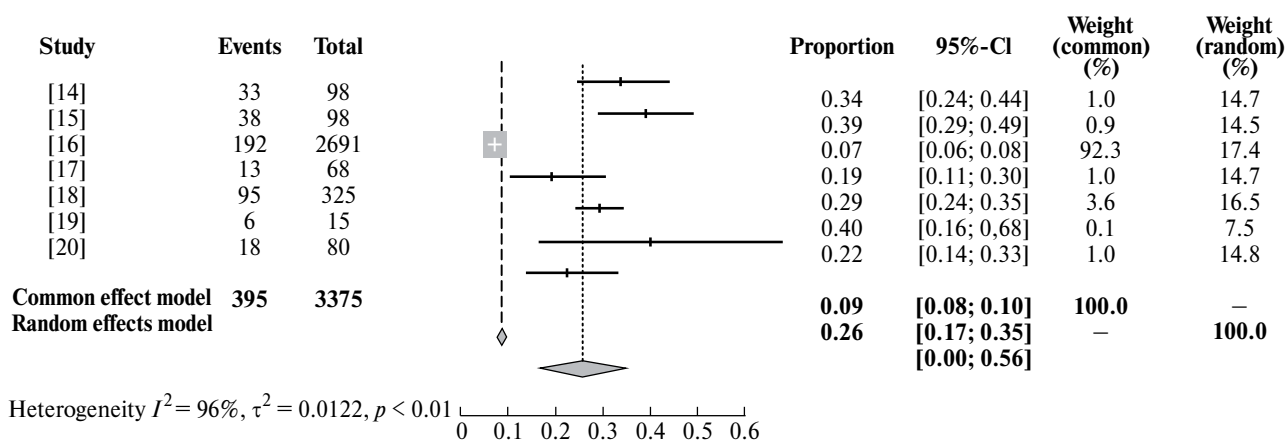
Среди всех CNV наблюдается незначительное преобладание микродупликаций над микроделециями – 250 (55%) и 204 (45%) соответственно (рис. 4,а). Среди патогенных CNV большую часть вариантов составляют микроделеции – 62 (63%). Напротив, среди вероятно патогенных вариантов и CNV с неопределенной клинической значимостью чаще выявлены микродупликации – 33 (52%) и 180 (62%) соответственно (рис. 4,б). Считается, что микроделеции, в силу своих молекулярных эффектов, более патогенны, чем микродупликации. Однако в то же время преобладание микроделений может указывать на вероятную недооценку патогенного эффекта микродупликаций [28].

Для 237 из 454 вариантов у 202 (51%) из 395 пациентов с CNV было известно их происхождение. Для 42 (9%) CNV у 34 (9%) индивидов был определен унаследованный характер вариантов без

уточнения материнского или отцовского происхождения. Среди патогенных микроделений подавляющее большинство перестроек возникли *de novo* – 26 (79%). Патогенные микродупликации чаще были унаследованными – 9 вариантов (53%) (рис. 5,а). При этом среди патогенных CNV преобладают возникшие *de novo* микроделеции ( $p = 0.023$ ). Напротив, в группе вероятно патогенных CNV, среди микроделений и микродупликаций, чаще встречались унаследованные варианты – 17 (68%) и 16 (73%) соответственно (рис. 5,б). Статистически значимых различий между частотами микроделений и микродупликаций выявлено не было ( $p = 0.724$ ). Аналогичная картина наблюдалась и среди CNV с неопределенной клинической значимостью. Количество унаследованных микроделений в данной группе составляет 38 (79%), а микродупликаций – 78 (85%) (рис. 5,в). Статистически значимых различий между частотами микроделений и микродупликаций также не было выявлено ( $p = 0.403$ ). Таким образом, отмечена тенденция к увеличению частоты патогенных *de novo* вариантов по сравнению с частотами вероятно патогенных CNV и вариантов с неопределенной клинической значимостью.

Известно, что *de novo* происхождение CNV является одним из факторов, с большой вероятностью определяющих ее патогенность. В то же время унаследованный характер CNV не всегда отражает ее нейтральный клинический статус [28]. Патогенные/вероятно патогенные варианты могут обладать неполной пенетрантностью и наследоваться от условно здоровых родителей, а следовательно существуют модифицирующие факторы, которые могут вносить вклад в появление симптомов заболевания у носителя CNV. Такими факторами являются эпигенетические модификации, дифференциальная аллельная экспрессия генов, гены-модификаторы, инактивация X-хромосомы, наличие дополнительной CNV/SNP, а также влияние окружающей среды [7, 29, 30].

В группе унаследованных патогенных CNV наблюдаются отличия в отношении направления изменения копийности (рис. 5,а). Микродупликации в большинстве случаев имеют материнское происхождение, тогда как большая часть микроделений унаследована от отца. Известно, что среди мужчин с бесплодием повышена частота CNV, размером более 1 Мб, в том числе и синдромальных вариантов, например микроделеции 1q21.1 (OMIM:612474) [31]. Среди вероятно патогенных унаследованных вариантов микроделеции с одинаковой частотой имеют материнское и отцовское происхождение (рис. 5,б). Однако микродупликации чаще унаследованы от матери. В группе унаследованных CNV с неопределенной клинической значимостью как для микроделений, так и для микродупликаций характерно материнское происхождение (рис. 5,в).



**Рис. 2.** График результатов научных исследований, включенных в мета-анализ, и суммарных данных. Study – ссылки на работы, включенные в анализ. Events – количество пациентов с патогенными CNV. Total – общее количество обследованных пациентов. График – меры эффекта для каждого из исследований, включая доверительные интервалы, представленные горизонтальными линиями. Ромб – суммарный эффект. Proportion – доля пациентов с патогенными CNV в общей выборке. Weight – вклад каждого исследования в мета-анализ [11].

Для вероятно патогенных CNV и вариантов неопределенного клинического значения характерно материнское происхождение (рисунок 5, б, в). Возможно, это связано с отличиями в процессе генетической регуляции мейотической рекомбинации в женском и мужском мейозе [32, 33]. Так, известно, что CNV в регионах 1p36 и 17p11.2 чаще имеют отцовское происхождение [34, 35]. *De novo* микроделеции в локусах 16p11.2, 17q11.2 и 22q11.2 чаще возникают на хромосомах, унаследованных от матери [36–38]. В исследовании В. Wang с соавт., проводившемся на когорте 287 детей с задержкой развития, было показано, что 62% *de novo* CNV возникли в отцовской зародышевой линии клеток. Это подтверждает модель, согласно которой спонтанные мутации в отцовской зародышевой линии вносят основной вклад в мутационное бремя *de novo* вариантов у потомства [39].

Размер вариантов в исследуемой выборке варьировал от 193 пн (микродупликация 17p13.3) до 9 Мб (микроделеция 11q24.2q25). Среди всего спектра CNV преобладают варианты, размер которых находится в диапазоне от 193 пн до 400 кб, а также варианты размером 1–3 Мб (рис. 6, а). Увеличение числа перестроек небольшого размера, возможно, связано с использованием ДНК-чипов высокого разрешения в исследованиях [14–17]. Объяснением причины выявления микродупликации региона 17p13.3 (OMIM: 613215) размером 193 пн, может служить неравномерное распределение точек на ДНК-микрочипе. Известно, что микроматрица имеет более высокую плотность зондов в синдромальных регионах, что и приводит к идентификации CNV крайне мелкого размера. При идентификации CNV небольшого размера решение о дальнейших исследованиях для пациентов с моно-/внутригенными CNV с целью установления окончательного молекулярного диагноза необходимо

принимать, основываясь на совокупности факторов. К таким факторам можно отнести информацию о вовлеченных в аберрацию генах (гаплонедостаточность/триплоизбыточность), происхождение CNV (*de novo*/унаследованное), а также связь CNV с фенотипом пациента. На следующем этапе обследования индивида можно рекомендовать анализ с помощью экзомного/полногеномного секвенирования с целью поиска патогенного варианта на интактном гомологе (компаундная гетерозигота).

В группе патогенных CNV чаще встречаются варианты размером 3.6–700 кб и варианты размером 1–3 Мб (рис. 6, б; табл. 3). При этом большинство патогенных микроделений имеют размер 3.6–300 кб и от 1 до 2 Мб. Размер большинства микродупликаций в данной группе варьирует от 1 до 3 Мб (рис. 6, в; табл. 4).

Среди вероятно патогенных вариантов преобладают CNV размером 48–400 кб и 1–3 Мб (рис. 6, в, табл. 3). В группе микроделений чаще встречаются варианты размером 48–300 кб, а среди микродупликаций – 200–400 кб и 1–3 Мб (рис. 6, в; табл. 4). В группе CNV с неопределенной клинической значимостью превалируют варианты размером от 193 пн до 600 кб и от 1 до 2 Мб (рис. 6, г; табл. 3). При этом большая часть микроделений имеет размер 19–600 кб, а микродупликаций – от 193 пн до 700 кб и от 1 до 3 Мб (рис. 6, г; табл. 4).

Наблюдается тенденция к увеличению частоты крупных CNV (более 1 Мб) от вариантов неопределенного клинического значения к вероятно патогенным CNV и затем к патогенным вариантам. Согласно R. Redon с соавт., патогенные CNV имеют размер от 1 Мб [40]. Это объясняется корреляцией размера варианта с числом вовлеченных в перестройку генов. Очевидно, чем больше генов

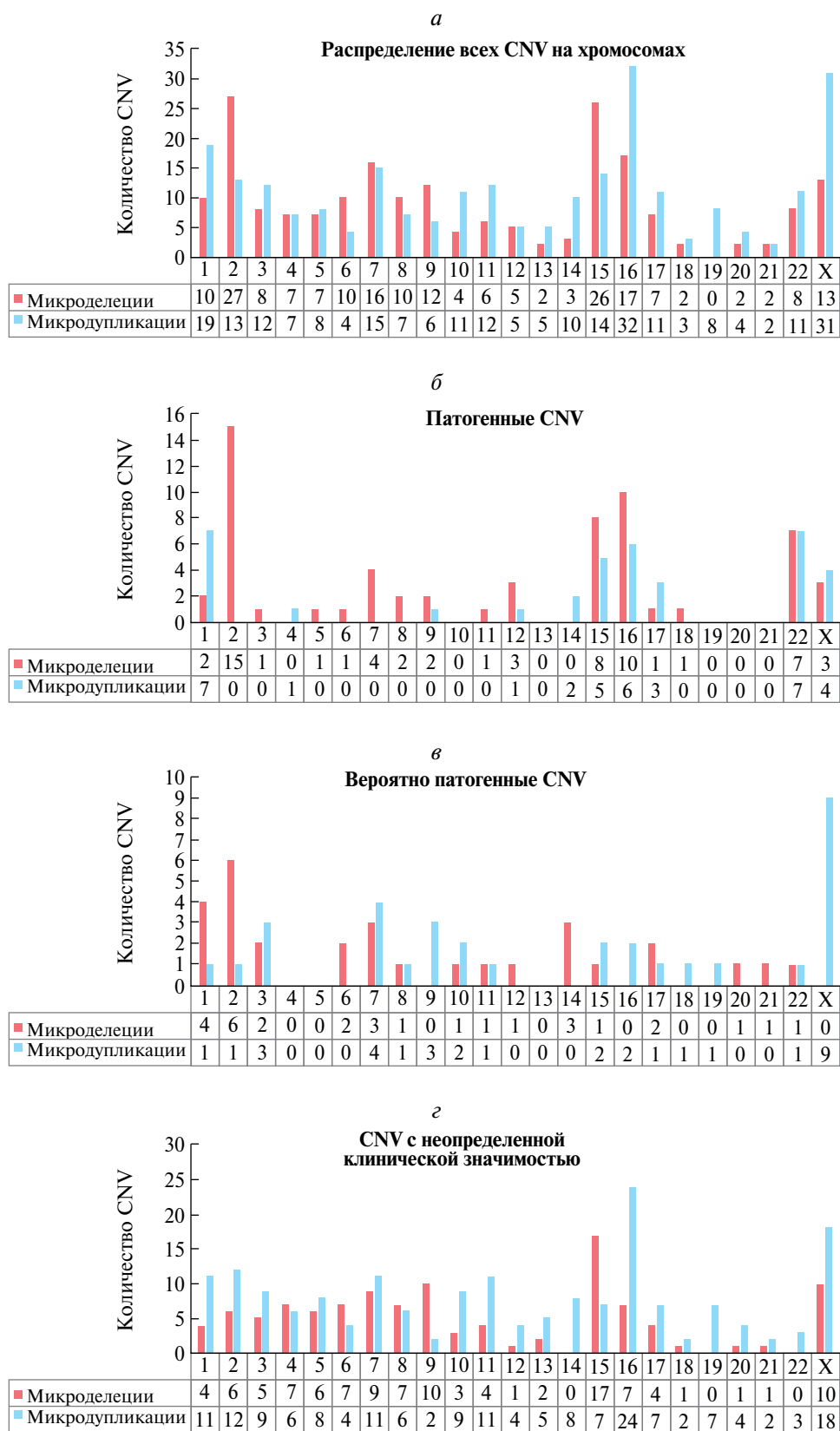
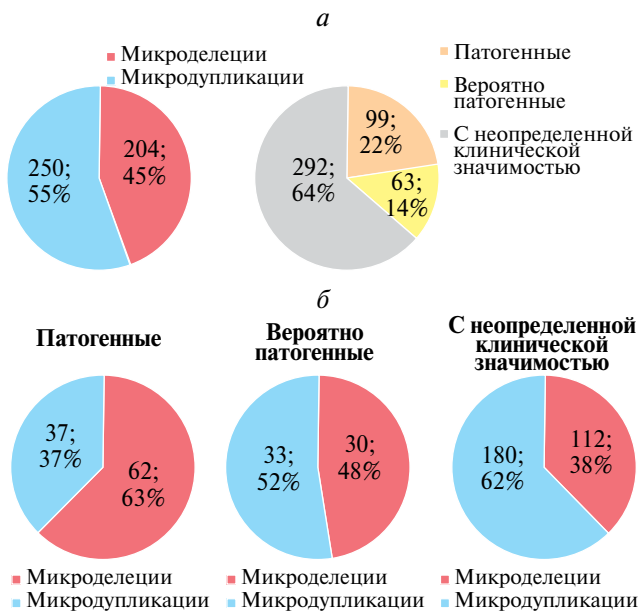


Рис. 3. Распределение CNV на хромосомах. По оси абсцисс – хромосома, по оси ординат – количество CNV.





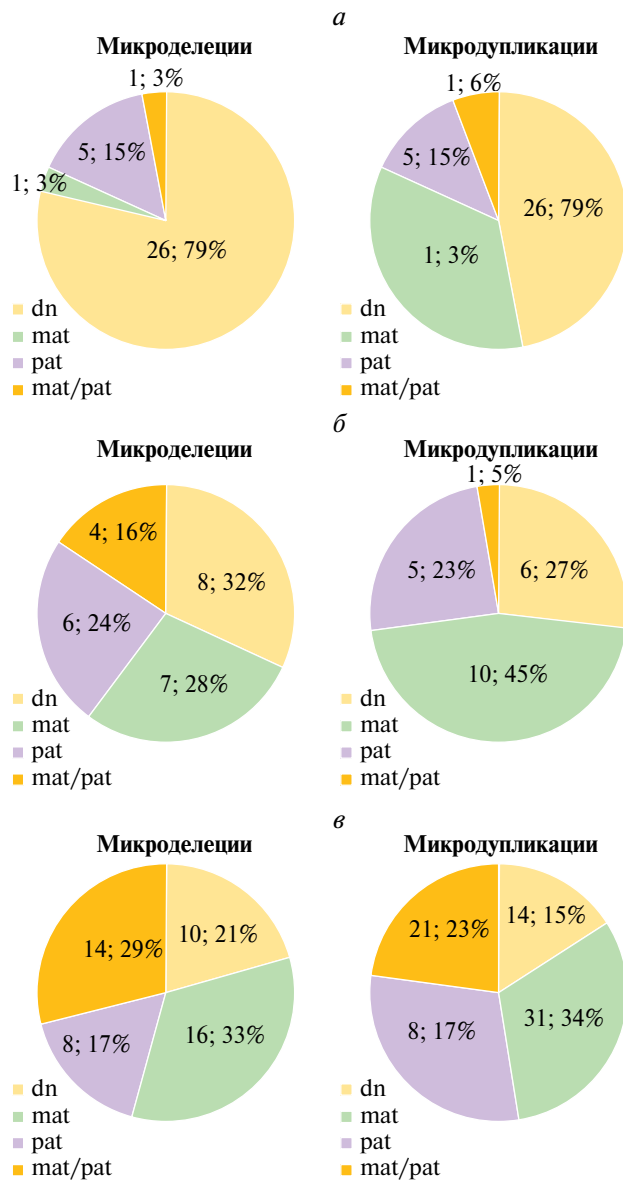
**Рис. 4.** Характеристика общего спектра CNV относительно направления изменения копияности и клинической значимости. *а* – общий спектр; *б* – патогенные, вероятно патогенные CNV, варианты с неопределенной клинической значимостью.

вовлечено в CNV, тем более вероятен ее патогенный эффект. Высокая частота данных структурных вариаций генома полностью согласуется с имеющимися данными [40].

Обратная динамика наблюдается для вариантов размером менее 1 Мб. Такие CNV имеют высокую частоту среди вариантов с неопределенной клинической значимостью, и их количество далее снижается в группах вероятно патогенных и патогенных CNV. Известно, что размер менее 0.5 Мб характерен для полиморфных вариантов [40]. Общепопуляционная частота CNV размером более 0.5 Мб составляет 5–10%, а более 1–2 Мб – 1–2%. При этом среди индивидов с интеллектуальными нарушениями варианты размером более 400 кб имеют частоту 25.7% [41, 42].

Аналогичные тенденции изменения размера с увеличением/уменьшением уровня патогенности наблюдаются как среди микроделетий, так и среди микродупликаций. CNV, размер которых превышает 5 Мб, чаще всего регистрируются в группе патогенных вариантов – 13/99 (13%). В отличие от группы вероятно патогенных CNV, где частота таких вариантов снижается до 5/63 (8%), в группе CNV с неопределенной клинической значимостью варианты данного размера отсутствуют (рис. 6, б–г).

Среди всего спектра CNV варианты размером больше 1 Мб чаще возникают *de novo*, тогда как CNV, размер которых не превышает 1 Мб,



**Рис. 5.** Происхождение CNV. *а* – патогенные варианты; *б* – вероятно патогенные варианты, *в* – варианты с неопределенной клинической значимостью.

преимущественно были унаследованными. При сравнении размеров всех вариантов между двумя группами (*de novo* и унаследованные) наблюдаются статистически значимые различия. Для группы унаследованных CNV характерен размер варианта менее 1 Мб ( $p < 0.001$ ) (табл. 5).

В группе патогенных *de novo* CNV преобладают варианты размером 23–300 кб, такую же частоту имеют CNV размером 1–3 Мб. При этом для унаследованных CNV характерны варианты размером 100–300 кб и 1–2 Мб. Среди вероятно патогенных CNV частота *de novo* вариантов размером от 100 до

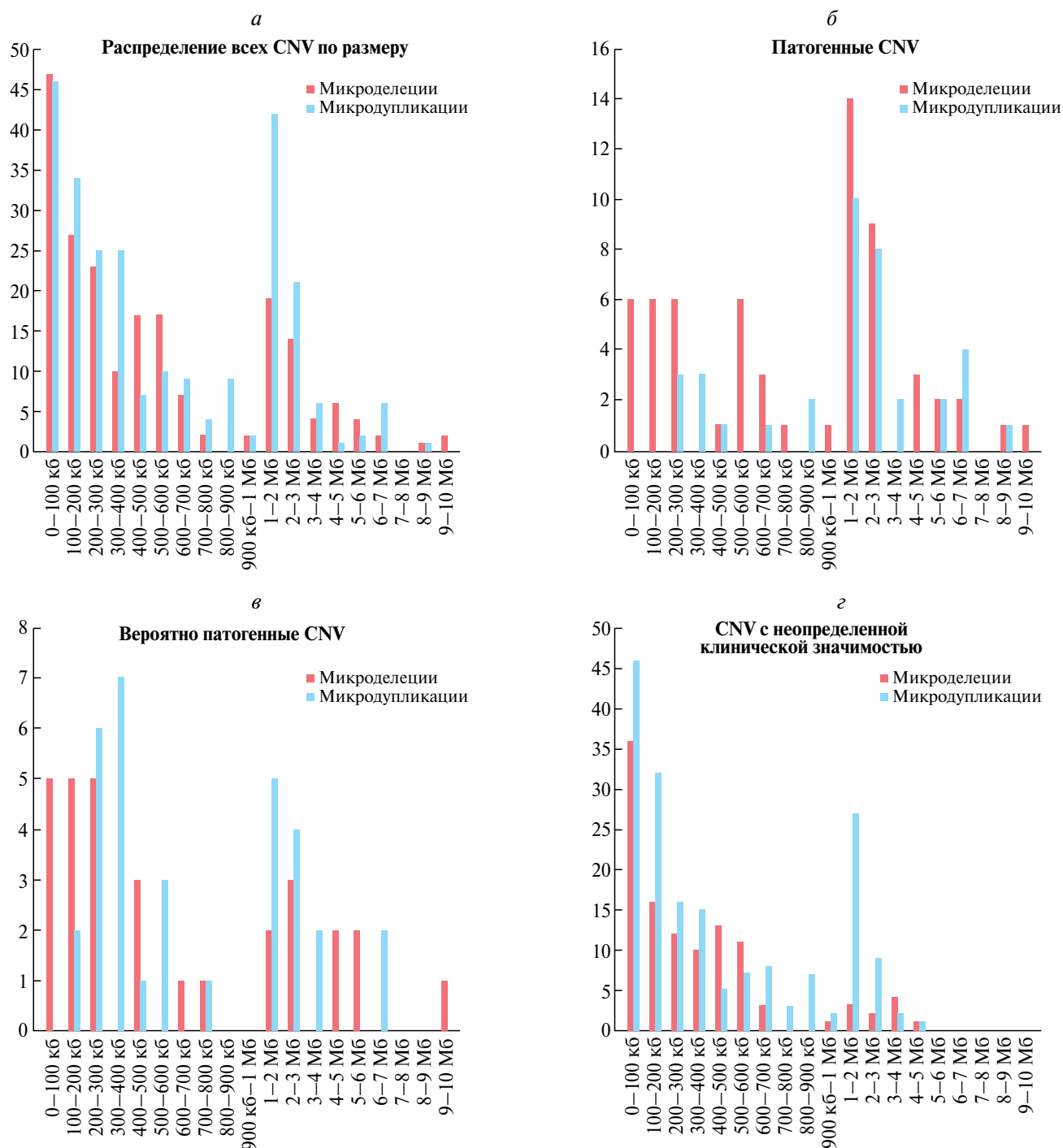


Рис. 6. Размер CNV. По оси абсцисс – количество CNV; по оси ординат – диапазоны размеров CNV.

700 кб составила 5/14 (36%) и от 1 до 10 Мб – 9/14 (64%). Унаследованные вероятно патогенные CNV чаще были размером 48–600 кб. В группе CNV с неопределенной клинической значимостью как унаследованные, так и *de novo* варианты чаще имели размер от 41 и 19 кб соответственно до 500 кб (табл. 6).

## ГЕННЫЙ СОСТАВ CNV

Для анализа генного состава CNV использовался ресурс Enrichr [43] и онтология “Фенотип млекопитающих” ( $p < 0.05$ ). Анализ обогащения был выполнен для каждой из групп CNV (патогенные, вероятно патогенные, варианты с неопределенной клинической значимостью) (табл. 7). Было идентифицировано 38, 35 и 55 статистически значимых

Таблица 2. Патогенные микроделеции и микродупликации

| Известные микроделеционные синдромы |   |  |
|-------------------------------------|---|--|
| Идентификатор пациента              | Результат аCGH [23]                         | Заключение   |
| 7-0312-003 [16]                     | arr[hg19] 1p36.33p36.32(849467_2628038)x1   | Синдром микроделеции 1p36 (ОМIM: 607872)                   |
| R1 [18]                             | arr[hg19] 1p36.23p36.21(8593674_15396672)x1 | »  |
| 2-1428-003 [16]                     | arr[hg19] 2p16.3(50754487_50996179)x1       | Синдром микроделеции 2p16.3 (ОМIM: 614332)                 |
| 14AG81 [16]                         | arr[hg19] 2p16.3(50975185_51209822)x1       | »  |
| 7-0186-003 [16]                     | arr[hg19] 2p16.3(50986743_51644735)x1       | »  |
| 7-0237-003 [16]                     | arr[hg19] 2p16.3(51125058_51263149)x1       | »  |
| 4-0062-003 [16]                     | arr[hg19] 2p16.3(51141571_51363855)x1       | »  |
| 2-1620-004 [16]                     | arr[hg19] 2p16.3(51163235_51285498)x1       | »  |
| 2-1620-003 [16]                     | arr[hg19] 2p16.3(51163990_51285498)x1       | »  |
| 77 [15]                             | arr[hg19] 2p16.3(50194187_50238567)x1       | »  |
| 77 [15]                             | arr[hg19] 2p16.3(50340671_50417720)x1       | »  |
| 1-0874-003 [16]                     | arr[hg19] 2q23.1(148704100_148955326)x1     | Синдром микроделеции 2q23.1 (ОМIM: 156200)                 |
| 237762 [16]                         | arr[hg19] 2q37.3(237508557_242783396)x1     | Синдром микроделеции 2q37 (ОМIM: 600430)                   |
| 2-1702-004 [16]                     | arr[hg19] 3q29(194573848_197176516)x1       | Синдром микроделеции 3q29 (ОМIM: 609425)                   |
| C1 [18]                             | arr[hg19] 5p15.33p15.32(204849_5014883)x1   | Синдром кошачьего крика, синдром делеции 5p (ОМIM: 123450) |
| R4 [18]                             | arr[hg19] 6q25.3(156012754_158804494)x1     | Синдром микроделеции 6q24-q25 (ОМIM: 612863)               |
| 10-1127-003 [16]                    | arr[hg19] 7q11.23(72718136_74146858)x1      | Синдром микроделеции 7q11.23 (ОМIM: 194050)                |
| RD_P407 [17]                        | arr[hg19] 7q11.23(72699382_74142329)x1      | »  |
| RD_P408 [17]                        | arr[hg19] 7q11.23(72726590_74142329)x1      | »  |
| C2 [18]                             | arr[hg19] 7q11.23(72721760_74140846)x1      | »  |
| R5 [18]                             | arr[hg19] 8p23.1(7039276_12485558)x1        | Синдром микроделеции 8p23.1                                |
| R660 [20]                           | arr[hg19] 9q34.3(140707889_140890373)x1     | Синдром субтеломерной делеции 9q (ОМIM: 610253)            |
| C3 [18]                             | arr[hg19] 11q24.2q25(125232584_134446160)x1 | Синдром делеции 11q (ОМIM: 147791)                         |
| 1-0761-005 [16]                     | arr[hg19] 15q13.2q13.3(30374369_32446842)x1 | Синдром микроделеции 15q13.3 (ОМIM: 612001)                |
| 1-0597-003 [16]                     | arr[hg19] 15q13.2q13.3(30386399_32444273)x1 | »  |
| 5-0008-003 [16]                     | arr[hg19] 15q13.2q13.3(30913586_32446830)x1 | »  |
| 9-0041-003 [16]                     | arr[hg19] 15q13.2q13.3(30913586_32446842)x1 | »  |
| 66 [15]                             | arr[hg19] 15q13.2q13.3(30943903_32510863)x1 | »  |
| RD_P412 [17]                        | arr[hg19] 15q13.2q13.3(30405535_32914190)x1 | »  |
| 23 [14]                             | arr[hg19] 15q13.2q13.3(30652489_32510863)x1 | »  |
| 14-0384-001 [16]                    | arr[hg19] 16p11.2(28808206_29051191)x1      | Синдром микроделеции 16p11.2-p12.2 (ОМIM: 613604)          |
| 1-0616-003 [16]                     | arr[hg19] 16p11.2(28824491_29051191)x1      | »  |
| 7-0229-003 [16]                     | arr[hg19] 16p11.2(29432213_30177916)x1      | »  |
| 7-0293-003 [16]                     | arr[hg19] 16p11.2(29567296_30178406)x1      | »  |
| 218119 [16]                         | arr[hg19] 16p11.2(29580021_30177928)x1      | »  |
| RD_P413 [17]                        | arr[hg19] 16p11.2(29656717_30158469)x1      | »  |
| 41 [14]                             | arr[hg19] 16p11.2(29652999_30197341)x1      | »  |

Таблица 2 (продолжение)

|   |   |   |
|---|---|---|
| R404 [20]                                 | arr[hg19] 16p11.2(29595483_30198151)x1              | »   |
| C4 [18]                                   | arr[hg19] 16p11.2(29674336_30198123)x1              | »   |
| 2-1525-003 [16]                           | arr[hg19] 16p13.11(14892881_16388596)x1             | Синдром микроделеции 16p13.11                       |
| C5 [18]                                   | arr[hg19] 17q21.31(43710371_44215352)x1             | Синдром микроделеции 17q21.31<br>(ОМІМ: 610443)     |
| RD_P414 [17]                              | arr[hg19] 18p11.32(12774_1652788)x1                 | Синдром делеции 18p (ОМІМ: 146390)                  |
| 3-0624-000 [16]                           | arr[hg19] 22q11.21(18916840_21465674)x1             | Синдром микроделеции 22q11<br>(ОМІМ: 188400)        |
| C6 [18]                                   | arr[hg19] 22q11.21(18894835_21505417)x1             | »   |
| 3 [15]                                    | arr[hg19] 22q11.21(19899742_20306819)x1             | »   |
| RD_P415 [17]                              | arr[hg19] 22q11.21(18890264_21540347)x1             | »   |
| 24 [14]                                   | arr[hg19] 22q13.33(50999319_51178264)x1             | Синдром микроделеции 22q13<br>(ОМІМ: 606232)        |
| 3-0391-000 [16]                           | arr[hg19] 22q13.33(50690823_51197850)x1             | »   |
| C7 [18]                                   | arr[hg19] 22q13.33(49513903_51178264)x1             | »   |
| 2-1693-003 [16]                           | arr[hg19] Xp11.22(53420743_53444522)x1              | Умственная отсталость,<br>связанная с Xp11.22 [9]   |
| P2 [19]                                   | arr[hg19] Xq28(152895888_152987984)x1               | Синдром микродупликации Xq28<br>(ОМІМ: 300815)*     |
| Патогенные микроделеции (несиндромальные) |   |   |
| R125 [20]                                 | arr[hg19] 2q24.3(163823021_167958723)x1             | –   |
| R351 [20]                                 | arr[hg19] 2q24.3(166842637_166918932)x1             | –   |
| R911 [20]                                 | arr[hg19] 2q22.3q23.1(148691873_148818437)x1        | –   |
| R2 [18]                                   | arr[hg19] 2p13.3p13.1(70894906_74986518)x1          | –   |
| 3-0460-000 [16]                           | arr[hg19] 8p23.3p23.1(158049_6999220)x1             | –   |
| 1-0713-003 [16]                           | arr[hg19] 9p22.1p21.2(19569670_27574515)x1          | –   |
| RD_P411 [17]                              | arr[hg19] 12q13.13(53784698_54741363)x1             | –   |
| RD_P417 [17]                              | arr[hg19] 12q24.31(123736705_123740392)x1           | –   |
| R6 [18]                                   | arr[hg19] 12q24.21q24.22(115505500_117441683)x1     | –   |
| P1 [19]                                   | arr[hg19] 15q23q24.1(70751053_73322354)x1           | –   |
| 154731 [16]                               | arr[hg19] Xp22.31(6455150_8135657)x0                | –   |
| Известные микродупликационные синдромы    |   |   |
| 214098 [16]                               | arr[hg19] 1q21.1q21.2(145895747_147929323)x3        | Синдром микродупликации 1q21.1<br>(ОМІМ: 612475)    |
| 1-0382-003 [16]                           | arr[hg19] 1q21.1q21.2(146016527_147897962)x3        | »   |
| 4-0029-003 [16]                           | arr[hg19] 1q21.1q21.2(146016527_147867742)x3        | »   |
| 2-1287-003 [16]                           | arr[hg19] 1q21.1q21.2(146112081_147929323)x3        | »   |
| C8 [18]                                   | arr[hg19] 1q21.1q21.2(146106723_147830830)x3        | »   |
| R7 [18]                                   | arr[hg19] 1q21.1q21.2(145883119_148828690)x3        | »   |
| 77 [15]                                   | arr[hg19] 1q21.1(145632334_146506369)x3             | »   |
| R14 [18]                                  | arr[hg19] 9q34.13q34.3(135767911_141153431)x3       | Синдром микродупликации 9q34.3 [24]                 |
| R14 [18]                                  | arr[hg19] 14q32.31q32.33(102959110_104578612)<br>x3 | Синдром микродупликации 14q32<br>(ОМІМ: 616604)     |
| R14 [18]                                  | arr[hg19] 14q32.33(105104831_106531339)x3           | »   |
| 1-0611-003 [16]                           | arr[hg19] 15q11.2q13.1(22770422_28915864)x3         | Синдром микродупликации 15q11-q13<br>(ОМІМ: 608636) |
| 2-1288-003 [16]                           | arr[hg19] 15q11.2q13.1(22770422_28928730)x3         | »   |

Таблица 2 (окончание)

|  |   |  |
|--|---|--|
| 3-0021-000 [16]                              | arr[hg19] 15q11.2q13.1(22770422_28526905)x3 | »  |
| C10 [18]                                     | arr[hg19] 15q11.2q13.1(22880274_29331964)x3 | »  |
| 154609 [16]                                  | arr[hg19] 15q11.2q13.1(22770421_28928730)x3 | »  |
| 176004 [16]                                  | arr[hg19] 16p11.2(28689086_29051191)x3      | Синдром микродупликации<br>16p11.2-p12.2   |
| 1-0782-004 [16]                              | arr[hg19] 16p11.2(28747521_29051191)x3      | »  |
| 219365 [16]                                  | arr[hg19] 16p11.2(29567296_30191848)x3      | Синдром микродупликации 16p11.2<br>(OMIM: 614671)  |
| C11 [18]                                     | arr[hg19] 16p13.11(15034010_16199882)x3     | Синдром микродупликации 16p13.11<br>(OMIM: 613458)   |
| R9 [18]                                      | arr[hg19] 16p13.11(15421671_16443968)x3     | »  |
| R10 [18]                                     | arr[hg19] 16p13.11(15484180_16308344)x3     | »  |
| 1-0622-003 [16]                              | arr[hg19] 17q11.1q12(25307567_33392085)x3   | Синдром микродупликации 17q11.2<br>(OMIM: 618874)<br>Синдром микродупликации 17q12<br>(OMIM: 614526) |
| 214097 [16]                                  | arr[hg19] 17q12(34425363_36283612)x3        | Синдром микродупликации 17q12<br>(OMIM: 614526)  |
| 7-0146-003 [16]                              | arr[hg19] 17q12(34440095_36410559)x3        | »  |
| 7-0066-003 [16]                              | arr[hg19] 22q11.21(18644791_21465674)x3     | Синдром микродупликации 22q11<br>(OMIM: 608363)  |
| 2-1370-003 [16]                              | arr[hg19] 22q11.21(18644791_21915509)x3     | »  |
| 10-1076-004 [16]                             | arr[hg19] 22q11.21(18645354_21465674)x3     | »  |
| 3-0437-000 [16]                              | arr[hg19] 22q11.21(18649190_21915521)x3     | »  |
| 1-1016-003 [16]                              | arr[hg19] 22q11.21(18916843_21462658)x3     | »  |
| 2-1753-003 [16]                              | arr[hg19] 22q11.21(18916843_21465674)x3     | »  |
| 7-0260-003 [16]                              | arr[hg19] 22q11.21(18916843_21465674)x3     | »  |
| R12 [18]                                     | arr[hg19] Xq28(152348378_155228013)x2       | Синдром микродупликации Xq28<br>(OMIM: 300815)   |
| R13 [18]                                     | arr[hg19] Xq28(153130545_153602293)x2       | »  |
| R11 [18]                                     | arr[hg19] Xp11.22(53569653_53769748)x2      | Синдром микродупликации Xp11.22<br>(OMIM: 300705)  |
| 42 [14]                                      | arr[hg19] Xp21.2(31069677_31382751)x2       | Миодистрофия Дюшенна/Беккера<br>(OMIM: 310200/300376)  |
| Патогенные микродупликации (несиндромальные) |   |  |
| RD_P406 [17]                                 | arr[hg19] 4q35.2(190816609_191024533)x3     | –  |
| R8 [18]                                      | arr[hg19] 12q24.21(116408736_116704303)x3   | –  |

Примечание. В таблице также приведены несиндромальные CNV, которые отнесены авторами соответствующих публикаций к патогенным; “–” – регион CNV не ассоциирован с синдромом; \* – пациент с микроделецией региона, для которого описан только микродупликационный синдром.

категорий онтологии “Фенотип млекопитающих” в каждой из групп (таблицы 2, 3 и 4 в Приложении). Учитывая количество CNV, оценить число вариантов, гены которых включены в статистически значимые категории онтологии “Фенотип млекопитающих”, не представляется возможным. Однако основываясь на количестве вариантов, результаты анализа обогащения можно считать достоверными и не связанными только с вкладом отдельных крупных CNV.

Среди патогенных CNV подавляющее большинство категорий были ассоциированы с аномалиями

поведенческого и неврологического фенотипов (18 категорий). Кроме этого, были выявлены 9 категорий, связанных с нарушениями нервной системы. Данный результат ожидаем, учитывая наличие нарушений психомоторного развития у исследуемых пациентов, причинами которого являются аномалии морфологии и функции головного мозга. Примечательно, что среди CNV с неопределенной клинической значимостью также подавляющее большинство категорий связано с аномалиями поведения/неврологического фенотипа (19 категорий). Вероятно патогенные CNV обогащены

**Таблица 3.** Частота CNV в зависимости от размера и патогенетической значимости

| Все CNV   |              |
|---|--------------|
| 193 пн–400 кб                                     | 237/454 (52) |
| 1–3 Мб  | 96/454 (21)  |
| Другие  | 121/454 (27) |
| Патогенные CNV                                    |              |
| 3.6–700 кб  | 36/99 (36)   |
| 1–3 Мб  | 41/99 (41)   |
| Другие  | 22/99 (22)   |
| Вероятно патогенные CNV                           |              |
| 48–400 кб   | 30/63 (48)   |
| 1–3 Мб  | 14/63 (22)   |
| Другие  | 19/63 (30)   |
| Варианты с неопределенной клинической значимостью |              |
| 193–600 кб  | 219/292 (75) |
| 1–2 Мб  | 30/292 (10)  |
| Другие  | 43/292 (15)  |

Примечание. Под категорией “другие” понимаются все остальные диапазоны размеров, встречающиеся значительно реже приведенных в таблице; в скобках указаны %.

генами, варианты в которых связаны с нарушениями гомеостаза и метаболизма (6 категорий), а также с аномалиями нервной системы (5 категорий).

Остальная часть обнаруженных категорий среди трех групп CNV была связана с аномалиями различных систем органов, таких как иммунная система, опорно-двигательная, сердечно-сосудистая, репродуктивная и другие (табл. 7). Очевидно, это связано с тем, что в большинстве случаев в CNV вовлечены несколько генов, выполняющих разные функции. Однако сравнить имеющиеся данные с фенотипом пациента не представляется возможным, поскольку подобного рода информация отсутствует в публикациях (табл. 1). Также во всех трех группах были обнаружены варианты, обогащенные генами, связанными с нарушениями гомеостаза и метаболизма, нервной системы, опорно-двигательной системы, мочевыделительной, а также с аномалиями поведения и неврологического фенотипа.

Кроме этого, во всех трех группах CNV были обнаружены категории, ассоциированные с аномалиями эмбриона. При этом ранее были опубликованы три крупных исследования, где была установлена связь между наличием спонтанных аборт у матери и рождением у нее детей с нарушениями психомоторного развития [44–46]. Авторы предполагают существование общих генетических факторов,

**Таблица 4.** Частота CNV в зависимости от размера и направления изменения копийности

| Патогенные CNV                                    |             |                 |              |
|---|-------------|-----------------|--------------|
| микроделеции                                      |             | микродупликации |              |
| 3.6–300 кб  | 18/62 (29)  | 1–3 Мб          | 18/37 (49)   |
| 1–2 Мб  | 14/62 (23)  | Другие          | 19/37 (51)   |
| Другие  | 30/62 (48)  |                 |              |
| Вероятно патогенные CNV                           |             |                 |              |
| микроделеции                                      |             | микродупликации |              |
| 48–300 кб   | 15/30 (50)  | 200–400 кб      | 13/33 (39.3) |
| Другие  | 15/30 (50)  | 1–3 Мб          | 9/33 (27.3)  |
|   |             | Другие          | 11/33 (33.3) |
| Варианты с неопределенной клинической значимостью |             |                 |              |
| микроделеции                                      |             | микродупликации |              |
| 19–600 кб   | 98/112 (88) | 193 пн–700 кб   | 129/180 (72) |
| Другие  | 14/112 (12) | 1–3 Мб          | 36/180 (20)  |
|   |             | Другие          | 15/180 (8)   |

Примечание. Под категорией “другие” понимаются все остальные диапазоны размеров, встречающиеся значительно реже приведенных в таблице; в скобках указаны %.

**Таблица 5.** Частота CNV в зависимости от размера и происхождения

| Размер     | Все CNV        |                |
|------------|----------------|----------------|
|            | <i>de novo</i> | унаследованные |
| Менее 1 Мб | 40/72 (56%)    | 130/165 (79%)  |
| Более 1 Мб | 32/72 (44%)    | 35/165 (21%)   |

**Таблица 6.** Частота CNV в зависимости от размера, происхождения и патогенетической значимости

| Патогенные CNV                                    |            |                |             |
|---|------------|----------------|-------------|
| <i>de novo</i>                                    |            | унаследованные |             |
| 23–300 кб   | 11/34 (32) | 100–300 кб     | 5/16 (31)   |
| 1–3 Мб  | 11/34 (32) | 1–2 Мб         | 5/16 (31)   |
| Другие  | 12/34 (35) | Другие         | 6/16 (38)   |
| Вероятно патогенные CNV                           |            |                |             |
| <i>de novo</i>                                    |            | унаследованные |             |
| 100–700 кб  | 5/14 (36)  | 48 – 600 кб    | 24/33 (73)  |
| 1–10 Мб   | 9/14 (64)  | Другие         | 9/33 (27)   |
| Варианты с неопределенной клинической значимостью |            |                |             |
| <i>de novo</i>                                    |            | унаследованные |             |
| 19 – 500 кб                                       | 17/24 (71) | 41–500 кб      | 80/116 (69) |
| Другие  | 7/24 (29)  | Другие         | 36/116 (31) |

Примечание. Под категорией “другие” понимаются все остальные диапазоны размеров, встречающиеся значительно реже приведенных в таблице; в скобках указаны %.

**Таблица 7.** Результаты анализа обогащения для генов, вовлеченных в патогенетически значимые CNV

| Категория онтологии “Фенотип млекопитающих”   | CNV        |                     |                                       |
|---|------------|---------------------|---------------------------------------|
|   | патогенные | вероятно патогенные | неопределенной клинической значимости |
| Аномалии гомеостаза/метаболизма               | 1          | 6                   | 5                                     |
| Аномалии кроветворения                        | 1          | 1                   | –                                     |
| Аномалии иммунной системы                     | 1          | 2                   | 3                                     |
| Аномалии нервной системы                      | 9          | 5                   | 6                                     |
| Аномалии опорно-двигательной системы          | 4          | 3                   | 5                                     |
| Аномалии пищеварительной системы              | 1          | –                   | 2                                     |
| Аномалии поведения/ неврологического фенотипа | 18         | 2                   | 19                                    |
| Аномалии мочевыделительной системы            | 1          | 2                   | 1                                     |
| Аномалии эмбриона                             | 2          | 2                   | 1                                     |
| Аномалии глаз                                 | –          | 2                   | 1                                     |
| Аномалии жировой ткани                        | –          | 2                   | –                                     |
| Аномалии кожи                                 | –          | 1                   | 1                                     |
| Аномалии клеток крови                         | –          | 1                   | –                                     |
| Аномалии репродуктивной системы               | –          | 2                   | 1                                     |
| Аномалии сердечно-сосудистой системы          | –          | 3                   | 3                                     |
| Опухоли                                       | –          | 1                   | –                                     |
| Аномалии эндокринных/экзокринных желез        | –          | –                   | 1                                     |
| Аномалии черепа/лица                          | –          | –                   | 2                                     |
| Аномалии роста                                | –          | –                   | 1                                     |
| Аномалии ушей                                 | –          | –                   | 2                                     |
| Аномалии зубов                                | –          | –                   | 1                                     |
| <b>Всего</b>                                  | <b>38</b>  | <b>35</b>           | <b>55</b>                             |

Примечание. В ячейках таблицы приведено суммарное число категорий. “–” – отсутствие категорий с данными аномалиями.

которые могут приводить к двум вышеописанным исходам. Учитывая, что патогенные/вероятно патогенные CNV обнаруживаются в выборках пациентов с нарушениями психомоторного развития, плодов с врожденными пороками развития, а также в выборках спонтанных абортусов, возможно, вариабельность по числу копий участков ДНК является одним из таких факторов [47, 48].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента установления хромосомной этиологии первых описанных синдромов (синдромы Дауна, Патау и Эдвардса), связанных с интеллектуальными нарушениями, прошло уже более 60 лет. Появление и развитие высокоразрешающих молекулярно-генетических методов исследования способствовало более детальному анатомированию генома, а следовательно описанию ранее неизвестных мутаций, лежащих в основе нарушений психомоторного развития. Последние десять лет ежегодно в мировой литературе публикуется более 100 исследований, описывающих генетические основы НПР. Отсутствие единой системы представления полных исходных данных в открытом доступе во многом препятствует систематизации всей опубликованной информации. Настоящая работа посвящена анализу спектра CNV, встречающихся у пациентов с НПР. Основным лимитирующим фактором данного исследования является отсутствие в подавляющем большинстве публикаций полного списка обнаруженных CNV. Введение единой формы представления полных исходных данных авторами исследований будет способствовать более основательной систематизации имеющейся информации, а также откроет медицинскому обществу более детальную картину генетической природы НПР.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-65-00017, <https://rscf.ru/project/21-65-00017/>

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- International Classification of Diseases 11th Revision. The global standard for diagnostic health information. <https://icd.who.int/>. (Accessed 8 Sep 2023).
- Ilyas M., Mir A., Efthymiou S., Houlden H. The genetics of intellectual disability: Advancing technology and gene editing // *F1000Res*. 2020. V. 9. № 22. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16315.1>
- Kearney H. M., Thorland E. C., Brown K. K. et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants // *Genet. Med.* 2011. V. 13. № 7. P. 680–685. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182217a3a>
- Alkan C., Coe B.P., Eichler E.E. Genome structural variation discovery and genotyping // *Nat. Rev. Genet.* 2011. V. 12. № 5. P. 363–376. <https://doi.org/10.1038/nrg2958>
- Lupiáñez D.G., Kraft K., Heinrich V. et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions // *Cell*. 2015. V. 161. № 5. P. 1012–1025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.004>
- Girirajan S., Rosenfeld J.A., Cooper G.M. et al. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay // *Nat. Genet.* 2010. V. 42. № 3. P. 203–209. <https://doi.org/10.1038/ng.534>
- Cooper D.N., Krawczak M., Polychronakos C. et al. Where genotype is not predictive of phenotype: Towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease // *Hum. Genet.* 2013. V. 132. №10. P.1077–1130. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1331-2>
- Database of Genomic Variants (DGV). URL: <https://dgv.tcag.ca/> (Accessed 8 Sep 2023).
- Mapping the clinical genome (DECIPHER). <https://www.deciphergenomics.org/>. (Accessed 8 Sep 2023).
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). <https://omim.org/>.
- Page M.J., McKenzie J.E., Bossuyt P.M. et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews // *BMJ*. 2021. V. 372. № n71. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
- National Library of Medicine, National Center for Bio-technology Information. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (Accessed 8 Sep 2023).
- NCBI Genome Remapping Service (NCBI Remap). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/remap> (Accessed 8 Sep 2023).
- Chehbani F., Tomaiuolo P., Picinelli C. et al. Yield of array-CGH analysis in Tunisian children with autism spectrum disorder // *Mol. Genet. Genomic Med.* 2022. V. 10. №. 8. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1939>
- Baccarin M., Picinelli C., Tomaiuolo P. et al. Appropriateness of array-CGH in the ADHD clinics: A comparative study // *Genes Brain Behav.* 2020. V. 19. № 6. <https://doi.org/10.1111/gbb.12651>
- Zarrei M., Burton C.L., Enghuan W. et al. A large data resource of genomic copy number variation across neurodevelopmental disorders // *NPJ*



- Genom. Med. 2019. V. 4. № 26.  
<https://doi.org/10.1038/s41525-019-0098-3>
17. *Lindstrand A., Eisfeldt J., Pettersson M. et al.* From cytogenetics to cytogenomics: Whole-genome sequencing as a first-line test comprehensively captures the diverse spectrum of disease-causing genetic variation underlying intellectual disability // *Genome Med.* 2019. V. 11. №. 68.  
<https://doi.org/10.1186/s13073-019-0675-1>
  18. *Lopes F., Torres F., Soares G. et al.* Genomic imbalances defining novel intellectual disability associated loci // *Orphanet J. Rare Dis.* 2019. V. 14. № 164.  
<https://doi.org/10.1186/s13023-019-1135-0>
  19. *Firouzabadi S.G., Kariminejad R., Vameghi R. et al.* Copy number variants in patients with autism and additional clinical features: Report of VIPR2 duplication and a novel microduplication syndrome // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. № 9. P. 7019–7027.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-0202-y>
  20. *Fry A.E., Rees E., Thompson R. et al.* Pathogenic copy number variants and SCN1A mutations in patients with intellectual disability and childhood-onset epilepsy // *BMC Med. Genet.* 2016. V. 17. № 34.  
<https://doi.org/10.1186/s12881-016-0294-2>
  21. *Wilfert A.B., Sulovari A., Turner T.N. et al.* Recurrent de novo mutations in neurodevelopmental disorders: properties and clinical implications // *Genome Med.* 2017. V. 9. № 101.  
<https://doi.org/10.1186/s13073-017-0498-x>
  22. *Munnich A., Demily C., Frugère L. et al.* Impact of on-site clinical genetics consultations on diagnostic rate in children and young adults with autism spectrum disorder // *Mol. Autism.* 2019. V. 10. № 33.  
<https://doi.org/10.1186/s13229-019-0284-2>
  23. *McGowan-Jordan J., Hastings R.J., Moore S.* ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020). Basel: Karger, 2020.  
<https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-06867-2>
  24. *Bonati M.T., Castronovo C., Sironi A. et al.* 9q34.3 microduplications lead to neurodevelopmental disorders through EHMT1 overexpression // *Neurogenetics.* 2019. V. 20. № 3. P. 145–154.  
<https://doi.org/10.1007/s10048-019-00581-6>
  25. *Bailey J.A., Yavor A.M., Massa H.F. et al.* Segmental duplications: Organization and impact within the current human genome project assembly // *Genome Res.* 2001. V. 11. № 6. P. 1005–1017.  
<https://doi.org/10.1101/gr.gr-1871r>
  26. *Redaelli S., Maitz S., Crosti F. et al.* Refining the phenotype of recurrent rearrangements of chromosome 16 // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 5.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20051095>
  27. *Delbridge M.L., McMillan D.A., Doherty R.J. et al.* Origin and evolution of candidate mental retardation genes on the human X chromosome (MRX) // *BMC Genomics.* 2008. V. 5. № 9.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-65>
  28. *Беляева Е.О.* Клинико-генетическая характеристика пациентов с недифференцированными формами интеллектуальных расстройств и хромосомными микродупликациями: Дис... канд. мед. наук. М.: НИИ мед. генетики ТНИМЦ, 2019. 231 с.
  29. *Girirajan S., Eichler E.E.* Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № R2. P. R176–R187.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddq366>
  30. *Girirajan S., Rosenfeld J.A., Coe B.P. et al.* Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants // *N. Engl. J. Med.* 2012. V. 367. № 14. P. 1321–1331.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200395>
  31. *Kikas T., Punab A.M., Kasak L. et al.* Microdeletions and microduplications linked to severe congenital disorders in infertile men // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. № 574. P. 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-27750-w>
  32. *Mosley T.J., Johnston H.R., Cutler D.J. et al.* Sex-specific recombination patterns predict parent of origin for recurrent genomic disorders // *BMC Med. Genomics.* 2021. V. 14. № 154. P. 1–12.  
<https://doi.org/10.1186/s12920-021-00999-8>
  33. *Chowdhury R., Bois P.R., Feingold E. et al.* Genetic analysis of variation in human meiotic recombination // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 9.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000648>
  34. *Potocki L., Chen K.S., Park S.S. et al.* Molecular mechanism for duplication 17p11.2 – the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion // *Nat. Genetics.* 2000. V. 24. № 1. P. 84–87.  
<https://doi.org/10.1038/71743>
  35. *Gajecka M., Mackay K.L., Shaffer L.G.* Monosomy 1p36 deletion syndrome // *Am. J. Med. Genet. Part C. Semin. Med. Genet.* 2007. V. 145. №. 4. P. 346–356.  
<https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30154>
  36. *Delio M., Guo T., McDonald-McGinn D.M. et al.* Enhanced maternal origin of the 22q11.2 deletion in velocardiofacial and DiGeorge syndromes // *Am. J. Hum. Genet.* 2013. V. 92 № 3. P. 439–447.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.01.018>
  37. *Duyzend M.H., Nuttle X., Coe B.P. et al.* Maternal modifiers and parent-of-origin bias of the autism-associated 16p11.2 CNV // *Am. J. Hum. Genet.* 2016. V. 98. № 1. P. 45–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.11.017>
  38. *Neuhausler L., Summerer A., Cooper D.N. et al.* Pronounced maternal parent-of-origin bias for type-1 NF1 microdeletions // *Hum. Genet.* 2018. V. 137. № 5. P. 365–373.  
<https://doi.org/10.1007/s00439-018-1888-x>
  39. *Wang B., Ji T., Zhou X. et al.* CNV analysis in Chinese children of mental retardation highlights a sex differentiation in parental contribution to *de novo* and inherited mutational burdens // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 25954.  
<https://doi.org/10.1038/srep25954>

40. Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R. et al. Global variation in copy number in the human genome // *Nature*. 2006. V. 444. № 7118. P. 444–454. <https://doi.org/10.1038/nature05329>
41. Itsara A., Cooper G.M., Baker C. et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. V. 84. № 2. P. 148–161. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.12.014>
42. Cooper G.M., Coe B.P., Girirajan S. et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay // *Nat. Genetics*. 2011. V. 43. № 9. P. 838–846. <https://doi.org/10.1038/ng.909>
43. Xie Z., Bailey A., Kuleshov M. V. et al. Gene Set-Knowledge Discovery with Enrichr // *Curr. Protoc.* 2021. V. 1. № 3. P. e90. <https://doi.org/10.1002/cpz1.90>
44. Paz Levy D., Wainstock T., Sheiner E. et al. Maternal recurrent pregnancy loss is associated with an increased risk for long-term neurological morbidity in offspring // *Dev. Med. Child Neurol.* 2019. V. 61. № 1. P. 91–97. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13976>
45. Wang H., Li F., Miao M. et al. Maternal spontaneous abortion and the risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring: A population-based cohort study // *Hum. Reprod.* 2020. V. 35. № 5. P. 1211–1221. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa035>
46. Ji H., Yu Y., Miao M. et al. Risk of intellectual disability and maternal history of spontaneous abortion: A nationwide cohort study // *Dev. Med. Child Neurol.* 2021. V. 63. № 7. P. 831–838. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14839>
47. Levy B., Wapner R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis // *Fertil. Steril.* 2018. V. 109. № 2. P. 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.005>
48. Finley J., Hay S., Oldziej J. et al. The genomic basis of sporadic and recurrent pregnancy loss: a comprehensive in-depth analysis of 24,900 miscarriages // *Reprod. Biomed. Online*. 2022. V. 45. № 1. P. 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.03.014>

## CNVs in Patients with Neurodevelopmental Disorders: Meta-Analysis

D. A. Fedotov<sup>1, \*</sup>, A. A. Kashevarova<sup>1</sup>, and I. N. Lebedev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

\*e-mail: dmitry.fedotov@medgenetics.ru

This review is devoted to a comprehensive analysis of DNA copy number variations (CNVs) identified in patients with neurodevelopmental disorders (NDDs) from the literature. The selection of publications was conducted using specifically developed criteria. CNVs were characterized based on their clinical significance, type of copy number alteration (microdeletion/microduplication), size, origin, and gene content. The study sample comprised 3,375 patients with NDDs, among whom pathogenic and likely pathogenic CNVs, as well as variants of uncertain clinical significance, were identified in 395 individuals (12%). Chromosomal variations from each category were identified in 89 (3%), 56 (2%), and 241 (7%) patients, respectively. Nine individuals exhibited combinations of CNVs with varying clinical significance. The number of microduplications slightly exceeded the number of deletions (250 and 204, respectively). The size of most CNVs ranged from 193 bp to 400 kb and from 1 to 3 Mb (237 and 96, respectively). Seventy-two variants originated *de novo*, while 165 were inherited. Eighty-six CNVs were associated with 33 known microdeletion/microduplication syndromes. The most prevalent syndromes included 1q21.1 microduplication (7/395, 1.8%) (OMIM: 612475), 2p16.3 microdeletion (9/395, 2.3%) (OMIM: 614332), 15q13.3 microdeletion (7/395, 1.8%) (OMIM: 612001), 16p11.2 microdeletion (9/395, 2.3%) (OMIM: 611913), and 22q11.2 microduplications (7/395, 1.8%) (OMIM: 608363). Enrichment analysis revealed that pathogenic CNVs, as well as variants of uncertain clinical significance, are enriched in genes associated with abnormal behavioral/neurological phenotypes. Likely pathogenic CNVs included genes linked to disorders of the nervous system and homeostasis/metabolism.

**Keywords:** DNA copy number variation (CNV), neurodevelopment disorder (NDD), intellectual disability (ID), autism spectrum disorder (ASD), attention deficit hyperactivity disorder (ADHD).

УДК 599.363(571.65):591.15

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СРЕДНЕЙ БУРОЗУБКИ (*Sorex caecutiens* Laxmann, 1788) БАСЕЙНА РЕКИ КОЛЫМА НА ЧУКОТКЕ

© В. В. Переверзева<sup>1,\*</sup>, Н. Е. Докучаев<sup>1</sup>, А. А. Примак<sup>1</sup>, Е. А. Дубинин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологических проблем Севера, Дальневосточное отделение Российской академии наук, Магадан, 685000 Россия

\*e-mail: vvpereverzeva@mail.ru

Поступила в редакцию 04.10.2023 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Исследован полиморфизм нуклеотидной последовательности и гаплотипическое разнообразие гена цитохрома *b* в выборках средней бурозубки подвида *Sorex caecutiens koreni* из популяций бассейна реки Колымы п-ова Чукотки. Найдено 56 *cytb*-гаплотипов, различающихся между собой 87 мутациями в 84 сайтах. Выявлена принадлежность *cytb*-гаплотипов особей подвидов *S. c. koreni* и *S. c. macrorygmaeus* к одной материнской линии мтДНК, их происхождение от одного родоначального гаплотипа Scb1, а также наличие у бурозубок обоих подвидов одинаковых *cytb*-гаплотипов. Показана взаимная изоляция популяций бурозубок верховьев бассейнов рек Колымы и Чукотки. Доля внутривидовой генетической изменчивости составляет 95.74%, межгрупповая изменчивость 5.74%, внутривидовая доля 1.48%, что отражает очень высокий уровень внутривидовой изменчивости *cytb*-гаплотипов в исследованных группах *S. c. koreni*, их монофилетическое происхождение и генетическое единство чукотских выборок. Значения индексов молекулярного разнообразия свидетельствуют о стабильности популяций, имеющих в течение длительного времени высокое значение эффективной численности.

**Ключевые слова:** средняя бурозубка, *Sorex caecutiens*, ген цитохрома *b* (*cytb*), генетический полиморфизм, филогенетический анализ, река Колыма, Чукотка, Россия.

DOI: 10.31857/S0016675824050038 EDN: CJPJPO

Ареал средней бурозубки (*Sorex caecutiens* Laxmann, 1788) простирается от Скандинавии до Чукотки и о. Хоккайдо. На материковой части северо-востока Азии вид представлен двумя подвидами – *S. caecutiens koreni* Gl. Allen, 1914 и *S. caecutiens macrorygmaeus* Miller, 1901 [1–3]. Бассейны рек Индигирки, Колымы и Анадыря населяет *S. c. koreni*, а *S. c. macrorygmaeus* – п-ов Камчатка и Северное Приохотье. На о-вах Парамушир и Карагинский обитают подвиды *S. c. insularis* Okhotina, 1993 и *S. c. orii* Kuroda, 1933 соответственно [4]. В таежной зоне Северо-Восточной Азии среди насекомоядных средняя бурозубка по численности занимает лидирующее положение [5], однако особенности генетической структуры популяций средней бурозубки этой части ареала малоизучены.

Трансмембранный фермент цитохром *b* (*Cytb*) является ключевым звеном дыхательной цепи переноса электронов. Возможность адаптации организма к различным экологическим условиям

зависит от уровня функциональной активности этого энзима. В настоящее время варибельность нуклеотидной последовательности гена цитохрома *b* (*cytb*), кодирующего этот полипептид, широко используется в области популяционной генетики и молекулярной филогеографии различных видов, в том числе и рода *Sorex* [6–16]. Изучение генетической изменчивости популяций является важной частью комплексного анализа внутривидового полиморфизма и относится к приоритетным научным направлениям. Генетический мониторинг популяций позволяет реконструировать историю экспансии видов [13].

Ранее нами была исследована изменчивость *cytb* и кодируемого им полипептида одной выборки средней бурозубки из Северного Приохотья, относящейся к подвиду *S. c. macrorygmaeus* [17]. Было установлено, что изученная популяция имеет монофилетическое происхождение и относится к митохондриальной линии, распространенной от

Финляндии до о. Сахалин. Эта гаплогруппа была выделена как сахалино-евразийский кластер [9]. В исследованной нами популяции *S. c. macropygmaeus* был найден высокий уровень полиморфизма нуклеотидной последовательности гена и аминокислотного состава данного полипептида. Полученные результаты свидетельствуют о действии стабилизирующего отбора на структуру фермента *Cytb* в исследованной популяции средней бурозубки Северного Приохотья [17].

В настоящей работе анализируется изменчивость нуклеотидной последовательности гена *cytb* популяций средней бурозубки подвида *S. c. koreni*, населяющих бассейн Колымы и Чукотку.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Карта-схема мест сбора материала приведена на рис. 1. Характеристики выборок из исследованных популяций и обобщенные сведения о молекулярном разнообразии *S. c. koreni* бассейна р. Колымы и п-ова Чукотки представлены в табл. 1. В верховьях Колымы отловлена 31 особь: в бас. рек Кулу – 9 экз.; Детрин – 4 экз.; Среднекан – 9 экз.; а также в районе озер Урультун – 9 экз., Малый и Момонтай – по 1 экз. Выборки из популяций этого вида верховьев Колымы объединены в одну группу. На Чукотке, в бас. р. Омолон добыты 43 особи, в окрестностях г. Анадырь – 15 экз. Река Омолон – самый крупный правый приток Колымы (рис. 1). Нами рассматривались выборки средней бурозубки как отдельно – отловленные в бас. р. Омолон и окрестностях г. Анадыря, так и объединенно – чукотского региона в целом (табл. 1).

Биоматериал, использованный в работе, взят из музейной коллекции лаборатории экологии млекопитающих, в которой работают авторы. Образцы мышечной ткани хранились в 96%-ном этаноле. Методы выделения, очистки тотальной ДНК, амплификации нуклеотидной последовательности *cytb*, очистки продукта полимеразной цепной реакции, секвенирования полной нуклеотидной последовательности *cytb* мтДНК и определения филогенетических отношений гаплотипов средней бурозубки представлены в нашей предыдущей статье [17]. Сайты расположения нуклеотидов на карте гена *cytb* мтДНК приведены в соответствии с полной нуклеотидной последовательностью данного гена *S. caecutiens* (GenBank № MF374796 [18]). Как и в предыдущей публикации [17], гаплогруппам *cytb* средней бурозубки присвоена аббревиатура **Scb**. Статистическая обработка и анализ генетических данных проводили с помощью пакетов программ MEGA 6.0.2.74 [19], Arlequin ver. 3.5 [20]. В пакете программ MEGA провели выравнивание нуклеотидных последовательностей, определили сайты нуклеотидных замен (нз), локализацию и категорию (транзиция или трансверсия) нз в

триплетях. Выявили *cytb*-гаплотипы, долю вариабельных сайтов и вариантов нуклеотидных последовательностей в выборках из исследуемых популяций. В пакете программ Arlequin определили индексы молекулярного разнообразия, параметры *D* и *F<sub>s</sub>*, рассчитали матрицу генетических дистанций методом попарной дифференциации гаплотипов, на основании которой рассчитали коэффициент *F<sub>st</sub>*. Соответствие гипотезе нейтральности определили с использованием тестов *D* и *F<sub>s</sub>*. Tajima и *F<sub>s</sub>* Y.X. Fu [21, 22]. Значение *F<sub>st</sub>* характеризует уровень дивергенции исследуемых популяций. Медианная сеть *cytb*-гаплотипов построена с применением пакета программ Network 4.5.1.0 [23].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полная нуклеотидная последовательность *cytb* исследована у 89 особей *S. c. koreni* (табл. 1). Ген *cytb* у *S. caecutiens* состоит из 1140 пар нуклеотидов (пн) и расположен с 14213-ой пн по 15352-ю пн полного генома мтДНК. Найдено 56 *cytb*-гаплотипов, различающихся между собой 87 мутациями в 84 сайтах. Все обнаруженные у *S. c. koreni* *cytb*-гаплотипы, как и определенные в предыдущем исследовании у *S. c. macropygmaeus* [17], принадлежат сахалино-евразийскому кластеру. Из относительно полной нуклеотидной последовательности *Scb1*, номера обнаруженных *cytb*-гаплотипов в электронной базе данных GenBank и места отлова носителей вариантов *cytb* приведены на рис. 2. Найденные *cytb*-гаплотипы отличаются от последовательности *Scb1* от 1 нз (*cytb*-варианты обнаружены у особей всех выборок) до 8 нз (*Scb120*, носитель отловлен возле оз. Урультун). Доля вариабельных сайтов в нуклеотидной последовательности *cytb* средней бурозубки в выборке из бас. Колымы составляет 0.03596 от всей длины *cytb*, из бас. р. Омолон – 0.0088, из окрестностей г. Анадырь – 0.0071. В сумме из чукотского региона – 0.0379. В общей выборке – 0.0600.

Характеристики нз представлены в табл. 2. В нуклеотидной последовательности *cytb* *S. c. koreni* транзиций (0.8966) найдено в 8.66 раза больше, чем трансверсий (0.1035), что согласуется с литературными данными [24, 25]. Известно, что вырожденность генетического кода определяет большую вариабельность третьего нуклеотида кодона в транслируемых участках гена [26] и что в большинстве триплетов распределение нз в первой, второй и третьей позициях соответствует 2 : 1 : 9 [27]. Полученные нами результаты отличаются от этого соотношения. У особей, отловленных в бас. Колымы транзиции в первой, второй и третьей позициях триплетов относятся как 6 : 1 : 29. Трансверсии во второй позиции кодона не обнаружены, а в первой и третьей найдены в долях 1 : 1.5. В выборке средней бурозубки из популяции окрестностей



**Рис. 1.** Карта-схема мест сбора проб средней буроzubки подвида *S. c. koreni*. Цифрами обозначены: бас. рек 1 – Кулу, 2 – Детрин, 3 – Среднекан; 4 – окрестности озер Урультун, Малый и Момонтай; 5 – бас. р. Омолон; 6 – окрестности г. Анадырь.

г. Анадырь трансверсии не определены. Транзиции выявлены только в первой и третьей позициях триплета в отношении 1 : 2.33. У экземпляров, отловленных в бас. р. Омолон, трансверсии найдены только в третьей позиции триплета, а транзиции распределены в позициях кодона как 5 : 1 : 16.48. В сумме, у исследованных особей *S. c. koreni* чукотского региона, соотношение мутаций в сайтах триплета составляет 5.5 : 1 : 18.01, трансверсии имеют место только в третьей позиции кодона.

На рис. 3 показаны доли *cytb*-гаплотипов в выборках из исследованных популяций *S. c. koreni*. Вариант Scb1, определенный как предковый и преобладающий в изученной ранее популяции *S. c. macrogymnaeus* Северного Приохотья [17], наиболее распространен и в выборках *S. c. koreni*. Кроме того, у особей обоих подвидов найдены Scb2 (носители отловлены в бас. рек Кулу, Среднекан и оз. Момонтай), Scb5 (бас. р. Среднекан), Scb6 (р-н оз. Урультун), Scb24 (бас. р. Кулу) и Scb9 (бас. р. Омолон, Чукотка) (рис. 3). Остальные гаплотипы обнаружены у особей *S. c. koreni* и специфичны для каждой исследованной выборки. Исключение составляет Scb49, выявленный у бурозубок бас. р. Омолон и г. Анадырь. Количество найденных гаплотипов *cytb* (*n*) и вариабельных сайтов (*V*) в каждой из групп пропорциональны размеру выборок (*N*) (табл. 1). Основная часть вариантов

*cytb* во всех выборках представлена единичными экземплярами (рис. 3). Значительный уровень полиморфизма нуклеотидных последовательностей *cytb*-вариантов определяет высокие значения индексов молекулярного разнообразия (табл. 1), что указывает на стабильность популяций, имеющих в течение длительного времени высокое значение эффективной численности [28]. Нуклеотидное разнообразие ( $\pi$ ) и среднее число попарных различий между гаплотипами ( $Pi$ ) – оказались выше у бурозубок бас. верхьев Колымы, гаплотипическое разнообразие ( $h$ ) выше в выборке из бас. р. Омолон. Наименьшие значения всех индексов – в группе бурозубок из окрестностей г. Анадырь – могут быть связаны с небольшим числом исследованных особей.

Для определения филогенетических отношений *cytb*-гаплотипов *S. c. koreni* построена медианная сеть по принципу минимального числа нз (рис. 4). Полученная диаграмма имеет четкую радиальную структуру, что, по-видимому, может свидетельствовать о происхождении всех исследованных нуклеотидных последовательностей от родоначального гаплотипа Scb1. Сопоставление данных рис. 2–4 показывает, что *cytb*-гаплотипы *S. c. koreni* бас. Колымы отличаются от Scb1 в основном 1–2 нз, за исключением Scb31 (6 нз, носитель отловлен в бас. р. Детрин); Scb70 (5 нз, бас. р. Кулу) и Scb120, Scb121, Scb123 (соответственно – 8, 6 и 4 нз, добыты возле оз. Урультун). пойманные в окрестностях г. Анадырь и большинство добытых в бас. р. Омолон бурозубок имеют Scb1 и *cytb*-гаплотипы, различающиеся от него 1–2 нз. Исключение – отловленные в пойме р. Омолон особи с гаплотипами Scb86 и Scb98, которые отличаются от Scb1 5 нз.

Между исследованными выборками были рассчитаны генетические дистанции (популяционные попарные *Fst*). Нуклеотидные последовательности *cytb*-гаплотипов *S. c. koreni* верхьев Колымы и окрестностей г. Анадырь не имеют достоверно значимых различий ( $Fst = 0.02728$ ,  $p = 0.07207 \pm 0.0227$ ), что может быть связано с небольшим количеством отловленных вблизи г. Анадырь особей и отличием всех обнаруженных у этих экземпляров *cytb*-гаплотипов от Scb1 1–2 нз (рис. 2–4).

Наличие у пойманных в бас. Омолон бурозубок ряда гаплотипов, отличающихся от Scb1 не только количеством, но и значимостью нз – транзициями в первой и второй позициях кодона (рис. 3, 4) обуславливает генетическое различие между выборками *S. c. koreni* верхьев Колымы и бас. р. Омолон ( $Fst = 0.04026$ ) с высокой степенью достоверности ( $p = 0.00 \pm 0.00$ ). Уровень различий между двумя чукотскими выборками ( $Fst = -0.00999$ ,  $p = 0.77477 \pm 0.0412$ ) свидетельствует о генетическом единстве этих групп и правомерности их объединения. В сумме нуклеотидные последовательности *cytb*-гаплотипов *S. c. koreni* верхьев Колымы и

Таблица 1. Характеристика выборок средней бурозубки из популяций бассейна р. Колымы и Чукотки

| Места сбора материала  | N  | n  | V  | k  | Индексы молекулярного разнообразия |                     |                 | Параметры тестов |              |
|------------------------|----|----|----|----|------------------------------------|---------------------|-----------------|------------------|--------------|
|                        |    |    |    |    | $Pi \pm sd$                        | $\pi \pm sd$        | $h \pm sd$      | $Fu Fs$          | Tajima's $D$ |
| Верховья Колымы        | 31 | 21 | 41 | 41 | 4.2323 ± 2.1579                    | 0.003713 ± 0.002106 | 0.9505 ± 0.0243 | -12.77048***     | -2.15542***  |
| Бассейн р. Омолон      | 43 | 30 | 47 | 48 | 3.1783 ± 1.6763                    | 0.002788 ± 0.001633 | 0.9657 ± 0.0172 | -26.23284***     | -2.48485***  |
| Окрестности г. Анадырь | 15 | 8  | 10 | 10 | 1.4476 ± 0.9313                    | 0.001270 ± 0.000916 | 0.7905 ± 0.1049 | -4.36420***      | -2.01460***  |
| Суммарно Чукотка       | 58 | 36 | 53 | 54 | 2.7350 ± 1.4721                    | 0.002399 ± 0.001432 | 0.9359 ± 0.0250 | -26.59215***     | -2.58526***  |
| Общая выборка          | 89 | 56 | 84 | 87 | 3.3225 ± 1.7227                    | 0.002914 ± 0.001674 | 0.9492 ± 0.0174 | -14.45584***     | -2.21829***  |

Примечание. N – объем выборок из популяций, n – число гаплотипов, V – число вариабельных сайтов в гене *cytb* мтДНК, k – число нуклеотидных замен,  $Pi$  – среднее число попарных различий между гаплотипами,  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие,  $h$  – гаплотипическое разнообразие,  $sd$  – стандартное отклонение,  $D$  – параметр теста Tajima,  $Fs$  – параметр теста  $Fu$ , \*\*\* –  $P < 0.001$  ( $P$  – статистическая значимость различий).

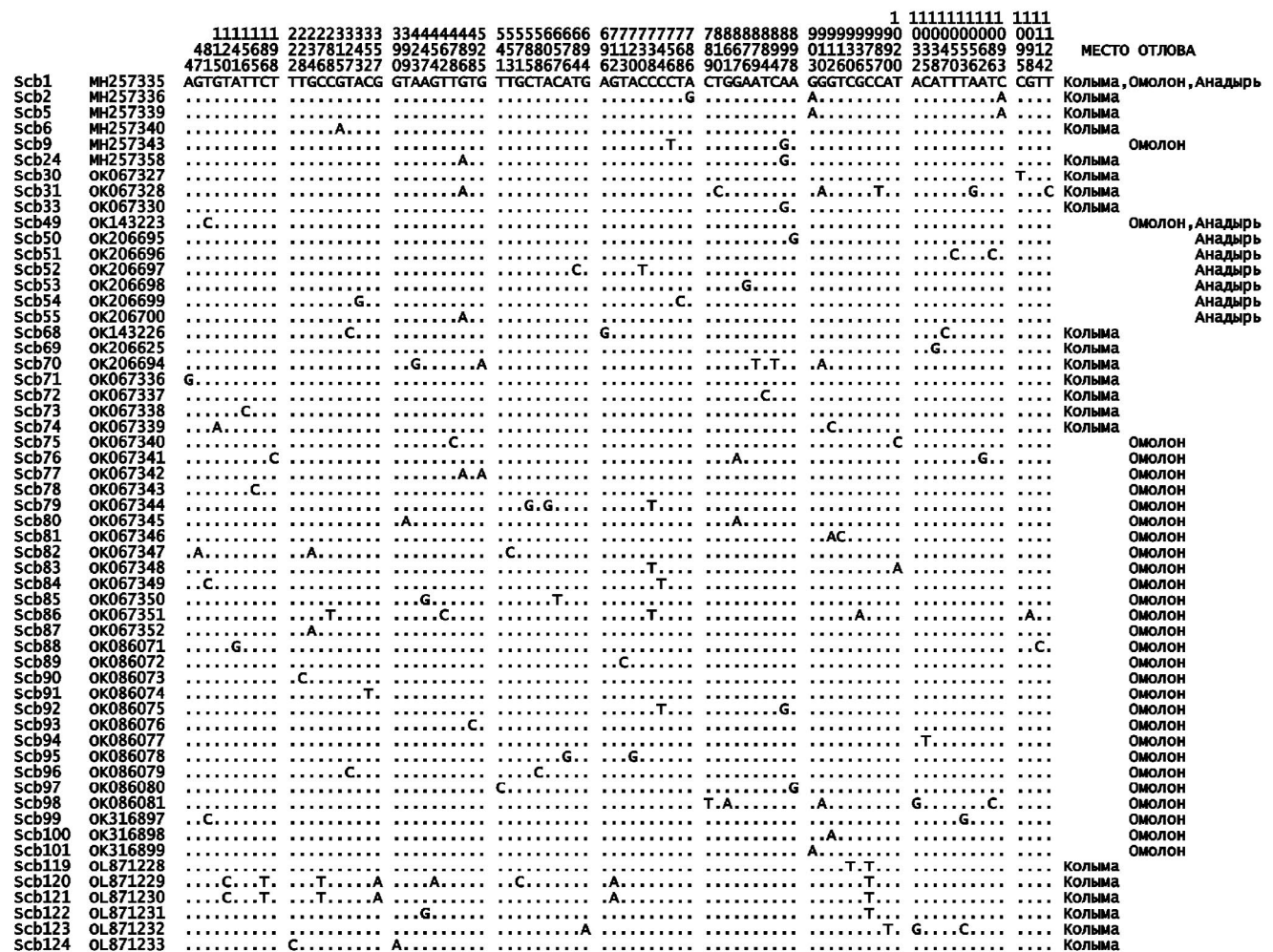


Рис. 2. Гаплотипы гена цитохрома *b* средней бурозубки *S. c. koreni* из популяций верховьев Колымы и Чукотки. Нуклеотидные замены представлены относительно последовательности варианта Scb1. Сайты замен показаны от начала гена цитохрома *b*.

**Таблица 2.** Локализация нуклеотидных замен в кодонах гена цитохрома *b* у средней бурозубки верховьев Колымы и Чукотки

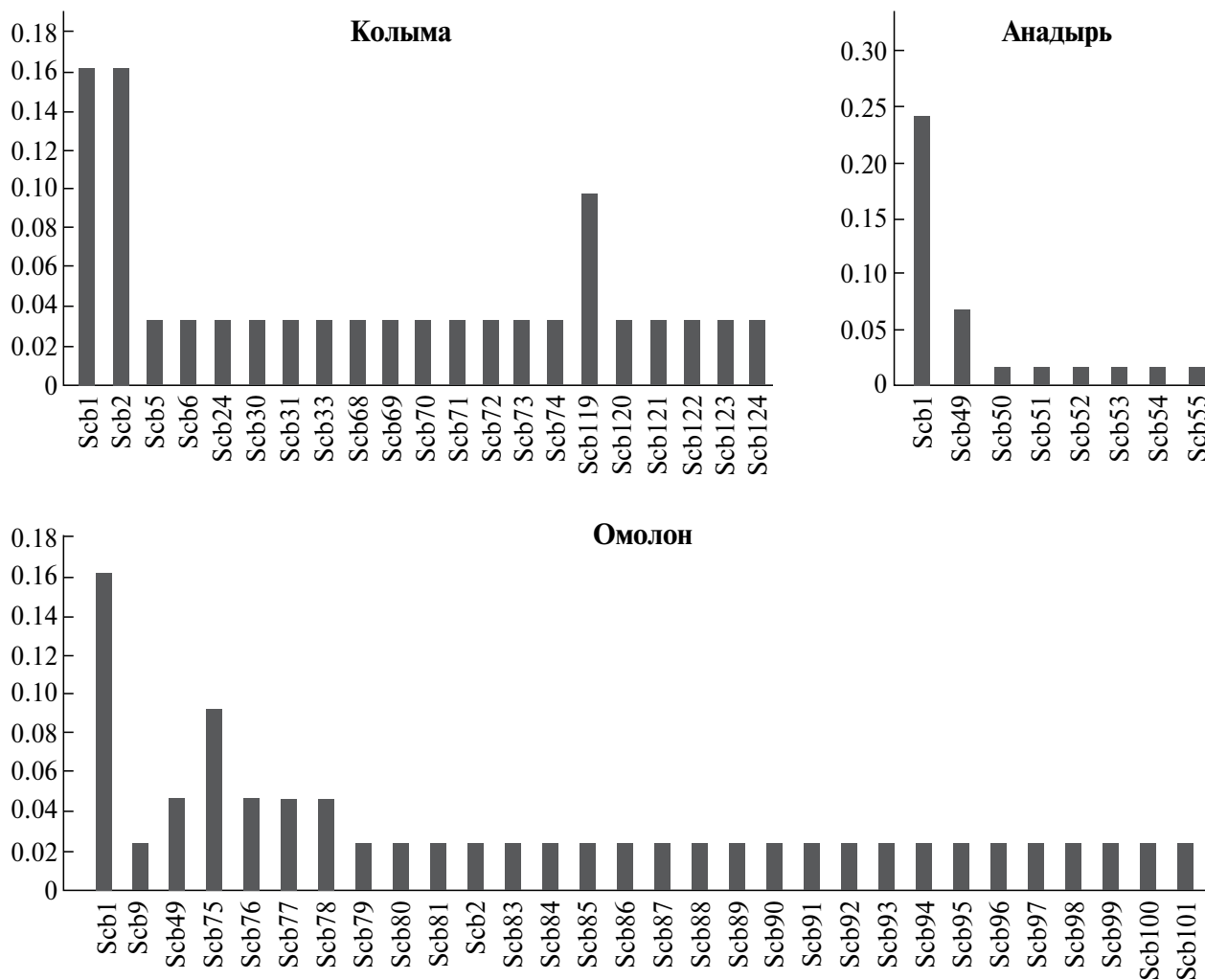
| Локаль-<br>ность              | Доля замен              |        |        |             |        |
|-------------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------|--------|
|                               | транзигция              |        |        | трансверсия |        |
|                               | позиция замены в кодоне |        |        |             |        |
|                               | 1                       | 2      | 3      | 1           | 3      |
| Верховье<br>Колымы            | 0.1463                  | 0.0244 | 0.7073 | 0.0488      | 0.0732 |
| Окред-<br>ности<br>г. Анадырь | 0.3000                  | –      | 0.7000 | –           | –      |
| Бассейн<br>р. Омолон          | 0.1875                  | 0.0417 | 0.6875 | –           | 0.0833 |
| Суммарно<br>Чукотка           | 0.2075                  | 0.0377 | 0.6792 | –           | 0.0755 |
| Всего                         | 0.1839                  | 0.0345 | 0.6782 | 0.0230      | 0.0805 |

Примечание: “–” – замена не обнаружена.

Чукотки различаются с высокой степенью достоверности ( $F_{st} = 0.04553, p = 0.00 \pm 0.00$ ), что свидетельствует о взаимной изоляции популяций бурозубок этих локальностей.

В модуле AMOVA в пакете программ Arlequin методом попарной дифференциации рассчитана генетическая изменчивость групп популяций *S. c. koreni*, составленных по географическому критерию (рис. 1). В первую группу вошла выборка бурозубок с верховьев Колымы, во вторую – выборки с Чукотки.

Доля внутривидовой генетической изменчивости составляет 95.74%, межгрупповая изменчивость 5.74%, внутривидовая доля –1.48%. Полученные результаты показывают очень высокую долю внутривидовой изменчивости *cytb*-гаплотипов в исследованных группах *S. c. koreni*. Отрицательное значение внутривидовой



**Рис. 3.** Доли гаплотипов гена цитохрома *b* в выборках средней бурозубки *S. c. koreni* из популяций верховьев Колымы и Чукотки.

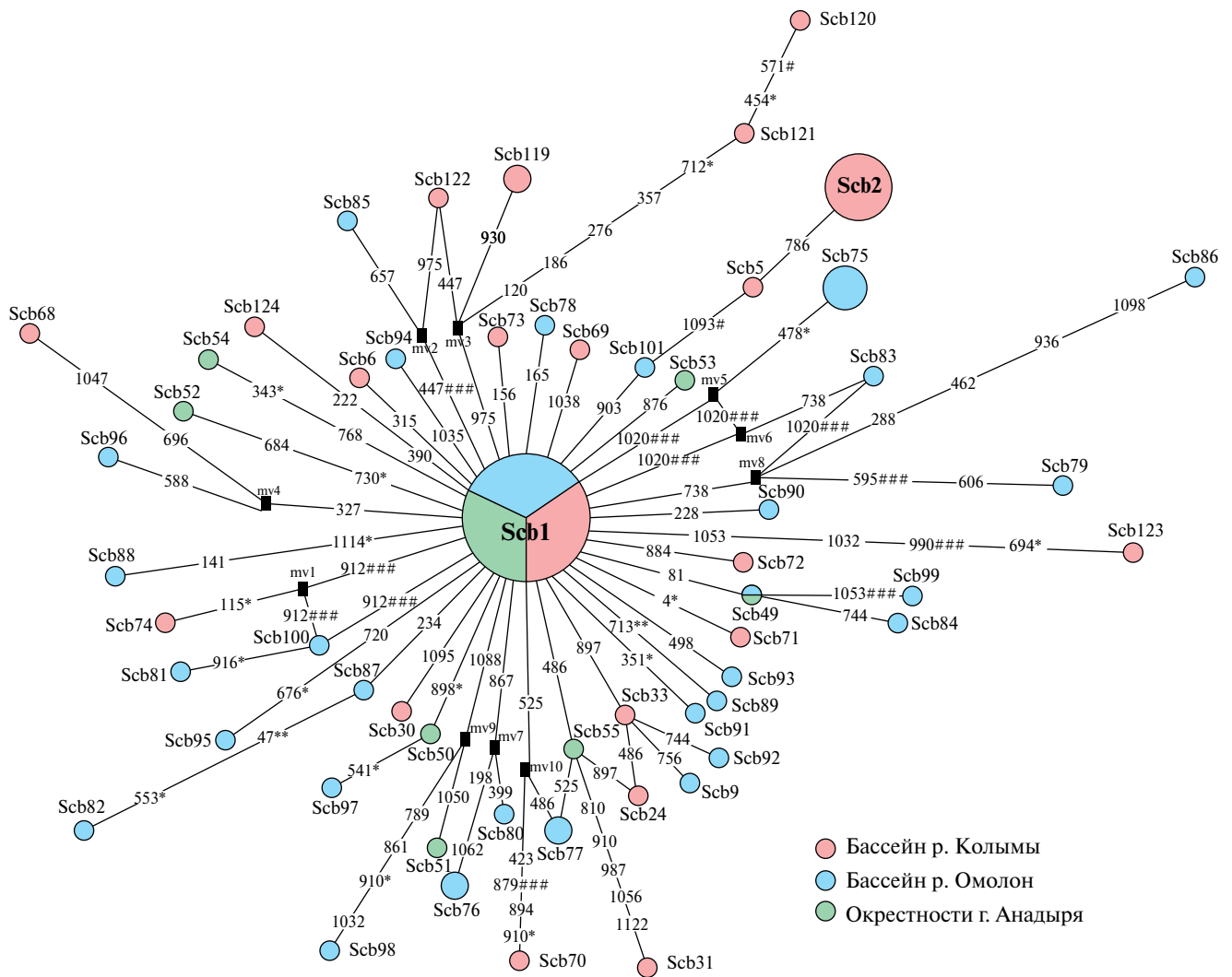


доли изменчивости свидетельствует о генетическом единстве чукотских выборок.

Для построения гипотетической реконструкции истории формирования и расселения подвида *S. c. koreni* в бассейне Колымы и на Чукотке был проведен тест на нейтральность, давший статистически достоверные высокие отрицательные значения параметров  $F_s$  и  $D$  (тестов  $F_u$  и  $Tajima$  соответственно) для всех выборок (табл. 1). Показано, что экспансия вида при отсутствии эффекта основателя и дрейфа генов приводит к большим отрицательным значениям  $D$ - и  $F_s$ -параметров [21, 22]. По-видимому, полученные нами результаты свидетельствуют как об отсутствии в процессе формирования генофондов исследованных популяций значительного вклада дрейфа генов, так

и об относительно недавней позднеплейстоценовой-голоценовой экспансии *S. c. koreni* в пределы Чукотки.

Ранее было показано [29, 30], что в период Сарганского оледенения позднего плейстоцена в бассейне Колымы отдельные виды бурозубок сохранились в рефугиуме. Учитывая достаточно обширную площадь рефугиума и особенности биологии бурозубок (3–4 помета за сезон, высокая численность), отсутствие дрейфа генов, свойственного для небольших изолированных популяций, вполне закономерно. Следует отметить, что для других видов мелких млекопитающих (в частности, полевок), освоивших этот регион и также переживших оледенения, характерно наличие разных генетических линий мтДНК [31–33]. Принадлежность *cytb*-гаплотипов особей двух подвигов *S. caecutiens*



**Рис. 4.** Медианная сеть гаплотипов гена цитохрома *b* средней бурозубки *S. c. koreni* из популяций верховьев Колымы и Чукотки. Размер кругов пропорционален доле варианта мтДНК. \* – транзигция в 1-й позиции кодона, \*\* – транзигция во 2-й позиции кодона, # – транзверсия в 1-й позиции кодона, ### – транзверсия в 3-й позиции кодона. Цифрами обозначены сайты мутаций от начала гена цитохрома *b*; mv – медианный вектор.



к одной *sub*-материнской линии, происхождение от одного родоначального Scb1, отсутствие кластеров на медианной сети гаплотипов, возможно, является особенностью этого вида бурозубок. Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований.

Исследования проведены в ходе выполнения государственного задания по теме “Млекопитающие Арктики и Субарктики: структура и динамика сообществ, проблемы охраны” № гос. регистрации АААА-А18-118010990006-3 (Институт биологических проблем Севера ДВО РАН).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных. Биоматериал, использованный в работе, взят из музейной коллекции нашей лаборатории (заспиртованные образцы тканей).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернявский Ф.Б. Млекопитающие крайнего северо-востока Сибири. М.: Наука, 1984. 389 с.
2. Юдин Б.С. Насекомоядные млекопитающие Сибири. Новосибирск: Наука, 1989. 360 с.
3. Докучаев Н.Е. Сравнительный анализ двух подвидовых форм средней бурозубки материковой части Северо-Восточной Азии // Эволюционные и генетические исследования млекопитающих. Тез. докл. Всесоюз. совещ. (Владивосток, 22–28 сентября 1990 г.). Владивосток: ДВО АН СССР, 1990б. Ч. 2. С. 80–82.
4. Охотина М.В. Подвидовая таксономическая ревизия дальневосточных бурозубок (Insectivora, *Sorex*) с описанием новых подвидов // Вопр. систематики, фаунистики и палеонтологии мелких млекопитающих. Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Т. 243. 1991. СПб.: Издательство Академии наук СССР. С. 58–70.
5. Докучаев Н.Е. Экология бурозубок Северо-Восточной Азии. М.: Наука, 1990а. 160 с.
6. Григорьева О.О., Борисов Ю.М., Стахеев В.В. и др. Генетическая структура популяций обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. 1758 (Mammalia, Lipotyphla) на сплошных и фрагментированных участках ареала // Генетика. 2015. Т. 51. № 6. С. 711–723. <https://doi.org/10.7868/S0016675815030042>
7. Ковалева В.Ю., Литвинов Ю.Н., Ефимов В.М. Землеройки (Soricidae, Eulipotyphla) Сибири и Дальнего Востока: комбинирование и поиск конгруэнтности молекулярно-генетических и морфологических данных // Зоологический журнал. 2013. Т. 92. № 11. С. 1383–1398. <https://doi.org/10.7868/S0044513413110081>
8. Ohdachi S., Masuda R., Abe H. et al. Phylogeny of Eurasian soricine shrews (Insectivora, Mammalia) inferred from the mitochondrial cytochrome *b* gene sequences // Zool. Sci. 1997. V. 14. P. 527–532.
9. Ohdachi S.D., Dokuchaev N.E., Hasegawa M., Masuda R. Intraspecific phylogeny and geographical variation of six species of northeastern Asiatic *Sorex* shrews based on the mitochondrial cytochrome *b* sequences // Mol. Ecology. 2001. V. 10. P. 2199–2213. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01359.x>
10. Ohdachi S.D., Abe H., Han S.H. Phylogenetic positions of *Sorex* sp. (Insectivora, Mammalia) from Cheju Island and *S. caecutiens* from the Korean Peninsula, inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences // Zool. Sci. 2003. V. 20. P. 91–95. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.91>
11. Ohdachi S.D., Yoshizawa K., Hanski I. et al. Intraspecific phylogeny and nucleotide diversity of the least shrews, the *Sorex minutissimus*–*S. yukonicus* complex, based on nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome *b* gene and the control region // Mammal Study. 2012. V. 37. P. 281–297. <https://doi.org/10.3106/041.037.0403>
12. Demboski J.R., Cook J.A. Phylogenetic diversification within the *Sorex cinereus* group (Soricidae) // J. Mammalogy. 2003. V. 84. № 1. P. 144–158. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2003\)084<0144:P-DWTSC>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2003)084<0144:P-DWTSC>2.0.CO;2)
13. Bannikova A.A., Dokuchaev N.E., Yudina E.V. et al. Holarctic phylogeography of the tundra shrew (*Sorex tundrensis*) based on mitochondrial genes // Biol. J. of the Linnean Society. 2010. V. 101. № 3. P. 721–746. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01510.x>
14. Bannikova A.A., Chernetskaya D.M., Raspopova A.A. et al. Evolutionary history of the genus *Sorex* as inferred from multigene data and molecular clock of major divergence events with the implications for systematics // Zool. Scripta. 2018. V. 47. № 5. P. 518–538. <https://doi.org/10.1111/zsc.12302>
15. Esteva M., Cervantes F.A., Brant S.V., Cook J.A. Molecular phylogeny of long-tailed shrews (genus *Sorex*) from México and Guatemala // Zootaxa. 2010. V. 2615. № 1. P. 47–65. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2615.1.3>
16. Koh H.S., Jang K.H., In S.T. et al. Genetic distinctness of *Sorex caecutiens hallamontanus* (Soricomorpha: Mammalia) from Jeju island in Korea: Cytochrome oxidase I and cytochrome *b* sequence analyses // Anim. Syst. Evol. Divers. 2012. V. 28. № 3. P. 215–219. <https://doi.org/10.5635/ASED.2012.28.3.215>

17. Переверзева В.В., Докучаев Н.Е., Примак А.А., Куцелев С.В. Генетическая изменчивость средней бурозубки (*Sorex caecutiens* Laxmann, 1788) Северного Приохотья // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2019. № 1. С. 103–115.
18. Jin Z.-M., Zhu L., Ma J.-Z. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of the masked shrew (*Sorex caecutiens*) from China // Mitochondrial DNA. Part B. 2017. V. 2. №. 2. P. 486–488.
19. Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
20. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinformatics Online. 2005. V. 1. P. 47–50.
21. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // Gen. Soc. Am. 1989. V. 123. P. 585–595.
22. Fu Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // Genetics. 1997. V. 147. P. 915–925. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>
23. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
24. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. N. Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 495 p.
25. Nei M., Kumar S. Molecular evolution and phylogenetic. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000. 333 p.
26. Zardoya R., Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates // Mol. Biol. Evol. 1996. V. 13. № 7. P. 933–942.
27. Hassanin A., Lecointre G., Tiller S. Related articles, links abstract. The “evolutionary signal” of homoplasy in protein-coding gene sequences and its consequences for a priori weighting in phylogeny // C. R. Acad. Sci. 1998. V. 321. № 7. P. 611–620.
28. Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.
29. Докучаев Н.Е. Роль Берингийской суши в расселении и образовании новых форм у землероек-бурозубок // Вестник ДВО РАН. 1997. № 2. С. 54–61.
30. Докучаев Н.Е., Гуляев В.Д. Четвертичная история землероек-бурозубок Северо-Восточной Азии в свете гельминтологических данных // Биология насекомых-млекопитающих. Мат. III всерос. науч. конф. по биологии насекомых-млекопитающих (15–20 сентября 2007 г., Новосибирск). Новосибирск: Изд-во “ЦЭРИС”, 2007. С. 38–40.
31. Переверзева В.В., Примак А.А., Дубинин Е.А. Филогенетические отношения популяций красной полевки *Myodes* (= *Clethrionomys*) *rutilus* Pallas, 1779 Северного Приохотья и Колымского региона // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 3. С. 444–451.
32. Переверзева В.В., Примак А.А., Докучаев Н.Е. и др. Изменчивость гена цитохрома *b* мтДНК красно-серой полевки (*Craseomys rufocanus* Sundevall, 1846) Северного Приохотья и бассейна р. Колыма // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2018. № 1. С. 101–112.
33. Переверзева В.В., Докучаев Н.Е., Примак А.А. и др. Изменчивость гена цитохрома *b* мтДНК полевки-экономки (*Alexandromys oeconomus* Pallas, 1776) Северного Охотоморья // Усп. совр. биологии. 2022. Т. 142. № 1. С. 90–104. <https://doi.org/10.31857/0042132422010057> (0042-1324 ISSN).

## GENETIC Variability of the Laxmann's Shrew (*Sorex caecutiens* Laxmann, 1788) of the Kolyma River Basin and Chukotka

V. V. Pereverzeva<sup>1,\*</sup>, N. E. Dokuchaev<sup>1</sup>, A. A. Primak<sup>1</sup>, E. A. Dubinin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Magadan, 685000 Russia*

\* e-mail: [vvpereverzeva@mail.ru](mailto:vvpereverzeva@mail.ru)

Nucleotide sequence polymorphism and haplotypic diversity of the cytochrome b gene were studied in samples of the Laxmann's Shrew *Sorex caecutiens koreni* from the populations of the Kolyma River basin and Chukotka. 56 cytb-haplotypes differing among themselves by 87 mutations in 84 sites were found. The cytb-haplotypes of individuals of the subspecies *S. c. koreni* and *S. c. macropygmaeus* were shown to belong to the same maternal mtDNA lineage, their monophyletic origin from the same ancestral haplotype Scb1, and the presence of identical cytb-haplotypes in both subspecies. The mutual isolation of the shrew populations in the upper basin of the Kolyma River and Chukotka is shown. The proportion of intrapopulation genetic variability is 95.74%, intergroup variability is 5.74%, and intragroup variability is –1.48%, which reflects a very high level of intrapopulation variability of *cytb* haplotypes in the studied groups of *S. c. koreni*, their monophyletic origin, and the genetic unity of the Chukchi samples. The values of molecular diversity indices testify to the stability of populations that have a high value of effective abundance for a long time.

**Keywords:** Laxmann's Shrew, *Sorex caecutiens*, cytochrome b (*cytb*) gene, genetic polymorphism, phylogenetic analysis, Kolyma River, Chukotka.

УДК 575.22:575.8:599.323.4

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПАШЕННОЙ ПОЛЕВКИ  
*Microtus agrestis* (Arvicolinae, Rodentia)  
ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ  
ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА ГЕНА ЦИТОХРОМА *b***

© Л. Э. Ялковская<sup>1, \*</sup>, П. А. Сибиряков<sup>2</sup>, М. А. Крохалева<sup>1</sup>, Е. А. Маркова<sup>1</sup>,  
А. В. Бородин<sup>1</sup>, С. А. Борисов<sup>3</sup>, М. В. Чибиряк<sup>1</sup>, А. В. Бобрецов<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии растений и животных Уральского отделения  
Российской академии наук, Екатеринбург, 620144, Россия

<sup>2</sup>Институт зоологии Республики Казахстан, Алматы, 050060 Республика Казахстан

<sup>3</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока,  
Иркутск, 664047 Россия

<sup>4</sup>Печоро-Илычский государственный природный биосферный заповедник,  
Республика Коми, пос. Якша, 169436 Россия

\*e-mail: lida@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 26.10.2023 г.

После доработки 19.12.2023 г.

Принята к публикации 26.12.2023 г.

Проведен анализ генетического разнообразия пашенной полевки с включением новых данных по полным последовательностям гена цитохрома *b* из наименее изученной области видового ареала — центральной части Северной Евразии (20 локалитетов Восточно-Европейской равнины, Урала, Западной и Восточной Сибири). Полученные результаты в целом согласуются с современными представлениями о филогеографической структуре вида, но указывают на ранее неучтенную генетическую неоднородность Восточной клады, занимающей всю азиатскую часть ареала вида и его европейскую часть до Северной и Восточной Европы. Проведенное на примере Урала сопоставление результатов анализа генетического разнообразия с возрастом палеонтологических находок позволяет предполагать, что климатические изменения позднего плейстоцена и голоцена могли приводить не к полному вымиранию вида на территориях региона, а к пространственному перераспределению его популяций с последующим полным или частичным замещением одних генетических групп другими.

**Ключевые слова:** генетическая дифференциация, филогеография, митохондриальный геном, эволюционная история, Arvicolini, Уральский регион

**DOI:** 10.31857/S0016675824050041 **EDN:** CJOZQK.

Исследования генетической структуры широко распространенных видов представляют интерес для изучения внутривидовой дифференциации и микроэволюционных процессов, оценки роли глобальных климатических изменений и динамики физико-географических условий отдельных регионов, а также антропогенного влияния в формировании современного биоразнообразия.

Пашенная полевка (*Microtus agrestis* Linnaeus, 1761) — один из наиболее широко распространенных в Палеарктике представителей рода *Microtus*, ареал которого занимает практически всю территорию Европы и Северо-Западной Азии от

Атлантического побережья до оз. Байкал [1–3]. *M. agrestis* населяет преимущественно лесную зону, где занимает открытые биотопы (поляны, опушки, поймы, сельскохозяйственные угодья, вырубki и т.д.), но за счет пойменных лесов проникает в субарктическую тундру и лесостепь и может рассматриваться как вид с полизональным характером распространения [4].

Генетические исследования ядерного и митохондриального геномов выявили дифференциацию пашенной полевки на три филогруппы: Португальскую, Южную (Средиземноморскую) и Северную [5–7], которые в настоящий момент

рассматриваются в качестве криптических видов [8]. Португальская (*M. rozianus*) и Южная (*M. lavernedii*) полевки представлены на территории Португалии и Испании, Франции и Швейцарии, соответственно. Наиболее широко распространенной является Северная филогруппа (*M. agrestis*), занимающая территорию от Великобритании и Западной Европы до восточных границ видового ареала. Анализ последовательностей гена цитохрома *b* (*cytb*) показал наличие у *M. agrestis* шести клад, названных соответственно их распространению Северо-Британской, Скандинавской, Французской, Западно-Европейской, Центрально-Европейской и Восточной [7, 9, 10]. Формирование современного генетического разнообразия вида согласно данным молекулярных часов произошло в результате недавней экспансии после критического сокращения численности (“бутылочного горлышка”) в позднем дриасе около 12000 лет назад [9, 10].

Изучению генетической структуры и эволюционной истории *M. agrestis* на территории Европы посвящен ряд научных исследований [7, 9–14]. Однако Восточная клада, территория распространения которой занимает около двух третей видового ареала (от Северной и Восточной Европы до оз. Байкал), остается практически неизученной в этом отношении. Это связано с почти полным отсутствием данных из центральной части Северной Евразии, в частности Урала и Западной Сибири, которые благодаря своему географическому положению и геологической истории играли важную роль в становлении биомов северного полушария [4, 15, 16], в том числе в формировании современного генетического разнообразия представителей рода *Microtus* [17–19]. Для пашенной полевки исследования на территориях Урала и Западной Сибири могут быть ключевыми при реконструкции эволюционной истории восточных популяций. В частности, могут способствовать устранению несоответствия между данными о времени появления современных *M. agrestis* в азиатской части ареала по молекулярным часам [9, 10] и возрастом палеонтологических находок на Урале и прилегающих равнинах, согласно которым первое появление вида в регионе датируется средним плейстоценом [20, 21], при этом пашенная полевка широко встречается в ископаемых фаунах как холодных, так и теплых временных интервалов еще с позднего плейстоцена (последние 130 тыс. лет) [22].

Уральские горы, протянувшиеся субмеридионально на границе Европы и Азии, занимают центральную часть области распространения Восточной клады *M. agrestis*. На протяжении позднего плейстоцена и всего голоцена этот вид был неотъемлемым элементом фауны Южного, Среднего и Северного Урала, о чем свидетельствуют многочисленные находки в пещерных местонахождениях от 51° до 62° с.ш. [23, 24]. Возраст находок

подтвержден радиоуглеродными датировками [23, 25–29], которые указывают на непрерывную историю вида на Урале по крайней мере с позднего плейстоцена.

В настоящей работе представлены результаты филогеографического анализа пашенной полевки на основе полных последовательностей *cytb* с включением данных из ранее неизученных локалитетов Урала и Западной Сибири, а также Восточно-Европейской равнины и Восточной Сибири, которые в настоящее время практически не представлены в генетических исследованиях вида. В задачи также входило получение данных о генетическом разнообразии *M. agrestis* в Уральском регионе, определение степени дивергенции гаплотипов, встречающихся на Южном, Среднем и Северном Урале, и обсуждение наблюдаемой картины географического распределения гаплотипов в контексте имеющихся данных о распространении вида в регионе, как в настоящее время, так и в прошлом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал представлен образцами мышечной и костной ткани 54 особей *M. agrestis* из 20 локалитетов Восточно-Европейской равнины, Урала, Западной и Восточной Сибири (рис. 1, табл. 1). В работе использованы сборы авторов и коллекция музея Института экологии растений и животных УрО РАН (номера использованных музейных экземпляров: ИЭРиЖ169576, ИЭРиЖ24996454, ИЭРиЖ78589, ИЭРиЖ86631, ИЭРиЖ296092, ИЭРиЖ366505, ИЭРиЖ366572), на базе которого хранится весь использованный материал.

Помимо собственных данных в анализ включены 313 гаплотипов полной последовательности *cytb* *M. agrestis* (AY167149–167159, AY167165–167185 [30]; AY167188–167213, FJ619746–619786 [11]; GU563195–563299 [9]; JX284248–284252 [6]; KF218851–218952 [10]; KP190261 [31]; MF099552 [32]), представленных в базе GenBank (рис. 1). В качестве внешней группы при филогенетических реконструкциях использованы *M. lavernedii* и *M. rozianus* (AY167186, AY167149–167187, AY167160–167164, JX284253–284283 [6, 30]).

Тотальная ДНК выделена методом солевой экстракции [33] из образцов мышечной ткани, зафиксированных в 96%-ном этаноле, черепов и шкур. Амплификацию участков мтДНК, содержащих *cytb*, проводили с двумя парами праймеров: L7 (5'-ACCAATGACATGAAAAATCATCGTT-3') и H2 (5'-TAGTTGTCTGGGTCTCC-3'); L8 (5'-CTGCCATGAGGACAAATATCATTT-3') и H6 (5'-TCTCCATTTCTGGTTTACAAGAC-3') [34]. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей dNTP's (SibEnzyme) 2.5 mM каждого, 10-кратный ASBuffer (SibEnzyme), 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 2.5 пМ каждого праймера, 5U

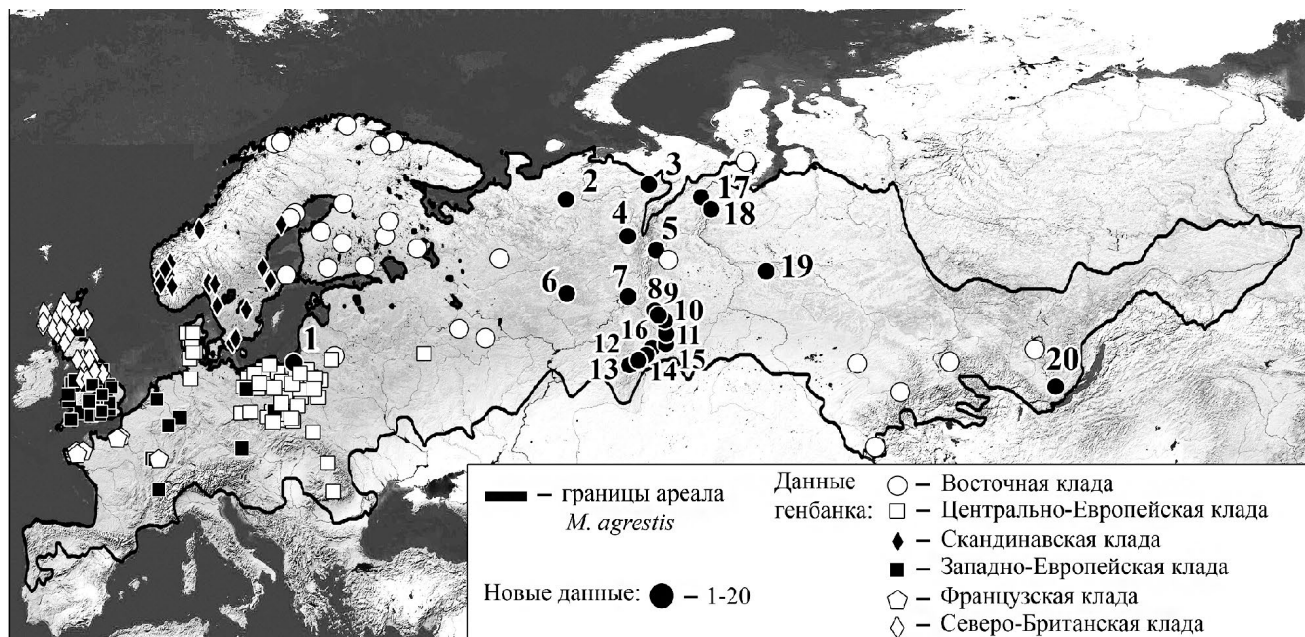


Рис. 1. Ареал *M. agrestis* [3], точки сбора нового материала и географическая локализация данных базы GenBank, анализируемых в работе.

Taq DNA Polymerase (SibEnzyme), 50–100 нг матрицы ДНК по температурному протоколу (94°C – 3 мин, [94°C – 20 с, 58°C – 15 с, 72°C – 1 мин 20 с] – 35 циклов; 72°C – 10 мин) на амплификаторах MyCycler (BioRad) и T100 (BioRad). ПЦР-продукт очищали с помощью QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование проводили с набором реактивов BrilliantDye® Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 (NimaGen, Нидерланды) в двух направлениях с праймерами, использованными при ПЦР, на генетическом анализаторе “Нанофор-05” (Синтол, Россия) в центре коллективного пользования ИЭРиЖ УрО РАН.

Анализ хроматограмм выполнен в программе BioEdit v. 7.2.0 (4.30.2013) [35], выравнивание последовательностей и расчет генетических дистанций – в программе MEGA v6 [36]. Филогенетические реконструкции методом Байесова анализа (Bayesian Inference – BI) проводили в программе MrBayes v3.2.2 [37]. При построении филогенетического дерева использовали комплексный подход с выбором оптимальной модели эволюции нуклеотидных последовательностей отдельно для каждой из трех позиций в кодоне в программе MrModeltest 2.3 [38]. Для всех позиций оптимальной была модель GTR+I. Для построения медианной сети (алгоритм median-joining [39]) использовали Popart v1.7 [40]. Расчет индексов генетического разнообразия и тесты на селективную нейтральность выполнены в программах Arlequin v3.1 [41] и DnaSP v5.10 [42].

При обсуждении результатов использовали данные по биологии и распространению пашенной полевки в современных экосистемах Уральского региона [43, 44], учитывали упоминания *M. agrestis* в ископаемой летописи Урала [22–29]. Границы Северного, Среднего и Южного сегментов Урала определены по физико-географическим критериям [45].

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Для 54 полных последовательностей *cytb* (1140 пн), полученных в ходе работы, число полиморфных сайтов составило 83 (42 сайта информативны для парсимонического анализа), число транзаций – 78, трансверсий – 8. Содержание цитозина и гуанина в последовательности 0.43. Всего описано 37 гаплотипов (табл. 1). Все – новые для вида. С учетом последовательностей, представленных в базе данных GenBank, общее число гаплотипов *cytb*, анализируемых в работе, составило 348 (число полиморфных сайтов – 273, из которых 196 информативны для парсимонического анализа).

На филогенетическом дереве *M. agrestis* выделяются шесть групп гаплотипов I–VI (рис. 2), соответствующих описанным ранее Восточной (I), Центрально-Европейской (II), Скандинавской (III), Западно-Европейской (IV), Французской (V) и Северо-Британской (VI) кладам [7, 9, 10].

Среди секвенированных нами последовательностей один из гаплотипов Magr36, обнаруженный у

**Таблица 1.** Географическое положение точек сбора нового материала, число анализируемых особей и гаплотипы *cytb* (1140 пн) *M. agrestis*

| Точки сбора материала        |   | <i>N</i> | Гаплотип<br>(№ access.)   |
|------------------------------|---|----------|---|
| Восточно-Европейская равнина | 1. п. Отрадное, Калининградская обл. (54.93° с.ш. 20.09° в.д.)                    | 1        | Magr36 (OR882682)   |
|                              | 2. Средний Тиман, Коми (64.88° с.ш. 51.47° в.д.)                                  | 1        | Magr29 (OR882675)   |
| Полярный Урал                | 3. Окрестности г. Воркута, Коми (67.02° с.ш. 64.07° в.д.)                         | 1        | Magr11 (OR882657)   |
| Северный Урал                | 4. Печоро-Ильчский заповедник, Коми (62.06° с.ш. 58.47° в.д.)                     | 5        | Magr7 (OR882653)<br>Magr8 (OR882654)<br>Magr9 (OR882655)  |
|                              | 5. Окрестности г. Ивдель, Свердловская обл. (60.39° с.ш. 60.31° в.д.)             | 2        | Magr6 (OR882652)  |
| Предуралье                   | 6. п. Черная Холуница, Кировская обл. (58.50° с.ш. 55.41° в.д.)                   | 7        | Magr10 (OR882656)<br>Magr11 (OR882657)<br>Magr24 (OR882670)   |
| Средний Урал                 | 7. Лысьвенский р-н, Пермский край (57.93° с.ш., 58.09° в.д.)                      | 1        | Magr27 (OR882673)   |
|                              | 8. Висимский биосферный заповедник (57.22° с.ш. 59.47° в.д.)                      | 8        | Magr4 (OR882650)<br>Magr5 (OR882651)<br>Magr25 (OR882671)<br>Magr26 (OR882672)<br>Magr28 (OR882674) |
|                              | 9. Окрестности г. Ревда, Свердловская обл. (56.52° с.ш. 59.50° в.д.)              | 1        | Magr20 (OR882669)   |
|                              | 10. г. Екатеринбург (56.48° с.ш. 60.32° в.д.)                                     | 2        | Magr15 (OR882661)<br>Magr16 (OR882662)  |
|                              | 11. с. Черданцево, Сысертский р-н, Свердловская обл. (56.60° с.ш. 60.95° в.д.)    | 1        | Magr37 (OR882683)   |
|                              | 12. гора Иремель, Белорецкий р-н, Башкирия (54.31° с.ш. 58.51° в.д.)              | 3        | Magr21 (OR882665)<br>Magr22 (OR882666)<br>Magr23 (OR882667)   |
| Южный Урал                   | 13. Южно-Уральский государственный природный заповедник (55.06° с.ш. 58.28° в.д.) | 4        | Magr30 (OR882676)<br>Magr31 (OR882677)<br>Magr32 (OR882678)<br>Magr33 (OR882679)                    |
|                              | 14. Ильменский государственный заповедник (55.10° с.ш. 60.17° в.д.)               | 4        | Magr17 (OR882663)<br>Magr18 (OR882664)  |
|                              | 15. Окрестности п. Метлино, Челябинская обл. (55.45° с.ш. 60.54° в.д.)            | 5        | Magr1 (OR882647)<br>Magr3 (OR882649)<br>Magr12 (OR882658)   |
|                              | 16. Окрестности г. Карабаш, Челябинская обл. (55.28° с.ш. 60.13° в.д.)            | 1        | Magr2 (OR882648)  |
| Западная Сибирь              | 17. с. Питляр, Шурышкарский р-н, ЯНАО (65.80° с.ш. 65.87° в.д.)                   | 1        | Magr14 (OR882660)   |
|                              | 18. д. Хашгорт, Шурышкарский р-н, ЯНАО (65.39° с.ш. 65.63° в.д.)                  | 1        | Magr13 (OR882659)   |
|                              | 19. Окрестности г. Пыть-Ях, Нефтеюганский р-н, ХМАО (60.43° с.ш. 72.45° в.д.)     | 2        | Magr19 (OR882668)   |
|                              | 20. Окрестности г. Иркутск (52.26° с.ш. 104.42° в.д.)                             | 3        | Magr34 (OR882680)<br>Magr35 (OR882681)  |

Примечание. Номера локалитетов соответствуют представленным на рис. 1; *N* – число особей; № access – номер гаплотипа в базе GenBank

особи из самой западной из исследуемых в работе популяций (Калининградская обл.), принадлежит Центрально-Европейской кладе (рис. 2), сформированной гаплотипами из центрально- и восточноевропейской областей распространения *M. agrestis* (Германия, Дания, Польша, Чехия, Румыния, Литва, Беларусь). Остальные 36 гаплотипов с востока Восточно-Европейской равнины, Урала, Западной и Восточной Сибири принадлежат Восточной кладе, в которую также входят последовательно из северо- и восточноевропейских популяций и всей азиатской части видового ареала (Приложение). Медианная сеть также демонстрирует дифференциацию *M. agrestis* на шесть вышеописанных клад и принадлежность гаплотипа из Калининградской области к Центрально-Европейской кладе, а остальных полученных в работе гаплотипов – к Восточной кладе (рис. 3).

Полученные результаты в целом согласуются с современными представлениями о филогеографической структуре вида [7, 9, 10]. Однако включение в анализ данных из ранее неисследованных территорий области распространения Восточной клады, выявило ее внутреннюю неоднородность, не описанную в предыдущих исследованиях. Так, на филогенетическом дереве в пределах Восточной клады с разной степенью поддержки выделяются две крупные группы гаплотипов Ia и Ib (рис. 2). Группа Ia ( $BI = 0.77$ ) представлена преимущественно гаплотипами с территории Урала (Северный, Средний и Южный Урал) и Западной Сибири, а также двумя гаплотипами из Алтая. Базальным для гаплогруппы является гаплотип Magr9 из Печоро-Ильчского заповедника (Северный Урал) (рис. 3). Группу Ib ( $BI = 0.91$ ) формируют северо-европейские гаплотипы (Норвегия, Швеция, Финляндия, Литва, Республика Карелия). Остальные гаплотипы Восточной клады из европейской и азиатской частей ареала *M. agrestis* (Финляндия, Предуралье, Средний и Южный Урал, Западная и Восточная Сибирь, Алтай, Китай) могут быть отнесены к третьей группе Ic, что демонстрирует расположение гаплотипов в пределах клады на медианной сети (рис. 3). Географическое распространение гаплотипов выделившихся гаплогрупп представлено на рис. 4.

Межгрупповые генетические дистанции, рассчитанные для гаплогрупп Ia, Ib и Ic, превосходят внутригрупповые, однако они несколько ниже, чем межгрупповые дистанции у Восточной, Центрально-Европейской, Скандинавской, Западно-Европейской, Французской и Северо-Британской клад (табл. 2).

Индексы генетического разнообразия гаплогрупп Ia, Ib, Ic в целом сходны и находятся в пределах значений, обнаруженных у шести клад *M. agrestis* (табл. 3). На фоне высоких значений гаплотипического разнообразия нуклеотидное

разнообразие относительно невысоко. Тесты на селективную нейтральность имеют статистически значимые отрицательные значения как для трех гаплогрупп, так и для большинства клад. Исключение составила Французская клада, что, по-видимому, связано с малым размером выборки ( $N = 6$ ). Результаты указывают на прохождение *M. agrestis* в недавнем прошлом через стадию увеличения эффективного размера популяции и последующего быстрого расселения в пределах современного ареала.

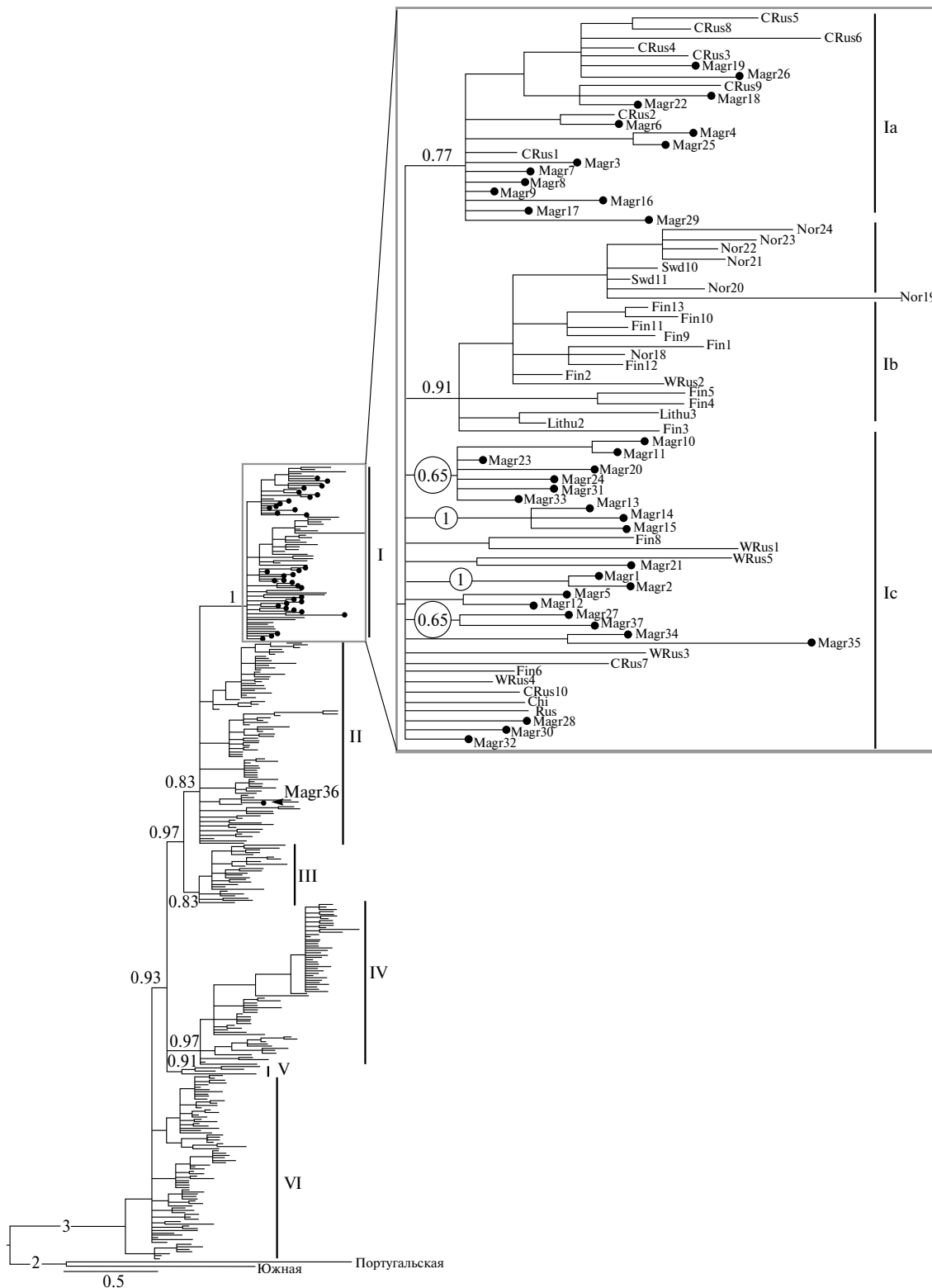
На территории Урала встречаются две из трех гаплогрупп Восточной клады – Ia и Ic (рис. 4). Наиболее распространены в регионе гаплотипы группы Ia. На Среднем и Южном Урале также представлена группа Ic, значительная область распространения которой и группировка гаплотипов внутри нее (существование групп гаплотипов с поддержкой  $BI > 0.65$  (рис. 2)) позволяют предполагать наличие нескольких дифференцированных подгрупп, в которые входят уральские гаплотипы: Ic1 – Magr10, Magr11, Magr20, Magr23, Magr24, Magr31, Magr33; Ic2 – Magr13–Magr15; Ic3 – Magr1, Magr2; Ic4 – Magr27, Magr37; Ic5 – недифференцированные гаплотипы. Географическая приуроченность групп гаплотипов разного ранга, обнаруженных на Урале, проиллюстрирована на рис. 5.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами новые данные для пашенной полевки из центральной части Северной Евразии позволили впервые провести анализ генетического разнообразия Восточной клады, область распространения которой включает как европейские территории, так и всю азиатскую часть ареала вида. В пределах данной клады выделяются как минимум три гаплогруппы (рис. 2, 3), одна из которых распространена преимущественно на Урале и в Западной Сибири, вторая – в Северной Европе, а область распространения третьей группы включает территории Европы и Азии (рис. 4).

Согласно филогенетическим реконструкциям с включением новых данных, индексам генетического разнообразия и демографии *M. agrestis* (рис. 2, 3, табл. 3) экспансия Восточной клады и формирование ее современного генетического разнообразия – относительно недавнее событие, произошедшее, по-видимому, уже после LGM. Полученные результаты не противоречат предположению, сделанному на основе данных молекулярных часов, о том, что современная генетическая структура вида является результатом расселения после критического сокращения численности и фрагментации ареала в период климатического пессимума, для Восточной клады этот интервал рассчитан в пределах 16907–8480 лет назад [9, 10]. Экспансии *M. agrestis* в восточном направлении, на которые указывают



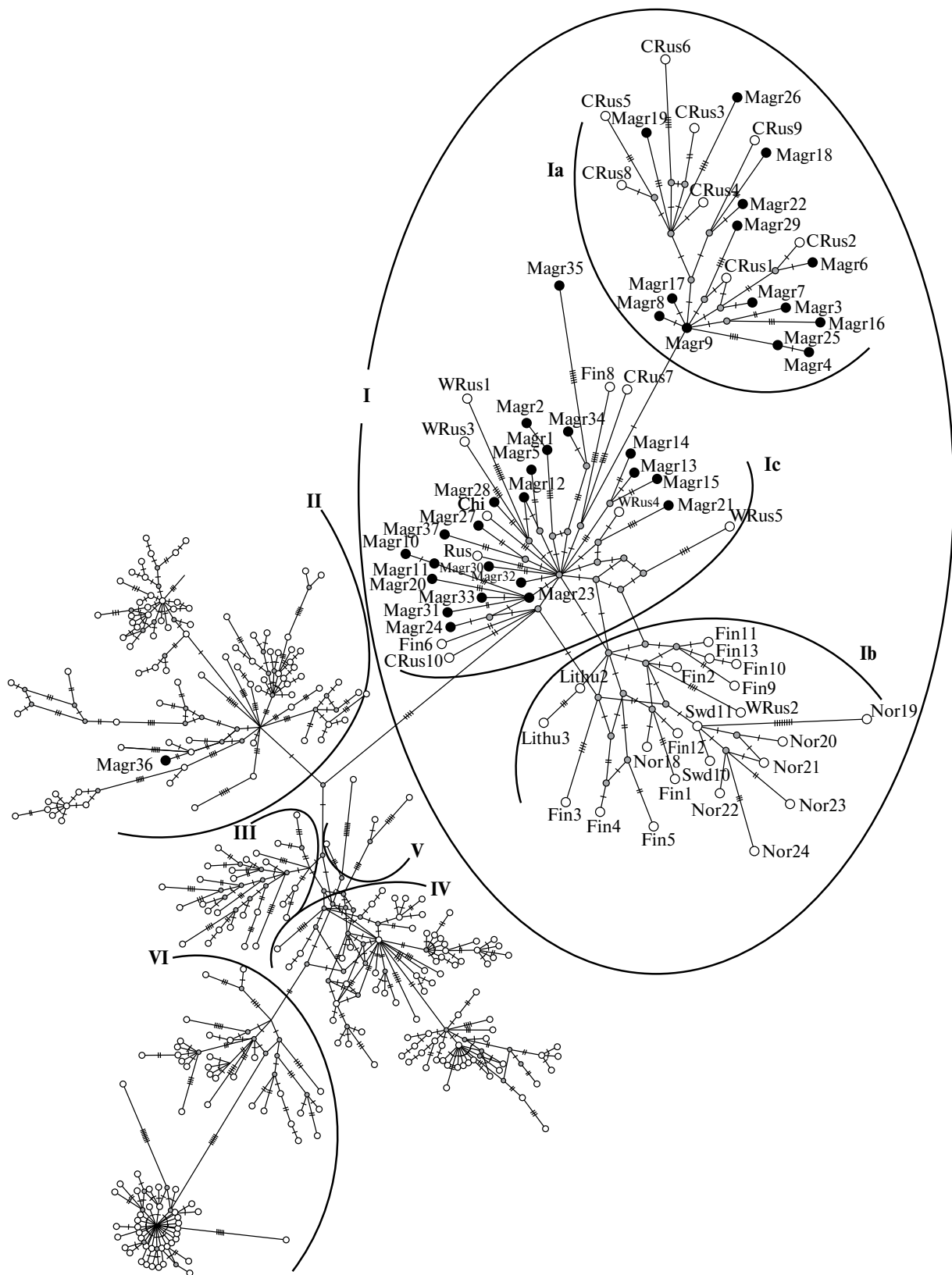


**Рис. 2.** Филогенетическое дерево *M. agrestis*, реконструированное методом Байесова анализа для 348 гаплотипов *cytb* (1140 пн). I–VI – кланды: I – Восточная, II – Центрально-Европейская, III – Скандинавская, IV – Западно-Европейская, V – Французская, VI – Северо-Британская. Ia–Ic – группы гаплотипов Восточной кланды. Черные круги – оригинальные гаплотипы (Magr1–Magr37). Цифры над ветвями – постериорные вероятности (BI > 0.70). Окружности с цифрами на ветвях гаплогруппы Ic – постериорные вероятности (BI > 0.65) для подгрупп, включающих гаплотипы с территории Урала.

**Приложение.** GenBank haplotypes included in Eastern clade (fig. 2): name used in the study, GenBank accession (№), geographic localization, the belonging to haplogroups identified within the clade

| Haplotype | №        | Geographic localization  | Group |
|-----------|----------|--|-------|
| CRus1     | AY167213 | Russia, Yamal peninsula 68.2500 N 70.0000 E                    | Ia    |
| Fin3      | AY167205 | Finland, Kuhmo 64.1167 N 29.5167 E                             | Ib    |
| Swd10     | AY167201 | Sweden, Gala 63.3667 N 18.4500 E                               | Ib    |
| Swd11     | AY167200 | Sweden, Ume 63.7667 N 20.2833 E                                | Ib    |
| Fin2      | AY167199 | Finland, Lapua 62.9833 N 22.9833 E                             | Ib    |
| Fin1      | AY167198 | Finland, Tornio 65.8500 N 24.1667 E                            | Ib    |
| Fin5      | AY167196 | Finland, Loppi 60.7167 N 24.4333 E                             | Ib    |
| Fin4      | AY167195 |  | Ib    |
| CRus2     | AY167180 | Russia, Kavka River, Serov 59.8333 N 60.3667 E                 | Ia    |
| Lithu3    | AY167178 | Lithuania, Vilnius 54.6667 N 25.3167 E                         | Ib    |
| Lithu2    | AY167177 |  | Ib    |
| CRus6     | AY167175 | Russia, Novosibirsk 55.0000 N 82.9167 E                        | Ia    |
| WRus3     | AY167174 | Russia, Penza region 53.6667 N 42.2500 E                       | Ic    |
| Fin8      | AY167173 | Finland, Eland Mellanon, 60.2500 N 19.5000 E                   | Ic    |
| CRus7     | AY167171 | Russia, Bratsk 56.2833 N 101.7000 E                            | Ic    |
| Fin6      | AY167169 | Finland, Luumäki 60.9167 N 27.6333 E                           | Ic    |
| WRus4     | AY167166 | Russia, Velsk, Archangel region 61.0500 N 42.1000E             | Ic    |
| WRus5     | AY167165 | Russia, Chernogolovka, Moscow region 56.000 N 38.3667 E        | Ic    |
| CRus5     | AY167157 | Russia, Novosibirsk 55.0000 N 82.9167 E                        | Ia    |
| CRus4     | AY167156 |  | Ia    |
| WRus2     | AY167154 | Russia, Pertozero, Karelia 62.0833 N 34. 0000 E                | Ib    |
| WRus1     | AY167153 |  | Ic    |
| CRus3     | AY167149 | Russia, Novosibirsk 55.0000 N 82.9167 E                        | Ia    |
| CRus10    | KF218952 | Russia, Altai, Artybash 51.7978 N 87.2262 E                    | Ic    |
| CRus9     | KF218951 |  | Ia    |
| CRus8     | KF218950 |  | Ia    |
| Nor24     | KF218873 | Norway: Finnmark, Sor-Varanger, Svanvik 69.4565 N 30.0431 E    | Ib    |
| Nor23     | KF218872 | Norway: Finnmark, Kvalsund, Sennalandet 70.2800 N 24.0800 E    | Ib    |
| Nor22     | KF218871 | Norway: Finnmark, Sor-Varanger, Korpjället 69.5667 N 30.8500 E | Ib    |
| Nor21     | KF218870 | Norway: Finnmark, Kvalsund, Sennalandet 70.2800 N 24.0800 E    | Ib    |
| Nor20     | KF218869 | Norway Troms, Balsfjord, Malangen 69.3522 N 18.8475 E          | Ib    |
| Nor19     | KF218868 | Norway Finnmark, Kvalsund, Sennalandet 70.2800 N 24.0800 E     | Ib    |
| Nor18     | KF218867 | Norway Finnmark, Kvalsund, Sennalandet 70.2800 N 24.0800 E     | Ib    |
| Chi       | KP190261 | China Habahe, Xinjiang   | Ic    |
| Fin13     | JX284252 | Finland Jyvaskyla  | Ib    |
| Fin12     | JX284251 | Finland  | Ib    |
| Fin11     | JX284250 | Finland Koli   | Ib    |
| Fin9      | JX284249 | Finland Koli   | Ib    |
| Fin10     | JX284248 | Finland Jyvaskyla  | Ib    |
| Rus       | MF099552 | Russia Krasnoyarsky Kray 54.8508 N 93.6757 E                   | Ic    |

The GenBank haplotypes having in the accession number the AY abbreviation [30]; KF [10]; KP [31]; JX [6]; MF [32].



**Рис. 3.** Медианная сеть 348 гаплотипов *cytb* (1140 пн) *M. agrestis*. I–VI кланды: I – Восточная, II – Центрально-Европейская, III – Скандинавская, IV – Западно-Европейская, V – Французская, VI – Северо-Британская. Ia–Ic – гаплогруппы Восточной кланды. Черные круги – оригинальные гаплотипы (Magr1–Magr37).

**Таблица 2.** Средние внутригрупповые и межгрупповые генетические дистанции для шести клад *M. agrestis* и гаплогрупп Восточной клады

| Клады | I         | II        | III       | IV        | V         | VI        | Группы | Ia        | Ib        | Ic        |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|-----------|-----------|-----------|
| I     | 7.92/1.10 | 13.93     | 13.59     | 19.86     | 14.90     | 14.50     |        |           |           |           |
| II    | 2.19      | 8.84/1.20 | 11.03     | 16.89     | 12.50     | 11.52     |        |           |           |           |
| III   | 2.29      | 1.77      | 6.76/1.05 | 15.41     | 10.74     | 9.99      |        |           |           |           |
| IV    | 3.29      | 2.86      | 2.80      | 6.66/1.19 | 14.81     | 13.80     | Ia     | 6.21/1.20 | 9.49      | 8.55      |
| V     | 2.78      | 2.37      | 2.11      | 2.92      | 6.59/1.65 | 9.33      | Ib     | 2.00      | 5.99/1.13 | 8.25      |
| VI    | 2.55      | 2.07      | 1.86      | 2.60      | 1.88      | 6.12/0.94 | Ic     | 1.43      | 1.49      | 6.82/1.00 |

Примечание. I – Восточная клада, II – Центрально-Европейская клада, III – Скандинавская клада, IV – Западно-Европейская клада, V – Французская клада, VI – Северо-Британская клада, Ia–Ic – гаплогруппы Восточной клады. Над диагональю – средние межгрупповые дистанции ( $\times 10^{-3}$ ), под диагональю – S.E. ( $\times 10^{-3}$ ), на диагонали – средние внутригрупповые дистанции / S.E ( $\times 10^{-3}$ ).

палеонтологические находки на Урале и в Западной Сибири [20–22], могли закончиться полным или частичным вымиранием и замещением одних генетических линий на другие.

В связи с этим более подробно остановимся на особенностях современного генетического разнообразия вида в Уральском регионе, где палеонтологические находки на Южном, Среднем и Северном Урале [23–29] показывают непрерывное существование *M. agrestis* на протяжении позднего плейстоцена и голоцена.

Гаплотипы группы Ia обнаружены на Северном Урале на восточном склоне (окрестности городов Ивдель и Серов) и в западных предгорьях (Печоро-Илычский заповедник); на Среднем Урале – в Висимском заповеднике и в окрестностях г. Екатеринбург; на Южном Урале – в Ильменском заповеднике, на горе Ирмель и в окрестностях пос. Метлино. Эти локалитеты относятся к зонам северной, средней, южной тайги, предлесостепных лесов и горно-лесостепному участку Южного Урала. Расположение группы Ia на территории Евразии и особенности пространственного распределения гаплотипов на Урале (рис. 4) позволяют охарактеризовать область ее распространения как субаркто-бореальную. Поскольку гаплотипы с разных склонов Урала близки, можно предполагать, что формирование Ia связано с развитием современного таежного биома. Базальное положение для группы имеет гаплотип из Печоро-Илычского заповедника, расположенного на границе средней и северной тайги.

В пределах группы Ic гаплотипы, относящиеся к подгруппе Ic1, встречались на Южном Урале (Южно-Уральский заповедник и гора Ирмель), Среднем Урале (окрестности г. Ревда), в Кировской области (пос. Черная Холуница), в Полярном Предуралье (окрестности г. Воркута). Примечательно, что в окрестностях г. Воркута и в пос. Черная Холуница обнаружен один и тот же гаплотип Magr11, хотя локалитеты удалены более чем на 1000 км. Базальным для подгруппы Ic1 является

гаплотип Magr23 (рис. 3), обнаруженный на Южном Урале на горе Ирмель. Подгруппа 1c2 объединяет гаплотипы с восточного склона Среднего Урала и с севера Западной Сибири; подгруппы 1c3 и 1c4 – гаплотипы Среднего и Южного Урала, обнаруженные на западном и восточном склонах.

Таким образом, наибольшее генетическое разнообразие *M. agrestis* прослеживается на Южном и Среднем Урале (рис. 5). По всей видимости, это связано с большим разнообразием доступных ландшафтов при контакте нескольких природных зон: на Среднем Урале прослеживается широтная зональность, на Южном – высотная поясность. Разнообразие ландшафтов и история их развития могли способствовать формированию более сложных путей расселения вида на Среднем и Южном Урале, по сравнению с Северным, и как следствие – более выраженной генетической дифференциации.

В то же время уровень дивергенции гаплотипов, встречающихся у *M. agrestis* на Урале, невысок. Степень дифференциации выделенных подгрупп несколько ниже, чем у других представителей подсемейства полеvoчьиx, обитающих на Северном, Среднем и Южном Урале, например *Clethrionomys glareolus* и *Cl. rutilus* [46, 47], а также *Microtus arvalis* кариоформы *obscurus* [19]. Это может объясняться недавней экспансией и недостаточно долгим для накопления генетических различий разобщением популяции пашенной полевки. Кроме того, высокая биотопическая мобильность вида [43] могла способствовать сохранению потока генов даже в условиях фрагментации местообитаний, в результате чего географические границы между подгруппами стираются, но продолжается накопление различий между ними.

Генетическая дифференциация *M. agrestis* в пределах Восточной клады, по-видимому, произошла в ходе расселения по территории ее современной области распространения, о чем свидетельствует сравнительный анализ межгрупповых дистанций, показавший более низкие значения

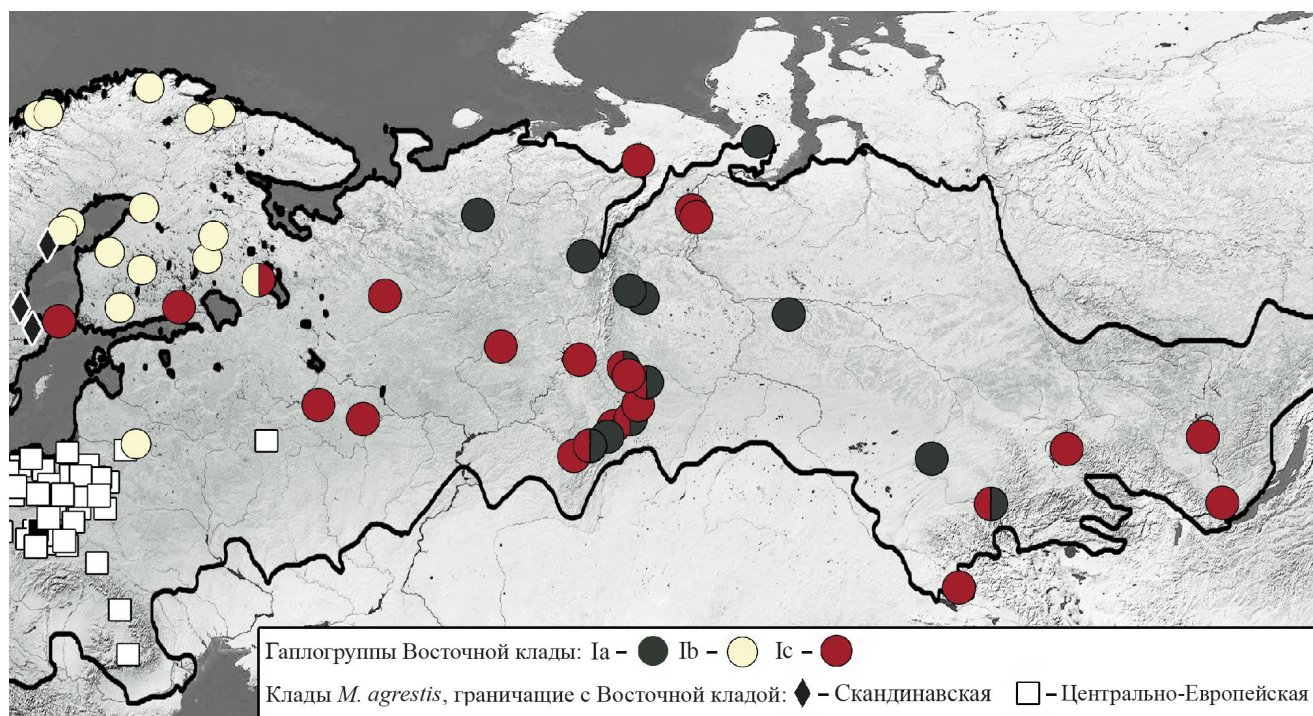


Рис. 4. Географическое положение гаплогрупп Восточной клады *M. agrestis*.

между гаплогруппами Восточной клады, чем между кладами (табл. 2). Наличие внутривидовой генетической дифференциации у мелких млекопитающих обычно связывают с климатическими изменениями позднего плейстоцена и голоцена.

Если согласиться с реконструированным по молекулярным часам временем дивергенции Восточной клады [9–10], то для территории Северной Евразии после позднего дриаса периоды похолодания, характеризовавшиеся сменой растительного

Таблица 3. Индексы генетического разнообразия и результаты тестов на селективную нейтральность для шести клад *M. agrestis* и трех гаплогрупп Восточной клады

| Клада, гаплогруппа | <i>N</i> | <i>N<sub>h</sub></i> | <i>h</i> ± <i>SD</i> | $\pi$ ± <i>SD</i> | <i>k</i> | <i>D</i> | <i>F<sub>s</sub></i> |
|--------------------|----------|----------------------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------------------|
| Клады              |          |                      |                      |                   |          |          |                      |
| I                  | 96       | 76                   | 0.993 ± 0.003        | 0.008 ± 0.004     | 8.96     | −2.14**  | −24.61****           |
| II                 | 127      | 90                   | 0.994 ± 0.002        | 0.009 ± 0.004     | 9.70     | −1.79*   | −24.42****           |
| III                | 32       | 26                   | 0.986 ± 0.012        | 0.007 ± 0.005     | 7.66     | −1.80*   | −14.51****           |
| IV                 | 112      | 71                   | 0.932 ± 0.021        | 0.007 ± 0.003     | 8.04     | −2.09**  | −24.70****           |
| V                  | 6        | 4                    | 0.800 ± 0.172        | 0.007 ± 0.004     | 7.47     | −0.33    | 1.97                 |
| VI                 | 133      | 81                   | 0.979 ± 0.006        | 0.006 ± 0.003     | 6.93     | −2.04**  | −24.84****           |
| Гаплогруппы        |          |                      |                      |                   |          |          |                      |
| Ia                 | 31       | 22                   | 0.976 ± 0.014        | 0.006 ± 0.003     | 7.03     | −1.58*   | −8.95***             |
| Ib                 | 22       | 22                   | 1.000 ± 0.014        | 0.006 ± 0.003     | 6.79     | −1.77*   | −18.86****           |
| Ic                 | 43       | 32                   | 0.979 ± 0.012        | 0.007 ± 0.004     | 7.72     | −2.04*   | −18.41****           |

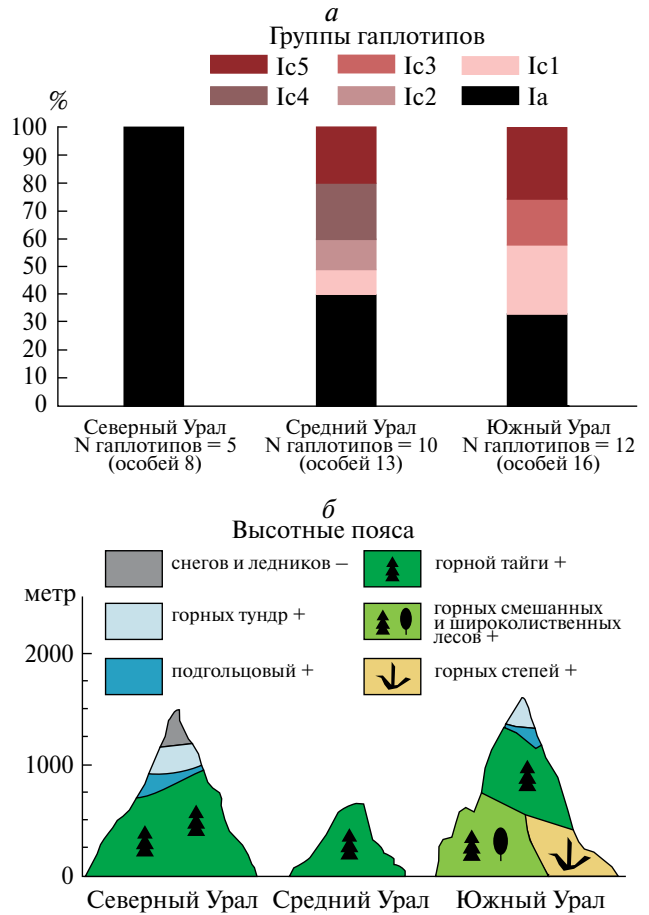
Примечание. I–VI – клады: Восточная, Центрально-Европейская, Скандинавская, Западно-Европейская, Французская, Северо-Британская соответственно; Ia–Ic – гаплогруппы Восточной клады; *N* – число особей; *N<sub>h</sub>* – число гаплотипов; *h* – гаплотипическое разнообразие;  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие; *k* – среднее число парных различий между гаплотипами; *SD* – стандартное отклонение; *D* – тест Таджимы на селективную нейтральность; *F<sub>s</sub>* – тест Фу на селективную нейтральность. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001; \*\*\*\**P* < 0.0001



покрова, документированы около 8 и 4 тыс. лет назад (cold event 8.2 k, 4.2 k [48, 49]). Изменение границ таежного биома могло приводить к трансформации местообитаний *M. agrestis*, по крайней мере, на отдельных территориях значительной области распространения Восточной клады. В то же время физико-географические особенности некоторых регионов могли способствовать выживанию изолированных популяций. В центральной части Северной Евразии такими регионами могли быть Северный, Средний и Южный сегменты Урала. Последующая экспансия в результате наступления благоприятных климатических условий привела к исчезновению возникших ранее изолятов и восстановлению непрерывной области распространения, а предшествовавшая фрагментация ареала отразилась на современной генетической структуре Восточной клады.

В то же время отсутствие перерывов в позднелайстоценовой и голоценовой ископаемой летописи *M. agrestis* на Урале подтверждено методами относительного датирования и радиоуглеродными датировками. Известно, как минимум, четыре находки на Среднем и Северном Урале в позднем дриасе [23, 26, 28] и подтверждено присутствие вида в фаунах Урала в течение последнего ледникового максимума [25]. Возможно, на особенности пространственного распределения *M. agrestis* в регионе влияли не только изменения климата, но и динамика региональных условий, например градиенты влажности. Для Южного, Среднего и Северного Урала показано изменение влажности местообитаний полевоцых, прослеживаемое по составу их экологических групп от позднего плейстоцена до современности [50]. Пашенная полевка относится к группе видов мезофитных местообитаний, упадок которых в неблагоприятные периоды наблюдался в различных сегментах Урала неодновременно. Так, на Южном Урале фиксируется резкое снижение встречаемости видов мезофитных местообитаний 17–16 тыс. лет назад, что соответствует раннему дриасу – холодному и сухому климатическому интервалу. Однако на Среднем Урале в это время пашенная полевка присутствует в ископаемых фаунах возрастом  $16400 \pm 165$  лет назад [28]. Можно предполагать, что трансформация местообитаний могла приводить не к полному исчезновению вида в регионе, а к его перераспределению в пространстве и постепенному замещению одних генетических групп другими.

В настоящее время в европейской и в азиатской частях ареала пашенной полевки остаются неисследованными территории, которые потенциально важны для верификации выдвигаемых нами гипотез. Так, включение в анализ данных из популяций, обитающих вблизи границ области распространения вида и на территориях, подвергавшихся наименьшим трансформациям ландшафта



**Рис. 5.** Группы гаплотипов, обнаруженные у *M. agrestis* в трех локалитетах Северного, пяти локалитетах Среднего и пяти локалитетах Южного Урала (а) и разнообразие ландшафтов (б), в которых рассматриваемый вид встречается (+) или не встречается (-) на Северном, Среднем и Южном Урале (на примере западного склона).

во время глобальных климатических изменений, может позволить с большей вероятностью оценить степень внутривидовой генетической дифференциации *M. agrestis* и вклада предыдущих волн экспансии в современное генетическое разнообразие вида. Перспективным для дальнейших исследований в этом направлении может стать анализ ядерной ДНК, который по сравнению с митохондриальными маркерами позволяет выявить более древние дивергенции, а также анализ палео-ДНК для определения генетической преемственности ископаемых и современных популяций в пределах области распространения вида.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование направлено на анализ генетического разнообразия самой широко распространённой и наименее изученной из

митохондриальных линий (Восточная клада) пашенной полевки, занимающей значительную территорию Палеарктики от Восточной и Северной Европы до оз. Байкал. Полученные результаты с включением данных из локалитетов Восточно-Европейской равнины, Урала, Западной и Восточной Сибири указывают на генетическую неоднородность линии, обусловленную, наиболее вероятно, недавними событиями в эволюционной истории вида, происходившими на территории центральной части Северной Евразии в течение позднего плейстоцена.

Современное внутривидовое генетическое разнообразие пашенной полевки в Уральском регионе формируется за счет гаплотипов одной клады – Восточной. По результатам филогенетической реконструкции эта клада является самой молодой. Наибольшее разнообразие гаплогрупп прослеживается на Южном и Среднем Урале, что, по-видимому, связано с большим, по сравнению с Северным Уралом, разнообразием доступных ландшафтов, формирующимся при контакте нескольких природных зон.

Сопоставление результатов анализа генетического разнообразия пашенной полевки на территории Урала с возрастом палеонтологических находок, свидетельствующим о непрерывной истории вида в регионе, по крайней мере с позднего плейстоцена, позволяет предположить, что трансформация местообитаний в результате климатических изменений позднего плейстоцена и голоцена могла приводить не к полному вымиранию вида на этих территориях, а к перераспределению его популяций в пространстве, в результате чего происходило постепенное замещение одних генетических групп другими.

Авторы выражают благодарность заведующему музеем ИЭРиЖ УрО РАН Н.Г. Ерохину за предоставленный материал; сотрудникам ИЭРиЖ УрО РАН: д.б.н. Л.Е. Лукьяновой, д.б.н., Е.В. Зиновьеву, к.б.н. С.В. Зыкову, С.В. Булычевой, А.Т. Галимову за помощь в отловах грызунов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-14-00332.)

Исследование одобрено Этическим комитетом Института экологии растений и животных УрО РАН 12 мая 2023 г., протокол №14.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Млекопитающие России: систематико-географический справочник. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2012. 604 с.
2. *Shenbrot G.I., Krasnov B.R.* An Atlas of the Geographic Distribution of the Arvicoline Rodents of the World (Rodentia, Muridae: Arvicolinae). Sofia & Moscow: Pensoft Publ., 2005. 336 p.
3. *Kryštufek B., Vohralík V., Zima J., Zagorodnyuk I.* *Microtus agrestis* (errata version published in 2017) // The IUCN Red List of Threatened Species. 2016. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T13426A22349665.en>
4. *Borodin A., Markova E., Zinovyev E. et al.* Quaternary rodent and insect faunas of the Urals and Western Siberia: connection between Europe and Asia // *Quat. Inter.* 2013. V. 284. P. 132–150. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2011.07.050>
5. *Jaarola M., Searle J.B.* A highly divergent mitochondrial DNA lineage of *Microtus agrestis* in southern Europe // *Heredity.* 2004. V. 92. P. 228–234.
6. *Paupério J., Herman J.S., Melo-Ferreira J. et al.* Cryptic speciation in the field vole: A multilocus approach confirms three highly divergent lineages in Eurasia // *Mol. Ecol.* 2012. V. 21. P. 6015–6032. <https://doi.org/10.1111/mec.12024>
7. *Herman J.S., Stojak J., Paupério J. et al.* Genetic variation in field voles (*Microtus agrestis*) from the British Isles: selective sweeps or population bottlenecks? // *Biol. J. Linn. Soc.* 2019. V. 126. № 4. P. 852–865. <https://doi.org/10.1093/biolinnea/bly213>
8. *Kryštufek B., Shenbrot G.I.* Voles and Lemmings (Arvicolinae) of the Palaearctic Region. Univ. Maribor: Univ. Press, 2022. 437 p.
9. *Herman J.S., Searle J.B.* Post-glacial partitioning of mitochondrial genetic variation in the field vole // *Proc. R. Soc. B.* 2011. V. 278. P. 3601–3607. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0321>
10. *Herman J.S., McDevitt A.D., Kawalko A. et al.* Land-bridge calibration of molecular clocks and the Post-Glacial colonization of Scandinavia by the eurasian field vole *Microtus agrestis* // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103949>
11. *Searle J.B., Kotlík P., Rambau R.V. et al.* The Celtic fringe of Britain: Insights from small mammal phylogeography // *Proc. R. Soc. B.* 2009. V. 276. P. 4287–4294. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1422>
12. *Beysard M., Perrin N., Jaarola M. et al.* Asymmetric and differential gene introgression at a contact zone between two highly divergent lineages of field voles (*Microtus agrestis*) // *J. Evol. Biol.* 2012. V. 25. P. 400–408. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02432.x>
13. *Stojak J., Borowik T., Górný M. et al.* Climatic influences on the genetic structure and distribution of the common vole and field vole in

- Europe // *Mammal. Res.* 2018. V. 64. P. 19–29. <https://doi.org/10.1007/s13364-018-0395-8>
14. *Stojak J., Tarnowska E.* Polish suture zone as the goblet of truth in post-glacial history of mammals in Europe // *Mammal. Res.* 2019. V. 64. P. 463–475. <https://doi.org/10.1007/s13364-019-00433-6>
  15. *Равкин Ю.С., Богомолова И.Н., Шубилин С.М. и др.* Пространственно-типологическая неоднородность населения мелких млекопитающих Западной Сибири (равнинная и горная территория) // *Сиб. экол. журн.* 2009. № 3. С. 475–487.
  16. *Zinovyev E.V., Gilev A.V., Khantemirov R.M.* Changes in the entomofauna of the southern Yamal Peninsula in connection with shifts of the northern timberline in the Holocene // *Entomological Revi.* 2001. V. 81. № 9. P. 1146–1152.
  17. *Haynes S., Jaarola M., Searle J.B.* Phylogeography of the common vole (*Microtus arvalis*) with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago // *Mol. Ecol.* 2003. V. 12. P. 951–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01795.x>
  18. *Brunhoff C., Galbreath K.E., Fedorov V.B. et al.* Hol-arctic phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*): Implications for late Quaternary biogeography of high latitudes // *Mol. Ecol.* 2003. V. 12. P. 957–968. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01796.x>
  19. *Сибиряков П.А., Товпинец Н.Н., Дунал Т.А. и др.* Филогеография обыкновенной полевки *Microtus arvalis* (Rodentia, Arvicolinae) формы obscurus: новые данные по изменчивости митохондриальной ДНК // *Генетика.* 2018. Т. 54. № 10. С. 1162–1176. <https://doi.org/10.1134/S0016675818100132>
  20. *Markova A.K., Puzachenko A.Yu., Glushankova N.I.* The Likhvin (=Holsteinian, =Hoxnian) small mammal faunas of Europe (MIS 11) with reference to the easternmost Likhvin small mammal locality Rybnaya Sloboda (Volga basin, Russia) // *Quat. Int.* 2022. V. 674-675. P.18–30. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2022.12.002>
  21. *Смирнов Н.Г., Большаков В.Н., Бородин А.В.* Плейстоценовые грызуны севера Западной Сибири. М.: Наука, 1986. 146 с.
  22. *Бородин А.В.* Полевки (Arvicolinae, Rodentia) Урала и Западной Сибири (эоплейстоцен–голоцен): Дис. ... док. биол. наук. Екатеринбург: ИЭРиЖ УрО РАН, 2012. 585 с.
  23. *Смирнов Н.Г.* Разнообразие мелких млекопитающих Северного Урала в позднем плейстоцене и голоцене // *Материалы и исследования по истории современной фауны Урала.* Екатеринбург: Екатеринбург, 1996. С. 39–83.
  24. *Kuzmina E.A., Smirnov N.G., Ulitko A.I.* New data on Late Pleistocene–Holocene small mammal communities from the Ural–Sakmara interfluvium, Southern Urals // *Quat. Int.* 2016. V. 420. P. 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2016.02.007>
  25. *Смирнов Н.Г., Большаков В.Н., Косинцев П.А. и др.* Историческая экология животных гор Южного Урала. Свердловск: УрО АН СССР, 1990. 224 с.
  26. *Смирнов Н.Г., Кузьмина Е.А., Коурова Т.П.* Новые данные о грызунах Северного Урала в позднеледниковье // *Биота Приуральской Субарктики в позднем плейстоцене и голоцене.* Екатеринбург: 1999, С. 68–77.
  27. *Смирнов Н.Г.* Мелкие млекопитающие Среднего Урала в позднем плейстоцене и голоцене. Екатеринбург: Наука, Уральское отд., 1993. 62 с.
  28. *Изварин Е.П.* Формирование фауны мелких растительноядных млекопитающих западного склона Среднего Урала в позднем плейстоцене и голоцене: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург: ИЭРиЖ УрО РАН, 2017. 20 с.
  29. *Фадеева Т.В., Смирнов Н.Г.* Мелкие млекопитающие Пермского Предуралья в позднем плейстоцене и голоцене. Екатеринбург: Голицынский, 2008. 172 с.
  30. *Jaarola M., Searle J.B.* Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 2613–2621. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01639.x>
  31. *Liu Sh., Jin W., Liu Y. et al.* Taxonomic position of Chinese voles of the tribe Arvicolini and the description of 2 new species from Xizang, China // *J. Mammal.* 2017. V. 98. № 1. P. 166–182. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw170>
  32. *Lisovsky A.A., Petrova T.V., Yatsentyuk S.P. et al.* Multilocus phylogeny and taxonomy of East Asian voles *Alexandromys* (Rodentia, Arvicolinae) // *Zool. Scr.* 2018. V. 47. № 1. P. 9–20. <https://doi.org/10.1111/zsc.12261>
  33. *Aljanabi S.M., Martinez I.* Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
  34. *Tougaard C., Brunet–Lecomte P., Fabre M., Montuire S.* Evolutionary history of two allopatric *Terricola* species (Arvicolinae, Rodentia) from molecular, morphological, and palaeontological data // *Biol. J. Linn. Soc.* 2008. V. 93. P. 309–323. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00926.x>
  35. *Hall T.A.* Bio-Edit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids Symp. Series.* 1999. V. 41. P. 95–98.
  36. *Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
  37. *Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P. et al.* MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic



- inference and model choice across a large model space // *Systematic Biol.* 2012. V. 61. P. 539–542.  
<https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
38. Nylander J.A.A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. 2004. Evolutionary Biology Centre, Uppsala Univ.
39. Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37–48.
40. Leigh J.W., Bryant D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction // *Methods Ecol. Evol.* 2015. V. 6. P. 1110–1116.  
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
41. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinformatics Online.* 2005. V. 1. P. 47–50.  
<https://doi.org/10.1177/117693430500100003>
42. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. P. 1451–1452.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
43. Бердюгин К.И., Большаков В.Н., Балахонов В.С. и др. Млекопитающие Полярного Урала. Екатеринбург: изд-во Уральского ун-та, 2007. 384 с.
44. Бобрецов А.В. Популяционная экология мелких млекопитающих равнинных и горных ландшафтов северо-востока Европейской части России. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2016. 381 с.
45. Кривцов В.А., Водорезов А.В. Физическая география и ландшафты России. Электронное учебное пособие. Рязань: Изд-во РГУ им. С.А. Есенина, 2016. 408 с.
46. Абрамсон Н.И., Родченкова Е.Н., Костызов А.Ю. Генетическая изменчивость и филогеография рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*, Arvicolinae, Rodentia) на территории России с анализом зоны интрогрессии мтДНК близкородственного вида красной полевки (*Cl. rutilus*) // *Генетика.* 2009. Т. 45. № 5. С. 610–623.  
<https://doi.org/10.1134/S1022795409050044>
47. Melnikova (Rodchenkova) E.N., Kshnyasev I.A., Bodrov S.Yu. et al. Sympatric area of *Myodes glareolus* and *M. rutilus* (Rodentia, Cricetidae): historic and recent hybridization // *Proc. Zool. Institute RAS.* 2012. V. 316. № 4. P. 307–323.
48. Kobashi T., Severinghaus J.P., Brook E.J. et al. Precise timing and characterization of abrupt climate change 8200 years ago from air trapped in polar ice // *Quat. Sci. Rev.* 2007. V. 26. № 9–10. P. 1212–1222.  
<https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2007.01.009>
49. Li C., Li Y.-X., Zheng Y. et al. A high-resolution pollen record from East China reveals large climate variability near the Northgrippian-Meghalayan boundary (around 4200 years ago) exerted societal influence // *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology.* 2018. V. 512. С. 156–165.  
<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2018.07.031>
50. Markova E.A., Strukova T.V., Borodin A.V. Can we infer humidity gradients across the Ural Mountains during the Late Quaternary using Arvicolinae rodents as an Environmental Proxy? // *Rus. J. Ecol.* 2022. V. 53. № 6. P. 485–499.  
<https://doi.org/10.1134/s1067413622060108>

## Genetic Diversity of the Field Vole *Microtus agrestis* (Arvicolinae, Rodentia) in the Central Part of Northern Eurasia According to the Cytochrome *b* Gene Data

L. E. Yalkovskaya<sup>1, \*</sup>, P. A. Sibiryakov<sup>2</sup>, M. A. Krohaleva<sup>1</sup>, E.A. Markova<sup>1</sup>,  
A.V. Borodin<sup>1</sup>, A. S. Borisov<sup>3</sup>, M. V. Chibiryak<sup>1</sup>, A.V. Bobretsov<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences,  
Ekaterinburg, 620144 Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Zoology Republic of Kazakhstan, Almaty, 050060 Republic of Kazakhstan*

<sup>3</sup>*Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and FarEast, Irkutsk, 664047 Russia*

<sup>4</sup>*Pechora-Ilych State Nature Reserve, Yaksha, Komi Republic, 169436 Russia*

\*e-mail: lida@ipae.uran.ru

An analysis of the genetic diversity of the field vole was carried out with the inclusion of new data on the complete sequences of the cytochrome *b* gene from the least studied area of the species range — the central part of Northern Eurasia (20 localities of the East European Plain, the Urals, Western and Eastern Siberia). The obtained results are generally consistent with modern view on the species phylogeography, but indicate the previously not investigated genetic heterogeneity of the Eastern clade, which occupies the entire Asian part of the species' range and its European part to Northern and Eastern Europe. The comparison of the genetic diversity analysis results with the age of paleontological findings, carried out using the Urals territory as the example, allows to assume that climatic changes in the late Pleistocene and Holocene could not lead to the complete extinction of the species in the region, but to the spatial redistribution of its populations and to the complete or partial replacement of some genetic groups by others.

**Keywords:** genetic differentiation, phylogeography, mitochondrial genome, evolutionary history, Arvicolini, Ural region.

УДК 575.224.22

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В БУККАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ И КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЛЕГКИХ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

© О. В. Сержантова<sup>1,2</sup>, А. Г. Новикова<sup>1,2</sup>, А. А. Михайлов<sup>1</sup>, И. П. Мошуров<sup>1</sup>, А. П. Гуреев<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup>Воронежский областной клинический онкологический диспансер, Воронеж, 394036 Россия

<sup>2</sup>Воронежский государственный университет, кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронеж, 394018 Россия

\*e-mail: gureev@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 04.10.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 11.01.2024 г.

Рак легких является одной из основных причин смерти от рака. Поиск новых методов ранней и точной диагностики рака легких имеет решающее значение для эффективного лечения. Мы показали, что у пациентов с раком легких в буккальном эпителии больше мутаций в генах *FLT3*, *PDGFRA*, *KDR*, *PIK3CA*, *HRAS*, *FGFR3*, чем у людей без диагностированного рака легких. Таким образом, изучение молекулярных изменений может быть использовано как метод точной диагностики рака легких на ранних стадиях исследования.

*Ключевые слова:* рак легкого, секвенирование, буккальный эпителий, мутационный профиль, ген.

DOI: 10.31857/S0016675824050053 EDN: CJMKTT

На сегодняшний день рак легкого занимает ведущую позицию (16.1%) в структуре онкозаболеваний по России. По данным на 2019 год в России у мужчин рак легкого опережает все остальные новообразования. Среди женского населения рак легкого занимает 10-е место (3.8%), уступая по частоте встречаемости раку кожи (кроме меланомы) (15.2%), раку молочной железы (21.2%), шейки матки (5%), тела матки (7.8%), яичников (4.1%), гемобластозам (4.7%), раку желудка (4.4%), ободочной кишки (7.3%), прямой кишки (4.4%) и прочим (9.8%). За 2019 г. заболеваемость раком легкого составила 47005 человек. Рак легких является одной из ведущих причин смертности от онкозаболеваний [1]. Абсолютное число умерших от данного заболевания по России в 2019 г. составило 50046 человек. Более 1/4 (25.5%) случаев смерти среди мужчин обусловлены раком легкого, бронхов и трахеи. Среди женщин смертность от рака легкого занимает 7.1%. Высокая смертность во многом обусловлена тем, что у 75% пациентов рак легких диагностируется на поздних стадиях, когда возможности лечения сильно ограничены [2]. Поиск новых методов ранней и точной диагностики рака легких имеет решающее значение для его эффективного лечения.

На данный момент наиболее распространены инвазивные технологии диагностики рака легкого, к которым относят в первую очередь

бронхоскопические исследования (brush-биопсия, бронхоальвеолярный лаваж и эндобронхиальная ультразвуковая биопсия) [3]. Однако инвазивность и необходимость в привлечении высококвалифицированного врача не дает возможности использовать данные методы для популяционного скрининга [4]. Неинвазивными методами можно анализировать мокроту и буккальный эпителий. Для диагностики рака легкого в мокроте анализируются клеточные аберрации с использованием цитологических методов, профили метилирования генов, соматические мутации, анализируют микроРНК [5]. Но зачастую исследователи сталкиваются с трудностями во время сбора мокроты. Обычно эти трудности возникают при работе с некурящими пациентами и людьми без воспалительных заболеваний дыхательных путей [6]. Буккальный эпителий, который располагается в ротовой полости гораздо более доступный объект исследования. Пациенты с раком легкого подвергают легкие и полость рта воздействию одних и тех же повреждающих факторов, к которым в первую очередь относятся канцерогены, содержащиеся в табачном дыме [7].

Было показано, что изменения профиля метилирования в бронхиальных тканях, вызванные курением, коррелируют с изменениями в метилировании в ткани ротовой полости [8]. У пациентов с раком легкого увеличивается цитогенетическая нестабильность, что проявляется в увеличении числа клеток с микроядрами, увеличивается частота

Таблица 1. Подробное описание экспериментальной и контрольной групп

| Параметр  | Контроль<br>(n = 9) | Рак легкого<br>(n = 20) |
|---|---------------------|-------------------------|
| Возраст (средний ± ст.отк.)   | 61.2 ± 8.7          | 46.7 ± 10.7             |
| Пол (муж./жен.)   | 0/9                 | 18/2                    |
| Статус курения (не курит/курил ранее/курит)   | 7/0/2               | 4/4/12                  |
| Количество пациентов с детектируемым H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> в КВВ  | 3                   | 14                      |
| Средняя концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> в КВВ (нмоль)  | 49.2 ± 25.9         | 506.7 ± 96.5            |
| Гистология  |                     |                         |
| Мелкоклеточный рак легкого  | –                   | 2                       |
| Плоскоклеточный рак легкого   | –                   | 1                       |
| Крупноклеточная карцинома   | –                   | 2                       |
| Аденокарцинома  | –                   | 15                      |
| Стадия (I/II/IIIА/IIIВ/IV)  | –                   | 0/3/6/8/3               |
| Первичная опухоль (T <sub>x</sub> /T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> /T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub> )               | –                   | 0/2/8/2/8               |
| Региональные лимфатические узлы (N <sub>x</sub> /N <sub>0</sub> /N <sub>1</sub> /N <sub>2</sub> /N <sub>3</sub> ) | –                   | 1/2/5/10/2              |
| Отдаленные метастазы (M <sub>x</sub> /M <sub>0</sub> /M <sub>1</sub> )  | –                   | 0/17/3                  |

полиморфизмов в генах *P53* и *murine double minute 2 (MDM2)* [9].

Цель данного исследования – изучить мутационный профиль клеток буккального эпителия пациентов с раком легкого в сравнении с буккальным эпителием контрольной группы (лиц без диагностированных злокачественных новообразований), а также с герминативными мутациями в крови пациентов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участниками исследования являлись пациенты Воронежского областного клинического онкологического диспансера с диагностированным раком легкого, которые не подвергались лечению на момент сбора биологического материала для исследования. В контрольную группу входили пациенты онкологического диспансера без диагностированного рака легкого или иных заболеваний дыхательных путей. Подробное описание параметров экспериментальной и контрольной групп представлено в табл. 1. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом Воронежского государственного университета и соответствовал основным положениям Хельсинкской декларации. От всех участников было получено информированное письменное согласие на включение в исследование. Все участники были проинформированы о последующих генетических исследованиях, проводимых с их биологическим материалом.

Сбор образцов буккального эпителия осуществлялся медицинским работником с помощью щетки FloqSwab и помещался в пробирку с консервирующим ДНК раствором (Helikon, Россия). Для сбора периферической крови медицинский

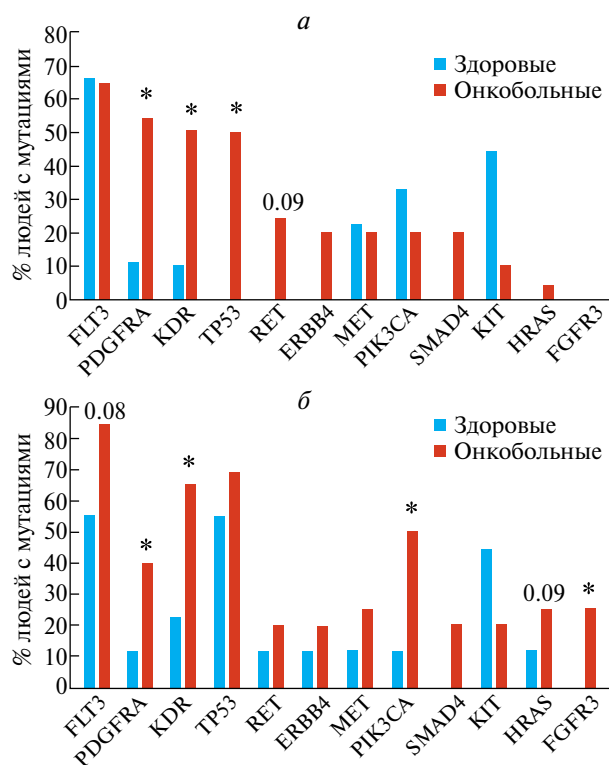
работник использовал вакуумные пробирки, покрытые гепарином.

Геномная ДНК была выделена из клеток буккального эпителия и крови с использованием набора Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, США) согласно прилагаемому протоколу. Качественный анализ изолированной ДНК осуществляли с помощью горизонтального электрофореза в 2%-ном агарозном геле в 1x TAE-буфере с окрашиванием бромистым этидием. Измерение концентрации ДНК проводили при помощи флуориметрической системы Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с прилагаемым протоколом.

Для последующего секвенирования проводилась таргетная амплификация с использованием панели праймеров AmpliSeq Cancer HotSpot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific, США) на платформе Ion Torrent PGM. Библиотеки для секвенирования готовили, используя набор реактивов Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Библиотеки были мультиплексированы с использованием уникальных баркодов из пула IonXpress.

Для идентификации полиморфизмов использовалось Ion Torrent Suite версии 5.10 и Torrent Variant Caller plugin версии 5.10.0.16. Все полиморфизмы с низким качеством прочтения и/или недостаточным покрытием были отфильтрованы. Аннотация полиморфизмов проводилась с использованием ENSEMBL Variant Effect Predictor версии 97. Для последующей обработки использовалось VCFtools версии 0.1.13.

Сравнение частот встречаемости мутантных вариантов гена и вариантов гена дикого типа проводили по критерию  $\chi^2$  Пирсона. Правильность



**Рис. 1.** Частота встречаемости мутаций в крови (а) и буккальном эпителии (б) здоровых людей и пациентов с раком легкого. \* –  $p < 0.05$ , различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона статистически достоверны.

распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилкса. Для оценки достоверности различий между группами использовался  $U$  критерий Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Мутационный профиль в крови

Наибольшее количество мутаций в крови было выявлено в гене *FLT3* (66.7% среди здоровых и 65% среди людей с раком легкого), а именно мутация rs2491231. Ген *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase 3) кодирует тирозинкиназу рецептора III класса, регулирующую кроветворение и играющую важную роль в выживании и пролиферации гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников.

### Мутационный профиль в крови и буккальном эпителии

Высокая мутабельность наблюдалась в гене *PDGFRA* (Platelet-derived growth factor receptor alpha) (55% у пациентов с раком легкого против 11.1% у здоровых людей,  $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона).

Наиболее часто в этом гене встречалась мутация rs1560480581. Данная мутация представляет собой однонуклеотидный полиморфизм. Ген *PDGFRA* кодирует рецептор тирозинкиназы клеточной поверхности для членов семейства факторов роста тромбоцитов. Эти факторы роста являются митогенами для клеток мезенхимального происхождения. Исследования показывают, что этот ген играет роль в развитии органов, заживлении ран и прогрессировании опухолей.

Также высокая мутабельность наблюдалась в гене *KDR* (50% у пациентов с раком легкого против 11.1% у здоровых людей,  $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Ген *KDR* (kinase insert domain receptor) кодирует один из двух рецепторов VEGF (фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является основным фактором роста эндотелиальных клеток). Этот рецептор, известный как рецептор домена вставки киназы, представляет собой рецепторную тирозинкиназу типа III. Он функционирует как главный медиатор VEGF-индуцированной пролиферации эндотелия, выживания, миграции, морфогенеза канальцев и прорастания.

У здоровых людей в крови не было обнаружено мутаций в генах *TP53* (tumor protein p53), *RET* (ret proto-oncogene), *ERBB4* (erb-b2 receptor tyrosine kinase 4), *SMAD4* (SMAD family member 4), *HRAS* (HRas proto-oncogene, GTPase), однако они были обнаружены у пациентов с раком легкого (50% для гена *TP53*,  $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона; 25% для гена *RET*,  $p = 0.09$  по  $\chi^2$  Пирсона; 20% для генов *ERBB4*, *SMAD4*, различий по  $\chi^2$  Пирсона не было выявлено; 5% для гена *HRAS*, различий по  $\chi^2$  Пирсона не было выявлено) (рис. 1).

Было выявлено, что в буккальном эпителии мутации в гене *FLT3*, встречаются у 85% пациентов с раком легкого, в то время как у контрольной группы только в 55.6% случаев ( $p = 0.08$  по  $\chi^2$  Пирсона). Мутации в гене *PDGFRA* встречаются у 40% пациентов с раком легкого и 11.1% людей из контрольной группы ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Мутации в гене *KDR* встречаются у 65% пациентов с раком легкого и 22.2% людей из контрольной группы ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Мутации в гене *PIK3CA* встречаются у 50% пациентов с раком легкого и у 11.1% людей из контрольной группы ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Мутации в гене *HRAS* встречаются у 25% пациентов с раком легкого и 11.1% людей из контрольной группы ( $p = 0.09$  по  $\chi^2$  Пирсона). У контрольной группы не было обнаружено мутаций в буккальном эпителии в гене *FGFR3*, в то время как 25% пациентов с раком легкого были выявлены мутации ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона).

Мы не выявили различий в частотах встречаемости мутаций в крови и буккальном эпителии пациентов в зависимости от стадии рака (табл. 2, 3). Также мы показали, что курение не влияет на

**Таблица 2.** Сравнение частот встречаемости мутаций в буккальном эпителии пациентов с раком легкого на разных стадиях. Различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона

| Ген           | II            |            | IIIА          |            | IIIВ          |            | IV            |            | Критерий Пирсона |
|---------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|------------------|
|               | дикий тип (%) | мутант (%) | дикий тип (%) | мутант (%) | дикий тип (%) | мутант (%) | дикий тип (%) | мутант (%) |                  |
| <i>ERBB4</i>  | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.16071         |
| <i>FLT3</i>   | 0 (0)         | 3 (100)    | 1 (16.7)      | 5 (83.3)   | 1 (12.5)      | 7 (87.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.71198         |
| <i>JAK3</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>KDR</i>    | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 1 (16.7)      | 5 (83.3)   | 3 (37.5)      | 5 (62.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.52520         |
| <i>MET</i>    | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 6 (75)        | 2 (25)     | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.72123         |
| <i>PDGFRA</i> | 0 (0)         | 3 (100)    | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 5 (62.5)      | 3 (37.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.27765         |
| <i>SMAD4</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.56595         |
| <i>TP53</i>   | 0 (0)         | 3 (100)    | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 3 (37.5)      | 5 (62.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.67132         |
| <i>CSF1R</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>FGFR1</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | С             | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>PIK3CA</i> | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 4 (50)        | 4 (50)     | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.72123         |
| <i>RET</i>    | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.16071         |
| <i>HRAS</i>   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.77439         |
| <i>FGFR3</i>  | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 6 (75)        | 2 (25)     | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.93092         |
| <i>KIT</i>    | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 6 (100)       | 0 (0)      | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.51412         |
| <i>ATM</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.15873         |
| <i>RB1</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 6 (100)       | 0 (0)      | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.66417         |
| <i>NRAS</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>EZH2</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.4303          |
| <i>KRAS</i>   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 6 (100)       | 0 (0)      | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.11333         |
| <i>STK11</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 6 (100)       | 0 (0)      | 8 (100)       | 0 (0)      | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.11333         |
| <i>IDH1</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>PTEN</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 6 (100)       | 0 (0)      | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.66417         |
| <i>EGFR</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 6 (100)       | 0 (0)      | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.66417         |
| <i>MLH1</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>FGFR2</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 6 (100)       | 0 (0)      | 6 (75)        | 2 (25)     | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.34303         |

**Таблица 3.** Сравнение частот встречаемости мутаций в крови пациентов с раком легкого на разных стадиях. Различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона

| Ген           | II            |            | IIIА          |            | IIIВ          |            | IV            |            | Критерий Пирсона |
|---------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|------------------|
|               | дикий тип (%) | мутант (%) | дикий тип (%) | мутант (%) | дикий тип (%) | мутант (%) | дикий тип (%) | мутант (%) |                  |
| <i>ERBB4</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.74104         |
| <i>FLT3</i>   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | 1 (16.7)      | 5 (83.3)   | 4 (50)        | 4 (50)     | 0 (0)         | 3 (100)    | <0.24807         |
| <i>KDR</i>    | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 5 (62.5)      | 3 (37.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.60771         |
| <i>MET</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.51412         |
| <i>PDGFRA</i> | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 5 (62.5)      | 3 (37.5)   | 1 (33.3)      | 2 (66.7)   | <0.64814         |
| <i>SMAD4</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.05756         |
| <i>TP53</i>   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | 2 (33.4)      | 4 (66.6)   | 5 (62.5)      | 3 (37.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.47681         |
| <i>CSF1R</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.11333         |
| <i>PIK3CA</i> | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.16071         |
| <i>RET</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 3 (50)        | 3 (50)     | 7 (87.5)      | 1 (12.5)   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)   | <0.19790         |
| <i>HRAS</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>KIT</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.41205         |
| <i>ATM</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.41205         |
| <i>RB1</i>    | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.34303         |
| <i>NRAS</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.66417         |
| <i>HNFIА</i>  | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.11333         |
| <i>IDH1</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |
| <i>PTEN</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.79677         |
| <i>GNAQ</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.11333         |
| <i>MLH1</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 4 (66.6)      | 2 (33.4)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.11333         |
| <i>GNAS</i>   | 3 (100)       | 0 (0)      | 5 (83.3)      | 1 (16.7)   | 8 (100)       | 0 (0)      | 3 (100)       | 0 (0)      | <0.48327         |

**Таблица 4.** Сравнение частот встречаемости мутаций в буккальном эпителии пациентов с раком легкого в зависимости от курения. Различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона.

| Ген           | Не курит      |            | Курил ранее   |            | Курит         |            | Критерий Пирсона |
|---------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|------------------|
|               | дикий тип (%) | мутант (%) | дикий тип (%) | мутант (%) | дикий тип (%) | мутант (%) |                  |
| <i>ERBB4</i>  | 4 (100)       | 0 (0)      | 2 (50)        | 2 (50)     | 10 (83.3)     | 2 (16.7)   | <0.18888         |
| <i>FLT3</i>   | 1 (25)        | 3 (75)     | 1 (25)        | 3 (75)     | 1 (8.3)       | 11 (91.7)  | <0.59281         |
| <i>JAK3</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 3 (75)        | 1 (25)     | 12 (100)      | 0 (0)      | <0.12181         |
| <i>KDR</i>    | 0 (0)         | 4 (100)    | 2 (50)        | 2 (50)     | 5 (41.6)      | 7 (58.4)   | <0.24859         |
| <i>MET</i>    | 3 (75)        | 1 (25)     | 2 (50)        | 2 (50)     | 10 (83.3)     | 2 (16.7)   | <0.41111         |
| <i>PDGFRA</i> | 1 (25)        | 3 (75)     | 1 (25)        | 3 (75)     | 6 (50)        | 6 (50)     | <0.53526         |
| <i>SMAD4</i>  | 3 (75)        | 1 (25)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 10 (83.3)     | 2 (16.7)   | <0.90108         |
| <i>TP53</i>   | 1 (25)        | 3 (75)     | 1 (25)        | 3 (75)     | 4 (33.4)      | 8 (64.6)   | <0.92370         |
| <i>CSF1R</i>  | 3 (75)        | 1 (25)     | 4 (100)       | 0 (0)      | 12 (100)      | 0 (0)      | <0.12181         |
| <i>FGFR1</i>  | 3 (75)        | 1 (25)     | 4 (100)       | 0 (0)      | 12 (100)      | 0 (0)      | <0.12181         |
| <i>PIK3CA</i> | 2 (50)        | 2 (50)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 5 (41.6)      | 7 (58.4)   | <0.51342         |
| <i>RET</i>    | 2 (50)        | 2 (50)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.18888         |
| <i>HRAS</i>   | 3 (75)        | 1 (25)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 9 (75)        | 3 (25)     | <1.0000          |
| <i>FGFR3</i>  | 3 (75)        | 1 (25)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 9 (75)        | 3 (25)     | <1.0000          |
| <i>KIT</i>    | 3 (75)        | 1 (25)     | 3 (75)        | 1 (25)     | 10 (83.3)     | 2 (16.7)   | <0.90108         |
| <i>ATM</i>    | 3 (75)        | 1 (25)     | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.47676         |
| <i>RB1</i>    | 3 (75)        | 1 (25)     | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>NRAS</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 12 (100)      | 0 (0)      | <0.12181         |
| <i>EZH2</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 10 (83.3)     | 2 (16.7)   | <0.47676         |
| <i>KRAS</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>STK11</i>  | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>IDH1</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>PTEN</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>EGFR</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>MLH1</i>   | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.70407         |
| <i>FGFR2</i>  | 4 (100)       | 0 (0)      | 4 (100)       | 0 (0)      | 11 (91.7)     | 1 (8.3)    | <0.47676         |

частоту встречаемости мутаций у пациентов с раком легкого (табл. 4).

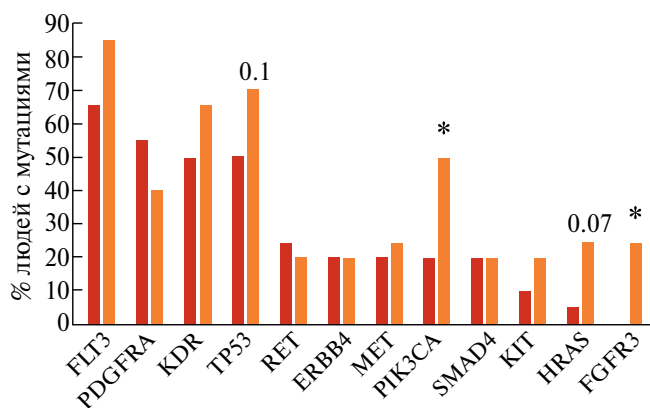
*Сравнение типов мутаций в крови и буккальном эпителии у пациентов с раком легкого*

В ходе анализа мутационного профиля в буккальном эпителии и крови у больных с диагностированным раком легкого мы выявили, что в клетках буккального эпителия содержится значительно больше мутаций в генах *FGFR3* (fibroblast growth factor receptor 3) и *PIK3CA* (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) по сравнению с кровью ( $p < 0.05$ ). Также в гене *HRAS* было выявлено большее количество мутаций в буккальном эпителии ( $p = 0.07652$ ). В гене *FGFR3* была обнаружена мутация rs7688609. В гене *PIK3CA* наиболее частой мутацией была rs3729674. Этот

однонуклеотидный полиморфизм расположен в интроне, ранее не был ассоциирован с раком легкого. В гене *HRAS* была выявлена мутация rs12628. Данный вариант расположен в кодоне 27 экзона 1.

В среднем у здоровых людей мутационная нагрузка в буккальном эпителии составила 22.2 мутации на одну мегабазу генома. У пациентов с диагностированным раком легких мутационная нагрузка в буккальном эпителии составила 36.5 мутаций на одну мегабазу генома. В крови здоровых людей мутационная нагрузка составила 15.6 мутаций на одну мегабазу генома, а у пациентов с раком легкого – 25.5 мутаций на одну мегабазу генома.

В 21.9% генов наблюдалось одинаковое количество мутаций в клетках буккального эпителия и крови у пациентов с диагностированным раком легкого. В 6.25% генов не было выявлено мутаций ни в буккальном эпителии, ни в крови у пациентов



**Рис. 2.** Частота встречаемости мутаций в крови и буккальном эпителии пациентов с раком легкого. \*  $p < 0.05$ , различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона статистически достоверны.

с диагностированным раком легкого (только у здоровых пациентов) (рис.2).

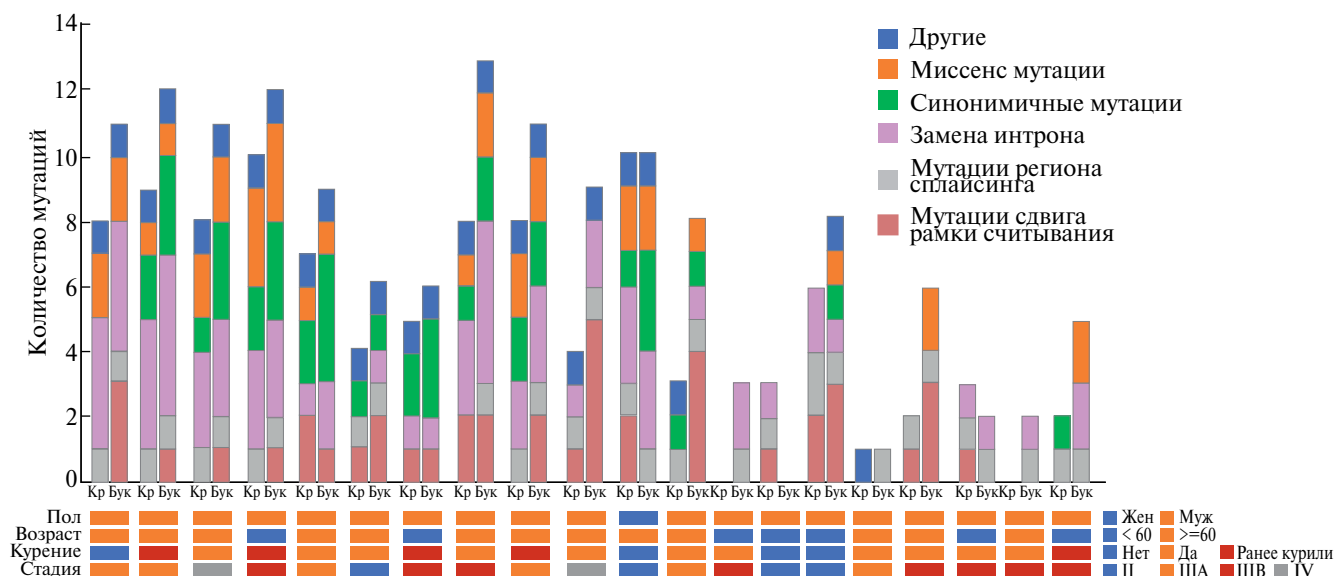
В ходе секвенирования исследуемого материала было обнаружено 98 полиморфизмов в 32 генах. 38 из 98 несинонимичных мутаций были обнаружены более чем у 1% индивидуумов. Большая часть мутаций встречается редко – 61.22% были обнаружены не более одного раза во всей выборке. Мы обнаружили, что 35% всех мутаций не были описаны ранее (не встречаются в базах данных dbSNP, COSMIC актуальных ревизий). Анализ мутационного ландшафта вариантов выявил, что 27.6% всех вариантов относятся к однонуклеотидным полиморфизмам, 37.7% – к инсерциям, 22.4% – к сдвигу

рамки считывания, 7.14% – к делециям, 6.6% – к многонуклеотидным полиморфизмам. Подробное описание всех типов выявленных мутаций представлено в табл. 5.

Было выявлено, что в буккальном эпителии содержится больше мутаций сдвига рамки считывания на 67.4% и синонимичных мутаций на 63.4%, чем в крови. Мутации типа миссенс, замена интрона, мутации региона сплайсинга и другие встречались одинаковое число раз в буккальном эпителии и крови у пациентов с диагностированным раком легкого. В группу “Другие” входили мутации типа мутации акцептора сплайсинга, мутация кодирующей последовательности/мутация донора сплайсинга/точечная мутация, мутация 3’-нетранслируемой области, мутации внутри рамки считывания (рис. 3).

### ОБСУЖДЕНИЯ

Молекулярный механизм патогенеза рака легкого – сложный процесс, в котором участвует множество молекул и вовлекаются все основные сигнальные пути, участвующие в канцерогенезе [10]. Ранее было показано, что мутации в 18 генах приводят к развитию аденокарциномы легкого. Наиболее часто мутировал ген *TP53* (46%). Мутации *KRAS* (33%) были взаимоисключающими с мутациями *EGFR* (14%). Другая группа генов, часто мутирующих, представлена *BRAF* (10%), *PIK3CA* (7%), *MET* (7%), *RT1*, и малыми ГТФзамами (2%). Группа генов-супрессоров опухолей, включая *STK11* (17%), *KEAP1* (17%), *NF1* (11%), *RB1* (4%) и *CDKN2A* (4%), также часто мутировала. Другая группа частых мутаций включает набор генов, модифицирующих



**Рис. 3.** Количество различных типов мутаций у пациентов с раком легкого в буккальном эпителии и крови.



Таблица 5. Подробное описание выявленных мутаций

| Ген          | Вариант мутации                      | Локализация          | Аллель | Последствия                               | Аберрация                    |
|--------------|--------------------------------------|----------------------|--------|---|------------------------------|
| <i>ERBB4</i> | rs839541                             | chr2:212812097_T/C   | C      | Замена интрона                            | Однонуклеотидный полиморфизм |
|              | Новая мутация<br>chr2:212576812_T/TC | chr2:212576812_T/TC  | C      | Мутация сдвига рамки считывания           | Инсерция                     |
|              | rs1356577968                         | chr2:212578395_GT/AG | AG     | Замена интрона                            | Замена                       |
|              | rs75580865                           | chr13:28602292_T/C   | C      | »   | Однонуклеотидный полиморфизм |
| <i>FLT3</i>  | rs2491231                            | chr13:28610183_A/G   | G      | Замена области сплайсинга, замена интрона | »                            |
|              | Новая мутация<br>chr13:28602279_C/CT | chr13:28602279_C/CT  | T      | Замена интрона                            | Инсерция                     |
|              | Новая мутация<br>chr13:28610146_A/AG | chr13:28610146_A/AG  | G      | Мутация сдвига рамки считывания           | »                            |
|              | Новая мутация<br>chr13:28608256_A/AG | chr13:28608256_A/AG  | G      | »   | »                            |
|              | Новая мутация<br>chr19:17945670_A/AG | chr19:17945670_A/AG  | G      | »   | »                            |
|              | rs3213409                            | chr19:17945696_C/T   | T      | Миссенс-мутация                           | Однонуклеотидный полиморфизм |
| <i>JAK3</i>  | rs373418967                          | chr19:17945674_A/AC  | C      | Мутация сдвига рамки считывания           | Инсерция                     |
|              | Новая мутация<br>chr4:55953804_T/TA  | chr4:55953804_T/TA   | A      | »   | »                            |
|              | rs7692791                            | chr4:55980239_C/T    | T      | Замена интрона                            | Однонуклеотидный полиморфизм |
|              | rs1870377                            | chr4:55972974_T/A    | A      | Миссенс-мутация                           | »                            |
| <i>KDR</i>   | rs157813263                          | chr4:55962545_T/TG   | G      | Замена интрона                            | Инсерция                     |
|              | Новая мутация<br>chr4:55979617_A/AC  | chr4:55979617_A/AC   | C      | Мутация сдвига рамки считывания           | »                            |
|              | rs10006115                           | chr4:55946354_G/T    | T      | Замена интрона                            | Однонуклеотидный полиморфизм |
|              | rs1342902707                         | chr4:55979575_G/GA   | A      | Мутация сдвига рамки считывания           | Инсерция                     |
|              | Новая мутация<br>chr4:55946134_TC/T  | chr4:55946134_TC/T   | -      | »   | Делеция                      |

|               |  |                                       |            |   |                              |
|---------------|--|---------------------------------------|------------|---|------------------------------|
| <i>MET</i>    | rs5985569  | chr7:116339642_G/T                    | T          | Миссенс-мутация   | Однонуклеотидный полиморфизм |
|               | rs35775721                                       | chr7:116339672_C/T                    | T          | Синонимичная мутация  | »                            |
|               | rs33917957                                       | chr7:116340262_A/G                    | G          | Миссенс-мутация   | »                            |
|               | Новая мутация<br>chr7:116403177_ТССССТGA/ТССССТG | chr7:116403177_ТССССТGA/ТССССТG       | ССССТG     | Мутация сдвига рамки считывания, мутация преждевременного завершения трансляции | Инсерция                     |
|               | rs1208881531                                     | chr7:116403215_A/AC                   | C          | Мутация сдвига рамки считывания   | замена                       |
|               | rs56391007                                       | chr7:116411990_C/T                    | T          | Миссенс-мутация   | Однонуклеотидный полиморфизм |
|               | Новая мутация<br>chr7:116403220_ТТССA/ТСС        | chr7:116403220_ТТССA/ТСС              | СС         | Мутация сдвига рамки считывания   | Инсерция                     |
|               | rs1794847963                                     | chr7:116411966_T/TA                   | A          | »   | »                            |
|               | rs1560480581                                     | chr4:55141051_G/T                     | G          | Делеция внутри рамки считывания   | »                            |
|               | rs2228230  | chr4:55152040_C/T                     | T          | Синонимичная мутация  | Однонуклеотидный полиморфизм |
| <i>PDGFRA</i> | rs1723633126                                     | chr4:55141050_AGCCSAGATGGACATGA/AA    |            | Делеция внутри рамки считывания   | Инсерция                     |
|               | rs948588   | chr18:48586344_C/T                    | T          | Замена интрона  | Однонуклеотидный полиморфизм |
| <i>SMAD4</i>  | rs374687785                                      | chr18:48584629_ТААААААТСТ/ТААААААТСТТ | ААААААТСТТ | »   | Инсерция                     |
|               | rs1042522  | chr17:7579472_G/C                     | C          | Миссенс-мутация   | Однонуклеотидный полиморфизм |
| <i>TP53</i>   | rs745751553                                      | chr17:7573940_T/TC                    | C          | Мутация сдвига рамки считывания   | Инсерция                     |
|               | rs587782423                                      | chr17:7579470_GG/CGC                  | CG         | »   | »                            |
|               | rs530941076                                      | chr17:7578191_AGGGCAC/AGGCAC          | AGGCAC0    | »   | »                            |
| <i>CSF1R</i>  | rs20666934                                       | chr5:149433596_TG/GA                  | GA         | »   | Изменение последовательности |
| <i>FGFR1</i>  | Новая мутация<br>chr8:38282247_C/CG              | chr8:38282247_C/CG                    | G          | Замена интрона  | Инсерция                     |

Таблица 5 (продолжение)

|        |   |  |               |                                 |                              |
|--------|---|--|---------------|---------------------------------|------------------------------|
|        | rs3729674   | chr3:178917005_A/G                                   | G             | »                               | Однонуклеотидный полиморфизм |
|        | rs761258531   | chr3:178927952                                       | TATTTTAAATTGT | »                               | Инсерция                     |
|        | rs2230461   | chr3:178927410_A/G                                   | G             | Миссенс-мутация                 | Однонуклеотидный полиморфизм |
|        | rs141098973   | chr3:178916856_AT/AA                                 | -             | Мутация сдвига рамки считывания | Изменение последовательности |
|        | rs200868796   | chr3:178916780 ACCCCCT/<br>ACCCCT                    | CCCCCT        | »                               | Инсерция                     |
| PIK3CA | Новая мутация<br>chr3:178927954<br>ATTTTCTTTGT/<br>ATTTTAAATTGT | chr3:178927954<br>ATTTTCTTTGT/<br>ATTTTAAATTGT       | TTTTTAAATTGT  | Замена интрона                  | »                            |
|        | Новая мутация<br>chr3:178947872_G/GC                            | chr3:178947872_G/GC                                  | C             | Мутация сдвига рамки считывания | »                            |
|        | Новая мутация<br>chr3:178938918_A/C                             | chr3:178938918_A/C                                   | C             | Миссенс-мутация                 | Однонуклеотидный полиморфизм |
|        | rs1553825421  | chr3:178947853_AT/AGT                                | GT            | Мутация сдвига рамки считывания | Изменение последовательности |
|        | rs761258531   | chr3:178927952<br>ATAATTTTCTTTGT/<br>ATAATTTTAAATTGT | TATTTTAAATTGT | Замена интрона                  | Инсерция                     |
| RET    | rs1800861   | chr10:43613843_G/T                                   | T             | Синонимичная мутация            | Однонуклеотидный полиморфизм |
|        | rs1800863   | chr10:43615633_C/G                                   | G             | »                               | »                            |
| HRAS   | rs12628   | chr11:534242_A/G                                     | G             | »                               | »                            |
| FGFR3  | rs7688609   | chr4:1807894_G/A                                     | A             | »                               | »                            |
|        | rs3822214   | chr4:55593464_A/C                                    | C             | Миссенс-мутация                 | »                            |
| KIT    | Новая мутация<br>chr4:55594270_G/A                              | chr4:55594270_G/A                                    | A             | »                               | »                            |
|        | rs55986963  | chr4:55593481_A/G                                    | G             | Синонимичная мутация            | »                            |
|        | Новая мутация<br>chr4:55597448_T/GC                             | chr4:55597448_T/GC                                   | C             | Замена интрона                  | Инсерция                     |

|      |  |                                  |          |  |                              |
|------|--|----------------------------------|----------|--|------------------------------|
| ATM  | Новая мутация<br>chr11:108119881_АТТТТТС/АТТТТТС/АТТТТТС | chr11:108119881_АГТТТТТС/АТТТТТС | ТТТТТС   | »  | »                            |
|      | rs1555068605   | chr11:108117845_СТGT/СТ          | Т        | Мутация сдвига рамки считывания                                | »                            |
|      | rs2227922  | chr11:108123551_С/Т              | Т        | Миссенс-мутация  | Однонуклеотидный полиморфизм |
|      | Новая мутация<br>chr11:108123524_СТТТТТГ/СТТТТТГ/СТТТТТГ | chr11:108123524_СТТТТТГ/СТТТТТГ  | ТТТТТТГТ | Замена интрона   | Инсерция                     |
|      | rs199885813  | chr11:108173695_С/СТ             | Т        | Мутация сдвига рамки считывания                                | »                            |
|      | rs1593455740   | chr13:48953841_С/Т               | Т        | Замена интрона   | Однонуклеотидный полиморфизм |
|      | Новая мутация<br>chr13:49037882_А/AG                     | chr13:49037882_А/AG              | G        | Мутация сдвига рамки считывания                                | Инсерция                     |
|      | rs1593529859   | chr13:49027123_А/AG              | G        | Замена интрона, мутация преждевременного завершения трансляции | »                            |
|      | Новая мутация<br>chr13:48942624_А/ААТ                    | chr13:48942624_А/ААТ             | АГ       | Замена интрона   | »                            |
|      | Новая мутация<br>chr13:48942657_А/АС                     | chr13:48942657_А/АС              | С        | Замена интрона, мутация преждевременного завершения трансляции | »                            |
| RB1  | rs1952727001   | chr13:48942697_С/CG              | G        | Мутация сдвига рамки считывания                                | »                            |
|      | Новая мутация<br>chr1:115256514_Г/GT                     | chr1:115256514_Г/GT              | Т        | »  | »                            |
|      | rs1246727247   | chr1:115256546_Т/TG              | G        | »  | »                            |
|      | rs1357368437   | chr1:115258732_СТ/C              | -        | »  | Делеция                      |
|      | Новая мутация<br>chr1:115252261_Т/TG                     | chr1:115252261_Т/TG              | G        | »  | Инсерция                     |
| NRAS |  |                                  |          |  |                              |
|      |  |                                  |          |  |                              |

Таблица 5 (окончание)

|       |                                    |  |   |   |                              |
|-------|------------------------------------|--|---|---|------------------------------|
| EZH2  | rs757534855                        | chr7:148508767_ТАААААТС/ТАААААТ  | ААААТ   | »   | »                            |
|       | Новая мутация chr7:148508744_АТ/А  | chr7:148508744_АТ/А  | А   | »   | »                            |
| HNF1A | Новая мутация chr12:121431456_G/GA | chr12:121431456_G/GA   | А   | »   | »                            |
|       | Новая мутация chr12:25378635_A/AC  | chr12:25378635_A/AC  | С   | »   | »                            |
| KRAS  | rs1034888250                       | chr19:1223052_A/АТ   | Т   | »   | »                            |
|       | Новая мутация chr10:123257991_GT/G | chr10:123257991_GT/G   | -   | Замена интрона  | Делеция                      |
| FGFR3 | rs755350933                        | chr10:123258032_A/АТ   | Т   | Мутация сдвига рамки считывания                                     | Инсерция                     |
|       | rs121909231                        | chr10:89720851_CCG/C   | G/T/C   | Мутация<br>прежвременного завершения трансляции                     | »                            |
| PTEN  | rs542808377                        | chr10:89717542_GT/G  | -   | Замена интрона  | Изменение последовательности |
|       | rs1589663424                       | chr10:89717710_GC/AG   | G   | Мутация сдвига рамки считывания                                     | Инсерция                     |
|       | rs786203847                        | chr10:8968269_GGTTTTTGGATCSAAAGCATAAAAA<br>CCATTACAAGATATACAA<br>TCT/AGTTTTTGGATTCA<br>AAGCATAAAAAACCCATTAC<br>AAGATATACAAATCT | AGTTTTTGGAGT<br>CAAAGCATAAAA<br>ACCATTACAAGA<br>TATACAAATCT | Мутация кодирующей последовательности, мутация акцептора сплайсинга | »                            |
|       | Новая мутация chr10:89717584_A/AC  | chr10:89717584_A/AC  | С   | Замена интрона  | »                            |
|       | rs746280047                        | chr10:89711920_T/TC  | С   | Мутация сдвига рамки считывания                                     | »                            |

|         |                                       |                                     |        |                                    |                                 |
|---------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------|------------------------------------|---------------------------------|
| CDH1    | rs1284989530                          | chr16:68835612_AГТТТТТС/<br>АГТТТТС | ТТТТТС | »                                  | »                               |
|         | Новая мутация<br>chr16:68835648_A/AG  | chr16:68835648_A/AG                 | G      | »                                  | »                               |
| IDH1    | rs11554137                            | chr2:209113192_G/A                  | A      | Синонимичная мутация               | Однонуклеотидный<br>полиморфизм |
|         | rs780642190                           | chr2:209113151_CG/C                 | C      | Мутация сдвига<br>рамки считывания | Инсерция                        |
| GNAS    | rs113203829                           | chr20:57484635_G/GC                 | C      | Мутация донора<br>сплайсинга       | »                               |
| SMARCB1 | Новая мутация<br>chr22:24133993_СТ/ТС | chr22:24133993_СТ/ТС                | ТС     | Миссенс-мутация                    | Изменение<br>последовательности |
|         | Новая мутация<br>chr3:37067294_AAC/A  | chr3:37067294_AAC/A                 | -      | Мутация сдвига<br>рамки считывания | Делеция                         |
| MLH1    | Новая мутация<br>chr3:37067310_GC/G   | chr3:37067310_GC/G                  | -      | »                                  | Изменение<br>последовательности |
|         | Новая мутация<br>chr9:80409384_Т/ТС   | chr9:80409384_Т/ТС                  | C      | »                                  | Инсерция                        |
| GNAQ    | rs1587919422                          | chr9:80409384_Т/ТС                  | G      | »                                  | »                               |
|         | rs201720393                           | chr7:55249192_CGGGGAG/<br>CGGGA     | GGGA   | Замена интрона                     | »                               |
| EGFR    | rs1281578598                          | chr7:55233008_Т/ТС                  | C      | Мутация сдвига<br>рамки считывания | »                               |
|         | Новая мутация<br>chr10:123257991_GT/G | chr10:123257991_GT/G                | -      | Замена интрона                     | Делеция                         |
| FGFR2   | rs755350933                           | chr10:123258032_A/AT                | T      | Мутация сдвига<br>рамки считывания | Инсерция                        |

хроматин, таких как *SETD2* (9%), *ARID1A* (7%) и *SMARCA4* (6%), а также два гена сплайсинга РНК *RBM10* (8%) и *U2AF1* (3%). Мутации гена *MGA* наблюдаются у 8% пациентов [11]. Также наблюдалось изменение числа копий генов *NKX2-1*, *TERT*, *MDM2*, *KRAS*, *EGFR*, *MET*, *CCNE1*, *CCND1*, *TERC* и *MECOM* [12]. Анализ aberrантных транскриптов РНК обнаружил слияния с участием *ALK*, *ROS1* и *RET*. Пропуск экзона 14 *MET* в РНК приводит к стабилизации белка MET и активации. Общий обзор мутационного статуса 230 пациентов с аденокарциномой показал, что 62% из них демонстрируют активирующие мутации в известных онкогенах-драйверах (такие как мутации *EGFR*, *KRES*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1* и слияния *RET*), у остальных 38% пациентов не было видимой мутации онкогена *RTK / RAS / RAF*. Однако тщательный анализ показал, что мутации *TP53*, *KEAP1*, *NF1* и *RIT1* обогащены онкоген-негативной группой аденокарцином легких. Ключевым изменениям при аденокарциноме легких подвергались следующие биохимические пути: путь *RTK / RAS / RAF* (76%), путь *PI3K-mTOR* (25%), путь p53 (63%), клеточный цикл (64%), сплайсинг хроматина и РНК (22%) [13]. Важно отметить, что показатель активации MAPK выше среди аденокарцином легких с мутантным *KRAS*, но он также присутствует среди аденокарцином *KRAS WT*. Путь *mTOR* может быть активирован в аденокарциномах легких посредством трех различных молекулярных механизмов: мутации *PI3KCA*, мутации *STK11*, связанной или не связанной с низкими уровнями *LKB1* [14].

Важно отметить, что наблюдались некоторые заметные различия в частоте возникновения некоторых онкогенных мутаций в аденокарциномах легких у пациентов разного этнического происхождения [15]. Таким образом, жители Восточной Азии демонстрируют более высокий уровень мутаций *EGFR* и более низкий уровень мутаций *KRAS*, чем европейские популяции. Эти различия существенно влияют на ведение аденокарциномы легких на уровне региональных онкологических центров и на дизайн клинических испытаний в разных странах. Среди пациентов из Восточной Азии наиболее часто мутировали гены *EGFR* (46.7%), *TP53* (21.2%), *ALK* (12.1%, из которых 8.8% мутации и 3.3% реаранжировки), *KRAS* (9.8%), *EZH2* (9.4%), *ERBB2* (5.5%), *STK11* (3.1%), *PDGFRA* (2.7%), *NF1* (2.7%) и *ERBB4* (2.4%) [16].

В 2013 г. было проведено всестороннее исследование генетических аномалий, встречающихся в плоскоклеточном раке легкого, в контексте проекта Атлас генома рака, обеспечивающего фундаментальное комплексное исследование аномалий числа копий ДНК, соматических экзонных мутаций, секвенирования мРНК, экспрессии мРНК и метилирования промотора, анализа микроРНК и секвенирования всего генома. Результаты этого

комплексного анализа предоставили всестороннюю картину геномных и эпигеномных изменений при плоскоклеточном раке легкого [17]. Наиболее заметными результатами этого анализа были следующие: 1) было обнаружено, что 10 генов часто мутировали, и они включают *TP53* (мутировавший примерно в 90% случаев), *CDKN2A* (15%), *PTEN* (8%), *PIK3CA* (16%), *KEAP1* (12%), *MLL2* (20%), *HLA-A* (3%, мутации с потерей функции), *NFE2L2* (15%), *NOTCH1* (8%, усекающие мутации, по-видимому связанные с потерей функции), *RBI* (7%); 2) многие из частых соматических мутаций, обнаруживаемых в плоскоклеточном раке легкого, являются движущими силами важных путей, участвующих в инициации опухоли или в прогрессии опухоли. Реакция на окислительный стресс изменяется в 34% случаев через мутации *KEAP1*, *CUL3* и *NFE2L2*; гены дифференцировки клеток (*SOX2*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *TP63*, *FOXP1*) изменены в 44% образцов; гены клеточного цикла, такие как *CDKN2A* и *RBI*, в — 72% опухолей [18], гены пути *PI3K* в — 47% опухолей. Также были опубликованы данные о мутационном спектре плоскоклеточного рака легкого у пациентов из Восточной Азии, демонстрирующем паттерн, аналогичный наблюдаемому в европейских популяциях. Наблюдались следующие частоты повторных мутаций генов: *TP53* (73%), *MLL2* (24%), *NFE2L2* (17%), *RBI* (15%), *PTEN* (11%), *KEAP1* (16%), *PI3KCA* (9%), *CD117* (13%), *NF1* (12%), *SWI / SNF* (15%), *NOTCH* (15%). Частые изменения числа копий наблюдались на уровне: *SOX2* (79%), *PI3KCA* (77%), *TP63* (75%), *FGFR1* (31%), *CDKN2A* (38%), *PDGFRA* (18%), *PTEN* (31%) [19].

Ранее был установлен ряд мутаций, возникающих при немелкоклеточном раке легкого. Основными молекулярными особенностями этих опухолей являлись мутации в генах *EGFR* (31.6%), *KRAS* (10.5%), *AKT1* (2–6%), мутации вставки *ERBB2* (1.3%), мутации *PI3KCA* (1.3%), слияния генов *ALK* (5.3%) и слияния *KIF5B-RETR* (4%); *BRAF*-мутации не обнаружены. Мутационные профили и клинико-патологические особенности немелкоклеточного рака легкого очень похожи на таковые у низкодифференцированных аденокарцином [20].

При мелкоклеточном раке легкого основную роль играют инактивирующие мутации *TP53* и *RBI*. Другая группа повторяющихся мутаций встречается на уровне трех генов: *CREBBP*, *EP300* и *MLL*, которые кодируют модификаторы гистонов: учитывая глобальную частоту геномных изменений этих трех гистон-модифицирующих ферментов, становится очевидным, что они представляют второй по частоте мутации класс генов при мелкоклеточном раке легкого. Другая группа мутаций касается трех генов-супрессоров опухолей: *PTEN*, *SLIT2* и *EPHA7*. Мутации *MYC* часто встречаются при мелкоклеточном раке легкого. Эти мутации включают

несколько генов семейства *MYC*, таких как *MYC*, *MYCL1* и *MYCN* [21].

В проведенном настоящем исследовании мы выяснили, что мутационный профиль в крови и клетках буккального эпителия схож с азиатской популяцией (разница в том, что в азиатской популяции при раке легкого преобладают мутации гена *EGFR*, а в нашем исследовании — *KDR*), и практически полностью отличается от европейской за исключением основных протоонкогенов, например *TP53*) [22].

Нами было установлено, что у пациентов с раком легкого в буккальном эпителии больше мутаций в генах *FLT3*, *PDGFRA*, *KDR*, *PIK3CA*, *HRAS*, *FGFR3*, чем у лиц без диагностированного рака легкого. Более того, мы показали, что у пациентов с раком легкого мутаций в буккальном эпителии на 44% больше, чем в крови. В 50% генов, в которых были обнаружены мутации, их количество в буккальном эпителии было выше, чем в крови. При этом статистически достоверные различия были показаны для генов *FGFR3* и *PIK3CA* ( $p < 0.05$ ). Для гена *HRAS*  $p = 0.07652$ . В 25% генов наблюдалось одинаковое количество мутаций в клетках буккального эпителия и крови у пациентов с диагностированным раком легкого. Также в 25% генов было обнаружено больше мутаций в крови, чем в буккальном эпителии, но данные варианты встречались единично — одна мутация была выявлена у одного пациента.

Наибольшее количество мутаций наблюдается в генах, кодирующих рецепторные тирозинкиназы: *KDR*, *FLT3*, *FGFR3*, *PDGFRA*. Установлено, что рецепторные тирозинкиназы являются ключевыми регуляторами нормальных клеточных процессов и играют критическую роль в развитии и прогрессировании многих типов злокачественных опухолей. Мутации в генах, кодирующих рецепторные тирозинкиназы, приводят к активации сигнальных каскадов, вызывая изменение экспрессии белка и пролиферацию клеток. [23].

Ген *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase 3) кодирует тирозинкиназу рецептора III класса, регулирующую кроветворение, и играет важную роль в выживании и пролиферации гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников. Ранее не было показано, что мутации в этом гене ассоциированы с развитием рака легкого, однако установлено, что они могут приводить к конститутивной активации этого рецептора тирозинкиназы и развитию острого миелоидного и лимфобластного лейкозов [24]. Мутация rs2491231, обнаруженная нами в этом гене, также ранее не была ассоциирована с раком легкого, но она была обнаружена при тройном негативном раке молочной железы [25].

Были обнаружены мутации в гене *PDGFRA*, который кодирует рецептор тирозинкиназы клеточной поверхности для членов семейства факторов

роста тромбоцитов. Исследования показывают, что этот ген играет роль в развитии органов, заживлении ран и прогрессировании опухолей. Мутации в этом гене связаны с идиопатическим гиперэозинофильным синдромом, соматическими и семейными опухолями стромы желудочно-кишечного тракта и множеством других видов рака, в том числе и рака легкого [26]. Однако обнаруженная нами мутация rs1560480581 ранее не была ассоциирована с раком легкого.

Высокая мутабельность наблюдалась в гене *KDR*, который кодирует один из двух рецепторов VEGF. Мутации этого гена вовлечены в инфантильные капиллярные гемангиомы [27]. Мутация rs7692791, которую мы обнаружили у пациентов с раком легкого, встречается при раке желудка [28], почечно-клеточной карциноме [29] и некоторых других патологиях [30], но ранее эта мутация не была ассоциирована с раком легкого. В гене *FGFR3* была обнаружена мутация rs7688609. Данный однонуклеотидный полиморфизм расположен в экзоне 13 гена *FGFR3* и не был ранее ассоциирован с раком легкого, однако он был обнаружен при некоторых других онкозаболеваниях, таких как аденокарцинома краниофарингиома [31], опухоль яичек [32] и плоскоклеточный рак пищевода [33]. В гене *PIK3CA* наиболее частой мутацией была rs3729674. Этот однонуклеотидный полиморфизм расположен в интроне, ранее он не был ассоциирован с раком легкого. В гене *HRAS* была выявлена мутация rs12628. Данный вариант расположен в кодоне 27 экзона 1. Ранее он не был ассоциирован с раком легкого, но был обнаружен при таких видах рака как меланома [34] и папиллярная карцинома щитовидной железы [35].

Считается, что мутации в гене *TP53* являются причиной рака легкого [36]. Ген-супрессор опухоли *TP53* в целом часто мутирует при раке человека. Аномалия гена *TP53* является одним из наиболее значимых событий при раке легких и играет важную роль в онкогенезе эпителиальных клеток легких [37]. Действительно, мы не выявили у здоровых людей в крови мутаций в гене *TP53*, однако они были обнаружены у пациентов с раком легкого (50%,  $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Статистически значимых различий по частоте встречаемости мутаций в гене *TP53* в буккальном эпителии не было выявлено. Однако у пациентов с раком легкого мутации в гене *TP53* в буккальном эпителии встречаются чаще, чем в крови (но различия статистически недостоверны,  $p = 0.1$ , различия частот встречаемости по  $\chi^2$  Пирсона) (рис. 2).

Наиболее подвержен мутациям в буккальном эпителии ген *PIK3CA*. В крови пациентов с раком легкого мутации в гене *PIK3CA* встречаются даже реже, чем у здоровых людей (20% против 33%). При этом в буккальном эпителии мутации в гене *PIK3CA* встречаются у 50% пациентов с раком легкого



и у 11.1% людей из контрольной группы ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). В некоторых исследованиях была установлена взаимосвязь между плоскоклеточным раком легкого и мутациями в гене *PIK3CA* [38]. Установлено, что мутации в гене *PIK3CA* также обнаружены при таких типах рака легкого как сквамозно-клеточная карцинома (8.9%) и аденокарцинома (2.9%). Наиболее частой мутацией *PIK3CA* был экзон 9 E545K. Рак легких с мутацией *PIK3CA* часто развивается у пациентов с предшествующими злокачественными новообразованиями [39].

Мы не обнаружили мутаций в гене *FGFR3* в крови здоровых людей и пациентов с раком легкого (рис. 1). Также не было обнаружено мутаций в гене *FGFR3* в буккальном эпителии здоровых людей, но они были обнаружены у 25% пациентов с раком легкого ( $p < 0.05$  по  $\chi^2$  Пирсона). Ранее было установлено, что мутации в гене *FGFR3* способствуют росту клеток при раке легкого. Это связано с тем, что гены семейства *FGFR* участвуют в регуляции множества биологических процессов, включая восстановление тканей, ангиогенез, пролиферацию, дифференцировку, миграцию и выживание клеток [40]. Повышенная экспрессия *FGFR3* указывает на неблагоприятный прогноз для людей с аденокарциномой легких и способствует увеличению метастатического потенциала клеток аденокарциномы легких [41].

В настоящей работе мы показали, что у пациентов с раком легкого увеличивается количество мутаций сдвига рамки считывания в буккальном эпителии, которые возникают, как правило, при увеличении уровня окислительного стресса. Мутации сдвига рамки считывания являются наиболее опасными мутациями, которые приводят к неправильной трансляции белка, а следовательно, к аномальному синтезу белковых продуктов с неправильной аминокислотной последовательностью [42]. Наибольшее количество соматических мутаций в буккальном эпителии пациентов с раком легкого наблюдается в генах *PIK3CA* и *FGFR3*. Наиболее мутабельными оказались гены, которые кодируют рецепторные тирозинкиназы. В совокупности эти данные подтверждают предположение о том, что ротовая полость является “молекулярным зеркалом рака легкого” [7].

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания университетам в сфере научной деятельности на 2020–2022 гг. (проект FZGU-2020-0044).

Исследование одобрено Этическим комитетом Воронежского государственного университета (протокол 42-03 от 8 октября 2020 г.).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального

комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все обследованные – совершеннолетние.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России 2020. 252 с.
2. Wadowska K., Bil-Lula I., Trembecki Ł., Śliwińska-Mossoń M. Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 13. <https://doi.org/10.3390/ijms21134569>
3. Rodionov E.O., Tuzikov S.A., Miller S.V. et al. Methods for early detection of lung cancer (review) // Sib. J. Oncology. 2020. V. 19. № 4. P. 112–122. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-4-112-122>
4. Nanavaty P., Alvarez M.S., Alberts W.M. Lung cancer screening: advantages, controversies, and applications // Cancer Control. 2014. V. 21. № 1. P. 9–14. <https://doi.org/10.1177/107327481402100102>
5. Hubers A.J., Prinsen C.F., Sozzi G. et al. Molecular sputum analysis for the diagnosis of lung cancer // Br. J. Cancer. 2013. V. 109. № 3. P. 530–537. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.393>
6. Ganeev A.A., Gubal A.R., Lukyano G.N. et al. Analysis of exhaled air for early-stage diagnosis of lung cancer: opportunities and challenges // Russ. Chemical Reviews. 2017. V. 87. № 9. P. 904–921. <https://doi.org/10.1070/RCR4831>
7. Sidransky D. The oral cavity as a molecular mirror of lung carcinogenesis // Cancer Prev. Res. (Phila). 2008. V. 1. № 1. P. 12–14. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0093>
8. Bhutani N., Burns D.M., Blay H.M. DNA Demethylation dynamics // Cell. 2011. V. 146. № 6. P. 866–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.042>
9. Kömerik N., Yüce E., Calapoğlu N.S. et al. Oral mucosa and lung cancer: Are genetic changes in the oral epithelium associated with lung cancer? // Nigerian J. Clin. Practice. 2017. V. 20. № 1. P. 12–18. <https://doi.org/10.4103/1119-3077.181396>
10. Shtivelman E., Hensing T., Simon G.R. et al. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer // Oncotarget. 2014. V. 5. № 6. P. 1392–1433. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1891>
11. Collisson E.A., Campbell J.D., Brooks A.N. et al. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma // Nature. 2014. V. 511. P. 543–550. <https://doi.org/10.1038/nature13385>

12. *Imielinski M., Berger A.H., Hammerman P.S. et al.* Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing // *Cell*. 2012. V. 150. № 6. P. 1107–1120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.029>
13. *Rodgers K.* Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma // *Nature*. 2018. V. 559. № 7715. <https://doi.org/10.1038/s41586018-0228-6>
14. *Levy M.A., Lovly C.M., Pao W.* Translating genomic information into clinical medicine: lung cancer as a paradigm // *Genome Res*. 2012. V. 22. № 11. P. 2101–2108. <https://doi.org/10.1101/gr.131128.111>
15. *Drilon A., Wang L., Arcila M.E. et al.* Broad, hybrid capture-based next-generation sequencing identifies actionable genomic alterations in lung adenocarcinomas otherwise negative for such alterations by other genomic testing approaches // *Clin. Cancer Res*. 2015. V. 21. № 16. P. 3631–3639. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2683>
16. *Liu L., Liu J., Shao D. et al.* Comprehensive genomic profiling of lung cancer using a validated panel to explore therapeutic targets in East Asian patients // *Cancer Sci*. 2017. V. 108. № 12. P. 2487–2494. <https://doi.org/10.1111/cas.13410>
17. *Rooney M., Devarakonda S., Govindan R.* Genomics of squamous cell lung cancer // *Oncologist*. 2013. V. 18. № 6. P. 707–716. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0063>
18. *Rodgers K.* Cancer genome atlas research network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers // *Nature*. 2012. V. 489. № 7417. P. 519–525. <https://doi.org/10.1038/nature11404>
19. *Kim Y., Hammerman P.S., Kim J. et al.* Integrative and comparative genomic analysis of lung squamous cell carcinomas in East Asian patients // *J. Clin. Oncol*. 2014. V. 32. № 2. P. 121–128. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.8556>
20. *Wang R., Pan Y., Li C. et al.* Analysis of major known driver mutations and prognosis in resected adenosquamous lung carcinomas // *J. Thorac. Oncol*. 2014. V. 9. № 6. P. 760–768. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182a406d1>
21. *Voortman J., Lee J.H., Killian J.K. et al.* Array comparative genomic hybridization-based characterization of genetic alterations in pulmonary neuroendocrine tumors // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2010. V. 107. № 29. P. 13040–13045. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008132107>
22. *Imielinski M., Berger A.H., Hammerman P.S. et al.* Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing // *Cell*. 2012. V. 150. № 6. P. 1107–1120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.029>
23. *Zwick E., Bange J., Ullrich A.* Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies // *Endocrine-Related Cancer J*. 2001. V. 8. № 3. P. 161–173. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0080161>
24. *Small D.* FLT3 mutations: biology and treatment // *Hematology*. 2006. V. 1. P. 178–184. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.178>
25. *Uscanga-Perales G.I., Santuario-Facio S.K., Sanchez-Dominguez C.N. et al.* Genetic alterations of triple negative breast cancer (TNBC) in women from Northeastern Mexico // *Oncol. Lett*. 2019. V. 17. № 3. P. 3581–3588. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9984>
26. *Guo M., Tomoshige K., Meister M. et al.* Gene signature driving invasive mucinous adenocarcinoma of the lung // *EMBO Mol. Med*. 2017. V. 9. № 4. P. 462–481. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606711>
27. *Qiu Z., Ye B., Wang K. et al.* Unique genetic characteristics and clinical prognosis of female patients with lung cancer harboring RET fusion gene // *Sci. Rep*. 2020. V. 10. № 10387. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66883-0>
28. *Zhuo Y.J., Shi Y., Wu T.* NRP-1 and KDR polymorphisms are associated with survival time in patients with advanced gastric cancer // *Oncol. Lett*. 2019. V. 18. № 5. P. 4629–4638. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10842>
29. *Cebrián A., Gómez Del Pulgar T., Méndez-Vidal M.J. et al.* Functional PTGS2 polymorphism-based models as novel predictive markers in metastatic renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib // *Sci. Rep*. 2017. V. 7. № 41371. <https://doi.org/10.1038/srep41371>
30. *O'Brien T.J., Harralson A.F., Tran T. et al.* Kinase insert domain receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR) genetic variation is associated with ovarian hyperstimulation syndrome // *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2014. V. 12. № 36. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-36>
31. *Jastania R.A., Saeed M., Al-Khalidi H. et al.* Adamantinomatous craniopharyngioma in an adult: A case report with NGS analysis // *Int. Med. Case Rep. J*. 2020. V. 13. P. 123–137. <https://doi.org/10.2147/IMCRJ.S243405>
32. *Goriely A., Hansen R.M., Taylor I.B. et al.* Activating mutations in FGFR3 and HRAS reveal a shared genetic origin for congenital disorders and testicular tumors // *Nat. Genet*. 2009. V. 41. № 11. P. 1247–1252. <https://doi.org/10.1038/ng.470>
33. *Рахимова С.Е., Саматкызы Д., Кожамкулов У.А. и др.* Опыт применения панели для секвенирования следующего поколения AmpliSeq Cancer HotSpot v.2 у казахстанских пациентов с плоскоклеточным раком пищевода // *Вестник Казахского Нац. Мед. Ун-та*. 2020. № 3. С. 76–80.
34. *Tomei S., Adams S., Uccellini L. et al.* Association between HRAS rs12628 and rs112587690 polymorphisms with the risk of melanoma in the North American population // *Med. Oncol*. 2012. V. 29. № 5. P. 3456–3461. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0255-3>
35. *Jin M., Li Z., Sun Y. et al.* Association analysis between the interaction of RAS family genes mutations and papillary thyroid carcinoma in the Han Chinese population // *Int. J. Med. Sci*. 2021. V. 18. № 2.

- P. 441–447.  
<https://doi.org/10.7150/ijms.50026>
36. *Testa U., Castelli G., Pelosi E.* Lung cancers: Molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells // *Cancers (Basel)*. 2018. V. 10. № 8.  
<https://doi.org/10.3390/cancers10080248>
  37. *Mogi A., Kuwano H.* TP53 Mutations in nonsmall cell lung cancer // *J. Biomedicine and Biotechnology*. 2011. V. 2011. № 583929.  
<https://doi.org/10.1155/2011/583929>
  38. *Tao D., Han X., Zhang N. et al.* Genetic alteration profiling of patients with resected squamous cell lung carcinomas // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 24. P. 36590–36601.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.9096>
  39. *Scheffler M., Bos M., Gardizi M. et al.* PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): Genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 2. P. 1315–1326.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2834>
  40. *Beenken A., Mohammadi M.* The FGF family: biology, pathophysiology and therapy // *Nat. Reviews. Drug Discovery*. 2013. V. 8. № 3. P. 235–253.  
<https://doi.org/10.1038/nrd2792>
  41. *Jing P., Zhao N., Xie N. et al.* miR-24-3p/FGFR3 signaling as a novel axis is involved in epithelial-mesenchymal transition and regulates lung adenocarcinoma progression // *J. Immunol. Res.* 2018. V. 2018. № 2834109.  
<https://doi.org/10.1155/2018/2834109>
  42. *Gasche C., Chang C.L., Rhee J. et al.* Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells // *Cancer Research*. 2001. V. 61. P. 7444–7448.

## Comparative Analysis of Mutation in the Buccal Epithelium and Blood in Patients with Lung Cancer and Healthy People

**O.V. Serzhantova<sup>1,2</sup>, A.G. Novikova<sup>1,2</sup>, A.A. Mikhailov<sup>1</sup>, I.P. Moshurov<sup>1</sup>, A. P. Gureev<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>*Voronezh Regional Clinical Oncological Dispensary, Voronezh, 394036 Russia*

<sup>2</sup>*Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia*

*\*e-mail: gureev@bio.vsu.ru*

Lung cancer is one of the leading causes of cancer death. Finding new methods for the early and accurate diagnosis of lung cancer is critical for effective treatment. We have shown that patients with lung cancer have more mutations in the *FLT3*, *PDGFRA*, *KDR*, *PIK3CA*, *HRAS*, *FGFR3* genes in the buccal epithelium than people without diagnosed lung cancer. Thus, study of molecular alterations may be used as a method for the accurate diagnosis of lung cancer in the early stages of investigational procedure.

**Keywords:** lung cancer; sequencin, buccal epithelium, mutation profile, gene.

УДК 575:599.9

## ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК: *HOTAIR*, *GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*, *TUG1*

© А. М. Бурдённый<sup>1,\*</sup>, С. С. Лукина<sup>1</sup>, Л.А. Урошлев<sup>2</sup>, Е. А. Филиппова<sup>1</sup>, И. В. Пронина<sup>1</sup>, М. В. Фридман<sup>2</sup>, К. И. Жордания<sup>3</sup>, Т. П. Казубская<sup>3</sup>, Н. Е. Кушлинский<sup>3</sup>, В. И. Логинов<sup>1,4</sup>,  
Э. А. Брага<sup>1,4,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

<sup>2</sup>Институт общей генетики им. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии

им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения России, Москва, 115478 Россия

<sup>4</sup>Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

\*e-mail: burdennyu@gmail.com

\*\*e-mail: eleonora10\_45@mail.ru

Поступила в редакцию 20.10.2023 г.

После доработки 04.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

В последнее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о роли длинных некодирующих РНК (днРНК) в регуляции биологических процессов в клетке, а также в механизмах развития и прогрессии рака. Аберрантное метилирование промоторных участков, как белковых генов, так и генов днРНК, может нарушать их экспрессию и функциональную активность. С применением биоинформатических баз данных отобрано шесть генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*), имеющих CpG-островки, дифференциально экспрессируемых и предположительно гиперметилируемых в опухолях больных раком яичников (РЯ). На выборке из 93 образцов больных РЯ методом метил-специфичной ПЦР в реальном времени показано статистически значимое ( $p < 0.05$ ) повышение уровня метилирования в опухолях; причем, для генов *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1* гиперметиличование при РЯ выявлено впервые. Для пяти генов (кроме *SNHG17*) показано дальнейшее повышение уровня метилирования на более тяжелой стадии, и для четырех генов (кроме *SNHG17* и *LINC00886*) показана значимая связь с метастазированием. С применением ОТ-ПЦР в реальном времени показано дифференциальное изменение уровня экспрессии генов *GAS5*, *HOTAIR*, *SNHG17* и *TUG1* и значимая корреляция метилирования с экспрессией для гена *GAS5*. Таким образом, для шести генов днРНК обнаружено гиперметиличование, ассоциированное с прогрессией и/или развитием РЯ, что важно для выяснения эпигенетических процессов, вовлеченных в патогенез РЯ, и может быть использовано в качестве новых биомаркеров РЯ.

Ключевые слова: гены длинных некодирующих РНК, *HOTAIR*, *GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17*, *TUG1*, аберрантное метилирование, рак яичников.

DOI: 10.31857/S0016675824050063 EDN: CJJFFC

Рак яичников (РЯ) относится к наиболее поздно выявляемым видам рака, поскольку он развивается бессимптомно вплоть до тяжелых стадий с обширным метастазированием и устойчивостью к химиотерапии, что приводит к неблагоприятному исходу [1,2]. Изучение факторов, участвующих в развитии и прогрессии РЯ, необходимо для разработки и налаживания своевременной диагностики этого вида рака.

В последние два десятилетия установлена важная роль некодирующих РНК в регуляции

экспрессии генов и сигнальных путей в онкогенезе [3]. Некодирующие РНК (нкРНК) можно условно классифицировать по длине: короткие (20–200 нуклеотидов) и длинные (примерно от 200 до десятков тысяч нуклеотидов) [4]. Среди коротких РНК наиболее изучены микроРНК, для которых установлена ключевая роль в регуляции экспрессии генов [5]. В последние годы выяснилось, что длинные нкРНК (днРНК) также играют важную роль в регуляции генов, в том числе в опухолях [6, 7]. С применением технологий секвенирования нового

поколения было доказано, что большинство геномных последовательностей транскрибируются в виде днРНК, число которых больше 100 тысяч (см. <http://www.noncode.org> и <http://www.lncrnadb.org/>), что превышает количество известных кодирующих белок генов и идентифицированных микроРНК человека [8]. Хотя исследованных и аннотированных днРНК пока значительно меньше, чем микроРНК и мРНК.

Аберрантное метилирование промоторных CpG-островков рассматривается как одна из первичных и глубинных эпигенетических модификаций генов и геномов в развитии и прогрессии рака. Показано, что гены днРНК могут регулироваться посредством метилирования, как и гены, кодирующие белки и микроРНК, в частности в опухолях [9, 10]. На данный момент имеются только единичные работы, выявляющие гиперметилирование генов днРНК в опухолях больных РЯ, однако, из этих работ следует, что гиперметилирование играет критическую роль в дерегуляции супрессорных и других функций ряда днРНК: MEG3, HAND2-AS1, ZNF667-AS1 и др. [11–14].

Цель данной работы – определить изменение уровня метилирования группы генов днРНК в опухолях больных РЯ и оценить возможную связь этих изменений с развитием и прогрессией РЯ. Для этого нами был проведен отбор группы генов днРНК, имеющих CpG-островки, согласно базам данных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, <http://www.urogene.org/methprimer2/>). В исследование были включены шесть генов днРНК: *GAS5* (Growth Arrest Specific 5), *HOTAIR* (HOX Antisense Intergenic RNA), *LINC00472* (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 472), *LINC00886* (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 886), *SNHG17* (Small Nucleolar RNA Host Gene 17), *TUG1* (Taurine-Upregulated Gene 1). Отбор этих генов днРНК был основан на биоинформатическом анализе данных бисульфитного секвенирования ДНК из базы NCBI's Gene Expression Omnibus (NCBI GEO), а также базы данных GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) об изменении уровней экспрессии этих генов при эпителиальном раке яичников.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С использованием сервера NCBI's Gene Expression Omnibus (NCBI GEO, a public archive and resource for gene expression data) отобраны наборы данных полногеномного бисульфитного секвенирования для генома рака яичников. Использовали две библиотеки данных с порядковыми номерами GEO Number: GSE146556 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE146555>), GSE81228 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE81228>), включавшие суммарно данные

для 33 (6 и 27) пациенток [15, 16]. Далее, с использованием языка программирования R, отбирали гиперметилированные гены, для которых более 70% наборов бисульфитных прочтений показали метилирование, а в контрольных образцах – не более 20%. После этого все отобранные гены разделялись по типу продукта на мРНК, микроРНК и днРНК. Разбиение проводилось с помощью программы Grep, которая входит в состав стандартного дистрибутива Linux (<https://linux.die.net/man/1/grep>). Применен GEO Accession viewer. Таблицы для мРНК и микроРНК далее не рассматривались.

В экспериментальном исследовании использовали 93 образца первичных опухолей, 75 образцов парной гистологически неизменной ткани. 37 первичных опухолей были взяты от пациенток без метастазов, 56 – от больных с метастазами. Клинико-морфологические характеристики 93 образцов первичных опухолей представлены в табл. 1.

Анализ уровня метилирования генов днРНК проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени. Использован набор реактивов “qPCRmix-HS SYBR” по протоколу фирмы “Евроген”. Амплификацию проводили в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Полноту конверсии ДНК определяли с помощью контрольного локуса *ACTB* с использованием олигонуклеотидов, специфичных к неконвертированной матрице [14]. Для сравнительного анализа эффективности амплификации также применялся локус *ACTB* с использованием олигонуклеотидов, специфичных к конвертированной матрице [14]. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР для генов днРНК приведены в табл. 2. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (“Promega”, США). В качестве позитивного контроля 100%-го метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 (“Thermo Fisher Scientific”).

Выделение РНК и получение кДНК проводили по методам, описанным ранее [17]. Анализ уровня экспрессии четырех днРНК выполнен методом количественной ПЦР в реальном времени в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по методу  $\Delta\Delta Ct$  [18]. Изменения уровня днРНК менее чем в два раза ( $|\Delta\Delta Ct| \leq 2$ ) рассматривали как отсутствие изменений. Праймеры для анализа уровня четырех днРНК и контрольного гена *B2M* приведены в табл. 3. Наличие и размер продуктов ПЦР проверяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле с

**Таблица 1.** Клинические и гистологические характеристики 93 образцов первичных опухолей больных РЯ

| Клинико-гистологический параметр     |   | N = 93   |
|--------------------------------------|---|----------|
| Гистологический тип                  | серозная аденокарцинома                                       | 67       |
|                                      | эндометриоидная аденокарцинома                                | 12       |
|                                      | другие гистологические типы                                   | 14       |
| Стадия                               | I   | 24       |
|                                      | II  | 18       |
|                                      | III   | 50       |
|                                      | IV  | 1        |
| Размеры и распространенность опухоли | T1  | 24       |
|                                      | T2  | 18       |
|                                      | T3  | 51       |
| Метастазирование                     | ЕСТЬ  | 56       |
|                                      | НЕТ   | 37       |
|                                      | N1  | 14       |
|                                      | M1  | 3        |
|                                      | метастазирование в большой сальник<br>диссеминация по брюшине | 42<br>38 |

**Таблица 2.** Нуклеотидные последовательности праймеров и условия МС-ПЦР

| Ген днРНК        | M/U | Последовательности праймеров          | Длина, пн, темп. отж., °С |
|------------------|-----|---------------------------------------|---------------------------|
| <i>GAS5</i>      | M   | MF: CGTTATCGTCGGTATTGGAGGGG           | 185, 60                   |
|                  |     | MR: CGCCCGACGCCTTATCCC                |                           |
|                  | U   | UF: TGTTATTGTTGGTATTGGAGGGGTGAG       | 179, 60                   |
|                  |     | UR: CAACACCTTATCCCCATCTTCTCCA         |                           |
| <i>HOTAIR</i>    | M   | MF: CGGGTTTTTATTTTTTCGTTATTGCG        | 258, 54                   |
|                  |     | MR: CGACTACTCTCGCCAAATTTCACTACTTC     |                           |
|                  | U   | UF: TGGGTTTTTATTTTTTGTTATTGTGTTATTTG  | 258, 52                   |
|                  |     | UR: CAACTACTCTCACCAAATTTCACTACTTCACAC |                           |
| <i>LINC00472</i> | M   | MF: AAGGCGTTTTAAGTCGAGGGTA            | 224, 60                   |
|                  |     | MR: AACGACTCCGACAACACACC              |                           |
|                  | U   | UF: AAGGTGTTTTAAGTTGAGGGTAAAG         | 228, 59                   |
|                  |     | UR: AACAACTCCAACAACACACCCAC           |                           |
| <i>LINC00886</i> | M   | MF: CGTGCGATCGTAGTTCGGTAGGTTA         | 172, 60                   |
|                  |     | MR: CGCCGAATTACGCGACGAAA              |                           |
|                  | U   | UF: CGTGCGATCGTAGTTCGGTAGGTTA         | 181; 60                   |
|                  |     | UR: CCTCACCAAATTACACAACAAAATCAACAC    |                           |
| <i>SNHG17</i>    | M   | MF: GCGCGAAACGAGCGTA                  | 168, 59                   |
|                  |     | MR: CGACGCCCTAACGTGCGAATA             |                           |
|                  | U   | UF: TTGGTGTGAAATGAGTGTA               | 170, 57                   |
|                  |     | UR: CAACACCCTAACATCAAATAACA           |                           |
| <i>TUG1</i>      | M   | MF: CGGGTTTCGGTTTCGTGGTC              | 199, 60                   |
|                  |     | MR: CGACGAAAACGACAACAACACATAATT       |                           |
|                  | U   | UF: TGGTTTTTAAGGATTGGATTGAGGGTAG      | 159, 60                   |
|                  |     | UR: CAACAACAACAAAACAACAACAACACATAAT   |                           |

Примечание. MF/UF – прямые праймеры к метилированному/неметилированному аллелю, MR/UR – обратные праймеры к метилированному/неметилированному аллелю. Олигонуклеотиды подобраны с использованием базы данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> и программы <http://www.urogene.org/methprimer2/> с проверкой в программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании DNASTAR (США). Для контрольного локуса ACTB использованы олигонуклеотиды из работы [14].

**Таблица 3.** Праймеры, условия ПЦР и размеры продукта ПЦР для 4 днРНК и контрольного гена

| РНК           | Последовательность праймеров                             | $T_{отж}$ , °C | Размер, н.о. |
|---------------|--|----------------|--------------|
| <i>GAS5</i>   | F: GAGCAAGCCTAACTCAAGCC<br>R: TCAAGCCGACTCTCCATACCC      | 60             | 157          |
| <i>HOTAIR</i> | F: CAGTGGGGAACTCTGACTCG<br>R: GTGCCTGGTGCTCTCTTACC       | 60             | 94           |
| <i>SNHG17</i> | F: GGGATCTGGGTTTGCTGATATT<br>R: GTAGCCTCACTCTCCATTCTCT   | 62             | 89           |
| <i>TUG1</i>   | F: GTGCAGAAGCCCAGAGTAAA<br>R: CCACGGTGGTAAAGGAAGATAG     | 62             | 152          |
| <i>B2M</i>    | F: TGACTTTGTACAGCCCAAGATAG<br>R: CAAATGCGGCATCTTCAAACCTC | 62             | 81           |

Примечание. Праймеры подбирали в программе Beacon Designer (Premier Biosoft International) и с использованием PrimerSelect, Lasergene (<http://www.dnastar.com/t-primerselect.aspx>).

окрашиванием интеркалирующим красителем бромидом этидия.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 22 и в программной среде R. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический *U* тест Манна–Уитни для независимых выборок. Данные выражали в виде медианы, нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей. Корреляции между изменениями уровней метилирования и экспрессии оценивались с применением коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Биоинформатический анализ базы данных GEO, направленный на отбор гиперметилируемых генов днРНК*

При анализе базы данных GEO, входящей в среду NCBI (NCBI's Gene Expression Omnibus, a public archive and resource for gene expression data), была поставлена задача отбора гиперметилируемых в опухолях яичников генов днРНК. Анализ данных полногеномного бисульфитного секвенирования ДНК из ткани яичника позволил определить несколько наборов генов днРНК, содержащих 2177 генов днРНК (библиотека GSE146556) и 3716 генов днРНК (библиотека GSE81228) [15, 16]. В результате удалось отобрать пять предположительно

гиперметилированных при РЯ генов: *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17*, *TUG1*. В исследование дополнительно включен ген *GAS5*, для которого ранее на выборке из 40 образцов РЯ нами были получены предварительные данные о его возможном частичном метилировании [14].

Затем, с помощью ресурса GEPIA2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis [19]), был проведен анализ дифференциальной экспрессии 6 отобранных генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*). В результате анализа было показано, что для наиболее распространенного гистологического подтипа РЯ (серозной цистаденокарциномы яичника) характерно значительное снижение уровня экспрессии *GAS5* и *TUG1*, малозначимое снижение экспрессии *HOTAIR* и *LINC00472*, а также малозначимое повышение экспрессии *LINC00886* и *SNHG17*. Отмеченное снижение уровня экспрессии для генов *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *TUG1* указывало на возможную роль гиперметилирования в подавлении экспрессии данных генов, что характерно для генов-супрессоров в опухолях.

### *Изменения уровня метилирования шести генов днРНК в опухолях больных РЯ*

По результатам МС-ПЦР проведен анализ уровня метилирования шести генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*) в 93 образцах первичных опухолей и 75 образцах парной гистологически неизменной ткани. С применением непараметрического критерия

Манна–Уитни проведено сравнение уровня метилирования шести генов днРНК в образцах первичных опухолей и гистологически неизменной ткани. Статистически значимое ( $p < 0.05$ ) повышение уровня метилирования наблюдается для всех 6 исследованных генов днРНК (рис. 1). Причем, для четырех генов (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00886* и *TUG1*) показано многократное (в 3–10 раз) и высоко значимое ( $p < 0.001$ ) повышение уровня метилирования в первичных опухолях РЯ в сравнении с условной нормой. Повышение уровней метилирования двух других генов (в 1.5–2 раза) также статистически значимо: *LINC00472* ( $p = 0.016$ ) *SNHG17* ( $p = 0.005$ ).

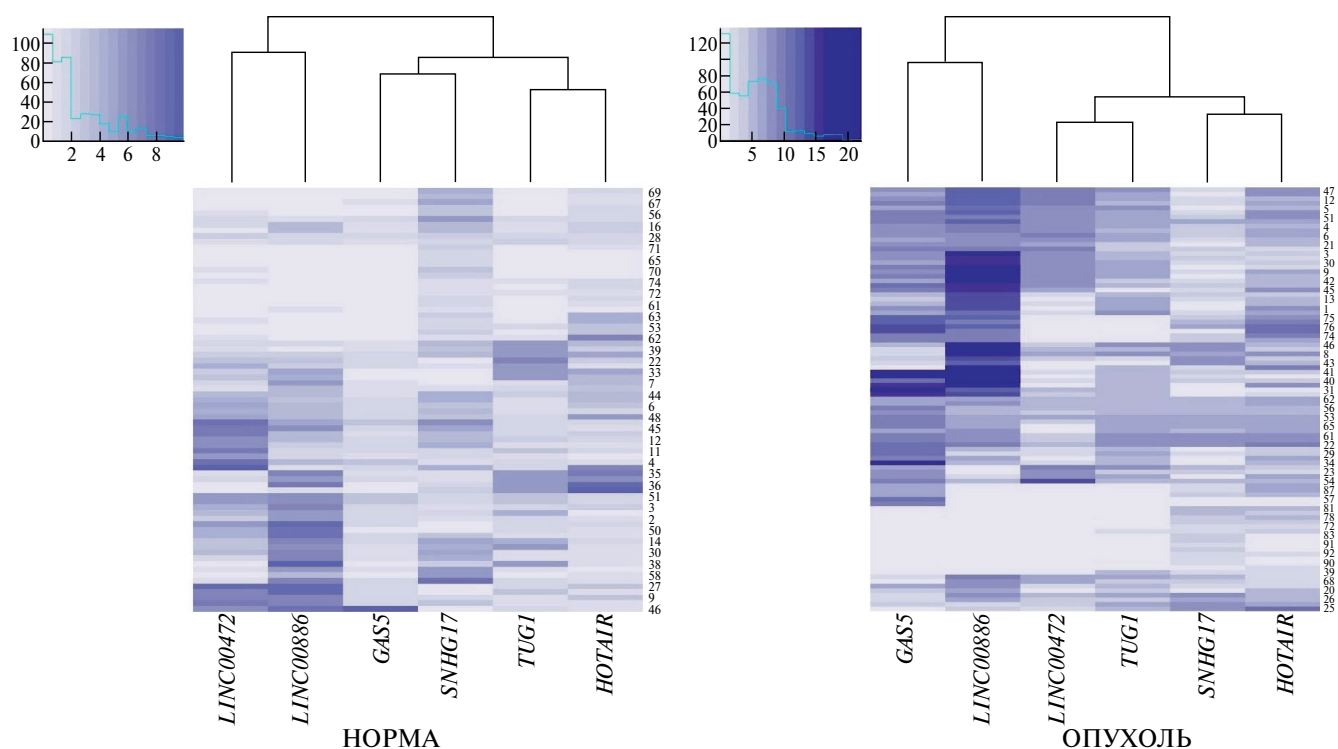
Следует отметить, что данные по гиперметилованию четырех генов днРНК (*LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*) при РЯ ранее не были опубликованы (PubMed 12.10.2023).

На более тяжелых клинических стадиях (III–IV, 51 образец опухолей РЯ) в сравнении с менее тяжелыми стадиями (I–II, 42 образца опухолей РЯ) наблюдается дальнейшее статистически значимое

(в 2–4 раза,  $p < 0.05$ ) повышение уровня метилирования пяти генов днРНК (кроме *SNHG17*), причем наиболее высоко значимое ( $p < 0.001$ ) повышение уровней метилирования выявлено для трех генов днРНК (*GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*), что показано на рис. 2.

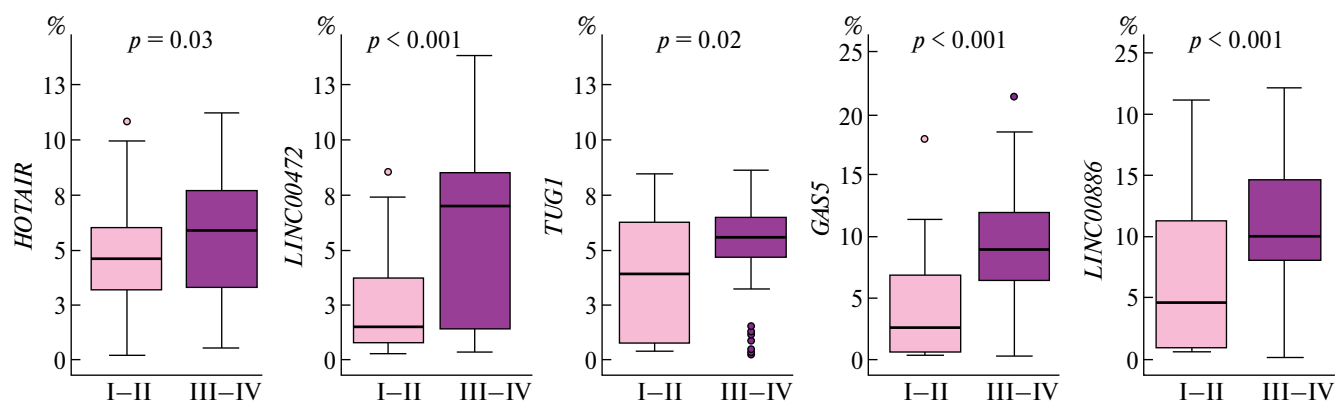
Аналогичный результат получен при сопоставлении данных для образцов, различающихся по размеру и степени распространенности рака (Т3, 52 образца, против Т1–Т2, 40 образцов): высоко значимое различие ( $p < 0.001$ ) найдено для тех же трех генов (*GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*). Повышение уровня метилирования для генов *HOTAIR* и *TUG1* менее значимо ( $p = 0.03$ ), для *SNHG17* – не выявлено.

Анализ образцов первичных опухолей РЯ от пациенток с метастазами (56 образцов) и без метастазов (37 образцов) выявил высоко значимую связь повышенного уровня метилирования с наличием метастазирования для генов *LINC00472* ( $p < 0.001$ ) и *HOTAIR* ( $p = 0.002$ ). Для трех других генов днРНК значимость различия уровней метилирования

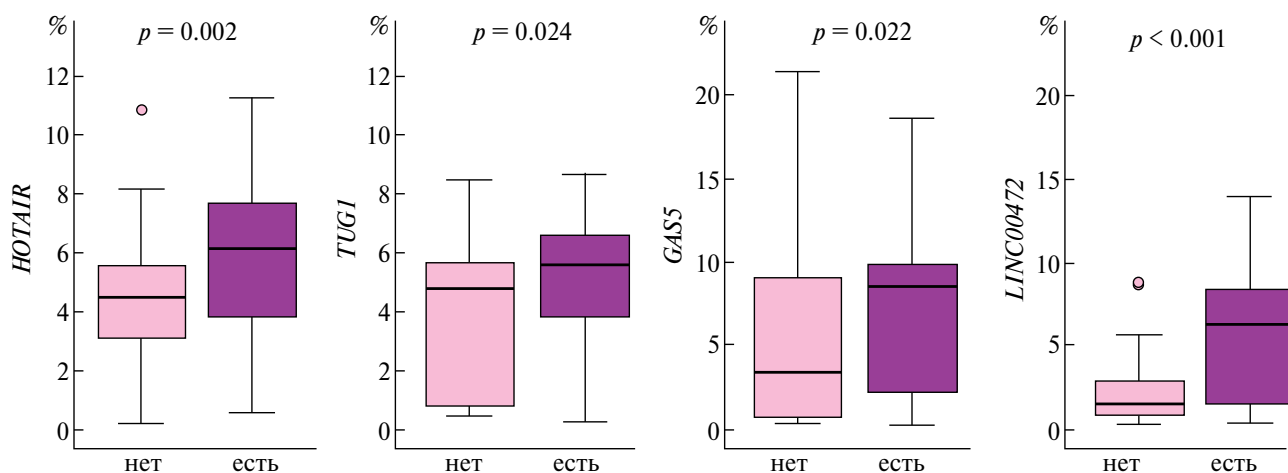


**Рис. 1.** Сравнение уровней метилирования шести генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*) в 93 образцах опухоли РЯ и в 75 парных образцах условной нормы; рассчитано с применением непараметрического критерия Манна–Уитни, показано в виде тепловой карты.





**Рис. 2.** Повышение уровня метилирования пяти генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886* и *TUG1*) на более поздних клинических стадиях (III–IV (51 образец) против I–II (42 образца)). На оси абсцисс – стадия заболевания.



**Рис. 3.** Повышение уровня метилирования генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *TUG1*) в первичных опухолях больных РЯ с метастазами (56 образцов) в сравнении с образцами опухолей больных без метастазов (37 образцов). По оси абсцисс – наличие или отсутствие метастазов.

в первичных опухолях между группами пациентов с метастазами и без таковых составили: *GAS5*,  $p = 0.022$ ; *TUG1*,  $p = 0.024$ ; для гена *SNHG17* различие не значимо (рис. 3).

*Влияние aberrантного метилирования на изменение уровня экспрессии генов днРНК GAS5, HOTAIR, SNHG17 и TUG1*

Если для генов днРНК *GAS5*, *LINC000472*, *LINC000886* имелись данные о влиянии метилирования на экспрессию в некоторых видах рака, то

для генов *HOTAIR*, *SNHG17* и *TUG1* такие данные полностью отсутствовали (PubMed, 30.09.2023). В связи с этим исследовано изменение уровня экспрессии для четырех днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *SNHG17* и *TUG1* в образцах РЯ относительно условной нормы; исследование выполнено на общей выборке из 36–53 образцов РЯ, использованных также в анализе aberrантного метилирования (рис. 4).

Наблюдается незначительное снижение уровня экспрессии днРНК *GAS5* (14/53 – 26%, против

18/53 – 34%, в 1.3 раза) в опухолях больных РЯ, высоко значимое снижение уровня экспрессии днРНК *HOTAIR* (8/36 – 22%, против 26/36 – 72%, в 3.2 раза,  $p < 0.001$ ), а также довольно значительное повышение уровня экспрессии днРНК *SNHG17* (18/36 – 55%, против 12/36 – 33%, в 1.5 раза) и незначительное повышение днРНК *TUG1* (9/45 – 20%, против 11/45 – 24%, в 1.2 раза). Многократное и высоко значимое снижение уровня экспрессии гена *HOTAIR* указывает на возможную роль метилирования в подавлении его экспрессии в опухолях РЯ. Полученные данные не исключают возможность вовлеченности метилирования в дерегуляцию экспрессии генов *GAS5* и *TUG1*. Однако значительное (в 1.5 раза) повышение уровня экспрессии днРНК *SNHG17* не согласуется с возможным участием выявленного гиперметилирования в подавлении экспрессии этой днРНК. Сопоставление результатов по изменениям уровней метилирования и экспрессии для этих четырех днРНК показало статистически значимую корреляцию только для гена *GAS5* ( $r_s = -0.47$ ,  $p < 0.001$ ), исследованного на большей выборке образцов (рис. 5).

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные подтверждают функциональную роль метилирования в подавлении экспрессии гена *GAS5*. При этом можно также предполагать, что метилирование может участвовать в регуляции генов *HOTAIR* и *TUG1*, но не гена *SNHG17*, который отличается наиболее повышенной экспрессией как по данным ресурса GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), так и по результатам нашего экспериментального исследования.

## ОБСУЖДЕНИЕ

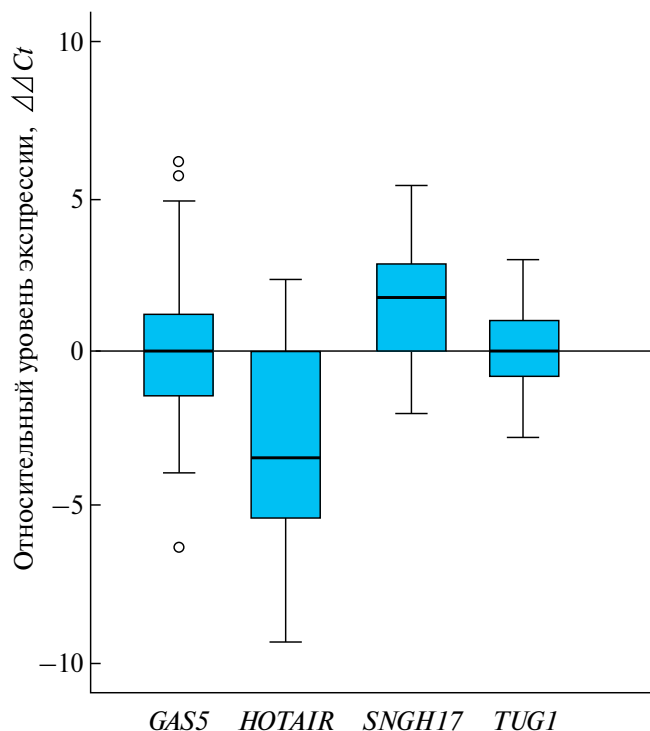
С применением биоинформатического анализа было отобрано шесть генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*, потенциально метилируемых при РЯ, из которых пять (*HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17*, *TUG1*) определены при анализе базы данных NCBI GEO. Чтобы оценить роль возможного участия метилирования в регуляции экспрессии этих генов в опухоли была использована платформа GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>). Результаты анализа позволили первично оценить уровень экспрессии каждого гена в опухоли яичника относительно нормальной ткани. Так, в отличие от рака легкого, почки и РМЖ, при серозной цистаденокарциноме яичника (доминирующем типе РЯ) выявлено сильное снижение уровня экспрессии днРНК *GAS5* и *TUG1*, которое могло быть вызвано aberrантным метилированием CpG-островков в промоторных участках этих генов. Кроме того, в международных исследованиях имеются единичные работы о

характере метилирования этих генов и влиянии метилирования на потенциал экспрессии. Так, согласно литературным источникам, получены данные о роли гиперметилирования в подавлении экспрессии гена *GAS5* в опухолях желудка, а также в меланоме и злокачественных опухолях молочной железы [20–22]. Таким образом, в настоящем исследовании поставлена задача выяснить значимость метилирования шести генов (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*) в развитии и прогрессии опухолей яичников, включая развитие метастазов, а также в дерегуляции экспрессии кодируемых ими днРНК. Проведенный анализ метилирования шести отобранных генов днРНК с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной МС-ПЦР показал статистически значимое повышение уровня метилирования всех шести исследованных генов: *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* и *TUG1*.

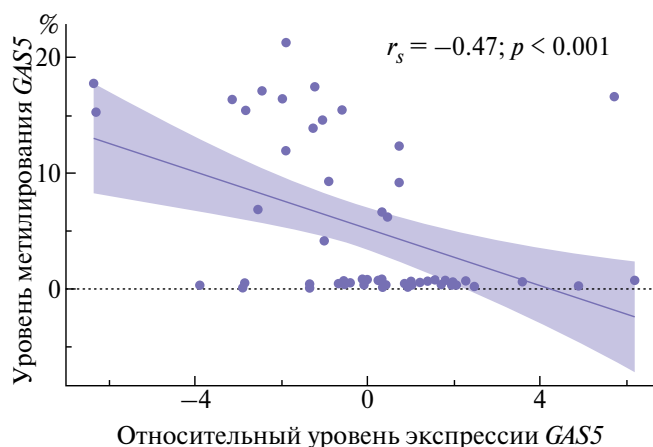
Сравнение уровней метилирования генов в образцах РЯ на разных клинических стадиях и в зависимости от размеров и распространенности рака показало дальнейшее возрастание уровня метилирования с прогрессией РЯ для пяти генов днРНК, кроме *SNHG17*. Для четырех генов (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *TUG1*) также установлена связь aberrантного метилирования с метастазированием РЯ (в лимфатические узлы, брюшину или другие органы).

Проведенный анализ изменения уровня экспрессии днРНК *SNHG17* в парных образцах РЯ позволил определить значимое повышение уровня ее экспрессии в опухоли. При этом связи гиперметилирования с экспрессией гена *SNHG17* выявлено не было. Характерно, что именно для гена этой днРНК не обнаружено также связи метилирования с какими-либо параметрами прогрессии РЯ (стадией, распространенностью, метастазированием). На основании этих результатов можно заключить, что aberrантное метилирование гена *SNHG17* не участвует в дерегуляции экспрессии этой днРНК. Этот результат согласуется с данными литературы об онкогенных свойствах днРНК *SNHG17*, в частности в патогенезе РЯ [23].

Для гена днРНК *GAS5* выявлено гиперметилирование при раке желудка, меланоме и в других видах рака [20–22]. В настоящей работе установлено гиперметилирование гена *GAS5* на представительной выборке образцов РЯ и впервые показана статистически значимая отрицательная корреляция между уровнями метилирования и экспрессии, подтверждающая участие aberrантного метилирования в подавлении экспрессии этой днРНК. Полученные нами данные согласуются с данными о супрессорной функции днРНК *GAS5* в опухолях разных локализаций, включая РЯ [24, 25].



**Рис. 4.** Профиль изменения уровня экспрессии днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *SNHG17* и *TUG1* на выборке из 36–53 образцов РЯ относительно условной нормы.



**Рис. 5.** Отрицательная корреляция между изменениями уровней метилирования и экспрессии гена *GAS5* (в 53 парных образцах РЯ); на рисунке приведен коэффициент корреляции Спирмена:  $r_s = -0.47$ ,  $p < 0.001$ .

Результат о гиперметилировании гена *HOTAIR* согласуется с данными о выявленном ранее aberrантном метилировании этого гена в клетках и тканях РЯ [26]. Снижение уровня экспрессии одновременно с увеличением уровня метилирования гена *HOTAIR*, и связь гиперметилирования с прогрессией РЯ, в том числе с клинической стадией, степенью распространённости и наличием метастазирования, позволяют предполагать участие процесса aberrантного метилирования гена *HOTAIR* в регуляции его экспрессии и супрессорную роль этой днРНК при РЯ.

Для днРНК *TUG1* ранее была показана повышенная экспрессия и онкогенные свойства во многих опухолях [27, 28]. Однако обнаруженное нами в настоящей работе многократное и статистически значимое повышение уровня метилирования гена *TUG1* в первичных опухолях РЯ, а также дальнейшее возрастание уровня метилирования с прогрессией РЯ (учитывая стадию, размеры и распространённость, а также метастазирование) позволяют предположить функциональное значение метилирования в инактивации этой днРНК и в патогенезе РЯ. С этим предположением согласуются данные сервиса GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) о сильном снижении уровня экспрессии днРНК *TUG1* при серозной цистаденокарциноме яичника (доминирующем типе РЯ) в отличие от рака легкого, почки и РМЖ, при которых наблюдается повышенная экспрессия.

Для межгенной днРНК *LINC00472* ранее была установлена роль гиперметилирования в регуляции её экспрессии в патогенезе рака молочной железы и желудка, а также супрессорные свойства в патогенезе некоторых видов рака [29, 30]. Однако повышенный уровень метилирования гена *LINC00472* в опухолях больных РЯ, а также данные о дальнейшем возрастании метилирования этого гена с повышением стадии и появлением метастазов выявлены нами впервые. Для гена *LINC00886* также имелись данные литературы о роли гиперметилирования в снижении экспрессии этой днРНК при раке гортани и при плоскоклеточном раке пищевода и в подавлении эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [31, 32]. Однако aberrантное метилирование гена *LINC00886* в опухолях больных РЯ, а также данные о связи гиперметилирования этого гена с прогрессией РЯ обнаружены нами впервые. Наш результат вместе с данными литературы позволяет предполагать, что aberrантное метилирование генов *LINC00472* и *LINC00886*, выявленное в настоящей работе в РЯ, вовлечено в дерегуляцию их экспрессии в РЯ.

Для оценки функциональной значимости шести исследованных днРНК, мы провели предварительный биоинформатический скрининг мРНК-мишеней, позитивно коррелирующих с

днРНК, с применением NCBI GEO (NCBI's Gene Expression Omnibus). Взята библиотека данных GSE211669 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE211669>) с результатами для 130 пациентов с диагнозом РЯ. По данным этого анализа, днРНК *GAS5* и *TUG1* наиболее задействованы в регуляции белковых генов. *GAS5* может прямо или опосредованно участвовать в позитивной регуляции 196 мРНК, а *TUG1* – 531 мРНК, *SNHG17* – 53 мРНК, *LINC00472* – 21 мРНК, *HOTAIR* – 4 мРНК и *LINC00886* – 2 мРНК ( $r_s \geq 0.5$ ,  $p \leq 10^{-9}$ ).

По данным PubMed (30.09.2023), к наиболее изученным днРНК в отношении патогенеза рака, и в частности РЯ, относятся именно *GAS5* (455 работ и 25 работ при РЯ) и *TUG1* (342 работы и 15 работ при РЯ). *GAS5* участвует в подавлении РЯ через активацию PTEN, Sprouty homolog 2 (SPRY2) и других онкосупрессоров [24, 33]. *GAS5* может подавлять инвазию и метастазирование рака поджелудочной железы и рака легкого, ингибируя ЭМП и стволовость раковых клеток [34, 35]. Эта днРНК выступает в роли супрессора в РМЖ, колоректальном раке, раке шейки матки, и вообще может подавлять до 20 видов рака, хотя при раке печени функционирует как онкоген [36]. В отношении *TUG1* опубликованные данные свидетельствуют об онкогенных функциях этой днРНК, например, через активацию ЭМП [28], хотя могут быть исключения, как для *GAS5* при раке печени. И можно предположить, что ингибирование гена *TUG1* в РЯ, по крайней мере частично, осуществляется за счет гиперметилирования, и что эта днРНК способна выступать супрессором при РЯ.

По итогам настоящего исследования можно утверждать, что процесс гиперметилирования генов *GAS5*, *LINC00472* и *LINC00886* в опухоли яичников является значимым регулятором экспрессии этих днРНК, что подтверждает супрессорный характер этих трех днРНК. При этом роль этого процесса для гена *SNHG17* как фактора регуляции экспрессии не значима, а определение роли гиперметилирования в дерегуляции генов *TUG1* и *HOTAIR* требует дальнейших исследований.

Интересно отметить, что гиперметилирование промоторного участка гена днРНК *LINC00473*, выявленное недавно в ДНК свободной от клеток плазмы больных колоректальным раком, предложено для ранней неинвазивной диагностики этого вида рака [37]. Обнаруженное нами гиперметилирование группы генов днРНК также открывает перспективы в разработке новых тестов для ранней диагностики РЯ.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант РНФ №20-15-00368П).

Исследование одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института

общей патологии и патофизиологии (18.04.2023, № 8-23-2).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все обследованные – совершеннолетние.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О.* Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России, 2022. 252 с.
2. *Vogell A., Evans M.L.* Cancer screening in women // *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 2019. V. 46. № 3. P. 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2019.04.007>
3. *Wei J.W., Huang K., Yang C., Kang C.S.* Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review) // *Oncol. Rep.* 2017. V. 37. № 1. P. 3–9. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>
4. *Hombach S., Kretz M.* Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 937. P. 3–17. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2_1)
5. *Baek D., Villén J., Shin C. et al.* The impact of microRNAs on protein output // *Nature.* 2008. V. 455. № 7209. P. 64–71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>
6. *Sanchez Calle A., Kawamura Y., Yamamoto Y. et al.* Emerging roles of long non-coding RNA in cancer // *Cancer Sci.* 2018. V. 109. № 7. P. 2093–2100. <https://doi.org/10.1111/cas.13642>
7. *Буре И.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В.* Длинные некодирующие РНК и их роль в онкогенезе // *Мол. Биология* 2018. Т. 52. № 6. С. 907–920. <https://doi.org/10.1134/S0026898418060034>
8. *Zhang X., Wang W., Zhu W. et al.* Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 22. <https://doi.org/10.3390/ijms20225573>
9. *Moutinho C., Esteller M.* MicroRNAs and epigenetics // *Adv. Cancer Res.* 2017. V. 135. P. 189–220. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.06.003>
10. *Ma L., Li C., Yin H. et al.* The mechanism of DNA methylation and miRNA in breast

- cancer // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 11. <https://doi.org/10.3390/ijms24119360>.
11. *Sheng X., Li J., Yang L. et al.* Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally expressed 3, a long non-coding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer // *Oncol. Rep.* 2014. V. 32. № 1. P. 277–285. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3208>
  12. *Gokulnath P., de Cristofaro T., Manipur I. et al.* Long non-coding RNA HAND2-AS1 acts as a tumor suppressor in high-grade serous ovarian carcinoma // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 11. <https://doi.org/10.3390/ijms21114059>
  13. *Di Fiore R., Suleiman S., Drago-Ferrante R. et al.* LncRNA *MORT (ZNF667-AS1)* in cancer – is there a possible role in gynecological malignancies? // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 15. <https://doi.org/10.3390/ijms22157829>
  14. *Бурденный А.М., Филиппова Е.А., Иванова Н.А. и др.* Гиперметилирование генов новых длинных некодирующих РНК в опухолях яичников и метастазах: двойственный эффект // *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 2021. Т. 171. № 3. С. 370–374. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05230-3>
  15. *Zhang W., Klinkebiel D., Barger C.J. et al.* Global DNA hypomethylation in epithelial ovarian cancer: Passive demethylation and association with genomic instability // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 3. <https://doi.org/10.3390/cancers12030764>
  16. *Klinkebiel D, Zhang W, Akers SN et al.* DNA methylome analyses implicate fallopian tube epithelia as the origin for high-grade serous ovarian cancer // *Mol Cancer Res.* 2016. V. 14. № 9. P. 787–794. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0097>
  17. *Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyy A.M. et al.* DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression // *Gene*. 2017. V. 604. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.018>
  18. *Pronina I.V., Uroshlev L.A., Moskovtsev A.A. et al.* Dysregulation of lncRNA–miRNA–mRNA interactome as a marker of metastatic process in ovarian cancer // *Biomedicines*. 2022. V. 10. № 4. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040824>
  19. *Tang Z., Kang B., Li C. et al.* GEPIA2: An enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis // *Nucl. Ac. Res.* 2019. V. 47. № W1. P. W556–W560. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>
  20. *Zhang N., Wang A.Y., Wang X.K. et al.* GAS5 is down-regulated in gastric cancer cells by promoter hypermethylation and regulates adriamycin sensitivity // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2016. V. 20. № 15. P. 3199–3205
  21. *Zhang Y.J., Xie R., Jiang J. et al.* 5-Aza-dC suppresses melanoma progression by inhibiting GAS5 hypermethylation // *Oncol. Rep.* 2022. V. 48. № 1. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8334>
  22. *Селезнева Ал. Д., Филиппова Е.А., Селезнева Ан. Д. и др.* Гиперметилирование группы генов длинных некодирующих РНК в развитии и прогрессии рака молочной железы // *Бюлл. Эксп. Биол. и Мед.* 2022. Т. 173. № 6. С. 754–758.
  23. *Wang W., Yu S., Li W. et al.* Silencing of lncRNA SNHG17 inhibits the tumorigenesis of epithelial ovarian cancer through regulation of miR-485-5p/AKT1 axis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022. V. 637. P. 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.10.091>
  24. *Dong Q., Long X., Cheng J. et al.* LncRNA GAS5 suppresses ovarian cancer progression by targeting the miR-96-5p/PTEN axis // *Ann. Transl. Med.* 2021. V. 9. № 24. <https://doi.org/10.21037/atm-21-6134>
  25. *Lin G., Wu T., Gao X. et al.* Research Progress of Long Non-Coding RNA GAS5 in Malignant Tumors // *Front Oncol.* 2022. V. 12. № 846497. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.846497>
  26. *Teschendorff A.E., Lee S.H., Jones A.* HOTAIR and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian cancer // *Genome Med.* 2015. V. 7. № 108. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0233-4>
  27. *Shen X., Hu X., Mao J. et al.* The long noncoding RNA *TUG1* is required for TGF- $\beta$ /TWIST1/EMT-mediated metastasis in colorectal cancer cells // *Cell. Death. Dis.* 2020. V. 11. № 1. № 65. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2254-1>
  28. *Kuang D., Zhang X., Hua S. et al.* Long non-coding RNA *TUG1* regulates ovarian cancer proliferation and metastasis via affecting epithelial-mesenchymal transition. // *Exp. Mol. Pathol.* 2016. V. 101. № 2. P. 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2016.09.008>
  29. *Shen Y., Wang Z., Loo L.W. et al.* LINC00472 expression is regulated by promoter methylation and associated with disease-free survival in patients with grade 2 breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* 2015. V. 154. № 3. P. 473–482. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3632-8>
  30. *Tsai K.W., Tsai C.Y., Chou N.H. et al.* Aberrant DNA hypermethylation silenced lncRNA expression in gastric cancer // *Anticancer Res.* 2019. V. 39. № 10. P. 5381–5391. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13732>
  31. *Lan L., Cao H., Chi W. et al.* Aberrant DNA hypermethylation-silenced *LINC00886* gene accelerates malignant progression of laryngeal carcinoma // *Pathol. Res. Pract.* 2020. V. 216. № 4. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.152877>
  32. *Dong Z., Yang L., Lu J. et al.* Downregulation of *LINC00886* facilitates epithelial-mesenchymal transition through SIRT7/ELF3/miR-144 pathway in esophageal squamous cell carcinoma // *Clin. Exp.*

- Metastasis. 2022. V. 39. № 4. P. 661–677.  
<https://doi.org/10.1007/s10585-022-10171-w>
33. Ma N., Li S., Zhang Q. et al. Long non-coding RNA GAS5 inhibits ovarian cancer cell proliferation via the control of microRNA-21 and SPRY2 expression // Exp. Theor. Med. 2018. V. 16. № 1. P. 73–82.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2018.6188>
34. Liu B., Wu S., Ma J. et al. lncRNA GAS5 reverses EMT and tumor stem cell-mediated gemcitabine resistance and metastasis by targeting miR-221/SOCS3 in pancreatic cancer // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2018. V. 13. P. 472–482.  
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.09.026>
35. Zhu L., Zhou D., Guo T. et al. LncRNA GAS5 inhibits invasion and migration of lung cancer through influencing EMT process // J. Cancer. 2021. V. 12. № 11. P. 3291–3298. <https://doi.org/10.7150/jca.56218>
36. Yang X., Xie Z., Lei X., Gan R. Long non-coding RNA GAS5 in human cancer // Oncol. Lett. 2020. V. 20. № 3. P. 2587–2594.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2020.11809>
37. Ruiz-Bañobre J., Rodriguez-Casanova A., Costa-Fraga N. et al. Noninvasive early detection of colorectal cancer by hypermethylation of the LINC00473 promoter in plasma cell-free DNA // Clin. Epigenetics. 2022. V. 14. № 86. <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01302-x>

## Hypermethylation in Ovarian Cancer of Long Non-Coding RNA Genes: *HOTAIR*, *GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*, *TUG1*

A. M. Burdenny<sup>1, \*</sup>, S. S. Lukina<sup>1</sup>, L. A. Uroshlev<sup>2</sup>, E. A. Filippova<sup>1</sup>,  
I. V. Pronina<sup>1</sup>, M. V. Fridman<sup>2</sup>, K. I. Zhordaniya<sup>3</sup>, T. P. Kazubskaya<sup>3</sup>,  
N. E. Kushlinskii<sup>3</sup>, V. I. Loginov<sup>1, 4</sup>, E. A. Braga<sup>1,4, \*\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia*

<sup>2</sup>*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia*

<sup>3</sup>*Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia*

<sup>4</sup>*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia*

\*e-mail: burdenny@gmail.com

\*\*e-mail: eleonora10\_45@mail.ru

Recently, more and more data have been accumulating indicating the role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in the regulation of biological processes in cells, as well as in the mechanisms of cancer development and progression. Aberrant methylation of promoter regions of both protein genes and lncRNA genes can disrupt their expression and functional activity. Using bioinformatics databases, six lncRNA genes (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* and *TUG1*) with CpG islands, differentially expressed and presumably hypermethylated in tumors of patients with ovarian cancer (OC) were selected. A statistically significant ( $p < 0.05$ ) increase in the methylation level in tumours was demonstrated in a sample of 93 OC specimens using methylation-specific real-time PCR assay. Moreover, for the genes *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17* and *TUG1*, hypermethylation in OC was detected for the first time. 5 genes (except *SNHG17*) showed a further increase in methylation levels at a more advanced stage, and 4 genes (except *SNHG17* and *LINC00886*) showed a significant association with metastasis. Using real-time RT-PCR, differential changes in the expression level of the *GAS5*, *HOTAIR*, *SNHG17* and *TUG1* genes and a significant correlation of methylation with expression for the *GAS5* gene were shown. Thus, hypermethylation associated with the progression and/or development of OC was detected for six lncRNA genes, which is important for elucidating the epigenetic processes involved in the pathogenesis of OC and can be used as new biomarkers of OC.

**Keywords:** long non-coding RNA genes, *HOTAIR*, *GAS5*, *LINC00472*, *LINC00886*, *SNHG17*, *TUG1*, aberrant methylation, ovarian cancer.

УДК 631.523.5;340.64

## ИНФОРМАТИВНОСТЬ СТАНДАРТНЫХ АУТОСОМНЫХ STR В ПОПУЛЯЦИЯХ КОРЕННЫХ НАРОДОВ РОССИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДСТВА ПЕРВОЙ СТЕПЕНИ

© К. В. Вагайцева<sup>1,\*</sup>, М. Е. Лопаткина<sup>1</sup>, Н. А. Колесников<sup>1</sup>, В. Н. Харьков<sup>1</sup>, В. А. Степанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

\*e-mail: kseniya.simonova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 03.11.2023 г.

После доработки 08.12.2023 г.

Принята к публикации 14.12.2023 г.

Действие различных генетико-демографических факторов на формирование генофонда привело к снижению уровня генетического разнообразия в малых изолированных популяциях коренных народов Российской Федерации. Такое снижение влияет на уровень информативности системы генетических маркеров при установлении родственных отношений. В нашем исследовании была проведена оценка эффективности двух стандартных наборов аутосомных STR (13 CODIS, 20 CODIS, Combined DNA Index System) для генетической экспертизы родства “родитель – ребенок” в четырех высоко инбридных популяциях РФ и популяции русских, с использованием двух типов референсных частот. Результаты проведенного исследования подтвердили предположение, что уровень идентификационной информативности стандартных аутосомных маркеров в высокоинбридных популяциях из Сибири и Дагестана ниже, чем в популяции русских. Совокупная информативность маркеров нового стандарта CODIS превосходит требуемые в приказе министерства здравоохранения и социального развития РФ (№ 346н) пороговые значения. При этом вероятность ложноположительного результата возрастает с увеличением коэффициента инбридинга в популяции.

*Ключевые слова:* ДНК-идентификация, популяционная генетика, уровень идентификационной информативности, определение родства, генетическая экспертиза, референсная база данных.

DOI: 10.31857/S0016675824050078 EDN: CJBLZB

Уровень идентификационной информативности генетических маркеров напрямую связан с уровнем генетического разнообразия в популяции. Причина этого заключается в том, что вероятность случайного совпадения генотипов анализируемого объекта и сравниваемого с ним образца ДНК тем меньше, чем больше вариантов аллелей встречается в популяции. При этом уровень генетического разнообразия варьирует между популяциями за счет действия различных генетико-демографических процессов. Популяции, проживающие на наибольшем генетическом расстоянии от места происхождения вида, обладают наименьшим уровнем гетерозиготности. Самый высокий уровень генетического разнообразия характерен для народов Африки, за которыми следуют популяции из Ближнего Востока, Европы, Центральной и Южной Азии. У населения Восточной Азии уровень генетического разнообразия еще ниже, а популяциях

жителей тихоокеанских островов и коренных американцев, находящихся на наибольшем географическом удалении по путям миграции, пройденным в ходе эволюции человека, являются наименее гетерозиготными [1]. Тенденция к снижению уровня генетического разнообразия показана на большом числе нейтральных генетических маркеров, в том числе на аутосомных STR, традиционно используемых для ДНК-идентификации [2].

Одна из последних публикаций, описывающих изменение уровня генетического разнообразия коренных народов России – работа Колесникова Н.А. и др. [3], где с помощью анализа широкогеномных данных была проведена оценка коэффициента геномного инбридинга для 76 популяций коренного населения Российской Федерации и стран ближнего зарубежья. Коэффициент геномного инбридинга отражает долю генома, расположенную в регионе высокой гомозиготности. Таким образом,



наибольший коэффициент геномного инбридинга характерен для популяций с наименьшим уровнем генетического разнообразия. Опубликованные результаты отражают общую тенденцию уменьшения уровня генетического разнообразия с запада на восток Евразии, за исключением популяций Дагестана. Согласно этим данным популяции Кавказа и Средней Азии обладают минимальными значениями коэффициента инбридинга. Популяции Волго-Уральского региона занимают промежуточное положение. Высокий уровень коэффициента инбридинга характерен для популяций Сибири и Дагестана, что вероятнее всего связано со значительной территориальной разделенностью популяций, проживающих в данных регионах, за счет рельефа местности, географических расстояний и климатических условий. Максимальное значение коэффициента инбридинга наблюдается в популяциях гинухцев и гунзибцев (Дагестан), причем показатель для гинухцев является одним из самых высоких в мире и схож лишь с уровнем инбридинга в изолированной популяции индейцев каритиана из бразильской Амазонии [3].

Наглядно снижение уровня идентификационной информативности и значимость выбранной референсной группы при определении родственных отношений продемонстрирована в двух зарубежных работах. В работе R. Rohlf с соавт. [4] уровень идентификационной информативности стандартных аутомомных STR-маркеров оценивался для пяти популяций: африканцы, европейцы США, латиноамериканцы, вьетнамцы, навахо. Анализ проводился *in silico*, то есть для анализа случаи родства генерировались искусственно, на основе популяционных частот. Полученные в этом исследовании результаты подтвердили тот факт, что для определенных локусов уровень идентификационной информативности ниже в группах с низкой дисперсией распределения частот, что приводит к снижению различимости родственных отношений, даже при использовании точных референсных данных. Когда порог принятия решения выбран таким образом, что вероятность идентификации родственников второй степени достаточно высока в популяциях, где уровень генетического разнообразия ниже, чем в используемых референсных частотах, вероятность ложноположительной семейной идентификации выше. Это может усугубляться неизвестными популяционными различиями, например мутациями в сайтах связывания праймеров [4].

В работе V. Zvenigorosky с соавт. [5], на реальных случаях родства, оценивалась эффективность и надежность генетической экспертизы в популяциях якутов (Сибирь) и бенинцев (Африка) при использовании трех типов референсных групп: частоты аллелей в выборке неродственных индивидов (а), частоты аллелей в тотальной выборке

анализируемой популяции (б), усредненные частоты аллелей по мировым данным (в). В данном эксперименте авторы собрали выборки индивидов с известными родственными отношениями разной степени и оценили информативность экспертизы проведенной с помощью 21 аутомомного STR, генотипирование осуществлялось наборами Investigator 24plex (Qiagen) и Globalfiler (Thermo Fisher). Оценивалось два показателя: вероятность обнаружения родства (эффективность) и вероятность ложноположительного результата (надежность). В результате было показано, что в якутской популяции экспертиза «родитель-ребенок» одинаково эффективна и надежна при выборе всех трех типов референсных групп. При этом надежность экспертизы, проводимой для родственников первой степени, в якутской популяции ниже, чем в популяции бенинцев. Эффективность выявления родственной связи между братьями/сестрами оказалась несколько выше при использовании референсных групп якутов (а, б), а в случае определения родства сводных братьев/сестер эффективнее оказалась усредненная референсная выборка (в). Однако надежность такой экспертизы в обоих случаях была выше при использовании референсных частот якутской популяции (а, б). Авторы отмечали, что в популяциях, для которых идентификационная информативность стандартной панели маркеров снижена и/или отсутствуют референсные значения частот, эксперт может быть не в состоянии отличить пару полных братьев и сестер от пары полусибсов [5].

Также о влиянии референсной группы на результаты экспертизы по установлению родственных отношений между индивидами из бурятской популяции ранее сообщалось в публикации Исаевой Е.Н. и др., где показано, что использование некорректной референсной выборки (европеоиды северной Америки) зависило показатели вероятности отцовства [6].

В настоящем исследовании была проведена оценка эффективности двух стандартных наборов аутомомных STR для генетической экспертизы родства первой степени в четырех высоко инбредных популяциях РФ и в популяции русских. Первый набор включает локусы стандарта CODIS (CODIS, Combined DNA Index System), действовавшего до 2017 г. и включавшего 13 аутомомных STR. Второй набор маркеров, анализируемый в данном исследовании – расширенный вариант стандарта CODIS, действующий с января 2017 г. [7].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки уровня идентификационной информативности системы аутомомных STR в высоко инбредных популяциях РФ мы провели оценку двух криминалистических показателей,

вероятности отцовства (Paternity Probability, *PP*), а также индекса отцовства (Paternity Index, *PI*). Частоты аллелей и генотипы, используемые для расчета, были получены ранее в рамках 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”), патент КОДИС-Р RU 2021622454 11.11.2021. Для анализа было выбрано пять популяций коренных народов РФ с разным уровнем геномного инбридинга: две популяции из Дагестана (андийцы ( $F_{\text{РОН}} = 0.0578$ ), гинухцы (0.1437)), две популяции Сибири – тувинцы (0.0591) и якуты (0.0723), а также одна популяция русских (0.0377).

Оценка показателей проводилась *in silico*, на основе популяционных данных. В рамках настоящей работы было сгенерировано по 1002 полных трио (для экспертизы доступны образцы предполагаемого родителя, ребенка и родителя, родство с которым не подвергается сомнению), и дуо (для экспертизы доступны образцы предполагаемого родителя и ребенка) для всех пяти популяций. При генерации (случайным образом) случаев из индивидов, составляющих популяционную выборку, мы сформировали по 334 искусственные пары. Для каждой такой пары было сгенерировано три потомка, с учетом того, что родители с равной вероятностью передают своему потомству по одному аллелю в каждом локусе. Частоты аллелей STR-локусов в сгенерированных таким образом выборках статистически значимо не отличались от частот аллелей в первоначальной популяции (критерий хи-квадрат Пирсона, уровень значимости  $p < 0.05$ ).

Помимо оценки криминалистических показателей в сгенерированных случаях был проведен поиск потенциальных родителей среди представителей соответствующих популяций для каждого ребенка. Реальные родители были исключены из анализа.

Расчеты *PP* и *PI* проводили согласно стандартным формулам [8] для двух наборов аутосомных STR (13 локусов CODIS: CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA, и 20 локусов CODIS: CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433, D22S1045). Для каждого случая оценка проводилась двумя способами: с использованием корректной референсной группы и с использованием средних по России референсных частот [9]. Порог принятия решения о вероятном родстве для трио равнялся  $PI \geq 1000$ , для дуо  $PI \geq 400$ . Все программы, используемые

для моделирования и расчетов, были написаны на языке Python.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы оценить, достаточно ли информативны стандарты аутосомных STR для экспертизы на родство в высокоинбридных популяциях России, мы оценили значения *PP* и *PI* для 10020 случаев. На основе популяционных данных были сгенерированы 1002 трио (родитель, предполагаемый родитель, ребенок) и 1002 дуо (предполагаемый родитель, ребенок) для пяти популяций с разным уровнем значения коэффициента  $F_{\text{РОН}}$  [3]: русские (0.0377), андийцы (0.0578), тувинцы (0.0591), якуты (0.0723), гинухцы (0.1437). В каждой таблице результатов, для удобства анализа популяции расположены в порядке возрастания уровня геномного инбридинга.

При анализе полных трио средние значения индекса отцовства и вероятности отцовства в пяти популяциях превысили пороговые значения, представленные в Приказе Министерства здравоохранения и социального развития РФ №3 46н (табл. 1, 2). Однако при анализе 13 аутосомных STR в популяции гинухцев в 21 (2.1%) сгенерированном случае полных трио и 618 (61.8%) дуо показатели не достигли порога принятия решения ( $PI < 1000$ ,  $PI < 400$  соответственно). В популяции якутов, при анализе с помощью 13 аутосомных STR, было выявлено 11 неубедительных результатов (1.1%) экспертизы трио и 428 (42.8%) дуо. В популяции тувинцев три случая трио и 213 случаев дуо не достигли требуемого порога при анализе с помощью 13 STR. При использовании расширенного набора маркеров (20 STR) случаи, когда криминалистические показатели не достигли принятого порогового значения, были выявлены только при экспертизе 16 дуо случаев в популяции гинухцев. Также показано, что использование усредненных референсных частот в высокоинбридных популяциях завышает значения показателей (табл. 3).

Выводы о достаточной информативности напрямую зависят от выбранного порога принятия решения о наличии родственных отношений между анализируемыми индивидами. Например, в Китае для подтверждения родства порог принятия решения составляет 10000 (*PI*) [11]. Если мы возьмем это пороговое значение для оценки информативности в нашем исследовании, будут признаны неубедительными результаты для гораздо большего числа экспертиз (табл. 3). Отметим также, что полученные значения доли экспертиз, не достигших требуемого порога принятия решения, занижены, поскольку генерация “детей” проводилась без учета возможности мутации в анализируемых локусах.

Таким образом, из полученных результатов следует, что информативность расширенного набора

**Таблица 1.** Средние значения и стандартное отклонение показателей идентификационной информативности в случаях экспертизы полных трио

| Популяция | Набор       | Точная референсная группа  |   | Референсная группа, россияне |   |
|-----------|-------------|----------------------------|---|------------------------------|---|
|           |             | <i>PP</i> (sd)             | <i>PI</i> (sd)                          | <i>PP</i> (sd)               | <i>PI</i> (sd)  |
| Рус.      | 13 маркеров | 0.999992<br>(0.00002)      | 21763079847<br>(332918895769)           | 0.999993<br>(0.00002)        | 12253095569618800<br>(183235273388355000)                               |
| Анд.      |             | 0.999993<br>(0.00002)      | 535289816<br>(6693901441)               | 0.999995<br>(0.00001)        | 1283830736984920000<br>(26676491095381200000)                           |
| Тув.      |             | 0.99998<br>(0.00008)       | 66681911 (848332027)                    | 0.999994<br>(0.00003)        | 5109514684 (128794392739)   |
| Як.       |             | 0.99992<br>(0.00003)       | 9289861106<br>(148171240278)            | 0.999991<br>(0.00002)        | 47828972895203200000<br>(1000459335519990000000)                        |
| Гин.      |             | 0.9998<br>(0.00003)        | 1960950 (13500794)                      | 0.999996<br>(0.00001)        | 413973204216057<br>(5224276537948190)                                   |
| Рус.      | 20 маркеров | 0.99999996<br>(0.00000002) | 1157225212913760<br>(14282006053073000) | 0.99999996<br>(0.00000001)   | 6763881348692140000000000<br>(10486824042508700000000000)               |
| Анд.      |             | 0.99999999<br>(0.00000001) | 126710591330963<br>(2449234403926140)   | 0.99999997<br>(0.00000003)   | 4918512278695320000000000000000<br>(1061373650778270000000000000000000) |
| Тув.      |             | 0.99999998<br>(0.00000007) | 847376637300<br>(9951259215426)         | 0.99999998<br>(0.000000009)  | 273387848232467<br>(8137984535706190)                                   |
| Як.       |             | 0.9999998<br>(0.00000007)  | 68531967847183<br>(1167928870429900)    | 0.99999997<br>(0.00000001)   | 2916363053944620000000000000<br>(5993798576654140000000000000)          |
| Гин.      |             | 0.999998<br>(0.000006)     | 30066518080<br>(256025790550)           | 0.999999991<br>(0.000000004) | 9259553187056510000<br>(126552648134884000000)                          |

Примечание. Рус. – русские, Анд. – андийцы, Тув. – тувинцы, Як. – якуты, Гин. – гинухцы. В скобках указаны значения стандартного отклонения.

стандартных аутомных STR превосходит требуемые в РФ на настоящий момент пороговые значения. Однако стоит помнить о том, что, несмотря на высокую информативность современных коммерческих мультиплексов, вероятность ошибочного заключения сохраняется. Так, в литературе описан случай, когда генетическая экспертиза, проведенная с помощью 46 аутомных маркеров STR, получила ложноположительный результат при установлении родственных отношений между предполагаемой матерью и ребенком [12]. В публикации Ковтуна П.А и др. при установлении родственных отношений между предполагаемыми родителями и детьми ложноположительный результат был получен при анализе набора из 15 аутомных STR [13]. Во всех трех описанных случаях предполагаемый родитель и ребенок имели общие аллели по каждому анализируемому локусу.

В связи с этим для каждого сгенерированного ребенка мы провели поиск индивидов в популяции, для которых результат вероятностных расчетов превысил бы значения порога принятия решения. Пара, на основе генотипов которой генерировался генетический профиль ребенка, из поиска была исключена. Таким образом, была рассчитана доля ложноположительных результатов при

условии, что у предполагаемого родителя и ребенка отсутствуют несовпадения аллелей (табл. 4). Из таблицы видно, что процент таких ложноположительных результатов растет при увеличении уровня инбридинга в популяции, не вписывается в эту тенденцию только популяция андийцев.

В целом, результаты настоящего исследования подтвердили предположение, что уровень идентификационной информативности стандартных аутомных маркеров в высокоинбридных популяциях Сибири и Дагестана ниже, чем в популяции русских. Совокупная информативность маркеров нового стандарта CODIS превосходит требуемые в Приказе Министерства здравоохранения и социального развития РФ (№ 346н) пороговые значения. При этом вероятность ложноположительного результата возрастает с увеличением коэффициента инбридинга в популяции.

Данные результаты правомерны для анализируемой нами модели популяции, однако нужно отметить, что в данном варианте расчетов при генерации случаев мы приняли допущение, что в популяции отсутствует ассортативность. При генерации второго поколения и поиске ложноположительных связей не учитывалась возможность возникновения случайных мутаций. Поиск

**Таблица 2.** Средние значения и стандартное отклонение показателей идентификационной информативности в случаях экспертизы "один родитель — один ребенок" / "родитель — ребенок"

| Популяция | Набор       | Точная референсная группа |                        | Референсная группа, россияне |   |
|-----------|-------------|---------------------------|------------------------|------------------------------|---|
|           |             | <i>PP</i> (sd)            | <i>PI</i> (sd)         | <i>PP</i> (sd)               | <i>PI</i> (sd)                          |
| Рус.      | 13 маркеров | 0.9992 (0.001)            | 7975 (34066)           | 0.9993 (0.0008)              | 25682 (291796)                          |
| Анд.      |             | 0.9993 (0.0009)           | 12397 (101573)         | 0.9996 (0.0006)              | 19635497 (404092850)                    |
| Тув.      |             | 0.998 (0.002)             | 3044 (10955)           | 0.9995 (0.0006)              | 32121 (403925)                          |
| Як.       |             | 0.996 (0.004)             | 3145 (14838)           | 0.9995 (0.0007)              | 128815 (1209796)                        |
| Гин.      |             | 0.994 (0.006)             | 828 (2774)             | 0.9996 (0.0005)              | 58369871 (640640448)                    |
| Рус.      | 20 маркеров | 0.999995 (0.000009)       | 181614399 (3617645858) | 0.999996 (0.000008)          | 73406389580528600 (1869619268014010000) |
| Анд.      |             | 0.999992 (0.00001)        | 4099054 (40093714)     | 0.999997 (0.000005)          | 8501869983 (134260262672)               |
| Тув.      |             | 0.99997 (0.00005)         | 503869 (2546337)       | 0.999997 (0.000006)          | 13146120 (143938396)                    |
| Як.       |             | 0.9999 (0.0002)           | 1085648 (23218559)     | 0.999997 (0.000005)          | 2864383370 (52431704081)                |
| Гин.      |             | 0.9996 (0.0006)           | 55653 (417673)         | 0.999998 (0.000003)          | 51318486753 (680675090558)              |

Примечание. Рус. – русские, Анд. – андийцы, Тув. – тувинцы, Як. – якуты, Гин. – гинухцы. В скобках указаны значения стандартного отклонения.

**Таблица 3.** Количество анализируемых случаев, не преодолевших порог принятия решения

|   | Популяция | 13 STR   |           | 20 STR |         |
|---|-----------|----------|-----------|--------|---------|
|   |           | трио     | дуо       | трио   | дуо     |
| <i>PI</i> > 400 (дуо),<br><i>PI</i> > 1000 (трио) | Русские   | 0 (0)    | 259 (35)  | 0 (0)  | 0 (0)   |
|   | Андийцы   | 0 (0)    | 48 (17)   | 0 (0)  | 0 (0)   |
|   | Тувинцы   | 3 (0)    | 213 (18)  | 0 (0)  | 0 (0)   |
|   | Якуты     | 11 (0)   | 428 (131) | 0 (0)  | 0 (0)   |
|   | Гинухцы   | 21 (0)   | 618 (9)   | 0 (0)  | 16 (0)  |
| <i>PI</i> > 10000 (дуо, трио)                     | Русские   | 8 (4)    | 863 (855) | 0 (0)  | 2 (1)   |
|   | Андийцы   | 8 (5)    | 816 (713) | 0 (0)  | 4 (0)   |
|   | Тувинцы   | 41 (7)   | 957 (809) | 0 (0)  | 54 (1)  |
|   | Якуты     | 149 (17) | 954 (766) | 0 (0)  | 249 (0) |
|   | Гинухцы   | 202 (2)  | 994 (609) | 1 (0)  | 611 (0) |

Примечание. В скобках указаны значения, полученные при использовании средних референсных частот.

**Таблица 4.** Процент экспертиз, показавших ложноположительные родственные связи (случаи, где у предполагаемого родителя и ребенка были несовпадения аллелей по 1–2 локусам, не учитывались)

| Популяция | 13 STR       |               | 20 STR |               |
|-----------|--------------|---------------|--------|---------------|
|           | трио         | дуо           | трио   | дуо           |
| Русские   | 0 (0)        | 0.04 (0.05)   | 0 (0)  | 0.003 (0.003) |
| Андийцы   | 0 (0)        | 0.035 (0.047) | 0 (0)  | 0 (0)         |
| Тувинцы   | 0 (0)        | 0.05 (0.11)   | 0 (0)  | 0.004 (0.004) |
| Якуты     | 0.009 (0.01) | 0.079 (0.44)  | 0 (0)  | 0.01 (0.01)   |
| Гинухцы   | 0 (0)        | 0.027 (0.23)  | 0 (0)  | 0.019 (0.023) |

Примечание. В скобках указаны значения, полученные при использовании средних референсных частот.

ложноположительных вариантов предполагаемых родителей осуществлялся только в одном поколении и только среди индивидов, не являющихся родственниками. Внесение соответствующих поправок в модель приведет к увеличению доли ложноположительных и неубедительных результатов.

Согласно полученным в настоящей работе данным, для проведения экспертизы родства первой степени в популяциях Дагестана и Сибири рекомендуется выбирать наборы для мультиплексного анализа, включающие расширенный состав стандартных маркеров (20 и более). В случаях, когда для определения родства используются наборы с меньшим числом маркеров, необходимо использовать точные референсные данные – это позволит избежать завышенных значений криминалистических показателей. При этом референсные частоты должны быть получены на однородных выборках, то есть включающих только индивидов, принадлежащих к конкретной этно-территориальной группе. Более того, на наш взгляд, полученные результаты подчеркивают необходимость использования дополнительных типов генетических маркеров (X, Y, mtДНК) при проведении генетической экспертизы, касающейся определения родственных отношений в дуо случаях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №23-74-10058, <https://rscf.ru/project/23-74-10058/>.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosenberg N.A., Kang J.T.L. Genetic diversity and societally important disparities // *Genetics*. 2015. V. 201. № 1. P. 1–12. doi: 10.1534/genetics.115.176750
2. Silva N.M., Pereira L., Poloni E. S., Currat M. Human neutral genetic variation and forensic STR data // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049666>
3. Колесников Н.А., Харьков В.Н., Зарубин и др. Особенности геномного распределения регионов высокой гомозиготности у коренного населения Северной Евразии на индивидуальном и популяционном уровнях на основе анализа SNP высокой плотности // *Генетика*. 2021. Т. 57. № 11. С. 1261–1275. <https://doi.org/10.31857/S0016675821110059>
4. Rohlf S.R.V., Fullerton S.M., Weir B.S. Familial identification: Population structure and relationship distinguishability // *PLoS Genet*. 2012. V. 8. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002469>
5. Zvenigorosky V., Sabbagh A., Gonzalez A. et al. The limitations of kinship determinations using STR data in ill-defined populations // *Int. J. Legal. Med*. 2020. V. 134. №. 6. P. 1981–1990. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02298-w>
6. Исаева Е.Н., Исаев Ю.С., Семинский И.Ж. Значение ДНК маркеров при судебно-медицинской экспертизе родства у этнических бурят Байкальского региона Восточной Сибири // *Сиб. мед. журнал (Иркутск)*. 2011. Т. 104. № 5. С. 24–27. Combined DNA Index System (CODIS): Overview // FBI Resources for Law Enforcement. URL: <https://le.fbi.gov/science-and-lab/biometrics-and-fingerprints/codis#Overview> (Accessed 11 Dec 2023).

7. *Культин А.Ю.* Экспертная оценка и вероятностно-статистическая обработка результатов исследования ДНК при установлении биологического родства. М.: ЭКЦ МВД России, 2011. 132 с.
8. *Культин А.Ю., Полякова А.В.* Генетическое разнообразие 38 аутомомных STR-маркеров в российской популяции // Судебная экспертиза Беларуси. 2023. Т. 1. № 16. С. 69–73.
9. *Культин А.Ю., Полякова А.В., Константинов С.В. и др.* Частоты встречаемости аллелей аутомомных STR-локусов у жителей России. Справочник. М.: ЭКЦ МВД России, 2022. 276 с.
10. *Gao H., Wang C., Zhang R., Wu H. et al.* Application of CPI cutoff value based on parentage testing of duos and trios typed by four autosomal kits // PLoS One. 2019. V. 14. № 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225174>. eCollection 2019
11. *Li L., Ge J., Zhang S.* Maternity exclusion with a very high autosomal STRs kinship index // Int. J. Legal Med. 2012. V. 126. № 4. P. 645–648. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0668-8>
12. *Ковтун П.А., Куклев М.Ю., Лапенков М.И., Плахина Н.В.* Недостаточность аутомомных STR-маркеров для достоверного установления родства в дугах родитель – ребенок // Судебно-медицинская экспертиза. 2013. Т. 56. № 6. С. 17–22.

## Identifiable Information Value of Standard Autosomal STR in Indigenous Populations of Russia for Determination of First-Degree Relatedness

**K. V. Vagaitseva<sup>1, \*</sup>, M. E. Lopatkina<sup>1</sup>, N. A. Kolesnikov<sup>1</sup>, V. N. Kharkov<sup>1</sup>, V. A. Stepanov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, 634050 Russia*

*\*e-mail: kseniya.simonova@medgenetics.ru*

The effects of the demographic history of mankind have led to the fact that the indigenous peoples of Dagestan and Siberia are inferior in terms of genetic diversity to the populations of Europe, which affects the level of identification informativeness of standard forensic autosomal markers in these populations. In our study, we evaluated the effectiveness of two standard sets of autosomal STRs (13 CODIS, 20 CODIS, Combined DNA Index System) for the genetic testing of parent-child relatedness in four highly inbred populations of the Russian Federation and the Russian population, using two types of reference frequencies. The results of the study confirmed the assumption that the level of identification informativity of standard autosomal markers in highly inbred populations of Siberia and Dagestan is lower than in the Russian population. The total information content of markers of the new CODIS standard exceeds the threshold values required in the order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation (No. 346n). At the same time, the probability of a false positive result increases with an increase in the inbreeding coefficient in the population.

**Keywords:** forensic genetics, population genetics, level of identification informativity, kinship determination, genetic test, reference database.

УДК 575.22:631.523.13:633.11

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕНОВ ГИБРИДНОГО НЕКРОЗА В ГЕНОТИПАХ СОРТОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.) АНГЛИЙСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

© В. А. Пухальский<sup>1</sup>,\*, А. М. Кудрявцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: pukhalsk@vigg.ru

Поступила в редакцию 19.12.2023 г.

После доработки 09.01.2024 г.

Принята к публикации 12.01.2024 г.

Исследовано генетическое разнообразие 15 сортов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) английской селекции. Установлено, что из изучавшихся сортов 11 (73,3%) несут ген *Ne2* (генотип *ne1ne1Ne2Ne2*), а 4 сорта (26,7%) были свободны от генов гибридного некроза (генотип *ne1ne1ne2ne2*). Ген *Ne1* обнаружен не был. Сорта с геном *Ne2* различались по силе его аллелей. У четырех сортов установлен аллель средней силы – *Ne2<sup>m</sup>* (*moderate*), а в генотипах семи сортов аллель промежуточной силы – *Ne2<sup>ms</sup>* (*moderately strong*).

**Ключевые слова:** гены гибридного некроза, комплементарное взаимодействие генов, сила аллелей, озимая мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.).

**DOI:** 10.31857/S0016675824050089 **EDN:** CJAHSV

Явление летальности первого гибридного поколения пшеницы впервые было описано в 1929 г. [1]. Позже было показано, что гибридный некроз вызывается комплементарным взаимодействием двух доминантных генов *Ne1* и *Ne2* [2–4]. При этом для гена *Ne1* описано три аллеля, а для гена *Ne2* – пять. Установлена видовая специфичность генов гибридного некроза и специфика их распространения в различных регионах земного шара. При этом выявлено определенное влияние селекции на распространение и соотношение генов гибридного некроза в генотипах озимой и яровой мягкой пшеницы различных стран [5, 6]. В целом же не произошло полного исчезновения этих генов из селекционных популяций пшеницы. В связи с этим остается важным изучение некрозных генотипов селекционных сортов для обоснования программ селекции и подбора исходного селекционного материала [6].

Нами было проведено исследование генотипов 15 современных сортов озимой мягкой пшеницы английской селекции на предмет отягощенности их генотипов генами гибридного некроза. В качестве тестеров использовали сорта яровой мягкой пшеницы Marqillo (генотип *Ne<sup>1s</sup>Ne1sne2ne2*) и Балаганка (генотип *ne1ne1Ne2<sup>s</sup>Ne2s*). Семена сортов озимой пшеницы из коллекции академика А.А. Созинова перед посевом были подвергнуты

яровизации. Скрещивание с тестерами проводили твел-методом в полевых условиях. Некроз выявляли на разных стадиях онтогенеза растений F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> в полевых условиях, используя критерии, описанные в [7, 8]. Полученные результаты приведены в табл. 1. Установлено, что из изучавшихся сортов 11 (73,3%) несли ген *Ne2* (генотип *ne1ne1Ne2Ne2*), а 4 сорта (26,7%) были свободны от генов гибридного некроза (генотип *ne1ne1ne2ne2*). Сорт с геном *Ne1* (генотип *Ne1Ne1ne2ne2*) не выявлено. Изучавшиеся сорта генотипа *ne1ne1Ne2Ne2* различались по силе аллелей гена *Ne2*. Так, в генотипах сортов Avilon, Armada, Calahad и Norman установлен аллель средней силы *Ne2<sup>m</sup>* (*moderate*), а в генотипах сортов Aqila, Brigand, Hustler, Longbow, Maris-Huntsman, Fenman и Stetson аллель промежуточной силы *Ne2<sup>ms</sup>* (*moderately strong*).

Полученные в настоящем исследовании данные по соотношению некрозных генотипов озимых пшениц английской селекции хорошо согласуются с полученными ранее данными по генотипам озимых сортов России, Индии, и других стран [9–11]. При этом высокий процент аллеля *Ne2* гена гибридного некроза в генотипах современных сортов озимой мягкой пшеницы обусловлен сцеплением этого гена с генами устойчивости к фитопатогенам, а также с генами ряда хозяйственно-ценных признаков [12–15]. Эти данные в определенной

**Таблица 1.** Генотипы по генам гибридного некроза английских сортов озимой мягкой пшеницы

| №  | Сорт           | Родословная  | Год включения в производство | Некротный генотип          |
|----|----------------|--|------------------------------|----------------------------|
| 1  | AVILON         | Maris–Ploughman/Bilbo  | 1980                         | <i>ne1Ne2<sup>n</sup></i>  |
| 2  | AQILA          | Tadorna/Carstens-854   | 1972                         | <i>ne1Ne2<sup>ms</sup></i> |
| 3  | ARMADA         | TR–118//Perdix//Hybride-46/4/Capelle-desperetz/Champlein/3/Viking/Tetrix//Tetrix/Jubilegem | 1978                         | <i>ne1Ne2<sup>n</sup></i>  |
| 4  | BRIGAND        | Maris–Huntsman/Maris-Bilbo   | 1979                         | <i>ne1Ne2<sup>ms</sup></i> |
| 5  | BOUNTY         | ?  | ?                            | <i>ne1ne2</i>              |
| 6  | FLANDERS       | Champlein/FD–2816–348  | 1949                         | <i>ne1ne2</i>              |
| 7  | CALAHAD        | ?  | ?                            | <i>ne1Ne2<sup>n</sup></i>  |
| 8  | HUSTLER        | Maris–Huntsman/Maris–Durin   | 1978                         | <i>ne1Ne2<sup>ms</sup></i> |
| 9  | LONGBOW        | TJB–268-175/Hobbit   | 1980                         | <i>ne1Ne2<sup>ms</sup></i> |
| 10 | MARIS HUNTSMAN | Cappelle*4/Hybrid-46, GBR//2*Professor Marshal   | 1980                         | <i>ne1Ne2<sup>ms</sup></i> |
| 11 | NORMAN         | TJB–268-175/(SIB)Hobbit  | 1981                         | <i>ne1Ne2<sup>n</sup></i>  |
| 12 | RAPIER         | Maris–Ranger/Mayo-64/Chile 8923/3/Maris-Beacon   | 1981                         | <i>ne1ne2</i>              |
| 13 | FENMAN         | TJB–268-175/(SIB)Hobbit  | 1978                         | <i>ne1Ne2<sup>ms</sup></i> |
| 14 | STETSON        | TR–226/Lincoln/Benno   | 1981                         | <i>ne1Ne2<sup>ms</sup></i> |
| 15 | VIRTNE         | ?  | ?                            | <i>ne1ne2</i>              |

степени обосновывают факт сохранения и распространения генотипов пшеницы *ne1ne1Ne2Ne2* в селекционных программах и в популяциях селекционных сортов пшеницы в качестве генетического груза на протяжении почти 100 лет. Однако остается непонятным сохранение в генотипах сортов пшеницы ряда регионов мира гена *Ne1*, это требует дальнейшего изучения.

Авторы выражают искреннюю благодарность М.П. Слезиной за помощь при оформлении данной рукописи в печать.

Работа выполнена при бюджетном финансировании.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объектов животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объектов людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Декапрелевич Л.Л. О нежизнеспособном потомстве при скрещивании пшениц // Список докладов и тезисы Всесоюзного съезда по генетике, селекции, семеноводству и племенному животноводству, Ленинград, 10-16 янв. 1929 г. Л.: Изд. Орг. бюро Съезда, 1929. Л.: 1929.
2. Костюченко И.А. Явление преждевременной гибели гибридов при скрещивании пшениц // Социалистическое растениеводство. 1936. № 19. С. 127–136.



3. *Hermesen J.G.T.* The genetic basis of hybrid necrosis in wheat. *Genetica (The Netherlands)* // 1963a. V. 12. P. 245–287
4. Пухальский В.А. Материалы к изучению генов некроза в роде *Triticum* L. // *Генетика*. 1996. Т. 32. № 4. С. 541–543.
5. *Zeven A.C.* Geographical distribution of genes of hybrid necrosis in wheat // *Euphytica*. 1966. V. 15. № 3. P. 281–284.
6. Пухальский В.А., Мартынов С.П., Добротворская Т.В. Гены гибридного некроза пшениц (Теория вопроса и каталог носителей летальных генов). М.: Изд-во ТСХА. 2002. 315 с.
7. *Hermesen J.G.T.* Quantitative investigations on progressive necrosis in wheat hybrids // *Euphytica*. 1960. V. 9. № 1. P. 141 – 172.
8. *Hermesen J.G.T.* Hybrid necrosis as a problem for the wheat breeder // *Euphytica*. 1963b. V. 12. P. 1–16.
9. *Singh S., Channadhary H.K., Sethi G.S.* Distribution and allelic expressivity of genes for hybrid necrosis in some elite winter and spring wheat ecotypes // *Euphytica*. 2000. V. 112. P. 95–100.
10. Пухальский В.А., Билинская Е.Н., Кудрявцев А.М. Мониторинг отягощенности геномов сортов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) генами гибридного некроза // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 12. С. 1466–1472.  
<https://doi.org/10.1134/S0016675818120123>
11. *Bomblies K., Weigel D.* Hybrid necrosis: Autoimmunity as a potential gene – flow barrier in plant species // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 1. P. 2–12.
12. *McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F.* Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. Melbourne: CSIRO Publications, 1995. 226 p.
13. Михайлова Л.А. Устойчивость пшеницы к бурой ржавчине // Идентифицированный генофонд растений и селекция. 2005. СПб.: ВИР, С. 513–526.
14. Рункина Л.А. О возможной связи генов гибридного некроза с генами, контролирующими другие селекционно – ценные признаки // *Бюлл. ВИР*. 1991. Вып. 210. С. 24–26.
15. *Morris R.* Chromosomal location of genes for wheat characters by *chromosomes* // *Ann. Wheat Newsletter (Kansas)*. 1959. V. 6. P. 45–49.

## Distribution of Hybrid Necrosis Genes in Genotypes of Winter Soft wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars of English Selection

V. A. Pukhalskij<sup>1, \*</sup>, A. M. Kudryavtsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

*\*e-mail: pukhalsk@vigg.ru*

The genetic diversity of 15 cultivars of winter soft wheat of English selection has been studied. It was found that 11 (73.3%) of the cultivars studied carried the *Ne2* gene (genotype *ne1ne1Ne2Ne2*), and four cultivars (26.7%) were free of hybrid necrosis genes (genotype *ne1ne1ne2ne2*). The *Ne1* gene was not detected. Cultivars with the *Ne2* gene differed in allele strength. *Moderate* (*m*) allele was identified in four cultivars, and *moderately strong* (*ms*) allele was identified in the genotypes of seven cultivars.

**Keywords:** hybrid necrosis genes, complementary gene interaction, allele strength, winter soft wheat (*Triticum aestivum* L.).